

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/02/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS E *Clostridium*
spp. E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium*
perfringens, *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. EM
PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE DE FRANGO**

Mariana Froner Casagrande

Zootecnista

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS E *Clostridium*
spp. E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium*
perfringens, *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. EM
PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE DE FRANGO**

Mariana Froner Casagrande

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

Casagrande, Mariana Froner

C334q Quantificação de enterobactérias e *Clostridium* spp. e detecção molecular de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em pontos de cadeia produtiva da carne de frango / Mariana Froner Casagrande. - Jaboticabal, 2016

xiii, 75p. : il. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Banca examinadora: Alessandra Aparecida Medeiros, Caroline Peters Pigatto De Nardi, Luiz Augusto do Amaral, Janete Aparecida Desiderio.

Bibliografia

1. Avicultura. 2. Bactérias Patogênicas. 3. Diversidade Genética. 4. Resistência a Antimicrobianos. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS *Clostridium* spp. E
DETECÇÃO MOLECULAR DE *Clostridium perfringens*, *Escherichia*
coli E *Salmonella* spp. EM PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE
CARNE DE FRANGO

AUTORA: MARIANA FRONER CASAGRANDE

ORIENTADOR: RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

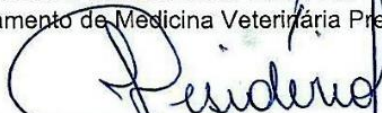
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



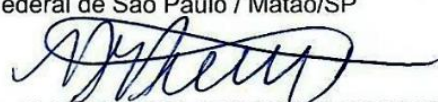
Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. CAROLINE PETERS RIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP



Profa. Dra. ALESSANDRA APARECIDA MEDEIROS
Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG

Jaboticabal, 04 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIANA FRÖNER CASAGRANDE - nascida em Tanabi, SP, em 28 de setembro de 1984, em Tanabi, SP, e filha de Rita de Cássia Fröner Casagrande e Nilton Pedro Casagrande. Graduada em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, em janeiro de 2010. Durante a graduação, estagiou em diversas áreas como Manejo de Animais Silvestres e Nutrição de Ruminantes. Também estagiou no Laboratório de Nutrição de cães e Gatos de 2008 a 2009, onde realizou seu trabalho de conclusão de curso sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi e co-orientação do Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcelos, que foi intitulado “Influência do consumo de bebida industrializada sobre a ingestão hídrica e parâmetros urinários de gatos”. O Estágio de Conclusão de Curso foi realizado no período de agosto a novembro de 2009 no Polo Regional Centro Norte – UPD de Mirassol, na área de Manejo de Bovino de Corte. Em março 2010, ingresso no curso de Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A dissertação de mestrado intitulada “*Clostridium perfringens* em ingredientes para ração de aves e controle da presença do agente utilizando tratamento químico”, foi defendida em 29 de fevereiro de 2012. Em março de 2012, começou o curso de Doutorado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, como bolsista CAPES e, posteriormente, como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar...
Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado.
Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”*

Bob Marley

“O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer.”

Albert Einstein

*“Aprenda a viver dentro de suas possibilidades. Buscar uma vida de aparências fora da sua realidade, só leva para um abismo sem volta.
Construa a sua vida aos poucos, lutando a cada dia e extraíndo da vida o que ela tem de melhor: a SIMPLICIDADE”*

Chico Xavier

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury

Ofereço

Aos meus pais, Rita e Nilton, pela educação, amor, compreensão e por me incentivarem e apoiarem em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão, João Vitor, pela ajuda, amizade, companheirismos e paciência.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico

Aos meus avós maternos, Godofredo e Meire, e aos paternos, Modesto e Lídia (in memoriam), pelo exemplo de vida e pela confiança que dispensam a mim sempre.

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, por estar sempre junto a mim, me dando forças e discernimento para enfrentar os obstáculos que aparecem em meu caminho.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal por oferecer os melhores professores e funcionários, que deram suporte para que fosse possível adquirir os conhecimentos necessários para meu crescimento profissional desde a graduação, em Zootecnia, até os dias atuais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro nos primeiros meses do curso de Doutorado.

À Coordenação de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro durante o curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, por todo aprendizado profissional e pelas oportunidades oferecidas.

À técnica do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Andressa de Souza Pollo, pelo ensino, paciência, amizade e, principalmente, pela sinceridade que ajudou muito em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros banca examinadora, Dra. Alessandra Aparecida Medeiros, Dra. Caroline Peters Pigatto De Nardi, Dr. Luiz Augusto do Amaral, Dra. Janete Aparecida Desiderio, pela atenção dispensada e sugestões valiosas para a tornar minha tese mais rica.

