



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas
de pollos de engorde: Prevalencia, factores de
riesgo y dinámica de infección.**

Saulo Hely Urdaneta Vargas

Ph.D. Thesis

Bellaterra, 2016

Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: Prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección.

Tesis doctoral presentada por **Saulo Hely Urdaneta Vargas** para optar al grado de Doctor en Veterinaria dentro del programa de doctorado de Medicina y Sanidad Animales del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección de la Dra. **Marta Cerdà Cuéllar** y la tutoría de la Dra. **Natàlia Majó i Masferrer**.

Dra. Marta Cerdà Cuéllar

Directora

Dra. Natàlia Majó i Masferrer

Tutora

Saulo Urdaneta Vargas

Doctorando



Los estudios de doctorado presentado por Saulo Hely Urdaneta Vargas fueron apoyados financieramente por una beca – sueldo doctoral de la Universidad del Zulia (Venezuela) y por una Beca del Proyecto CamCon de la UE.

Estos estudios han sido financiados por los proyectos CamCon (UE, Séptimo Programa Marco, FP7/2007-2013, no. 244547) y RTA2009-00117-00-00 (INIA).

La Dra. MARTA CERDÀ CUÉLLAR, investigadora del Centro de investigación de sanidad animal CReSA-IRTA, y la Dra. NATÀLIA MAJÓ i MASFERRER, profesora titular del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona y tutora de esta tesis

Certifican:

Que la memoria titulada "Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: Prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección", ha sido realizada por **Saulo Hely Urdaneta Vargas** para la obtención del grado de Doctor en Veterinaria, y se ha realizado bajo su dirección y supervisión.

Así, autorizan la presentación de la mencionada Tesis Doctoral para su defensa.

Bellaterra, a 20 de septiembre de 2016.

Dra. Marta Cerdà Cuéllar

Directora

Dra. Natàlia Majó i Masferrer

Tutora

CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal

IRTA
RESEARCH & TECHNOLOGY
FOOD & AGRICULTURE

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

Agradecimientos

A Dios mi creador por darme la oportunidad de venir a este país (España) a realizar mi Doctorado, en el que he vivido cosas buenas y malas, pero siempre contando con su ayuda a pesar de las duras pruebas, porque pude ver su mano salvadora en todas ellas. A Dios sea la gloria por los siglos de los siglos, Amén.

A Marta Cerdà, mi directora, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, en un momento difícil y de incertidumbre que nunca lograré entender, donde a pesar de habernos esforzado y trabajado duro en el Máster, fui excluido sin explicación. Pero Marta vino al rescate, confió en mí para emprender esta aventura de trabajo titánico en granja y guió mis pasos, enseñándome el recorrido de una experimentada Bacterióloga que no descansa al hacer su trabajo. Marta desde muy temprano hasta que cerraban el CReSA, estaba allí en su rincón, cada día presentando informes, proyectos, ponencias, corrigiendo Tesis de sus múltiples maestrantes, doctorantes, pasantes, programando el trabajo de sus empleados y ayudantes, a pesar de todas esas cosas todavía le quedaba un tiempesito para regar las plantas. Día a día aportaba nuevos resultados, descubrimientos e ideas de trabajo para solucionar problemas. Hacia pruebas sin parar con sus hisopos de Deltalab y sus Quorum Sensing. Por ello gracias Marta, por la oportunidad, por guiarme y por acompañarme con toda la paciencia del mundo en esta tesis. Espero que estés satisfecha y orgullosa del trabajo realizado y de este doctorando que has tenido, a pesar de sus múltiples problemas, repetidamente te doy las gracias Marta, porque sin tu ayuda económica no hubiera podido terminar, pues tu me ayudaste cuando mis compatriotas me dieron la espalda y saliste al paso dándome una mano para pagar todas mis deudas, allí estabas para ayudarme con el envíos de informes, almuerzos y tantas cosas más. Una vez más gracias infinitas por tu buen corazón.

Muchas gracias a mi tutora, Natalia, por su aceptación en su tiempo, y por las miles de firmas para mis informes semestrales. Gracias Tere por tu trabajo, tus enseñanzas en el laboratorio, tu compañía en granjas, por tu ayuda para procesar muestras y que a pesar que no congeniábamos mucho por nuestros caracteres similares, de seguro te echaré de menos.

Entro al laboratorio de Bacteriología I, para agradecer a todo el equipo de Dr. Badiola, a la Nuria Aloy, Ana Pérez, Judith, gracias por sus acertados consejos, y su compañía cuando les contaba del comandante supremo H.R. Chávez y de su revolución bonita. A Josep M^a o conocido como: "Buenos días Cataluña" gracias por sus riñas y por su tiempo siempre dispuesto a ayudar. A Manoli por prestarme su ayuda con los medios de cultivos y sus

autoclaves. Gracias a Paula Manrique y a Karla Cameron por su amistad y compañía en el Laboratorio de Bacteriología II, ya que me alegraban un poco, las tardes y noches de trabajo.

Gracias a Diego, Rosa y Sergio, y todos aquellos que habéis hecho de muestreadores de pollos y moscas, nos acompañaron muchas mañanas o a veces iban solos a granja, en esos largos viajes a darnos una mano con este agotador trabajo, porque gracias a vosotros esta tesis pudo salir adelante.

Gracias al Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la UAB, en especial a Gemma Castellà para las múltiples gestiones y Ana Ortuño, guía fundamental como consejera en ese comité de seguimientos. Mil gracias a todas las personas de dirección, de administración Montse, Marta López, Silvia y el trabajo de Isabel, quién siempre estaba ayudándonos con el envío de las cajas a los granjeros y mataderos. Gracias Isabel, por tanto trabajo a nuestro lado. Al personal de limpieza, de garantía de calidad y de gestión del CReSA para hacer que el resto de trabajadores tengamos todo más fácil.

Gracias a la reina de la estadística y de los mapas, gracias Anna Alba por dejarme robarte algo de tu tiempo cuando no tenías. Al equipo de Entomología, Sandra, Martita, Nitu, Marco, por su ayuda en las clasificaciones y capturas de esas escurridizas moscas, gracias por el trabajo realizado. Gracias a Cris por haber sido mi suplente y terminar parte del muestreo que no pude culminar. Muchas gracias a todos los granjeros, a los hermanos Casallarch, Jordi y Xavier, por su ayuda y paciencia, a Jaume por su amistad, a Joan por su ayuda, siempre en esos muestreos en su granja y por las enseñanzas de la avicultura en Catalunya.

Al Sr Antonio Esteve y familia, por la colaboración y por enseñarme lo que es trabajar duro en familia para obtener sus frutos. A Ferrán por su ayuda y paseos en el delta del Ebro y sus arrozales.

Gracias a mi madre por sus oraciones diarias, a mi hermana Aixa, que siempre ha estado allí, ayudando en lo que se ha podido, siempre. Y bueno, como no agradecer a mis hijos y mi esposa Yalixi, que han ayudado y aguantado todas las pruebas, por la meta de su Padre.

Yali, gracias por apoyarme siempre, fuiste una ayuda en las buenas y en las malas, hicisteis amistades que nos hicieron pasar la vida más fácil. Yo creo que sin ti, no hubiera terminado esta etapa de mi vida con éxito. Le doy gracias a Dios porque estamos juntos.

Índice

Abreviaturas.....	i
Resumen	iii
Summary	v
Publicaciones.....	vii
Introducción	1
1. Las zoonosis	3
2. <i>Campylobacter</i> como principal zoonosis en la UE	3
3. Taxonomía de <i>Campylobacter</i>	4
3.1. Género <i>Campylobacter</i>	7
3.1.1. Características fisiológicas y de cultivo	8
3.1.2. Características antigénicas y respuesta inmune	9
3.1.3. Aislamiento e identificación	11
4. Tipificación molecular	12
4.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).....	17
4.2. <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> (ERIC)-PCR	18
4.3. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	19
5. Signos clínicos de la campilobacteriosis	20
6. Patogénesis de la campilobacteriosis	21
7. Tratamiento.....	23
8. Epidemiología de <i>Campylobacter</i>	23
8.1. Transmisión de <i>Campylobacter</i>	24
8.1.1. Fuentes y transmisión en humanos.....	24
8.1.2. Transmisión vertical en aves	26
8.1.3. Transmisión horizontal en aves	27
8.1.4. Transmisión aérea y por insectos.....	29
8.2. Estacionalidad de la campilobacteriosis	30
8.3. Colonización y diseminación de <i>Campylobacter</i>	31
8.3.1. Ambiente interno de las naves y bienestar animal	32
9. Medidas de control y prevención de la campilobacteriosis	33
10. Estrategias de control y prevención en granjas de pollos de engorde broilers	34

Objetivos	41
Estudios	45
Study I. Assessment of two different matrices for the early detection and isolation of thermophilic <i>Campylobacter</i> in broiler farms.	
Abstract	49
Introduction	49
Materials and methods	50
Results and discussion	51
Study II. Dynamics of <i>Campylobacter</i> spp. infection in Spanish broiler farms: a 2-year longitudinal study.	
Abstract	57
Introduction	58
Materials and methods	59
Results	63
Discussion	66
Study III. House fly (<i>Musca domestica</i>) as a vector for <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> in Spanish broiler farms.	
Abstract	75
Introduction	75
Materials and methods	77
Results	79
Discussion	81
Discusión General	85
Conclusiones	97
Referencias	101

Abreviaturas

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APEC	<i>Escherichia coli</i> patógena aviar
BSA	Bovine serum albumin
CCDA	Charcoal cefoperazone deoxycholate agar
CDT	Cytolethal distending toxin
CFU	Colony form units
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay
EM	Estados Miembros*
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
EU	European Union
HR	Humedad Relativa*
ISO	International Organization for Standardization
Kb	Kilo base
LPS	Lipopolisacharide o lipopolisacárido
MLST	Multilocus sequence typing
Pb	pares de bases
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pi	post infection
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction;
OMP	Outer Membrane Protein
RH	Relative humidity
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGB	Síndrome de Guillain-Barré*
ST	Sequence Type o Secuencia Tipo
UFC	Unidad Formadora de Colonias*
UE	Unión Europea*
UV	Ultravioleta*
VBNC	Viable But Non-Cultivable cells
WHO	World Health Organization

* Del castellano

Resumen

La campilobacteriosis es la zoonosis bacteriana más reportada en la Unión Europea (UE) desde hace una década. Causa pérdidas económicas significativas y problemas de salud pública en países desarrollados. La principal fuente de infección es el consumo o manipulación de carne de pollo contaminada con *Campylobacter* termófilos (principalmente *C.jejuni* y *C.coli*). La alta prevalencia de *Campylobacter* en pollos de engorde supone un elevado riesgo de contaminación de las canales de pollos a nivel de matadero, y por ende el riesgo de infección en el consumidor. Por ello, la prevención y reducción de la colonización en producción primaria (granjas de pollos de engorde) es una prioridad en la UE. Para alcanzar este objetivo es necesario conocer en profundidad la epidemiología de *Campylobacter* en granja. A pesar de los numerosos estudios existentes en este campo, continúa habiendo numerosos aspectos en los que es necesario profundizar, para llevar a cabo medidas que resulten efectivas.

Es por ello que en el marco de esta tesis se han realizado una serie de estudios en granjas de pollos de engorde, que incluyeron: (i) la determinación del método óptimo y sensible de muestreo de las aves para la detección temprana y aislamiento de *Campylobacter*; (ii) el estudio de la dinámica de colonización en granja; (iii) el estudio del papel de las moscas como vector de introducción de *Campylobacter* en las naves de pollos.

Para estudiar la dinámica de colonización en granja, se requería primero valorar el método óptimo para la detección temprana y aislamiento de *Campylobacter* en pollos de engorde en granja. De este modo, se compararon dos tipos de muestras: contenido cecal obtenido mediante necropsia de las aves e hisopos cloacales transportados en medio Amies con carbón. El uso de hisopos cloacales evita tener que sacrificar animales en granja para obtener las muestras, y facilita tanto el muestreo como su posterior procesado. La comparación de ambos tipos de matrices se realizó mediante el muestreo de cinco lotes de pollos de cinco granjas diferentes. No se encontraron diferencias entre ambos tipos de matrices, resultando las muestras de hisopos cloacales efectivas para los estudios longitudinales que se llevaron a cabo posteriormente.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la dinámica de colonización de *Campylobacter*, se llevó a cabo un estudio longitudinal en 5 granjas de pollos de engorde durante dos años. Se analizaron un total de 63 lotes mediante muestreos semanales y las

prevalencias por granja oscilaron entre 38,46% y 83,33%. Mediante la toma de muestras de calzas en las naves de pollos, que resultó ser el método más sensible para la detección (no aislamiento) de *Campylobacter*, se detectó *Campylobacter* a los 7 días de edad de los pollos. Mediante cultivo, la excreción de *Campylobacter* más temprana detectada fue a los 10 días. La velocidad de diseminación dentro de una nave de pollos es extremadamente rápida, pudiéndose determinar en este estudio que puede ser de tan sólo 2 días (rango 2-13 días). No se detectó *Campylobacter* en ninguna de las naves antes del inicio de cada nuevo lote, ni en los pollitos de un día o en el agua de bebida. Ello demuestra la importancia de los procesos de limpieza, desinfección y cambio de la yacija durante el vacío sanitario, para garantizar un inicio de crianza libre de *Campylobacter* y para evitar las infecciones entre lotes, en caso que un lote sea colonizado. Diversos factores ambientales suponen un mayor riesgo de infección de los lotes, como una mayor temperatura mínima en el interior o exterior de las naves, así como el tipo de ventilación (mayor riesgo cuando la ventilación es no forzada). Por el contrario, el tipo de cama o de bebedero no influyó en la colonización por *Campylobacter*.

Dado que se ha descrito en el norte de Europa que las moscas pueden actuar como vectores de introducción de *Campylobacter* en las naves de pollos, se exploró si en un clima más cálido estos insectos suponían también un factor de riesgo. En el estudio realizado, en las mismas granjas donde se realizó el estudio longitudinal, demostramos que efectivamente, las moscas, y en particular la mosca común (*Musca domestica*) son un factor de riesgo en las granjas de pollos de engorde en España. Se aisló *C. jejuni* y *C. coli* de las moscas capturadas en el exterior de las naves, y en algún caso genotipos idénticos a los aislados de los pollos en el interior de las naves. Así mismo, las dos granjas que presentaron una mayor prevalencia de *Campylobacter*, fueron en las que se detectó mayor número de moscas positivas.

Los datos generados en esta tesis contribuyen al conocimiento de la epidemiología de *Campylobacter* en granjas de pollos de engorde, y ponen de relieve la importancia de implementar unas medidas de bioseguridad estrictas en granja que eviten o reduzcan el riesgo de colonización de los pollos. No obstante, para un completo control de la bacteria, son necesarias medidas adicionales y complementarias, no disponibles actualmente, como el uso de estrategias nutricionales (prebióticos o probióticos) o vacunas.

Summary

Campylobacteriosis is the most frequently reported bacterial zoonosis in the European Union (EU) for a decade. It causes significant economic losses and is of public health concern in developed countries. The main source of infection is consumption or handling of contaminated chicken meat with thermophilic *Campylobacter* (mainly *C. jejuni* and *C. coli*). High *Campylobacter* prevalence in broilers represents a high risk of contamination of chicken carcasses at slaughter and as a consequence, a high risk of consumer infection. Therefore, to prevent and to reduce the *Campylobacter* colonization in primary production (broiler farms) is a priority in EU. To achieve this goal it is necessary to gain insight into the epidemiology of *Campylobacter* in broiler farms. Despite the numerous studies in this field, there are still many gaps that request further research, in order to implement effective measures. Hence, in the framework of this thesis a number of studies in broiler farms have been carried out, which included: (i) determination of an optimum and sensitive method for sampling birds on farm, for an early detection and isolation of *Campylobacter*, (ii) the study of the dynamics of colonization on farm, (iii) the study of the role of flies as a vector for introduction of *Campylobacter* in broiler houses.

To study of the dynamics of colonization on farm, it was first required to assess the optimal method for the early detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* in broilers at farm level. Thus, two types of samples were compared: caecal contents obtained by necropsy and cloacal swabs transported in charcoal Amies medium. The use of cloacal swabs avoids sacrificing farm animals to get samples, and facilitates both sampling and further processing. Comparison of both types of matrices was carried out by sampling five broiler flocks from five different farms. No differences between the two types of matrices were found, with cloacal swabs being as effective as caecal samples, and therefore the former type of sample was used for the longitudinal studies.

