

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E MOLECULAR DE
CAMPYLOBACTER spp., *SALMONELLA* spp. e
ESCHERICHIA COLI EM CARÇAÇAS DE FRANGO**

ISAMERY AUXILIADORA MACHADO DE SARMIENTO

Botucatu – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E MOLECULAR DE
CAMPYLOBACTER spp., *SALMONELLA* spp. e
ESCHERICHIA COLI EM CARCAÇAS DE FRANGO**

ISAMERY AUXILIADORA MACHADO DE SARMIENTO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título
de Doutora

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA
INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU -
UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Machado de Sarmiento, Isamery Auxiliadora.

Diagnóstico microbiológico e molecular de *Campylobacter*
spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em carcaças de
frango/ Isamery Auxiliadora Machado de Sarmiento.-
Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50503006

1. Frango de corte - Carcaças. 2. Integrons. 3.
Salmonella. 4. *Escherichia coli*. 5. *Campylobacter*. 6.
Alimentos - Contaminação. 7. Diagnóstico microbiológico.

Palavras-chave: Aves; Doenças de transmissão alimentar;
Enteropatógenos; Integron; Resistência antimicrobiana.

Nome do Autor: Isamery Auxiliadora Machado de Sarmiento

Título: DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E MOLECULAR DE *CAMPYLOBACTER* SPP., *SALMONELLA* SPP. e *ESCHERICHIA COLI* EM CARÇAÇAS DE FRANGO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ-UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ-UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Francisco Javier Pedraza-Ordoñez
Membro
Departamento de Salud Animal
Universidad de Calda, Manizales-Colombia.

Profa. Dra. Valéria Barbosa de Souza
Membro
Departamento de Farmacologia
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

Data da Defesa: 30 de junho de 2016

DEDICATORIA

Ao Divino Deus e minha mãe que desde o céu me cuidam

Meus filhos e esposo, razão de vida

Meu pai, minha família, meus amigos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Noeme Sousa Rocha, por ter me aceitado como orientada, e sobretudo pelo seu apoio incondicional durante meu doutorado;

À meu coorientador, Professor Doutor Adriano Okamoto, pela ajuda na elaboração e correção do trabalho, assessoramento nos isolamentos das bactérias *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, e no diagnóstico molecular no laboratório de Ornitopatologia.

Ao Professor Doutor José Rafael Modolo pela sua colaboração no laboratório de Planejamento de Saúde Animal para o isolamento de *Campylobacter* spp., além de compartilhar seu valioso conhecimento dessa bactéria e Planejamento de Saúde Pública;

À senhora Tania Maria Martins pela sua valiosa ajuda, dedicação, colaboração para o isolamento de *Campylobacter* e sua amizade;

Ao senhor Fernando Paganini do Laboratório de Diagnóstico Microbiológico de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos pela sua dedicação no ensino em tudo relacionado com isolamento de bactérias;

A todos os amigos do Laboratório de Patologia, principalmente Priscila, Carlos Eduardo (Cadu), Sarah, Clau Barro e Claudinha por ter compartilhado durante meus estudos de doutorado as alegrias e tristezas, conhecimentos, cafés de manhã, organização de cursos, congressos e festas;

A todos os que passaram pela Residência de Patologia, entre eles Mayra, Leo, Caio, Fabricio, Renata, Tatiana;

Aos residentes de Ornitopatologia Carolina, Bianca e Igor e a todos os estagiários que colaboraram com o trabalho no laboratório. Do mesmo modo, agradeço à ajuda dos pós-graduandos da área de Ornitopatologia, principalmente a Rafaela e ao Tarcisio;

Aos Professores de Patologia Julio Lopes Sequeira, Renée Laufer e Alessandre Hataka por todo seu carinho e compreensão;

Aos Professores Antonio Carlos Paes e Márcio Garcia Ribeiro do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública pelo apoio e condescendência nos momentos em que precisei de ajuda;

Aos senhores Mauri, Claudines e à senhora Valeria pela sua amizade e apoio em tudo o que precisei durante minha estadia;

Aos amigos Pós-Graduandos e residentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, principalmente Carolina, Carol, Carmen e Rafaela;

Ao Professor Doutor José Pantoja pela colaboração nas análises estatísticas. Além disso à senhora Juliana Gadun de Lalla pela sua contribuição nas análises estatísticas e elaboração de tabelas;

Ao professor Cassiano pelos conselhos acadêmicos apropriados;

Aos Professores Germano Biondi e Jean Fernandes Joaquim pela participação e assessoria durante a elaboração do projeto;

Aos Professores da IBB Sandra Bosco, Vera Rall, João Pessoa e Rodrigo pela sua colaboração;

A todos os Professores que deram maravilhosas palestras na suas disciplinas e colegas de turma, pelos belos momentos compartilhados;

Ao Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, pela gentileza na doação das cepas de referência de *Campylobacter*;

À equipe da Pós-Graduação principalmente o senhor Carlos Pazzini e a senhora Patricia Biassotto e Simone Fernandes, pelo pronto atendimento às solicitações feitas;

Aos integrantes da Biblioteca da UNESP, pela ajuda dispensada;

Ao senhor José Roberto de Lalla Júnior e ao Professor Francisco Pedraza pela sua colaboração e dedicação no assessoramento para ingressar como pós-graduanda na Unesp;

As senhoras que realizam faxinas pelos seus carinhos e cuidados, principalmente dona Rita e Dona Deisi;

Aos amigos do Brasil, Colômbia, México, Venezuela, Nicarágua, Bolívia que compartilharam como família;

Ao meu querido esposo Wismar Sarmiento pela companhia, compreensão e ajuda em todo momento. Por ter cuidado de meus filhos. Além de traduzir e editar os artigos publicados para a língua inglesa;

A meus filhos Luis Manuel Sarmiento e Alanis Sarmiento pela compreensão, pela sua força, apoio e presença em todo momento;

A toda minha família e amigos principalmente meu irmão Diego Machado pelo apoio incondicional desde Venezuela;

Aos Órgão de financiamento CAPES, CNPq e FAPESP;

A todos meus companheiros, alunos e amigos da UCV por seu apoio, principalmente aos professores Vasco de Basilio e Leonardo Thaylhardat;

A todos o pessoal da UNESP pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Principalmente a Deus por dar me forças em momentos difíceis de meu doutorado;

A todos OBRIGADA

LISTA DE TABELAS

1	Diferenciação bioquímica das principais espécies de <i>Campylobacter</i>	5
2	Diferenciação bioquímica das principais espécies de enterobactérias.....	8
3	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> em frango resfriados na cidade de Botucatu, SP, Brasil, 2015.....	23
4	Prevalência de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> em diferentes marcas de frangos de Botucatu, SP, Brasil, 2015.....	23
5	Proporção de isolamentos de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> em diferentes marcas comerciais de frangos Botucatu, SP, Brasil.....	24
6	Prevalência de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> de frangos em diferentes regiões de Botucatu, SP, Brasil, 2015.....	25
7	Proporção de isolamento de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> de frangos em diferentes regiões de Botucatu, SP, Brasil, 2015.....	25
8	Prevalências das espécies de <i>Campylobacter</i> spp. de frangos em Botucatu, SP, Brasil, 2015.....	26

LISTA DE FIGURAS

1	<i>Campylobacter</i> spp. observado em microscópio óptico e eletrônico.....	4
2	Mapa de Botucatu.....	16
3	Colônias com brilho de água típicas de <i>Campylobacter</i> spp.....	17
4	Colônias características de <i>Salmonella</i> spp e <i>E. coli</i>	18
5	Provas bioquímicas para confirmação de <i>Campylobacter</i> spp.....	19
6	Provas bioquímicas (triagem) para confirmação de <i>Salmonella</i> spp. e <i>E. coli</i> .	19
7	Determinação da resistência dos isolados.....	22
8	Gel de agarose mostrando produto da PCR do grupo controle positivo de <i>Campylobacter</i> spp.	26
9	Gel de agarose mostrando produto da PCR do gene pg3/pg50 para confirmação de <i>Campylobacter</i> spp.	26
10	Gel de agarose mostrando produto da PCR do gene <i>inv A</i> . para confirmação da <i>Salmonella</i> spp.	27
11	Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar <i>E. Coli</i> . com os <i>primers</i> Eco 2083/Eco 2745.	27
12	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>Campylobacter</i> spp. obtidos em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015.	28
13	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>Salmonella</i> spp. obtidos em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015	28
14	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de <i>E. coli</i> obtidos em carcaças de frangos na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015.	29
15	Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar o gene de resistência <i>integron</i> classe 1 os <i>primers</i> Eco 2083/Eco 2745.	30
16	Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar o gene de resistência <i>integron</i> classe 1 os <i>primers</i> Eco 2083/Eco 2745.	30

ABREVIACÕES

- AMP_c – Adenosina Monofosfato Cíclico
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APPCC- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- BGA- Brilliant Green Agar
- BHI- Brain Heart Infusion
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- CDT – Cytolethal Distending Toxin
- DNA – Deoxyribonucleic Acid
- DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos
- ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control
- EPEC-*Escherichia coli* enterotoxigênicas
- EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasivas
- EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênicas
- EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágicas
- EU-União Europeia
- DAEC- *Escherichia coli* de aderência difusa
- EFSA-The European Food Safety Authority
- EAggEC- *Escherichia coli* enteroagregativas
- EUA - Estados Unidos da América
- FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- InDRE -Instituto de Referência Epidemiológica
- LIA- Lysine Iron Agar
- LT- Toxina termolábil
- mL - Microlitro
- mL – Mililitro
- MR-Multirresistentes
- MKTTn- Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em cadeia pela polimerase

RVS- Rappaport-Vassiliadis medium with soya

SIM- Sulfide Indol and Motility

SGB - Síndrome de Guillain Barré

ST- Toxina termoestável

TSI- Triple Sugar Iron

TTC- Cloreto de trifeniltetrazóico

WHO - World Health Organization

XLD- Xylose Lysine Desoxycholate

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Considerações gerais	3
2.2 Etiologia	3
2.2.1 <i>Campylobacter</i>	3
2.2.2 <i>Salmonella</i>	6
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	8
2.3 Prevalência	10
2.4 Resistência antimicrobiana	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Geral	15
3.2 Específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Isolamento e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	16
4.2 Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i>	17
4.3 Confirmação das bactérias isoladas por provas bioquímicas	18
4.4 Confirmação das bactérias isoladas e identificadas pela PCR	19
4.5 Determinação da resistência dos isolados	21
4.6 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS.....	23
5.1 Isolamentos e identificação	23
5.2 Confirmação das bactérias isoladas e identificadas pela PCR	26
5.3 Determinação da resistência dos isolados	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	36
8 REFERÊNCIAS.....	37

RESUMO

MACHADO, I. **Diagnóstico microbiológico e molecular de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em carcaças de frango.** Botucatu, SP, 2016. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, SP, Universidade Estadual Paulista.

As doenças de transmissão alimentar (DTA) por bactérias constituem um problema de saúde pública no mundo. O objetivo do trabalho foi identificar por métodos microbiológicos e moleculares a presença de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em frangos de Botucatu-SP, Brasil. Sessenta (60) amostras de frangos resfriados de diferentes marcas foram coletadas aleatoriamente em diferentes estabelecimentos localizados tanto na periferia, quanto no centro da cidade de Botucatu, SP, no período de julho a outubro de 2015. Posteriormente, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp e *E. coli* foram isolados através de métodos microbiológicos convencionais. A confirmação das bactérias isoladas se realizou por provas bioquímicas e PCR. Além disso, as provas para determinar a resistência antimicrobiana e a existência de gene *integron* classe 1 foram realizadas. Os resultados demonstraram a presença de três das principais bactérias que causam doenças de origem alimentar em carcaças de frango provenientes de supermercados e casas de carne de Botucatu. A prevalência de *Campylobacter*, *Salmonella*, e *E. coli* foi 38,3%, 13,3% e 60%, respectivamente. A resistência antimicrobiana dos isolados foi elevada e presença do gene *integron* classe 1 foi identificada em alguns agentes patogênicos.

Palavras-Chave: Doenças de transmissão alimentar, enteropatógenos, resistência ao antimicrobiano, integron, frango.

ABSTRACT

MACHADO, I. **Microbiological and molecular diagnosis of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in chicken carcasses.** Botucatu, SP, 2016. Dissertation (PhD) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The transmission of Foodborne Diseases (FBD) by bacteria constitutes a public health problem in the world. The objective of this study was to identify by microbiological and molecular methods the presence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in broiler chickens at Botucatu, SP, Brazil. Sixty samples of chilled chickens of different brands were randomly collected from supermarkets and meat houses located in both the periphery and the center of the city, in the period from July to October 2015. Later, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., and *E. coli* were isolated by conventional microbiological methods. Confirmation of the isolated bacteria was performed by biochemical and PCR tests. In addition, proofs to determine antimicrobial resistance and the existence of class 1 integron gene were carried out. Results confirmed the presence of the three assessed bacteria in poultry carcasses from selected establishments. The prevalence was 38.3%, 13.3% and 60% to *Campylobacter*, *Salmonella* and *E. coli*, respectively. Antimicrobial resistance of the isolates was high and the presence of integron class 1 gene has been identified in some pathogens.

Keywords: foodborne diseases, enteropathogen, antimicrobial resistance, integron, chicken.

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango tem se expandido cerca de 5,6% a partir da década de 1980. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, superado pelos Estados Unidos da América (EUA), mas se destacando como o maior exportador mundial. Além disso, o consumo mundial de carne de frango tem aumentado consideravelmente, uma vez que esta fonte proteica é a mais econômica entre as proteínas de origem animal. Estima-se que acima de 60% da proteína animal que se consome é proveniente da carne de frango. Atualmente, o Brasil apresenta consumo *per capita* de 41,862Kg/hab./ano.

Paralelamente ao crescimento da indústria avícola mundial, a prevalência de doenças entéricas em humanos, por diferentes agentes, tem aumentado nas últimas décadas. As infecções agudas do trato gastrointestinal estão entre as mais comuns, superadas apenas por infecções do trato respiratório.

Estima-se que na Ásia, África e América Latina, dependendo de fatores socioeconômicos e nutricionais, a probabilidade da morte de crianças por doenças entéricas, antes dos cinco anos de vida, atinge 50% da população. Em razão disso, nos países considerados desenvolvidos, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são as causas comuns de gastroenterite bacteriana. Em 2006, o gênero *Campylobacter* foi classificado como patógeno de maior associação a surtos na União Europeia, mesmo que a maioria dos casos relatados tenham sido considerados esporádicos.

Como reportado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o gênero *Campylobacter* foi o segundo classificado e *Salmonella* o primeiro entre as causas de doenças bacterianas transmitidas por alimentos. Ainda, cerca de 50% dos casos que desenvolvem diarreia por *E. coli*, ocorrem em indivíduos que se locomovem de países desenvolvidos para os em desenvolvimento.

Campylobacter spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* podem colonizar o trato gastrointestinal da grande variedade de animais silvestres e domésticos, especialmente os criados para o consumo humano. A contaminação de alimentos com estas bactérias podem ocorrer em várias etapas ao longo da cadeia alimentar, incluindo na produção, processamento e distribuição. Vários estudos epidemiológicos têm implicado os alimentos de origem animal como os principais veículos associados à doenças causadas por estes patógenos, especialmente produtos de origem aviária.

Alimentos de origem animal podem ser vias de transmissão de bactérias responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (DTA), gerando preocupação para os Serviços de Saúde Pública. A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos é considerada problema crescente a nível mundial, sendo também caracterizado como risco potencial para a saúde humana. Resultados em diferentes países, tais como, EUA, Portugal, Holanda, Bolívia, Brasil, Camarões têm mostrado elevada ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em produtos de origem aviária. Frente ao exposto, o presente estudo teve por objetivo identificar por métodos microbiológico e molecular a presença de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

A contaminação dos alimentos por diversos agentes, entre os quais estão incluídas principalmente bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp. e *E. coli*, além da família *Campylobacteriaceae*, como *Campylobacter*, podem provocar infecções ou intoxicações nos humanos. Esses micro-organismos têm como *habitat* o trato gastrointestinal de animais e dos humanos (FITCH *et al.*, 2005; ENGBERG, 2006; KEGODE *et al.*, 2008; VILA *et al.*, 2009; NEZOUANKEU *et al.*, 2010).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a indisposição seguida de vômitos, dores abdominais e diarreia, são manifestações clínicas características das doenças transmitidas por alimentos (DTA). Os sintomas podem aparecer a partir de algumas horas ou até dias depois de ser ingerido o alimento contaminado. Esse tipo de infecções compreende interação entre o hospedeiro, o organismo patogênico e o alimento contaminado. Três eventos podem acontecer: a eliminação do patógeno pelo hospedeiro, desencadeamento de doença ou morte (ANVISA, 2007).

A transmissão de doenças pelo consumo de alimentos é comum na grande maioria dos países, sendo que a prevalência tem aumentado exponencialmente nesse tipo de enfermidade, em virtude do elevado consumo de aves domésticas e de seus subprodutos, por exemplo ovos. Essa característica depende da associação de fatores ligados tanto ao alimento como ambientais, permitindo o desenvolvimento dos micro-organismos. Além de programas de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na indústria, o papel de manipuladores e consumidores é fundamental na diminuição dos riscos de patógenos alimentares, principalmente em relação a contaminações cruzadas (MENG e DOYLE, 1998; ALVAREZ *et al.*, 2008; WILHELM *et al.*, 2011; MOLERO, 2012; WILLIAMS e EDEL, 2012).

