

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
SARAH INÊS RODRIGUES ROSA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de *Campylobacter* spp. EM
LINGUIÇAS DE FRANGO FRESCAL**

Goiânia
2015



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações - BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	SARAH INÊS RODRIGUES ROSA		
CPF:	03110237113	E-mail:	sarahines.vet@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo Empregatício do autor	-		
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO
CNPJ:	00.889.834/0001-08		
Título:	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de <i>Campylobacter</i> spp. EM LINGUIÇAS DE FRANGO FRESCAL		
Palavras-chave:	<i>Campylobacter</i> spp. Produto avícola. Resistência bacteriana. Microbiologia de alimentos.		
Título em outra língua:	ISOLATION AND IDENTIFICATION OF <i>Campylobacter</i> spp. IN CHICKEN SAUSAGE		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Campylobacter</i> spp. Poultry product. Bacterial resistance. Food microbiology		
Área de concentração:	Ciência e tecnologia de alimentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência e Tecnologia de Alimentos		
Orientador(a):	Prof. ^a Dr. ^a Maria Raquel Hidalgo Campos		
CPF:	300.419.701-44	E-mail:	raquelhidalgocampos@gmail.com
Co-orientador(a):	Prof. ^a Dr. ^a Cíntia Silva Minafra e Rezende		
CPF:	003.289.076-18	E-mail:	cintiaminafra@gmail.com

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ **total** ☐ **parcial**

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Sarah Inês Rodrigues Rosa
Assinatura do(a) autor(a)

Data: 27 / 04 / 2015

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

SARAH INÊS RODRIGUES ROSA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de *Campylobacter* spp. EM
LINGUIÇAS DE FRANGO FRESCAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Hidalgo Campos

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cíntia Silva Minafra e Rezende

Goiânia
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rosa, Sarah Inês Rodrigues
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de *Campylobacter* spp. EM
LINGUIÇAS DE FRANGO FRESCAL [manuscrito] / Sarah Inês
Rodrigues Rosa. - 2015.
73 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos; co
orientadora Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia (EA) , Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, mapas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras,
lista de tabelas.

1. *Campylobacter*. 2. Produtos avícolas. 3. Resistência bacteriana a
antibióticos. 4. Microbiologia de alimentos. I. Campos, Maria Raquel
Hidalgo , orient. II. Rezende, Cíntia Silva Minafra e, co-orient. III. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

SARAH INÊS RODRIGUES ROSA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO de *CAMPYLOBACTER* SPP. EM LINGUIÇAS DE
FRANGO FRESCAL.**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 27 de março de 2015, pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:

A handwritten signature in blue ink, reading 'Liana Jayme Borges', is written over a horizontal line.

Profa.Dra. Liana Jayme Borges
Membro – FANUT/UFG

A handwritten signature in blue ink, reading 'Maria Claudia Dantas Porfírio Borges André', is written over a horizontal line.

Profa. Dra Maria Claudia Dantas Porfírio Borges André
Membro – IPTSP /UFG

A handwritten signature in blue ink, reading 'Maria Raquel Hidalgo Campos', is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos
Presidente – EA/UFG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida orientadora, Prof.^a Dr^a Maria Raquel Hidalgo Campos, que em muito me ajudou na realização deste trabalho, que me inspirou confiança e liberdade durante sua realização, além da amizade e compreensão em momentos de dificuldade. Muito obrigada pelo conhecimento compartilhado nas áreas acadêmica e pessoal. Trilhamos um caminho desconhecido em se tratando de *Campylobacter*, mas conseguimos chegar ao final dessa pesquisa com grande aprendizado em relação a esse micro-organismo.

Obrigada à minha família. Meu esposo, que me apoiou integralmente e me ajudou em vários momentos durante a realização da pesquisa. Aos meus pais e irmãos que entenderam minha ausência em momentos em que não pude acompanhá-los. Em especial a minha mãe, meu pai e minha irmã que acompanharam a realização do trabalho e me auxiliaram em alguns momentos de turbulência.

Agradeço a minha coorientadora, Prof.^a Dr^a Cíntia Silva Minafra e Rezende pela paciência que demonstrou e pelo acompanhamento durante as análises de um micro-organismo tão minucioso, além do suporte de material oferecido.

Obrigada as professoras Dr^a Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André e Dr^a Liana Jayme Borges, que em momentos de dúvidas contribuíram para um melhor método de trabalho.

Agradeço as minhas colegas da pós-graduação que me ajudaram em temas que eu desconhecia e, em especial, um muito obrigada as amigas Letícia Freire, Kassia Kiss e Manuela Barbosa que me auxiliaram diretamente no laboratório.

Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFG e à CAPES, que me deram oportunidade e apoio financeiro para a realização dessa pesquisa. Agradeço também aos fiscais da Vigilância Sanitária de Aparecida de Goiânia pela parceria.

RESUMO

Campilobacteriose tem sido frequentemente relatada como principal causadora de doenças gastroentéricas na Europa e América do Norte. No Brasil, a escassez de dados em relação à notificação dessa enfermidade dificulta uma comparação com outros países e a tomada de decisões quanto a políticas de combate à bactéria causadora. Devido a relatos de alta incidência de *Campylobacter* spp. em carnes, principalmente em carcaças de frango e derivados, este estudo teve como objetivo o isolamento e identificação dessa bactéria em linguças de frango do tipo frescal obtidas no município de Aparecida de Goiânia, no estado de Goiás. Foram coletadas 34 amostras do produto no período de julho a outubro de 2014, cada uma delas foi dividida em duas partes totalizando 68 subamostras, metade delas foram imediatamente analisadas, na condição fresca/refrigerada, e metade foi submetida ao congelamento para posterior análise. Em 11,75% das amostras frescas pesquisadas, isolou-se *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*. Não foi observado resultado positivo para *Campylobacter* spp. nas linguças congeladas. Trabalhou-se também, com simples e dupla concentração do meio de enriquecimento, recuperando três amostras positivas no meio simples e uma amostra positiva no meio em dupla concentração. Foi observada 100% de resistência frente às bases antibióticas testadas. Recomenda-se mais estudos desta natureza, ampliando a abrangência quanto aos produtos avícolas e com maior número de amostras, pois acredita-se que poderão avaliar a prevalência deste importante micro-organismo em produtos de origem animal no estado de Goiás. Tais investigações poderão contribuir com informações importantes para o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango, estabelecido em 2008 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

Palavras-chave: *Campylobacter*. Produtos avícolas. Resistência bacteriana a antibióticos. Microbiologia de alimentos.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Campylobacter* spp. IN CHICKEN SAUSAGE

Campylobacteriosis have been related as main cause of gastroenteric diseases in Europe and North America. In Brazil, the lack of data about this disease hinders a comparison with other countries and difficult the decision making to combat the causative bacterium. Due high incidence of *Campylobacter* spp. in meat, main in poultry carcasses and by-products, this study aimed isolate and identify this bacteria in chicken fresh sausage sampled in Aparecida de Goiânia, in Goiás state. Thirty-four samples were collected in the period from July to October, each one were subdivided in 68 sub-samples, half of sub-samples were analyzed immediately, in fresh/chilled condition, and the other half were frozen for further analysis. In 11.65% of fresh samples were isolated *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. For the frozen samples, no positive results were observed. Worked also with simple and double concentration of enrichment medium, recovering three positive samples in the simple one and a positive sample in the double. It was observed 100% resistance against the antimicrobial bases tested. It is recommended more studies of this nature, broadening the scope as to poultry products and greater number of samples; therefore, it is believed that they may evaluated the prevalence of this important microorganism in animal products in the Goiás state. Such investigations may provide important information for the National Program for Monitoring Prevalence and Bacterial Resistance in Chicken, established in 2008 by the National Agency of Sanitary Surveillance of the Ministry of Health.

Key words: *Campylobacter* spp. Poultry product. Antimicrobial resistance. Food microbiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Presença de <i>Campylobacter</i> spp. em diferentes marcas de linguiças tipo frescal (artesanal e industrializada), obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.....	30
Tabela 2. Faixas de temperatura dos balcões de exposição e das linguiças tipo frescal obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.	31
Tabela 3. Perfil de resistência a antimicrobianos, segundo padrões EUCAST (2013), de isolados de <i>Campylobacter</i> em linguiças tipo frescal obtidas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resultados esperados para confirmação de <i>Campylobacter</i> spp.....	28
Quadro 2. Características das espécies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes nos testes de identificação.....	28
Quadro 3. Padrões de susceptibilidade a antimicrobianos para <i>Campylobacter</i> spp.....	29
Quadro 4. Isolados de <i>Campylobacter</i> spp. e espécies em algumas regiões do mundo e em estados do Brasil, 2015 (revisão da autora).....	35
Quadro 5. Resistência antimicrobiana de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i> isolados na Letônia, China e Brasil, 2015 (revisão da autora).	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões administrativas e registro de habitação do município de Aparecida de Goiânia, Goiás. (PINTO, 2006).....	23
Figura 2. Fluxograma para o isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. (ISO, 2006).....	25
Figura 3. Morfologia de colônias características de <i>Campylobacter</i> spp. no meio m-CCDA.	26
Figura 4. Morfologia de colônias características de <i>Campylobacter</i> spp. em meio CBA.	26
Figura 5. Temperatura do balcão de exposição das linguças tipo frescal de açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.	31
Figura 6. Temperatura das linguças tipo frescal no momento da coleta, obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.	32
Figura 7. Distribuição dos açougues pesquisados e isolados de <i>Campylobacter</i> spp. nas linguças tipo frescal, por município de Aparecida de Goiânia, Goiás.	32
Figura 8. Número de amostras coletadas e isolados de <i>Campylobacter</i> spp. por marca de linguça tipo frescal obtidas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Doenças transmitidas por alimentos	13
2.2	<i>Campylobacter</i> spp. e Campilobacteriose	14
2.3	Linguiça frescal	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	Geral	21
3.2	Específicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Local do estudo e amostragem	22
4.2	Coleta das amostras	23
4.3	Análises microbiológicas	24
4.3.1	Isolamento e Identificação	24
4.3.2	Susceptibilidade antimicrobiana	29
4.3.3	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE A	50
	ANEXO 1	70

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, milhões de pessoas contraem doenças transmitidas pelo consumo de água e alimentos contaminados e, desses, aproximadamente 1,5 milhão são crianças que morrem anualmente por doenças diarreicas (WHO, 2009). A necessidade de grande atenção na segurança alimentar é um tema autoevidente e a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos diz respeito a todos os segmentos que estão envolvidos na produção e consumo deles. Certamente essa consciência irá reduzir a incidência das chamadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (WHO, 2006).

O fornecimento de alimentos livres de riscos à saúde é realmente um desafio, e sua negligência pode ocasionar infecções e intoxicações graves e prejudiciais ao consumidor, causando desde um simples desconforto intestinal a distúrbios neurológicos e morte (MIRANDA; BARRETO, 2012).

O número crescente de DTA pode atingir anualmente até 30% da população por ano em países desenvolvidos. Devido a esse aumento desenfreado, entidades governamentais, indústrias e os próprios consumidores vêm se tornando mais exigentes quanto à sanidade dos alimentos (WHO, 2007). Entre os anos de 2000 e meados de 2014 foram notificados, no Brasil, 9.928 surtos de DTA, com 195.753 pessoas doentes e, em 45,66% destes surtos, o alimento relacionado com a enfermidade foi ignorado. Alimentos de origem carne, tanto bovina quanto suína e de aves, estão relacionados em 8,72% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O Brasil é considerado o segundo maior produtor de carne do mundo e vem se mantendo como maior exportador. Portanto, existe uma preocupação constante com a qualidade da carne destinada ao consumo (ABIEC, 2011). Dados de 2007 descreveram que, no país, o consumo de linguiça foi expressivo. Este produto foi líder no segmento de embutidos, responsável por 30% do faturamento deste mercado, seguido por mortadela (14%), presunto (12,5%) e salsicha (11%). Nesse mesmo ano, a linguiça do tipo frescal foi a preferida dos consumidores e representou 60% das vendas totais da categoria, cujo consumo aumentou em 17% em comparação ao ano anterior (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO DO BRASIL, 2007).

As linguiças são definidas pela legislação brasileira como produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado. Podem ser classificadas segundo a tecnologia de fabricação como:

frescas, secas, curadas e/ou maturadas e cozidas; ou de acordo com a composição da matéria-prima (como exclusivas de carne suína, bovina, frango ou peixe, e mistas – feitas com diferentes tipos de carne) (BRASIL, 2000).

Linguiça do tipo frescal é um produto cárneo pronto para consumo, facilmente vendido e, muitas vezes, elaborado em condições higiênicossanitárias inadequadas, como as de fabricação caseira e comercializadas em diversos estabelecimentos e feiras metropolitanas. As linguiças são produtos com elevada atividade de água, de intensa manipulação e sem tratamento térmico durante o seu preparo e, após a fabricação, são mantidas somente sob refrigeração, podendo ser veiculadoras de patógenos, como diversos tipos de bactérias, incluindo *Campylobacter* spp. (BARRELL, 1984; WHO, 2006).

As bactérias do gênero *Campylobacter* são de grande importância para a saúde pública pela sua significativa incidência em alguns países, constituindo a maior causa de gastroenterite em humanos, sendo a espécie *Campylobacter jejuni* a mais comum (KUANA et al., 2008). Esses micro-organismos fazem parte da microbiota de animais, como suínos, bovinos e aves; porém estudos epidemiológicos sugerem que o principal veículo de transmissão são os produtos de origem avícola (KUANA et al., 2008).

Considerando a falta de conhecimento dos manipuladores em relação às condições higiênicossanitárias na fabricação de alimentos e a possível presença de *Campylobacter* spp. em sua microbiota, a contaminação cruzada torna-se evidente. Esse tipo de contaminação afeta principalmente indústrias de alimentos, restaurantes e hospitais, constituindo um potencial risco à saúde pública (TOSIN; MACHADO, 1995).

Em 2012, 6.812 casos de *Campylobacter* spp. foram confirmados em laboratório nos Estados Unidos pela *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (FoodNet). Comparando com os dados entre 2006 a 2008, houve um aumento de 13% na incidência deste patógeno (CDC, 2014).

De acordo com *European Food Safety Authority* (EFSA), o número de casos confirmados de campilobacteriose apresentou um aumento de 4% em relação a 2008, permanecendo como a zoonose mais frequentemente reportada. Crianças com idade menor que cinco anos apresentaram maior susceptibilidade e maior número de casos notificados. Na União Europeia, ocorreram aproximadamente 40 mortes em 2009 devido a essa enfermidade (EFSA; ECDC, 2011).