In order to deepen the understanding of the dynamics of colonization of *Campylobacter*, a 2-year longitudinal study was carried out in 5 broiler farms. A total of 63 flocks were analyzed by weekly sampling and farms prevalence ranged from 38,46% to 83,33%. Boot sock sampling was the most sensitive method to detect (not to isolate) *Campylobacter*, and allowed to detect *Campylobacter* as early as 7 days of chick placement. By culture, the earliest *Campylobacter* excretion was detected in 10 days-old chicks. The speed of *Campylobacter* spread within a broiler house is extremely fast and in this study we were able to determine that it can be of just 2 days (range 2-13 days). *Campylobacter* was not detected in any of the broiler houses before chick placement nor in one-day old chicks or in drinking water. This shows the importance of cleaning and disinfection and litter replacement during

the down time period, to ensure a start of each rearing cycle free of *Campylobacter* and to prevent infection between consecutive batches, if one flock is colonized. Several environmental factors pose a greater risk of infection of flocks, such as a higher minimum temperature inside or outside of the broiler houses, as well as the type of ventilation (increased risk when not forced ventilation is used). On the contrary, the type of poultry litter or drinker did not influence colonization by *Campylobacter*.

There are several studies in Northern Europe reporting that flies can act as vectors for introduction of *Campylobacter* in broiler houses. However, there are no data in countries with a warmer climate. Thus, we explored if in Southern Europe insects also posed a risk. The study was performed in the same farms where the longitudinal study was conducted and we demonstrated that indeed, flies and in particular housefly (*Musca domestica*) are a risk factor in Spanish broiler farms. *C. jejuni* and *C.coli* were isolated from flies captured outside the broiler houses and in some instances, the same genotypes to those isolated from chickens inside the broiler houses were found. Likewise, the two farms with a higher *Campylobacter* prevalence were those where the highest number of positive flies were detected.

The data generated in this thesis contributes to a better understanding of the epidemiology of *Campylobacter* in broiler farms, and highlight the importance of implementing strict biosecurity measures on farm to avoid or reduce the risk of colonization of chickens. However, for a complete control of the bacteria, additional and complementary measures are needed, although they are not currently available, such as using nutritional strategies (prebiotics or probiotics) or vaccines

Publicaciones

Los resultados presentados en esta tesis se han publicado o están en preparación para sumisión a revistas científicas internacionales indexadas:

Urdaneta, S., Dolz, R., Cerdà-Cuéllar, M. 2015. Assesment of two different types of sample for the early detection and isolation of termophilic *Campylobacter* in broiler farms. *Avian Pathol* 44(2):103-105.

Urdaneta, S., Lorca C., López, S., Dolz, R., Cerdà-Cuéllar, M. Dynamics of *Campylobacter* spp. infection in Spanish broiler farms: a 2-year longitudinal study. Manuscrito en preparación para su sumisión.

Urdaneta, S., Talavera, S., Verdún, M., Pagès, N., Dolz, R., Hald, B., Cerdà-Cuéllar, M. Housefly (*Musca domestica*) as a vector for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Spanish broiler farms. Manuscrito en preparación para su sumisión.

Otros artículos relacionados, publicados durante el desarrollo de la tesis:

B. Borck Hog, H. Rosenquist, A. I. V. Sorensen, L.S. Larsen, J., Osek, K. Wiczorek, P. Kusyk, M. Cerdà-Cuéllar, R. Dolz, S. Urdaneta, B. David, M. Hofshagen, J.A. Wagenaar, N. Bolder, F. Jorgensen, N. Williams, Y. Merga, T. Humphrey. 2011. Questionnaire survey among broiler producers in six European countries. Disponible en http://www.camcon-eu.net/wp-content/uploads/2010/08/WP1_Camcon-Report_final1.pdf

H. M. Sommer, B. Borck Høg, L.S. Larsen , A.I.V. Sørensen, N. Williams, J.Y. Merga, M. Cerdà-Cuéllar, S. Urdaneta, R. Dolz, K. Wiczorek, J. Osek, B. David, M. Hofshagen, M. Jonsson, J. Wagenaar, N. Bolder, H. Rosenquist. 2016. Analysis of farm specific risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers in six European countries. *Microbial Risk Analysis*. doi: 10.1016/j.mran.2016.06.002.

Introducción

1. Las zoonosis

Las zoonosis son infecciones o enfermedades que se pueden transmitir directamente o indirectamente entre los animales y los seres humanos. Entre un tercio y la mitad de todas las enfermedades infecciosas humanas tienen un origen zoonótico. En los últimos 10 años en torno al 75% de las nuevas enfermedades que han afectado a los seres humanos se han originado a partir de animales o productos de origen animal (EFSA, 2013a).

Hay varias formas de transmisión de las enfermedades zoonóticas y en función de este aspecto las infecciones se dividen en dos grupos: las enfermedades zoonóticas de origen alimentario y las no transmitidas por alimentos. Las primeras incluyen a las enfermedades causadas por patógenos transmitidos a través del consumo de alimentos contaminados o agua potable, tales como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Trichinella*, la Hepatitis A, etc. Las no alimentarias incluyen enfermedades que principalmente se transmiten por contacto directo con los animales infectados, como la gripe aviar y la fiebre Q, o por vectores, como la malaria, el virus del Nilo Occidental y la enfermedad de Lyme, entre otras.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos en la actualidad han adquirido gran importancia en todo el mundo. Los patógenos zoonóticos más importantes que causan enfermedades transmitidas por los alimentos son *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli O157: H7* (Cloeckaert, 2006; Humphrey et al., 2007; Frederick y Huda, 2011). Las infecciones causadas por estas bacterias son pues de gran relevancia desde una perspectiva de salud pública y tienen una gran repercusión económica. Es por ello que en los países desarrollados y en vías de desarrollo hay un interés en la reducción de las infecciones causadas por estos agentes zoonóticos.

2. *Campylobacter* como principal zoonosis en la UE.

Campylobacter causa en el hombre la enfermedad denominada campilobacteriosis y es a nivel mundial la principal infección zoonótica entérica bacteriana en la mayoría de las naciones desarrolladas y en vía de desarrollo (*World Health Organization*, 2001), causando millones de casos en todo el mundo (Tauxe, 2001). En la Unión Europea (UE) es la zoonosis más frecuentemente declarada desde 2005, por delante de *Salmonella*, con 236,851 casos confirmados en 2014 (Figura 1). Los informes de zoonosis comunitarias de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) confirman que el número de casos confirmados de campilobacteriosis mantiene un aumento continuo en los últimos años (Figura 2) (EFSA-

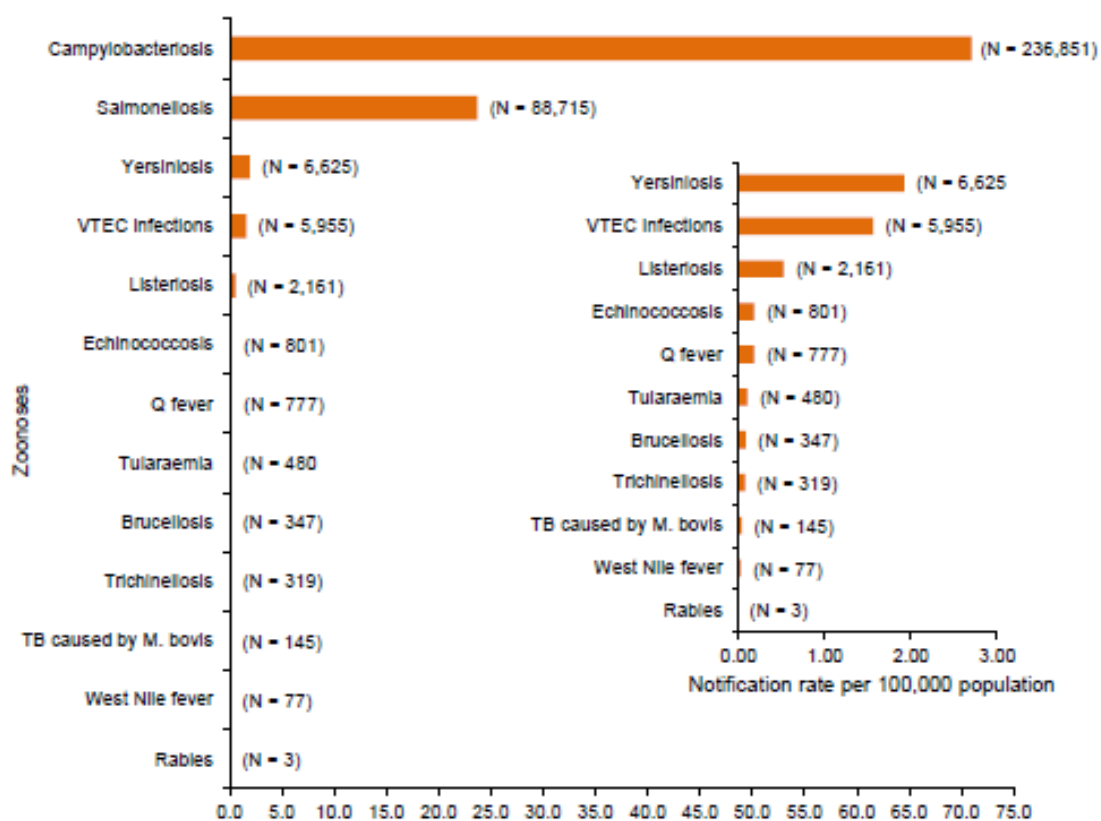
ECDC, 2016). A pesar de ser la zoonosis más declarada en la UE, la tasa de notificación de los casos de campilobacteriosis es claramente inferior al número de casos reales, dado que las tasas de incidencia sólo se corresponden con los casos confirmados en laboratorio. En consecuencia, la verdadera tasa de infección es mayor al número de casos notificados, y se estima que son entre un 7,6 a 100 veces más alta (Skirrow y Blaser, 1992; Mead et al., 1999; Samuel et al., 2004). En la UE se estima que podría haber entre 2 y 20 millones de casos de campilobacteriosis al año (en los 27 Estados Miembros). Por el contrario, los brotes de origen alimentario notificados debidos a *Campylobacter* son limitados, aunque pueden ser más comunes de lo que se sospechaba. Teniendo en cuenta el elevado número de casos de campilobacteriosis humana, la gravedad en términos de muertes reportadas en la UE es baja (0,01%) 25 muertes para 2014 (EFSA, 2016). Por otro lado, si bien las complicaciones mayores son poco frecuentes, esta enfermedad puede ocasionar hepatitis, pancreatitis y trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré, una forma de parálisis que puede provocar disfunción respiratoria y neurológica grave, e incluso la muerte, en un reducido número de casos (WHO, 2011). Debido a su elevada incidencia, así como a su duración y posibles secuelas, la enteritis por *Campylobacter* tiene gran importancia desde una perspectiva socioeconómica. El impacto económico de infecciones por *Campylobacter* en la UE se ha estimado en aproximadamente 2,4 billones de euros al año (EFSA, 2013a).

La principal fuente de infección por *Campylobacter* en humanos son las aves y en especial la carne de pollo (Friedman et al., 2004, Humphrey et al., 2007, Pires et al., 2010). Dada la importancia de la campilobacteriosis, la EFSA ha hecho hincapié en la importancia de realizar una vigilancia activa de esta zoonosis en todos los estados miembros, incluyendo el realizar esfuerzos para determinar los casos de campilobacteriosis inciertos y los no comunicados. Asimismo, también recomienda el guardar y caracterizar genéticamente los aislados de *Campylobacter* de origen humano y de reservorios putativos en todos los estados miembros.

3. Taxonomía de *Campylobacter*

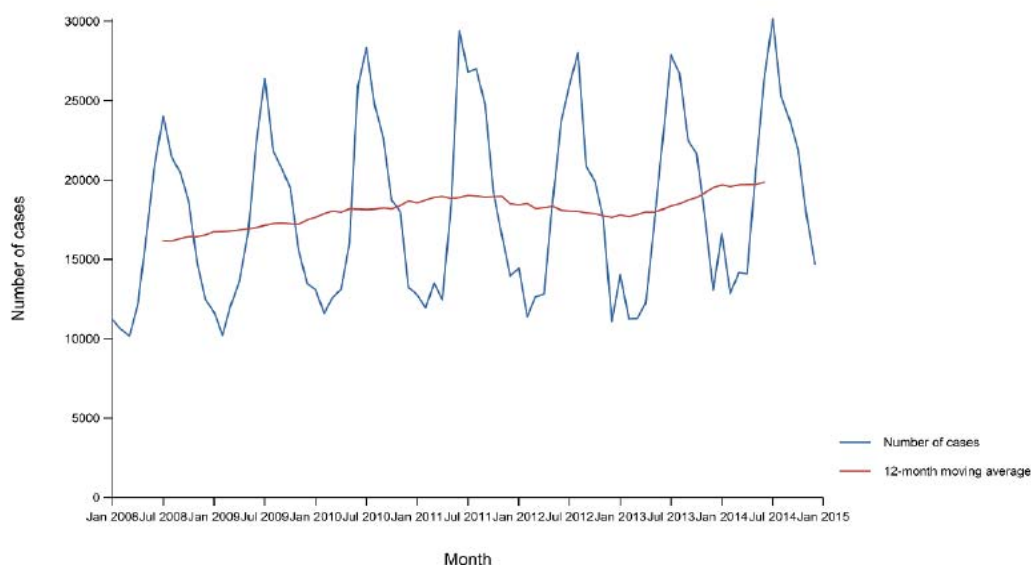
El género *Campylobacter* proviene de la palabra griega que significa “bastón curvo”, debido a la morfología en forma de S, en espiral o curva de esta bacteria. Existen muchas especies de *Campylobacter*, y en años recientes su taxonomía ha cambiado de manera considerable. El primer reporte de este microorganismo lo realizó Theodor Escherich en 1886, al describir el aislamiento de una bacteria no cultivable en forma de espiral del contenido de colon de neonatos y gatitos que habían muerto como resultado del “cólera infantum” (Escherich, 1886) (**Figura 3**).

Figura 1. Tasa de notificación de zoonosis declaradas en casos humanos confirmados en la UE, 2014.



Nota: Total de casos confirmados indicado entre paréntesis en el extremo de cada barra. EFSA Journal 2016; 13(12):4329.

Figura 2. Evolución de los casos confirmados reportados de campilobacteriosis humana en la UE para el período 2008-2014. Fuente: EFSA Journal 13(12):4329.



Se ha sugerido que ésta es la primera observación reportada de la bacteria que ahora conocemos como *Campylobacter*. Hasta principios de los años 1900, no fue posible cultivar estas bacterias (Skirrow y Butzler, 2000; Park, 2002). Fue en 1909 cuando se obtuvo el primer cultivo puro de la bacteria de fetos ovinos abortados (McFadyean y Stockman, 1913).

Debido a su sorprendente similitud morfológica a *Vibrio cholerae*, las bacterias se clasificaron como miembros del género *Vibrio*. Cinco años más tarde, Smith descubrió bacterias con forma de espiral en fetos bovinos abortados y llegó a la conclusión de que estas cepas y los vibriones de McFadyean y Stockman pertenecían a la misma especie (Smith y Taylor, 1919), para lo cual propuso el nombre *Vibrio fetus*. *Campylobacter fetus* (antes *Vibrio fetus*) se reconoció como patógeno de ovinos y bovinos y otros organismos estrechamente relacionados a éstos se describieron más adelante como *V. jejuni* aislado de yeyuno de ganado, y *V. coli* de cerdos (Doyle, 1944; Jones et al., 1931).

Figura 3. Primera publicación de las bacterias en forma de espiral no cultivables aisladas a partir del contenido del colon de los recién nacidos y los gatitos (Escherich, 1886).



En la década de 1950 Elizabeth King, identificó un grupo de "vibrios relacionados" vinculados con enfermedades entéricas en seres humanos y fue la primera en estudiar con detalle cepas humanas. Ella discriminó entre *V. fetus* y los termotolerantes *V. jejuni* y *V. coli*, aunque mantuvo los nombres provisionales como "vibrios relacionados" (King, 1957). Sebald y Verón separaron formalmente los "vibrios relacionados" de la familia Vibrionaceae en base a la composición de bases G y C del ADN de estos microorganismos, sus requisitos de crecimiento microaerofílico, su metabolismo no fermentador y su elevada temperatura óptima de crecimiento. Propusieron el término *Campylobacter*, que se deriva de dos palabras griegas que significan "bastón curvo" (Sebald y Veron, 1963). Diez años más tarde, Verón y Chatelain esclarecieron la taxonomía y consideraron cuatro especies distintas

dentro del género *Campylobacter*. *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter sputorum* (Véron y Chatelain, 1973).

