REVISTA BIO CIENCIAS
http://revistabiociencias.uan.mx
https://doi.org/10.15741/revbio.07.e698
ISSN 2007-3380

Original Article/Artículo Original

Use of Membrane Filtration for the Recovery of *Campylobacter* from Raw Chicken Carcasses Purchased at Retail Markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico

Uso de filtración por membrana para la recuperación de *Campylobacter* de muestras de pollo crudo provenientes de supermercados locales en Culiacán, Sinaloa, México

Soto Beltrán, M.[1], Quiñones, B.[2], Ibarra Rodríguez, A.[1], Amézquita-López, B. A.[1].*

[1]Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria S/N, Ciudad Universitaria, C.P.80040, Culiacán, México.
[2]United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service, Western Regional Research Center, Produce Safety and Microbiology Research Unit, Albany, CA 94710 USA.

Cite this paper/Como citar este artículo: Soto Beltrán, M., Quiñones, B., Ibarra Rodríguez, A., Amézquita-López, B. A. (2020). Use of Membrane Filtration for the Recovery of *Campylobacter* from Raw Chicken Carcasses Purchased at Retail Markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 7, e698. doi: https://doi.org/10.15741/revbio.07.e698

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* are responsible for human gastroenteritis worldwide, and the consumption of raw and undercooked poultry contributes to human infections. The present study examined the presence of *C. jejuni* and *C. coli* from retail chicken carcasses, purchased from local markets in the Culiacan Municipality in Sinaloa, Mexico. To improve the recovery of *Campylobacter*, the package liquid from the raw chicken carcasses was subjected to membrane filtration after an overnight enrichment under microaerophilic conditions. The presence of *C. jejuni* and *C. coli* was further determined by PCR amplification of the *lpxA* gene. Presumptive *Campylobacter* colonies

Article Info/Información del artículo
Received/Recibido: March 11st 2019.
Accepted/Aceptado: September 27th 2019.
Available on line/Publicado: October 11st 2019.

RESUMEN

Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli* son responsables del mayor número de gastroenteritis humana a nivel mundial, y el consumo de carne de pollo crudo y poco cocido contribuye al mayor número de infecciones humanas. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en pollos crudos provenientes de supermercados locales en el Municipio de Culiacán, Sinaloa, México. Para incrementar la recuperación de *Campylobacter*, se utilizó el líquido contenido en el paquete de pollo crudo y se sometió a filtración por membrana seguido de enriquecimiento durante toda la noche en condiciones microaerófilas. La presencia de *C. jejuni* y *C. coli* se determinó mediante la amplificación por PCR del gen *lpxA*. Colonias presuntivas de *Campylobacter* fueron aisladas del 43 % (13/30) de las muestras analizadas, las cuales fueron adquiridas del 64 % (7/11) de los supermercados seleccionados. Los estudios de genotipificación detectaron *C. jejuni* en el 33.3 % (10/30) de las muestras. Este estudio identificó por primera vez la

Corresponding Author:
Soto Beltrán, M., Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, 80040 México. Email: jsotobel@uas.edu.mx (M.S.B.); bamezquita@uas.edu.mx (B.A.A.L.).

were recovered from 43 % (13/30) of the chicken carcasses purchased from 64 % (7/11) of the retail markets examined. Genotyping assays detected *C. jejuni* in 33.3 % (10/30) of the carcasses examined. This study identified for the first time *C. jejuni* in raw chicken carcasses in Northwestern Mexico and provided valuable information for monitoring *Campylobacter* in retail meats.

KEY WORDS

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli,* poultry, foodborne pathogen, food safety.

Introduction

Campylobacter species are responsible for the highest percentage of gastroenteritis worldwide and are found in the intestinal track of domestic animals (Silva *et al*., 2011; Kaakoush *et al*., 2015; Pintar *et al*., 2015; Scallan *et al*., 2015). The most frequently isolated and reported species in humans with gastroenteritis are *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (Silva *et al*., 2011; Noormohamed & Fakhr, 2013; Kaakoush *et al*., 2015). The ability of both species to colonize and survive in a wide variety of animal species and habitats makes it challenging to control these foodborne pathogens (Epps *et al*., 2013). A large portion of *Campylobacter* infections has been attributed to the consumption of contaminated raw or undercooked poultry, unpasteurized milk or dairy products, untreated water, as well as direct contact with farm animals (Smole Možina & Uzunović-Kamberović, 2005; Domingues *et al.,* 2012; Pintar *et al*., 2015). Additionally, malpractices during handling, cooking, or post-cooking storage of poultry meat products may contribute to campylobacteriosis. *C. jejuni* and *C. coli* can lead to campylobacteriosis, an infection characterized with diarrhea, cramps, abdominal pain and fever. The diarrhea may be bloody and can be accompanied by nausea and vomiting (Domingues *et al*., 2012; CDC (Centers for Disease Control & Prevention), 2015; Kaakoush *et al*., 2015; Skarp *et al*., 2016). The infection usually lasts about one week. In severe cases of *C. jejuni* infections, some individuals may develop the autoimmune neuropathies, Guillain-Barré or Miller Fischer syndromes, and reactive arthritis

presencia de *C. jejuni* en pollo crudo en el Noroeste de México y proporcionó información valiosa para el monitoreo de *Campylobacter* en muestras de carnes.

PALABRAS CLAVE

Campylobacter jejuni, *Campylobacter coli,* aves de corral, patógenos trasmitidos por alimentos, seguridad alimentaria.

Introducción

Las especies de *Campylobacter* son responsables del mayor porcentaje de gastroenteritis en todo el mundo y se encuentran en la vía intestinal de los animales domésticos (Silva *et al*., 2011; Kaakoush *et al*., 2015; Pintar *et al*., 2015; Scallan *et al*., 2015). Las especies aisladas y reportadas con mayor frecuencia en humanos con gastroenteritis son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (Silva *et al*., 2011; Noormohamed & Fakhr, 2013; Kaakoush *et al*., 2015). La capacidad de ambas especies para colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de especies y hábitats animales dificulta el control de estos patógenos transmitidos por alimentos (Epps *et al*., 2013). Una gran parte de las infecciones por *Campylobacter* se ha atribuido al consumo de aves de corral contaminadas, crudas o poco cocidas, leche no pasteurizada o productos lácteos, agua no tratada, así como el contacto directo con animales de granja (Smole Možina & Uzunović-Kamberović, 2005; Domingues *et al.,* 2012; Pintar *et al*., 2015). Además, las malas prácticas durante el manejo, la cocción o el almacenamiento posterior a la cocción de productos cárnicos de aves de corral pueden contribuir a la campilobacteriosis. *C. jejuni* y *C. coli* pueden desarrollar campilobacteriosis, una infección caracterizada por diarrea, calambres, dolor abdominal y fiebre. La diarrea puede ser sanguinolenta y puede ir acompañada de náuseas y vómitos (Domingues *et al.,* 2012; CDC (Centers for Disease Control & Prevention), 2015; Kaakoush *et al.,* 2015; Skarp *et al*., 2016). La infección generalmente dura aproximadamente una semana. En casos severos de infecciones por *C. jejuni*, algunas personas pueden desarrollar neuropatías autoinmunes, síndromes de Guillain-Barré o Miller Fischer, y en algunos casos artritis reactiva (Epps *et al*., 2013; Kaakoush *et al*., 2015; Skarp *et al*., 2016).