Às pessoas do Laboratório de Microbiologia, Livia Boarini, Marita Vedovelli, Mariana Beraldo-Massoli e a Silvina Berchielli, pela amizade conquistada e pela ajuda dispensada na realização deste trabalho.

Aos amigos de Faculdade, Daniela (Jatinha), Panki, Lary, Roberta, Anne Caroline, Ingrid, Carol (Vem-ki-tem), pela amizade conquistada nesses anos me ajudando a enfrentar os problemas e compartilhar os momentos inesquecíveis de minha vida e pelo ensinamento que cada uma me proporcionou com formas diferentes e que me ajudou a amadurecer. Vocês estão guardadas no meu coração e espero estar sempre com vocês.

Às minhas amigas, Tatiane Leva, Michela, Inni, Tatiane Bula, Jonas, Patrícia, Enéias e Fabiane, que perto ou longe, estão sempre presentes nos bons e maus momentos de minha vida.

Aos estagiários, Renan e Mariana (Boo), pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e pelo reconhecimento de minhas conquistas.

Aos meus “filhos peludos”, Nicolau, Fredie, Ponto, Kate, Yuri, Cherrie, Sadam, Hitler, pela companhia, amor e carinho.

Obrigada aos professores e funcionários do Laboratório de Microbiologia, que auxiliaram de alguma maneira na obtenção do meu título de Doutorado e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva que permitiram que eu utilizasse a estrutura para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida, pois, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a crescer e a me tornar a pessoa que sou hoje.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Avicultura.....	3
2.2.	Cadeia produtiva de aves de corte.....	4
2.3.	Processamento da carne de frango.....	5
2.4.	Padrões microbiológicos exigidos para comercialização de carne de frango e derivados.....	8
2.5.	Principais bactérias patogênicas encontradas na carne de frango.....	9
2.5.1.	<i>Clostridium</i> spp.	9
2.5.1.1.	<i>Clostridium perfringens</i>	10
2.5.2.	Enterobactérias.....	10
2.5.2.1.	<i>Salmonella</i> spp.	11
2.5.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	12
2.5.2.2.1.	Classificação em patótipos de <i>E. coli</i>	12
2.5.2.2.1.1.	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	13
2.5.2.2.1.2.	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica e enterohemorrágica.....	13
2.5.2.2.1.3.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....	14
2.5.2.2.1.4.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	15
2.5.3.	Resistência das bactérias aos antimicrobianos.....	15
2.5.4.	Enfermidades causadas pelos microrganismos pesquisados veiculados na carne de frango.....	18
2.6.	Análises moleculares de bactérias.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Amostragens realizadas na cadeia produtiva de frango de corte.....	22
3.1.1.	Amostragens em frigoríficos.....	22
3.1.2.	Amostragens em granjas comerciais.....	23
3.1.3.	Amostragens de cortes de frangos congelados.....	24
3.2.	Análises microbiológicas.....	25
3.2.1.	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp. de amostras de frigoríficos.....	25
3.2.2.	Contagem de colônias de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	26
3.2.3.	Análises estatísticas das contagens de colônias de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	26
3.2.4.	Cultivo bacteriano para extração de DNA de amostras de frigoríficos.....	27
3.2.5.	Cultivo bacteriano a partir de amostras colhidas em granjas comerciais.....	27