El fracaso en cultivar campilobacterias de las heces se había atribuido al recrecimiento de bacterias coliformes y los requisitos nutricionales exigentes de *Campylobacter*. Este problema fue superado por el uso de un método de filtración junto con el crecimiento en medios selectivos (Dekeyser et al., 1972; Butzler et al., 1973). La etapa de filtración permitió a las campilobacterias, más pequeñas y muy móviles, pasar a través de un filtro de 0,65 µm, mientras que otros organismos de mayor tamaño era retenido. A partir del uso de este método, ciertas campilobacterias fueron reconocidas como potenciales agentes causantes de enfermedades entéricas transmitidas por los alimentos y se cultivaron exitosamente a partir de heces humanas (Dekeyser et al., 1972; Slee, 1972). En 1977, el aislamiento de *Campylobacter* mejoró mediante el uso de agar selectivo suplementado con una mezcla de vancomicina, polimixina B y trimetoprim, hasta el punto de que la etapa de filtración ya no fue necesaria, permitiendo el examen de rutina de muestras fecales humanas (Skirrow, 1977).

Los procedimientos de aislamiento adecuados permitieron la recuperación de *Campylobacter* a partir de una variedad de fuentes humanas, animales y del medio ambiente, y se propusieron gradualmente nuevas especies. Como resultado de la descripción de nuevas especies, la taxonomía fue revisada y se propuso una nueva familia bacteriana, denominada *Campylobacteriaceae* (Vandamme y de Ley, 1991). Actualmente esta familia está formada por cuatro géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Dehalospirillum*.

3.1. El género *Campylobacter*

La estructura taxonómica del género *Campylobacter* ha experimentado grandes cambios e incluso algunas partes de la taxonomía actual del género es un tema de controversia y que requieren una mayor investigación (Debruyne et al., 2005; On, 2001). En la actualidad, el género *Campylobacter* cuenta con 34 especies descritas, 14 subespecies y 2 biovars (<http://www.bacterio.net/>) (**Tabla 1**). Las especies más aisladas de infecciones humanas son las especies termofílicas *C. jejuni* (subespecies *jejuni*) y *C. coli*. Otras especies como *C. lari* y *C. upsaliensis* también han sido aisladas en pacientes con enfermedades diarreicas, pero su notificación es menos frecuente (WHO, 2011). Los miembros del género *Campylobacter* son bacilos gram negativos, pequeños (0,2-0,8 µm de ancho x 0,5-8 µm de largo) y delgados, curvados en espiral. Cuando dos o más células bacterianas se agrupan, forman una "S" o una forma en "V" que se asemeja a unas alas de gaviota.

Sin embargo, las células envejecidas o células expuestas al oxígeno atmosférico adoptan una forma cocoide (Rollins y Colwell, 1986; Bovill y Mackey, 1997). Todas las especies son bacterias no esporuladas y a excepción de *C. gracilis*, logran la motilidad por medio de un flagelo polar en uno (monotrico) o ambos extremos (anfitrico), que junto con su forma helicoidal, genera un movimiento similar a un sacacorchos o en forma de tirabuzón (Ferrero y Lee, 1988). La motilidad de estas bacterias es rápida para las pequeñas campilobacterias termofílicas y algo más lenta para las grandes formas espiraladas de *C. fetus* spp. *C. showae* presenta múltiples flagelos (Debruyne et al., 2005). Su composición de bases G y C del ADN varía entre el 28 al 38 %.

3.1.1. Características fisiológicas y de cultivo

Todas las especies del género *Campylobacter* son no esporuladas y no sacarolíticas y tienen requerimientos nutricionales y ambientales únicos. La mayoría de las especies prefieren una atmósfera microaeróbica (3-5 % de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N) para su crecimiento. Para algunas especies es más propicio un medio anaeróbico (que contenga poco o nada de oxígeno), aunque también pueden crecer en condiciones microaeróbicas. La mayoría de las especies tienen actividad oxidasa con la única excepción de *C. gracilis*. Los *Campylobacter* spp. no metabolizan la glucosa porque carecen de la enzima 6-fosfofructoquinasa (PFK) una enzima crítica glucolítica (Kelly, 2001; Velayudha et al., 2004) y utilizan aminoácidos e intermediarios del ciclo de Krebs o del ácido tricarboxílico como fuente de energía. La incapacidad para fermentar o oxidar carbohidratos y a su vez, su necesidad de ricos medios de crecimiento, se explica por el genoma relativamente pequeño que poseen las campilobacterias (Griffiths y Park, 1990).

La temperatura óptima de crecimiento es 30°C a 37°C. Bajo condiciones de crecimiento desfavorables, estos microorganismos tienen la capacidad de formar células viables pero no cultivables (VBNC) (Portner et al., 2007). Las especies de *Campylobacter* termófilas son capaces de crecer entre 37°C y 42°C, pero son incapaces de crecer por debajo de 30°C, debido a la ausencia de los genes de proteínas de choque en frío (CSP, *cold shock proteins*), que juegan un papel en la adaptación a baja temperatura. Las especies de *Campylobacter* termófilas son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*, que son de importancia para la salud pública, ya que son los agentes causales de la campilobacteriosis. Entre ellos, la especie más comúnmente asociadas con la infección humana son *C. jejuni* seguida de *C. coli*. Estas especies representan el 90% de las campilobacteriosis humanas (EFSA, 2013a). Se ha sugerido que la elevada temperatura óptima de crecimiento de los *Campylobacter* termófilos se ha desarrollado como resultado de su adaptación a animales

de sangre caliente, especialmente aves (Ketley, 1997). Esta sugerencia se apoya en el hecho de que la temperatura del intestino aviar es de 42°C (Park, 2002).

3.1.2. Características antigénicas y respuesta Inmune

La estructura antigénica del género es muy diversa. Las distintas especies de *Campylobacter* no están relacionadas entre sí. En cambio las dos subespecies de *C. fetus* (venerealis y fetus) tienen antígenos comunes, por lo que no son diferenciables por inmunofluorescencia. Las especies más estudiadas son *C. jejuni* y *C. coli* existiendo hasta el momento 42 antisueros para serotipificar la primera especie y 18 para la segunda. Esta serotipificación basada en antígenos solubles termoestables "O" derivados de lipopolisacáridos superficiales, permite diferenciar 60 serotipos de *C. jejuni*, por una prueba de hemoaglutinación pasiva o esquema de Penner y Hennessy (Penner et al., 1983). También existe otro sistema de serotipificación para estas dos especies basado en la detección de antígenos H termolábiles aglutinantes o esquema de Lior (Lior et al., 1982), prueba que diferencia unos 100 serotipos.

Este sistema se lee con aglutinación en placa y requiere absorción múltiple de antisueros heterólogos. En cambio la especie *C. fetus* es antigénicamente más homogénea, habiéndose descrito 5 grupos serológicos usando antígenos celulares enteros (esquema de Marsh y Firehammer) y dos grupos A y B basados en antígenos termoestables "O" (esquema de Morgan). Esta última es la clasificación que actualmente se utiliza en el esquema de Berg y que se basa en una combinación de propiedades bioquímicas y serológicas. Basado en un esquema de serotipificación para la detección de antígenos termolábiles superficiales, Lawson detectó tres serotipos (A, B y C) para cepas de *C. mucosalis* aisladas, asociadas a casos de adenomatosis intestinal porcina. Para el resto de las especies de *Campylobacter* no se han efectuado estudios antigénicos detallados para serotipificar a las cepas aisladas. Los estudios más detallados sobre respuesta inmune han sido llevados a cabo en pacientes infectados con *C. jejuni*. Estos individuos desarrollan anticuerpos séricos que han sido investigado por una variedad de técnicas que incluyen aglutinación, fijación del complemento, ensayo bactericida, inmunofluorescencia indirecta, ELISA y ELISA en gel difusión (DIG-ELISA). A pesar de que la hemoaglutinación pasiva es una técnica útil para serotipificar, no ha sido adecuada para detectar anticuerpos en individuos convalecientes.

Tabla 1. Especies validadas dentro del genero *Campylobacter*.

Especies de <i>Campylobacter</i>	Referencias
<i>C. avium</i>	Rossi et al., 2009
<i>C. canadensis</i>	Inglis et al., 2007
<i>C. corcagiensis</i>	Koziel et al., 2014
<i>C. cinaedi</i>	Totten et al., 1988
<i>C. coli</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. butzleri</i>	Kiehlbauch et al., 1991
<i>C. concisus</i>	Tanner et al., 1981
<i>C. cuniculorum</i>	Zanoni et al., 2009
<i>C. cryaerophilus</i>	Neill et al., 1985
<i>C. concisus</i>	Tanner et al., 1981
<i>C. cuniculorum</i>	Zanoni et al., 2009
<i>C. curvus</i>	Vandamme et al., 1991
<i>C. fetus</i>	Smith and Taylor, 1919
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. fetus subsp. venerealis</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. fetus subsp. testudinum</i>	Fitzgerald et al., 2014
<i>C. gracilis</i>	Vandamme et al., 1995
<i>C. helveticus</i>	Stanley et al., 1992
<i>C. hominis</i>	Lawson et al., 2001
<i>C. hyoilei</i>	Alderton et al., 1995
<i>C. hyointestinalis</i>	Gebhart et al., 1985
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	On et al., 1995
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>	On et al., 1995
<i>C. iguaniorum</i>	Gilbert et al., 2015
<i>C. insulaenigrae</i>	Foster et al., 2004
<i>C. jejuni subsp. doylei</i>	Steele and Owen, 1988
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	Steele and Owen, 1988
<i>C. lanienae</i>	Logan et al., 2000
<i>C. lari</i>	Benjamin et al., 1983
<i>C. lari subsp. concheus</i>	Debruyne et al., 2009
<i>C. lari subsp. lari</i>	Debruyne et al., 2009
<i>C. mucosalis</i>	Roop et al., 1985
<i>C. peloridis</i>	Debruyne et al., 2009
<i>C. mustelae</i>	Fox et al., 1989

Tabla 1. Continuación.

<i>C. nitrofigilis</i>	McClung et al., 1983
<i>C. fennelliae</i>	Totten et al., 1988
<i>C. peloridis</i>	Debruyne et al., 2009
<i>C. pilori</i>	Marshall et al., 1985
<i>C. piloris subsp. mustelae</i>	Marshall et al., 1985
<i>C. piloris subsp. piloris</i>	Fox et al., 1988
<i>C. rectus</i>	Vandamme and De ley, 1991
<i>C. showae</i>	Etoh et al., 1993
<i>C. sputorum</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. sputorum subsp. bubulus</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. sputorum subsp. sputorum</i>	Véron and Chatelain, 1973
<i>C. sputorum subsp. mucosalis</i>	Lawson et al., 1981
<i>C. subantarcticus</i>	Debruyne et al., 2010a
<i>C. upsaliensis</i>	Sandstedt and Ursing, 1991
<i>C. ureolyticus</i>	Vandamme et al., 2010
<i>C. volucris</i>	Debruyne et al., 2010b

Debe tenerse en cuenta que estos antígenos generalmente autoaglutinan si se usan directamente en las pruebas serológicas, por lo cual se recomienda la utilización de antígenos sonicados, formolados o extractos glicoprotéicos.

3.1.3. Aislamiento e identificación

La sensibilidad de *Campylobacter* spp. al oxígeno y los radicales oxidantes ha conducido al desarrollo de varios medios selectivos que contienen uno o más secuestrantes de oxígeno y agentes selectivos, en particular los antibióticos. Dependiendo de la matriz desde donde se intente el aislamiento de *Campylobacter*, los métodos pueden implicar una etapa de pre-enriquecimiento en un medio líquido, seguido de un plaqueado sobre medio de agar.

Hay varios caldos selectivos, como el caldo Bolton, el caldo Preston y el caldo de enriquecimiento para *Campylobacter*. Además, existen diversos agares selectivos para el aislamiento de *Campylobacter* de muestras clínicas y de alimentos, medios como el agar Preston, el agar desoxicolato cefoperazona carbón (CCDA) y agares Butzler, Skirrow, Blaser y Campy-BAP; son medios comerciales que contienen agar brucela, base de agar sangre, sangre de ovino, bovino o equino y varios aditivos antibióticos como bacitracina,

novobiocina, trimetoprin, actidiona, cicloheximida, cefalotina y colistina, que inhiben parte de la microbiota acompañante, y aumenta la eficacia de aislamiento. El uso de CCDA y la incubación a 42°C en lugar de 37°C es por lo general la metodología de elección, ya que permite el aislamiento de más cepas de *Campylobacter* (Zanetti et al., 1996, Koolman et al., 2014).

Asimismo, se han desarrollado métodos alternativos y rápidos para la detección y confirmación de *Campylobacter* spp., por ejemplo aquellos que incluyen hibridación in situ fluorescente (FISH; Lehtola et al., 2005), aglutinación en látex y un método de enriquecimiento mediante filtración que permite la separación de *Campylobacter* de otros organismos presentes en la matriz del alimento (Baggerman y Koster, 1992)

Tal vez los métodos de confirmación más eficaces son los basados en la PCR, ya que las reacciones fenotípicas son a menudo atípicas y difíciles de leer. Se han desarrollado diversos protocolos de PCR específicos de especie, para la detección e identificación de *Campylobacter* termófilos. Algunos de ellos se indican en la **Tabla 2**. Recientemente se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real que muestran el potencial de un límite de detección de 1 ufc en muestras de pollo, y en menos de 2 h (Debretson et al., 2007).

4. Tipificación Molecular

Existen actualmente una amplia variedad de sistemas de tipificación bacteriana que difieren entre sí en la capacidad de discriminar entre las cepas bacterianas, en su fiabilidad, en el esfuerzo requerido y en el coste. Ninguna técnica es óptima para todas las formas de investigación y la técnica de tipificación elegida depende tanto del diseño del estudio como de los objetivos de la investigación.

Los métodos de tipificación se dividen en dos grandes categorías, métodos fenotípicos y genotípicos. Los sistemas de tipificación tradicionales se han basado en el fenotipo, tales como serotipo, biotipo, fagotipo o perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Estos métodos permiten discriminar entre las bacterias de una sola especie, ya que implican la expresión de genes. Las propiedades fenotípicas tienen una tendencia a variar, en función de los cambios en las condiciones de crecimiento, fase de crecimiento y mutación espontánea (Pfaller, 1999).

Tabla 2. PCRs desarrolladas para la detección de *Campylobacter* termophilos

PCR	Gen blanco	Primer	Primer secuencia	Referencia
<i>Campylobacter</i> spp.	16S rRNA	C412F campR2	5'-GGA TGA CAC TTT TCG GAG C-3' 5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3'	Katzav et al., 2008
<i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i>	16S rRNA	MD16S1Upper MD16S2Lower	5'-ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC-3' 5'-GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T-3'	Denis et al., 2001
<i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i>	<i>ceuE</i> (<i>C. coli</i>) <i>mapA</i> (<i>C. jejuni</i>)	COL3Upper MDCOL2Lower MDmapA1Upper MDmapA2Lower	5'-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG-3' 5'-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3' 5'-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG-3' 5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A-3'	Denis et al., 1999
<i>C. lari</i>	16S rRNA	CL594F CL1155R	5'-CAA GTC TCT TGT GAA ATC CAA C-3' 5'-ATT TAG AGT GCT CAC CCG AAG-3'	Linton et al., 1996
<i>C. upsaliensis</i>	16S rRNA	CHCU146F CU1024R	5'-GGG ACA ACA CTT AGA AATGAG-3' 5'-CAC TTC CGT ATC TCT ACA GA-3'	Linton et al., 1996
<i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>C. lari</i> y <i>C. upsaliensis</i>	23S rRNA	THERM1 THERM4	5'-CTT CGC TAA TGC TAA CCC-3' 5'-TAT TCC AAT ACC AAC ATTAGT-3'	Fermer and Engvall, 1999
<i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>C. lari</i> y <i>C. upsaliensis</i>	<i>lpxA</i>	Forward primers: <i>lpxAF9625</i> 0301 <i>lpxAC. coli</i> , <i>lpxAC. Jejuni</i> <i>lpxAC. Lari</i> , <i>lpxAC. upsaliensis</i> Reverse primers: <i>lpxAR0025</i> 0304 <i>lpxARKK2m</i>	5'-TGC GTC CTG GAG ATA GGC-3' 5'-CTT AAA GCN ATG ATA GTR GAY AAR-3' 5'-AGA CAA ATA AGA GAG AAT CAG-3' 5'-ACA ACT TGG TGA CGA TGT TGT A-3' 5'-TRC CAA ATG TTA AAA TAG GCG A-3' 5'-AAG TCG TAT ATT TTC YTA CGC TTG TGT G-3' 5'-TAG GCA TTA TTT TTA CCC CTA TAG ACA G-3' 5'-ACA GGR ATT CCR CGY TTT GTY TC-3' 5'-CAA TCA TGD GCD ATA TGA SAA TAH GCC AT-3'	Klena et al., 2004

Tabla 3. Comparación de las técnicas comunes de tipificación bacterianas basados en el poder relativo discriminatorio, reproducibilidad, repetibilidad, tiempo requerido, el costo y la información que dan sobre las partes dispersas o focales del genoma. Adaptada por Foxman *et al.* (2005).