Se ha documentado la importancia de algunos mecanismos de virulencia implicados en conferir a *Campylobacter* la capacidad de causar enfermedades en humanos. En

in some instances (Epps *et al.*, 2013; Kaakoush *et al.*, 2015; Skarp *et al.*, 2016).

The importance of some virulence mechanisms, implicated in conferring *Campylobacter* an ability to cause disease in humans, has been documented. In particular, flagella-mediated motility, bacterial adherence to intestinal mucosa, and the ability to produce toxins have been identified as clinically-relevant phenotypes (van Vliet *et al.*, 2001; Dasti *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). The genes coding for flagellin and cytolethal distended toxin are considered to be the primary and defining virulence and toxin factors contributing to campylobacteriosis (van Vliet *et al.*, 2001; Poly & Guerry, 2008; Silva *et al.*, 2011).

Chicken meat is a nutritious, healthy food since it's an excellent source of protein, vitamins, and minerals and is also low in fat and cholesterol when compared to other meats (Skarp *et al.*, 2016). In Mexico, the popularity of chicken meat is due to sensory and dietary reasons as well as economic considerations. Chicken continues to be one of the preferred and most affordable animal proteins in Mexico for the low and middle-income population (Hernández & Parrish, 2017). Among the principal chicken producing states in northern and central Mexico, the poultry sector has significantly increased in the last decades and is expected to continue growing (Salazar *et al.*, 2005; Hernández & Parrish, 2017). This increased consumption of poultry products has led consequently to an increase in human foodborne disease (Corry & Atabay, 2001; Hussain *et al.*, 2007; Zaidi *et al.*, 2012; Miri *et al.*, 2014).

A limited number of published reports examined *Campylobacter* spp. in raw poultry meat in Mexico. In particular, a study conducted in Guadalajara in central Mexico showed that a total of 33 % of raw chicken thighs were found to be positive for *Campylobacter* spp., and genotyping assays confirmed that 50 % of the isolates were *C. coli* (Castillo-Ayala *et al.*, 1993). The most extensive survey examining the presence of *Campylobacter* spp. in samples from municipal markets and butcheries in multiple cities in Mexico revealed that this foodborne pathogen was found to be present in 58.3 % of raw chicken meat and in 93.6% of chicken intestine samples, indicating a higher percentage when compared to other meats, such as pork or beef samples (Zaidi *et al.*, 2012). More recently, *Campylobacter* spp.

particular, la motilidad mediada por flagelos, la adherencia bacteriana a la mucosa intestinal y la capacidad de producir toxinas han sido identificados como fenotipos clínicamente relevantes (van Vliet *et al.*, 2001; Dasti *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Los genes que codifican la toxina distendida de flagelina y citoletal se consideran los principales factores determinantes en la virulencia y toxicidad que contribuye a la campilobacteriosis (van Vliet *et al*., 2001; Poly & Guerry, 2008; Silva *et al.*, 2011).

La carne de pollo es un alimento nutritivo y saludable, ya que es una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales, y también es baja en grasas y colesterol en comparación con otras carnes (Skarp *et al*., 2016). En México, la popularidad de la carne de pollo se debe a razones sensoriales y dietéticas, así como a consideraciones económicas. El pollo sigue siendo una de las proteínas animales preferidas y más accesibles en México por la población de bajos y medianos ingresos (Hernández & Parrish, 2017). Entre los principales estados productores de pollo en el Norte y Centro de México, el sector avícola ha aumentado significativamente en las últimas décadas y se espera que continúe creciendo (Salazar *et al*., 2005; Hernández & Parrish, 2017). Este aumento en el consumo de productos avícolas ha contribuido con un aumento en las enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos (Corry & Atabay, 2001; Hussain *et al*., 2007; Zaidi *et al*., 2012; Miri *et al*., 2014).

Un número limitado de estudios publicados determinó la presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de aves de corral en México. En particular, un estudio realizado en Guadalajara, en el Centro de México, demostró que el 33 % de los muslos de pollo crudos resultaron positivos para *Campylobacter* spp., y los análisis de genotipificación confirmaron que el 50 % de los aislamientos fueron *C. coli* (Castillo-Ayala *et al*., 1993). La encuesta más extensa en determinar la presencia de *Campylobacter* spp. en muestras de mercados municipales y carnicerías de varias ciudades de México, demostró la presencia de este patógeno alimentario en el 58.3 % de la carne de pollo cruda y en el 93.6 % de las muestras de intestino de pollo, lo que indica un porcentaje más alto en comparación con otros carnes, como carne de cerdo o de res (Zaidi *et al*., 2012). Recientemente, *Campylobacter* spp. se detectó en el 74 % y el 89 % de pollo fresco y congelado al por menor, respectivamente, los cuales fueron adquiridos en mercados locales en el estado de Durango, Norte de México (Rodríguez Ceniceros *et al*., 2016).

was detected in 74 % and 89 % of fresh and frozen retail chicken, respectively, purchased at food markets in the state of Durango in northern Mexico (Rodríguez Ceniceros *et al.*, 2016).

For the effective isolation and detection of *Campylobacter* from food or environmental samples, methodologies employ the use of a variety of enrichment media in conjunction with the incorporation of antibiotics to reduce microbial flora and promote the growth and isolation of campylobacters when present in low numbers (Man, 2011; Kaakoush *et al.,* 2015). By taking advantage of the increased motility of campylobacteria, the use of a membrane filtration protocol has proven to effectively recover campylobacteria from clinical, environmental and food samples (Lastovica & Le Roux, 2000; Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2017).

Given that the consumption of poultry meat and its processed products are of public health significance, the objective of the present study was to identify the presence of *C. jejuni* and *C. coli* from chicken meat sold at the retail markets in the metropolitan Culiacan Municipality in Sinaloa, one of the states with significant chicken production industry in Mexico (Hernández & Parrish, 2017). To achieve this goal, a membrane filtration method was employed to achieve an efficient recovery of campylobacters from food samples. Currently, there is very limited information on the levels of *C. jejuni* and *C. coli* in retail chicken meat products sold at retail markets in this region in northwestern Mexico; therefore, the results from this study will aid in the development of surveillance measures to improve food safety and quality among consumers in this agricultural region in Sinaloa, Mexico.