3.2.6.	Cultivo bacteriano a partir de amostras de cortes de frangos congelados.....	28
3.3.	Análises moleculares.....	29
3.3.1.	Extração de DNA.....	29
3.3.2.	Detecção de <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp. e subgrupos diarreio gênicos de <i>Escherichia coli</i> por PCR.....	30
3.3.3.	Detecção de genes codificadores de toxinas de <i>Clostridium perfringens</i> por meio da PCR multiplex.....	32
3.3.4.	Isolamento de Bacteriano.....	33
3.3.4.1.	Isolamento de <i>C. perfringens</i>	33
3.3.4.2.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	34
3.3.5.	Extração de DNA dos isolados para análise de perfil genético.....	35
3.3.6.	Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR.....	36
3.3.7.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1.	Análises microbiológicas.....	39
4.1.1.	Contagem de colônias de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias de amostras de frigoríficos.....	39
4.2.	Análises moleculares.....	46
4.2.1.	Detecção de <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp. e subgrupos diarreio gênicos de <i>Escherichia coli</i> por PCR.....	46
4.2.1.1.	Amostragens realizadas em frigoríficos.....	46
4.2.1.2.	Amostragens realizadas em granjas de frangos de corte.....	48
4.2.1.3.	Amostragens de cortes de frangos congelados.....	49
4.2.2.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	51
4.2.3.	Análise do perfil genético bacteriano por Rep-PCR.....	52
4.2.4.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	58
5.	CONCLUSÃO	61
6.	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de amostras colhidas por período e o tipo de limpeza em frigoríficos.....	22
Tabela 2.	Amostragens de cortes de frangos congelados realizados em supermercados.....	25
Tabela 3.	Sequência de <i>primers</i> específicos utilizados na diferenciação dos subgrupos de <i>E. coli</i>	31
Tabela 4.	Sequência de <i>primers</i> utilizados na tipagem do <i>C. perfringens</i> , segundo Baums et al. (2004).....	32
Tabela 5.	Comparações das médias estatísticas de contagem de bactérias entre os frigoríficos e comparação entre os tipos de limpeza das esteiras em relação a todas amostragens realizadas.....	42
Tabela 6.	Comparações de médias dos desdobramentos estatísticos da contagem de <i>Clostridium</i> spp. e de Enterobactérias da interação significativa frigorífico <i>versus</i> limpeza das esteiras.....	43
Tabela 7.	Identificação das amostras positivas de cortes congelados de frangos quanto à espécie bacteriana, estabelecimento, localidade e marca.....	50
Tabela 8.	Descrição da nomenclatura dos isolados bacterianos positivos para o gene <i>eae</i> de <i>E. coli</i> , quanto a localidade e o estabelecimento amostrado.....	52
Tabela 9.	Resistência antimicrobiana dos isolados de <i>E. coli</i> enteropatogênica.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da cadeia produtiva de aves de corte.....	5
Figura 2.	Fluxograma de abate de frangos de corte.....	6
Figura 3.	Esquema de obtenção das amostragens realizadas neste estudo.....	21
Figura 4.	Isolamento de <i>Clostridium perfringens</i> a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo preconizado para <i>E. coli</i> pelo Reference Laboratory for Escherichia coli, (EcL), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, com modificações.....	33
Figura 5.	Isolamento de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas a partir de amostras colhidas em granjas, frigoríficos e supermercados, segundo o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV/UNESP Jaboticabal.....	34
Figura 6.	(A) PCR de amplificação para o gene <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp. de 796 pb. Não houve amostras positivas. CPS: cepa padrão de <i>Salmonella</i> Typhimurium; (B) Produtos de PCR da amplificação dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> (STEC) e <i>eae</i> (EPEC) de <i>Escherichia coli</i> , de 388pb, 807pb e 570pb, respectivamente. Foram identificadas amostras positivas apenas para o gene <i>eae</i> . CPE: cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> . PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).....	47
Figura 7.	Produtos da PCR multiplex para identificação dos tipos de <i>Clostridium perfringens</i> , A, B, C, D e E, apresentando amplificação para os genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> , <i>cpe</i> , <i>etx</i> e <i>iap</i> , de 900 pb, 611pb, 506 pb, 396 pb e 293 pb, respectivamente. Linha 6: amostra positiva de frigorífico. Linhas 7-10: amostras positivas de cortes de frangos. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA).....	47
Figura 8.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> REP1R/REP2 de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	53
Figura 9.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> ERIC1R/ERIC2 de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	53
Figura 10.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> BOXA1R de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	54

Figura 11.	Produto de amplificação utilizando-se os <i>primers</i> GTG ₅ de isolados de <i>E. coli</i> obtidos de amostras colhidas em granjas (1 a 21), frigoríficos (22 a 25) e supermercados (26 e 27). CN: controle negativo. PM: 100pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	54
Figura 12.	Agrupamento Neighbor-Joining resultante da análise dos marcadores moleculares REP, ERIC, BOX e GTG ₅ de isolados de <i>E. coli</i> do subgrupo EPEC, oriundos de frigoríficos, granjas e supermercados.....	55