Técnica de tipificación	Poder relativo de discriminación	Repetibilidad relativa	Reproducibilidad relativa	Parte dispersa o focal del genoma*	Días requeridos post cultivo	Costo Relativo **
Secuenciación del genome entero	Elevado	Elevado	Elevado	Genoma entero	Meses o años	Muy elevado
Hibridación comparativa contra el "array" que contiene toda la secuencia del gen	Elevado	Medio a elevado	Medio a elevado	Dispersa	Meses o años	Elevado
Secuenciación directa de una o más regiones genéticas	Moderado a elevado (depende del gen de elección)	Elevado	Elevado	Focal si solo una región	2–3	Equipo: Medio a elevado Trabajo y suministros: Medio a elevado
<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	Moderado a elevado (depende del gen de elección)	Elevado	Elevado	Dispersa	3+	Equipo: Medio a elevado Trabajo y suministros: Elevado
Tipado binario (presencia/ausencia de genes seleccionados o alelos a lo largo del genoma)	Moderado a elevado (depende del gen de elección)	Elevado	Potencialmente elevado	Dispersa (si se eligen diferentes genes a lo largo del genoma)	2–3	Equipo: medio Trabajo y suministros: Medio

Tabla 3. Continuación

Técnica de tipificación	Poder relativo de discriminación	Repetibilidad relativa	Reproducibilidad relativa	Parte dispersa o focal del genoma*	Días requeridos post cultivo	Costo Relativo **
<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	Moderado a elevado (depende del número de bandas observadas)	Medio=> Elevado (en función de las especies)	Medio =>Elevado	Dispersa	3	Equipo: Elevado Trabajo y suministros: Elevado
<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (RFLP)	Moderado a elevado (depende del número de bandas observadas)	Medio=>Elevado	Medio	Dispersa	1-3	Medio
Amplificación de un único gen diana específico de patógeno	Moderado a Elevado (depende del gen de elección)	Elevado	Medio=>Elevado	Focal	<1	Equipo: Bajo a medio Trabajo y suministros: Bajo
<i>Amplified fragment length polymorphism</i> (AFLP)	Moderado a elevado	Elevado	Medio=>Elevado	Dispersa	2	Equipo: Bajo a medio Trabajo y suministros: Bajo
Ribotipado automático	Moderado	Elevado	Elevado	Focal	1	Equipo: Elevado Trabajo y suministros: Elevado
<i>Ribosomal RNA gel electrophoresis</i>	Moderado	Elevado	Elevado	Focal	1	Equipo: Bajo Trabajo y suministros: Medio

Tabla 3. Continuación

Técnica de tipificación	Poder relativo de discriminación	Repetibilidad relativa	Reproducibilidad relativa	Parte dispersa o focal del genoma*	Días requeridos post cultivo	Costo Relativo **
Targeting known repetitive gene sequences (ERIC), (REP), (DRE), BOX, (IS), (PGRS)	Bajo a moderado	Medio	Bajo	Generalmente dispersa	1	Equipo: Bajo a Medio Trabajo y suministros: Bajo
Random primers (randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), arbitrary primed PCR (AP-PCR))	Bajo a moderado	Bajo	Bajo	Dispersa	1	Equipo: Bajo a Medio Trabajo y suministros: Bajo
Restriction endonuclease on a single amplified product	Bajo a moderado (depende del amplicón)	Elevado	Elevado	Focal	1-2	Equipo: Bajo a Medio Trabajo y suministros: Bajo
Plasmid profiles	Bajo	Elevado	Medio	Focal	1	Equipo: Bajo Trabajo y suministros:

*Focal corresponde a un único loci. Dispersa indica multiples loci.

**Coste por aislado en \$ en 2005, asumiendo que el equipo necesario está disponible, y que el investigador tiene acceso a secuenciación automática, para reacciones de PCR son ~\$5, PFGE~\$20, MLST ~\$140, hibridación comparativa ~\$1000 a \$2000 y secuenciación del genoma completo (asumiendo que una cepa ya ha sido secuenciada) ~\$100,000 a \$500,000. Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives and Innovations* 2, 10.

Los métodos genotípicos se basan en el análisis de la estructura genética, incluyendo polimorfismos de ADN en los patrones de restricción y la presencia o ausencia de ADN extracromosómico. Por lo tanto, estos métodos están menos sujetos a variación natural, aunque pueden verse afectados por mutaciones aleatorias que pueden crear o eliminar sitios/puntos de reconocimiento de endonucleasas de restricción, inserciones o deleciones de ADN en el cromosoma, o la ganancia o pérdida de ADN extracromosómico (Tenover et al., 1997). En la **Tabla 3** se resume una breve descripción de varios métodos de tipificación existentes.

La tipificación de patógenos microbianos es particularmente importante para el diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de las infecciones bacterianas. La caracterización de cepas también aplica en el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas. Por otro lado, los nuevos métodos y herramientas moleculares están adquiriendo un papel cada vez más importante para esclarecer la diversidad bacteriana, así como para obtener en menor tiempo una gran cantidad de información que ayudará a obtener una visión más amplia de los diferentes procesos y cambios que tienen lugar en los microorganismos y en las poblaciones microbianas.

Los investigadores han utilizado en sus estudios sobre patógenos microbianos una variedad de métodos basados en ADN para determinar el genotipo. Estos métodos utilizan campos eléctricos para separar el ADN en patrones únicos (*fingerprints*) que se visualizan mediante la tinción del ADN con bromuro de etidio o mediante hibridación de ácido nucleico. Más recientemente se han desarrollado técnicas basadas en medidas indirectas de la secuencia genética (como la *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) – PCR, y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y medidas directas de la secuencia genética (como la Tipificación multilocus de secuencias o *Multilocus Sequence Typing* (MLST)). Éstas se describen brevemente a continuación.

4.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

EL PFGE es uno de los métodos basados en patrón de bandas de ADN, que clasifican las bacterias de acuerdo con el tamaño de los fragmentos generados por la digestión enzimática de ADN genómico. Este método fue desarrollado en 1984 y desde entonces se ha convertido en el método de referencia o *gold standard* de los métodos de caracterización molecular. El procedimiento consiste en la incorporación de una suspensión bacteriana mezclada con una proteasa y con un detergente (SDS) en agarosa fundida, haciendo bloques (*plugs*) de agarosa. La mezcla de proteasa-SDS desnaturaliza

las proteínas de la membrana celular formando los poros en la célula que permiten la liberación del ADN cromosómico.

La agarosa mantiene el ADN embebido en la matriz del gel. A continuación, el *plug* se lava varias veces para eliminar los restos celulares y proteasas. Una porción del *plug* (aproximadamente 1/3) se corta y se añade a una mezcla de endonucleasa/s de restricción que escinde el ADN en puntos de corte específicos de secuencia, generando 10-30 fragmentos de ADN de 0,5 a 1000 kb. Los fragmentos de ADN se separan por tamaño mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Los fragmentos de ADN más pequeños se mueven más rápido a través de la agarosa que los fragmentos más grandes y el resultado es un patrón de fragmentos de ADN.

Las distancias de migración se comparan con patrones de referencia de peso molecular conocido y se obtiene un perfil para cada cepa o aislamiento. El patrón de PFGE de un aislado se puede comparar con otros patrones para determinar si las muestras pueden haberse originado a partir de una fuente común. Los patrones electroforéticos se visualizan una vez teñidos los geles con un colorante fluorescente como el bromuro de etidio. Los resultados del gel pueden ser fotografiados y los datos obtenidos se pueden analizar utilizando un paquete de software comercial (Tenover et al., 1995; Tenover et al., 1997; Olive and Bean, 1999).

El PFGE es una de las técnicas de tipificación más reproducible y altamente discriminatoria disponible en la actualidad. Este método se puede aplicar fácilmente a diferentes especies, todas las cepas se pueden tipificar con buena reproducibilidad y los perfiles de restricción son fácilmente leídos e interpretados. Sin embargo, esta técnica es costosa y laboriosa, especialmente por el equipo necesario, lo cual puede suponer una limitación importante para muchos laboratorios (Matushek et al., 1996).

4.2. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR*

Los métodos de tipificación mediante PCR de elementos polimórficos repetitivos, se basan en la presencia de elementos de ADN que se repiten a lo largo del genoma de diferentes especies bacterianas (Versalovic y Lupski, 2002). Hay tres tipos principales de elementos de ADN repetitivos detectados y utilizados en diferentes genomas de bacterias: REP, BOX y ERIC (Versalovic et al., 1991). Los elementos BOX fueron las primeras secuencias repetitivas identificadas en un organismo Gram positivo, mientras que las secuencias REP y ERIC se identificaron originalmente en bacterias Gram negativas y posteriormente se vio que estaban conservadas en todas las bacterias entéricas Gram negativas relacionadas,

así como en muchas y diversas bacterias no relacionados de múltiples phyla (Hulton et al., 1991; Versalovic et al., 1991; Olive and Bean, 1999).

Estas secuencias se utilizan para diseñar cebadores (*primers*) para la amplificación por PCR, de modo que en una misma reacción se generan diversos amplicones de tamaños diferentes. Los fragmentos amplificados se pueden correr en un gel de electroforesis, produciendo un perfil denominado *fingerprint* genómico rep-PCR (Versalovic et al., 1994). La posición de los elementos ERIC en los genomas de enterobacterias varía entre las diferentes especies y se ha utilizado como un marcador genético para caracterizar los aislados dentro de una especie bacteriana (Versalovic et al., 1991; Radu et al., 2002).

El ERIC-PCR ha demostrado que tiene un poder de discriminación de cepas similar o incluso mejor que otros métodos, tales como el análisis de espaciadores intergénicos ribosómicos (RISA, del inglés *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y el análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Niemann et al., 1997; Olive and Bean, 1999; Chmielewski et al., 2002). Varios estudios han demostrado que el ERIC-PCR tiene una buena correlación con los resultados de PFGE, pero, en general, con una potencia discriminatoria ligeramente menor y menos reproducible (Kidd et al., 2011). El ERIC-PCR es un método rápido, fácil y barato especialmente adecuado para estudios de brotes, ya que permite la confirmación de la fuente de infección y el número de cepas implicadas. Sin embargo, la mala reproducibilidad y la transferibilidad de los resultados de ERIC-PCR hace muy difícil compartir esta información entre laboratorios (Foxman et al., 2005).

4.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Se trata de una técnica para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos. El procedimiento caracteriza muestras de especies microbianas mediante la secuenciación de ADN de fragmentos internos de varios (habitualmente siete) genes conservados. Se utilizan fragmentos internos de cada gen de entre 450 y 500 pares de bases, cuyas secuencias son obtenidas con exactitud mediante el uso de secuenciadores automáticos de ADN. Se le asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentre en un gen de mantenimiento de una especie. Cada muestra se caracteriza por las secuencias únicas de alelos en cada uno de los siete loci, lo cual constituye su perfil alélico o secuencia tipo (ST). El primer esquema MLST fue desarrollado para la bacteria *Neisseria meningitidis* (Pérez et al., 2013).

Los genomas de *Campylobacter* son genéticamente diversos e inestable con recombinación inter e intragenomic frecuentes, junto con la variación de fase, lo que complica la interpretación de los datos de muchos métodos de caracterización. Hasta hace poco, con la aplicación de la técnica MLST, *Campylobacter* typing ha logrado un gran éxito y añadido a la base de datos MLST. Al 1º de mayo de 2008, la base de datos contiene *Campylobacter* MLST 3516 aislamientos y cerca de 30 publicaciones que utilizan o mencionan MLST en la investigación sobre *Campylobacter*. (<http://pubmlst.org/campylobacter>).

5. Signos clínicos de la campilobacteriosis

Las infecciones por *Campylobacter* suelen ser leves, pero pueden ser mortales aunque infrecuentes, en niños muy pequeños, personas de edad avanzada o bien en aquellos individuos inmunosuprimidos (WHO, 2011). La campilobacteriosis afecta principalmente a adultos jóvenes y a niños menores de 5 años, pero también a personas mayores. Los primeros síntomas de la enfermedad suelen aparecer entre dos y cinco días después de la infección, pero el periodo de incubación por lo general suele oscilar entre uno y diez días (WHO, 2011). (La infección entérica por *Campylobacter* va desde una diarrea inflamatoria severa a una diarrea generalmente suave, no inflamatoria acuosa (Butzler y Skirrow, 1979; Walker et al., 1988.; Van Vliet y Ketley, 2001). Sin embargo, los síntomas clínicos más comunes de la infección por lo general son diarrea (frecuentemente con presencia de sangre en las heces), dolor abdominal, a menudo con fiebre, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos y malestar general, con una duración de tres a seis días (Humphrey et al., 2007).

En general, la dosis infectiva de *Campylobacter* es baja. Se han inducido infecciones con tan sólo 500-800 bacterias. Aunque la infección puede dar como resultado una enfermedad grave que dura más de una semana, por lo general es autolimitante y las complicaciones son poco frecuentes (Skirrow y Blaser, 1992). Sin embargo, algunas complicaciones en infecciones agudas incluyen hemorragias intestinales, megacolon tóxico y síndrome hemolítico urémico; en algunos casos una adenitis mesentérica (inflamación de los nódulos linfáticos abdominales) pueden simular apendicitis aguda (Humphrey et al., 2007).

También se han observado, con diverso grado de frecuencia, complicaciones como bacteriemia (presencia de bacterias en sangre), hepatitis, pancreatitis (infecciones del hígado y el páncreas, respectivamente) y abortos. Entre otras complicaciones posteriores a la infección figuran la artritis reactiva (inflamación dolorosa de las articulaciones que puede durar varios meses) y quizás la complicación más notable es el Síndrome de Guillain-Barré

(SGB), un trastorno neurológico autoinmune grave de la sistema nervioso periférico y una de las causas más comunes de parálisis flácida aguda (Kuroki et al., 1991; Nachamkin et al., 1998; Moore et al., 2005).

El SGB es una forma de parálisis semejante a la poliomielitis que puede provocar disfunción respiratoria y neurológica grave, e incluso la muerte, en un reducido número de casos (Winner, J.B., 2001; Nachamkin et al., 2000). Esta importante complicación está asociada a un mimetismo molecular de los lipo-oligosacaridos (LOS) de *C. jejuni*, que inducen reactividad cruzada de anticuerpos en gangliosidos y tejido nervioso dando lugar al SGB, debido a la similitud de estos antígenos bacterianos con receptores de células nerviosas (Godschalk et al., 2004). El SGB y su variante no paralítica, el Síndrome de Miller Fisher, son consideradas secuelas reconocidas de infecciones por *Campylobacter* (Nachamkin et al., 2000).