Material and Methods

Sampling

A total of thirty whole chicken carcasses were purchased from eleven different retail markets in the central part of the metropolitan city of Culiacan in the state of Sinaloa, Northwestern Mexico from February to April 2016 (Figure 1). The retail markets sell raw chicken carcasses processed by one of the largest distributors of chicken meat in the state of Sinaloa. After purchase, the raw chicken samples were immediately transported to the laboratories for microbiological research at the Autonomous University

Para aumentar la eficiencia en el aislamiento y la detección de *Campylobacter* en alimentos y/o muestras ambientales, las metodologías han empleado una variedad de medios de enriquecimiento adicionados con antibióticos para disminuir la flora microbiana presente en la muestra y promover el crecimiento y aislamiento de *Campylobacter* cuando están presentes en cantidades bajas (Man, 2011; Kaakoush *et al.*, 2015). Tomando en cuenta la movilidad de las campilobacterias, los protocolos de filtración por membrana han demostrado ser eficientes en la recuperación de las campilobacterias provenientes de muestras clínicas, ambientales y de alimentos (Lastovica & Le Roux, 2000; Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al.*, 2009; Miller *et al*., 2014; Miller *et al*., 2017).

Dado que el consumo de carne de aves de corral y sus productos procesados son de importancia para la salud pública, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en carne de pollo que se vende en los mercados minoristas en el municipio de Culiacán, Sinaloa, uno de los estados con una importante industria en la producción de pollo en México (Hernández & Parrish, 2017). Para lograr este objetivo, se empleó el método de filtración por membrana para incrementar la eficiencia en la recuperación de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de alimentos. Actualmente, hay información muy limitada sobre los niveles de *C. jejuni* y *C. coli* en los productos de carne de pollo que se venden en los mercados minoristas de esta región en el Noroeste de México; por lo tanto, los resultados de este estudio ayudarán en el desarrollo de medidas de vigilancia para mejorar la seguridad y calidad de los alimentos entre los consumidores de esta región agrícola en Sinaloa, México.

Material y Métodos

Toma de muestra

Un total de treinta muestras de pollo crudo se adquirieron de once mercados minoristas diferentes en la parte central de la ciudad de Culiacán, en el estado de Sinaloa, Noroeste de México, entre Febrero y Abril del 2016 (Figura 1). Los mercados minoristas venden pollo crudo procesados por uno de los mayores distribuidores de carne de pollo en el estado de Sinaloa. Después de la compra, las muestras de pollo crudo se transportaron inmediatamente a los laboratorios de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México, para los análisis microbiológicos y las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento dentro de un lapso de 24 h.

Figure 1. Location of the retail markets sampled in Culiacan, Sinaloa, Mexico. Raw chicken carcasses were purchased from eleven food markets (yellow circles with numbers 1-11), representative of the main retailers for raw chicken meat in the northern part of the city of Culiacan. The raw meat products were immediately transported to the laboratories for microbiological research at The Autonomous University of Sinaloa (yellow circle number 12) for further processing as described in the Materials and Methods. The scale bar corresponds to 400 meters.

Figura 1. Ubicación de los mercados minoristas muestreados en Culiacán, Sinaloa, México. Las muestras de pollo crudo se compraron en once mercados de alimentos (círculos amarillos con números del 1 al 11), representativos de los principales minoristas de carne de pollo crudo en la parte Norte de la ciudad de Culiacán. Las muestras de carne de pollo crudo fueron transportados inmediatamente a los laboratorios para investigación microbiológica en la Universidad Autónoma de Sinaloa (círculo amarillo número 12) para su posterior procesamiento como se describe en Materiales y Métodos. La barra de escala corresponde a 400 metros.

of Sinaloa, Mexico and kept at 4 °C until processing within a 24 h time lapse.

Microbiology analysis

Before opening, outside plastic wrapping of the chicken carcasses was disinfected with 70 % ethanol solution. The package liquid from each carcass was collected and kept at 4 °C for 30 min, and 5 mL of the package liquid was further added to 45 mL of Oxoid™ anaerobe basal broth [(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), amended with Oxoid™ CAT supplement] cefoperazone (8 µg/mL), teicoplanin (4 µg/mL), amphotericin B (10 µg/mL); Thermo Fisher Scientific] in a sterile cell culture flask with a 0.2 µm vented cap.

Análisis microbiológico

Antes de abrir la envoltura de plástico exterior de las muestras de pollo crudo, ésta se desinfectó con una solución de etanol al 70 %. El líquido del paquete de cada muestra se recuperó y se mantuvo a 4 °C durante 30 min, y se añadieron 5 mL del líquido del paquete a 45 mL de caldo basal anaeróbico Oxoid™ [(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con el suplemento Oxoid™ CAT] cefoperazona (8 µg/ml), teicoplanina (4 µg/mL), anfotericina B (10 µg/mL); Thermo Fisher Scientific] en un matraz de cultivo celular estéril con una tapa ventilada de 0.2 µm. El matraz se incubó a 42 °C durante 24 h con agitación suave (30 rpm) en condiciones microaerofílicas generadas con el sistema de bolsas GasPak™ EZ Campy

The flask was incubated at 42 °C for 24 h with gentle shaking (30 rpm) under microaerophilic conditions generated by the GasPak™ EZ Campy Pouch System (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A membrane filtration method was then employed to improve the recovery of the bacterial isolates from the enrichment broths (Lastovica & Le Roux, 2000; Quiñones *et al.*, 2007). A 250 µL sample of enrichment broth was added in small droplets onto a sterile Whatman® 0.65 µm mixed cellulose ester membrane filter (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), which was placed on the surface of Oxoid™ anaerobe basal agar (ABA) (Thermo Fisher Scientific) plates amended with Oxoid™ CAT supplement (Thermo Fisher Scientific) and 5% laked horse blood. Samples were passively filtered for 30 min at room temperature under the ambient atmosphere in a laminar flow hood. Subsequently, the filters were carefully removed, and the ABA plates were incubated for 48 h at 42 °C under microaerophilic conditions. The presumptive *Campylobacter* isolates with a typical colony morphology (pale orange colonies on ABA plates) were collected and stored by using Microbank™ beads (Pro-Lab Diagnostics, Round Rock, TX, USA) and stored at −80 °C. Cells from each colony were further visualized with a LABOMED CXL Binocular Microscope (Labo America Inc., Fremont, CA, USA) to examine the single cell spiral morphology typical of *Campylobacter* spp., as in previous studies (Quiñones *et al.*, 2007).

Campylobacter species identification

Campylobacter isolates were plated onto Oxoid™ anaerobe basal agar (Thermo Fisher Scientific) at 42 °C for 48 h and were incubated under microaerophilic conditions by using the GasPak™ EZ Campy Pouch System (Becton, Dickinson and Company). Template DNA from each isolate was prepared from crude lysates after resuspending *Campylobacter* cells from ABA plates in 100 µL of HyPure™ molecular biology-grade water (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) and further incubation at 95 °C for 20 min (Amézquita-López *et al.*, 2014). The lysates were centrifuged at 2000 × g for 5 min and the supernatants were collected. Crude lysates were stored at −20 °C until further use as a template for PCR amplification.