O congelamento e a refrigeração têm o papel de conservar o alimento em bom estado para o consumo, controlando o desenvolvimento bacteriano. Alguns estudos demonstram uma menor detecção de *Campylobacter* spp. em produtos submetidos ao

congelamento (HAUGHTON et al., 2012; SAMPERS et al., 2010). Contudo, existem relatos de sobrevivência desse micro-organismo ao congelamento. Barrell (1984) observou a sobrevivência de cepas microbianas ao congelamento a -19 °C. A detecção de bactérias viáveis em produtos refrigerados e congelados é de grande importância; pois, no caso de *Campylobacter* spp., apenas 500 células seriam suficientes para causar infecção (GONÇALVES et al., 2012).

Pelo risco de contaminação em linguiças por *Campylobacter* spp., bem como pelo seu importante consumo no estado de Goiás, torna-se tema relevante a verificação microbiológica desse produto como forma de contribuir para a saúde da população. Considerando o exposto, este estudo pretende isolar e caracterizar esse micro-organismo em linguiças do tipo frescal de frango, refrigerada e congelada, comercializadas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

Mais de 250 tipos de DTA são conhecidos atualmente. Relatórios publicados pela EFSA informam que *Campylobacter* spp. lidera a lista de doenças zoonóticas na União Europeia (CDC, 2011; EFSA, 2009). Devido à alta incidência desse micro-organismo em carcaças de frango pós abate, é importante avaliar produtos que tenham como base a carne de frango (FEISTEL et al., 2012; MELO et al., 2012; OLIVEIRA, 2014).

DTA são definidas como doenças, quer de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou água. São consideradas atualmente um problema emergente e com grande impacto em saúde pública, apresentando maior incidência a cada dia devido a mudanças de hábitos alimentares e em geral, rápida urbanização, alimentação fora do lar mais frequente, situação em que a segurança alimentar nem sempre é garantida (WHO, 2009).

Tais enfermidades podem ser provocadas por diversos micro-organismos; entretanto as bactérias, pela sua diversidade e patogenicidade, constituem, epidemiologicamente, o grupo mais importante, estando implicadas em dois terços dos surtos dessas doenças, comumente associados com alimentos de origem animal. No Brasil, os principais agentes bacterianos destas enfermidades são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* e *C. jejuni* (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). *Campylobacter* spp. ocupa, atualmente, lugar de destaque na Europa e nos Estados Unidos, tendo como principal fonte os produtos de origem avícola (CDC, 2011; EFSA, 2012).

Em países ditos desenvolvidos, é crescente a cobrança quanto à adoção de boas práticas de gestão da qualidade do *International Standard for Quality Management Systems* (ISO) e dos princípios do sistema *Hazard Analysis of Critical Control Points* (HACCP), ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos, como medida primordial de controle de qualidade e segurança, e como redução nas estatísticas de DTA (CDC, 2012).

A necessidade de grande atenção na segurança alimentar é um tema evidente. De fato, a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos diz respeito a todos os segmentos

envolvidos em sua produção, e certamente essa consciência irá reduzir a incidência das chamadas DTA (WHO, 2006).

Estima-se que 48 milhões de enfermidades relatadas nos Estados Unidos são decorrentes de DTA. Dessas, 9,4 milhões não se conhece o patógeno responsável (CDC, 2013). De acordo com Gottardi (2006), *C. jejuni* e *L. monocytogenes* foram consideradas espécies de micro-organismos emergentes na Europa e nos Estados Unidos e tem sido foco de preocupação.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2012, 84% dos surtos de DTA notificados foram causados por bactérias, sendo apenas três causados por *Campylobacter* spp. Porém, aproximadamente 46% destes surtos (4.050) tiveram seus agentes etiológicos ignorados ou não informados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.2 *Campylobacter* spp. e Campilobacteriose

O gênero *Campylobacter* é de natureza zoonótica, comensais em bovinos, suínos e aves. Constitui-se de bacilos Gram negativos, de 0,2 - 0,8 μm , não esporulados, curvos em forma de vírgula, móveis com movimento característico em “serrote” ou “saca-rolha”, e microaerófilos, que requerem concentração de 5% de O_2 , 10% de CO_2 e 85% de N_2 (YAN et al., 2005; GOTTARDI, 2006; CARVALHO, 2009; ZENDEHBAD; ARIAN; ALIPOUR, 2013; BOLTON, 2015).

Dentre as mais de 25 espécies descritas atualmente do gênero *Campylobacter*, as termofilicas são as mais importantes em relação às DTA, pois relacionam-se a gastroenterites em seres humanos, sendo elas *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli* e *Campylobacter upsaliensis* (EFSA, 2012).

C. jejuni, *C. coli* e *C. lari* são os mais comumente isolados, desenvolvem-se em temperatura ótima de 42 e 43 °C, frequentemente isolados de enterites humanas e animais. Dentre os três, *C. jejuni* destaca-se como o principal agente etiológico de diarreia humana, e lidera os relatos de DTA registradas nos Estados Unidos, onde aproximadamente 1,3 milhões de pessoas apresentam essa enfermidade (CARVALHO, 2009; HURD et al., 2012; ZENDEHBAD; ARIAN; ALIPOUR, 2013).

Normalmente são isolados do trato gastrointestinal de animais, sendo mais comum em aves e suínos. *C. coli*, *C. jejuni* e *Campylobacter fetus* têm sido isolados de fezes e carcaças de animais sadios, sem sintomatologia clínica de afecção gastrointestinal, abatidos em matadouros regulares (SILVA et al., 2012).

A principal forma de transmissão é a alimentar, sendo produtos de origem animal e água, com tratamentos ineficientes, os maiores responsáveis. Porém, casos de contaminação cruzada e contato direto com animais também podem ser fontes de contaminação (CARVALHO, 2009). A dose infectante de *Campylobacter* é baixa, sendo suficiente apenas 500 células, e isso justifica a grande frequência de surtos (GONÇALVES et al., 2012). O período de incubação é em torno de dois a dez dias, com média de quatro dias para início dos sintomas. Porém, depois de cessados os sintomas, o micro-organismo continua sendo excretado nas fezes por várias semanas, com relatos de recaídas em 25% dos casos (FORSYTHE, 2013).

Os sintomas de campilobacteriose são relacionados, geralmente, a afecções gastrointestinais como diarreia, dor abdominal e febre, sendo normalmente auto limitante em adultos, com curso de cinco a sete dias (GONÇALVES et al., 2012). Os casos mais graves necessitam de cuidados hospitalares e normalmente são tratados com antibioticoterapia baseada no uso de macrolídeos, tetraciclina ou (fluoro) quinolonas (BOLTON, 2015).

As carcaças de aves apresentam maior incidência de contaminação pelo agente. A contaminação é devida ao contato com o conteúdo intestinal durante abate, ou de ave para ave por meio dos equipamentos utilizados. Zendehbad, Arian e Alipour (2013) encontraram maior prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango (59,3%) em relação as outras carcaças de aves domésticas, sendo *C. jejuni* encontrado em 80,7% dos casos e *C. coli* em 19,3%.

A carne de frango é considerada a principal disseminadora dessa bactéria, com grande prevalência e taxas alarmantes na Europa (de cada 10 carcaças, oito estão contaminadas) de acordo com o painel dos riscos biológicos da EFSA em 2010 (MELO et al., 2013). Silva et al. (2012) fez o isolamento de *Campylobacter* spp. em 15,9% das amostras coletadas de carcaças suínas abatidas em São Paulo, sendo destes, 93,6% isolados em swab retal, 3,2% em swab de carcaça e 3,2% em linfonodo, todas com predominância de *C. coli*.

Carcaças suínas são menos contaminadas por *Campylobacter* spp. do que as de frango. Isso pode ser devido ao tempo de secagem e resfriamento; pois, para carcaças de frango, é em torno de uma hora, e, de suína, aproximadamente, 24 horas, o que diminui a quantidade de células viáveis devido ao maior tempo de resfriamento e ao decréscimo gradual da temperatura. Outro fator é a textura da pele que no frango dificulta secagem da carcaça (SILVA et al., 2012).

Campylobacter spp. é sensível à secagem e destruído por cocção em temperatura de 55 a 60 °C com D₅₀ entre 0,88 e 1,63 minutos. Todavia, essa bactéria tem alta capacidade de sobrevivência e adaptação ao meio. Algumas pesquisas relatam que *Campylobacter* spp., ao ser

submetido a condições não favoráveis, pode passar para sua forma cocóide, a chamada forma viável não cultivável (VNC), considerada uma estratégia de sobrevivência desses micro-organismos, prolongando sua sobrevivência por até sete meses. Essa forma de sobrevivência torna mais difícil sua identificação em análises, mas mantém suas características de virulência no organismo (ROLLINS; COLWELL, 1986; JAY, 2005; FORSYTHE, 2013; MAGAJNA; SCHRAFT, 2015).

O aumento nos relatos de multirresistência bacteriana de cepas de *Campylobacter* spp. tem gerado preocupação. Essa característica frequentemente relatada tem sido relacionada com o uso de antibióticos na agricultura e na medicina veterinária, como promotores de crescimento animal e no controle de doenças de animais destinados a alimentação (ANDRZEJEWSKA et al., 2015; ZENDEHBAD; KHAYATZADEH; ALIPOUR, 2015).

Múltiplos mecanismos de resistência tem sido relacionados com essa frequente multirresistência de cepas, como alteração por mutação ou modificação de moléculas alvo, repressão dos sistemas de captação, ativação de bombas de efluxo e inativação do antibiótico, sendo o principal mecanismo o sistema de efluxo CME, cuja expressão é modulada por CmeR, um repressor de transcrição. Esse sistema de efluxo está relacionado a características de resistência a vários compostos, como antibióticos, sais biliares, corantes e detergentes. A mutação de CmeR tem sido relacionada com diminuição da resistência bacteriana e da capacidade de *C. jejuni* em colonizar frangos (BOLTON, 2015; HUNGARO et al., 2015).

É importante conhecer as características fenotípicas desse micro-organismo, pois a maioria dos testes para identificação se baseia em provas bioquímicas. As espécies termofílicas, são oxidase e catalase positivas, e apresentam também característica indol negativa. *C. jejuni* tem capacidade de hidrólise de hipurato, ao contrário das outras espécies, tornando essa prova uma possibilidade de diferenciação (ISO, 2006). Alguns estudos, no entanto, afirmam que determinadas cepas de *C. jejuni* não têm a capacidade de expressão dessa característica, o que pode gerar dúvida nas provas bioquímicas. Em análises laboratoriais rotineiras, não se consegue identificar, em nível de espécie, os isolados de *Campylobacter* (CANER et al., 2008; FORSYTHE, 2013).

Estudo realizado por Andrzejewska et al. (2015) em produtos avícolas, no norte da Polônia, de 742 amostras pesquisadas, 41,6% foram positivas para *Campylobacter* spp. Desse total, 62,8% eram *C. jejuni* e o restante, 37,2%, identificados com *C. coli*. Foram analisadas, nessa investigação, diferentes partes da carcaça de frango e de peru, observando-se que a coxa de frango e o filé de peito de peru apresentaram a maior frequência de isolados positivos, e a menor frequência foi nas asas de frango. Outro dado interessante observado foi que, em 2009,

início do estudo, 60,2% das amostras foram positivas e, em 2013, final do estudo, apenas 30,2% das amostras obtinham isolados de *Campylobacter* spp., o que representa um decréscimo temporal apesar de mantida a mesma técnica de amostragem e isolamento.

No Canadá, em 2014 foram relatados 145.000 casos de *Campylobacter* spp. em uma população de 32,5 milhões de habitantes. Nesse país, *C. jejuni* é o terceiro causador de gastroenterite mais frequente, atrás apenas de Norovírus e *C. perfringens*. O mesmo estudo relatou isolados de *Campylobacter* em vegetais frescos, com uma taxa de 0,42% das amostras, o que também havia sido relatado em 1992, com isolados positivos no espinafre, alface e salsa (GUÈVREMONT et al., 2015). Em relatos holandeses, 30% dos casos de *Campylobacter* spp. são atribuídos a consumo de preparações de carne de frango (HANSSON et al., 2015).

No Irã, Zendehbad, Khayatzadeh e Alipour (2015) relataram uma taxa de 63,1% de amostras de carne de frango de varejo positivas para o gênero e, dessas, 88,1% eram *C. jejuni* e 11,9% *C. coli*. Observaram também que a maior quantidade de isolados ocorreu no verão, o que foi relatado por outros estudos citados pelo autor. Foi observado também que oito amostras, consideradas negativas na fase de isolamento, foram determinadas como positivas quando submetidas a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), demonstrando a dificuldade de isolamento dessa bactéria.

No Brasil, em Minas Gerais, Hungaro et al. (2015) observaram a incidência de 16,8% de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango, em que *C. jejuni* representou 93,8% dos isolados. Em Uberlândia, de 450 amostras de frango congelado, 55 foram positivas para *C. jejuni* (MELO et al., 2013). No Rio de Janeiro, observou-se uma incidência maior de *C. coli* em relação a *C. jejuni* em isolados de fonte animal e de casos de gastroenterite humana (AQUINO et al., 2010).

Em Santa Catarina, Biasi et al. (2011) analisaram 259 amostras oriundas de 37 carcaças suínas, onde obtiveram nove (3,5%) amostras positivas para *Campylobacter* spp. em, sete carcaças (18,9%). Porém, os isolados que foram identificados bioquimicamente como este micro-organismo foram também analisados pelo Kit API Campy (ensaio imunoenzimático específico para identificação de *Campylobacter* e *Arcobacter*) e um desses isolados foi identificado como *Arcobacter*, sendo esta uma situação relativamente comum na pesquisa de *Campylobacter* spp.

Em Goiás, Oliveira (2014) verificou 14% de contaminação por *Campylobacter* spp. em 100 amostras de carcaças de frango coletadas em supermercados, as quais foram analisadas, primeiramente, por ensaio imunoenzimático VIDAS®. Aquelas amostras positivas ou com limiar próximo ao positivo, seguiram para o isolamento convencional. Do total de amostras

positivas, 11% foram confirmadas apenas pelo meio de isolamento convencional, sendo 47,4% de *C. jejuni*, 31,5% de *C. lari* e 21,1% de *C. coli*.

Existem relatos da presença desse agente em casos de diarreia aguda, crônica e em indivíduos assintomáticos no Brasil. De acordo com Carvalho (2009), em São Paulo, *Campylobacter* é o segundo agente mais isolado em crianças com quadros diarreicos numa incidência próxima a 25,9%.

Portadores assintomáticos desse micro-organismo, principalmente do sexo masculino, têm sido identificados, visto que Tosin e Machado (1995) encontraram 6,2% destes em indivíduos que trabalhavam com a manipulação de alimentos na região Sul do Brasil.

Após ingestão, *Campylobacter* spp. coloniza a mucosa e adere às células intestinais, perturbando a capacidade de absorção devido à invasão celular e produção de toxina, além do início da resposta inflamatória. Entre as toxinas normalmente produzidas pelo *Campylobacter* spp. cita-se a enterotoxina termossensível, toxina distensora citoletal e as citotoxinas proteicas termossensíveis (FORSYTHE, 2013). Existem relatos confrontando essa doença com complicações como artrite reativa, síndrome hemolítica urêmica, septicemia e Síndrome de Guillain-Barré (GOTTARDI, 2006).