2.2 Etiologia

2.2.1 *Campylobacter*

Campylobacter foi descrito pela primeira vez por volta de 1886 por Theodor Escherich, que identificou uma bactéria de forma espiralada, localizada no segmento do cólon, de crianças que tinham morrido de doença denominada por esse pesquisador

“cólera infantil”. Posteriormente, Escherich observou micro-organismos espiralados similares em fezes de crianças com doenças diarreicas (BUTZLER, 2004).

As bactérias do gênero *Campylobacter* são gram-negativas. As células têm a forma de bastonetes finos curvos em espiral ou em S com aparência de asa de gaivota, e podem apresentar forma cocoide nos cultivos velhos. Possuem tamanho de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro de largura e 0,5 a 5,0 μm de comprimento Figura 1. Esses micro-organismos movimentam-se com o auxílio de flagelo polar localizado em uma ou nas duas extremidades da célula. A maioria das espécies são tipicamente microaerófilas e requerem uma concentração de O_2 entre 3 e 15% e de CO_2 de 3 a 5%. As espécies de *Campylobacter* não são fermentativas, mas são oxidase positivas e catalase variáveis. Algumas espécies são patogênicas para humanos e animais. A diferenciação das espécies de *Campylobacter* estão na Tabela 1 (HOLT *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 2007).

Atualmente, a “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby, cita 34 espécies e 14 subespécies. www.bacterio.net/campylobacter.html (LPSN, 2016).

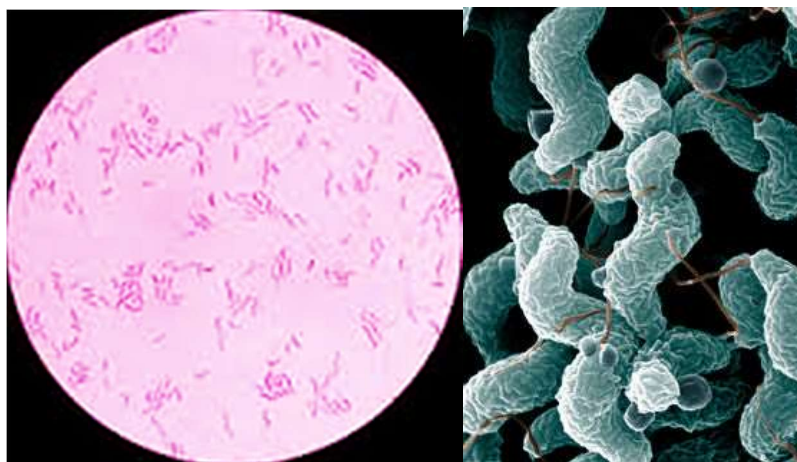


FIGURA 1. *Campylobacter* spp. observado em microscópio óptico e eletrônico.

Fonte: De Wood, apud Orihuel 2015

A campilobacteriose é uma doença causada pelo *Campylobacter* spp. As espécies mais comuns de *Campylobacter* são *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, dos quais, *C. jejuni* é responsável por 90-95% das gastroenterites bacterianas (ROZYNEK *et al.*, 2005 ROSELL, 2006; BRONZWAER *et al.*, 2009). Nos humanos, a gastroenterite é a manifestação clínica mais comum. A sintomatologia é semelhante à causada por outros patógenos entéricos, embora, o agravante é a baixa dose infectante. Estima-se que a

ingestão de 400 a 500 bactérias possa provocar a doença (BUTZLER, 2004; FONSECA *et al.*, 2007 GONÇALVES *et al.*, 2012). A enfermidade pode levar a Síndrome de Guillain-Barré, uma complicação rara, na qual o sistema imune induz lesão no sistema nervoso periférico causando paralisia muscular (SILVA *et al.*, 2014).

TABELA 1. Diferenciação bioquímica das principais espécies de *Campylobacter*.

Especies	Catal.	25°C	42°C	Glicina 1%	Na Cl 3,5%	H ₂ S C\Sist	H ₂ S S\Sist	TTC	Hip.	Ac Nal.	Cefa.
<i>C. Fetus subs. Venerealis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S
<i>C. Fetus subs. Fetus</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	V	S
<i>C. jejuni subs jejuni</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	S	R
<i>C. jejuni subs doley</i>	+	-	+	+	-	V	-	-	+		
<i>C. coli</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	-	S	R
<i>C. lari</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	R	R
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	R	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	R	S

Fonte: Adaptado de *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994. Legenda: Positivo (+), negativo (-), variável (v), resistente (t), sensível (s), catal.(catalase), hip. (hipurato), Ac Nal, (ácido nalidíxico), cefa. (cefalotina), TTC (cloreto de trifeniltetrazóico).

Autores têm definido a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) como uma polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda de origem autoimune (BENETI e DORO DA SILVA, 2006). A primeira referência foi em 1916, quando Georges Guillain J. A. Barre e A. Strohi descreveram uma síndrome similar à paralisia de Landry em soldados do exército francês (QUINTERO e BOZA, 1999). Mais de 40% dos pacientes com SGB têm apresentado doença recente por *Campylobacter jejuni*, podendo 5% evoluírem para óbito. A Síndrome de “Reiteré”, outra consequência decorrente da infecção por essa bactéria que ocorre em cerca de 1% dos pacientes num período de 7 a 10 dias após o início da diarreia, se caracteriza por dor nas articulações que pode durar meses ou se tornar crônica (DE MELLO MEDEIROS, 2011).

Na patogênese, a bactéria *Campylobacter* spp. ingressa através da ingestão de alimento, principalmente carnes cruas ou pouco cozida. A carne de frango é a principal causa de infecção pelo consumo massivo entre a população. O período de incubação é de 2 a 5 dias, podendo-se estender até 10 dias. Quando o micro-organismo ingressa no lúmen

intestinal invade a linha superficial de muco presente nas criptas intestinais. Nesse local, fica protegido da ação de substâncias deletérias e sucos digestivos (ORIHUEL *et al.*, 2015; GUIFFRIDA, 2016).

A bactéria migra para a superfície das células epiteliais intestinais, na qual adere por meio de proteínas ligantes. Após internalizada via endocitose, o patógeno alcança a lamina própria intestinal, podendo ser encontrado no interior de granulócitos e células mononucleares, especialmente macrófagos. Em seguida, produz a toxina citoletal distensiva (CDT), uma toxina similar às enterotoxinas ativadora da adenilciclase celular produzidas por *E. coli* enterotoxigênica que causam aumento do AMP cíclico celular e desequilíbrios nos mecanismos de absorção e secreção de eletrólitos para o lúmen intestinal, resultando em diarreia profusa e aquosa (GUIFFRIDA, 2016).

No caso do SGB, ocorre uma desmielinização segmentar dos nervos periféricos com infiltrados mononucleares e edema. A destruição da mielina pode ser mediada por um efeito tóxico direto ou por um mecanismo imunopatogênico. No último caso, tanto mecanismos imunitários humorais quanto celulares podem atuar (MISHU e BLASER, 1993).

2.2.2 *Salmonella*

A salmonelose é uma doença causada por *Salmonella* spp. que afeta animais e humanos. *Salmonella* Typhi foi a primeira espécie a ser estudada em 1874, e isolada em cultura pura em 1884. O primeiro surto da doença confirmado por um laboratório foi descrito pelo pesquisador Gaertner, em 1888, causado por uma espécie de *Salmonella* não tifoide, chamada *Bacillus enteritidis*. Salmon e Smith isolaram organismo similar em suínos com cólera suína e descreveram em detalhes denominando *Salmonella cholera-suis*. Originou-se, assim, o gênero *Salmonella* (HART, 2010; MESTROVIC, 2015).

Salmonella é um gênero de bactérias pertencente à família Enterobacteriaceae. São micro-organismos gram-negativos, em forma bacilar, medindo 0,7-1,5 a 2,5 μm , geralmente móveis com flagelos peritríquios. Além disso, são bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, com crescimento ótimo de 37°C, não esporuladas, nem capsuladas, sendo que a maioria não fermenta a lactose. D-glucose e outros carboidratos são catabolizados com a produção de ácido e algumas vezes gás. O gênero *Salmonella* contém mais de 2.500 sorotipos. Para diferenciação bioquímica das espécies ver Tabela 2. A sorotipagem é baseada no esquema de Kaufmann e White, no qual os antígenos

somáticos (O) e flagelares (H) e capsulares (Vi) são identificados (HOLT *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 2007; PAIXÃO *et al.*, 2016).

De todos os sorotipos descritos para *Salmonella enterica*, Enteritidis e Typhimurium são os mais frequentes envolvidos em casos de salmonelose humana no mundo inteiro (GALANIS *et al.*, 2006; HENDRIKSEN *et al.*, 2009; MOLERO, 2012). As manifestações clínicas variam, desde leves sinais intestinais até septicemia, sendo observadas principalmente em recém-nascidos, idosos e imunocompetentes. Apesar da diarreia ser o principal sintoma, a intensidade pode variar entre pacientes. Também podem ser observadas manifestações de desconfortos abdominais, cólicas, febre, náuseas, vômito e dor de cabeça (ZHAO *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2006).

A virulência do gênero *Salmonella* relaciona-se com a sua habilidade em invadir células do hospedeiro e multiplicar-se. Estas podem resistir à digestão por fagócitos e à destruição por componentes plasmáticos do complemento, assim como se disseminar pelos vários órgãos dos animais. O micro-organismo tem vários mecanismos de patogenicidade. Dentre os mecanismos relacionados com a virulência bacteriana, devem ser considerados, cápsula, flagelo, pili ou adesina, lipopolissacáridos de membrana, enterotoxinas e plasmídeos (QUINN *et al.*, 2007; PAIXÃO *et al.*, 2016).

De maneira geral, após a infecção por via oral, as células do intestino constituem a primeira barreira a ser atravessada pelo micro-organismo. Em seguida, se produz a indução da resposta inflamatória do hospedeiro, como mediadores de inflamação, particularmente quimiocinas da classe CXC (como IL-8), que são quimiotáticos para neutrófilos. O resultado da forte resposta inflamatória induzida por *Salmonella* spp. causa um processo inflamatório agudo grave, resultando em lesão tecidual e necrose superficial da mucosa. Esse processo caracteriza a enteropatia com diarreia primariamente exsudativa (PAIXÃO *et al.*, 2016).

Especificamente, *S. Typhi* é um patógeno unicamente humano que invade a vesícula biliar do portador, sendo excretado esporadicamente ao longo de sua vida. A célebre portadora “Typhoid Mary” foi cozinheira de famílias abastadas de Nova Iorque na década de 1900, causando várias epidemias. Na patogênese da bactéria, uma vez ingeridas passam pelo estômago em direção ao intestino delgado, atravessam as células que revestem o órgão e são levadas aos linfonodos locais. O patógeno é capaz de resistir e pode permanecer no interior dos macrófagos. Depois, destroem as células e se disseminam pelos linfáticos até a corrente sanguínea por todo o corpo (HART, 2010).

TABELA 2. Diferenciação bioquímica das principais espécies de Enterobactéreas

	Acido																			
	Indol	V-M	V-P	Cit	Ure	Fen-des	H2S	Lis-des	Ornit	Mot	Dul	Ino	Lact	Mal	Mani	Mano	Rab	Sorb	Sucr	
<i>Citrobacter diversus</i>	+	+	-	+	(+)	-	-	-	+	+	d	-	d	+	+	+	+	+	+	(-)
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+	d	-	-	-	+	+	-	(-)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	(+)	d	(+)	d	-	+	+	+	+	+	(+)	+	d
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	(-)	+	+	+	-	-	+	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	(-)	d	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	(-)	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> subgenus I	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	-
(Arizona) Subgenus II	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	(-)	-	+	(-)	-	-	+	+	+	-	(+)	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Serratia rubidaea</i>	-	(-)	+	+	-	-	-	d	-	(+)	-	(-)	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Shigella species</i>	v	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	v	+	v	v	v	-
<i>Yersenia enterocolitica</i>	d	+	-	-	(+)	-	-	-	+	-	-	d	-	d	+	+	-	+	+	+

Fonte: *Clinical Veterinary Microbiology* (Quinn *et al.*, 1994). Legenda: + 90-100% cepas positivas, (+)= 76-89% positivas, d= 26-75%, (-)=11-25% positiva, - 0-10% positiva, v= variável. Provas: V-M (Vermelho de Metilo), V-P (Voges-Proskauer), Cit (citrato), Ure (uréase), Fen-des (fenilalanina- desaminase), Ornit (ornitina), Mot (motilidade), Dul (dulcitol), Ino (inositol), Lact (Lactose), Mal (maltose), Mani (manitol), Mano (manose), Rab (rafinose), Sorb (sorbitol), Sucr (sucrose).

2.2.3 *Escherichia coli*

A colibacilose é causada por *E. coli*, agente etiológico, o qual recebe esse nome em reconhecimento pelas pesquisas desenvolvidas pelo pediatra e bacteriologista alemão-austriaco Theodor Escherich. Esse pesquisador isolou o patógeno pela primeira vez em trato gastrointestinal de criança e inicialmente chamou-o de *Bacteria coli commune* em 1885 (MURRAY *et al.*, 2006).

Colibacilose refere-se a qualquer infecção localizada ou sistêmica, que tem como causa única a bactéria *E. coli*, podendo haver associação com outros micro-organismos (ARANGO, 2012). Segundo Ribeiro *et al.* (2016) os definem como doenças infectocontagiosas causadas pela bactéria *E. coli* caracterizada pela complexidade dos fatores de virulência e por afecções entéricas e extra entéricas animais domésticos e em humanos.

O gênero *Escherichia* apresenta-se no formato de cocobacilos, gram-negativos com tamanho de 0,5 a 1,5 μm , com ou sem capsula, podendo ser móveis ou não. São anaeróbicos facultativos, não formam esporos e podem produzir hemolisinas. A temperatura ótima de crescimento é 37°C. D-glucose e outros carboidratos são catabolizados com formação de ácido e gás. Para diferenciação bioquímica das espécies ver tabela 2 (HOLT *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 2007).

A bactéria *E. coli*, é a espécie predominante da microbiota entérica normal da maior parte dos mamíferos. Algumas cepas são patogênicas, podendo causar doenças em humanos e animais, como infecções do trato urinário, septicemia, meningites e gastroenterites. A habilidade de *E. coli* em causar doença é devido à presença de vários fatores de virulência localizados em genes plasmidiais e/ou cromossomais. A patogenicidade do micro-organismo está relacionada à forma como a bactéria se liga à célula do hospedeiro, à produção de toxinas e a sua invasão (QUINN *et al.*, 2007; HART, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Vários fatores de virulência são identificados nas cepas patogênicas desse micro-organismo: a capsula (antígeno K) é antifagocítico e protetor celular dos efeitos do complemento. A endotoxina (lipídio A) presente no lipopolissacarídeo de membrana é uma toxina associada a colisepticemia. Fimbrias são proteínas que permitem a ligação de *E. coli* na superfície celular de revestimento de jejuno e íleo causando colonização, também no epitélio renal. Alfa e beta hemolisinas são exotoxinas que produzem dano nas membranas celulares do hospedeiro. A toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST) são produzidas por cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, sendo que estas toxinas afetam o sistema adenilato ciclase (AMP_c) causando diarreia, hipovolemia, acidoses metabólica (QUINN *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2016).

E. coli causa manifestações entéricas e extraentéricas em humanos e animais. Com base na patogenicidade a bactéria é classificada em diferentes grupos: as enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), de aderência difusa (DAEC) e enteroagregativas (EAaggEC) (HART, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Os diferentes grupos foram classificados com base na produção de toxinas, na capacidade de invasão celular e nas manifestações clínicas particulares em hospedeiros. Em geral, esses grupos ou classes apresentam mecanismo de patogênese específicos no

hospedeiro, sorotipos diferentes e estão associados a infecções e síndromes comumente distintas (RIBEIRO *et al.*, 2016).

2.3 Prevalência

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um problema de saúde pública mundial e tem como principal causa o grupo formado pelos agentes *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* (CDC, 2009; FAO e WHO, 2009; JOKINEN *et al.*, 2010). Nesse contexto, os órgãos de saúde que se preocupam com a segurança dos alimentos na Europa, *The European Food Safety Authority* (EFSA) e *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) publicaram em 2010, o Relatório Anual sobre DTA na União Europeia. Esse relatório revelou que houve redução de aproximadamente 9% nos casos relacionados com *Salmonella* em humanos. Por outro lado, os relacionados com *Campylobacter* mostram aumento significativo. Conclui-se que a campilobacteriose tem sido a infecção alimentar mais notificada nos humanos desde 2005 (EFSA, 2012).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) apresentaram resultados semelhantes, no que diz respeito ao *Campylobacter* spp., que notificaram também aumento de 14% em humanos. No entanto, os dados se mantiveram sem variação para *Salmonella* spp. e *E. coli* (CDC, 2012).

Para *E. coli*, estudos realizados em outros países como o México, a ocorrência em humanos notificados pelo Instituto de Referência Epidemiológica (InDRE), encontrou-se que o grupo mais frequentemente foi ETEC (48%), seguido de EIEC (9%), EPEC (4%) e EHEC (1%). Entretanto, não foram isoladas cepas *E. coli* tipo O157:H7 (HERNANDEZ *et al.*, 2011).