A PCR assay was conducted for the simultaneous identification of *Campylobacter* species based on the amplification of the *lpxA* gene, which codes for the enzyme LpxA, an UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase

(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Posteriormente, se empleó el método de filtración por membrana para incrementar la recuperación de los aislamientos bacterianos del caldo de enriquecimiento (Quiñones *et al.*, 2007; Lastovica & Le Roux, 2000). Se añadió una muestra de 250 µL de caldo de enriquecimiento en pequeñas gotas sobre un filtro de membrana de éster de celulosa mixta estéril Whatman® de 0.65 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) la cual se colocó en la superficie de las placas de agar basal anaeróbico Oxoid™ (ABA) (Thermo Fisher Scientific) con el suplemento Oxoid™ CAT (Thermo Fisher Scientific) y 5 % de sangre de caballo. Las muestras se filtraron pasivamente durante 30 min. a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Posteriormente, los filtros se retiraron cuidadosamente, y las placas de ABA se incubaron durante 48 h a 42 °C en condiciones microaerófilas. Se seleccionaron los aislamientos presuntivos de *Campylobacter*, tomando en cuenta la morfología de una colonias típica (colonias de color naranja pálido en placas ABA), se almacenaron utilizando microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Round Rock, TX, USA) y se preservaron a -80 °C. Las células de cada colonia se visualizaron adicionalmente con un microscopio binocular LABOMED CXL (Labo America Inc., Fremont, CA, USA) para examinar la morfología en espiral típica de células individuales de *Campylobacter* spp., como se ha reportado en estudios previos (Quiñones *et al.*, 2007).

Identificación de especies de _Campylobacter_

Los aislamientos de *Campylobacter* se colocaron en placas de agar basal anaeróbico Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific) a 42 °C durante 48 h y se incubaron en condiciones microaerófilas utilizando el sistema de bolsa GasPak™ EZ Campy (Becton, Dickinson and Company). El DNA molde de cada aislado se preparó a partir de lisados crudos después de resuspender las células de *Campylobacter* de las placas ABA en 100 µL de agua grado biológico molecular HyPure™ (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) con una incubación adicional de 95 °C durante 20 min (Amézquita-López *et al.*, 2014). Los lisados se centrifugaron a 2000 × g durante 5 min y los sobrenadantes se recolectaron. Los lisados crudos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso como molde para la amplificación por PCR.

Se realizó un ensayo de PCR múltiple para la identificación simultánea de especies de *Campylobacter* basado en la amplificación del gen *lpxA*, que codifica la enzima LpxA, una UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa (Klena *et*

(Klena *et al.*, 2004). All oligonucleotides were purchased from Eurofins Genomics (Huntsville, AL, USA). The multiplex PCR amplifications consisted of a 50 µL reaction mixture, each containing 50 ng of genomic DNA (5 µL of crude lysate), 10 pmol/µL of each forward primer (lpxA*C. jejuni*) 5'-ACAACTTGGTGACGATGTTGTA-3', (lpxA*C. coli*) 5'-AGACAAATAAGAGAGAATCAG-3', 30 pmol/µL of the reverse primer (lpxARRK2m) 5'-CAATCATGDGCDATATGASAATAHGCCAT-3' and 22.5 µL of 2× GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The reaction mixtures were placed in an Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf Latin America, São Paulo, Brazil) using the following PCR cycling conditions: 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension time of 5 min at 72 °C (30 cycles total). Amplified products were analyzed in 2 % agarose gels containing 0.04 µL/mL GelRed Nucleic Acid Stain (Phenix Research, Candler, NC, USA). As positive controls for the PCR assay, *C. jejuni* strain RM3145 (HB93-13) and *C. coli* strain RM4661 were used (Nachamkin *et al.*, 2001; Zautner *et al.*, 2015). The positive samples were analyzed based on the expected sizes of the *lpxA* amplified fragments, which corresponded to 330 bp for *C. jejuni* and 390 bp for *C. coli,* as described in previous reports (Klena *et al.*, 2004; Quiñones *et al.,* 2007).

Statistical analysis

Descriptive statistics were performed to determine the prevalence of *Campylobacter* spp., in the examined whole chicken carcasses from the various sampling locations by using Microsoft Excel with the Analysis Toolpak Add-In (Office 365, Version 1808; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Results and Discussion

The aim of the present study was to determine the presence of *Campylobacter* spp. recovered from chicken carcasses in Culiacan, Sinaloa, a major agricultural region in the northwestern part of Mexico. Chicken carcasses were sampled from retail markets at eleven sampling sites in the central part of the city of Culiacan (Figure 1). The retail markets selected for the present study sell raw chicken carcasses, which

al., 2004). Todos los oligonucleótidos se compraron de Eurofins Genomics (Huntsville, AL, USA). La amplificación por PCR múltiple consistió en una mezcla de reacción de 50 µL, cada una con 50 ng de DNA genómico (5 µL de lisado crudo), 10 pmol/µL de cada cebador directo (lpxA*C. Jejuni*) 5'-ACAACTTGGTGACGATGTTGTA-3', (lpxA*C. coli*) 5'-AGACAAATAAGAGAGAATCAG-3', 30 pmol/µL del cebador inverso (lpxARRK2m) 5'-CAATCATGDGCDATATGASAATAHGCCAT-3' y 22.5 µL de 2× GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador Eppendorf 5331 (Eppendorf Latin America, São Paulo, Brasil) utilizando las siguientes condiciones de PCR: 94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, seguido de un tiempo de extensión final de 5 min a 72 °C (30 ciclos en total). Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2 % que contenían una tinción de ácido nucleico GelRed de 0.04 µL/mL (Phenix Research, Candler, NC, USA). Como controles positivos para el ensayo de PCR, se utilizaron la cepa *C. jejuni* RM3145 (HB93-13) y la cepa *C. coli* RM4661 (Nachamkin *et al.*, 2001; Zautner *et al.*, 2015). Las muestras positivas se analizaron en función de los tamaños esperados de los fragmentos amplificados de *lpxA*, que correspondían a 330 pb para *C. jejuni* y 390 pb para *C. coli*, como se describe en estudios anteriores (Klena *et al.,* 2004; Quiñones *et al.*, 2007).