A maior preocupação, portanto, tem sido com as sequelas deixadas pela campilobacteriose. Fica et al. (2012) relataram um caso de miopericardite como uma complicação infrequente desta enfermidade no Chile. O autor levanta várias hipóteses, relacionando essa situação com a ponta de um *iceberg*, considerando que a campilobacteriose pode ainda ter muito a surpreender. Por ter um diagnóstico presuntivo, o autor sugere que este pode ter sido também uma reação autoimune provocada pela infecção causada pelo *Campylobacter*, sendo esse o evento clínico anteriormente observado.

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma neuropatia autoimune aguda que envolve o sistema nervoso periférico. Leva a debilitação do paciente de forma rápida, sendo necessária hospitalização e, em alguns casos, ventilação mecânica. Apesar de ser uma doença de etiologia múltipla, observou-se que 40% dos casos apresentam antecedentes de afecção por *Campylobacter*, sendo o evento clínico mais comum antes de certos tipos de SGB. A estimativa é de que, a cada mil infecções, uma evolua a SGB, tornando maior a importância do micro-organismo em questão (GOTTARDI, 2006).

Barrell (1984), em um estudo clássico, observou a presença e redução de *C. jejuni* em mistura de linguiça e carne picada estocada a -19 °C e a 22 °C em refrigerador doméstico e em estufa, respectivamente. Verificou também que o congelamento ocasionou a redução de uma a duas unidades logarítmicas do micro-organismo. O armazenamento em temperatura

maior que 10 °C representou uma redução de uma unidade logarítmica, e a 22 °C, uma redução menor que uma unidade. A sobrevivência na mistura com linguiça de porco foi a menor, o que pode ser devido à presença de sal e dióxido de enxofre (BARRELL, 1984).

Algumas pesquisas demonstram que a detecção ou não de *Campylobacter* spp. pode ser influenciada pelo congelamento, onde parte da população pode ser eliminada e parte pode sofrer injúrias sub-letais, o que dificulta o seu desenvolvimento durante isolamento (HAUGHTON et al., 2012; SAMPERS et al., 2008, 2010). Entretanto, Sampers et al. (2008) observaram, em estudo com preparações cárneas de frango, que produtos congelados com ou sem pele tem diferenças na contagem de *Campylobacter* spp., sendo os congelados com pele os que apresentaram menor redução logarítmica após congelamento.

Sampers et al. (2010) relataram que, após 24 horas de armazenamento a -22 °C, ocorreu decréscimo de um log na contagem de Unidades Formadora de Colônias (UFC) de *Campylobacter* spp. Com estocagem prolongada nesta temperatura, observaram uma redução gradual em UFC, não conseguindo mais a detecção dessa bactéria no teste de isolamento. Porém, no teste de presença ou ausência, foi detectado *Campylobacter* spp. após 84 dias de estocagem, confirmando que esse micro-organismo pode persistir por longos períodos em produtos congelados, apesar da diminuição de concentração e viabilidade das células (SAMPERS et al., 2010).

2.3 Linguiça frescal

A linguiça é um produto cárneo industrializado, elaborado a partir de uma mistura de carne picada (carne de frango, porco ou mista) e temperos, em um invólucro natural (tripa) ou artificial, submetidos ao processamento tecnológico adequado. É um produto muito consumido devido a seu baixo custo e popularidade (BRASIL, 2000; ROSSI et al., 2011).

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) da Linguiça, esse tipo de alimento pode ser classificado como produto fresco, seco, curado, maturado, cozido ou outros de acordo com a tecnologia de fabricação. A designação de venda deve ser feita por linguiça, seguido pela expressão ou denominação que caracterizem o produto, sendo as mais comuns: linguiça de carne bovina, linguiça de carne suína, linguiça de lombo suíno, linguiça de lombo e/ou pernil suíno, linguiça de carne suína defumada, linguiça calabresa, linguiça portuguesa, linguiça toscana, linguiça de carne de peru, linguiça de carne de frango, linguiça mista, linguiça tipo calabresa, linguiça tipo portuguesa, linguiça cozida de

(denominação referente a sua composição principal), paio, e outras denominações. A linguiça ainda pode ser designada como frescal, cozida ou dessecadas, sendo a frescal, a de teor máximo de umidade (70%), e que não permite o uso de carne mecanicamente separada (BRASIL, 2000).

É um alimento de fácil e rápida elaboração e pouco oneroso, sendo esse processo realizado tanto em estabelecimentos de pequeno porte, quanto médio e grande porte. Por ser um alimento de intensa manipulação, a linguiça tem importante risco de contaminação, sendo este favorecido pela alta atividade de água e ausência de tratamento térmico durante sua elaboração (WHO, 2006; ROSSI et al., 2011; GEORGES, 2014).

É um alimento consumido após algum tipo de processamento térmico como cozimento, assamento ou fritura, entretanto, dependendo da carga microbiana inicial, e das condições de processamento, ainda pode se manter contaminado após o processamento (SILVA et al., 2004).

Os limites microbiológicos para linguiça são definidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme sejam: contagem de coliformes a 45 °C ($5,0 \times 10^3$ UFC/g), de *Estafilococos* coagulase positiva ($5,0 \times 10^3$ UFC/g), e de *Clostrídios* sulfito redutores a 46 °C ($3,0 \times 10^3$ UFC/g) bem como a ausência de *Salmonella* spp. em 25g do produto (BRASIL, 2001). No entanto, não existe legislação que defina um limite microbiológico para linguiça quanto à presença ou ausência de *Campylobacter* spp.

Existe uma grande variedade de carnes utilizadas na produção de linguiças, se destacando a suína e de frango (GEORGES, 2014). Produtos de origem avícola têm sido relacionados como principais fontes de campilobacteriose, geralmente devido a contaminação cruzada ou tratamento térmico ineficiente. Apesar da implantação de algumas políticas de controle de contaminação na cadeia de produção avícola, *Campylobacter* spp. continua sendo patógeno relatado em enfermidade gastrointestinal em vários países (HANSSON et al., 2015; JENSEN; LAWSON; LUND, 2015).

Devido a essas características de consumo e de produção da linguiça tipo frescal, é de extrema importância que trabalhos sejam voltados a essa matéria prima para se avaliar o risco gerado pelo consumo, além de fornecer dados para decisões e ações do Ministério da Saúde e das Secretarias de Saúde do país.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Isolar *Campylobacter* spp. em linguças de frango do tipo frescal comercializadas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás.

3.2 Específicos

- Realizar pesquisa de presença de *Campylobacter* spp. em amostras de linguça de frango do tipo frescal refrigeradas e congeladas;
- Identificar as espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de linguças de frango do tipo frescal refrigeradas e congeladas;
- Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados;
- Subsidiar o registro de informações sobre *Campylobacter* spp. em linguça de frango tipo frescal no estado de Goiás.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa é parte de um projeto maior denominado “Caracterização de micro-organismos isolados em linguiça tipo frescal em Goiás” desenvolvido nos Programas de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos e em Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Goiás.

4.1 Local do estudo e amostragem

O estudo foi realizado em açougues do Município de Aparecida de Goiânia, Goiás, considerado um dos pólos mais dinâmicos do Estado, se destacando principalmente, nas áreas de indústria, comércio e prestação de serviços. Conta com uma população em torno de 511 mil habitantes (IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013), ou seja, o segundo município mais populoso do estado, atrás somente da capital.

Segundo a Secretária do Planejamento de Aparecida de Goiânia (SEGPLAN), o município está dividido em sete regiões administrativas: Região central, Cidade livre, Tiradentes, Garavelo, Papillon, Vila Brasília e Santa Luzia (Figura1).

Para a realização do estudo e obtenção das amostras junto aos estabelecimentos (açougues), foi firmada uma parceria entre a Faculdade de Nutrição (FANUT)/UFG e o Departamento de Vigilância Sanitária Municipal (VISA) de Aparecida de Goiânia, sendo este o responsável pela fiscalização dos estabelecimentos comerciais varejistas que produzem, manipulam e fracionam produtos de origem animal destinados à venda direta ao consumidor final.

Assim, as amostras foram obtidas junto a todos os açougues habilitados para o comércio e fiscalizados pela VISA do Município, distribuídos nas sete regiões administrativas acima citadas. A listagem destes açougues foi disponibilizada pelo Sindicato dos Açougues (SINDIAÇOUGUES) a qual continha o endereço, o Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ) e a razão social. Foram visitados 34 estabelecimentos, no período de julho a outubro de 2014, nos quais foram coletadas amostras de linguiça do tipo frescal de frango refrigeradas.

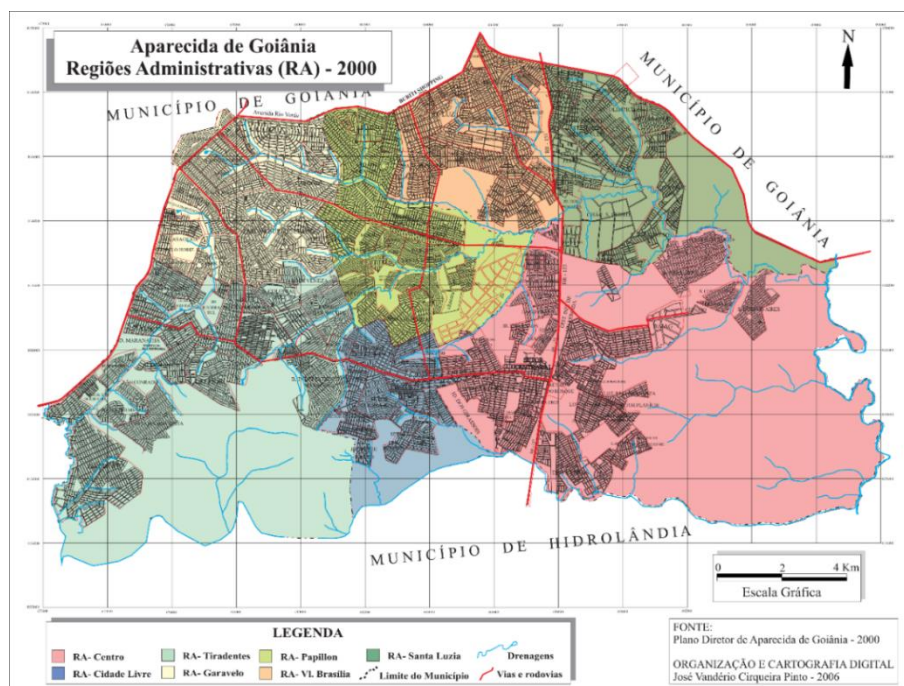


Figura 1. Regiões administrativas e registro de habitação do município de Aparecida de Goiânia, Goiás. (PINTO, 2006)

4.2 Coleta das amostras

Os açougues, objeto deste estudo, foram visitados pelos pesquisadores sempre acompanhados por um fiscal de saúde pública da VISA do Município. Antes da coleta, com ajuda de termômetro infravermelho calibrado, foi mensurada a temperatura do balcão de exposição das linguças de frango a serem amostradas.

Foi coletada, aleatoriamente, uma amostra de aproximadamente 200 gramas de linguça de frango tipo frescal refrigerada por estabelecimento. Esta foi dividida, pelo próprio funcionário do estabelecimento, em duas subamostras de aproximadamente 100 gramas cada, para análise de diferentes tratamentos de conservação, ou seja, uma refrigerada e outra congelada. Estas foram acondicionadas em caixa isotérmica com placas de gelo reciclável, para evitar a alteração devido à temperatura ambiente e, imediatamente, transportada ao laboratório num prazo máximo de duas horas.

Com auxílio de termômetro de penetração tipo espeto, mensurou-se também a temperatura das linguças expostas para venda nos açougues visitados, imediatamente após a coleta.

4.3 Análises microbiológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Higiênico Sanitário de Alimentos (LaCHSA)/FANUT/UFG, em parceria com o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambientes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)/UFG, e com o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG.

Uma vez no laboratório, uma das subamostras de cada estabelecimento, foi congelada por aproximadamente oito semanas para análise posterior, e a outra, encaminhada para ser analisada imediatamente (refrigerada).

4.3.1 Isolamento e Identificação

As análises microbiológicas para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. obedeceram à metodologia oficial prevista na *International Organization for Standardization - ISO 10272-1* (ISO, 2006) (Figura 2).

Essa metodologia prevê o enriquecimento de 25 gramas da amostra em caldo Bolton e incubação em estufa em ambiente de microaerofilia. Também sugere que é possível a redução da unidade analítica, desde que seja mantida a diluição de 1:10.

Nesse estudo, foi adotada a diluição recomendada, utilizando 10 gramas de amostra em 90 mL de Caldo Bolton, incubados inicialmente na fase de pré-enriquecimento sob uma temperatura de 37 °C, durante quatro horas e, posteriormente, a temperatura de $41,5 \pm 1$ °C por 44 ± 4 horas para fase de enriquecimento. Essa redução analítica também foi utilizada por Alter et al. (2006) e Sampers et al. (2008).

De cada amostra homogeneizada, duas porções de 10 gramas foram pesadas e enriquecidas em duas situações diferentes: uma em concentração simples e a outra em dupla concentração de Caldo Bolton, com o objetivo de avaliar se a concentração de nutrientes no meio melhora ou não a capacidade de recuperação da bactéria.

Após a fase de enriquecimento, a partir do Caldo Bolton, estriou-se o inóculo em placas de Petri com Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA) e com Ágar Columbia Sangue (CBA) e, estas foram incubadas a $41,5 \pm 1$ °C, por 44 ± 4 horas, em atmosfera de microaerofilia. Após o período de incubação, foi observado o desenvolvimento de colônias típicas de *Campylobacter* spp.