6. Patogenesis de la campilobacteriosis

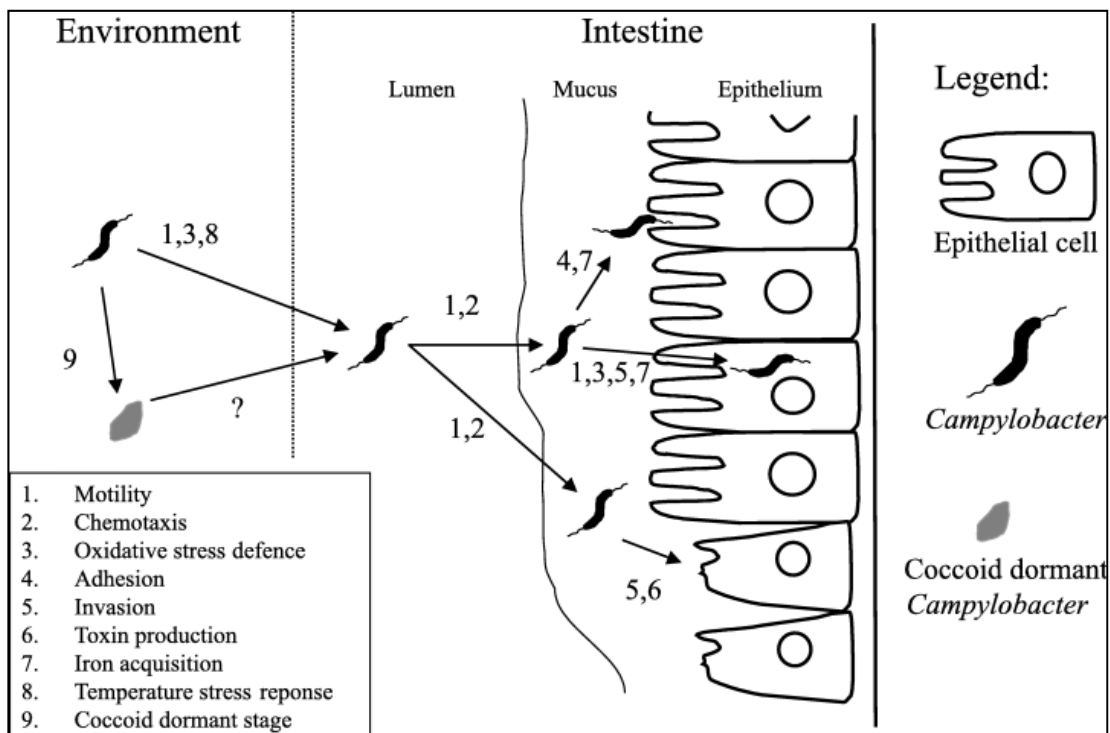
La severidad de la campilobacteriosis depende de la virulencia de la cepa, así como del estado inmunitario del hospedador. Los elementos de la motilidad de *Campylobacter* (flagelos) y la quimiotaxis (capacidad para detectar y moverse en función de gradientes químicos) son esenciales para la colonización del intestino delgado. Los flagelos son también importantes para la supervivencia bacteriana en los diversos nichos ecológicos encontrados en el tracto gastrointestinal (Jagannathan y Penn, 2005). Tras la infección, *Campylobacter* cruza la capa de moco que cubre las células epiteliales, adheriéndose a ellas; una subpoblación posteriormente invade las células epiteliales, pudiendo afectar a la lámina propia del intestino delgado (ID) y el colon.

Esta invasión que puede conllevar un daño en la mucosa e inflamación es común en la infección por *Campylobacter* (enterocolitis inespecífica), la cual se caracteriza por una degeneración y atrofia glandular, pérdida de producción de mucus, abscesos de las criptas de glándulas epiteliales y ulceración de la mucosa. La lesión esencial es un enteritis inflamatoria aguda, que posteriormente afecta al colon, el órgano diana (Poly y Guerry, 2008). Esta enteritis es probablemente también consecuencia de la producción de citotoxinas. La *cytolethal distending toxin* (CDT) es la mejor caracterizada de las toxinas producidas por *Campylobacter* spp. Se ha descrito como un factor de virulencia importante de este patógeno (Asakura et al., 2008).

Al entrar en el organismo, *Campylobacter* entra en contacto con las defensas del hospedador. Además, tiene que lidiar con los metabolitos tóxicos del oxígeno producidos durante el funcionamiento normal del metabolismo y con la limitación de hierro libre en los tejidos del huésped. *Campylobacter* spp. es capaz de utilizar los sideróforos ferricromo y enteroquelina producidos por otros organismos y también compuestos hemo, que se liberarían en el lugar de inflamación (Pickett et al., 1992). La capacidad de estas bacterias para adquirir del hospedador un nutriente esencial como es el hierro, contribuye a la patogénesis bacteriana.

Campylobacter spp. debe ser capaz de responder a un cambio en la temperatura. La respuesta al estrés térmico de las bacterias se lleva a cabo principalmente por la inducción de la expresión de proteínas de shock térmico (HSP, del inglés heat shock protein). Estas HSPs tienen una función importante en la termotolerancia, así como en la respuesta a otros tipos de estrés, al actuar como chaperonas para promover el plegado de la mayoría de las proteínas celulares y la proteólisis de proteínas mal plegadas y potencialmente perjudiciales (van Vliet y Ketley, 2001). Todos los pasos involucrados en la patogénesis de *Campylobacter* spp. causando enteritis se muestran en la **Figura 4**.

Figura 4. Visión general de las diferentes fases de la colonización del intestino por *Campylobacter*. Se indican factores de virulencia putativos actores, junto con la fase(s) en que se cree que son expresados (Van Vliet y Ketley, 2001).



7. Tratamiento

La mayoría de los pacientes infectados con *Campylobacter* spp. se recuperará sin ningún tratamiento específico, únicamente con el reemplazo de líquidos y de los electrolitos perdidos. El uso de antibióticos es controvertido, y sólo tiene un beneficio marginal en la duración de los síntomas, y no debe ser utilizado de forma rutinaria (Ternhag et al., 2007). En los casos más graves, el tratamiento de elección en general macrólidos, fluoroquinolonas, cefalosporinas y tetraciclinas.

La eritromicina se puede utilizar en niños, y la tetraciclina en los adultos. Algunos estudios muestran, sin embargo, que la eritromicina elimina rápidamente *Campylobacter* de las heces sin afectar la duración de la enfermedad. No obstante, los niños con disentería por *C. jejuni*, pueden tener beneficio con un tratamiento precoz con eritromicina. El tratamiento con antibióticos, por lo tanto, depende de la gravedad de los síntomas. Las fluoroquinolonas son eficaces si el organismo es sensible, pero las altas tasas de consumo de quinolonas en el ganado, han ocasionado que las quinolonas ahora sean en gran medida ineficaces (Fàbrega et al., 2008). Otros antibióticos como el cloranfenicol y kanamicina han mostrados los menores porcentajes de resistencia (Kang et al., 2006). El uso de Trimetoprim/ sulfamethoxazole y ampicilina son ineficaces contra *Campylobacter*.

El tratamiento antimicrobiano está por lo tanto, recomendado en casos invasivos (cuando las bacterias invaden las células de la mucosa intestinal y dañan los tejidos) o bien para suprimir la condición de portador, es decir, cuando una persona es portadora de *Campylobacter* en su organismo y sigue diseminando las bacterias sin padecer los síntomas de la enfermedad (WHO, 2011). Agentes antidiarreicos, como la loperamida, deben evitarse pues pueden conducir a una enfermedad prolongada o perforación intestinal en cualquier diarrea invasiva.

8. Epidemiología de *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter* tienen una distribución mundial. Las especies termófilas de *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la mayoría de los animales de sangre caliente y presentan una elevada prevalencia en los animales destinados al consumo como aves de corral, vacuno, porcino, ovino, avestruces y mariscos; y en los animales de compañía como perros y gatos. (WHO, 2011). Se considera que los *Campylobacter* spp. termófilos existen como organismos comensales intestinales en una amplia variedad de mamíferos y aves (silvestres y domésticos), así como dispersos en el

medio ambiente, especialmente en el agua, como consecuencia de la contaminación fecal de la misma (Moore et al., 2005). Las especies termófilas de *Campylobacter* típicamente constituyen una asociación a largo plazo con sus hospedadores, sin causar aparentemente enfermedad en los mismos.

Las aves domésticas y otros animales destinados a consumo humano, sirven de reservorio primario de los *Campylobacter* termófilos (Genigeorgis, 1986). Pavos, pollos, patos y palomas son altamente colonizados por estas bacterias. También se han detectado en una variedad de aves silvestres como perdices, faisanes, codornices, gorriones, cuervos y aves marinas como frailecillos, gaviotas y aves zancudas (Maruyana et al., 1990; Humphrey et al., 2007; EFSA, 2013a). Se suelen aislar con más frecuencia en los animales carroñeros y omnívoros que en los granívoros. Los animales raramente sucumben a la enfermedad causada por los *Campylobacter* termófilos. Además, se ha demostrado que el tracto digestivo de los bovinos sanos es un depósito importante para un número de especies de *Campylobacter* (Atabay y Corry, 1998), con prevalencias que van desde 0% a 80%.

En 2014, mientras que la prevalencia de *Campylobacter* en aves de corral era reportada por 20 de los EM de la Unión Europea, con valores de 57,8% para los países nórdicos y entre 76,5 a 91.7% para los otros EM. Sólo unos pocos países proporcionaron datos sobre la prevalencia de *Campylobacter* en animales distintos de broilers, como pavos, cerdos, vacas, gatos y perros (EFSA, 2016). La prevalencia media más alta de *Campylobacter* reportada por la EFSA en estas especies de animales fue en los pavos (45,4% a 92.6%), seguida de los cerdos (23,1 a 80,1%), en gatos y perros de (69,8%), vacas (0% a 16.5%). No se declararon prevalencias en caballos, mientras que en ovejas y cabras fueron muy bajas (EFSA, 2016).

8.1. Transmisión

8.1.1. Fuentes y transmisión en humanos

La campilobacteriosis es debida principalmente a la manipulación y consumo de alimento contaminado de origen animal, mayoritariamente productos avícolas, y menos extendidos los de porcino y vacuno (leche cruda y otros derivados lácteos) (Pearson et al., 1996; Jacobs-Reitma, 2000; Humphrey et al., 2006). Otras fuentes de infección incluyen el consumo de agua no tratada (Schorr et al., 1994; Eberhart-Phillips et al., 1997), así como el contacto con animales domésticos (Potter et al., 1983) y el contacto con agua contaminada durante actividades recreativas. El marisco contaminado también ha sido

descrito como un vehículo para la difusión de la campilobacteriosis, siendo la recolección de marisco de aguas contaminadas con *Campylobacter* la causa más probable de infección (Wilson y Moore, 1996).

Para el 2011, en la UE la mayor parte de la información sobre *Campylobacter* en los productos alimenticios era con respecto a la carne de pollo y productos derivados. Globalmente, el 31,3% de las unidades de carne de pollo fresco se encontraron positivos para *Campylobacter* en los informes de EM (EFSA, 2013a). Como en años anteriores, las proporciones de las muestras de carne de pollos de engorde positivos variaron ampliamente entre los EM, con prevalencias que oscilaron entre el 3,2% y el 84,6%. Esta proporción ha continuado aumentando estos últimos años, habiéndose declarado en 2014 un 48,31% de unidades de carne de pollo positivas (EFSA, 2016). Lo mismo sucede con el total de unidades de pollos de engorde analizados en 2014 en los EM, donde el 30,7% fueron positivos. Esta proporción es marcadamente superior a la de años anteriores, siendo en 2013 de un 19,9% y del 21,3% en 2011, aunque cabe remarcar que de un año a otro el total de EM que proporcionaron datos a nivel nacional fue ligeramente diferente.

Así pues, la principal fuente de infección por *Campylobacter* en el hombre tanto en la UE como a nivel global, es la carne de pollo de engorde. Ello queda reflejado en diferentes informes y publicaciones en la UE desde el 2005 (EFSA, 2006), Estados Unidos (Friedman et al., 2004), Korea (Kang et al., 2006), Australia, (Fullerton, k., 2008) Canadá (Ontario) (Deckert et al., 2010), entre otros. Asimismo, estudios de caso-control en Dinamarca han encontrado que los pollos preparados fuera de casa, la manipulación de pollos, y el consumo de carne de pollo insuficientemente cocida es un factor de riesgo importante para contraer la infección (Adak et al., 2002; Neimann et al., 2003). La contaminación cruzada en la cocina supone también un factor de riesgo importante (EFSA, 2013a).

La contaminación de los productos cárnicos, en especial los avícolas, tiene lugar durante el procesado en matadero, debido a la alta carga de *Campylobacter* en el intestino de las aves. La rotura del paquete intestinal durante el procesado conlleva la fácil contaminación de las carcasas y la carne. Dada la elevada prevalencia de *Campylobacter* en pollos de engorde, se entiende los niveles de este patógeno en el producto final.

La prevalencia de *Campylobacter* en la producción avícola depende del tipo de sistema de producción. Los lotes positivos en general son más frecuentes entre los pollos de cría al aire libre que entre los de cría intensiva en naves cerradas, probablemente debido a una mayor exposición con el medio ambiente (Hendrixson y DiRita, 2004).

Cabe destacar que los brotes originados en las fuentes comunes representan una proporción bastante reducida del total de casos de campilobacteriosis y la inmensa mayoría de los informes se refieren a casos esporádicos, que no presentan una pauta fácilmente discernible. Por ello, resulta extremadamente difícil calibrar la importancia de todas las fuentes conocidas.

8.1.2. Transmisión vertical en aves

La principal vía de transmisión de *Campylobacter* en las aves es horizontal, a partir de basura, agua, equipo, insectos, y fauna silvestre, ante la falta de evidencias de transmisión vertical, mediante la infección transovárica, o por penetración del cascaron del huevo después de la puesta (Acuff, et al., 1982; Doyle et al., 1984), y también debido a los fracasos en los intentos de cultivar *Campylobacter* de las incubadoras o de los pollitos recién nacidos (Neil et al., 1984; Clark, A.G., 1986). No se ha demostrado la presencia de esta bacteria en huevos fértiles de lotes de gallinas positivas, ni han penetrado el cascaron de huevos de gallinas criadas en jaulas, a pesar de haberse recuperado *C. jejuni* de intestino y heces.

Sin embargo, en algún estudio se ha sugerido la transmisión vertical a través del huevo, tomando en cuenta que *C. jejuni* se ha encontrado en todos los segmentos del tracto reproductivo de las gallinas y en el semen de gallos progenitores (Maruyana y Katsube, 1990; Zweifel et al., 2008). Pero se ha demostrado que la transmisión vertical de *Campylobacter* no es generalmente diseminada como una importante fuente de infección de los lotes de pollos (Callicott et al., 2006; Newell y Fearnly, 2003; Redley et al., 2011).

La falta de confirmación de *C. jejuni* de la superficie de los huevos, los bajos porcentajes de embriones y de superficies de huevos embrionadas a nivel de incubadoras positivos a *Campylobacter* (1.6% y 3.8%), y la imposibilidad de inducir su penetración por diversos métodos, permitieron concluir a Maruyana y Katsube (1990) que las condiciones prácticas de manejo y desecación, destruyen a estos microorganismos en un corto periodo de tiempo después de la puesta. Además la contaminación artificial de huevos con suspensiones fecales con *C. jejuni*, demostró que la viabilidad de estos organismos no superó las 16 h y el 50% de los cascarones fueron libres de *Campylobacter* viables en 10 h.

En un estudio reciente en España, durante un estudio de campo realizado entre 2012 y 2013, se detectó por qPCR DNA de *Campylobacter* spp. en 4/12 lotes, en pollitos de un día, pero que resultaron negativos por cultivo bacteriano convencional. Estos resultados sugieren la potencial existencia de transmisión vertical, y la necesidad de implementar medidas estándares de diagnóstico moleculares (qPCR), distintos a los existentes en la actualidad en la legislación alimentaria (estándar ISO 10272-2), que es el método oficial para la detección y enumeración de *Campylobacter* spp (Marin et al., 2015). Sin embargo, recientemente Battersby et al., (2016) utilizando qPCR, no detectó transmisión vertical, durante un estudio de evaluación de patrones de contaminación por *Campylobacter* en granjas de pollos.

8.1.3. Transmisión horizontal en aves

Las bacterias termófilas del género *Campylobacter* son ubicuas en el medio ambiente y la transmisión horizontal es considerada la mayor vía de colonización de pollos en naves cerradas. Está ampliamente aceptado que las aves de producción alojadas en naves cerradas casi siempre adquieren *Campylobacter* del medio ambiente externo, que es considerado la fuente más probable de *Campylobacter* spp. para las aves, y esto ha llevado a prestar atención al papel del ganado, los animales silvestres y el ambiente local, a la hora de determinar la incidencia de la colonización en pollos (Humphrey et al., 2007). De hecho, las naves de pollos de engorde están continuamente rodeadas por fuentes potenciales de *Campylobacter*.