Atualmente, nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, são escassas as estatísticas oficiais sobre DTA. No entanto, nesses países têm sido descritos *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em produtos alimentícios, principalmente de origem avícola (MODOLO *et al.*, 2005; RALL *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014), reforçando a necessidade de estudos com esses agentes em alimentos.

Em Washington, EUA, Zhao *et al.* (2001) determinaram prevalência de *Campylobacter* spp., *E. coli* e *Salmonella* em carnes cruas de varejo (frango, peru, suíno e bovino). Dentre 825 amostras coletadas entre junho de 1999 a julho 2000, estavam contaminadas 70,7% das amostras de frango com *Campylobacter* spp., 38,7% com *E. coli*

e 4,2% com *Salmonella* spp. Houve diferença significativa na contaminação das bactérias em carnes nos diferentes estabelecimentos.

No Senegal, foi determinada a prevalência de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos. *Salmonella* foi isolada em 96% das amostras analisadas e o principal sorovar identificado foi *S. Hadar* (41,6%), seguido de *S. Brancaster* (20,8%). *Campylobacter* spp. foi isolado em 56% das amostras, sendo os mais frequentes *C. jejuni* (59%) e *C. coli* (27%). A contaminação foi significativamente diferente em relação ao tipo de carcaça obtidas em 76% a fresco, 53% nos produtos resfriados e 28% nos congelados (CARDINALE *et al.*, 2003).

No Brasil, Modolo *et al.* (2005) investigaram espécies de *Campylobacter* em carcaças resfriadas de 400 frangos comercializados nas regiões central e periféricas de Botucatu, SP. Os isolamentos mais frequentes foram nas carcaças vendidas nos estabelecimentos da região central. A análise da frequência de isolamento revelou que o micro-organismo foi encontrado em 47% dos frangos resfriados. Além disso, a classificação bioquímica revelou que *C. jejuni* e *C. jejuni/coli* estiveram presentes nas carcaças em 15% e 10,2%, respectivamente.

Estudo sobre contaminação com *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* foi realizado no Vietnã em alimentos crus disponíveis em fábricas, escolas e hospitais. Amostras altamente contaminadas com *Campylobacter jejuni* (28,3%), *Salmonella* spp. (8,3%) e *E. coli* (45%) foram identificadas. Os produtos de origem animal com maior contaminação são peixe e frango (HA e PHAM, 2006).

Rall *et al.* (2009) avaliaram as condições sanitárias de 50 amostras de frangos e 75 de linguiças comercializadas na cidade de Botucatu, SP, Brasil. Observou-se que 70% das amostras de frango estavam fora dos parâmetros microbiológicos e 8% apresentaram *Salmonella* spp. pela metodologia tradicional. O diagnóstico foi confirmado por PCR, sendo positivo em 54% das amostras.

Foi determinada a presença de 14,2% de *Campylobacter* spp. pela técnica convencional e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em carcaças de frangos. A espécie mais prevalente foi *C. coli* (88%), seguido de *C. jejuni* (12%). Estudo semelhante foi realizado em pele e carcaça de bovino, obtendo 22,7% de prevalência em pele para *Campylobacter* spp., com predomínio da espécie *C. jejuni*, porém a bactéria não foi isolada na carcaça (LOPES, 2009).

Carvalho *et al.* (2010) pesquisaram *Campylobacter* spp. em amostras de frangos resfriados, provenientes de feira livre e supermercados de São Paulo, Brasil. *Campylobacter* spp. foi isolado em 12,5% das amostras, bem como a presença do complexo de genes da toxina citoletal distensiva (CDT), em 36,4% das amostras.

Foi investigada a presença de *E. coli* em água de lavagem de 33 amostras de carcaças de frango de quatro marcas diferentes disponíveis nos mercados e açougues da cidade de Campo Mourão-PR, Brasil. Determinou-se 24,2% de amostras positivas para o patógeno pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os autores concluíram também diferenças de positividade nas marcas e a necessidade de pré-enriquecimento com incubação de, no mínimo, 48 horas (RISSATO *et al.*, 2012).

Para *Salmonella* spp., estudos foram realizados em frangos de diferentes abatedouros no Estado Zulia, Venezuela. Os autores encontraram 100% de positividade no conteúdo intestinal, além de 60% em carcaças em pré chiller, 46,6% carcaças em chiller, 60 % carcaças embaladas, 73,3% água pré chiller e 60% em água chiller (MOLERO, 2012).

A ocorrência de *Campylobacter* spp. foi investigada em carne de frango, fezes humanas e de frangos. Foram coletadas 100 amostras de conteúdo fecal de aves de corte, 100 de produtos de frango e 100 de fezes de humanos. A bactéria foi isolada em 61% das amostras de fezes de frango, 20% de produtos de frango e 3% de fezes de humanos. A maioria dos isolados foi classificado como *C. jejuni*. Destes micro-organismos, 93,5% apresentaram os genes para toxina CDT. Os resultados demonstraram a prevalência do patógeno em frangos de corte e produtos foi elevada (SILVA *et al.*, 2014).

2.4 Resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema mundial que vem crescendo exponencialmente nos últimos anos. As bactérias são denominadas multirresistentes (MR), quando não são sensíveis aos antimicrobianos de primeira escolha. O principal mecanismo de resistência é mediado pelos *integrons*, que são elementos genéticos potencialmente móveis envolvidos na transferência da resistência aos fármacos, bem como por plasmídeos e transposons (LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2002; LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2003; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, *et al.*, 2007).

O uso indiscriminado de antimicrobianos somado a pressão ambiental seletiva por antissépticos e desinfetantes gerou uma resposta de sobrevivência em micro-organismos. Na última década, os países que pertencem à União Europeia (EU) já proibiram o uso de antibióticos promotores de crescimento. No entanto, outros países não pertencentes à UE continuam a usá-los na alimentação animal. Os Antibióticos promotores de crescimento são substâncias administradas em pequenas quantidades aos produtos destinados à alimentação animal utilizadas com a finalidade de controlar o crescimento exacerbado e indesejado de determinadas populações microbianas para melhorar a produtividade nos sistemas de produção (CABRERA *et al.*, 2007).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência. Apesar destes mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por vários fatores, o uso indiscriminado de antimicrobianos pelos médicos, automedicação de pacientes, uso como aditivos em rações animais. Existe uma necessidade contínua de fármacos com novos mecanismos de ação, uma vez que as doenças infecciosas representam a segunda maior causa de morte em todo o mundo e os níveis de resistência das bactérias são elevados (GUIMARAES *et al.*, 2010).

Uma das zoonoses bacterianas mais importantes é a campilobacteriose. Fitch *et al.* (2005) compararam isolados de *Campylobacter* spp. de frango no varejo e humanos com gastroenterite, utilizando a técnica de tipagem por sequenciamento por multilocus. Os autores demonstraram que *C. jejuni* isolados de fontes clínicas em Michigan tiveram maior diversidade de alelos flagelina e uma maior taxa de resistência às quinolonas de isolados de produtos de frango no varejo.

Tambur *et al.* (2009), investigaram *Campylobacter* spp. a partir de fezes humanas para determinar a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de campilobacteriose. Determinou-se que 25% das cepas de *C. jejuni* e *C. coli* foram resistentes para ampicilina, 29,2% para tetraciclina e 50% para ciprofloxacino. Além disso, 23,5% de *C. jejuni* foram resistentes a eritromicina e 11,7% ao cloranfenicol. Nenhum *C. coli* foi resistente à cloranfenicol tampouco a eritromicina.

Olaguibel, (2009), analisaram 44 cepas de *Campylobacter* em hospitais da Bolívia, das quais 28 foram *C. jejuni*, 13 *C. coli* e 3 *C. lari*. Destas, 70% foram resistentes para ciprofloxacino, 61% para eritromicina, 66% para tetraciclina, e 77% a clindamicina.

No Brasil, Lopes (2009) observam resistência dos isolados de 72,2% e 50% ao ácido nalidíxico e ciprofloxacino, respectivamente. A pesquisa foi realizada em cortes resfriados de bovinos e frangos comercializados no Município de São Paulo.

Os *integrons* são elementos gênicos que têm se destacado como importante reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos. Na Holanda, em 2004 foi realizado estudo com amostras de frangos e posterior comparação com as amostras de fezes de humanos para determinar MR. Foram identificados *integrons* e classes a partir das bactérias: *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., encontrando *integrons* de classe 1 em 76% das *E. coli* e 43% em *Salmonella*. *Integrons* de classe 2 foram observados em 11% de *E. coli* e 1% da *Salmonella*, enquanto, *integrons* de classe 3 não foram encontrados (VAN ESSEN-ZANDBERGEN *et al.*, 2007).

Okamoto *et al.* (2009) determinaram a transferência horizontal do gene *integron* classe 1 *in vitro* a partir de *E. coli* para *Salmonella* spp., demonstrando que o gene pode ser disseminado entre enterobactérias. Além disso, observaram não haver relação direta entre a presença do *integron* e a resistência a 14 antimicrobianos testados.

Portanto, a exposição destas bactérias através da cadeia alimentar é considerada um risco potencial para a saúde humana, por contribuir com a resistência aos antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2007; VAN ESSEN-ZANDBERGEN *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2009; BAKHSHI *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar por métodos microbiológicos e moleculares a presença de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças de frangos em Botucatu, SP, Brasil.

3.2 Específicos

- 1- Isolar *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., e *E. coli* a partir de carcaças de frangos pela técnica convencional microbiológica.
- 2- Confirmar a identificação microbiológica de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*, com auxílio de técnicas moleculares de PCR.
- 3- Determinar a resistência antimicrobiana dos isolados e presença de gene *integron* classe 1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 60 amostras de carcaças de frangos resfriados de diferentes marcas, procedentes de estabelecimentos localizados tanto na periferia, quanto no centro da cidade de Botucatu, São Paulo, no período de julho a outubro de 2015 (Figura 2). O transporte das carcaças do estabelecimento até os laboratórios foi realizado em diferentes períodos para assegurar que as amostras não seriam provenientes do mesmo lote, totalizando 10 frangos por grupo. As amostras foram mantidas nas embalagens e transportadas imediatamente sob refrigeração (4-8°C) em caixas isotérmicas, aos Laboratórios Planejamento de Saúde Animal e Ornitopatologia, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, SP, UNESP.



FIGURA 2. Mapa de Botucatu. Fonte: IBGE, 2013.

4.1 Isolamento e identificação de *Campylobacter* spp.

No Laboratório de Planejamento de Saúde Animal, a embalagem de cada frango recebeu um corte na região do lacre. Posteriormente, foi colocado por duas horas sobre um béquer estéril para obtenção do líquido sanguinolento.

Para o isolamento do agente foram realizados dois procedimentos. No processo de filtração, 10 mL do líquido de cada amostra foi colocado em tubo de ensaio e centrifugado a 2.500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de uma membrana de acetato de celulose de 0,65 µm de diâmetro. Finalmente, três gotas do filtrado foram semeadas sobre ágar tioglicolato contendo 20% de sangue bovino e incubada a 37°C por 72 horas em microaerofilia.

Posteriormente, uma alíquota da amostra previamente centrifugada e homogeneizada foi semeada sobre o mesmo ágar com adição do suplemento seletivo de

Buzler (bacitracina, novobiocina, ciclohexamida, colistina e cefazolina) e incubada por 48 horas a 42°C em microaerofilia (MODOLO *et al.*, 2005).

Colônias típicas de *Campylobacter* foram separadas para identificação por meio de provas bioquímicas e moleculares (Figura 3).



FIGURA 3. Colônias com brilho de água típicas de *Campylobacter* spp.

4.2 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*

Para isolamento de *Salmonella* spp., no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP, foram retirados 25 mL do líquido sanguinolento das carcaças e introduzidos numa embalagem plástica estéril contendo 225 mL de água peptonada, com posterior incubação a 37°C por 24 horas. Após esse período, 1 mL e 0,1 mL foi transferida para dois tubos de ensaio contendo 10 mL de meios de enriquecimento seletivo, o tetrathionato (Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth-MKTTn) e Rappaport (Rappaport-Vassiliadis medium with soya broth -RVS), respectivamente.

Nova incubação foi realizada para MKTTn a 37°C por 24 horas e para RVS a 42°C por 24 horas. Em seguida, com auxílio de uma alça de platina, esse material incubado foi semeado em meios de cultura seletivo Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) e Brilliant Green Agar (BGA), conforme descrito por normas ISO 6579-2002.



FIGURA 4. Esquerda: Colônias vermelhas com ponto preto característica de *Salmonella* spp. em meio XLD. Direita: Colônias amarelas suspeitas de *E. coli*, acima. Colônias vermelhas características de *Salmonella* spp., abaixo, em meio BGA.

Para isolamento de *E. coli*, 25 mL do líquido sanguinolento das carcaças foram introduzidos num embalagem plástico estéril com 225 mL água peptonada com posterior incubação durante 24 horas. Finalmente, com ajuda de um alça platina foi semeado em Ágar MacConkey e Brilliant Green Ágar (BGA) e incubado a 37°C durante 24 horas (QUINN *et al.*, 2007).

Colônias características de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* foram separadas para identificação via provas bioquímicas e moleculares (Figura 4).

4.3 Confirmação das bactérias isoladas por provas bioquímicas.

Colônias suspeitas de *Campylobacter* spp. foram examinadas em microscopia de contraste de fase (1000X) Carl Zeiss-Germany. O diagnóstico foi realizado pela observação das seguintes morfologias: bacilo curvo e movimentação típica de espirilo. Depois do diagnóstico presuntivo as colônias sugestivas foram repicadas em meio de Tarozzi. Finalmente, foram incubadas a 37°C por 72 horas para obtenção do inóculo com densidade ajustada à escala do tubo 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL).

Para observação das características típicas do micro-organismo foram realizadas diferentes provas bioquímicas. O crescimento de *Campylobacter* à temperatura foi determinada a 25°C e 43°C. Também, foi observado o crescimento do *Campylobacter* em 1% de glicina e em 3,5% de NaCl. Além disso, foram realizadas as provas de oxidase, catalase, hidrólise do hipurato, produção de H₂S (com e sem cisteína a 0,02%), tolerância ao cloreto de trifeniltetrazóico (TTC), resistência ao ácido nalidíxico e à cefalotina

(Figura 5) (STERN *et al.*, 1985; HUNT *et al.*, 2001; MODOLO *et al.*, 2005; ISO 10272-1, 2006).



FIGURA 5. Provas bioquímicas para confirmação de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies principais. Esquerda: Crescimento a 25°C e 43°C, glicina, NaCL, produção de H₂S (com e sem cisteína). Direita: Tolerância a TTC.

Colônias características de *Salmonella* spp. e *E. coli* foram repicadas em ágar Triple Sugar Iron (TSI), e ágar Lysine Iron Agar (LIA), Sulfide Indol and Motility (SIM) e ureia para triagem (Figura 6). Colônias compatíveis com *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* foram identificadas por provas bioquímicas complementares (FDA/BAM, 2014).



FIGURA 6. Provas bioquímicas (triagem) para confirmação de *Salmonella* spp. e *E. coli*.

4.4 Confirmação das bactérias isoladas e identificadas pela PCR

Colônias de *Campylobacter* spp. identificadas por provas bioquímicas foram confirmadas pela técnica de PCR no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP. Os isolados foram recuperados em ágar tioglicolato com 20% de sangue bovino a 42°C por 48 horas, em microaerofilia. Após, uma porção foi diluída em 100 µL de água ultra pura, a fim de obter a população de 10⁹ UFC/mL (tubo 4 da escala de McFarland). Para

a extração de DNA foi utilizado o KIT Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante.

As colônias típicas de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* para cada espécie foram inoculadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente foram semeadas em Ágar MacConkey e Brilliant Green Ágar (BGA) e incubado a 37°C durante 24 horas. As culturas foram utilizadas para a extração de DNA de acordo com as instruções do KIT Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma).

A identificação de cada isolado foi confirmada por PCR, utilizando *primers* específicos para os gêneros de *Campylobacter*, *Salmonella* e *Escherichia coli*.

Os procedimentos de PCR utilizados para identificação de *Campylobacter* estão previamente descritos por Harmon *et al.* (1997). Foram utilizados os pares de *primers* pg 3: GAACTTGAACCGATTTG e pg 50: ATGGGATTTTCGTATTAAC. A reação teve um volume final de 25µL.

Foram utilizados 12µL de Go Taq Green Master Mix (Promega), 2µL (20pmol) de cada *primer*, 1µL de DNA (na concentração de 5nmol/µL) e 8µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. (SILVA *et al.*, 2014). Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Para sua recuperação foi utilizado o protocolo enviado por o Laboratório de Micro-organismos de Referência. Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%).

Para identificação de *Salmonella* spp. se seguiu o procedimento descrito por Rall *et al.* (2009). Os *primers* utilizados foram *invA1*: TCATCGCACC GTCAAAGGAAC e *invA2*: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG. As reações de PCR tiveram um volume total de 25µL, composto por 12,5µL de Go Taq Green Master Mix (Promega), 1µL (10 pmol) de cada *primer*, 7,5 µL água ultrapura autoclavada e 3 µL da amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador. Os parâmetros do ciclo foram a 94°C durante 5 min para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com desnaturação 94°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 30 seg e amplificação 72°C por 30 seg. Finalizando com extensão final de 72°C por 4min. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de

Salmonella spp. cedida pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP. Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%).