RESUMO

A produção de aves no Brasil tem aumentado consideravelmente, impulsionada principalmente pelo consumo da carne de frango, o que gera uma preocupação com a transmissão de patógenos ao ser humano. Porém, a higienização e cuidados adequados durante toda cadeia produtiva pode-se evitar contaminações dos alimentos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de bactérias patogênicas em granjas, esteiras condutoras de cortes de frango em frigoríficos antes e após a higiene pré-operacional e operacional, e em cortes de frangos congelados adquiridos em supermercados, além de comparar geneticamente os isolados obtidos nos diferentes pontos da cadeia produtiva por sequências repetitivas utilizando a técnica Rep-PCR. Os mesmos isolados também foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos. Para tanto, foram realizadas contagem de Enterobactérias e de *Clostridium* spp., identificação por PCR de *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* diarreiogênicas (*E. coli* enteropatogênica - EPEC, *E. coli* shigatoxigênica - STEC, *E. coli* enteroagregativa - EAEC, *E. coli* enterotoxigênica - ETEC), e isolamento bacteriano. Para quantificação de Enterobactérias e de *Clostridium* spp., foram colhidos 311 suabes de esteiras de frigoríficos, dos quais procedeu-se, também, o cultivo bacteriano para posterior identificação das amostras por PCR espécie-específico. Em granjas comerciais, foram colhidas 164 amostras de suabes com conteúdo cloacal de frangos saudáveis e 20 amostras de cortes de frangos congelados em supermercados. Nas granjas, foram identificadas 107 amostras contendo EPEC, já nas esteiras condutoras de cortes nos frigoríficos, foram verificadas 23 amostras positivas para *E. coli* EPEC e uma para *C. perfringens*. Em cortes de frangos congelados de supermercados, foram encontradas quatro amostras contendo EPEC, duas contendo STEC e quatro positivas para *C. perfringens*. Em nenhuma amostra foi verificada a presença de *Salmonella* spp. A análise do perfil genético de 27 isolados de EPEC por Rep-PCR mostrou que houve relação genética entre isolados obtidos da mesma procedência e entre aqueles obtidos nos diferentes pontos da cadeia produtiva, indicando a ocorrência de contaminação cruzada. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Assim, de acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que a contaminação bacteriana está presente em diversos pontos da cadeia produtiva de frango de corte, desde a granja até o produto final. Certamente, isto mostra a importância de maiores cuidados com a higienização em todas as etapas da produção, o que possivelmente diminuirá a chance de transmissão desses patógenos para o ser humano.

Palavras Chaves: avicultura, bactérias patogênicas, diversidade genética, resistência a antimicrobianos.

Title: Quantification of Enterobacteria and *Clostridium* spp. and molecular detection of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. at points in the chicken meat production chain.

ABSTRACT – Brazilian poultry production has been increasing significantly, mainly by the consumption of chicken meat, which leads to concern about the transmission of pathogens to human. However, proper hygiene and management in the production chain of poultry meat may avoid food bacteria contamination. Thus, this study aimed to evaluate the presence of pathogenic bacteria in poultry farms, sanitary conveyors of Brazilian slaughterhouses, before and after the pre-operational and operational hygiene, and in frozen cuts of chicken commercialized in supermarkets, beyond of comparing isolates obtained in different points of the production chain by repetitive sequences using Rep-PCR. The same isolates were also submitted to antimicrobial sensitivity test. For this, it was performed Enterobacteriaceae and *Clostridium* spp. counts, identification of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* and diarrheagenic *Escherichia coli* (Enteropathogenic *E. coli* - EPEC, Shigatoxigenic *E. coli* - STEC, Enteroaggregative *E. coli* - EAEC, Enterotoxigenic *E. coli* - ETEC) through PCR and bacterial isolation. For quantification of Enterobacteriaceae and *Clostridium* spp. and PCR identification of pathogens, 311 samples were collected from sanitary conveyors using sterile swabs. From poultry farms, 164 samples of cloacal content swabs were collected from healthy chickens, and 20 samples of frozen chicken cuts were taken from supermarkets. In commercial poultry farms, 107 positives samples for EPEC were identified. Similarly, it was found 23 positive samples for EPEC and one for *C. perfringens* in sanitary conveyor at chicken slaughterhouses. In cuts of chicken from supermarkets, it was found four positive samples for EPEC, two for STEC and four for *C. perfringens*. No samples were diagnosed with the presence of *Salmonella* spp.. The genetic profile analysis of 27 EPEC strains showed that there was a genetic relationship among isolates from the same origin and among those obtained from different points of the production chain, which is an indicative of cross contamination. All isolates are resistant to at least one antimicrobial. Thus, according to the results obtained, it was attested that bacterial contamination might be present in various points of the poultry meat production chain, from the poultry farms to the final product. Certainly, it denotes the importance of enhanced care with the hygiene and management in all stages of the meat production, which possible will reduce the chance of these harmful pathogens transmission to human.