En condiciones de campo, la mayor parte de los lotes permanecen libres de *Campylobacter* hasta los 10 a 14 días de edad. Aunque en condiciones experimentales es posible infectar a pollitos de un día, raramente se recupera *Campylobacter* de lotes de pollos de cría intensiva antes de los 14 a 21 días, donde las aves permanecen durante las 2 - 3 primeras semanas de su vida libres de *Campylobacter* (Evans y Sanyers, 2000; Shreeve et al., 2000; Stern et al., 2001., Ridley et al., 2011). A partir de esa edad, la resistencia a la infección va disminuyendo. Se desconocen los motivos de este periodo refractario.

Varios estudios han demostrado que los anticuerpos maternos protegen parcialmente de la infección en este periodo. Estos anticuerpos maternos van disminuyendo progresivamente en el tiempo y desaparecen a finales de la tercera semana (15 a 21 días), lo que explicaría porque los animales son más sensibles a la infección a partir de esa edad. (Sahin et al., 2003; Cawthraw and Nell et al., 2010). Sin embargo, de acuerdo con algunos estudios, parece que la fisiología intestinal, la composición del alimento y los cambios que

éste induce en la microbiota del intestino tienen más importancia en la resistencia a la colonización que los anticuerpos maternos.

La transmisión dentro de un lote se produce rápidamente una vez que las aves individuales son colonizadas por *Campylobacter* (Carrillo et al., 2004; Horrocks et al., 2009). Una vez establecida la bacteria en el intestino, es muy difícil de eliminar. El origen de la introducción de estas cepas en las naves de pollos, probablemente proceda de animales domésticos o de compañía no restringidos o no confinados, insectos, el calzado contaminado con heces o yacija contaminada (Ridley et al., 2011). Otros factores como el gran tamaño del lote, las fuentes de agua del medio ambiente, basura, aves silvestres, roedores, contacto fecal, el personal de la granja y otros animales, pueden aumentar el riesgo de colonización y diseminación (Adkin et al., 2006; Horrocks et al., 2009).

Las campilobacterias se diseminan rápidamente a través de la vía fecal – oral, por medio del consumo de alimento contaminado fecalmente, la cama o el agua no clorada, contribuyendo también a su diseminación el uso de bebederos de canales o de cazoleta. Es por ello, que por lo general, las camas, el pienso y el agua no clorada, se consideran vehículos de introducción y transmisión de bacterias entéricas. Estudios epidemiológicos han identificado y confirmado al manejo y a los factores de riesgo ambientales como responsables de las infecciones por *Campylobacter* spp. en lotes de pollos de engorde; por ejemplo, el bajo nivel de bioseguridad, el número de pollos por nave en la granja, la calidad del agua potable, la estación del año, y la presencia de otros animales de granja en la vecindad (McDowell et al., 2008; Redley et al., 2011, Sommer et al., 2016).

Otros estudios basados en encuestas o investigaciones epidemiológicas a nivel de granja, han identificado un número importante de factores de riesgo para la infección de lotes de pollos (Bouwkenegt et al., 2004; Guerin et al., 2007a; Lyngstand et al., 2008; McDowell et al., 2008 y Redley et al., 2011). Éstos incluyen la edad del lote, el uso de sacrificio escalonado, múltiples naves de pollos, número de trabajadores en la granja, presencia de otro ganado en la granja, granjas vecinas alrededor y charcos en la granja (Bull et al., 2008; Johnsen et al., 2006); moscas (Hald et al., 2004); jaulas de transporte (Hansson et al., 2007); el sistema de agua en las naves de pollos (Lehtola et al., 2006; Guerin et al., 2007a; Perez-Boto et al., 2010). Las aves silvestres también pueden introducir *Campylobacter* spp. en las naves. La presencia de *C. jejuni* en heces de gorriones, capturados en casetas de pavos, sugieren que las aves silvestres portadoras, participan en la introducción de la infección de *Campylobacter* en lotes de tipo comercial.

8.1.4. Transmisión aérea y por insectos.

La transmisión aérea está relacionada con un incremento de la transmisión de *Campylobacter* como consecuencia de la gran cantidad de aire que penetra en las naves a través de las aberturas de los sistemas de ventilación.

Los *Campylobacter* pueden encontrarse libres en el aire fuera de las naves, o en gran medida en insectos (Hansson et al., 2007; Hald et al., 2008) y precisamente los sistemas de ventilación son una de las vías de entrada de moscas y otros insectos dentro de las naves. La mosca doméstica (*Musca domestica*), puede adquirir la bacteria de la yacija contaminada y es capaz de transmitirla a pollos susceptibles. Algunos estudios han demostrado que el 50% de las moscas de los alrededores de una granja de aves pueden estar infectadas por *Campylobacter* (Hald et al., 2004).

Los estudios de Hald y col. (2004) en Dinamarca han demostrado que un gran número de moscas, potencialmente contaminadas con *Campylobacter*, en las inmediaciones de las naves de pollos, entran en las mismas a través del sistema de ventilación, lo que sugiere que las moscas pueden ser un vector o vehículo para la transmisión entre naves. En estos estudios, el aumento de las poblaciones de moscas durante el verano explica el pico de lotes positivos a *Campylobacter* durante los meses más cálidos; se demostró que el uso de mosquiteras en las granjas durante el verano evitó dicho pico de lotes positivos (Bahrndorff et al., 2013).

Otros insectos que pueden estar involucrados en la transmisión de *Campylobacter* son los *Alfítobium diaperinus* (escarabajo de la cama), en los cuales se ha detectado la presencia de *Campylobacter* por varios días, aunque debido a su poca viabilidad en ellos, no representan un riesgo de infección entre lotes, como pudiera ocurrir con *Salmonella* y algunos virus aviares (Gumboro). No obstante, sí que pueden ser un importante vector de transmisión entre granjas y de introducción de *Campylobacter* del medio ambiente exterior al interior de las naves (Refrégier et al., 2001; Templeton et al., 2006). También la recuperación de *C. jejuni* de cucarachas americanas (*Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*) indica que otros insectos también pueden participar en la transmisión de estas bacterias (Ramírez, J., 1989; Ponce et al., 2005).

8.2. Estacionalidad de la campilobacteriosis

En climas templados la incidencia de la campilobacteriosis así como la prevalencia de pollos infectados por *C. jejuni* y *C. coli*, presentan un ciclo estacional, con un pico en verano en países del hemisferio norte (Neylen et al., 2002). Estudios previos en el norte de Europa muestran que los lotes de animales alojados en naves cerradas tienen una probabilidad significativamente más alta de ser positivos a *Campylobacter* en verano (Bull et al., 2008; Hofshagen et al., 2005), cuando la edad de sacrificio coincide con temperaturas ambientales más elevadas o con días lluviosos (Rushton et al., 2009). Las causas de este ciclo estacional no están claras (Newell y Fearnley, 2003).

Estudios recientes han demostrado una correlación entre temperatura ambiental y el número de casos de *Campylobacter*. En Dinamarca, Patrick y col. (2004) demostraron que una temperatura elevada 4 semanas antes de la infección es el mejor predictor de casos en humanos. Sin embargo, en ese estudio únicamente se tomaron en cuenta 4 parámetros climáticos: temperatura, precipitación, humedad relativa y horas de irradiación solar.

El estrés térmico de los pollos también jugaría un papel importante durante el verano (Louis et al., 2005, Cogan et al., 2007). El riesgo asociado a las lluvias estaría relacionado con una mayor supervivencia de *Campylobacter* en el aire de la nave, como consecuencia del incremento de la humedad relativa. No se conoce si el incremento en la prevalencia de *Campylobacter* en verano es general en toda la UE. No resultaría irracional asumir, sin embargo, que en aquellas regiones del este y sur de la UE, incluida España, donde las temperaturas ambientales son más elevadas y en las que las naves pueden requerir una casi constante ventilación, puedan tener un patrón estacional menos pronunciado.

Asimismo, la persistencia ambiental de *Campylobacter* podría ser muy diferente en el sur con respecto al norte de la UE. Así, la bacteria podría no persistir en forma viable por tanto tiempo en el medioambiente en el sur de Europa como consecuencia de un clima generalmente más cálido y seco y por los mayores niveles de irradiación de UV, y en consecuencia, el riesgo para las aves se vería reducido. Por el contrario, el riesgo se incrementaría puesto que los climas templados están asociados a un incremento de actividad de las moscas, que pueden actuar como vectores de este enteropatógeno bacteriano (Hald et al., 2004, 2007).

8.3. Colonización y diseminación de *Campylobacter*

La entrada oportunista de *Campylobacter* en la nave no implica necesariamente que las aves resulten colonizadas por la bacteria. El proceso que conduce a la colonización de los pollos por *Campylobacter* es multi-factorial y depende de la frecuencia y tipo de exposición a esta bacteria que sufren los pollos, la capacidad de la bacteria de establecerse en el intestino, y la propia susceptibilidad del hospedador potencial, factores éstos que se ven afectados por el ambiente en el que los pollos son criados. Cuando *Campylobacter* coloniza el intestino de los pollos, se encuentra en mayor concentración en los ciegos (Newell & Wagenaar, 2000; Singh et al., 2006).

En el ciego, el microorganismo puede constituir el principal componente de la microbiota cecal con cargas excediendo valores de 10^9 bacterias por gramo (Lee & Newell, 2006; Allen et al., 2007). Aunque se considera que la colonización por *Campylobacter* en lotes de *broilers* sigue un patrón de “todo-o-nada”, un extenso estudio en 789 lotes realizado en Reino Unido mostró únicamente porcentajes de colonización en individuos entre un 10% y un 40% (Bull et al., 2008). Se desconoce si este resultado se debió a una entrada tardía de *Campylobacter*, a una transmisión lenta dentro del lote, o a la baja capacidad colonizadora de estas cepas concretas de *Campylobacter* que entraron en estas naves. Consistente con la exposición de los pollos a diferentes fuentes ambientales, los pollos de cría intensiva, los pollos orgánicos y los de cría al aire libre, pueden ser colonizados con múltiples cepas de *Campylobacter* spp. (Newell y Wagenaar, 2000).

Las aves de corral pueden ser rápidamente colonizadas con *Campylobacter* spp. convirtiéndose en portadores intestinales asintomáticos del organismo. Una vez que algún pollo de la parvada llega a ser colonizado, la bacteria puede propagarse rápidamente a la mayoría de las aves del lote (Rushton et al., 2009, van Gerwe et al., 2009). Estudios experimentales han demostrado que la colonización de *C. jejuni* en el tracto intestinal de pollitos es rápida: una inoculación por vía oral de 10^4 UFC, produjo muestras cloacales positivas en un 88% de los individuos al 3er día pi, y 97% a día 4 pi (van Gerwe et al., 2009; Stern et al., 2001). Una vez colonizados, la diseminación de *Campylobacter* dentro del lote puede estar también influenciado por diversos factores como el manejo del agua, el tipo de bebedero empleado, el cual ha sido identificado como un factor de riesgo que favorece la colonización (Rushton et al., 2009).

Estudios recientes muestran diferencias en los niveles de colonización del lote, que podrían indicar que las cepas de *Campylobacter* que penetran en dichos lotes difieren en

su habilidad para colonizar y/o persistir en los pollos. Los estudios de laboratorio han mostrado que cepas de *C. jejuni* varían en su potencial colonizador (Chen et al., 2006) y que las cepas de *Campylobacter jejuni* aislados de pollos son de alta virulencia para los humanos, debido a que produce una cápsula de polisacárido (Pope et al., 2007).

8.3.1. Ambiente interno de las naves y bienestar animal.

Muy pocos estudios han tomado en consideración los efectos que el ambiente interior de las naves puede tener en la colonización de los pollos por *Campylobacter*. Del mismo modo, casi no se ha prestado atención al papel que puede jugar la propia salud y/o bienestar del animal, en la dinámica hospedador-*Campylobacter*. Así pues, probablemente se han ignorado componentes potencialmente importantes en la dinámica de infección. Claramente, las cepas de *Campylobacter* que penetran en el pollo deben ser capaces de establecerse en los ciegos de las aves para que la colonización tenga éxito y esto se verá afectado por el estado inmunitario del hospedador.

En un estudio reciente, se compararon lotes negativos a *Campylobacter* con otros total o parcialmente colonizados. Los resultados mostraron que los individuos con mayores niveles de lesiones en almohadilla plantar y/o la articulación fémorotibial, así como los infectados con *E. coli* patógena aviar (APEC) tenían significativamente más probabilidades de ser positivos a *Campylobacter*, especialmente a niveles altos (Bull et al., 2008; Rushton et al., 2009). Adicionalmente, trabajos realizados en Noruega han mostrado una asociación entre la enteritis necrótica (*Clostridium perfringens*) y *Campylobacter* en *broilers* (Skanseng et al., 2006); sin embargo, no se conoce todavía si las relaciones comentadas anteriormente son casuales o si están apuntando a un factor medioambiental común, o si más bien son un marcador de un pobre manejo general en las granjas.

Se ha descrito que la humedad relativa (HR) del aire en el interior de la nave también puede influenciar la colonización y que la diseminación era mayor si los valores de HR se mantenían altos (Line, 2006). Las investigaciones sugieren que el estrés del hospedador y la respuesta inmune innata pueden trabajar aislada o conjuntamente en el pollo para crear fenotipos invasores de *Campylobacter* (Cogan et al., 2007). Por tanto, en el sur de Europa (incluida España) el estrés térmico de los pollos, que puede conducir a niveles elevados de noradrenalina y corticosterona, podrían ser un factor influyente importante en los procesos de colonización en épocas de verano.

El vaciado parcial o aclarado de los lotes de pollos, una semana antes del vaciado completo de las naves, con la finalidad de disminuir la densidad poblacional, también influye en la colonización del lote por *Campylobacter* (Hald et al., 2001). Ello se debe posiblemente al estrés que produce el movimiento de las aves, o la introducción de jaulas u otros objetos contaminados con la bacteria, así como del calzado del personal que participa en la recolección de las aves. Sin embargo, no se conoce el efecto que puede tener el aclarado en el nivel de contaminación de las canales.

9. Medidas de control y prevención de la campilobacteriosis.

La prevención se basa en medidas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria, desde la producción en el establecimiento agropecuario hasta la elaboración, manufactura y preparación de los alimentos tanto comercialmente como en los hogares. La amplia distribución de *Campylobacter* también dificulta la elaboración de estrategias de control a lo largo de la cadena alimentaria.

Sin embargo, en los países que han adoptado estrategias específicas a nivel de producción primaria para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las aves de corral, se ha observado una reducción similar en los casos humanos (Hald et al., 2004 o 2008).

Entre las medidas encaminadas a reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las aves de corral figura el mejoramiento de la bioseguridad a fin de evitar la transmisión de la bacteria del medioambiente exterior de las granjas a las aves de la explotación que se encuentran confinadas en naves cerradas. El sacrificio de los animales en buenas condiciones de higiene reduce su contaminación por las heces, pero no garantiza la ausencia de *Campylobacter* en la carne y los productos cárnicos. Enseñar a los trabajadores de los mataderos y a los productores de carne cruda a manipular los alimentos de forma higiénica es fundamental para mantener la contaminación en un nivel mínimo.

Los métodos de prevención de la infección en las cocinas de los hogares son similares a los usados respecto de otras enfermedades bacterianas de transmisión alimentaria. In vitro estudios han demostrado que el tratamiento con agentes bactericida, como la aplicación de calor (p. ej. cocción o pasteurización), el uso de ácidos orgánicos (fórmico, acético, propionico, ác. láctico), tienen un efecto bactericida y reducen la contaminación de la carne pollo (Chaveerach et al., 2002; EFSA, 2011); sin embargo, la irradiación es el único método eficaz para eliminar *Campylobacter* de los alimentos contaminados.

La OMS (2011), recomienda las siguientes medidas para evitar las infecciones:

- a) Consumir leche y productos lácteos pasteurizados o hervidos, nunca productos de leche cruda
- b) El tratamiento con antibióticos puede reducir la excreción fecal.
- c) Los trabajadores de la salud infectados no deben brindar atención directa al paciente
- d) Después de preparar los alimentos crudos de origen animal, todas las tablas de cortar y las encimeras deben limpiarse cuidadosamente con agua caliente y jabón.
- e) Evitar el contacto con la saliva y heces del animal doméstico.
- f) Los alimentos deben estar adecuadamente preparados y calientes cuando se sirven.
- g) Asegurarse de que el hielo es de agua potable.
- h) Si no se está seguro de la potabilidad del agua, hervirla o desinfectarla con desinfectante químico, la cloración del agua potable destruye el organismo.
- i) Lavarse las manos a conciencia y frecuentemente con jabón, especialmente después de ir al baño y después del contacto con los animales domésticos y animales de granja.
- j) Lavar las frutas y verduras a fondo, sobre todo si son para comer crudas. Frutas y verduras deben pelarse siempre que sea posible.
- k) Los manipuladores de alimentos, profesionales y en casa, deben conservar las reglas de higiene durante la preparación de alimentos.