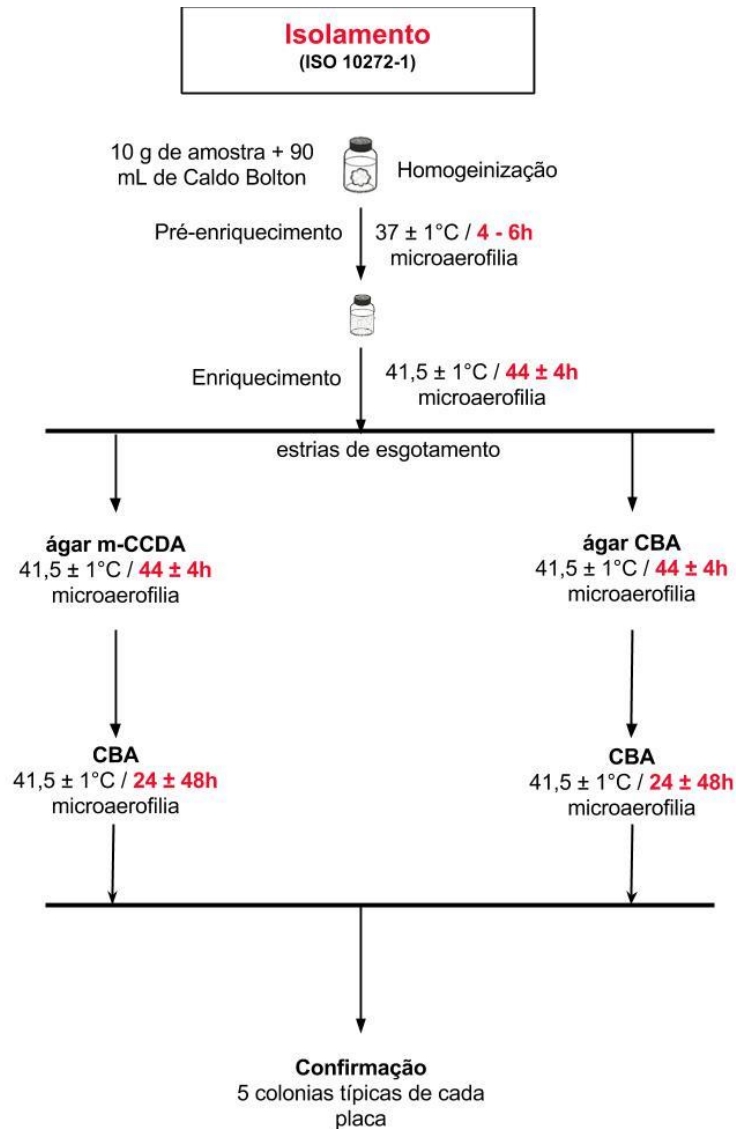


Figura 2. Fluxograma para o isolamento de *Campylobacter* spp. (ISO, 2006)

No meio m-CCDA verificou-se a presença de colônias acinzentadas, geralmente com brilho metálico, planas e úmidas, com tendência ao espalhamento (Figura 3).

Colônias típicas foram então purificadas repetindo o plaqueamento em CBA. Neste, tais colônias apresentam-se mucóides, de pequena a média dimensão, normalmente com uma coloração acinzentada, planas com extremidades irregulares e não hemolíticas. Algumas cepas tem sido relacionadas também com uma morfologia composta por colônias redondas, com 1 a 2 mm de diâmetro, convexas, completas e brilhantes (Figura 4).



Figura 3. Morfologia de colônias características de *Campylobacter* spp. no meio m-CCDA.



Figura 4. Morfologia de colônias características de *Campylobacter* spp. em meio CBA.

Depois de repetidos plaqueamentos, com o intuito de purificar as colônias com características típicas, foi feita coloração de Gram para observação de bastonetes gram-negativos, buscando observar também a homogeneidade da colônia a ser testada. Em seguida, foram submetidas às provas de confirmação e de identificação da espécie.

4.3.1.1 Provas confirmatórias (ISO, 2006)

Morfologia e motilidade. A partir das placas de CBA, uma colônia foi suspensa em 1 mL de Caldo Brucella e levada em montagens úmidas ao microscópio para observação da morfologia e motilidade. As culturas típicas de *Campylobacter* spp. são bastonetes curvos com motilidade tipo “saca rolha”.

Teste de crescimento a 25 °C em atmosfera microaerófila. A partir das placas de CBA, estriou-se uma alçada da cultura em uma placa de CBA que foi incubada a 25 ± 1 °C/44 ± 4 h, em atmosfera microaerófila. O desenvolvimento de colônia na placa indica negatividade do teste para espécies de *Campylobacter* spp., pois estas não se multiplicam nesta faixa de temperatura.

Teste de crescimento a 41,5 °C em atmosfera aeróbica. A partir das placas de CBA, estriou-se uma alçada da cultura em uma nova placa com CBA e incubou-se a $41,5 \pm 1$ °C/44 ± 4 h, em atmosfera de aerofilia. Novamente, se houvesse desenvolvimento de colônia na placa, o teste seria negativo visto que espécies de *Campylobacter* spp. não se multiplicam em atmosfera aeróbica.

Teste de Oxidase. Em uma fita de papel filtro embebida com reagente de Kovacs, foi espalhada uma colônia e observou-se o aparecimento de cor azul intensa em aproximadamente dez segundos, sendo essa mudança de cor, indicativo de *Campylobacter* spp.

4.3.1.2 Provas de Identificação da espécie (ISO, 2006)

Teste de Catalase. Uma alçada da cultura foi testada em uma lâmina de microscópio, pingando uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. O borbulhamento em caso de colônias positivas é quase imediato, como foi observado.

Teste de sensibilidade à Cefalotina e ao ácido Nalidíxico. Foi preparada uma suspensão da amostra em Caldo Brucella, ajustada para 0,5 na escala de McFarland. Essa suspensão foi diluída na proporção 1:10 com o mesmo caldo e colocada na superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton 5% Sangue. Após cinco minutos de contato, o excesso do líquido foi drenado e a placa foi levada a estufa a 37 °C/10 min para secar. Após, colocou-se um disco de ácido Nalidíxico (30µg) e um disco de Cefalotina (30µg) na superfície da placa com auxílio de pinça esterilizada e incubou a 37 ± 1 °C/22 ± 2h em atmosfera microaerófila, sem inverter. Foi observada a sensibilidade pela presença de uma zona de inibição de crescimento ao redor dos discos testados.

Teste de hidrólise de hipurato. Uma alçada do isolado foi transferida para um tubo com 0,4 mL de solução de hipurato de sódio, misturado por agitação e incubado a 37 ± 1 °C/2

horas em banho maria. Após esse período, adicionou 0,2 mL de solução de ninidrina ao tubo, sem agitar. Foi realizada nova incubação a 37 ± 1 °C/10 min e observou-se o desenvolvimento de uma cor violeta escura (teste positivo).

Teste de hidrólise do indoxil acetato. Sobre um disco de indoxil acetato (2,5 a 5,0 mg), colocou-se uma alçada da cultura e uma gota de água destilada esterilizada. Observou-se a mudança de cor do disco para azul escuro entre cinco a dez minutos (teste positivo).

4.3.1.3 Interpretação dos resultados

Para que o isolado seja considerado *Campylobacter* spp., as culturas testadas apresentariam os resultados apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Resultados esperados para confirmação de *Campylobacter* spp.

Teste realizado	Resultado esperado para <i>Campylobacter</i>
Morfologia	Pequenos bastonetes curvos
Motilidade	Tipo “saca rolha”
Crescimento microaeróbico a 25 °C	Negativo
Crescimento aeróbico a 41,5 °C	Negativo
Teste de oxidase	Positivo

Fonte: ISO 10272-1 (2006)

Os testes de identificação das espécies foram interpretados de acordo com o quadro 2.

Quadro 2. Características das espécies de *Campylobacter* termotolerantes nos testes de identificação.

Teste	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalase	+	+	+	- ou levemente +
Sensibilidade ao ácido nalidíxico	S ^a	S ^a	variável	S
Sensibilidade à cefalotina	R	R	R	S
Hidrólise do hipurato	+	-	-	-
Hidrólise do indoxil acetato	+	+	-	+

^a Tem sido observada elevação na resistência

Fonte: ISO 10272-1 (2006)

4.3.2 Susceptibilidade antimicrobiana

A metodologia utilizada para o teste de susceptibilidade foi a de difusão em disco. Foram escolhidas bases de antibióticos considerando estudos recentes (CHEN et al., 2010; OLIVEIRA, 2014) e sua importância em tratamentos de infecções em humanos e animais, considerando as diferentes classes de antimicrobianos. Utilizou-se, nesse estudo, eritromicina, ciprofloxacina, ácido nalidixico, tetraciclina, ceftriaxona e cloranfenicol. Após o período de incubação, a leitura dos resultados foi baseada nos padrões fornecidos pela *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (2013) (Quadro 3).

Quadro 3. Padrões de susceptibilidade a antimicrobianos para *Campylobacter* spp.

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Eritromicina	$\geq 20\text{mm}$	-	$< 20\text{mm}$
Ciprofloxacina	$\geq 26\text{mm}$	-	$< 26\text{mm}$
Ácido Nalidixico	$\geq 20\text{mm}$	-	$\leq 19\text{mm}$
Tetraciclina	$\geq 30\text{mm}$	-	$< 30\text{mm}$
Ceftriaxona	$\geq 28\text{mm}$	24-27mm	$\leq 23\text{mm}$
Cloranfenicol	$\geq 17\text{mm}$	15-16mm	$< 14\text{mm}$

Fonte: EUCAST (2013)

4.3.3 Análise estatística

Teste de Fisher foi utilizado para comparações a fim de determinar estatisticamente se existe diferença significativa a um nível de 95%, na prevalência de *Campylobacter* spp. entre as amostras resfriadas e congeladas. Diferença significativa foi considerada quando a probabilidade (p) foi igual ou maior que o risco ($p \geq 0.05$).

5 RESULTADOS

Sessenta e oito amostras de linguiça de frango tipo frescal foram coletadas e analisadas, sendo 34 refrigeradas e 34 congeladas. As amostras congeladas foram analisadas após, aproximadamente, oito semanas de congelamento.

Das amostras refrigeradas, 11,75% (n=4) foram positivas para *Campylobacter* spp., segundo isolamento bacteriano convencional (ISO, 2006). Dessas, foi possível isolar duas espécies, sendo elas *C. coli* e *C. lari*.

Foi observado que o uso de dupla concentração do meio de enriquecimento não favoreceu uma maior detecção de *Campylobacter* spp., pois obteve-se 75% dos isolados recuperados em meio com simples concentração e 25% em meio com dupla concentração.

Tabela 1. Presença de *Campylobacter* spp. em diferentes marcas de linguiças tipo frescal (artesanal e industrializada), obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.

Classificação e marca de linguiça tipo frescal		N	Presença de <i>Campylobacter</i>
Artesanal	A	7	0
	B	2	0
Industrializada	C	1	1
	D	1	0
	E	2	0
	F	2	0
	G	5	1
	H	1	0
	I	2	0
	J	1	0
	K	1	0
	L	1	0
	M	1	1
	N	1	0
	O	2	1
	P	4	0
Total		34	4

Foram coletadas amostras de linguiças de diferentes fornecedores, segundo informação dos proprietários dos açougues estudados. Em alguns casos, o estabelecimento comercializava uma única marca do produto, assim não foi possível manter uma menor variação das marcas coletadas.

Na tabela 1 visualiza-se que foram coletadas amostras de 16 marcas do produto, sendo um deles classificado com linguiça artesanal (A), ou seja, de fabricação própria, e os 15 demais (B a P) classificados como linguiças industrializadas. Nas amostras de marcas industrializadas C, G, M e O detectou-se presença de *Campylobacter* spp.

Na tabela 2 observa-se variação expressiva da temperatura dos balcões de exposição e temperatura interna das linguiças obtidas no estudo. E esta variação entre um estabelecimento e outro pode ser observada nos gráfico de dispersão nas figuras 5 e 6.

Tabela 2. Faixas de temperatura dos balcões de exposição e das linguiças tipo frescal obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.

	Balcão	Linguiça
Temperatura média	$3,585 \pm 7,803$	$8,273 \pm 4,878$
Mínima	-17,6 °C	-2,5 °C
Máxima	23,6 °C	17,5 °C

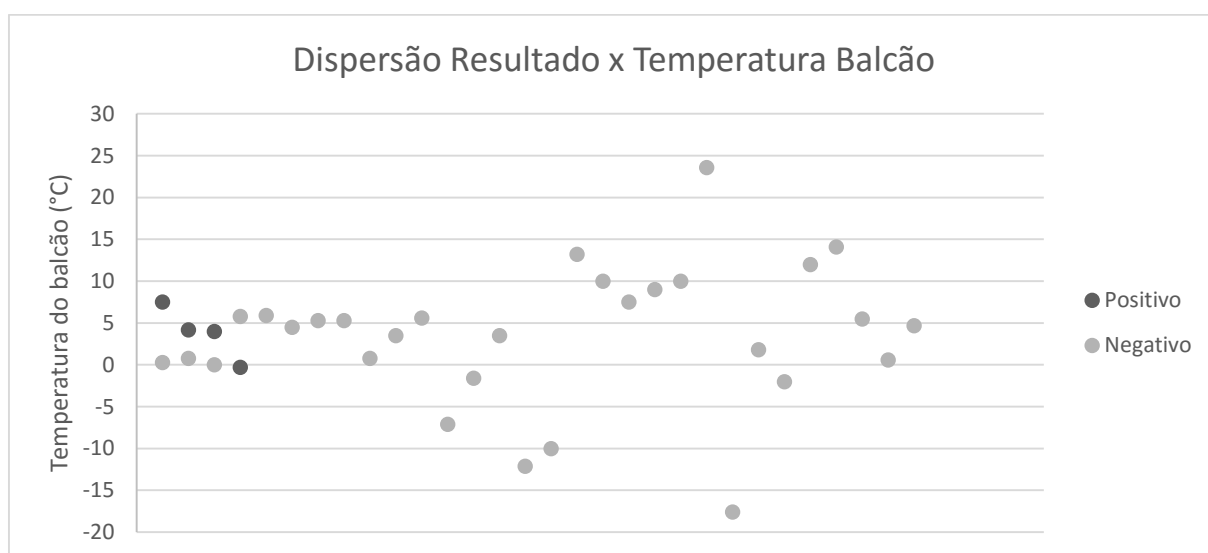


Figura 5. Temperatura do balcão de exposição das linguiças tipo frescal de açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.

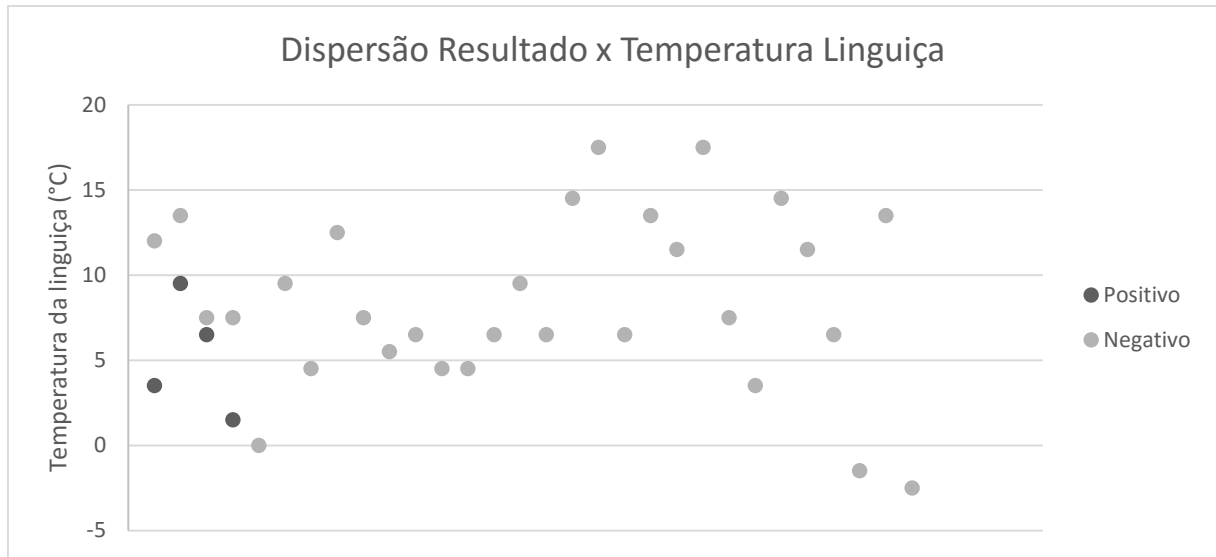


Figura 6. Temperatura das línguas tipo frescal no momento da coleta, obtidas em açougues de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.