Keywords: poultry production, pathogenic bacteria, genetic diversity, antimicrobial resistance.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da avicultura brasileira teve início a partir da década de 1950, período no qual houve uma modificação no sistema de produção de carne de frango, que anteriormente era realizado artesanalmente com a produção do frango caipira (BELUSSO; HESPANHOL, 2010; VASCONCELOS et al., 2015). A produção em larga escala de frango começou a partir da importação de novas linhagens, com modernizações nos setores da genética, sanidade e nutrição, e com a introdução de instalações tecnificadas (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

Segundo dados do Relatório Anual da Associação Brasileira da Proteína Animal – ABPA (2015), em 2014, a avicultura industrial brasileira ocupou o primeiro lugar no *ranking* mundial como exportador de carne de frango, comercializando 4,09 milhões de toneladas. Em 2015, a estimativa é que houve um crescimento da produção da carne de frango de 3,58% em relação ao ano anterior, com o equivalente a 13,146 milhões de toneladas, fazendo com que o Brasil ultrapasse a produção da China (ABPA, 2016).

Com o aumento na produção da carne de frango, intensificou-se a preocupação com a veiculação de microrganismos prejudiciais à saúde humana em alimentos. Uma das maneiras de se evitar a contaminação por microrganismos patogênicos, é a higienização adequada durante toda a cadeia produtiva de carne de frango (PINTO, 1996; SOUZA, 2014).

As principais toxinfecções alimentares são causadas por bactérias, como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, entre outros. Os

alimentos de origem animal, possuem nutrientes suficientes para a multiplicação de tais patógenos, sendo que as contaminações podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, chegando ao produto final, o que pode ocasionar prejuízos econômicos e danos à saúde humana (FLORES; MELO, 2015).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, a detecção e identificação de microrganismos e de genes específicos, seja por meio de *primers* específicos ou por sequenciamento de fragmentos de DNA, tem sido largamente aplicada na microbiologia, devido a obtenção de resultados em menor tempo e com maior eficácia (BARGHOUTH, 2011). A técnica de marcadores moleculares por Rep-PCR, por exemplo, tem ajudado no estudo da diversidade genética bacteriana, demonstrando que é possível encontrar variabilidade genética em isolados da mesma espécie bacteriana (ALBUFERA et al., 2007; CHAPAVAL et al., 2010).

Diante o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a higiene pré-operacional e operacional de esteiras condutoras de cortes de frango em frigoríficos localizados na região Sudeste do Brasil, por meio da quantificação de colônias bacterianas de Enterobactérias e *Clostridium* spp., e identificação de *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreioogênicas, sendo a shigatoxigênica (STEC), enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteroagregativa (EAEC) por PCR. Adicionalmente, tal pesquisa de patógenos foi realizada em granjas comerciais de frangos de corte e em cortes de frangos congelados comercializados em supermercados. A fim de verificar a presença de diversidade genética em diversos pontos a cadeia produtiva da carne de frango, o perfil genético dos isolados bacterianos obtidos foram analisados por Rep-PCR. Além disso, todos os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

Os mecanismos de higienização foram insuficientes nas esteiras da maioria dos frigoríficos amostrados, já que as contagens de colônias de *Clostridium* spp. e de Enterobactérias foram superiores aos valores recomendado pelos órgãos internacionais.

Os patógenos estão disseminados nos três pontos analisados da cadeia produtiva de carne de frango, pois foi possível encontrar *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* shigatoxigênica e *Clostridium perfringens* em granjas, esteiras condutoras de cortes em frigoríficos e em cortes de frangos congelados comercializados em supermercados.

A análise molecular por Rep-PCR mostrou maior relação genética entre isolados obtidos de uma mesma procedência. No entanto, também mostrou estreita relação genética entre isolados obtidos dos diferentes pontos da cadeia produtiva amostrados, o que é indicativo de que a contaminação cruzada pode ocorrer, desde a granja até o produto final nos supermercados.

Não houve relação entre a análise de diversidade genética e a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos. A resistência antimicrobiana está presente entre as cepas de *E. coli* enteropatogênica isoladas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2015>> Acessado em 02 novembro. 2015.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção sustentável garante ao Brasil liderança nas exportações**. Revista Avicultura Brasil, n.1, p.4-7, 2012. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/938d713b69d9f25901b1d810f038272b.pdf>> Acessado em 08 fevereiro. 2016.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>> Acessado em 08 fevereiro. 2016.

ALBUFERA, U.; BHUGALOO-VIAL, P.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY-FAKIM Y. Molecular characterization of *Salmonella* isolates by Rep-PCR and RAPD analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.322–327, 2009.