Análisis estádistico

Se realizó un análisis descriptivo para determinar la presencia de *Campylobacter* spp., en muestras de pollos enteros crudo de las distintas ubicaciones de muestreo, utilizando Microsoft Excel con el complemento de análisis Toolpak (Office 365, Version 1808; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Resultados y Discusión

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Campylobacter* spp. de muestras de pollo crudo en Culiacán, Sinaloa, una importante región agrícola en el Noroeste de México. Se tomaron muestras de pollo entero crudo de los mercados minoristas en once sitios de muestreo en la parte central de la ciudad de Culiacán (Figura 1). Los mercados minoristas seleccionados para el presente estudio venden pollo crudo, los cuales son procesados por grandes distribuidores de carne de pollo en el estado de Sinaloa.

are processed by large distributors of chicken meat in the state of Sinaloa. During the three months of the sampling (February to April 2016), selective enrichment and membrane filtration methodologies were employed to effectively recover *Campylobacter* spp. from a total of 30 raw chicken carcasses purchased from the 11 retail markets.

The results indicated that presumptive *Campylobacter* spp. colonies were recovered from 43 % (13/30) of the chicken carcasses after membrane filtration and plating on selective media, and the *Campylobacter*-positive carcasses were identified in 64 % (7/11) of the retail markets examined (Table 1). Further analysis by phase contrast microscopy of the recovered colonies revealed a spiral-corkscrew single cell morphology (data not shown), which is typical of campylobacters (Quiñones *et al.*, 2007). The presumptive *Campylobacter* spp. colonies were further genotyped by PCR after amplification of a species-specific region in the *lpx*A gene, and the analysis revealed that 33.3 % (10/30) of the chicken samples tested positive for *C. jejuni* (Table 1). Among the presumptive *Campylobacter* isolates, a total of 28.7 % (27/94) of the colonies were typed as *C. jejuni*. *C. coli* was not detected in any of the chicken carcasses examined (Table 1). Our study also

Durante los tres meses del muestreo (Febrero a Abril de 2016), se emplearon metodologías de enriquecimiento selectivo y filtración por membrana para recuperar eficazmente *Campylobacter* spp. de un total de 30 muestras de pollo crudo compradas de 11 mercados minoristas.

Los resultados indicaron la presencia de colonias presuntivas de *Campylobacter* spp. en el 43 % (13/30) de las muestras analizadas después de realizar la filtración por membrana y la siembra en medios de cultivos selectivos, y las muestras positivas para *Campylobacter* fueron identificadas en el 64 % (7/11) de los mercados analizados (Tabla 1). Un análisis posterior por microscopía de contraste de fase de las colonias recuperadas reveló una morfología de célula única de sacacorchos en espiral (datos no mostrados), lo cual es típico de las especies de *Campylobacter* (Quiñones *et al*., 2007). Las colonias presuntivas de *Campylobacter* spp. fueron analizadas por genotipificación por PCR amplificando la región específica del gen *lpxA*, y el análisis mostró que el 33.3 % (10/30) de las muestras de pollo dieron positivo para *C. jejuni* (Tabla 1). De los aislamientos presuntivos de *Campylobacter*, un total de 28.7 % (27/94) de las colonias se tipificaron como *C. jejuni*. No se detectó *C. coli* en ninguna de las muestras de pollo examinadas (Tabla 1). Nuestro estudio también mostró que las muestras de pollo del mercado

Table 1.
Presence of *Campylobacter* spp. in raw chicken carcasses purchased at retail markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico.
Tabla 1.
Presencia de *Campylobacter* spp. en muestras de pollo crudo adquiridas en mercados minoristas en Culiacan, Sinaloa, México.

Retail market (n=11)	Chicken carcass (n=30)	No. of presumptive *Campylobacter* isolates (n=94)	No. of positive *C. jejuni* isolates (%)	No. of positive *C. coli* isolates (%)
1	3	22	12 (54.5)	ND
2	3	8	2 (25)	ND
3	3	ND†	ND	ND
4	3	4	1 (25)	ND
5	2	ND	ND	ND
6	2	12	3 (25)	ND
7	3	12	3 (25)	ND
8	2	12	1 (8.3)	ND
9	4	24	5 (20.8)	ND
10	1	ND	ND	ND
11	4	ND	ND	ND

†ND, not detected.
†ND, no detectado.

revealed that carcasses from retail market site 1 had the highest *C. jejuni* prevalence with 54.5 % (12/22). The remaining markets had a prevalence ranging from 8.3 % to 25 % with four markets testing negative for presumptive *Campylobacter* spp. Interestingly, market site 9 had the highest number of presumptive isolates; however, only 20.8 % (5/24) of the isolates were typed as *C. jejuni*, suggesting the presence of other members of the *Campylobacteraceae* family in these raw chicken samples.

Campylobacter is a leading cause of foodborne illnesses worldwide, accounting for an estimated global burden of 166 million diarrheal illnesses (Kaakoush *et al*., 2015; Devleesschauwer *et al*., 2016). Given that poultry are the main reservoir for thermophilic campylobacters in the food supply (Corry & Atabay, 2001; Kaakoush *et al*., 2015; Skarp *et al*., 2016), the present study employed a membrane filtration method for examining the presence of *Campylobacter* spp. in raw chicken carcasses available at local retail markets in the metropolitan city of Culiacan within the state of Sinaloa in Northwestern Mexico. Sinaloa is known as one of the principal chicken producing states in Mexico (Hernández & Parrish, 2017), and the domestic consumption of chicken meat by consumers is expected to continue increasing since it is viewed as a preferred and affordable source of animal protein (Salazar *et al*., 2005; Hernández & Parrish, 2017).

Due to the difficulty of detecting *Campylobacter spp*. from food samples due to the high levels of background microbial flora, a cellulose membrane filtration method was employed in conjunction with an enrichment step and selective media to increase the efficiency for isolation of campylobacters. The method is known as the "Cape Town Protocol" and was initially developed for the isolation of campylobacters from human stool samples (Lastovica & Le Roux, 2000). In subsequent studies, this membrane filtration methodology was then adapted for the isolation of multiple members of the *Campylobacteraceae* family from raw chicken carcasses as well as environmental samples (Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al*., 2009; Miller *et al*., 2014; Miller *et al*., 2017). In the present study, a membrane pore size of 0.65 µm was selected, as previously shown for its efficacy in the recovery of campylobacters from package liquid from raw chicken carcasses (Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al*., 2009; Miller *et al*., 2014; Berrang *et al*., 2017). During the slaughtering process, the birds' gastrointestinal

minorista 1 tenían la presencia más alta de *C. jejuni* con 54.5 % (12/22). Los mercados restantes tenían una prevalencia que oscilaba entre el 8.3 % y el 25 %, y cuatro mercados dieron resultados negativos para la presencia de *Campylobacter* spp. Curiosamente, el mercado 9 tenía el mayor número de aislados presuntivos; sin embargo, solo el 20.8 % (5/24) de los aislamientos se tipificaron como *C. jejuni*, lo que sugiere la presencia de otros miembros de la familia *Campylobacteraceae* en estas muestras.