Das sete regiões administrativas do município estudado, em apenas duas foram observadas amostras positivas para *Campylobacter* spp. (Figura 7). Destaca-se que estas apresentaram a maior frequência de açougues pesquisados, reflexo de maior densidade populacional nas regiões.

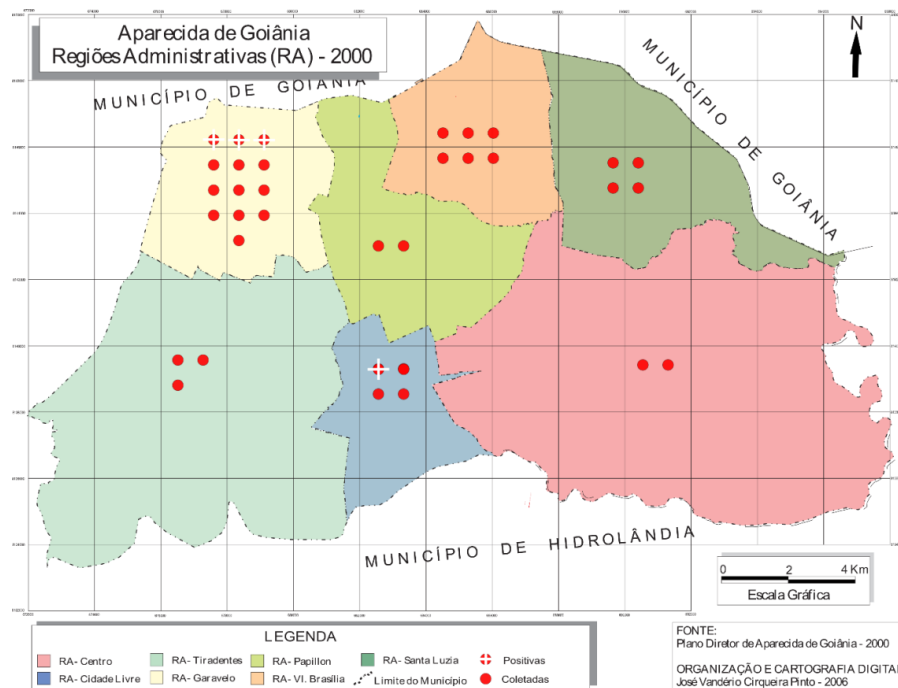


Figura 7. Distribuição dos açougues pesquisados e isolados de *Campylobacter* spp. nas línguas tipo frescal, por município de Aparecida de Goiânia, Goiás.

Nas amostras analisadas após o período de armazenamento sob congelamento, não foi detectada presença de *Campylobacter* spp. Apesar de ter sido observado crescimento característico nos meios de cultura utilizados e recomendados pela ISO 10272-1 (2006), nas provas confirmatórias o resultado foi negativo.

Todos os isolados de *Campylobacter* spp. obtidos apresentaram resistência às bases de antibióticos testadas, segundo os padrões EUCAST (2013) (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de resistência a antimicrobianos, segundo padrões EUCAST (2013), de isolados de *Campylobacter* em linguças tipo frescal obtidas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás, 2014.

Antimicrobianos testados	Isolados (resultados observados)		Padrões EUCAST	
	<i>C. coli</i> (n=3)	<i>C. lari</i> (n=1)	Sensível	Resistencia
Cefalotina	R	R	-	-
Ácido Nalidixico	R	R	≥ 20mm	≤ 19mm
Cloranfenicol	R	R	≥ 17mm	< 14mm
Eritromicina	R	R	≥ 20mm	< 20mm
Ciprofloxacina	R	R	≥ 26mm	< 26mm
Tetraciclina	R	R	≥ 30mm	< 30mm
Ceftriaxona	R	R	≥ 28mm	≤ 23mm

Todos os resultados são apresentados no formato de artigo científico em revista especializada na área (Apêndice A).

6 DISCUSSÃO

Considerando que 11,75% (n=4) das amostras foram positivas para *Campylobacter* pelo isolamento convencional (ISO, 2006) e que 75% (n=3) destas foram identificadas como *Campylobacter coli* e 25% (n=1) como *Campylobacter lari*, observa-se que tais resultados aproximam dos encontrados por Oliveira (2014), que, em seu estudo, obteve 14% de positividade para este micro-organismo em carcaça de frango, coletadas no estado de Goiás.

No mesmo Estado, Feistel et al. (2012) identificaram colônias características de *Campylobacter* em 25% das amostras de moela, fígado, coração e carcaça de frango, bem como em swabs de equipamentos de abatedouro. Dessas, com perfil aceitável no Kit API Campy, 50% foram identificadas como *C. coli*, 37,5% como *C. jejuni* e 12,5% como *C. lari*, assemelhando-se ao presente estudo, com maior quantidade de isolados de *C. coli*.

O isolamento de *C. lari* no Brasil ocorre esporadicamente, o que não é descrito em outros países do mundo, cuja maior frequência de isolados tem sido de *C. jejuni*, conforme apresentado na quadro 4. Moore e Matsuda (2002), pesquisadores do norte da Irlanda, consideram *C. lari* como uma espécie de rara ocorrência, sendo *C. jejuni* a espécie de maior incidência.

Essa variação nos resultados observado em todo o mundo pode ser devido a técnicas de amostragem, tipo de amostra (amostras de carne, ceco, swab de carcaça, entre outras), diferenças climáticas entre as estações do ano e ao método adotado pelo laboratório para o isolamento dessa bactéria (ANDRZEJEWSKA et al., 2015; ZENDEHBAD; ARIAN; ALIPOUR, 2013).

Williams e Oyarzabal (2012) reafirmam que *C. jejuni* é predominantemente mais isolado em aves no varejo. Porém, pesquisadores da Tailândia e África do Sul têm demonstrado predomínio no isolamento de *C. coli*, sugerindo que as taxas de isolamento de cada espécie são variáveis e dependentes de fatores regionais.

De acordo com resultados observados por Zendeabad, Arian e Alipour (2013), o isolamento bacteriano convencional não é 100% eficiente quanto à bactéria em questão. Estes autores observaram que, de 300 amostras coletadas e analisadas, nove foram consideradas negativas no isolamento. No entanto obtiveram resultado positivo quando submetidas a análise pela técnica de PCR. Essa técnica tem se mostrado mais eficiente na recuperação de *Campylobacter* spp. em relação ao método convencional ou técnicas baseadas em ensaios bioquímicos (ALMEIDA et al., 2011; MARINOU et al., 2012).

Quadro 4. Isolados de *Campylobacter* spp. e espécies em algumas regiões do mundo e em estados do Brasil, 2015 (revisão da autora).

Tipo de Produto/Nº. de amostras coletadas	Amostras positivas	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. spp.*</i>	Local	Referência
Produtos avícolas no varejo - 742 amostras	41,6%	62,8%	37,2%	-	-	Norte da Polônia	(ANDRZEJEWSKA et al., 2015)
Carne de aves - 300 amostras	49,7%	80,8%	19,3%	-	-	Iran	(ZENDEHBAD; ARIAN; ALIPOUR, 2013)
Carne de frango no varejo - 755 amostras	41%	66%	28%	-	6%	USA	(WILLIAMS; OYARZABAL, 2012)
Carcaça de frango e peito sem pele - 410 amostras	66,6%	-	-	-	-	Suécia	(HANSSON et al., 2015)
Preparações cárneas a base de frango - 656 amostras	48%	-	-	-	-	Bélgica	(SAMPERS et al., 2008)
Pele do pescoço, carcaça e intestino inteiro - 2880 amostras	17%	37,8%	60,8%	-	1,3%	Letônia	(KOVALENKO et al., 2014)
Ceco - 767 amostras	35,8%	75,6%	19,3%	-	5,1%	China	(CHEN et al., 2010)
Vários animais e fezes - 828 amostras	-	66%	-	-	-	São Paulo, Brasil	(SCARCELLI et al., 2005)
Sobrecoxa resfriada - 80 amostras	12,5%	84,6%	15,4%	-	-	São Paulo, Brasil	(CARVALHO et al., 2010)

Continua.

Quadro 4. Isolados de *Campylobacter* spp. e espécies em algumas regiões do mundo e em estados do Brasil, 2015 (revisão da autora). (Continuação)

Carcaça de frango congeladas - 100 amostras	14%	50%	25%	25%	-	Goiás, Brasil	(OLIVEIRA, 2014)
Moela, fígado, coração e carcaça de frango, swab de equipamento - 56 amostras	25%	21,4%	28,6%	7,14%	42,85%	Goiás, Brasil	(FEISTEL et al., 2012)
Carcaça de frango - 200 amostras	24%	20,4%	58,6%	13,8%	7,2%	Goiás, Brasil	(FEISTEL, 2013)
Carcaça de frango - 95 amostras	16,8%	93,8%	6,2%	-	-	Minas gerais, Brasil	(HUNGARO et al., 2015)
Carcaça de frango resfriada - 420 amostras	22,38%	58,5%	20,2%	-	21,3%	Minas gerais, Brasil	(MELO, 2012)
Fígado, moela, coração, pele, pescoço e carcaça - 16 amostras	93,7%	-	-	-	-	Pará, Brasil	(FREITAS; NORONHA, 2007)
Carcaça de frango - 30 amostras	93,3%	100%	-	-	-	Paraná, Brasil	(MAZIERO, 2007)
Fezes, penas, água de escaldagem - 288 amostras	5,2%	93,3%	6,67%	-	-	São Paulo, Brasil	(CORTEZ et al., 2006)
Ambiente de três frigoríficos - 120 amostras	50% - 83,3%	-	-	-	-	Goiás, Brasil	(ALMEIDA; REZENDE, 2013)

* Não foi possível identificar a espécie

Na tentativa de melhorar a recuperação de bactérias do gênero *Campylobacter* spp., foram utilizadas duas concentrações do Caldo Bolton para cada amostra. O resultado das análises demonstrou que não houve melhor recuperação de bactérias com a dupla concentração. Porém a amostra com resultado positivo em meio de dupla concentração não apresentou o mesmo resultado no meio simples e vice versa.

Melo (2012) utilizou dupla concentração de Caldo Bolton em suas análises e obteve como resultado 22,38% de amostras positivas, porém a intenção do trabalho não foi comparar a eficiência da concentração do caldo no resultado das amostras. É importante que trabalhos futuros pesquisem a relação entre recuperação de *Campylobacter* spp. em diferentes concentrações do meio de enriquecimento em uma maior quantidade de amostras para que seja possível um resultado mais conclusivo.

A coleta foi realizada em estabelecimentos das sete regiões administrativas da cidade. É possível observar, pelos mapas (Figura 1 e 7), que a maior concentração populacional encontra-se na região mais próxima ao município de Goiânia e foi nessa região que ocorreu o maior número de coletas de amostras em função da maior frequência de açougues cadastrados. Observa-se que a região Garavelo apresentou o maior número de estabelecimentos cadastrados, bem como maior número de amostras positivas. No entanto não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre as amostras positivas, visto que vieram de marcas e estabelecimentos diferentes.

É importante observar que as regiões com maior densidade populacional (Figura 1) foram também as regiões onde as amostras positivas foram obtidas, o que representa maior risco de contaminação da população.

Dentre as 16 marcas de linguiça analisadas, quatro amostras apresentaram contaminação por *Campylobacter* spp., conforme figura 8, sendo elas de indústrias de médio e grande porte.

Em um estudo realizado na Bélgica, em que se analisou a incidência de *Campylobacter* spp. em várias indústrias espalhadas pelo país, pode-se notar que empresas de maior porte apresentavam maior taxa de recuperação de amostras positivas. Isso foi relacionado às práticas aplicadas dentro destes estabelecimentos onde, devido à alta demanda de produtos à base de carne, não seria funcional que a matéria prima fosse congelada antes de seu processamento em linguiças e hambúrgueres. Essa prática ocorria sempre em empresas de pequeno porte que buscavam manter um estoque de produtos congelados, para evitar falhas na produção (SAMPERS et al., 2008). Esse estudo ainda relatou que 60% das empresas de grande porte e 22% das de pequenos porte apresentaram amostras contaminadas. Isso, no entanto, não

sinaliza que uma seja melhor que a outra, apenas sugere que o processo adotado pode influenciar na qualidade do produto em relação ao nível de contaminação por *Campylobacter* spp.

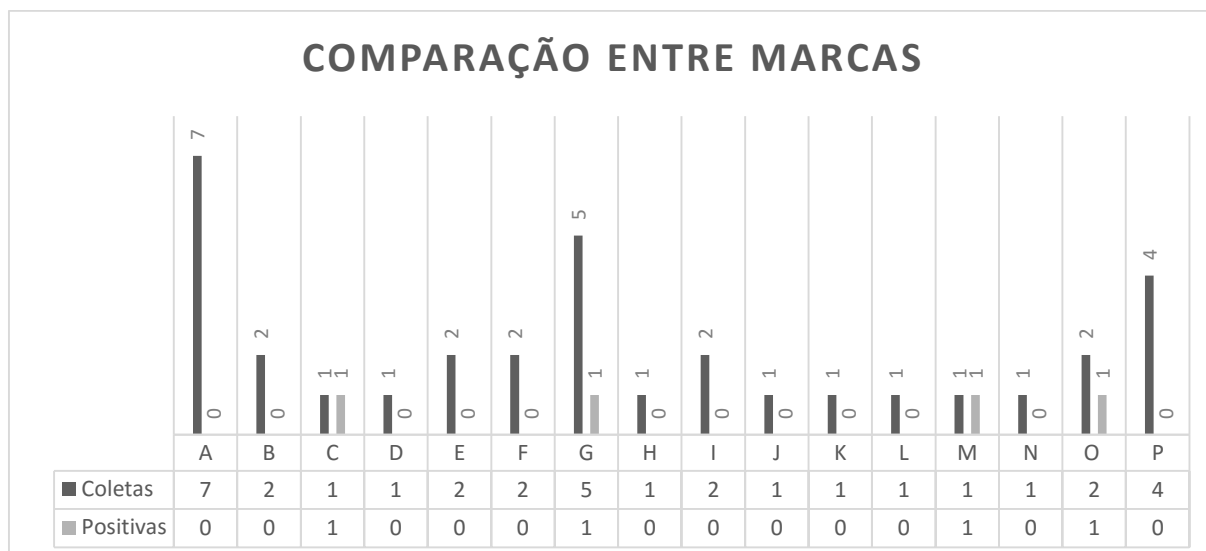


Figura 8. Número de amostras coletadas e isolados de *Campylobacter* spp. por marca de linguiça tipo frescal obtidas em açougues do município de Aparecida de Goiânia, Goiás.