ANDERSON, D.B.; MCCRACKEN, V. J.; AMINOV, R. I.; SIMPSON, J. M.; MACKIE, R. I.; VERSTEGEN, M. W. A.; GASKINS, H. R. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. **Pig News and Information**, v.20, p. 115N-122N, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E. T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.190-194, 2009.

APHA, **American Public Health Association**. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4th ed. Washington, 2001.

ARAS, Z.; HADIMLI, H. H. Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. **Anaerobe**, v.32, p.15-17, 2015.

ARAÚJO, G. C. de; BUENO, M. P.; BUENO, V. P.; SPROESSER, R. L.; SOUZA, I. F. Cadeia produtiva da avicultura de corte: Avaliação da apropriação de valor bruto nas transações econômicas dos agentes envolvidos. **Gestão & Regionalidade**, v. 24, n. 72, p.6-16, 2008.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Current Gastroenterology Reports**, v. 14, p. 386-394, 2012.

ATEBA, C. N.; MBEWE M. Genotypic characterization of *Escherichia coli* o157:h7 isolates from different sources in the north-west province, South Africa, using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR analysis. **International Journal of Molecular Science**, v.15, p.9735-9747, 2014

AVISITE. **O Portal da Avicultura na Internet**. Estatísticas e preço: Alojamento Regional de pintinhos de corte. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia/index.php?acao=alojamentoregional>> Acessado em: 10 novembro. 2015.

BARGHOUTH, S. A. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p.430–444, 2011.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, v. 45, p 493- 496, 1966.

BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.11-16, 2004.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso – NEMO**, v.2, n.1, p.25-51, 2010.

BLAAK, H; VAN HOEK, A.H.; HAMIDJAJA, R. A.; VAN DER PLAATS, R. Q.; KERKHOF-DE HEER, L.; DE RODA HUSMAN, A. M.; SCHETS, F. M. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PLoS One**, v.10, n.8, p.1-23, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 226-258, 26 nov. 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução: RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova: o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais – CGPE. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontroles. Circular 175/2005/CGPE/DIPOA. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de Maio. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Aprovado pelo decreto n.30.691, 29/03/52, alterados pelos decretos n.1255 de 25/06/62, 1236 de 01/09/94, 1812 de 08/02/96, 2244 de 04/06/97. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2015. **Serviço de Inspeção Federal - SIF**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sif>>. Acessado em: 17 novembro. 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm> Acesso em 12 novembro. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo VI. 95p. 2013. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia.asp>>. Acessado em: 05 novembro. 2015.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação técnica - Salmonela na segurança dos alimentos. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 11-13, 2008.

CASAGRANDE, M. F.; CARDOZO, M. V.; BERALDO-MASSOLI, M. C.; BOARINI, L.; LONGO, F. A.; PAULILO, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. *Clostridium perfringens* in ingredients of poultry feed and control of contamination by chemical treatments. **Journal Applied Poultry Research**, v.22, p.771–777, 2013.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: **Annual Report**. 20p. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>>. Acessado em: 17 novembro. 2015.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Escherichia coli: General Information**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acessado em 05 novembro. 2015.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/index.html#c>>. Acessado em 19 fevereiro. 2016.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 2138-2140, 2003.

CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C.S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F.S.F.; FROTA, I.M.A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de Rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite da cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 1, p. 49-56, 2010.

CHERIF, A.; BRUSETTI L, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; KHYAMI-HORANI, H.; DAFFONCHIO, D. Genetic Relationship in the *Bacillus cereus* group by

REP-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific Rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.6, p.1108-1119, 2003.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.9, p.811-818, 2014.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.26-38, 2010.

Departamento de Agricultura dos EUA, Julho de 2015. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acessado em: 06 novembro. 2015.

DÜRRE, P. **Handbook on Clostridia**. Taylor & Francis, 2005, 903p.

FARRELL, D. Poultry development review. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, p.1-8, 2013.

European Commission (EC). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organism resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003. **Official Journal of the European Union**. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf>. Acessado em: 10 novembro. 2015.

European Commission (EC). Commission Decision 2001/471/EC of 8 June 2001 laying down rules for the regular checks in the general hygiene carried out by the operators in establishments according to Directive 64/433/EEC on health conditions for the production and marketing of fresh meat and Directive 71/118/ECC on health problems affecting the production and placing on the market of fresh poultry meat. **Official Journal of the European Union**, v.165, p.48–53, 2010. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001D0471&from=EN>>. Acessado em: 21 novembro. 2015.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Applied Microbiology**, v.97, p.362–370, 2004.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, n.1, p.65-72, 2015.