Para *Escherichia coli*, as reações foram realizadas com *primers* Eco 2083: GCT TGA CAC TGA ACA TTG AG e Eco 2745: GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT. As reações de PCR tiveram um volume total de 25µL (5 µL 600ng de DNA extraído, 2,5µL de cada *primer*, 12,5µL de Go Taq Green Master Mix (Promega) e água ultrapura até completar o volume final. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *E. coli* spp. gentilmente cedida pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP.

A amplificação foi realizada com um termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento de 57°C por 1 min e amplificação a 72°C por 2 min, com extensão final de 72°C por 10 min (RISSATO *et al.*, 2012). Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a (1,5%).

Para determinar a presença do gene de resistência antimicrobiana nas bactérias isoladas os *primers* utilizados foram CS5: GGCATCCAAGCAGCAAG e CS3: AAGCAGACTTGACCTGA. As reações de PCR tiveram um volume final de 25 µL adicionado 12,5µL de Go Taq Green Master Mix (Promega), 1,25 µL de cada *primer*, 5 µL de água ultrapura e 5 µL de lisado de cada mostra. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *E. coli* resistente aos antimicrobianos, gentilmente cedida pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP.

A amplificação foi realizada através de um termociclador com desnaturação a 94°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 1 min, anelamento a 54°C durante 1 min e amplificação a 72°C durante 2 min, com uma extensão final a 72°C durante 10 min. Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. (SILVA *et al.*, 2006; OKAMOTO *et al.*, 2009).

4.5 Determinação da resistência dos isolados

A determinação da sensibilidade antimicrobiana foi realizada com base na metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966) no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ. Os isolados de *Campylobacter* spp. foram descongelados e, posteriormente, semeados em placas de ágar sangue Columbia e incubados a 41,5°C por 48 horas em condições de microaerofilia.

Igualmente, os isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* foram descongelados e semeados em BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi preparada uma suspensão em solução salina peptonada equivalente ao tubo 5 da escala McFarland. A suspensão de *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp. e *E.coli*, foi semeada com auxílio de um *swab* estéril na superfície de ágar sangue e ágar Mueller-Hinton (MH) respectivamente (Figura 7). Foram adicionados discos com antimicrobianos sobre a superfície de cada placa (CLSI, 2012; CLSI, 2013).

Foi avaliada a sensibilidade “in vitro” dos isolados de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* frente aos seguintes fármacos: ácido nalidíxico (30µg), ciprofloxacino (5 µg), eritromicina (15µg), cefalotina (30µg), estreptomicina (10µg), gentamicina (10µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), enrofloxacino (5µg), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), trimetoprim/sulfa (5µg), amicacina (30µg) (LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2002, VAN ESSEN-ZANDBERGEN *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2009; CLSI, 2012; CLSI. 2013).

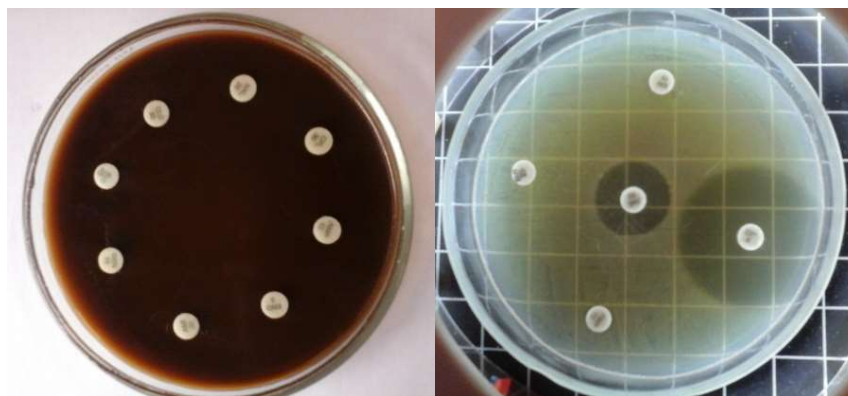


FIGURA 7. Determinação da resistência dos isolados. Esquerda: prova de discos para *Campylobacter* spp. Direita: provas para de *Salmonella* spp. e *E. coli*.

4.6 Análise Estatística

Para o cálculo estatístico do número de frango necessário foi considerada a prevalência das bactérias, o nível de confiança de 95% e a margem de erro de 5%. Para análise estatística foi realizado o teste χ^2 (Qui-quadrado) e o teste de Fisher para comparação da associação entre a prevalência das marcas de frango pesquisadas e o isolamento de cada bactéria, bem como para comparação entre a região de coleta e seu isolamento. O nível de significância adotado foi 5% ($P < 0,05$) (ZAR, 1996).

5 RESULTADOS

5.1 Isolamentos e identificação

A Tabela 3 demonstra a ocorrência de isolamentos de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em frangos resfriados de diferentes marcas comercializados em estabelecimentos localizados na região periférica e central de Botucatu. Das 60 amostras de frangos analisadas, 23 (38,3%) apresentaram isolamento de *Campylobacter*, 8 (13,3%) *Salmonella* e 36 (60%) *E. coli*.

TABELA 3. Ocorrência de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em frangos resfriados na cidade de Botucatu, SP, Brasil, 2015.

Bactéria	Amostras positivas	Frequência
<i>Campylobacter</i> spp.	23	38,3
<i>Salmonella</i> spp.	8	13,3
<i>E. coli</i>	36	60,0
Total	67*	100

*Isolamentos simultâneos

TABELA 4. Prevalência de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em diferentes marcas de frangos de Botucatu, SP, Brasil, 2015.

Marca	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)
A	4	6,7	1	1,7	3	5,0
B	3	5,0	2	3,3	8	13,3
C	4	6,7	1	1,7	4	6,7
D	5	8,3	0	0,0	8	13,3
E	2	3,3	2	3,3	8	13,3
F	5	8,3	2	3,3	5	8,3
Total	23	38,3	8	13,3	36	60,0
χ^2	8,5145		5,0703		7,9689	
P (Fisher)	0,1519		0,2852		0,1675	

f: frequência p: prevalência n°: número

A Tabela 4 mostra a prevalência de isolamento das bactérias em frangos de diferentes marcas adquiridas em estabelecimentos de carne em Botucatu, SP. O resultado do teste estatístico indicou que não houve associação significativa ($p < 0,05$) entre as marcas e a prevalência de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*.

Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as marcas de frango quanto à proporção de positividade das três bactérias analisadas (Tabela 5). Considerando a bactéria *Campylobacter* spp., a marca F apresentou maior proporção de positividade, seguida da marca A. Para *Salmonella* spp. e *E. coli*, as marcas E e F mostraram maior positividade.

TABELA 5. Proporção de isolamentos de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em diferentes marcas comerciais de frangos. Botucatu, SP, Brasil

Marca	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
A	57,1 b	14,3 b	42,9 c
B	23,1 c	15,4 b	61,5 b
C	36,4 c	9,1 c	36,4 c
D	35,7 c	0,0 d	57,1 b
E	22,2 c	22,2 a	88,9 a
F	83,3 a	33,3 a	83,3 a
Total	38,3	13,3	60,0
χ^2	63,966	40,983	36,009
P	<0,001	<0,001	<0,001

Letras distintas indicam diferenças significativas

Na Tabela 6 se observa que não houve associação entre a região de procedência da amostra e a prevalência de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*. No entanto, pode se observar uma tendência maior na região de periferia quando se compara com a região central da cidade, possivelmente pelas condições de armazenamento, rotação dos estoques e controle higiênico-sanitário.

TABELA 6. Prevalência de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* de frangos em diferentes regiões de Botucatu, SP, Brasil, 2015.

Região	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)
Centro	9	15,0	3	5,0	14	23,3
Periferia	14	23,3	5	8,3	22	36,7
Total	23	38,3	8	13,3	36	60,0
χ^2	0,5192		0,2098		1,3580	
P Fisher	0,1641		0,2713		0,1071	

f: frequência e p: prevalência

Também, verificou-se não haver diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as amostras obtidas nos estabelecimentos do centro e da periferia em relação à proporção de positividade das três bactérias analisadas. Porém, numericamente, na região periférica houve cerca de 60% a mais na frequência e porcentagem de positividade em relação à região central (Tabela 7).

TABELA 7. Proporção de isolamento de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* de frangos em diferentes regiões de Botucatu, SP, Brasil, 2015.

Região	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
Centro	33,3	11,1	51,9
Periferia	42,4	15,2	66,7
Total	38,3	13,3	36 (60,0)
χ^2	1,094	0,639	1,847
P	0,3519	0,5455	0,2051

A Tabela 8 mostra os resultados de isolamento do *Campylobacter* segundo classificação da espécie detectada. Pode se observar que *C. jejuni* e *C. jejuni/coli* estiveram presentes nas carcaças de frango em 52,17% e 39,13%, respectivamente.

TABELA 8. Prevalência das espécies de *Campylobacter* de frangos em Botucatu, SP, Brasil, 2015.

Bactéria	Número de amostras	Prevalência
<i>Campylobacter jejuni</i>	12	52,17
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	9	39,13
Outros	2	8,70
Total	23	100

5.2 Confirmação das bactérias isoladas e identificadas pela PCR

O controle positivo de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 foi evidenciado na Figura 8, através dos *primers* pg3 e pg50 que amplificam uma região conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, gerando um produto de 480 pb.

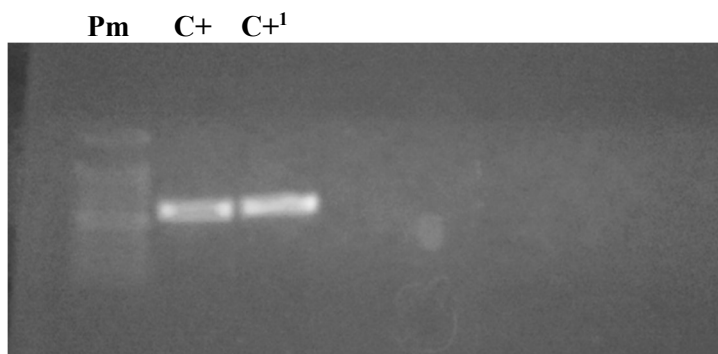


FIGURA 8. Gel de agarose mostrando produto da PCR do grupo controle positivo de *Campylobacter jejuni*.

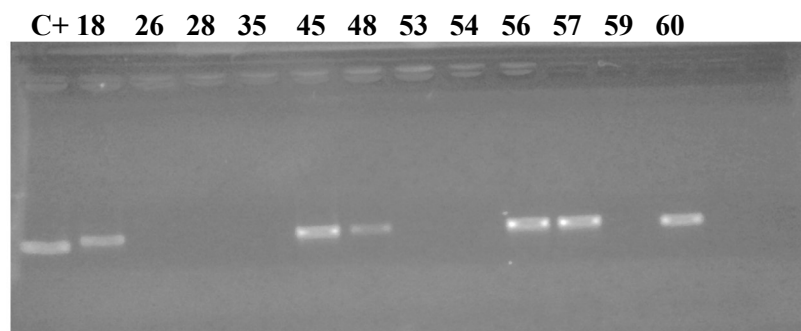


FIGURA 9. Gel de agarose mostrando produto da PCR do gene pg3/pg50 para confirmação de *Campylobacter*. Legendas: C+: controle positivo, amostras 18, 45, 48, 56, 57 e 60 positivas visualizadas.

Os isolados de *Campylobacter* spp. resultante de diagnóstico microbiológico convencional foram confirmados através de PCR como se pode observar na Figura 9.

Na Figura 10 se observa o produto da PCR utilizando o par de *primers* que codifica para o gene *inv A*, gerando um produto de 284 pb. A presença da *Salmonella* spp. foi confirmada pela PCR em 7 das amostras. No entanto, 8 (13, 3%) das amostras apresentaram o patógeno pela metodologia tradicional.

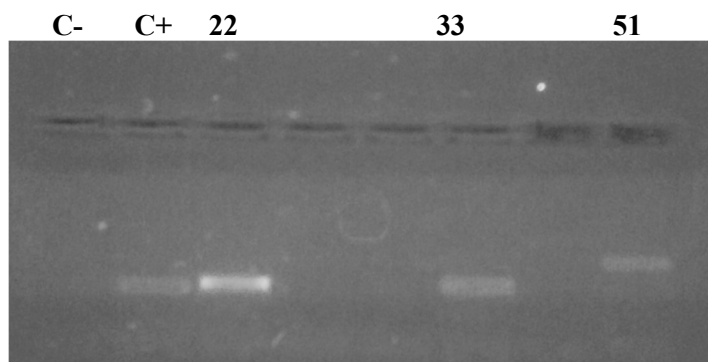


FIGURA 10. Gel de agarose mostrando produto da PCR dos genes *inv A*, para confirmação da *Salmonella* spp. Legendas: C-: controle negativo; C+: controle positivo, amostras (22) e (33) positivas.

Os resultados obtidos nas pesquisa de *Escherichia coli* em carcaças de frango foram confirmada pela técnica de PCR, como se observa na Figura 11. Nas reações, foram utilizados os *primers* Eco 2083 e Eco 2745 para a região altamente divergente e específica do DNA codificante do RNAr 16S e 23S de *E. coli*.

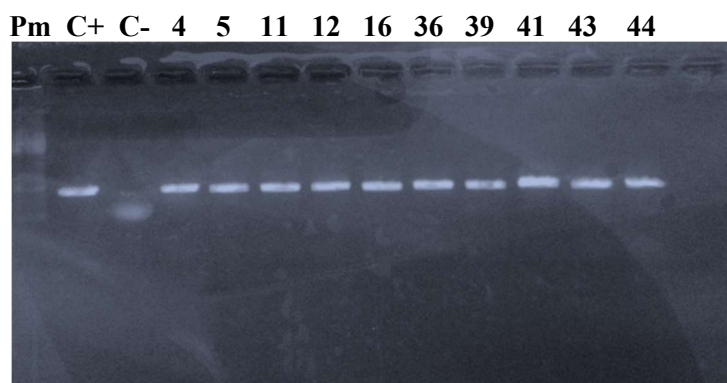


FIGURA 11. Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar *E. coli* com os *primers* Eco 2983 e Eco 2745. Legenda: Pm: peso molecular do marcador, C+: controle positivo, C-: controle negativo, amostras 4 até 13 positivas.

5.3 Determinação da resistência dos isolados

A Figura 12 demonstra a porcentagem de resistência aos antimicrobianos das amostras isoladas com *Campylobacter* spp. em carcaças de frango. Pode se observar que a maioria dos isolados foram resistentes em 80% aos antimicrobianos. Para ampicilina foi 90% para cefalotina e sulfa+trimetropim 90%, respectivamente.

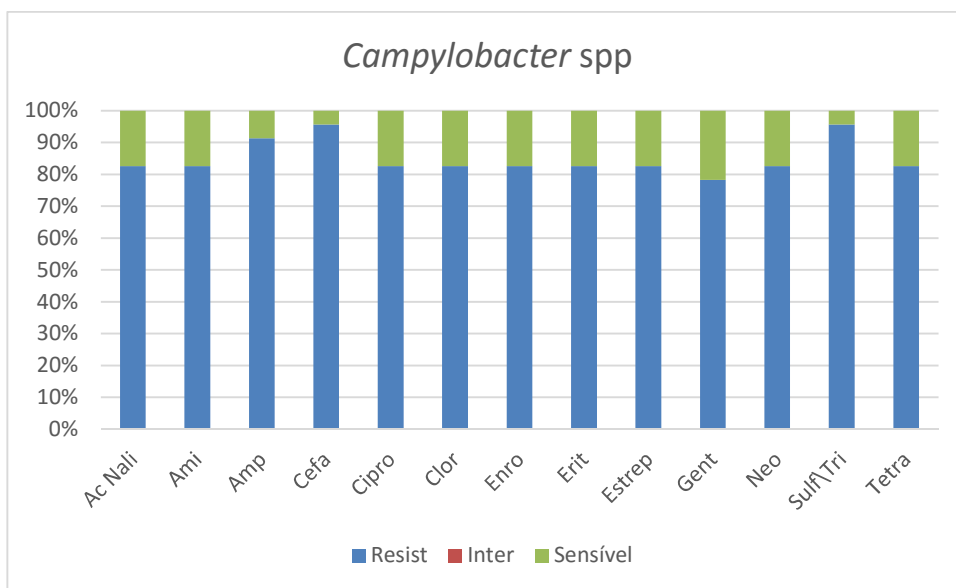


FIGURA 12. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Campylobacter* spp. obtidos em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015.