De acordo com a RDC 216 da ANVISA (BRASIL, 2004), a temperatura de alimentos refrigerados, em exposição para comercialização, deve ser inferior a 4 °C. Esse critério é utilizado pelos órgãos de vigilância sanitária como parâmetro para avaliação de produtos refrigerados quando retirados da embalagem original. Assim, para alcançar este critério, o equipamento de exposição (balcão) deveria apresentar temperaturas abaixo deste valor para que se garantisse a manutenção da rede de frio necessária.

As linguiças coletadas, neste estudo, foram provenientes de vendas a granel nos estabelecimentos pesquisados, portanto deveriam obedecer a este critério. Considerando os resultados obtidos, em que a temperatura média dos balcões encontravam-se entre $3,58 \pm 7,80$ °C e, das linguiças entre $8,27 \pm 4,87$ °C, além da presença de outros produtos cárneos no mesmo balcão de exposição, o risco de contaminação cruzada seria eminente. Essa faixa de temperatura da linguiça não seria indicativo de sobrevivência do *Campylobacter* spp., pois essa bactéria não se desenvolve em temperaturas abaixo de 22 °C (BARRELL, 1984), entretanto, a temperatura de refrigeração observada não causou injúria letal a bactéria e, assim, a viabilidade em algumas amostras foi mantida e foi possível recuperar *Campylobacter* spp. em quatro delas, que apresentaram temperatura da linguiça entre 1,5 e 9,5 °C.

Das linguças submetidas a congelamento, nenhuma amostra foi positiva para *Campylobacter* spp. Devido ao reduzido número de amostras, com uma margem de erro de 5%, não é possível afirmar que o congelamento interfira estatisticamente nos resultados, porém, estudos relatam que o congelamento elimina ou diminui drasticamente a capacidade de recuperação da bactéria (BARRELL, 1984; RITZ et al., 2007; SAMPERS et al., 2008, 2010).

A sobrevivência de *Campylobacter* spp. ao congelamento gera um paradoxo, já que é uma bactéria considerada muito sensível a condições adversas. Ritz et al. (2007) avaliou o efeito do congelamento a -20 °C de 126 amostras inoculadas (sobre a pele, abaixo da pele e na musculatura) e percebeu que, na 1ª semana de congelamento, ocorreu um decréscimo de 1.9 log₁₀ na contagem de *Campylobacter* spp.; na 2ª semana, a diminuição na contagem foi de 1.3 log₁₀; e, a partir da 3ª semana, o número de sobreviventes permaneceu constante. Sampers et al. (2008) observaram que empresas que congelavam a matéria prima antes de encaminhá-la para a elaboração de produtos à base de carne obtinham menor índice de positividade no isolamento de *Campylobacter* spp.

Apesar da redução drástica de contagem dessa bactéria, quando se diminui a temperatura ou quando se adiciona sal e tempero à formulação, diminuindo também a faixa de atividade de água, uma fração da população total de *Campylobacter* spp. pode sobreviver na amostra, e é possível ou não ser recuperada em análises convencionais, dependendo do nível de injúria celular subletal. Portanto o congelamento não elimina o risco de infecção por essa bactéria, apenas diminui sua probabilidade (SAMPERS et al., 2008).

Na pesagem da amostra durante análise, foi observada presença de pele de frango na mistura da linguça, o que pode ter facilitado a sobrevivência dessa bactéria em um meio não propício devido a formulação da linguça, que tem como ingrediente obrigatório o cloreto de sódio (NaCl) (BRASIL, 2000).

Relatos demonstram dificuldade de sobrevivência de *Campylobacter* spp. em concentrações acima de 1,5% de NaCl, porém vários estudos tem demonstrado o contrário e tem sido isolado *Campylobacter* spp. em preparações com concentração superior a 2% deste produto (BARRELL, 1984; SAMPERS et al., 2010).

Hansson et al. (2015) observaram que a presença de pele nas amostras influenciou nos resultados encontrados. Foram coletadas 285 carcaças e analisadas em duas situações, amostras intactas com pele e amostras com a pele retirada assepticamente em laboratório, percebendo-se 68% e 5% de amostras positivas, respectivamente. Também foram coletadas amostras de peito sem pele e essas tiveram uma porcentagem de 63 % das amostras positivas, o que também indica que a retirada da pele no frigorífico resulta em contaminação cruzada.

Situação semelhante foi observada por (SAMPERS et al., 2008), que percebeu alta incidência de *Campylobacter* spp. em preparações cárneas com pele. Em alguns casos a pele está na preparação carne de hambúrguer e linguiça entre outras para dar características sensoriais à formulação.

Quanto ao perfil de susceptibilidade frente às bases de antibióticos testadas (EUCAST, 2013), todos os isolados de *Campylobacter* spp. obtidos apresentaram resistência a todos os antibióticos testados (Tabela 3). Tais resultados estão em acordo com alguns estudos que relatam multirresistência, ou seja, resistência a várias classes de antimicrobianos, e 100% de resistência para algumas bases de antibióticos relacionados no quadro 5.

Quadro 5. Resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp., *C. coli* e *C. jejuni* isolados na Letônia, China e Brasil, 2015 (revisão da autora).

País / Autor	Brasil	Letônia	Brasil	China
	(OLIVEIRA, 2014)	(KOVALENKO et al., 2014)	(BIASI et al., 2011)	(CHEN et al., 2010)
Multirresistência	100	67,2	41,7	90
Ácido Nalidixico	91,7 (<i>C. lari</i>)	87,9	100	98
Ceftriaxona	91,7	-	-	-
Ciprofloxacina	100	100	77,8	98
Clindamicina	-	-	77,8	13,9* ; 100**
Cloranfenicol	50	-	-	30,7* ; 3,8**
Doxiciclina	-	-	-	98
Enrofloxacin	-	-	-	98
Eritromicina	100	44,8	-	8,9* ; 100**
Estreptomicina	-	39,6	33,3	-
Gentamicina	-	-	44,5	92,3
Tetraciclina	100	77,6	100	100

* *Campylobacter jejuni*

** *Campylobacter coli*

Multirresistência a antimicrobianos exige maior atenção, visto que os antimicrobianos testados são aqueles de escolha para o tratamento de campilobacteriose, sendo os macrolídeos (Eritromicina) os mais comumente utilizado, seguido pelos fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) (HARIHARAN et al., 2009; LAZOU et al., 2014; ROŻYNEK et al., 2013). Em estudo realizado por ROŻYNEK et al. (2013), o aumento de resistência a eritromicina foi relacionado, na maior parte dos casos, com a mutação em um único ponto no rRNA, que é uma mutação comumente identificada em isolados resistentes a macrolídeos.

Pode-se observar resistência de todos os isolados ao ácido Nalidíxico. A sensibilidade a esse antibacteriano era considerada característica para identificação de espécie de acordo com a ISO 10272-1, publicada em 2006, embora já ter sido observada elevação na resistência na época de publicação. Alguns estudos já relatam 100% de resistência a essa substância, o que demonstra a emergência de isolados multirresistentes, o que está relacionado ao uso inadequado de antibióticos na produção animal e as mutações genéticas, o que tem aperfeiçoado os mecanismos de resistência dessa bactéria (DUARTE et al., 2014; HUNGARO et al., 2015; KOVALENKO et al., 2014).

Na Austrália, Polônia e Malásia, notou-se uma taxa de multirresistência de 54,2%, sendo o primeiro, o país que apresentou menor taxa de resistência do *Campylobacter* spp. a antimicrobianos, já que essa bactéria mostrou-se resistente apenas ao ácido Nalidixico e à Tetraciclina. Entretanto, as bactérias isoladas na Malásia apresentaram 60% de resistência a todos os antibióticos testados, exceto Florfenicol (WIECZOREK et al., 2013). Em Portugal, observou-se que isolados de *C. coli* apresentaram maior resistência a antimicrobianos que isolados *C. jejuni* (DUARTE et al., 2014). Nesse mesmo estudo, 86% das cepas isoladas eram resistentes a três ou mais bases testadas.

7 CONCLUSÕES

Apesar das características de susceptibilidade de *Campylobacter* spp. às variações do ambiente, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio, e as dificuldades inerentes ao isolamento, esta pesquisa conseguiu isolar espécies importantes em linguiças do tipo frescal, produto altamente consumido no Brasil.

Os isolados apresentaram perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados, o que torna evidente a necessidade de mais estudos para determinação dos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos de isolados de *Campylobacter* spp. no Brasil.

A utilização da técnica de conservação do produto pelo congelamento dificultou a recuperação das bactérias nas linguiças tipo frescal, considerando o isolamento nas mesmas amostras sob refrigeração.

Considerando a escassez de estudos desta natureza em Goiás, faz-se importante que outras investigações sejam desenvolvidas, em parcerias de órgãos de fiscalização sanitária de alimentos, com vistas a determinação de prevalência de contaminação de produtos alimentícios por este importante micro-organismo.

REFERÊNCIAS

ABIEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Pecuária Brasileira**, 2011.

ALMEIDA, T. L. DE; REZENDE, C. S. M. E C. S. M. E. ***Campylobacter* spp. em ambiente de abate de aves do Estado de Goiás: Identificação e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos.** Anais 63º Reuniao Anual SBPC. **Anais...**2013

ALMEIDA, T. L. DE; REZENDE, C. S. M. E; NICOLAU, E. S.; SOLA, M. C.; MESQUITA, S. Q. P. DE. **Comparação entre ensaio imunoenzimático VIDAS® *Campylobacter* e reação em cadeia pela polimerase em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas provenientes de abatedouros goianos.** Anais 63º Reuniao Anual SBPC. **Anais...**2011

ALTER, T.; BORI, A.; HAMED, A.; ELLERBROEK, L.; FEHLHABER, K. Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of *Campylobacter jejuni* in German style fermented turkey sausages. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 701–707, out. 2006.

ANDRZEJEWSKA, M.; SZCZEPANSKA, B.; SPICA, D.; KLAWE, J. J. Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. **Food Control**, v. 51, p. 190–194, 2015.

AQUINO, M. H. C.; FILGUEIRAS, A. L. L.; MATOS, R.; SANTOS, K. R. N.; FERREIRA, T.; FERREIRA, M. C. S.; TEIXEIRA, L. M.; TIBANA, A. Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Genotypes from Human and Animal Sources from Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 214–217, 2010.

BARRELL, R. A. E. The survival of *Campylobacter jejuni* in red meats stored at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 187–196, 1984.

BIASI, R. S.; FREITAS DE MACEDO, R. E.; SCARANELLO MALAQUIAS, M. A.; FRANCHIN, P. R. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 702–707, 2011.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99–108, 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº216, de 15 de setembro de 2004.** Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000.** Aprova os Regulamentos Técnicos de

Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. . 2000, p. 6.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, 2001.

CANER, V.; COKAL, Y.; CETIN, C.; SEN, A.; KARAGENC, N. The detection of hipO gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter* spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, p. 527–532, 2008.

CARVALHO, A. F. DE. **Deteção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças**. 2009. Dissertação (Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, 2009.

CARVALHO, A. F. DE; SILVA, D. M.; AZEVEDO, S. S.; PIATTI, R. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. Deteção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1054–1061, 2010.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preliminary FoodNet data on the incident of infection with pathogens transmitted commonly through food, 2011**, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html>>

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, v. 62, n. 15, p. 283–287, 2012.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2008. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries**, v. 62, n. 2, p. 1–34, 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). **Emerging infectious diseases**, 2014.

CHEN, X.; NAREN, G.-W.; WU, C.-M.; WANG, Y.; DAI, L.; XIA, L.-N.; LUO, P.-J.; ZHANG, Q.; SHEN, J.-Z. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. **Veterinary microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 133–9, 29 jul. 2010.

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; BÜRGER, K. P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, p. 307–310, 2006.

CRUZ, D. C.; MARTINEZ, B. M.; DESTRO, M. T. T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 125–206, 2008.

DUARTE, A.; SANTOS, A.; MANAGEIRO, V.; MARTINS, A.; FRAQUEZA, M. J.; CANIÇA, M.; DOMINGUES, F. C.; OLEASTRO, M. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 306–313, 2014.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Press Releases & News Stories: Reports shows *Campylobacter* cases in humans on the rise, while salmonellosis is decline; listeriosis remains of concern**, 2009.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, v. 10, n. 3, 2012.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. **EFSA Journal**, v. 9, n. 3, p. 2090, 2011.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**, 2013. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_Breakpoint_table_v_3.0.pdf>

FEISTEL, J. C. **Caracterização de *Campylobacter* spp. isoladas em carcaças de frango**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciencia Animal). Universidade Federal de Goiás, 2013.

FEISTEL, J. C.; SOLA, M. C.; MEDEIROS, N. X.; TRASSI, A. M. C.; MESQUITA, S. Q. P.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, C. S. M. DE. **Identificação e biotipificação de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de produtos avícolas** Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX (2012). **Anais...2012**

FICA, A.; SEELMANN, D.; PORTE, L.; EUGENIN, D.; GALLARDO, R. A case of myopericarditis associated to *Campylobacter jejuni* infection in the southern hemisphere. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 294–296, jun. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª edição ed.[s.l.] Artmed, 2013.

FREITAS, J. A.; NORONHA, G. N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 3–5, 2007.

GEORGES, S. O. **Qualidade microbiológica de Linguiças do tipo frescal e caracterização de isolados de *Escherichia coli***. 2014. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Universidade Federal de Goiás, 2014.

GONÇALVES, K. D. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I.; CHANO, L. D. J.; RIBEIRO, A. B. Pesquisa de *Campylobacter* spp em carnes de frango comercializadas na cidade de Campo Mourão - PR. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 211–216, 2012.

GOTTARDI, C. P. T. **Avaliação das condições higienico-sanitárias do ambiente de manipulação de produtos fatiados de Origem Animal de redes de Supermercados de Porto Alegre.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2006.

GUÈVREMONT, E.; LAMOUREUX, L.; WARD, P.; VILLENEUVE, S. Survival of *Campylobacter jejuni* on fresh spinach stored at 4 °C or 12 °C. **Food Control**, v. 50, p. 736–739, 2015.

HANSSON, I.; NYMAN, A.; LAHTI, E.; GUSTAFSSON, P.; ENGVALL, E. O. Associations between *Campylobacter* levels on chicken skin, underlying muscle, caecum and packaged fillets. **Food Microbiology**, v. 48, p. 178–181, 2015.