FOLEY, S. L.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; RHODES, B.; FEDORKA-CRAY, P. J.; SIMJEE, S.; ZHAO, S. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.10, p.3569–3577, 2006.

FRATAMICO, P. M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and Cellular Probes**, v.17, p.215–221, 2003.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LUTHY, J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 10, n.1, p. 31-34, 1990.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, 2005.

GOMES, M. J. P.; Gênero *Clostridium* spp. Disponível em: <www6.ufrgs.br/labacvet/files/Clostridium201102.pdf>. Acesso em 30, outubro. 2015. In: **Microbiologia Clínica LABACVET**, II, 2007.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, p.45-62, 2007.

HEIKINHEIMO, A.; LINDSTRÖM, M.; LIU, D.; KORKEALA, H. *Clostridium*. In: LIU, D. **Molecular Detection of Foodborne Pathogens**. Florida, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, 1ª ed., p.145-155, 2009.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the Rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution **Environmental Microbiology**, v.11, n.4, p.733–740, 2009.

JOHN, F.; SANFORD, W. An {R} Companion to Applied Regression, 2ª ed. Thousand Oaks CA: Sage. URL <<http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>>, 2011.

JUNIOR, C. J.; PAULA, S. R. L.; ORMOND, J. G. P.; BRAGA, N. M. A cadeia da carne de frango: tensões, desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, n.26, p.191-232, 2007.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.5, p.408-418, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JÚNIOR, W.C. As *Enterobacteriaceae*. In: **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan. 6ªed. Medsi, p. 208-299, 2012.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v. 54, n. 2, p.311-320, 2004.

KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.

LINDSTRÖM, M.; HEIKINHEIMO, A.; LAHTI, P.; KORKEALA, H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. **Food Microbiology**, v.28, p.192-198, 2011.

LENTH, R.V. Using the Ismeans Package. The University of Iowa. Updated with Ismeans Version 1.10. July 4, 2013.

LORTIE, L.A.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.3, p.656–659, 1991.

MAGWEDERE, K; DANG, H. A.; MILLS, E. W.; CUTTER, C.N.; ROBERTS, E. L.; DEBROY, C. Incidence of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.2, p.254–258, 2013.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.152, p.2-12, 2013.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela. 1 ed. 258p., 2006.

MEAD, G. C. Hygiene problems and control of process contamination, In: Mead, G. C. (Ed.) **Processing of poultry meat**. Elsevier Science, Amsterdam, 183-220, 1989.

MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five Rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 277, p. 98–106, 2007.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.443-454, 2005.

NGAMWONGSATIT, B.; TANOMSRIDACHCHAI, W.; SUTHIENKUL, O.; URAIRONG, S.; NAVASAKULJINDA, W.; JANVILISRI, T. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. **Anaerobe**, v.38, p.88-93, 2016.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPLEYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 15, p. 242–252, 2003.

OBENG, A. S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M.; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.305–315, 2012.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; BAPTISTA, A. A. S.; ROCHA, T. S. Evaluation of the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated of healthy hens (*Gallus gallus*). **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.218-221, 2012.

OLATOYE, I. O.; AMOSUN, E. A.; OGUNDIPE, G. A. Multidrug resistant *Escherichia coli* O157 contamination of beef and chicken in municipal abattoirs of Southwest Nigeria. **Nature and Science**, v.10, n.8, p.125-132, 2012.

OLSVIK, Ø.; STROCKBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washington: ASM, p.271-276, 1993.

PAIVA, J. C; BUENO, M.P.; SAUER, L.; SPROESSER, R. L. Evolução da gestão da qualidade segundo o programa nacional de sanidade avícola. **Revista Avicultura Industrial**, n.10, 2005.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p. 1-6, 2014.

PINTO, A. D. M. **Doenças de Origem Microbiana Transmitidas pelos Alimentos**. 1996. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm> Acessado em: 08 julho. 2015.

PRIÓ P.; GASOL R.; SORIANO R. C.; PEREZ-RIGAU A. Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feeds. In: **Brufan J. (Ed.): From Feed to Food**, p.197-199, 2006.

PUERTA-GARCÍA, A.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. **Medicine**. v.10, n.51, p.3426-3431, 2010.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

RAJESHWARI, K.; UPPAL, B.; SINGH, R.; TIWARI, G.; MAHATO, A. K. Multidrug resistant enteropathogenic *E. Coli* diarrhea in children. **American Journal of Research Communication**, v.3, n.9, p.27-48, 2015.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; GODARD, C.; WILDEMAUWE, C.; PASTUSZCZAK-FRAK, M.; DE ZUTTER L. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p.146–152, 2008.