10. Estrategias de control y prevención en granjas de pollos de engorde (*broilers*).

En la UE, actualmente no hay ninguna normativa europea para el control de *Campylobacter* y los únicos países que hace años que tienen un programa de control nacional de *Campylobacter* son los países nórdicos. En Dinamarca, las primeras iniciativas se remontan a los años 90 y se han basado en estrategias de control de bioseguridad destinadas a reducir *Campylobacter* en pollos de engorde, medidas de higiene, el control de lotes de pollos y carne, y por último la información del consumidor. En 2003 se desarrollaron y evaluaron una serie de estrategias, que incluyeron iniciativas en la cadena de producción, tratamiento de la carne y de educación de los consumidores (Rosenquist et al., 2009). En Islandia implementando en la industria avícola medidas biológicas de seguridad, la congelación de canales y el aumento de la educación del consumidor, lograron también bajar las tasas de infecciones en humanos (Stern et al., 2003).

Ya para el año 2000, en algunos países de la UE, se habían ensayado varias estrategias de control de la bioseguridad destinadas a reducir *Campylobacter* en pollos de engorde. Dada la rápida transmisión de la bacteria por toda la manada, principalmente por transmisión horizontal, el objetivo principal era prevenir la colonización de la primera ave.

Existe un alto riesgo de contaminación por el personal que se mueven dentro y alrededor de la granja avícola. Este riesgo podría reducirse si evitamos la contaminación por el personal que se mueve en y alrededor de la granja. Este riesgo podría reducirse mediante medidas de bioseguridad y las prácticas de higiene, tales como el uso de zapatos de goma, la desinfección por inmersión para las botas, cambios de botas entre diferentes naves y lavarse las manos antes y después de las visitas. Un estudio de campo reporto que la aplicación de estas medidas reduce la colonización *Campylobacter* por 50% (Gibbens et al., 2001).

Un estudio británico mostró que la desinfección de vehículos, lavado de manos y la desinfección del calzado y equipo del personal reducen la prevalencia de *Campylobacter* en el personal de la granja y los transportistas (Ridley et al., 2011). El ganado diferente a los pollos, animales salvajes y domésticos, también puede actuar como una fuente potencial de contaminación de la parvada, pero su función sigue siendo poco clara (Newell et al., 2011). Sin embargo, se ha demostrado que las moscas y otros insectos voladores están involucrados en la transmisión de *Campylobacter* y en Dinamarca, la instalación de mosquiteras en las naves de pollos de engorde redujo significativamente el porcentaje de las lotes positivos y una disminución de la campilobacteriosis a nivel nacional (Hald et al., 2007; Bahrndorff et al., 2013).

La bioseguridad por lo tanto, es una herramienta fundamental en la producción avícola para controlar la introducción de *Campylobacter* en los lotes de *broilers*. El cambio de calzado y ropa, así como disponer de vestuario que permita el lavado de manos, son instrumentos de bioseguridad importantes (Hald et al., 2008). Sin embargo, la mayoría de las medidas de bioseguridad implementadas hasta la fecha en muchas granjas, son medidas genéricas y no han sido efectivas, o no son cumplidas por parte del personal que trabaja en ellas, por lo que son necesarias estrategias de bioseguridad nuevas y específicas (Redley et al., 2011). Un estudio reciente en España, ha demostrado que la implementación de medidas adecuadas de bioseguridad en las naves de pollos reduce de forma significativa la proporción de lotes colonizados por *Campylobacter* (Cerdà-Cuéllar et al., 2015).

Hasta la fecha, a excepción de Dinamarca, no se ha extendido a otros países de la UE la implementación las medidas de bioseguridad necesarias en granja para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en pollos. Únicamente en España y Reino Unido, se han llevado a cabo un estudio piloto, basado en la experiencia danesa. Estas medidas se basan en la implementación de bioseguridad a nivel de nave, además de a nivel de granja.

Estas medidas permiten reducir de forma importante la prevalencia de *Campylobacter* en granja.

Otras medidas adicionales y complementarias a la bioseguridad, como la terapia con bacteriófagos, la vacunación, o estrategias nutricionales (prebióticos y probióticos) son necesarias para un control total o mayor del patógeno. Sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna de estas estrategias en el mercado. Lo que se dispone son estudios y resultados a nivel experimental.

a) *Estrategias nutricionales con aditivos alimenticios*: hasta la fecha, se han llevado a cabo diversos estudios en este campo, con el fin de conseguir una eliminación o reducción de la carga de *Campylobacter* en el intestino de pollos de engorde, aunque en ninguno con resultados concluyentes o reproducibles. Por ejemplo, Skanseng et al., (2010) demostró que pollos alimentados con un alimento suplementado con una combinación de ácido fórmico y con una alta dosis de sorbato fueron protegidos contra la colonización de *C. jejuni* o redujeron la misma durante diferentes infecciones, pero no inhibieron por completo la colonización de los broilers.

En otro estudio reciente, donde se compararon 13 dietas diferentes, suplementadas con bacterias (*B. subtilis*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), con ácidos orgánicos, aceites esenciales, monoglicéridos (MG), ácidos grasos de cadena media (AGCM), concluyeron que ninguno de los tratamientos impidieron completamente la colonización de pollos con *C. jejuni*, y sólo AGCM a los 35 días o MG-AGCM a los 35 o 42 días disminuyeron significativamente su población cecal (Gracia et al., 2015). Todo ello sugiere que probablemente se requiere la combinación de varias estrategias para conseguir un control eficaz de *Campylobacter* en las aves de corral.

b) *Terapias con bacteriocinas*: Las bacteriocinas son péptidos producidos en el tracto digestivo del pollo por bacterias del ácido láctico tales como *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Pueden ser activas contra un espectro estrecho o amplio de bacterias, y pueden matar a un patógeno particular sin alterar la microbiota del animal. La mayoría de las bacteriocinas producen poros en la membrana externa de las bacterias susceptibles, o crear trastornos en la estructura y la síntesis de las paredes celulares, lo que lleva, en ambos casos a la muerte bacteriana (Svetoch y Stern, 2010). Se han purificado pocas bacteriocinas que tengan actividad sobre *Campylobacter* y que se hayan probado en la alimentación de pollos (Stern et al., 2006; Stern et al., 2005b).

Los estudios *in vitro* o *in vivo* en condiciones controladas o en condiciones de campo con éstas y otras bacteriocinas están produciendo en algunos casos resultados prometedores (Líne et al., 2008; Messaoudi et al., 2012; Stern et al., 2008; Svetoch et al., 2008 y 2011). Todos estos estudios sugieren que los purificados de bacteriocinas anti-*Campylobacter* son en general una forma más eficiente de disminuir la carga intestinal en los pollos que las cepas probióticas. Esto podría ser debido al hecho de que las bacteriocinas liberadas por las cepas probióticas administradas deben estar a una concentración más baja, en comparación con las bacteriocinas administradas directamente en el agua o el pienso.

c) *Terapias con bacteriófagos*: los bacteriófagos son virus que se replican específicamente en bacterias causando su muerte y se encuentran naturalmente ubicuos en el medio ambiente. Actualmente en algunos países, se utilizan ampliamente dentro del ámbito de la salud, tanto en medicina humana como veterinaria (Tiwari et al., 2014). Debido a la especificidad de hospedador, en base a la afinidad de las proteínas de la cola de los fagos con sus receptores bacterianos, el tratamiento con fagos se ha considerado una respuesta a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

Varios estudios científicos que utilizan fagos para controlar las enfermedades animales han considerado a los bacteriófagos de *Campylobacter* como una herramienta para tratar o prevenir la colonización de los pollos. La mayoría de los estudios utilizan fagos aislados del intestino de pollos, puesto que este ambiente es el mayor reservorio de *Campylobacter*. En diversos estudios se ha evaluado individualmente la efectividad de diferentes fagos (El-Shibiny et al., 2009; Loc Carrillo et al., 2005; Wagenaar et al., 2005), mediante administración oral. No obstante, debido a la especificidad de huésped que muestran los fagos frente a diferentes cepas de *Campylobacter*, sería más efectivo administrar cócteles de fagos.

En este sentido, existen diversos estudios donde se han evaluado distintos cócteles fágicos, tanto frente a *C. jejuni* como *C. coli*, con distintos nivel de éxito (Carvalho et al., 2010; Fischer et al., 2013; Kittler et al., 2013; Wagenaar et al., 2005). En general se consiguen reducciones de la carga intestinal de *Campylobacter* de entre 1 y 2 log. No obstante, a menudo las pruebas realizadas en condiciones controladas en instalaciones experimentales no se traducen en el mismo resultado bajo condiciones naturales, en granjas comerciales. La ineficacia de algunas de esas pruebas podría explicarse por el tiempo transcurrido entre la colonización de *Campylobacter* y la aplicación del fago y por otra parte, que el cóctel de fagos utilizados puede ser adecuado para algunas cepas bacterianas pero no para otras, debido a la especificidad de huésped de los fagos.

d) *Estrategias de Inmunización*: Estas estrategias también se aplican a nivel de la producción primaria de pollos y consisten en la administración de anticuerpos o vacunas. El objetivo de los experimentos es el desarrollo de una respuesta inmune específica anti-*Campylobacter*, sobre todo a nivel de la mucosa para neutralizar y eliminar la colonización de *Campylobacter*, pero no invasiva, y para limitar la carga intestinal antes del sacrificio.

Inmunidad pasiva: La protección pasiva que genera la presencia de anticuerpos maternos en el pollo durante las primeras semanas antes de la colonización por *Campylobacter*, puede mantenerse mediante la administración de inmunoglobulina Y (IgY) tipo específica para *Campylobacter*. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los efectos de protección no son duraderos y luego de algunos días de protección, las bacterias vuelven a colonizar los tejidos (Tsubokura et al., 1997). Mediante la adición de yema de huevo hiperinmune (obtenido mediante vacunación de gallinas ponedoras con un lisado de células enteras de *C. jejuni*), a la alimentación de los pollos, es posible reducir la carga cecal de *C. jejuni* en más de 5 log₁₀ CFU/g respecto al grupo control, así como reducir de forma notable o totalmente la transmisión de los pollos infectados a los no infectados (Hermans et al., 2014). No obstante, no hay estudios que demuestren el efecto a largo plazo de la inmunización pasiva. Probablemente esta estrategia podría ser utilizada sólo unos días antes de la edad de sacrificio, para reducir el nivel de contaminación de las canales por *Campylobacter*.

Inmunidad activa: la vacunación, desde que *Campylobacter* es un problema importante de salud pública en los países desarrollados, sigue siendo una de las mejores estrategias para impactar en la incidencia de la campilobacteriosis humana. Hasta la fecha, se han llevado a cabo diversos estudios de vacunación utilizando diversas estrategias: células enteras inactivadas o atenuadas (Glünder et al., 1997; Wyszynska et al., 2004; Ziprin et al., 2002); vacunas de subunidades, la mayoría utilizando como Ag la flagelina (proteína del flagelo) (Huang et al., 2010; Khoury y Meinersmann, 1995; Neal-McKinney et al., 2014; Widders et al., 1998) o proteínas de la membrana externa (OMP) encapsuladas en nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (Annamalai et al., 2013), o bien proteínas que tienen un papel en la adhesión de *Campylobacter* durante la colonización de aves (proteínas Cadf, FlpA y proteínas CmeC) Neal McKinney et al., 2014); y vacunas vectorizadas en microorganismos.

Esta última estrategia consiste en la presentación de antígenos utilizando microorganismos que albergan plásmidos con el ADN de interés (vectorización). Se han llevado a cabo diversos ensayos usando habitualmente como vector cepas atenuadas de *Salmonella*

(Wyszynska et al., 2004; Buckley et al., 2010; Layton et al., 2011; Laniewski et al., 2014) con inconsistentes resultados entre autores, en cuanto a la reducción de la carga cecal de las campylobacterias. Otros ensayos, en cambio, han dado resultados prometedores, con reducciones de hasta 2.48 log₁₀ UFC/g respecto al grupo control (Theoret et al., 2012).

Hasta la fecha, las diferentes estrategias vacunales ensayadas han dado resultados desiguales ante desafíos homólogos o heterólogos. En el caso particular de vacunas basadas en la flagelina, a pesar de los resultados prometedores, no se pueden utilizar como un antígeno para vacunación a gran escala de aves de corral por varias razones. El primero es debido a las diferencias en la flagelina entre las cepas de *Campylobacter* y la falta de protección cruzada contra diversas cepas susceptibles de colonizar a los pollos de engorde. En segundo lugar, muchos anticuerpos anti-flagelina se dirigen contra epítomos no expuestos de la superficie, y por lo tanto no neutralizan la bacteria durante la infección (Widders et al., 1998). Por último, algunos anticuerpos reconocen patrones glicosilación con fases variables, lo que permite a *Campylobacter* evadir al sistema inmune al variar la cantidad y la naturaleza de estos residuos. En el caso de las vacunas vectorizadas, a pesar de que han arrojado resultados prometedores, como toda vacuna viva atenuada, el proceso de reversión puede ocurrir al adquirir genes del entorno y los vectores de antígenos podrían convertirse en patógenos para las aves vacunadas, especialmente *Salmonella* y las *Eimeria* que son patógenos frecuentes de las aves de corral.

Objetivos

Para conseguir reducir la incidencia de la campilobacteriosis, es necesario actuar a lo largo de toda la cadena alimentaria. El control de *Campylobacter* en el primer eslabón de la cadena (granjas de pollos de engorde) es fundamental, debido a su elevada prevalencia en las granjas. Para ello, es necesario profundizar en el conocimiento de la epidemiología de dicho agente en granja, para llevar a cabo medidas de control efectivas. De este modo los objetivos planteados en esta tesis son:

1. Establecer una metodología sencilla y efectiva de muestreo en granja para detectar *Campylobacter* en estudios que requieran el aislamiento del patógeno.
2. Estudiar la dinámica de colonización de *Campylobacter* spp. en granja y factores de riesgo asociados.
3. Evaluar el papel de las moscas como vector en la transmisión de *Campylobacter* en granjas de pollos de engorde.

ESTUDIOS



Study I

Assessment of two different matrices for the early detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* in broiler farms

Published in Avian Pathology, 2015

Abstract

In order to assess the optimal method for the early detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* in broilers at farm level, two types of samples were compared: caecal contents obtained by necropsy and cloacal swabs transported in charcoal Amies medium. The study was conducted in five batches of broilers from five different farms, where weekly samples (caecal contents and cloacal swabs) from 30 birds were obtained. Samples were plated onto selective agar (modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar, mCCDA) for *Campylobacter* isolation. Four out of five batches were positive for *Campylobacter*. No marked differences in sensitivity of both sample types were observed. However, a higher percentage of positive birds were detected when cloacal swabs were used. The results show that cloacal swab samples are adequate, and in some cases even better than caecal samples for the early detection of *Campylobacter* in broiler flocks at farm level. Also, this sample avoids sacrificing birds to test *Campylobacter*, which not only allows to save time in sample collection, transportation and processing at the laboratory, but also improves bird welfare and cost of sampling.

Introduction

Campylobacter spp. are the most common cause of acute bacterial gastroenteritis in humans worldwide, being an important threat to public health. In the EU, human campylobacteriosis has long been the most commonly reported bacterial zoonotic disease and its incidence has displaced salmonellosis during the last years. Human campylobacteriosis has followed a significant increasing trend in the EU for the last five years, and continued to be the most commonly reported zoonosis in 2012 with 214268 confirmed cases ((European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). The vast majority of human campylobacteriosis cases are sporadic, with large outbreaks being uncommon. The most frequently isolated species in foodborne infection of humans are *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). In up to 50 % of *C. jejuni* cases, post-infection complication may occur, such as Guillain-Barré Syndrome (a neurological disorder that can result in respiratory and severe neurological dysfunction or death; Moore et al., 2005). Although many sources of human campylobacteriosis are reported, poultry meat as the largest risk factor for this disease (Friedman et al., 2004; Humphrey et al., 2007; Pires et al., 2010).