Campylobacter es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo, y se estima una carga global de 166 millones de enfermedades diarreicas (Kaakoush *et al.,* 2015; Devleesschauwer *et al*., 2016). Dado que las aves de corral son el principal reservorio de *Campylobacter* termofílicos en la cadena de alimentos (Corry & Atabay, 2001; Kaakoush *et al*., 2015; Skarp *et al*., 2016), el presente estudio utilizó un método de filtración por membrana para analizar la presencia de *Campylobacter* spp. en muestras de pollo crudo de los mercados minoristas locales en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, en el Noroeste de México. Sinaloa es conocido como uno de los principales estados productores de pollo en México (Hernández & Parrish, 2017), y se espera que el consumo interno de carne de pollo por parte de los consumidores continúe aumentando, ya que se considera una fuente preferida y accesible de proteína animal (Salazar *et al*., 2005; Hernández & Parrish, 2017).

Debido a la dificultad para detectar *Campylobacter* spp. a partir de muestras de alimentos por los altos niveles de flora microbiana presentes, se utilizó el método de filtración por membrana de celulosa, así como el uso de medios de enriquecimiento y medios selectivos para incrementar la eficiencia en el aislamiento de *Campylobacter*. El método se conoce como el "Cape Town Protocol" CTP (por sus siglas en inglés) e inicialmente se desarrolló para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de muestras de heces humanas (Lastovica & Le Roux, 2000). Diversos estudios han adaptado esta metodología de filtración por membrana para el aislamiento de múltiples miembros de la familia *Campylobacteraceae* en muestras de pollo crudos, así como en muestras ambientales (Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al*., 2009; Miller *et al*., 2014; Miller *et al*., 2017). El presente estudio, utilizó un tamaño de poro de membrana de 0.65 µm, porque se ha demostrado su eficacia en la recuperación de *Campylobacter* en muestras de líquido de pollo crudo empaquetado (Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al*., 2009; Miller *et al*., 2014; Berrang *et al*., 2017). Durante el sacrificio de animales, el contenido gastrointestinal de las aves puede contaminar la piel del canal de pollo, lo que

contents can contaminate the skin of the chicken carcass, resulting in the presence of campylobacters in the package liquid (Quiñones *et al.,* 2007; Speegle *et al*., 2009; Berrang *et al*., 2017). Improper handling and cross contamination of this carcass package liquid with other fresh produce or fomites can take place during food preparation either at homes or at retailers serving ready-to-eat foods. Thus, it is imperative to develop accurate and reliable methods to assess the presence of campylobacters on raw food products.

By employing this filtration technique, the present study has demonstrated for the first time the recovery of *C. jejuni* isolates in 33.33 % (10/30) of chicken carcasses samples from 64 % retail markets examined in Culiacan, Sinaloa, Northwestern Mexico. The observed *C. jejuni* prevalence in raw chicken carcasses from retail markets in Culiacan, Mexico appears to be similar to what has been previously documented in studies from other geographical locations (Hussain *et al*., 2007; EFSA (European Food Safety Authority), 2010; Williams *et al*., 2012; Hungaro *et al*., 2015; Lopes *et al*., 2018). However, a total of 36 % of the examined retail markets showed no prevalence of *Campylobacter* spp. One possible explanation for this absence of campylobacters in some carcasses is probably due to the presence of indigenous microbial communities prevalent in raw chicken carcasses that could potentially impede the recovery of campylobacters (Ae Kim *et al*., 2017)2017. Interestingly, presumptive *Campylobacter* isolates that were non-*C. jejuni/C. coli* were identified in raw chicken meat products for most markets examined in this study. These observations suggest the presence of other members of the *Campylobacteraceae* family such as *Arcobacter butzleri*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, or *Campylobacter concisus*, which have been reported in poultry products and are considered emerging human pathogens (Skovgaard, 2007; Kaakoush & Mitchell, 2012; Ferreira *et al*., 2016).

Horizontal transmission of *Campylobacter* in the farm environment represents the most likely route of transmission to broilers. Once colonized, broilers remain colonized until they are slaughtered, and contamination of raw meat and dissemination has been shown to occur in the slaughterhouse (Keener *et al*., 2004). Given the importance of *C. jejuni* to public health as only 300 colony-forming units may cause an infection in humans (Hara-Kudo & Takatori, 2011),

resulta en la presencia de *Campylobacter* en el líquido del paquete (Quiñones *et al*., 2007; Speegle *et al*., 2009; Berrang *et al*., 2017). La manipulación inadecuada de este líquido del paquete de pollo crudo con otros productos frescos o fomites y la contaminación cruzada pueden darse durante la preparación de alimentos, ya sea en los hogares o en los comercios minoristas que sirven alimentos listos para el consumo. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos precisos y confiables para evaluar la presencia de *Campylobacter* en productos alimenticios crudos.

El uso de esta técnica de filtración por membrana en el presente estudio demostró por primera vez la recuperación de aislamientos de *C. jejuni* en 33.3 % (10/30) de muestras de pollo crudo de 64 % de los mercados minoristas examinados en Culiacán, Sinaloa, Noroeste de México. La presencia de *C. jejuni* en muestras de pollo crudo de los mercados minoristas en Culiacán, México, es similar a lo demostrado en estudios anteriores realizados en diferentes ubicaciones geográficas (Hussain *et al*., 2007; EFSA (European Food Safety Authority), 2010; Williams *et al*., 2012; Hungaro *et al*., 2015; Lopes *et al*., 2018). Sin embargo, el 36 % de los mercados minoristas examinados no mostraron presencia de *Campylobacter* spp. Una posible explicación de esta ausencia puede ser debido a la presencia de comunidades microbianas nativas en las muestras de pollo crudo que impeden la recuperación de *Campylobacter* (Ae Kim *et al*., 2017). Interesantemente, aislamientos presuntivos de *Campylobacter* que no eran *C. jejuni* y/o *C. coli* se obtuvieron de las muestras de pollo crudo de la mayoría de los mercados examinados en este estudio. Estas observaciones sugieren la presencia de otros miembros de la familia *Campylobacteraceae* como *Arcobacter butzleri*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* o *Campylobacter concisus*, los cuales han sido reportado en productos avícolas y se consideran patógenos humanos emergentes (Skovgaard, 2007; Kaakoush & Mitchell, 2012; Ferreira *et al*., 2016).

La transmisión horizontal de *Campylobacter* en granjas avícolas representa la ruta más probable de transmisión a los pollos de engorda. Una vez que los pollos han sido colonizados, éstos permanecen colonizados hasta que son sacrificados, y se ha demostrado que la contaminación de carne cruda y la diseminación ocurren en el matadero (Keener *et al*., 2004). *C. jejuni* tiene una gran importancia en la salud pública, ya que solo 300 unidades formadoras de colonias pueden causar una

future work on the development of methodologies and virulence genes for monitoring *Campylobacter* will provide additional information regarding the prevalence of this foodborne in environmental, clinical, and other food samples.