RAVAGNANI, L. K.; AGOSTINIS, R. O.; OTUTUMI, L. K.; LIMA, E. T.; FERNANDES, J. I. M.; MARTINS, L. A. Pesquisa de *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões climatizados de uma integração na região Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2327-2336, 2012.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTÉ, A.P.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. Enterica sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.357-360, 2006.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P.; FERREIRA, D.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* and *Listeria* from stainless steel, polyurethane and polyethylene surfaces in the cutting room of a poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, n.1164, p.1-7, 2013.

ROSA, C. O.; GARCIA, R. G.; BINOTTO, E.; RUVIARO, C. F.; NÄÄS, I. A. Características do mercado consumidor de carne de frango em um município de médio porte. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.9, n.17, p.518-532, 2013.

SABAT, A.J., BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v.18, n.4, p.1-14, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Londres: CSHL Press, p.1448, 2001.

SANDERSON, K. E.; NAIR, S. Taxonomy and species concepts in genus *Salmonella*. In: BARROW, P. A.; METHNER, U. **Salmonella in Domestic Animals**. Boston: CAB International. 2^a ed., p. 1-19, 2013.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ISHI, M.; VITTORI, J. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI, A. JR.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2 ed., p.533-550, 2009.

SINGH, R. V.; BHILEGAONKAR, K. N.; AGARWAL, R. K. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. **Journal of Food Safety**, v.25, p.146–156, 2005.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; ZANETTE, C. M.; NERO, L. A.; PINTO, J. P. A. N.; BARCELLOS, V. C.; BERSOT, L. S. Cleaning conveyor belts in the chicken-cutting area of a poultry processing plant with 45°C water. **Journal of Food Protection**, v.77, n.3, p.496–498, 2014.

SOARES, V. M. **Efeito da aspersão de água sobre a contaminação microbiológica em esteiras transportadoras de cortes de frango**. 2014. 83 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

SOLTANI, M.; PEIGHAMBARI, S.M.; ASKARI BADOUEI, M.; SADRZADEH, A. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences polymerase chain reaction (ERIC-PCR). **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v.6, n.3, p.143-148, 2012.

SOUZA, G.C. DE; GONSALVES, H.R.O.; GONSALVES, H. E. O.; COELHO, J.L.S. Característica microbiológica da carne de frango. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.10, n.1, p.12-17, 2014.

SVOBODOVÁ, I.; STEINHAUSEROVÁ, I.; NEBOLA M. Incidence of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens in the Czech Republic. **ACTA Veterinaria Brno**, v.76, p.S25–S30, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony, version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TADESSE, D. A.; ZHAO, S.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M. J.; MCDERMOTT, P. F. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.5, p.741-749, 2012. Disponível em: <www.cdc.gov/eid> Acessado em: 10 novembro. 2015.

TAVARES, L. D. P.; RIBEIRO, K. C. D. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à influenza aviária. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v.9, n.1, p.79-88, 2007.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**; v.17, n.107, p.52-55, 2003.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S.; VERNOSY-ROZAND, C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage-processing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.85–94, 2005.

VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. L.; MEZA, M. L. F. G.; BASSI, N. S. S. Trajetória tecnológica da cadeia produtiva do frango de corte no Brasil. **Iniciação Científica CESUMAR**, v.17, n.1, p.15-27, 2015.

VELUZ, G.A.; PITCHIAH, S.; ALVARADO, C.Z. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. **Poultry Science**, v.91, p.2004-2010, 2012.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VOILÀ, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010. **Publicação do Instituto de Pesquisas Econômicas e Sociais – Texto para Discussão**, n.044, p.1-26, 2013.

VON RÜCKERT, D.A.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.S.; RODRIGUES, A.C.A. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p.326-330, 2009.

WAN, L.; WANG, Z.B.; YAN, Q.G.; WANG, X.; LEI, Y.; ZUO, L.; CHENG, Y.; REN, Y.P.; GUO, W.Z. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms revealed by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and repetitive extragenic palindrome PCR (Rep-PCR). **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.51, 2011.

XU, X.; CUI, S.; ZHANG, F.; LUO, Y.; GU, Y.; YANG, B.; LI, F.; CHEN, Q.; ZHOU, G.; WANG, Y.; PANG, L.; LIN, L. Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and ground pork, China. **Microbial Drug Resistance**, v.20, n.1, p.73-81, 2014.

ZHAO, C.; GE, B.; 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. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p. 5431–5436, 2001.