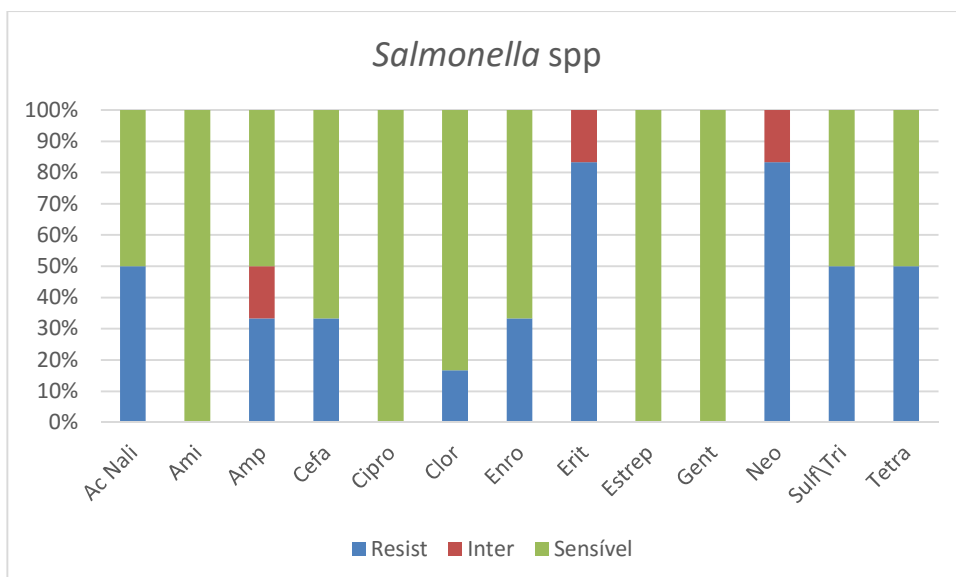


FIGURA 13. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. obtidos em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015.

Para *Salmonella*, dos 13 antimicrobianos testados eritromicina e neomicina apresentaram resistência (85%) nas amostras analisadas. No caso de ácido nalidíxico, trimetoprim/sulfa e tetraciclina resultaram 50% resistentes. Para os antimicrobianos ampicilina, cefalotina e enrofloxacino foi observado 30% de resistência dos isolados. No entanto as bactérias foram sensíveis 100% para amicacina, ciprofloxacino, estreptomicina, gentamicina, e 80% para cloranfenicol (Figura 13).

No caso de *E. coli*, os antimicrobianos com menos efetividade foram eritromicina (80%), ácido nalidíxico (70%), seguido de tetraciclina (60%). Nessa mesma bactéria, ampicilina e cefalotina apresentaram 50% de resistência. Observa-se a neomicina com valores equivalentes de resistência e sensibilidade intermediária em 45%, e só 10% de sensibilidade. Os outros fármacos testados apresentaram entre 20% e 30% de resistência. Por outro lado, amicacina, estreptomicina e gentamicina apresentaram a maior proporção de sensibilidade (Figura 14).

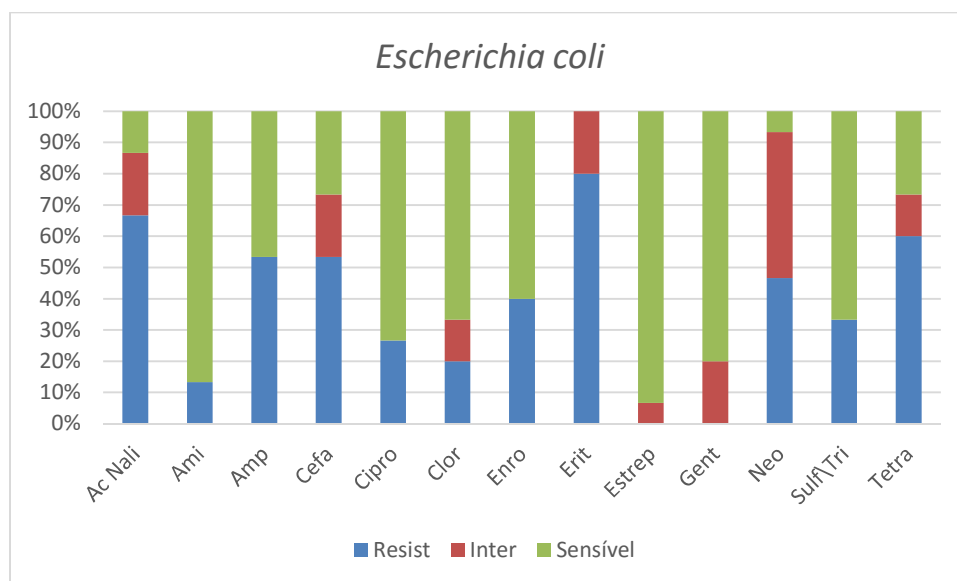


FIGURA 14. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* obtidas em carcaças de frango na cidade de Botucatu, SP, Brasil 2015.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado pela razão entre o número de classe de antimicrobiano, contra cada um dos isolados resistentes e o número total de classes testadas (07 classes). Foram considerados multirresistentes os isolados que apresentaram resistência simultânea a três ou mais antimicrobianos de

diferentes grupamentos (SCHWARZ *et al.*, 2010). Para *Campylobacter* spp., o IRMA foi de 95,66%, seguido de *E. coli* 73,3% e *Salmonella* spp. 71,43%.

Integron classe 1 foram detectadas em algumas das cepas através de PCR usando *primers* Cs5 e Cs3, gerando um produto de 900 pb (Figura 15 e 16). Pode se observar que os isolados 44 e 50 de *E. coli* apresentaram o gene de resistência. Igualmente a cepa 13 e 22 de *Camylobacter* spp. e 20, 36 e 52 de *Salmonella* spp.

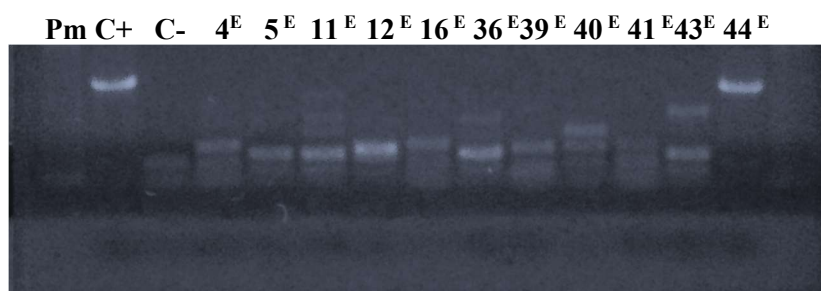


FIGURA 15. Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar gene de resistência para *E. coli*. Legenda: Pm: peso molecular do marcador, C+: controle positivo, C-: controle negativo. Amostra 44 positiva.

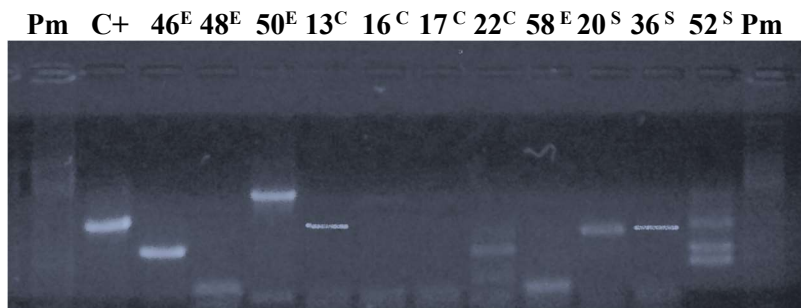


FIGURA 16. Gel de eletroforese do produto da PCR para confirmar gene de resistência nas bactérias. Legenda: Pm: peso molecular do marcador, C+: controle positivo. Amostra 13^c, 22^c, 20^s, 36^s positivas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a prevalência de três principais patógenos que causam DTA, tais como, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças de frango de alguns estabelecimentos localizados em áreas periféricas e centrais da cidade de Botucatu, SP, Brasil, no período de julho a outubro de 2015.

A ocorrência dessas bactérias em carne de consumo pode variar consideravelmente. Para o gênero *Campylobacter* spp., essa condição depende do número de micro-organismos presentes nas carcaças, do tempo de prateleira e dos cuidados na conservação (CARVALHO e COSTA, 1996; MODOLO, *et al.*, 2005). Silva *et al.* (2014) descreveram que a dificuldade do isolamento de *Campylobacter* spp. está relacionada com a sensibilidade ao oxigênio, dessecação, calor e pH. Para *Salmonella* spp. a variação vai depender da procedência do lote (contaminação primária), condições higiênico-sanitárias do abatedouro, contaminações cruzadas durante as etapas do abate, além do transporte e local de comercialização (OLSEN *et al.*, 2003; RALL *et al.*, 2009).

Esses resultados concordam com os obtidos em diferentes países referente ao isolamento das bactérias analisadas. No Senegal, foram obtidas prevalências de 56% para *Campylobacter* spp. e 96% para *Salmonella* spp. (CARDINALE *et al.*, 2003). Em Washington, EUA, Zhao *et al.* (2001) encontraram prevalências em frangos de 70,7% para *Campylobacter* spp., 4,2% para *Salmonella* spp. e 38,7% de *E. coli*. No Vietnã, Há e Pham (2006) identificaram 45% de *E. coli*, 28,3% de *Campylobacter* spp. e 8,3% de *Salmonella* spp. Na Venezuela Molero (2012), reportaram a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de frango em 60% das amostras.

No Brasil, estudos similares também detectaram bactérias em carcaças de frango. Modolo *et al.*, (2005) reportaram 47% de isolamentos positivos para *Campylobacter* spp., valores superiores aos obtidos neste trabalho. No entanto, Lopes (2009) e Carvalho *et al.*, (2010) encontraram 14,2% e 12,5% de positividade para o agente, respectivamente. Silva *et al.* (2014) determinaram ocorrências de 61% de *Campylobacter* spp. das amostras de fezes de frango, 20% de produtos de frango para consumo, e 3% de fezes de humanos. Carvalho *et al.* (2010) reportaram presença do complexo de genes da toxina citoletal distensiva (CDT) em 36,4% das amostras e Silva *et al.* (2014), determinaram 93,5% de genes para CDT.

No caso de *Salmonella* spp., organizações oficiais tais como o *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) e o *Center for Disease Control* (CDC) tem

reportado redução da presença dessa bactéria quando comparada com *Campylobacter* spp., devido a diferentes normativas e regulamentos implantados mundialmente (ANVISA, 2001). Porém, a prevalência de 13,33% observada no presente estudo ainda é considerada alta. Rall *et al.* (2009) citaram a presença do patógeno em 8% das amostras de frangos em Botucatu, SP, valores menores comparados com o presente trabalho. Esses autores também indicaram que 70% das amostras estavam fora dos parâmetros microbiológicos.

A prevalência de *E. coli* no presente estudo foi de 60%. Os resultados encontrados em carcaças de frango na cidade de Campo de Mourão, PR, Brasil, foram de 24,2% (RISSATO, *et al.*, 2012) menores do que os relatados na presente investigação.

Foram observadas prevalências de 13,3% nas marcas B, D e E para *E. Coli*. No entanto, para *Campylobacter* spp. as marcas com maiores prevalências foram D e F com 8,3%, seguida de A e C com 6,7%. No caso de *Salmonella* spp., a prevalência foi igual para B, E e F (3,3%). Estudo similar foi realizado em carcaças de frangos resfriados com as marcas disponíveis em mercados e açougues da cidade de Campo Mourão. A marca A apresentou 12,12%, seguido de C e D com 6,06% das amostras positivas. Marca B não apresentou amostras positivas (RISSATO *et al.*, 2012).

Estudos relacionados com locação em várias partes do mundo têm mostrado a presença desses patógenos em carcaças de frangos. Zhao *et al.* (2001) determinaram que 91% dos estabelecimentos durante a coleta de 92 amostras de frango tiveram contaminação com *Campylobacter* spp. tanto na área urbana como suburbana em Washington, EUA. No entanto, para *E. coli*, a prevalência foi de 60% em 106 estabelecimentos visitados. Para *Salmonella* spp. foi observada baixa prevalência.

Modolo *et al.* (2005) determinaram *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos comercializadas nas regiões centrais e periféricas de Botucatu, SP, Brasil. Os testes realizados em 400 carcaças de frango indicaram maior presença da bactéria nas carcaças vendidas na região central do que na região periférica.

Os resultados apresentados indicam um problema de Saúde Pública, pois as marcas utilizadas nestas pesquisas estão disponíveis para consumo humano, além de atenderem os programas de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na indústria recomendado por ANVISA (2007). É fundamental o papel de manipuladores e consumidores na diminuição dos riscos de patógenos de origem alimentar. Igualmente é importante a Vigilância por parte dos

Órgãos de Saúde que se preocupam com a segurança dos alimentos para disponibilizar aos consumidores produtos livres de micro-organismos que causam DTA.

Isolamento de *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp. e de *E. coli* detectado a partir do diagnóstico metodologia convencional foram confirmados por provas bioquímicas e, testes moleculares (PCR).

As cepas de *Campylobacter* spp. isoladas não apresentaram distinções nítidas nos testes bioquímicos, pois algumas cepas tiveram a característica de *C. coli* com tolerância ao 2`3`5 cloreto de trifeniltetrazólio e também à hidrólise do hipurato, característico de *Campylobacter jejuni*. Por esse motivo, tais cepas têm se denominado *Campylobacter jejuni/coli*. Comportamentos similares têm sido relatados por Modolo *et al.* (1991) durante pesquisas em bezerros e cães, com e sem diarreia, e por Modolo *et al.* (2005) em carcaças de frangos em Botucatu, SP. Véron e Chatelain (1973) indicaram a dificuldade para realizar estudos taxonômicos com o gênero *Campylobacter*. Além disso, outro estudo refere que a dificuldade em classificar esse agente pode estar relacionada a presença de um plasmídeo comum (BRADBURY, 1983).

Os isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* foram confirmadas através de provas bioquímicas complementares. Ao contrário de *E. coli*, não foi possível mostrar características típicas em todas as cepas de *Salmonella* spp.

No diagnóstico molecular algumas amostras de *Campylobacter* spp. que não puderam visualizar-se são descritas por autores como falsos negativos, pois alguns componentes dos meios de cultura de *Campylobacter* inibem fortemente PCR, tais como; sangue ou hemoglobina (DENIS *et al.*, 2001). O fígado muito rico em proteína poderia também explicar essa interferência, devido a que todas as amostras foram estocadas em meio Tarozzi. Outros autores como Silva *et al.* (2014) assinalaram que não foi possível obter material dos isolados do micro-organismo para análise molecular pela dificuldade de cultivo da bactéria.

Ressalta-se, a importância de realizar diagnóstico molecular para confirmação da presença de bactérias alimentar, pois é uma alternativa viável para detecção de micro-organismo nos alimentos, devido a rapidez, especificidade e sensibilidade do método referida por vários autores (RALL *et al.*, 2009; RISSATO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014)

A pesar de estudos anteriores descreverem essas bactérias em frangos comercializados para consumo, este trabalho demonstra prevalências ainda significativas

de bactérias que causam doenças de transmissão alimentar. Tal fato reforça o risco para os consumidores considerando que os organismos de segurança alimentar têm alertado os perigos para a saúde pública. Preocupação especial merece *Campylobacter*, pois ainda não existem regulamentações para esta bactéria em alimentos. A baixa dose infectante e a relação do patógeno com a Síndrome de Guillain-Barré, que causa a paralisia muscular, merece preocupação pelos profissionais de saúde.

No estudo mostra-se alta porcentagem de resistência aos antimicrobianos das amostras isoladas com *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* em carcaças de frango obtidas nos diferentes estabelecimentos. Se observar que a maioria dos isolados de *Campylobacter* spp. foram resistentes entre 80 e 90% nos fármacos testados. Das amostras pesquisadas, 19 cepas demonstraram resistência a todos os antimicrobianos. Só quatro delas resultaram sensíveis em alguns dos fármacos o que representa um grave perigo as pessoas que consomem frangos contaminados com esse patógeno. Em estudo similar em Bolívia utilizando o método de difusão com discos, foram observados cepas resistentes para ciprofloxacino (70%), eritromicina (61%), tetraciclina (66%) e clindamicina (77%) (OLAGUIBEL, 2009). No Brasil determinou-se resistência dos isolados às quinolonas ácido nalidíxico (72,2%) e ciprofloxacino (50,8%), igualmente utilizando o método de difusão com discos (LOPES, 2009).

Fitch *et al.* (2005) demonstraram que isolados de *C. jejuni* de produtos de frango tiveram uma maior taxa de resistência às quinolonas quando foram comparados com isolados em fezes de humanos. Tambur *et al.* (2009) determinaram que as cepas de *C. jejuni* e *C. coli* foram resistentes para ampicilina (25%), tetraciclina (29,2%), e ciprofloxacino (50%). Além disso, as amostras de *C. jejuni* foram resistentes a eritromicina (23,5%) e a cloranfenicol (11,7%). Nenhum *C. coli* foi resistente ao cloranfenicol nem eritromicina. Valores menores aos observados em este estudo foram reportados por outros pesquisadores, o que indica que as bactérias cada vez se tornam mais resistentes aos fármacos existentes.

Para *Salmonella* spp. mostra-se porcentagem de resistência variável dos patógenos em 85%, 50% e 30% nos diferentes antimicrobianos. Okamoto *et al.* (2009), revelaram 100% de efetividade do cloranfenicol em 100 das amostras analisadas da bactéria provenientes de aves. A sensibilidade a este fármaco pode ser justificada, devido ao impedimento do seu uso em animais de produção em diferentes países. Em Brasil tem

sido proibido desde 2003 (BRASIL, 2003). Resultados similares foram observados no presente trabalho com 80% de sensibilidades para esse antimicrobiano.