HARIHARAN, H.; SHARMA, S.; CHIKWETO, A.; MATTHEW, V.; DEALLIE, C. Antimicrobial drug resistance as determined by the E-test in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolates from the ceca of broiler and layer chickens in Grenada. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 32, n. 1, p. 21–8, jan. 2009.

HAUGHTON, P. N.; LYNG, J.; CRONIN, D.; FANNING, S.; WHYTE, P. Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of *Campylobacter* on raw chicken. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 147–51, out. 2012.

HUNGARO, H. M.; MENDONÇA, R. C. S.; ROSA, V. O.; BADARÓ, A. C. L.; MOREIRA, M. A. S.; CHAVES, J. B. P. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15–22, 2015.

HURD, S.; PATRICK, M.; HATCH, J.; CLOGHER, P.; WYMORE, K.; CRONQUIST, A. B.; SEGLER, S.; ROBINSON, T.; HANNA, S.; SMITH, G.; FITZGERALD, C. Clinical laboratory practices for the isolation and identification of *Campylobacter* in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites: baseline information for understanding changes in surveillance data. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54 Suppl 5, n. Suppl 5, p. S440–5, jun. 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas da População Residente no Brasil e Unidades da Federação com Data de Referência em 1º de Julho de 2013.** Ibge, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2014/estimativas_2014_TCU.pdf>

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** 6ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JENSEN, J. D.; LAWSON, L. G.; LUND, M. Systemic cost-effectiveness analysis of food hazard reduction – *Campylobacter* in Danish broiler supply. **European Journal of Operational Research**, v. 241, p. 273–282, 2015.

KOVALENKO, K.; ROASTO, M.; ŠANTARE, S.; BERZIŅŠ, A.; HÖRMAN, A. *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. **Food Control**, v. 46, p. 86–90, 2014.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R. DOS; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; MORAES, H. L. D. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. DO. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp isolated from broiler flocks. **Brazilian journal of microbiology publication of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 39, p. 738–740, 2008.

LAZOU, T.; HOUF, K.; SOULTOS, N.; DOVAS, C.; IOSSIFIDOU, E. *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 54–61, 3 mar. 2014.

MAGAJNA, B. A.; SCHRAFT, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. **Food Control**, v. 50, p. 45–50, 2015.

MARINOU, I.; BERSIMIS, S.; IOANNIDIS, A.; NICOLAOU, C.; MITROUSSIA-ZIOUVA, A.; LEGAKIS, N. J.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. FEB, p. 1–6, 2012.

MAZIERO, M. T. **Contaminação de Carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento.** [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2007.

MELO, A. A. M.; GERALDINE, R. M.; SILVEIRA, M. F. A.; TORRES, M. C. L.; MINAFRA-REZENDE, C. S.; FERNANDES, T. H.; DE OLIVEIRA, A. N. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1419–1427, 2012.

MELO, R. T. DE. **Fatores de Patogenicidade e potencial risco à saúde em *Campylobacter* spp isolados de carcaças de frango.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

MELO, R. T. DE; NALEVAIKO, P. C.; MENDONÇA, E. P.; BORGES, L. W.; FONSECA, B. B.; BELETTI, M. E.; ROSSI, D. A. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 227–231, set. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA.** Dados de surtos de DTA entre 2000 e 2014, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO DO BRASIL. **Renda maior e inflação zero disparam vendas de linguiça**, 2007. Disponível em: <<http://clipping.planejamento.gov.br/Noticias.asp?NOTCod=421322>>

MIRANDA, P. C.; BARRETO, N. S. E. Avaliação Higiênico-Sanitária de diferentes Estabelecimentos de Comercialização da Carne-de sol no Município de Cruz Das Almas-Ba. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 166–172, 2012.

MOORE, J. E.; MATSUDA, M. The history of *Campylobacter*: Taxonomy and nomenclature. **Irish Veterinary Journal**, v. 55, p. 495–501, 2002.

OLIVEIRA, J. J. DE. **Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e ovos comerciais**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, 2014.

PINTO, J. V. C. **Aparecida de Goiânia Regiões Administrativas.**, 2006. Disponível em: <https://observatoriogeogoiias.iesa.ufg.br/up/215/o/Aparecida_de_Goiânia_Regioes_administrativas.pdf>

RITZ, M.; NAUTA, M. J.; TEUNIS, P. F. M.; VAN LEUSDEN, F.; FEDERIGHI, M.; HAVELAAR, A. H. Modelling of *Campylobacter* survival in frozen chicken meat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 594–600, 2007.

ROLLINS, D. M.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, 1986.

ROSSI, L. P. R.; ALMEIDA, R. C. C.; LOPES, L. S.; FIGUEIREDO, A. C. L.; RAMOS, M. P. P.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 954–958, jun. 2011.

ROŻYNEK, E.; MAĆKIW, E.; KAMIŃSKA, W.; TOMCZUK, K.; ANTOS-BIELSKA, M.; DZIERŻANOWSKA-FANGRAT, K.; KORSACK, D. Emergence of macrolide-resistant *Campylobacter* strains in chicken meat in Poland and the resistance mechanisms involved. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n. 7, p. 655–60, 2013.

SAMPERS, I.; HABIB, I.; BERKVEN, D.; DUMOULIN, A.; ZUTTER, L. DE; UYTENDAELE, M. Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 297–303, 2008.

SAMPERS, I.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L.; DUMOULIN, A.; UYTENDAELE, M. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 147–53, 28 fev. 2010.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; HAKAKA, R.; MIYASHIRO, S.; DE CAMPOS FERNANDES, F. M.; CAMPOS, F. R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M. É.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains

isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 378–382, 2005.

SILVA, G. O.; CARVALHO, A. F. DE; MIYASHIRO, S.; PIATTI, R. M.; SCARCELLI, E. Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1–6, 2012.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAUJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 911–916, 2004.

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 472–477, 1995.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Five keys to safer food manual Zoonoses and Foodborne Disease**, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf>

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness.**, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int>>

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Salmonella and Campylobacter in chicken meat.**, p. 69, 2009.

WIECZOREK, K.; DYKES, G. A.; OSEK, J.; DUFFY, L. L. Antimicrobial resistance and genetic characterization of *Campylobacter* spp. from three countries. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 84–91, nov. 2013.

WILLIAMS, A.; OYARZABAL, O. A. Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 184, 2012.

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; FOLEY, S. L.; POWERS, J. H. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, n. 5, p. 285–305, set. 2005.

ZENDEHBAD, B.; ARIAN, A. A.; ALIPOUR, A. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from poultry meat in Khorasan province, Iran. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 724–727, ago. 2013.

ZENDEHBAD, B.; KHAYATZADEH, J.; ALIPOUR, A. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates of retail broiler meat in Iran. **Food Control**, v. 53, p. 41–45, 2015.

APÊNDICE A

Artigo a ser submetido ao periódico Food Control, Qualis A2 e fator de impacto 2.819.

Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* in chicken sausage and resistance profile

Abstract

In Brazil, the lack of data about Campylobacteriosis hinders a comparison with other countries and makes difficult the decision of combating the causative bacterium. Due to the high incidence of *Campylobacter* spp. in meat, main in poultry carcasses and by-products, this study aimed to isolate and identify these bacteria in chicken fresh sausage sampled in Brazil Midwest. Thirty-four samples were collected in the period from July to October, each one was subdivided into 68 sub-samples, half of the sub-samples were analyzed immediately, in fresh/chilled condition, and the other half were frozen for further analysis. In 11.65% of fresh samples were isolated *C. coli* and *C. lari*. Frozen samples showed negative results for *Campylobacter* spp. It also worked with a simple and double concentration of enrichment medium, recovering three positive samples in the simple one and a positive sample in the double. It was observed 100% resistance against the antibiotic tested basis. It is recommended more studies of this nature, with a greater number of samples; therefore, it is believed that they may evaluate the prevalence of this important microorganism in animal products in Brazil Midwest. Such investigations may provide important information for the National Program for Monitoring Prevalence and Bacterial Resistance in Chicken.

Keywords: *Campylobacter* spp. Poultry product. Antimicrobial resistance. Food microbiology.

Introduction

Campylobacter spp. are important for public health due to its high incidence in the world (Kuana *et al.*, 2008). There are about 25 species for *Campylobacter* genus, and the most related to foodborne disease are the thermophilic species: *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli* e *C. upsaliensis* (EFSA 2012), and the higher incidence of contamination are at the broiler carcasses due to the contact with intestinal contents or cross-contamination during slaughter (Zendehbad *et al.*, 2013). Even though *Campylobacter* spp. are sensitive to freezing temperature, some studies have shown that is possible to recover *Campylobacter* strains in frozen products (Barrell, 1984; Sampers *et al.*, 2008, 2010; Haughton *et al.*, 2012).

Brazil is considered the third major meat producer and the largest exporter (UBABEF 2014), so there is a concern about the microbiological quality of this meat. *Campylobacter* spp. had been isolated from broiler meat in all the countries with isolation rate among 12.5 and 25% of the broiler carcasses (Carvalho *et al.*, 2010; Biasi *et al.*, 2011; Feistel *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2012; Oliveira, 2014; Hungaro *et al.*, 2015).

Corresponding author: Sarah Inês Rodrigues Rosa. Address: Rua Emiliano Braga, nº 635 apto 1401 Ed. Luar do Campus, Várzea, Recife, Brazil. Zip code: 50670-380. Phone: +55 81 99303-4141. E-mail: sarahines.vet@gmail.com

Fresh sausage has a high growth rate of consumption in the country, due to its low cost and popularity. This sausage is an industrialized product, made from a mixture of minced meat and spices, in a natural or artificial casing, subject to appropriate technologic processes (BRASIL 2000; Rossi et al. 2011). Due to the intense handling in production, this product has a high risk of contamination. (Rossi *et al.*, 2011; Georges, 2014; Souza *et al.*, 2014).

The aim of this study was to isolate and identify *Campylobacter* spp. from industrialized fresh chicken sausage and “hand-made” commercialized at butcher shops, and evaluate the antimicrobial resistance of the isolates. We also seek to evaluate the incidence of this microorganism in frozen sausage.

Material and methods

The samples were collected from 34 butcher shop in Brazil Midwest, with the supervision of the city Department of Health Surveillance. The temperature of the sausage was measured with skewer type thermometer immediately after the collection. A total of 34 samples from chicken sausage, each one with about 200 grams, were divided into two subsamples, one subsample was analyzed fresh and the other was frozen for about eight weeks.

Microbiological analysis for isolation and identification of *Campylobacter* spp. followed the methodology provided by *International Organization for Standardization* (ISO 10272:1 2006), which provides the enrichment in Bolton broth at 1:10 dilution. All the samples were tested for simple and double broth concentration, and 10 grams of each sample were weighed and enriched in 90 mL of broth (simple and double concentration) for 37 °C/4h and then 41,5±1 °C/44±4h. After the enrichment, the samples were plated on modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (m-CCDA) and Columbia blood agar (CBA). The characteristic colonies were then examined for morphology, motility, microaerobic growth at 25 °C and aerobic growth at 41.5 °C, catalase and oxidase activity, sensitivity to nalidixic acid and cephalothin, hippurate and indoxyl acetate hydrolysis.

The isolates confirmed as *Campylobacter* thermophilic were submitted an antimicrobial susceptibility test by the disk diffusion method in Mueller-Hinton agar with 5% blood in microaerobic conditions. The antibiotic bases were chosen by their importance at the human and animal treatment and considered recent studies. The antimicrobial drugs tested were nalidixic acid, chloramphenicol, erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, and ceftriaxone. Susceptible isolates were determined according to the procedures of the *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (EUCAST 2013).

Fisher test was used for comparisons in order to determine if there were statistically significant differences at 95% level in the prevalence of *Campylobacter* between chilled and frozen sausage. Significant differences were considered when probability (p) was equal to or more than a risk ($p \geq 0.05$).

Results

From 34 fresh samples, 11.75% were positive for *Campylobacter* spp. From these, 75% were *C. coli* and 25% were *C. lari*. No positive samples were observed after the freezing process. Among double and simple concentration, 75% of the *Campylobacter* positive samples were enriched in simple concentration, and 25% in double. There was not a standard in the collected brand, which depended on the availability in the establishment, and 16 brands were collected. The temperature of the sausage during the collect varied from -2.5 to 17.5 °C (figure 1), and the positive samples were stored at the temperature from 1.5 to 9.5 °C. All the isolates were resistant for the antimicrobial bases tested (table 1).

Discussion

The result is resembling the observed by Oliveira (2014), which obtained 14% of positive samples for *Campylobacter* spp. from carcasses collected in Brazil Midwest. In the same state, FEISTEL et al. (2012) identified characteristic colonies in 25% of the samples (gizzard, liver, heart, and carcass swabs slaughterhouse equipment), and these colonies were identified as 50% *C. coli*, 37.5% *C. jejuni* and 12.5% as *C. lari*, which are similar to those found in this study with the largest number of isolates of *C. coli*.

In other countries, the isolation of *C. lari* is not described and most of the isolates have been led by *C. jejuni* (Chen et al., 2010; Williams and Oyarzabal, 2012; Zendehbad et al., 2013; Kovalenko et al., 2014; Andrzejewska et al., 2015). In Brazil, these species occur sporadically (Feistel et al., 2012; Oliveira, 2014), and they are considered of rare occurrence (Moore and MATSUDA, 2002).

The large difference shown in the results of these studies may be due to sampling techniques, sample type (meat samples, cecum, carcass swab and others), climatic effects such as climatic differences between the seasons, and the method adopted by the laboratory for the isolation of this bacteria (Zendehbad et al., 2013; Andrzejewska et al., 2015). These differences are related in the summary presented by Suzuki and Yamamoto (2009), that demonstrated the

prevalence of *C. jejuni* in the retail poultry in the world, been an exception in Thailand and South Africa.

The conventional isolation technique is not 100% effective for the *Campylobacter* spp. Zendehbad et al. (2013) observed that nine samples were considered negative in the isolation, but in the Polymerase chain reaction (PCR), those samples were positive for the bacteria. This technique has shown a better efficiency in the recovery of *Campylobacter* spp. compared to the conventional method or techniques based on biochemical tests.

It was observed that the establishments, from which the positive samples were obtained, were located in regions with high population density, which increases the risk of contamination of the population. Among the 16 brands collected, four have shown contamination by *Campylobacter* spp. between the positive ones, all they were from medium and large companies. According to Sampers et al. (2008), large companies had the biggest recovery rate of positive samples. It was related with the practices applied within the large and medium-sized establishment, due to the high demand for meat products, it was not functional that the raw material goes through a freezing period before processing in sausages and burgers, the practice which has always occurred in small companies, always seek to have a stock of frozen products to avoid failures in production. In the same study, it was found that 60% of the large companies had contaminated food against 22% of the small sizes companies. However, this does not mean, as explained by the author, that one is better than the other. It just means that the process adopted influences on product quality to the level of contamination by the bacteria.