Conclusions

Campylobacter species are the causative agent of human gastroenteritis worldwide. In Mexico, a limited number of studies have previously documented the presence of *Campylobacter* spp., in raw chicken meat. This is the first report documenting *C. jejuni* isolation in raw chicken carcasses from retail markets within Culiacan, Sinaloa. Given the increased consumption of poultry products in Mexico, and the importance as a public health concern, the development of effective methodologies for detecting campylobacters in chicken carcasses purchased from local retail markets will aid in the development of control strategies to ensure a safe food supply for consumers.

Acknowledgements

This material is based upon work supported in part by Universidad Autónoma de Sinaloa, Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación No. PROFAPI2014/208 and PROFAPI2015/277 and by the U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, CRIS Project No. 2030-42000-051-00D. The authors gratefully thank Jaszemyn Yambao and Bertram Lee (USDA-ARS, Albany, CA) and Hilary Arim Beltrán Sauceda and Manuel Castillo Olea (Universidad Autónoma de Sinaloa) for providing excellent technical assistance and Dr. Cristóbal Chaidez (Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Culiacán, Sinaloa, Mexico) for allowing the use of the LANIIA facilities and instrumentation for this research.

infección en humanos (Hara-Kudo & Takatori, 2011), por lo que más estudios enfocados en el desarrollo de nuevas metodologías y en el monitoreo de genes de virulencia de *Campylobacter* proporcionará información relacionada con la presencia de éste patógeno en muestras ambientales, clínicas y de otros alimentos.

Conclusiones

Las especies de *Campylobacter* son el principal agente causal de gastroenteritis humana en todo el mundo. En México, un número limitado de estudios ha documentado la presencia de *Campylobacter* spp., en carne de pollo crudo. Este es el primer informe que documenta el aislamiento de *C. jejuni* en muestras de pollo crudo en mercados minoristas de Culiacán, Sinaloa. Dado el aumento en el consumo de productos avícolas en México, y la importancia como un problema de salud pública, el desarrollo de metodologías efectivas para detectar *Campylobacter* en muestras de pollo compradas en los mercados minoristas locales ayudará en el desarrollo de estrategias de control que garanticen un suministro seguro de los alimentos a los consumidores.

Agradecimientos

El material del presente trabajo fue apoyado en parte por la Universidad Autónoma de Sinaloa, el Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación No. PROFAPI2014/208 y PROFAPI2015/277 y por Servicio de Investigación Agrícola (ARS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA), Proyecto CRIS No. 2030-42000-051-00D. Los autores agradecen a Jaszemyn Yambao y Bertram Lee (USDA-ARS, Albany, CA) y a Hilary Arim Beltrán Sauceda y Manuel Castillo Olea (Universidad Autónoma de Sinaloa) por su excelente asistencia técnica, así como al Dr. Cristóbal Chaidez (Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Culiacán, Sinaloa, México) por permitir el uso de las instalaciones e instrumentos de LANIIA para esta investigación.

References

Ae Kim, S., Hong Park, S., In Lee, S., Owens, C. M. *and* Ricke, S. C. (2017). Assessment of chicken carcass microbiome responses during processing in the presence of commercial antimicrobials using a next generation sequencing approach. *Scientific Reports,* 7. https://doi.org/10.1038/srep43354

Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Lee, B. G. *and* Chaidez, C. (2014). Virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 4: 7. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00007

Berrang, M. E., Meinersmann, R. J. *and* Cox, N. A. (2017). Passage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* subtypes through 0.45- and 0.65-micrometer-pore-size nitrocellulose filters. *Journal of Food Protection,* 80(12): 2029-2032. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-211

Castillo-Ayala, A., Salas-Ubiarco, M. G., Márquez-Padilla, M. L. *and* Osorio-Hernández, M. D. (1993). Incidence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in raw and roasted chicken in Guadalajara, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiologia,* 35(4): 371-375. https://europepmc.org/abstract/med/8066332

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). *Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet): FoodNet surveillance report for 2015 (Final report).* Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2015.

Corry, J. E. L. & Atabay, H. I. (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement,* 90: 96S-114S. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x

Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E. *and* Groß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology,* 300(4): 205-211. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002

Devleesschauwer, B., Bouwknegt, M., Mangen, M. J. J. *and* Havelaar, A. H. (2016). Health and economic burden of *Campylobacter*. In G. Klein (Ed.), *Campylobacter: Features, detection, and prevention of foodborne disease* (pp. 27-40). Hannover, Germany: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803623-5.00002-2

Domingues, A. R., Pires, S. M., Halasa, T. *and* Hald, T. (2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiology and Infection,* 140: 970-981. https://doi.org/10.1017/S0950268811002676

EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *EFSA Journal,* 8: 1503. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1503

Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C. *and* Nisbet, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 10: 6292-6304. https://doi.org/10.3390/ijerph10126292

Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. *and* Domingues, F. C. (2016). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology,* 42(3): 364-383. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523

Hara-Kudo, Y. & Takatori, K. (2011). Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiology and Infection,* 139(10): 1505-1510. https://doi.org/10.1017/S095026881000292X

Hernández, G. & Parrish, M. R. (2017). *Poultry and eggs are pillars of production.* (MX7034). Retrieved from USDA Global Agriculture Information Network: https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Annual_Mexico%20City_Mexico_9-20-2017.pdf

Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Rosa, V. O., Badaró, A. C. L., Moreira, M. A. S. *and* Chaves, J. B. P. (2015). Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control,* 51: 15-22. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.001

Hussain, I., Shahid Mahmood, M., Akhtar, M. *and* Khan, A. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiology,* 24(3): 219-222. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.001

Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M. *and* Man, S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews,* 28: 687-720. https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15

Kaakoush, N. O. & Mitchell, H. M. (2012). *Campylobacter concisus* - A new player in intestinal disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 2: 4. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00004

Keener, K. M., Bashor, P. A., Sheldon, B. W. *and* Kathariou, S. (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 3: 105-116. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x

Klena, J. D., Parker, C. T., Knibb, K., Claire Ibbitt, J., Devane, P. M. L., Horn, S. T., Miller, W. G. *and* Konkel, M. E. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology,* 42: 5549-5557. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5549-5557.2004

Lastovica, A. J. & Le Roux, E. (2000). Efficient isolation of campylobacteria from stools. *Journal of Clinical Microbiology,* 38(7): 2798-2799.