Os isolados de *E. coli* também indicaram porcentagem variável de resistência (80%, 65%, 50% e 30%) dos diferentes fármacos analisados. Estudo realizado por Silva *et al.* (2006) em enterobactérias isoladas de águas tratadas e não tratadas, foram encontradas *Escherichia coli* em 76% nas amostras. Para essa bactéria, as maiores prevalências em resistência aos antimicrobianos, amoxicilina e tetraciclina (30%). No entanto, neste trabalho foi a eritromicina e o ácido nalidíxico os fármacos menos efetivos. Uma das hipóteses da resistência de bactérias a diferentes antimicrobianos está associado aos padrões de uso indiscriminado (STELLING *et al.*, 2005).

Nesse caso, a presença de bactérias MR pode ser atribuída aos protocolos terapêuticos utilizados para tratamento de doenças semelhantes em humanos. Além disso, esses fármacos são utilizados em animais de produção, principalmente em sistemas intensivos, com fins terapêuticos ou mesmo profiláticos, como os “promotores de crescimento” adicionados na ração de aves e suínos, e na profilaxia da vaca seca.

Integron classe 1 foram detectadas em algumas das cepas de *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp. e *E. coli* através de PCR. Os integrons são elementos gênicos que têm se destacado como um importante reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos. Estudos similares foram realizados por Silva *et al.* (2007), Van Essen-Zandbergen *et al.* (2007), Okamoto *et al.* (2009), Bakhshi *et al.* (2014).

A presença de bactérias MR nos isolados das carcaças de frango é um problema relevante de Saúde Pública, tendo em vista a impossibilidade do tratamento eficaz das pessoas com gastroenterite associada à ingestão de alimentos contaminados, inclusive tratamentos ineficazes, elevado custo financeiro nas terapias. Por conta disso, a possibilidade de exposição a outros agentes infecciosos altamente patogênicos são situações que podem influenciar negativamente. Ademais, essas bactérias são capazes de transferir o gene de resistência. Em 2016, EUA reportaram a primeira bactéria, a *E. coli* resistente para todos os antimicrobianos (O GLOBO, 2016).

Dada a relevância das DTA se faz necessário pesquisas para implementação de métodos seguros e rápidos na detecção desse patógeno alimentar. Isso contribuiria para a aplicação de sistemas de segurança alimentares baseados no controle de qualidade da carne de frango resfriada, devido ao seu elevado consumo.

7 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* estiveram presentes nas diferentes marcas de carcaças de frango oriundos de estabelecimentos comerciais da cidade de Botucatu, SP, com maior tendência na periferia.

Mesmo assim, os micro-organismos em questão exibiram elevada resistência aos antimicrobianos, provavelmente pelo uso indiscriminado na profilaxia/tratamento de doenças de frango. Dessa maneira, o *Integron* de classe 1 encontrado nas cepas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* indica perigo de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos entre os enteropatógenos obtidos de frangos.

Por fim, a exposição destas bactérias via cadeia alimentar pode ser considerado um fator de risco à Saúde Pública.

8 REFERÊNCIAS*

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001*. Regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.RDC_12_2001. Acesso em: 10 nov 2015

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Vigilância Sanitária: alimentos, medicamentos, produtos e serviços de interesse à saúde: guia didático*. Brasília: ANVISA, 2007. p. 111.

ÁLVAREZ, M. M.; BUESA, G. J.; CASTILLO, G. J.; VILA, E. J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. In: CERCENADO, E.; CANTÓN, R. (Ed.). *Procedimientos en microbiología clínica: recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC, 2008. p. 1-40.

ARANGO, B. M. *Colibacilosis aviar: una enfermedad compleja. Parte II: la enfermedad en aves*. Disponível em: <http://patologiaaviarmiagnostico.blogspot.com.br/2012/01/colibacilosis-aviar-una-enfermedad.html>>. Acesso em: 20 maio 2013.

BAKHSHI, B.; EFTEKHARI, E.; POURSHAFIE, M. R. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among intestinal bacteria. *Jundishapur J. Microbiol.*, v. 7, n. 5, p. 1-5, 2014.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SCHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENEDETI, G. M.; DORO DA SILVA, D. L. Síndrome de Guillain-Barré. *Semina: Ciên. Biol. Saúde*, v. 27, n. 1, p. 57-69, 2006.

BRADYBURY, C. B. Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect. Immun.*, v. 40, p. 460-463, 1983.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº9*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Seção 1, p. 4.

BRONZWAER, S.; HUGASA, M.; COLLINS, J. D.; NEWELL, D. G.; ROBINSON, T.; MAKELA, A. P.; HAVELAAR, A. Scientific Colloquium-assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 131, n. 2-3, p. 284-285, 2009.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 20025. 24p. BIOSIS. **Serial s**

BUTZLER, J. P. *Campylobacter* from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 10, n. 10, p. 868-876, 2004.

CABRERA, C. E.; GÓMEZ, R. F.; ZÚÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Méd.*, v. 38, n. 2, p. 149-158, 2007.

CARDINALE, E.; PERRIER GROS-CLAUDE, J. D.; TALL, F.; CISSÉ M.; GUÈYE E. F.; SALVAT, G. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in Retail Chicken Carcasses in Senegal. *Rev. Élev. Méd. Vét. Paystrop.*, v. 56, n. 1-2, p. 13-16, 2003.

CARVALHO, A. C.; COSTA, F. N. Ocorrência de *Campylobacter* em carcaças e cortes de frango ao nível industrial e comercial. *Hig. Aliment.*, v. 10, p. 41-43, 1996.

CARVALHO, A. F.; SILVA, D. M.; AZEVEDO, S. S.; IATTI, R. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 5 p. 1054-1061, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v. 58, p. 333-337, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Food safety progress report for 2012*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodnet>>. Acesso em: 12 abr. 2014

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - Ninth Edition*. CLSI Document M07-A9. Wayne: CLSI, 2012. (CLSI Document M07-A9).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility Tests for bacterial isolated from animals; approved standard 4th*. Wayne: CLSI, 2013. (CLSI Document VET 01-A4).

DENIS, M.; REFREGIER-PETTON, J.; LAISNEY, M. J.; ERMEL, G.; SALVAT, G. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 91, p. 255-267, 2001.

DE MELLO MEDEIROS, V. *Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de Campylobacter spp. a partir de frango resfriado*. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado) – INCQS, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

ENGBERG, J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. *Dan. Med. Bull.*, v. 53, p. 361-389, 2006.

EUA têm primeiro caso de bactéria resistente ao 'último antibiótico'. *O Globo*. Disponível em:<<http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/eua-tem-primeiro-caso-de-bacteria-resistente-ao-ultimo-antibiotico-19383672>>. Acesso em: 9 jun. 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). *Annual Report 2012*. Disponível em:<www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/ar12>. Acesso em: 20 out. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (US). WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). *Salmonella and Campylobacter in chicken meat: meeting report*. Rome: FAO, 2009. (Microbiological Risk Assessment Series, 19).

FITCH, B. R.; SACHEN, K. L.; WILDER, S. R.; BURG, M. A.; LACHER, D. W.; KHALIFE, W. T.; THOMAS, M.; YOUNG, S. W.; YOUNG, B.V. Genetic diversity of *campylobacter* sp. isolates from retail chicken products and humans with gastroenteritis in central. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 8, p. 4221-4224, 2005.

FONSECA, B. B.; SONCINI, R. A.; FREZZA, A. L. C.; ROSSI, D. A. *Campylobacter* spp. Em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. *Biosci. J.*, v.23, n.3, p.128-132, 2007.

GALANIS, E.; LO FO WONG, D. M.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F. J.; WEGENER, H. C.; WORLD HEALTH ORGANIZATION GLOBAL SALM-SURV. We-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 2, n. 3 p. 381-388, 2006.

GUIFFRIDA, R. Infecções pelo gênero *Campylobacter*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 347-355.

GUIMARAES, D. O.; DA SILVA-MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos, importância, terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-669, 2010.

GONÇALVES, K. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I.; CHANO, L. J.; RIBEIRO, A. B. Study about the *Campylobacter* spp. present in chicken meat sold in the city of Campo Mourão-PR. *Alim. Nutr*, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 211-216, 2012.

HA, T. A.; PHAM, T. Study of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* contamination in raw food available in factories, schools, and hospital canteens in Hanoi, Vietnam. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1081, p. 262-265, 2006.

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

HART, T. *Microterrores*. O guia completo das infecções bacterianas, virais e fúngicas que ameaçam a nossa saúde. São Paulo: Ed. Principis, 2010. p. 192.

HENDRIKSEN, R.; MIKOLEIT, M.; CARLSON, V.; KARLSMOSE, S.; VIEIRA, A.; JENSE, A.; SEYFARTH, A.; De LONG, S.; WEILL, F.; LO FO WONG, D.; ÂNGULO, F.; WEGENER, H.; AARESTRUP, F. Who global Salm-surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolate from 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n. 9, p. 2729-2736, 2009.

HERNANDEZ, C. C.; AGUILERA, A. M.; CASTRO, E. G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf. Inf. Microbiol.*, v. 31, n. 4, p. 137-151, 2011.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; STANLEY, T. W. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. *Campylobacter*. In: U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Silver Spring: FDA, 2001. chap. 7. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). *Mapa de Botucatu 2013*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 maio 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10272-1:2006(E)*. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.–Part 1: Detection method. Geneva: ISO, 2006. p. 16.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 6579-2002*. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva: ISO, 2002. p. 25.

JOKINEN, C. C.; SCHREIER, H.; MAURO, W.; TABOADA, E.; ISAAC-RENTON, J. L.; TOPP, E.; EDGE, T.; THOMAS, J. E.; GANNON, V. P. The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J. Water Health*, v. 8, n. 2, p. 374-386, 2010.

KEGODE, R.; DOETKOTT, D.; KHAITSA, M.; WESLEY, I. Occurrence of *Campylobacter* species, *Salmonella* Species and generic *Escherichia coli* in meat products from retail outlets in the Fargo Metropolitan area. *J. Food Safety*, v. 28, p.111-125, 2008.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; PAAUW, A. BOX, A. T.; BLOK, H.E.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n.8, p. 3038-3040, 2002.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; BLOK, H. E.; DONDERS, A. R.; PAAUW, A.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate Origin. *J. Infect. Dis.*, v. 187, p. 251-259, 2003.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPNSN). Genus *Campylobacter* Disponível em: www.bacterio.net/campylobacter.html. Acesso: 30 mar. 16

LOPES, G. V. *Campylobacter spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças de bovino para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovino*. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENG, J.; DOYLE, M. P. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull. Inst. Pasteur.*, v. 96, p. 151-164, 1998.

MESTROVIC, T. *Historia de las Salmonelas*. 2015. Disponível em: <[http://www.news-medical.net/health/Salmonella-History-\(Portuguese\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Salmonella-History-(Portuguese).aspx)>. Acesso em: 21 maio 2016.

MISHU, B.; BLASER, M. J. Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillain-Barré syndrome. *Clin Infect Dis.* v.17, p.104-108, 1993.

MOLERO, G. L. Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos del estado Zulia, Venezuela. 2012. 88 f. Tesis (Doctorado en Veterinaria) - Departamento de Biología LUZ y Departamento de sanidad Animal UCO, Córdoba, España, 2012.

MODOLO, J. R.; GOTTSCHALK, A. F.; MORENO, G.; LOPES, C. A. M; MARGATHO, L. F.; DALFAVA, C. *Campylobacter* em cães com o sem diarreia: incidência e susceptibilidade a 21 antimicrobianos. *Rev. Microbiol.*, v. 22, p. 288-292, 1991.

MODOLO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P.; PADOVONI, C. R.; SIMÕES, L. B. CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para saúde pública. *Hig. Aliment.*, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. *Microbiología Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 255.

NEZOUANKEU, A.; NGANDJIO, A.; EJENGUELE, G.; NJINE, T.; NDAYO-WOUAFO, M. Multiple contaminations of chickens with *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* in Yaounde (Cameroon). *J. Infect. Dev. Ctries*, v. 4, n. 9, p. 583-586, 2010.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI-FILHO, R. L.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in *Salmonella* Enteritidis derived from avian material. *Braz. J. Poultry Sci.*, v. 11, n. 3, p. 195-201, 2009.

OLAGUIBEL, O. L. *Monitoreo de la resistencia antimicrobiana de Campylobacter spp. en cuatro hospitales de la ciudad de la Paz-Bolivia 2005-2006*. Trabajo de fin de Titulación (Licenciado en Bioquímica) - Universidad San Andres, Bolivia, 2009.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Crosscontamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, n. 5, p. 826-835, 2003.

ORIHUEL, E.; SANZ, M.; BERTO, N.; CANET, J. J.; LORENZO, F.; CORUJO, A.; MILVAQUES, A. *Campylobacter la bacteria discreta*. Valencia: Betelgeux, 2015. p. 48.

PAIXÃO, T. A.; PINTO, J. P. A. N.; SANTOS, R. L. Enfermidades pelo gênero *Salmonella*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 478-493.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Clinical veterinary microbiology*. London: Ed. Wolfe, 1994. p. 648.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. São Paulo: Artmed, 2007. p. 512.

QUINTERO, T.; BOZA, R. Síndrome de Guillain-Barré: análisis de 36 pacientes. *Rev. Costarric. Ciênc. Méd.*, v. 20, n. 3-4, p. 217-230, 1999.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; DA SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAUJO-JUNIOR. J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguças comercializados na cidade de Botucatu. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

RIBEIRO, M. G.; LEITES, D. S.; SIQUEIRA, A. K.; Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J.; GARCIA-RIBEIRO, M.; PAES, A. C. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro, 2016. p. 243-276.

RISSATO, D. P.; BORGIO, A. P.; MOREIRA, J. P.; MULLER-CONTI, A. C.; FRANCIELLE, B.; RIBEIRO, A. B. Detecção de *Escherichia coli* em água de lavagem de carcaças de frango pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *SaBios: Rev. Saúde Biol.*, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2012.

ROSELL, A. C. Campylobacteriosis en aves de corral. *Mundo Ganadero*, n. 188, p. 22-25, 2006.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P.; POPOWSKI J, KORSAK, D.; DZIERZANOWSKA, D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.*, v. 54, p. 615-619, 2005.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.*, v. 141, p. 1-4, 2010.

STELLING, J. M.; TRAVERS K.; JONES, R. N.; TURNER, P. J.; O'BRIEN, T. F.; LEVI, S. B. Integrating *Escherichia coli* antimicrobial susceptibility data from multiple surveillance programs. *Emerg. Infect Dis*, v. 11, p. 873-882, 2005.

STERN, N. J.; ROTHENBERG, P. J.; STONE, J.M. Enumeration and reduction of *Campylobacter jejuni* in poultry and head meats. *J. Food Prot*, v.48, p.606-610, 1985.

SILVA, M. F.; VAZ-MOREIRA, L.; GONZALEZ-PAJUELO, M.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 60, p. 166-176, 2007.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; CUNHA, C. C.; LOPES, N. A.; AGOSTINETTO, A.; COLLARES, T.; LEON, P. M.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 1, p. 297-304, 2014.

TAMBUR, Z.; MILIKOVIC-SELIMOVIC, B.; BOKONJIC, D. Determination of sensitivity to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Vojnosanit. Pregled.*, v. 66, n. 1, p. 49-52, 2009.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Salmonella*. In: _____. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Silver Spring: FDA, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 4 maio 2014.

VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; SMITH, H.; VELDMAN, K.; MEVIUS, D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 59, p.746-750, 2007.

VERON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Verón and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 23, n. 2, p. 122-123, 1973.

VILA J.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M. J.; BUESA, J.; CASTILLO, J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, v. 27, p. 406-411, 2009.

WILHELM, B.; RAJIC, A.; GREIG, J. D.; WADDELL, N.; HARRIS, J. The effect of hazard analysis critical control point programs on microbial contamination of carcasses in abattoirs: a systematic review of published data. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 8, n. 9, p. 949-960, 2011.

WILLIAMS, M. S.; EDEL, E. D. Foodborne pathogens and disease. *Foodborne Pathog. Dis*, v. 9, n. 1, p. 59-67, 2012.

ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. New Jersey. Prentice Hall, 1996. 662 p

ZHAO, C.; GE, B.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

1 Trabalho a ser enviado para a revista: Applied and Environmental Microbiology.

2 **Occurrence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in chicken**
3 **carcasses.**

4 **Isamery A. Machado^{1,4}, Adriano S. Okamoto², José Rafael Modolo³ Noeme S.**
5 **Rocha⁴**

6 ¹Institute of Animal Production-UCV, ²Department of Veterinary Clinics
7 (Ornithopathology Service) FMVZ-UNESP, ³Department of Veterinary Hygiene and
8 Public Health FMVZ UNESP, ⁴Department of Veterinary Clinics (Pathology Service)
9 FMVZ UNESP.

10 **E-mail Address:** isamerymachado@yahoo.com

11 The transmission of Foodborne Diseases (FBD) by bacteria constitute a public health
12 problem in the world. This study aimed to identify the presence of *Campylobacter* spp.,
13 *Salmonella* spp. and *E. coli* in broiler chickens of Botucatu, SP, Brazil, by means of
14 microbiological and molecular methods. Sixty samples of chilled chickens of different
15 brands were randomly collected from supermarkets and meat houses located in both
16 peripheral and central area of the city, from July to October 2015. Later, *Campylobacter*,
17 *Salmonella* and *E. coli* were isolated from poultry carcasses by conventional
18 microbiological methods, and confirmed by biochemical and PCR tests. The prevalence
19 was 38.3% of *Campylobacter*, *Salmonella*, 13.3%, and *E. coli*, 60%. New findings on
20 multidrug resistance and integron class 1 of such pathogens poses a significant public
21 health concern.