The sausages collected in this study were derived from bulk sales in the establishments. The temperature of the sausages at the collect was 1.5 °C, 3.5 °C, 6.5 °C and 9.5°C. This sausage temperature range would not be indicative for the survival of *Campylobacter* spp. since this bacteria does not grow at temperatures below 22 °C (Barrell, 1984). However, the cooling temperature does not cause lethal injury to *Campylobacter* cells, the viability was maintained, and it was possible to recover positive samples.

No samples of the frozen sausages from this research were positive. Several studies report that freezing processes eliminates or drastically reduces the capacity of recovery the *Campylobacter* spp. (Barrell, 1984; Ritz et al., 2007; Sampers et al., 2008, 2010). Sampers et al. (2008) noted that companies that froze the raw material before forwarding it to the production of meat products obtained lower positivity rate on the isolation of *Campylobacter* spp. The survival of these bacteria to the freezing generates a paradox since this bacteria is considered very sensitive to adverse conditions. The effect of freezing at -20°C in inoculated

samples shows a decrease of 1.9 log₁₀ count of *Campylobacter* spp. in the first week, and after the third week, the number remains constant (Ritz *et al.*, 2007).

Although the drastic reduction of the bacteria counts at a lower temperature or at the addition of salt and spice to the formulation, a fraction of the total population of *Campylobacter* spp. survives, and they may be recovered in conventional analysis depending on the level of sub-lethal cell injury. Therefore the freezing does not eliminate the risk of infection by this bacteria, it only decreases it (Sampers *et al.*, 2008).

Characteristics of the *Campylobacter* spp. define the difficulty of survival in a concentration above 1.5% NaCl, however, reports demonstrate the opposite and have isolated this bacteria in meat preparation with a concentration above 2% NaCl (Barrell, 1984; Sampers *et al.*, 2010). At the samples analyzed in this work, it was observed the presence of skin of the sausage mixture and, Hansson *et al.* (2015) observed that skin presence on the samples demonstrates higher isolation of *Campylobacter* spp. A similar situation was observed by Sampers *et al.* (2008) in meat preparation with skin, wherein the skin addition has the purpose of giving sensory characteristics to the product.

All *Campylobacter* isolates were resistant to all tested antimicrobial bases, showing multidrug resistance. This profile of multidrug resistance have been related in several studies (Chen *et al.*, 2010; Biasi *et al.*, 2011; Wieczorek *et al.*, 2013b; Kovaļenko *et al.*, 2014; Oliveira, 2014), and it has been associated with the indiscriminate use of antibiotics in veterinary therapy and points mutations in the genetic base of the bacteria (Bolton *et al.*, 2013; Rożynek *et al.*, 2013; Amar *et al.*, 2014).

All isolates were resistant to nalidixic acid, which is used to identify the species of *Campylobacter* spp. in accordance with ISO 10272-1 (2006). Some reports show 100% resistance to this antibiotic, what demonstrate the resistant *Campylobacter* strains emergence (Duarte *et al.*, 2014; Kovaļenko *et al.*, 2014; Hungaro *et al.*, 2015).

In Australia, Poland, and Malaysia, there has been a multidrug resistance rate of 54.2%. Australia is the one that shows the least resistance rate since the bacterium was resistant only to nalidixic acid and tetracycline. However, the bacteria isolate in Malaysia showed 60% of resistance to all antibiotic tested except Florfenicol (Wieczorek *et al.*, 2013a). In Portugal, it was observed that isolates of *C. coli* showed higher resistance to antimicrobials than *C. jejuni* isolates, and 86% were resistant to three or more tested basis. (Duarte *et al.*, 2014)

This situation of multidrug resistance generates a great concern, as the antimicrobial tested are those of choice for the treatment of Campylobacteriosis, being the macrolides

(erythromycin) the most commonly used, followed by fluoroquinolones (ciprofloxacin) (Hariharan *et al.*, 2009; Rożynek *et al.*, 2013; Lazou *et al.*, 2014).

Conclusions

Despite *Campylobacter* spp. features susceptibility to environmental variations (temperature, nutrients availability and oxygen concentration) and the difficulties of isolation, this study demonstrated the presence of *C. coli* and *C. lari* in fresh sausages, a product that has a high rate of consumption in Brazil. The isolates had a multiresistant profile to antibiotics, which makes clear the need for further studies to determine the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in Brazil. The use of freezing preservation technique hindered the recovery of bacteria in fresh sausage, considering the isolation in the same samples under refrigeration. Although the positive result, it is important more study about these bacteria in fresh sausage to determinate the prevalence, contributing to improvements on the health of the population, since campylobacteriosis is not a reportable disease in Brazil and the available epidemiological data is very limited.

Funding

This investigation was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação, Brazil, who provides a fellowship to Sarah Inês Rodrigues Rosa.

Acknowledgements

This project was conducted in partnership with the Department of Health Surveillance, Brazil.

References

- Amar C, Kittl S, Spreng D, et al. Genotypes and antibiotic resistance of canine *Campylobacter jejuni* isolates. *Vet Microbiol* 2014, **168**: 124–30.
- Andrzejewska M, Szczepanska B, Spica D, et al. Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. *Food Control* 2015, **51**: 190–194.
- Barrell R a. E. The survival of *Campylobacter jejuni* in red meats stored at different temperatures. *Int J Food Microbiol* 1984, **1**: 187–196.
- Biasi R S, Freitas de Macedo R E, Scaranello Malaquias M A, et al. Prevalence, strain

identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. *Food Control* 2011, **22**: 702–707.

Bolton DJ, Patriarchi A, Fox Á, et al. A study of the molecular basis of quinolone and macrolide resistance in a selection of *Campylobacter* isolates from intensive poultry flocks. *Food Control* 2013, **30**: 222–226.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. Diário Oficial da União* 2000, 6.

Carvalho A F, Silva D M, Azevedo S S, et al. Detecção dos genes da toxina citotetal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq Bras Med Vet Zoo* 2010, **62**: 1054–1061.

Chen X, Naren G-W, Wu C-M, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet microbiol* 2010, **144**: 133–9.

Duarte A, Santos A, Manageiro V, et al. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int J Antimicrob Ag* 2014, **44**: 306–313.

EFSA. European Food Safety Authority. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, **10**.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2013,

Feistel J C, Sola M C, Medeiros N X, et al. Identificação e biotipificação de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de produtos avícolas. In *Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX (2012)* 10903–10907.

Georges S O. Qualidade microbiológica de Linguiças do tipo frescal e caracterização de isolados de *Escherichia coli*. *Universidade Federal de Goiás* 2014.

Hansson I, Nyman A, Lahti E, et al. Associations between *Campylobacter* levels on chicken skin, underlying muscle, caecum and packaged fillets. *Food Microbiol* 2015, **48**: 178–181.

Hariharan H, Sharma S, Chikweto A, et al. Antimicrobial drug resistance as determined by the E-test in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolates from the ceca of broiler and layer chickens in Grenada. *Comp immunol microb* 2009, **32**: 21–8.

Haughton PN, Lyng J, Cronin D, et al. Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of *Campylobacter* on raw chicken. *Food Microbiol* 2012, **32**: 147–51.

Hungaro H M, Mendonça R C S, Rosa V O, et al. Low contamination of *Campylobacter* spp.

on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control* 2015, **51**: 15–22.

ISO. International Organization for Standardization. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. 2006.

Kovaļenko K, Roasto M, Šantare S, et al. *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. *Food Control* 2014, **46**: 86–90.

Kuana S L, Santos L R, Rodrigues L B, et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp isolated from broiler flocks. *Brazilian journal of microbiology publication of the Brazilian Society for Microbiology* 2008, **39**: 738–740.

Lazou T, Houf K, Soultos N, et al. *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance. *Int J Food Microbiol* 2014, **173**: 54–61.

Melo A A M, Geraldine R M, Silveira M F A, et al. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012, **43**: 1419–1427.

Moore JE, MATSUDA M. The history of *Campylobacter*: Taxonomy and nomenclature. *Irish Vet J* 2002, **55**: 495–501.

Oliveira J J. Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e ovos comerciais. Universidade Federal de Goiás 2014.

Ritz M, Nauta M J, Teunis P F M, et al. Modelling of *Campylobacter* survival in frozen chicken meat. *J Appl Microbiol* 2007, **103**: 594–600.

Rossi LPR, Almeida RCC, Lopes LS, et al. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. *Food Control* 2011, **22**: 954–958.

Rożynek E, Maćkiw E, Kamińska W, et al. Emergence of macrolide-resistant *Campylobacter* strains in chicken meat in Poland and the resistance mechanisms involved. *Foodborne pathogens and disease* 2013, **10**: 655–60.

Sampers I, Habib I, Berkvens D, et al. Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. *Int J Food Microbiol* 2008, **128**: 297–303.

Sampers I, Habib I, De Zutter L, et al. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int J Food Microbiol* 2010, **137**: 147–53.

Souza M, Pinto FGS, Bona EAM, et al. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* 2014, **18**: 107–112.

Suzuki H, Yamamoto S. 2009. Campylobacter contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. *Food Control* 2009, **20**: 531–537.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. 2014. Relatório Anual, São Paulo, Brasil.

Wieczorek K, Denis E, Lynch O, Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of Campylobacter isolated from cattle in Polish slaughterhouses. *Food Microbiol* 2013a, **34**: 130–136.

Wieczorek K, Dykes G a., Osek J, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of Campylobacter spp. from three countries. *Food Control* 2013b, **34**: 84–91.

Williams A, Oyarzabal O a. Prevalence of Campylobacter spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. *BMC Microbiol* 2012, **12**: 184.

Zendehbad B, Arian AA, Alipour A. Identification and antimicrobial resistance of Campylobacter species isolated from poultry meat in Khorasan province, Iran. *Food Control* 2013, **32**: 724–727.

ANEXO 1

Normas para submissão de artigo ao periódico escolhido.



Guide for authors

Submit your paper

Track your paper

Order journal

View articles

Abstracting and indexing

Editorial board

Browse journals > Food Control > Guide for authors

Guide for Authors

 Author information pack

INTRODUCTION

- Types of paper
- Contact details for submission

BEFORE YOU BEGIN

- Ethics in publishing
- Conflict of interest
- Submission declaration and verification
- Changes to authorship
- Copyright
- Role of the funding source
- Funding body agreements and policies
- Open access
- Language (usage and editing services)
- Submission

• Referees

PREPARATION

- Use of word processing software
- Article structure
- Essential title page information
- Abstract
- Highlights
- Keywords
- Chemical compounds
- Abbreviations
- Acknowledgements
- Units
- Database linking
- Math formulae

- Footnotes
- Artwork
- Tables
- References
- Video data
- AudioSlides
- Supplementary material
- Interactive Phylogenetic Trees
- Submission checklist

AFTER ACCEPTANCE

- Use of the Digital Object Identifier
- Online proof correction
- Offprints

AUTHOR INQUIRIES



FOOD CONTROL

An official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0956-7135

DESCRIPTION

Food Control is an international journal that provides essential information for those involved in food safety and process control.

Food Control covers:

- Microbial **food safety** and **antimicrobial** systems
- **Mycotoxins**
- Hazard analysis, **HACCP** and food safety objectives
- **Risk assessment**, including microbial risk assessment
- **Quality assurance** and control
- Good **manufacturing** practices
- Food **process systems** design and control
- Food **Packaging**
- Rapid methods of **analysis** and **detection**, including sensor technology
- **Environmental control** and safety
- **Codes** of practice, **legislation** and international **harmonization**
- Consumer issues
- **Education**, training and research needs.

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

All managers, scientists, technologists, and legislators working in the food industry today.

IMPACT FACTOR

2013: 2.819 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

Bulletin of the International Institute of Refrigeration
CAB Health
Current Contents
Food Safety Microfile
FSTA (Food Science and Technology Abstracts)
Research Alert
SCISEARCH
Science Citation Index
CAB Abstracts
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

G. Campbell-Platt, Berkshire, UK

Editor, North America and Asia/Pacific

J.J. Jen, California Polytechnic State University - San Luis Obispo, San Luis Obispo, California, USA

Editor, Europe and South America

R. Greiner, Max Rubner-Institut (MRI), Karlsruhe, Germany

Editorial Board Members

L. Anelich, Anelich Consulting, Pretoria, South Africa
A.A.G. Candlish, Glasgow Caledonian University, Glasgow, Scotland, UK
W. Chen, Jiangnan University, Jiangsu, China
P. V. Gawande, Kane Biotech Inc, Winnipeg, Manitoba, Canada
A. Gomes da Cruz, Federal Institute of Education, Rio de Janeiro, Brazil
R. Goodrich, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
C. T. Ho, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA
B. Jarvis, Ross Biosciences Ltd, Ross-on-Wye, UK
D.J. Jukes, University of Reading, Reading, UK
F-K. Lücke, Fulda University of Applied Science, Fulda, Germany
S. Mortimore, Land O'Lakes Inc, Arden Hills, Minnesota, USA
A. Pacin, Teresa Benedicta de la Cruz, Lujan, Argentina
A. Pisula, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw
P. Rao, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian, China
Q. Rao, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA
G.L. Robertson, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia
W.E.L. Spieß, Max-Rubner-Institut; Federal Institute for Nutrition, Karlsruhe, Germany
J. Weng, JBT Corporation, Madera, California, USA
R.J. Winger, Massey University, Albany, New Zealand
A. Wu, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China
D. Zhang, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Control is an international journal that provides essential information for those involved in food safety and process control.

Food Control covers:

Microbial food safety and antimicrobial systems
Mycotoxins
Hazard analysis, HACCP and food safety objectives
Risk assessment, including microbial risk assessment
Quality assurance and control
Good manufacturing practices
Food process systems design and control
Food Packaging
Rapid methods of analysis and detection, including sensor technology
Environmental control and safety
Codes of practice, legislation and international harmonization
Consumer issues
Education, training and research needs.

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

Types of paper

Original high-quality research papers (preferably no more than 7000 words, including tables and illustrations). Major review articles, up to 10,000 words
Short communications of up to 3000 words (not including references), describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. Short reviews on topical subjects, up to 6000 words. Comment articles not exceeding 2000 words. Authoritative position papers from expert groups are also welcome.

Food Control also publishes book reviews, Letters to the Editor, conference reports and a calendar of forthcoming events.

The Editor-in-Chief has the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) of insufficient novelty for a wide international readership; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

All contributions deemed suitable for review are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

Contact details for submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal <http://ees.elsevier.com/foodcont> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingolity>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Every page of the manuscript should be numbered. Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript, not per page.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Mathematical and technical settings

Use the appropriate number of significant figures to express your data - they should be justifiable and reflect the necessary level of accuracy of the method. A normal maximum should be 3 - e.g. 37.1, 2.53). Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions (not necessarily for publication) will help the editor. Type mathematical equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols is as follows: italic (indicated by underlining); constants, roman type; matrices and vectors, bold type (indicated by wavy underlining).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments

in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. For more information please see <http://www.elsevier.com/phylogenetictrees>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's

WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>