Lopes, G. V., Landgraf, M. and Destro, M. T. (2018). Occurrence of *Campylobacter* in raw chicken and beef from retail outlets in São Paulo, Brazil. *Journal of Food Safety,* 38(3). https://doi.org/10.1111/jfs.12442

Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology,* 8: 669-685. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191

Miller, W. G., Yee, E., Chapman, M. H., Smith, T. P. L., Bono, J. L., Huynh, S., Parker, C. T., Vandamme, P., Luong, K. *and* Korlach, J. (2014). Comparative genomics of the *Campylobacter lari* group. *Genome Biology and Evolution,* 6(12): 3252-3266. https://doi.org/10.1093/gbe/evu249

Miller, W. G., Yee, E., Lopes, B. S., Chapman, M. H., Huynh, S., Bono, J. L., Parker, C. T., Strachan, N. J. C. *and* Forbes, K. J. (2017). Comparative genomic analysis identifies a *Campylobacter* clade deficient in selenium metabolism. *Genome Biology and Evolution,* 9(7): 1843-1858. https://doi.org/10.1093/gbe/evx093

Miri, A., Rahimi, E., Mirlohi, M., Mahaki, B., Jalali, M. *and* Safaei, H. G. (2014). Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/NM from hamburger and chicken nugget. *International Journal of Environmental Health Engineering,* 3: 19-23. https://doi.org/10.4103/2277-9183.138414

Nachamkin, I., Engberg, J., Gutacker, M., Meinersman, R. J., Li, C. Y., Arzate, P., Teeple, E., Fussing, V., Ho, T. W., Asbury, A. K., Griffin, J. W., McKhann, G. M. *and* Piffaretti, J. C. (2001). Molecular population genetic analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 associated with Guillain-Barré syndrome and gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases,* 184(2): 221-226. https://doi.org/10.1086/322008

Noormohamed, A. & Fakhr, M. K. (2013). A higher prevalence rate of *Campylobacter* in retail beef livers compared to other beef and pork meat cuts. *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 10: 2058-2068. https://doi.org/10.3390/ijerph10052058

Pintar, K. D. M., Christidis, T., Kate Thomas, M., Anderson, M., Nesbitt, A., Keithlin, J., Marshall, B. *and* Pollari, F. (2015). A systematic review and meta-analysis of the *Campylobacter* spp. prevalence and concentration in household pets and petting zoo animals for use in exposure assessments. *PLoS ONE,* 10(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144976

Poly, F. & Guerry, P. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology,* 24(1): 27-31. https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f1dcb1

Quiñones, B., Parker, C. T., Janda Jr, J. M., Miller, W. G. *and* Mandrell, R. E. (2007). Detection and genotyping of *Arcobacter* and *Campylobacter* isolates from retail chicken samples by use of DNA oligonucleotide arrays. *Applied and Environmental Microbiology,* 73: 3645-3655. https://doi.org/10.1128/AEM.02984-06

Rodríguez Ceniceros, R., Gómez Hernández, F. *and* Vázquez Sandoval, H. (2016). *Campylobacter* and *Salmonella* present in poultry on sale at Gómez Palacio Durango, México. *Revista Electronica de Veterinaria,* 17(6).

Salazar, A., Mohanty, S. *and* Malaga, J. (2005). 2025 vision for Mexican chicken consumption. *International Journal of Poultry Science,* 4(5): 292-295. https://doi.org/10.3923/ijps.2005.292.295

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F. *and* Griffin, P. M. (2015). An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology and Infection,* 143: 2795-2804. https://doi.org/10.1017/S0950268814003185

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A. *and* Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology,* 2(SEP). https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200

Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L. *and* Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection,* 22(2): 103-109. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019

Skovgaard, N. (2007). New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology,* 120(3): 217-224. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.046

Smole Možina, S. & Uzunović-Kamberović, S. (2005). *Camplylobacter* spp. as emerging food-borne pathogen - Incidence, detection and resistance. *Medicinski Glasnik,* 2: 1-15.

Speegle, L., Miller, M. E., Backert, S. *and* Oyarzabal, O. A. (2009). Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. from naturally contaminated retail broiler meat. *Journal of Food Protection,* 72(12): 2592-2596. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.12.2592

van Vliet, A. H. & Ketley, J. M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*(30): 45S-56S. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01353.x

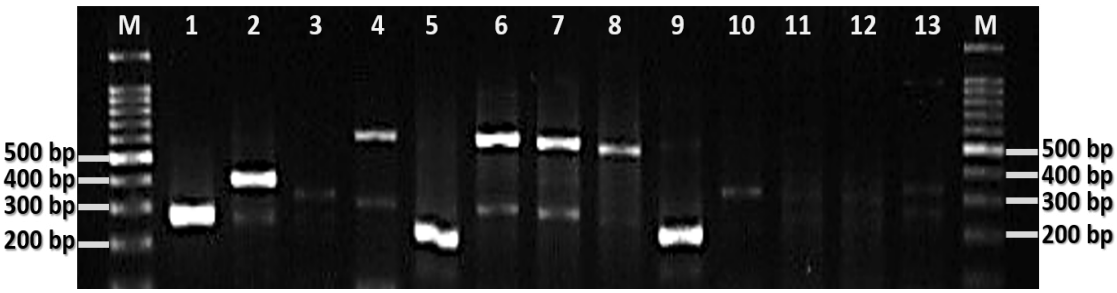
Williams, A. & Oyarzabal, O. A. (2012). Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. *BMC Microbiology,* 12. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-184

Zaidi, M. B., Campos, F. D., Estrada-García, T., Gutierrez, F., León, M., Chim, R. *and* Calva, J. J. (2012). Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clinical Infectious Diseases,* 55: 51-60. https://doi.org/10.1093/cid/cis300

Zautner, A. E., Goldschmidt, A. M., Thürmer, A., Schuldes, J., Bader, O., Lugert, R., Groß, U., Stingl, K., Salinas, G. *and* Lingner, T. (2015). SMRT sequencing of the *Campylobacter coli* BfR-CA-9557 genome sequence reveals unique methylation motifs. *BMC Genomics,* 16(1). https://doi.org/10.1186/s12864-015-2317-3

Supplementary information

Información suplementaria



Supplementary figure 1. Representative image of multiplex PCR analysis for corroborating the species identification of *Campylobacter* isolates recovered from retail chicken samples. Lanes M, 100-bp DNA ladder; lane 1, *Campylobacter* jejuni positive control strain RM3145 (330 bp); lane 2, *Campylobacter coli* positive control strain RM4661 (390 bp); lanes 5 and 9, representative positive PCR results for *C. jejuni*; lanes 3-4, 6-8, and 10-13, representative negative PCR results for *C. jejuni* or *C. coli*.

Figura suplementaria 1. Imagen representativa del análisis de PCR múltiple para corroborar la identificación de especies aisladas de *Campylobacter* recuperadas de muestras de pollo de mercados minoristas. Carriles M, marcador de DNA de 100 pb; carril 1, cepa de control positivo *Campylobacter jejuni* RM3145 (330 pb); carril 2, cepa de control positivo de *Campylobacter coli* RM4661 (390 pb); carriles 5 y 9, resultados de PCR positivos representativos para *C. jejuni*; carriles 3-4, 6-8 y 10-13, resultados de PCR negativos representativos para *C. jejuni* o *C. coli*.