22 **Keywords:** foodborne diseases, chicken carcass, enteropathogens, *Campylobacter* spp.,
23 *Salmonella* spp., *Escherichia coli*

24 **INTRODUCTION**

25 The production of poultry meat has expanded approximately 5,6% in the decade
26 of the 80s. Brazil has positioned as the second major producer and the largest exporter of
27 chicken meat. In addition, global consumption of poultry meat has increased considerably
28 since considered as the most economical among animal protein sources. It is estimated
29 that over 60% of animal protein consumed comes from chicken meat. Currently, Brazil
30 has the third per capita consumption worldwide, with 41,862Kg/inhab./year (1).

31 The contamination of food by pathogens, among them bacteria of the
32 Enterobacteriaceae family, as *Salmonella* spp. and *E. coli*, and the Campylobacteriaceae
33 family, such as *Campylobacter* spp., may cause infection or intoxication in humans.

34 These micro-organisms commonly dwell in gastrointestinal tract of animals and humans
35 (2, 3, 4).

36 The foodborne disease (FBD) is common in most countries. However, its
37 prevalence has increased exponentially by the massive consumption of poultry and eggs
38 (5, 6, 7).

39 *Campylobacter*, *Salmonella* and *E. coli* colonize the gastrointestinal tract of a
40 wide variety of wild and domestic animals. Human consumption of poisoned meat is the
41 main propagator of these bacteria (8, 9). This bacterial contamination can occur at various
42 stages along the food chain, including production, processing and distribution. Several
43 epidemiological studies confirm diseases caused by these pathogens, especially in avian
44 origin products (9, 10, 11).

45 Campylobacteriosis is a disease caused by *Campylobacter* spp. *Campylobacter*
46 species most common are *C. coli*, *C. lari*, and *C. jejuni*, being the latter responsible for
47 90-95% of bacterial gastroenteritis (11). In humans, gastroenteritis is the most common
48 clinical manifestation. The symptoms are similar to those caused by other enteric
49 pathogens. However, the main complication is the low dose to cause infection. Only the
50 intake of 400 to 500 cells can produces the sickness (12, 13). This pathology is also
51 implicated as the predominant cause of Guillain-Barré syndrome, a demyelinating
52 inflammatory polyneuropathy resulting in acute neuromuscular paralysis (14, 15).

53 Salmonellosis is caused by *Salmonella* spp. evenly affecting animals and humans.
54 From all serotypes described for *Salmonella enterica*, Enteritidis and Typhimurium are
55 the most frequent cases of human salmonellosis in the world (6, 16, 17). Clinical
56 manifestations range from mild intestinal signs to septicemia. It is found widely in
57 newborns, elderly and immunocompetent people. Although the diarrhea is the main
58 symptom, the intensity varies among patients. Moreover, abdominal discomfort, cramps,
59 fever, nausea, vomiting and headache are also present (9, 18).

60 The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) is the predominant species in the normal
61 enteric flora of most mammals, and generally as a harmless microorganism. However,
62 some strains are quite pathogenic causing urinary tract infections, septicemia, meningitis
63 and gastroenteritis in humans and animals. The high pathogenicity of *E. coli* is due to
64 several virulence factors (19, 20).

65 *E. coli* causes enteric and extra-enteric events. Based on pathogenicity, it is
66 classified into different groups: enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasivo (EIEC),

67 enteropathogenic (EPEC), enterohemorrágico (EHEC), diffuse adherence (DAEC) and
68 enteroaggregative (EA_ggEC) (21, 22).

69 The prevalence of these bacteria has been reported worldwide. However, official
70 statistics on FBD from developing countries like Brazil are scarce. Studies have primarily
71 described the presence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli* in poultry
72 products (9, 15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

73 Based on these grounds, this research aims to identify the presence of
74 *Campylobacter*, *Salmonella* and *E. coli* in broiler carcasses in Botucatu, SP, Brazil, by
75 microbiological and molecular methods.

76 MATERIAL AND METHODS

77 Sixty samples of chilled chicken carcasses of different brands were collected from
78 some establishments located at peripheral and central areas of the city of Botucatu, SP,
79 Brazil, in the period from July to October 2015. The transport of carcasses to the
80 laboratories was carried out at different times to ensure variety of batches. Thus, groups
81 of 10 chickens were formed, according to the experimental design. The samples were kept
82 in containers and transported immediately under refrigeration (4-8°C) in cool boxes to
83 the laboratories of Animal Health Planning and Avian Pathology, both from the Faculty
84 of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, UNESP.

85 Isolation and identification of *Campylobacter* spp.

86 In the laboratory, the packaging of each chicken received a cut at the seal region,
87 and placed for two hours on a sterile beaker to obtain bloody fluid.

88 Isolation of the agent was performed by using two procedures: filtration and direct
89 seeding. In the filtration process, 10 ml of liquid sample was placed in each test tube, and
90 centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes. The supernatant was filtered with the aid of a
91 cellulose acetate membrane of 0.65 µm in diameter (Sartorius Brasil Ltda). Finally, three
92 drops of the filtrate were plated on agar thioglycolate (Oxoid Brasil Ltda) containing 20%
93 bovine blood, and incubated at 37 ° C for 72 hours, under microaerobic (Gerador
94 Microaereofilia CO2 GEN- Oxoid Brasil Ltda). To direct seeding, an aliquot of
95 previously centrifuged and homogenized sample was seeded on the same agar with the
96 addition of the Buzler selective supplement (bacitracin, novobiocin, cycloheximide,
97 colistin and cefazolin.) (Oxoid Brasil Ltda) and incubated for 48 hours at 42°C, in
98 microaerophilic (28). Typical colonies of *Campylobacter* were separated for their
99 identification through biochemical and molecular tests.

100 **Isolation and Identification of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli***

101 For isolation of *Salmonella* spp., 25 ml of bloody fluid carcasses were removed,
102 placed in a sterile plastic bag (WHIRL-PAK) containing 225 ml of peptone water, and
103 then incubated at 37°C, for 24 hours. After this, 1 ml and 0.1 ml were transferred to two
104 test tubes containing 10 ml of selective enrichment media, tetrathionate (Muller-
105 Kauffmann tetrathionate/novobiocin-broth MKTTn) and Rappaport (Rappaport-
106 Vassiliadis medium with soya -RVS broth) (Sigma- Aldrich), respectively. A further
107 incubation was performed for MKTTn at 37 ° C for 24 hours, and for RVS at 42°C for
108 24 hours. Then, by means of a platinum loop, the incubated material was seeded in a
109 selective culture medium Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (Sigma- Aldrich), and in
110 a Brilliant Green Agar (BGA) (Sigma- Aldrich), as described by (30).

111 For isolation of *E. coli*, 25 ml of bloody fluid carcasses were placed in a sterile
112 plastic bag with 225 ml peptone water for subsequent incubation at 37°C for 24 hours.
113 Finally, with the help of platinum loop, the contents was seeded onto MacConkey Agar
114 and Brilliant Green Agar (BGA) (Sigma- Aldrich), and incubated at 37°C for 24 hours.
115 Characterized colonies of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* were separated for
116 identification via biochemical and molecular tests.

117 **Confirmation of the bacteria isolated by biochemical tests.**

118 Colonies suspected of *Campylobacter* spp. were examined by phase-contrast
119 microscopy (1000X), Carl Zeiss AG, Germany. The diagnosis was made by observing
120 the following morphologies: curved bacillus, and typical movement of spirillum. After
121 the presumptive diagnosis, a suggesting colonies were subcultured in a Tarozzi medium,
122 and finally incubated at 37°C for 72 hours, to obtain inoculum with a density adjusted to
123 the scale of the McFarland tube 1 (3x 10⁸ CFU/mL). To observe typical features of micro-
124 organism, different biochemical tests were performed such as catalase, growth
125 temperature at 25°C and 43°C, and growth medium at 1% of glycine and 3.5% of NaCl,
126 hydrolysis of hippurate, H₂S production with and without cysteine at 0.02%, tolerance to
127 trifeniltetrazóico chloride (TTC), and resistance to nalidixic acid and cephalothin (28, 31,
128 32).

129 Characterized colonies of *Salmonella* spp. and *E. coli* were placed into agar Triple
130 Sugar Iron (TSI) and agar Lysine Iron Agar (LIA), Sulfide Indole and Motility (SIM),
131 and urea for screening. Colonies compatible with *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*
132 were identified by additional biochemical tests (33).

133 **Confirmation of isolated bacteria and identified by PCR**

134 Colonies of *Campylobacter* spp. previously identified by biochemical tests were
135 confirmed by PCR. The isolates were recovered in thioglycolate agar with 20% of blood
136 at 42°C for 48 hours, under microaerophilic. Then, a portion was diluted with 100 µl of
137 ultrapure water, in order to obtain a population of 10⁹ UFC/ml (tube 4 of the McFarland
138 scale). For DNA extraction the kit Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma) was used,
139 according to manufacturer instructions.

140 Typical colonies of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* for each species were
141 inoculated into brain-heart infusion broth (BHI) for 24 hours at 37°C. Subsequently, these
142 colonies were seeded on MacConkey Agar and Brilliant Green Agar (BGA), and
143 incubated at 37°C for 24 hours. The cultures were used for DNA extraction according to
144 the instructions of the kit Gen Elute Bacterial Genomic DNA (Sigma).

145 The identification of each isolate was confirmed by PCR using primers specific
146 for the genus *Campylobacter*, *Salmonella* and *Escherichia coli*.

147 PCR procedures used to identify *Campylobacter* are previously described by
148 Harmon et al. (1997). The primer pairs used were pg 3: GAACTTGAACCGATTTG and
149 pg 50: ATGGGATTTTCGTATTAAC. The reaction had a final volume of 25µL. To
150 complete the reaction volume, 12µL of Go Taq Green Master Mix (Promega), 2µL
151 (20pmol) of each primer, 1µL of DNA (with a concentration of 5nmol/µL), and 8µL water
152 were used. Amplification was performed in a thermocycler by the following program:
153 initial denaturation at 94°C for 4min, followed by 25 cycles of denaturation at 94 ° C for
154 1 min, annealing at 45°C for 1 min, extension at 72°C for 1min, and final extension at
155 72°C for 7min. (15). The strain of *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, courtesy of the
156 Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), served as a positive control. For its recuperation
157 was used the protocol sent by the Micro-Organism Laboratory Reference. The
158 electrophoresis in agarose gel (1.5%) was useful for the analysis of amplifications.

159 The identification process of *Salmonella* spp. followed the procedure described
160 by (29). The primers used were invA1: TCATCGCACC GTCAAAGGAAC and invA2:
161 GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG. PCR reactions had a total volume of 25µL,
162 comprising 12,5µL of Go Taq Green Master Mix (Promega), 1µL (10 pmol) of each
163 primer, 7.5 µl of ultrapure and autoclaved water, and 3 µL of DNA sample. Amplification
164 was performed in a thermocycler. The cycle parameters were 94°C for 5 min to initial
165 denaturation, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C

166 for 30 sec, amplification at 72°C for 30 sec, ending with a final extension of 72°C for 4
 167 minutes. The positive control was a strain of *Salmonella* spp. courtesy of Avian Pathology
 168 Laboratory of FMVZ-UNESP. The electrophoresis in agarose gel (1.5%) was performed
 169 for the analysis of amplifications.

170 For *Escherichia coli*, reactions were carried out with primers Eco 2083: GCT TTG
 171 ACA TGA TGA CAC AG, and Eco 2745: GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT. PCR
 172 reactions had a total volume of 25µL (5µL (600ng) of extracted DNA), 2,5µL of each
 173 primer, 12,5µL of Go Taq Green Master Mix (Promega), and ultrapure water to make up
 174 the final volume. Amplification was performed in a thermocycler with an initial
 175 denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec,
 176 annealing of 57°C for 1 min, and amplification at 72°C for 2 min, with a final extension
 177 of 72°C for 10 minutes (34).

178 **Statistical analysis**

179 Statistical analysis was completed using chi-squared test (χ^2 test) and Fisher's
 180 exact test to compare the association between the prevalence of the studied commercial
 181 mark of broiler chicken, and the isolation of each bacterium as well as for comparison
 182 between the region of collection and isolation. The significance was 5% ($P < 0.05$) (35).

183 **RESULTS**

184 **Isolations and identification**

185 Table 1 shows the occurrence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*
 186 in isolates of different brands of chilled chickens purchased in stores at peripheral and
 187 central locations of Botucatu. Of the 60 samples from analyzed chickens, 23 (38.3%)
 188 showed isolation of *Campylobacter*, 8 (13.3%) of *Salmonella* and 36 (60%) of *E. coli*.

189 **Table 1. Occurrence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli* in chilled**
 190 **chickens from the city of Botucatu, SP, Brazil, 2015.**

Bacteria	Samples	Frequency
<i>Campylobacter</i> spp.	23	38,3
<i>Salmonella</i> spp.	8	13,3
<i>E. coli</i>	36	60,0
Total	60	100

191

192 Table 2 shows the prevalence of bacterial isolation on chicken meat in different
 193 brands acquired in chicken outlets of Botucatu. The statistical test results indicated that
 194 there was no significant association ($p < 0.05$) between the commercial marks and the
 195 prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*.

196 **Table 2. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* in different**
 197 **brands of broiler chickens in Botucatu, SP, Brazil, 2015.**

Brand	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)
A	4	6,7	1	1,7	3	5,0
B	3	5,0	2	3,3	8	13,3
C	4	6,7	1	1,7	4	6,7
D	5	8,3	0	0,0	8	13,3
E	2	3,3	2	3,3	8	13,3
F	5	8,3	2	3,3	5	8,3
Total	23	38,3	8	13,3	36	60,0
χ^2	8,5145		5,0703		7,9689	
P (Fisher)	0,1519		0,2852		0,1675	

198 f: frequency; p: prevalence

199 The statistical analysis showed a significant difference among the chicken marks
 200 referred to the proportions of the three positive bacteria analyzed (Table 3). In this way,
 201 brand F showed higher proportion of positivity to *Campylobacter* spp., then brand A. For
 202 *Salmonella* spp. and *E. coli*, brands E and F showed higher positivity.

203 Table 4 shows that there was no association between the sample region of origin
 204 and the prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*. However, a
 205 greater tendency can be noted in the peripheral region when compared to the central
 206 region, possibly by inadequate storage conditions, rotation of stocks, and/or hygienic-
 207 sanitary control.

208 **Table 3. Proportion of bacterial isolations of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e**
 209 ***E. coli* in different brands of broiler chickens, Botucatu, SP, Brazil**

Brand	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
A	57,1 b	14,3 b	42,9 c
B	23,1 c	15,4 b	61,5 b
C	36,4 c	9,1 c	36,4 c
D	35,7 c	0,0) d	57,1 b
E	22,2 c	22,2 a	88,9 a
F	83,3 a	33,3 a	83,3 a
Total	38,3	13,3	60,0
χ^2	63,966	40,983	36,009
P	<0,001	<0,001	<0,001

210 Different letters indicate significant differences

211 **Table 4. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* of broiler**
 212 **chickens from different regions of Botucatu, SP, Brazil, 2015.**

Region	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)	f (n°)	p (%)
Central	9	15,0	3	5,0	14	23,3
Peripheral	14	23,3	5	8,3	22	36,7
Total	23	38,3	8	13,3	36	60,0
χ^2	0,5192		0,2098		1,3580	
P Fisher	0,1641		0,2713		0,1071	

213 f: frequency; p: prevalence

214 In addition, there was no significant statistical difference ($P > 0.05$) between the
 215 samples obtained in the center of the establishments and the periphery in relation to the
 216 proportion of positivity of the three bacteria analyzed. However, numerically, the
 217 peripheral region was approximately 60% higher in frequency and percentage of
 218 positivity than the central region (Table 5).

219 **Table 5. Proportion of bacterial isolations of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e**
 220 ***E. coli* of broiler chickens in different regions of Botucatu, SP, Brazil, 2015.**

Region	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
Central	33,3	11,1	51,9
Peripheral	42,4	15,2	66,7
Total	38,3	13,3	36 (60,0)
χ^2	1,094	0,639	1,847
P	0,3519	0,5455	0,2051

221

222 Table 6 shows the results of isolation of *Campylobacter* according to the
 223 classification of detected species *C. jejuni* and *C. jejuni/coli* were present in poultry
 224 carcasses in 52.17% and 39.13%, respectively.

225

226 **Table 6. Proportion of bacterial isolations of *Campylobacter* species in broiler**
 227 **chickens, Botucatu-SP, Brazil, 2015.**

Bactéria	Positive Samples	% Prevalence
<i>Campylobacter jejuni</i>	12	52,17
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	9	39,13
Others	2	8,70
Total	23	100

228

229 Confirmation of bacteria isolated and identified by PCR

230 The positive control of *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, through the primer
 231 pg3 pg50, which amplifies a conserved region of the flagellin related to both genes *C.*
 232 *jejuni* and *C. coli*, and generates a product of 480 bp. The isolated *Campylobacter* spp.
 233 detected from conventional methodology diagnosis, and confirmed by biochemical
 234 proofs, resulted also positive for molecular testing (PCR).

235 The PCR product appears after using the primer pair encoding *inv A1* and *inv A2*
 236 genes, yielding 284 bp. The presence of *Salmonella* spp. was confirmed by PCR in 7 of
 237 samples. However, 8 (13 3%) were positive to the pathogen by traditional methodology.

238 Outcomes related to *Escherichia coli* in chicken carcasses were confirmed by PCR, as
239 shown in Figure 11. Primers were used in all reactions for the highly divergent and
240 specific region of the DNA encoding rRNA 16S and 23S of *E. coli*. (Figure not shown).
241 Likewise, based on the antimicrobials tested and on the PCR assays specific, isolates
242 displayed features linked to multidrug resistance and integron class 1 (data not shown).

243 **DISCUSSION**

244 The present study demonstrates bacterial prevalence of three major pathogens on
245 chicken carcasses from some supermarkets and retail stores located at peripheral and
246 central areas of the city of Botucatu, SP, Brazil, from July to October 2015.

247 Such an occurrence linked to meat consumption can vary considerably. For the
248 genus *Campylobacter* spp, it depends on the number of microorganisms present in the
249 carcass, time in shelf, and care conservation (28, 36). In addition, it was reported that the
250 difficulty of isolating *Campylobacter* spp. is related to sensitivity to oxygen, desiccation,
251 heat, and pH (15). Variations in *Salmonella* spp. depend on the batch origin (primary
252 infection), sanitary conditions of the slaughterhouse, and cross-contamination during the
253 stages of slaughter, in addition to transportation and place of marketing (29, 37).

254 These results agree with those obtained in different countries regarding the
255 isolation of the bacteria analyzed. For example, in Senegal, Africa, a research found 56%
256 of prevalence for *Campylobacter jejuni*, and 96% for *Salmonella* spp. (23). In
257 Washington, USA, authors reported prevalence of *Campylobacter* spp. in 70.7% of
258 broiler chickens, 4.2% for *Salmonella* spp., and 38.7 for *E. coli* (9). In Vietnam, Asia,
259 45% of *E. coli* was identified, followed by 28.3% of *Campylobacter* spp., and 8.3% of
260 *Salmonella* spp. (24). In Venezuela, the presence of *Salmonella* was also determined in
261 60% of samples taken from poultry carcasses (27).

262 In Brazil, related studies also revealed such bacteria in chicken carcasses.
263 Detected 47% positive isolates in *Campylobacter* spp., higher values than those indicated
264 in the present work. The tests performed at 400 chicken carcasses indicated major
265 presence of the bacterium in the carcass sold in the central region than in peripheral region
266 (28). However, both Lopes (25) and Carvalho et al. (26) found lower percentage of
267 isolation of this bacteria, 14.2 and 12.5%, respectively. Silva et al. (15) determined
268 occurrences in 61% of samples of chicken droppings, 20% in chicken products for
269 consumption, and 3% in human stool, all linked to this microorganism. Carvalho et al.
270 (2010) pointed out the presence of gene complexes of the extensional citoletal toxin

271 (ECT) in 36.4% of the samples. However, Smith et al. (2014) determined 93.5% of such
272 grouped genes for ECT.

273 In the case of *Salmonella* spp., official organizations such as the European Centre
274 for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Center for Disease Control (CDC)
275 have documented a reduced presence of this bacterium when compared with
276 *Campylobacter* spp., mostly due to different regulations implanted worldwide (38).
277 However, the prevalence of 13.33% found in this study is still considered high. Moreover,
278 Rall et al. (29) cited the presence of the pathogen in 8% of the samples in chickens in
279 Botucatu. These values are lower than those expressed in the present research. These
280 authors also indicate that 70% of the samples were out of microbiological parameters.

281 A similar study was conducted on chilled chicken carcasses with the brands
282 available in markets and butcher shops of the city of Campo Mourão, Paraná, Brazil.
283 Brand A showed 12.12%, followed by C and D with 6.06% of the positive samples. Brand
284 B showed no positive samples. The results found in poultry carcasses in the city were
285 24.2%), lower than those reported in this study. (34).

286 The results presented indicate a public health problem due to the commercial
287 marks used for this research are extensively available for human consumption.

288 Isolates of *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp e *E. coli* detected from
289 conventional methodology diagnosis, and confirmed by biochemical proofs, resulted also
290 positive for molecular testing (PCR). *Campylobacter* spp. isolates did not present clear
291 distinction at biochemical tests. Strains featured both *C. coli*, with a tolerance of 2`3`5 to
292 Triphenyltetrazolium chloride, and *Campylobacter jejuni*, when hydrolyzed by hippurate.
293 Therefore, they has been named *Campylobacter jejuni/coli*.

294 Similar behavior has been reported by both studies Modolo et al. (39) in calves
295 and dogs, with and without diarrhea, and Modolo et al. (28) in broiler carcasses, Botucatu,
296 SP. Véron & Chatelain (31) indicated problems associated to this bacterium to achieve
297 taxonomic studies on the genus *Campylobacter*. In addition, further investigations
298 highlight difficulties in its classification, probably due to the presence of a common
299 plasmid on such strains (40).

300 Some authors describe unrevealed samples as false negatives, since some medium
301 components of the *Campylobacter* culture like blood or hemoglobin strongly inhibit PCR
302 (41). The high protein levels on liver could also explain this interference due to all
303 samples were stored in Tarozzi mediums. Other researchers as Silva et al. (15) pointed

304 out unsuccessful efforts to obtain *Campylobacter* material for molecular analysis linked
305 to its culturing hardships.

306 Isolates of *Salmonella* spp. and *E. coli* were confirmed through complementary
307 biochemical tests. Unlike *E. coli*, *Salmonella* spp did not show typical characteristics in
308 all strains. Thus, molecular diagnosis is important as a viable and reliable alternative to
309 confirm the presence of food bacteria. Speed, specificity and sensitivity are its main
310 advantages (15, 29, 34).

311 Despite previous studies on the assessed bacteria about pathogenic contamination
312 of commercialized broiler chickens, this research demonstrates a significantly remaining
313 prevalence. This must be still considered a very high risk factor for public health despite
314 Brazilian food health organizations have warned consumers about FBD. Special attention
315 should deserve *Campylobacter* before the absence of specific regulations to monitor and
316 control it. Low infective doses and its relationship with Guillain-Barré syndrome, a
317 disease that leads to muscle paralyses.

318 In the present study demonstrates the presence of *Campylobacter* spp., *Salmonella*
319 spp., *E. coli* and in different brands of chicken carcasses of meat Botucatu supermarkets
320 and homes, conventional molecular and microbiological methodology. This presents a
321 danger to public health because these bacteria are considered by international
322 organizations as the main causes of foodborne diseases.

323 ACKNOWLEDGEMENTS

324 The authors of this paper acknowledge to Prof. Wismar Sarmiento for his valuable help
325 for the edition and translation of this paper, to the technician Tânia M. Martins from the
326 Lab of Planning and Animal Health, FMVZ-UNESP, for her collaboration, and to the
327 funding agencies CAPES FAPESP and CNPq UNESP.

328 REFERENCES

- 329 1. **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)**. Perspectivas para as carnes
330 bovina, de frango e suína 2013 – 2014. In:
331 [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_12_17_43_13_09](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_12_17_43_13_09_carnes.pdf)
332 [_carnes.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_12_17_43_13_09_carnes.pdf) : 12-04-14.
- 333 2. **Fitch BR, Sachen KL, Wilder SR, Burg MA, Lacher DW, Walis T, Khalife**
334 **WT, Thomas M, Young SW, Young BV**. 2005. Genetic diversity of
335 *Campylobacter* sp. Isolates from retail chicken products and humans with
336 gastroenteritis in central. *J Clin Microbiol* **43**:4221-4224.
337 doi: [10.1128/JCM.43.8.4221-4224.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4221-4224.2005)
- 338 3. **Engberg J**. 2006. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter*
339 infections. *Dan Med Bull* **53**:361-389.

- 340 4. **Nzouankeu A, Ngandjio A, Ejenguele G, Njine T, Ndayo-Wouafo M.** 2010.
341 Multiple contaminations of chickens with *Campylobacter*, *Escherichia coli* and
342 *Salmonella* in Yaounde (Cameroon). *J Infect Dev Ctries* **4**:583-586.
343 <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/21045373/44>
- 344 5. **Wilhelm B, Rajic A, Greig JD, Waddell N, Harris J.** 2011. The effect of hazard
345 analysis critical control point programs on microbial contamination of carcasses
346 in abattoirs: a systematic review of published data. *Foodborne Pathog Dis* **8**:949-
347 960.
- 348 6. **Molero GL.** 2012. Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos
349 del estado Zulia, Venezuela. Tesis de Doctorado en Veterinaria. Departamento
350 de Biología LUZ y Departamento de sanidad Animal UCO, Córdoba, España,
351 p.88.
- 352 7. **Williams MS, Edel ED.** 2012. Foodborne pathogens and disease. *Foodborne*
353 *Pathog Dis.* **9**:59-67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114501/>
- 354 8. **Meng J, Doyle MP.** 1998. Emerging and evolving microbial foodborne
355 pathogens. *Bull Inst Pasteur.* **96**:151–164.
- 356 9. **Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White DG, Wagner D,**
357 **Meng J.** 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and
358 *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater
359 Washington, D.C., Area. *Appl Environ Microbiol* **67**:5431-5436.
- 360 10. **Rozynek, E.; Dzierzanowska-Frangat, K.; Jozwiak, P. Popowski J, Korsak**
361 **D, Dzierzanowska D.** 2005. Prevalence of potential virulence markers in
362 Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from
363 hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.* **54**: 615-619.
- 364 11. **Rosell AC.** 2006. Campylobacteriosis en aves de corral. *Mundo Ganadero*
365 **(188)**:22-25
- 366 12. **Butzler, J P.** 2004. Campylobacter from obscurity to celebrity. *Clinical*
367 *Microbiology and infection.* **10**: 868-876.
- 368 13. **Gonçalves KO, Yamanaka EHU, Almeida API, Chano LJ, Ribeiro AB.** 2012.
369 Study about the Campylobacter spp. present in chicken meat sold in the city of
370 Campo Mourão-PR. *Alim Nutr* **23**:211-216.
- 371 14. **Mishu, B., Blaser, M. J.** 1993. Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in
372 the initiation of Guillain-Barré syndrome. *Clin infect Dis.* **17**:104-108.
- 373 15. **Silva, D.T., Tejada, T.S., Cunha, C.C., Lopes, N.A., Agostinetto, A., Collares,**
374 **T.; Leon, P.M., Timm, C.D.** 2014. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de
375 frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arq. Bras. Med. Vet.*
376 *Zootec.* **66**: 297-304.
- 377 16. **Galanis E., Wong Lo. Fo., Danilo M.A., Patrick M., Biinsetein N., Cieslik A.,**
378 **Thogchai Ch., Aidara- Kane A., Ellis A., Angulo F., Wegerner H.** 2006. We-
379 based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect*
380 *dis.* **2**: 381-388.
- 381 17. **Hendriksen R., Mikoleit M., Carlson V.P., Karlsmose S., Vieira A.R., Jense**
382 **A.B, Seyfarth A.M., De Long S.M., Weill F.X., Lo Fo Wong D.M., Angulo**
383 **F.J, Wegener H.C., Aarestrup F.M.** 2009. Who global Salm-surv external
384 quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007.
385 *J Clin Microbiology.* **47**: 2729-2736.
- 386 18. **Murray P, Rosenthal K, Pfaller M.** 2006. Microbiología médica, 5a ed.
387 Elsevier, Rio de Janeiro, p 255.

- 388 19. **Ribeiro, M. G.; Leites, D. S.; Siqueira, A. K.** 2016. *Enfermidades por*
389 *Escherichia coli*. In: **Megid, J.; Garcia-Ribeiro, M.; Paes, A. C.** *Doenças*
390 *infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro, p. 243-276.
- 391 20. **Hart T.** 2010. *Microterrores: o guia completo das infecções bacterianas, virais e*
392 *fúngicas que ameaçam a nossa saúde*. Principis, São Paulo, p 192.
- 393 21. **Hernandez, C. C.; Aguilera, A. M.; Castro, E. G.** 2011. *Situación de las*
394 *enfermedades gastrointestinales en México*. *Enf Inf Microbiol.* **31**:137-151.
- 395 22. **Megid J, Garcia-Ribeiro M, Paes AC.** 2015. *Doenças infecciosas em animais*
396 *de produção e de companhia*. Roca, Rio de Janeiro, p. 1272.
- 397 23. **Cardinale, E; Perrier Gros-Claude, J.D.; Tall, F.; Cissé M.; Guèye E.F.;**
398 **Salvat, G.** 2003. *Prevalence of Salmonella and Campylobacter in Retail Chicken*
399 *Carcasses in Senegal*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* **56**: 13-16.
- 400 24. **Ha, Thi Anh Dao; Pham, Thanh Yen.** 2006. *Study of Salmonella,*
401 *Campylobacter, and Escherichia coli Contamination in Raw Food Available in*
402 *Factories, Schools, and Hospital Canteens in Hanoi, Vietnam*. *Ann. N.Y. Acad.*
403 *Sci.***1081**: 262–265.
- 404 25. **Lopes, G. V.** 2009. *Campylobacter spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças*
405 *de bovino para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovino*. Teses de
406 *Mestrado USP*. São Paulo.
- 407 26. **Carvalho A. F.; Silva D. M.; Azevedo S. S.; Iatti R. M.; Genovez M. E.;**
408 **Scarcelli, E.** 2010. *Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes*
409 *de Campylobacter jejuni isoladas de carcaças de frangos*. *Arq. Bras. Med. Vet.*
410 *Zootec.* **62**: 1054-1061.
- 411 27. **Molero, G. L.** *Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos del*
412 *estado Zulia, Venezuela*. Tesis de Doctorado en Veterinaria. Departamento de
413 *Biología LUZ y Departamento de sanidad Animal UCO, Córdoba, España*, p.88,
414 2012.
- 415 28. **Modolo JR, Augusto Filho O, Pinto JP, Padovoni CR, Simões LB, Carvalho**
416 **JLB.** 2005. *Campylobacter em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do*
417 *fator de risco para saúde pública*. *Hig Aliment* **19**:40-46.
- 418 29. **Rall VLM, Martin JGP, Candeias JMG, Cardoso KFG, Da Silva MG, Rall**
419 **R, Araujo-Junior JP.** 2009. *Pesquisa de Salmonella e das condições sanitárias*
420 *em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu*. *Braz J Vet Res*
421 *Anim Sci* **46**:167-174.
- 422 30. **Iso 6579-2002. International Standard.** *Microbiology of food and animal*
423 *feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* p. 25, 2002.
- 424 31. **Veron M, Chatelain R.** 1973. *Taxonomic study of the genus*
425 *Campylobacter* Sebald and Verón and designation of the neotype strain for the
426 *type species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Véron*. *Int J*
427 *Syst Bacteriol* **23**:122-123.
- 428 32. **Iso 10272-1:2006(E). International Standard.** *Microbiology of food and animal*
429 *feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of*
430 *Campylobacter spp.–Part 1: Detection method*. p.16, 2006.
- 431 33. **Bacteriological Analytical Manual (BAM).** 2014. *Salmonella*. In:
432 [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm07014](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm)
433 [9.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm) 29-05-2016
- 434 34. **Rissato DP, Borgo AP, Moreira JP, Muller-Conti AC, Francielle B, Ribeiro**
435 **AB.** 2012. *Detecção de Escherichia coli em água de lavagem de carcaças de*

- 436 frango pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). SaBios: Rev Saúde
437 Biol 7:1-6.
- 438 **35. Zar, J.H.** Biostatistical analysis. New Jersey. Prentice Hall, 1996. 662p
- 439 **36. Carvalho AC, Costa FN.** 1996. Ocorrência de *Campylobacter* em carcaças e
440 cortes de frango ao nível industrial e comercial. Hig Aliment 10:41-43.
- 441 **37. Olsen JE, Brown DJ, Madsen M, Bisgaard M.** Cross contamination with
442 *Salmonella* on a broiler slaughter house line demonstrated by use of
443 epidemiological markets. J Appl Microbiol 95:826-835.
- 444 **38. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** Regulamento técnico de
445 padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC N° 12, 2001. In:
446 http://www.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/.RDC_12_2001: 10-11-15
- 447 **39. Modolo, J. R.; Gottschalk, A. F.; Moreno, G.; Lopes, C.A.M; Margatho, L.F.;**
448 **Dalfava, C.** *Campylobacter* em cães com o sem diarreia: incidência e
449 susceptibilidade a 21 antimicrobianos. Rev Microbiol 22:288-292.
- 450 **40. Bradybury CB.** 1983. Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains
451 of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Infect Immun 40:460-463.
- 452 **41. Denis M, Refregier-Petton J, Laisney MJ, Ermel G, Salvat G.** 2001.
453 *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to
454 consumers. Use of PCR assay for detection and identification of *Campylobacter*
455 *jejuni* and *C. coli*. J Appl Microbiol 91:255-267.

REVISTA: Applied and Environmental Microbiology

As normativas atualizadas para os autores estão disponíveis em:

<http://aem.asm.org/site/misc/2016AprilAEMITA.pdf>