It is believed that intervention during the primary production on farm (during the growing cycle of the birds) is likely to be the most cost-effective way to control campylobacteriosis (EFSA Panel on Biological Hazards, 2011). However, to define effective intervention strategies a better understanding of the epidemiology of *Campylobacter* in broilers is needed. This includes gaining insight into the dynamics of infection in broiler farms. There are few studies that have compared the suitability of different types of sample for the detection of *Campylobacter* at the slaughterhouse (Ugarte-Ruiz et al., 2012), or the performance of sampling methods on the farm (Vidal et al., 2013). As a first step to conduct studies of *Campylobacter* dynamics at farm level, we evaluated the sensitivity of two types of sample (caecal contents and cloacal swabs) in order to choose the most suitable one for the early detection of *Campylobacter* when culture methods are used.

Materials and methods

Sampling

Weekly sampling of 30 birds was performed in five batches of broilers from five different farms (one batch per farm), except for 1-day old birds that 10 birds were sampled. Birds were sampled from day 1 of hatch to 35 days old. Two samples were obtained from each bird: first, cloacal swabs were taken from birds and then birds were euthanized and the caeca obtained by necropsy at farm. Birds were sacrificed by occipital dislocation. Cloacal swab samples were carefully obtained, taking care to avoid contamination from the outside of the cloaca, and were placed in Amies with charcoal transport medium. All samples were kept refrigerated during the transport to the laboratory and culture was performed immediately after reception or within 24 h.

Animal studies were performed in accordance with the regulations required by the Ethics Commission in Animal Experimentation of the Generalitat de Catalunya (Approved Protocol number 4239).

Isolation and identification of *Campylobacter*

Caeca from each bird was aseptically opened and a sample was obtained with a swab. Both cloacal and caecal swabs were directly streaked onto *Campylobacter* blood-free selective agar medium (mCCDA, modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar, CM739; with selective supplement SR0155E; Oxoid, Basingstoke, UK). Care was taken to not plate an excess of caecal contents onto the mCCDA plates, as this would avoid the potential overgrowth of accompanying microbiota. Plates were examined after incubation at 42°C for 48 h under microaerobic conditions using a microaerobic atmosphere generator

(Anaerocult[®] C, Merck, Darmstadt, Germany). Up to four *Campylobacter*-typical colonies were cultured onto blood agar plates (bioMérieux, France) at 37°C for 48 h in a microaerobic atmosphere for further identification using biochemical tests and conventional PCR. If more than one colony morphology was observed, representative colonies of these were picked. A sample was considered positive if at least one colony was confirmed by PCR.

Statistical differences between *Campylobacter* detection from caecal or cloacal swab samples were determined by a Chi-squared test using a significance threshold of $p < 0.05$.

Identification of suspected *Campylobacter* colonies

DNA extraction was performed from a bacterial suspension in PBS using InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the manufacturer instructions. A conventional multiplex PCR was used for simultaneous identification of *C. jejuni* and *C. coli*, using species-specific primers targeting the lipid A gene *lpxA* (Klena *et al.*, 2004). Forward primers *lpxA-C. coli* 5'-AGA CAA ATA AGA GAG AAT CAG-3', *lpxA-C. jejuni* 5'- ACA ACT TGG TGA CGA TGT TGT A-3', and a common reverse primer *lpxA-RKK2m* 5'- CAA TCA TGD GCD ATA TGA SAA TAH GCC AT-3' produced a 391-bp amplicon for *C. coli* and of 331-pb for *C. jejuni*.

PCR amplification was performed in 25 µl containing 2.5 µl of DNA, 12.5 µl of a PCR master mix (M7502, Promega Corporation, Madison, USA), 2.5 µl of a 1 µg/µl BSA solution, 10 pmol of each forward primer and 20 pmol of reverse primer *lpxA-RKK2m*, and 3.5 µl of nuclease free water. DNA amplification was performed in a Thermal Cycler (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Singapore) and the conditions were: one cycle at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min; the last elongation step at 72°C lasted 7 min. Amplicons were detected by gel electrophoresis using 1.8 % agarose gels containing 0.2 µg/ml of ethidium bromide. A DNA molecular weight marker 2 log DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was included for reference.

Results and discussion

The results of the weekly sampling and detection of *Campylobacter* in four batches of broilers from four different farms are summarized in **Table 1**.

One of the batches was negative to *Campylobacter* throughout the sampling for both kind of samples, and therefore it is not included in the table. *C. jejuni* was isolated in three out of four positive batches, while in the fourth batch both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated (either from cloacal swabs and caecal contents). In three out of the four *Campylobacter* positive farms, earliest detection was obtained in both caecal content and cloacal swabs.

However, in one farm, *Campylobacter* positive birds were first detected in cloacal swab samples (three positives out of 30 cloacal swabs, compared to 0 positives out of 30 caecal samples; Farm A). Also, when the earliest *Campylobacter* positive birds were detected, the percentage of positive samples obtained with cloacal swabs was higher than with caecal samples, although no statistically significant differences were found ($p = 0.066$). The number of *Campylobacter* positive birds per flock and sampling occasion by using cloacal swabs was equal to or higher than the number based obtained from caecal samples. From the overall samples analyzed, significantly greater number of positive birds was detected with cloacal swabs than with caecal samples ($p = 0.04$).

Table 1. *Campylobacter* spp detection from broilers at farm using two different matrices (caeca and cloacal swabs)

Farm A			Farm B			Farm C			Farm D		
Broiler age (days)	Caeca	Cloacal swabs	Broiler age (days)	Caeca	Cloacal swabs	Broiler age (days)	Caeca	Cloacal swabs	Broiler age (days)	Caeca	Cloacal swabs
1	0/10	0/10	1	0/10	0/10	1	0/10	0/10	1	0/10	0/10
6	0/30	0/30	9	0/30	0/30	8	0/30	0/30	6	0/30	0/30
14	0/30	3/30	13	0/30	0/30	16	0/30	0/30	12	0/30	0/30
20	20/30	26/30	23	19/30	24/30	21	0/30	0/30	19	0/30	0/30
			27	24/30	24/30	26	1/30	4/30	24	0/30	0/30
						30	20/30	20/29	28	22/30	26/30
									31	29/30	30/30

Within the chicken intestinal tract *Campylobacter* is most associated with the caeca, where it can reach numbers up to 10^9 CFU g^{-1} in caecal contents (Allen *et al.*, 2007). It would therefore be expected to detect *Campylobacter* more easily from caecal samples than from cloacal swab samples. However, detection was better when using cloacal swab samples, probably due to a lower regrowth of accompanying microbiota that, although not frequent when using mCCDA plates, can sometimes mask *Campylobacter* colonies hampering its detection. Other authors have reported that the sensitivity of caecal culture was higher than the sensitivity of the faecal culture (Woldemariam *et al.*, 2008); nevertheless samples were obtained at the end of the rearing cycle of the flock (at partial or final depopulation) at farm or at the slaughterhouse. Also, fewer faecal samples than caecal samples were obtained,

which may have decreased the herd sensitivity. On the other hand, the use of Amies with charcoal as transport medium for cloacal swabs protects campylobacters during transport, while bacteria in the caecal contents would have been exposed to air (thus reducing *Campylobacter* viable numbers). This can be an important issue, despite culture being performed immediately after reception or within 24 h, if the chickens are colonized with low numbers of *Campylobacter*, since it would have affected the overall number of positive samples.

Other sampling strategies for *Campylobacter* detection at farm level are used, such as boot swabs or boot socks (Bull et al., 2006). The use of boot swabs moistened in transport media can be an efficient alternative to caecal or faecal sampling at the farm (Vidal et al., 2013). This kind of sample has shown a good sensitivity and can be a good method for an early PCR detection of a *Campylobacter* positive flock, for monitoring purposes. However, it cannot be used to determine the within-flock prevalence or to study the dynamics of colonization at the farm, where single birds have to be sampled.

The present study shows that cloacal swab samples are adequate and sometimes even better than caecal samples for the early detection of *Campylobacter* in broiler flocks on the farm when using culture methods. In addition, the use of cloacal swabs allows obtaining samples without the need to euthanize any bird, which improves bird welfare. It also saves time during sampling at the farm and at the laboratory when processing samples and reduces the economic cost of testing for *Campylobacter*. Swab samples are, therefore, suitable for certain epidemiological studies at farm level, such as those of the dynamics of *Campylobacter* colonization in broilers, where frequent sampling of individual birds is performed and there is a need to isolate the bacteria instead of performing molecular detection of the pathogen.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support received from farmers and poultry companies participating in the study, as well as Teresa Ayats (CReSA) for technical support. This study was supported by the projects RTA2009-00117-00-00 (INIA) and CamCon (*Campylobacter* control-novel approaches in primary poultry production, funded by the European Community's Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under grant agreement no. 244547).



Study II.

Dynamics of *Campylobacter* spp. infection in Spanish broiler farms: a 2-year longitudinal study

Abstract

A longitudinal study was conducted in five conventional broiler farms during a 2 year period to determine the dynamics of *Campylobacter* infection in Spanish broiler flocks. Weekly sampling was performed in 63 flocks and *Campylobacter* spp. detection was assessed by PCR and culture methods. Samples were obtained from cleaned and disinfected houses prior to chick placement. During rearing, feed and water, chickens (30 cloacal swabs per house and sampling day), and the environments inside and outside the broiler houses were sampled at least once per week. Once all 30 sampled chickens were positive, the whole flock was considered colonized and the sampling finished. Thirty nine flocks (61.90%) became colonized during the growing period. No *Campylobacter* was detected prior to chick placement, neither in one day-old chicks nor in the water supply. However, weak *Campylobacter*-positive feed was detected in two flocks by PCR. First bird excreting *Campylobacter* was detected in 10 days-old chicks and the earliest a flock became positive was at 14 days-old, while the latest was at 39 days. Once *Campylobacter* was detected in chickens, the whole flock was colonized within 2 to 13 days. *Campylobacter* farm prevalence ranged from 53,8% to 83.3% in four out of five farms, while the remaining farm showed a lower prevalence (38.5%). Logistic regression model showed that infection with *Campylobacter* spp was more likely under higher minimal indoor temperature ($\beta= 0.452$; $P=0.008$) as well as at higher minimal outdoor relative humidity ($\beta= 0.106$; $P=0.005$). A significant effect of ventilation type was also found ($P= 0.021$). In all farms, positive and negative flocks were recorded throughout the year, and no clear farm effect or seasonality was observed. Improvements of biosecurity measures are needed in Spanish broiler farms, in order to prevent flock colonization and thus reduce the current high flock prevalence.

Introduction

Campylobacter spp. are a major cause of foodborne diarrhoeal illness in humans worldwide (WHO, 2011, Jacobs-Reitma, 2000, Humphrey et al., 2006). The high incidence of *Campylobacter* diarrhoea, as well as its duration and possible sequelae, makes it highly important from a socio-economic perspective (Havelaar et al., 2015; WHO, 2011).

In the EU, campylobacteriosis remains the most commonly reported foodborne disease, with 236,851 confirmed cases in 2014, which represents a 10% increase compared with 2013 (EFSA, 2016). The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimate that each year 845,024 cases of human campylobacteriosis occur in the United States (Scallan et al., 2011), and the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) indicates that about 14,3 cases are diagnosed each year for each 100,000 persons in the population. Many more cases go undiagnosed or unreported, and campylobacteriosis is estimated to affect over 1.3 million in the United States (CDC, 2012). *Campylobacter jejuni* is the main species identified and the most common predisposing factor to the peripheral neuropathies Guillain-Barré and Miller-Fisher syndromes (Winner, 2001; Leonard et al., 2004). In Spain, most broiler farms are infected with *Campylobacter* (EFSA, 2011), and its prevalence can exceed 75% during warmer months (Muñoz-Carneado et al., 2012).

Campylobacter spp. are carried in the intestinal tracts of all types of domestic livestock and many wild animals (Humphrey et al., 2007). Broiler meat may account for 20% to 30% of campylobacteriosis cases, while 50% to 80% may be attributed to the chicken reservoir as a whole (broilers as well as laying hens) (EFSA, 2011), and most infections originate in non-properly cooked chicken (Humphrey et al., 2007). Several studies have identified consumption of poultry as a risk factor for campylobacteriosis (Friedman et al., 2004, Wingstrand et al., 2006, Humphrey et al., 2007). Since not only many chickens are campylobacter-positive, but also contamination levels can be extremely high, there is an urgent need to reduce both the prevalence and the levels of carcass contamination. On-farm control measures to block the initial colonization are likely to be the most cost-effective. This is because intestinal contamination is the main source of broiler carcass contamination at the slaughterhouse, since campylobacters accumulate to high numbers in chickens, and may persist in the gut until slaughter age, increasing the subsequent spread during slaughter (EFSA, 2013a). However, before control can be properly implemented it is important to identify the sources and routes of infection in housed flocks. This is particularly relevant in the warmer southern Europe, where a higher *Campylobacter* flock prevalence

occurs throughout the year, compared to the colder northern countries, with a more marked seasonality. Also, there is scarce information regarding the epidemiology and dynamics of infection of *Campylobacter* on farm in southern Europe, compared to northern countries (Wingstrand et al., 2006; Hofshagen and Kruse, 2005; Hald et al., 2008). Different farming practices may also influence *Campylobacter* infection of broiler flocks, as may climatic conditions (McDowell et al., 2008).

Thus, a two year longitudinal study was carried out in five Spanish broiler farms with the aim of better understanding the epidemiology of *Campylobacter* in southern Europe, as well as to gain insight into the colonization dynamics and the influence of environmental factors in the infection and transmission of *Campylobacter* spp.

Materials and Methods

Study design

Five broiler farms, each belonging to one of the main broiler companies in Catalonia (northeastern Spain), with one of them being also the main broiler company in Spain where selected for a two-year longitudinal study. All of them had a breed, integrated system. Characteristics of the farm are depicted in **Table 1**.

Table 1. Characteristics of the broiler farms included in the study.

Farm	Num House	House age (yr)	Ventilation ^a	Size ^b	Capacity ^c	Bed Type
1	2	>15	natural	1.120 m ²	12.900- 15.500	Straw/ Shaving
2	1	10-15	forced	940 m ²	13.000- 15.000	Straw/ Shaving (pine)
3	1	6-10	forced	1.428 m ²	20.000- 25.596	Shaving (rec)
4	2	2-5	forced	2.900 m ²	40.000- 46.200	Shaving (grain)
5	2	>15	natural	2.190 m ²	24.052- 28.500	Rice husks

a) forced = transversal forced ventilation; b) size of each broiler house; c) capacity of each broiler house.

From June 2011 to October 2013, the longitudinal monitoring of all flocks produced in all five farms was performed by sampling both the birds and the external and internal environment of the houses. In those farms with more than one broiler house (2-broiler house farms), the intensive sampling was performed in one of the houses (study house), with additional boot sock sampling of the second house (neighbor house).

Sampling

○ **Boot socks and 1-day old chicks**

Boot socks sampling with a pair of boot socks was performed for the early detection of *Campylobacter* infection. Boot socks were previously moistened in sterile saline solution and worn over plastic overboots. Boot sock sampling was performed both outside (path leading to the study house) and inside the studied broiler houses (anteroom and broiler room), as well as inside the additional broiler houses (broiler room of the neighbor house) in the two-house farms. Inside each broiler house, boot sock sampling was performed by walking twice the whole broiler room at day 0 (cleaned and disinfected broiler houses prior to chick placement), upon 1 day-old chick placement, and weekly from day 7 (7 day-old chicks) until slaughter or until a boot sock was positive. From day 14 and subsequent weekly samplings, boot sock samples were taken from each of six areas covering the whole broiler room in the monitored broiler house. Samples were transported to the laboratory in a cool box and processed on the same day as collection.

Also, in order to confirm that day-old chicks were free of *Campylobacter* upon placement, 3 random samples of lining paper soiled with feces from crates in which chicks were transported were sent refrigerated to the laboratory for PCR detection of *Campylobacter* spp. (Katzav *et al.*, 2008).

○ **Cloacal swabs**

Once a boot sock sample was positive at the broiler room from the study house, cloacal swab samples were obtained from 30 live birds in each study house, by sampling 5 birds from six different areas covering the whole broiler room. Samples were collected at least every 7 days, and upon first *Campylobacter* isolation, the sampling frequency increased to every 2-4 days until all 30 cloacal swabs were positive. At that point, the flock was considered positive and sampling was ended. Negative flocks were sampled weekly until slaughter, with a maximum of 9 samplings per flock.

Cloacal swabs were transported in Amies with charcoal medium and processed in the laboratory individually, as described below.

○ **Feed**

Feed samples (~400g) were collected at each weekly visit to the farms from the automatic broiler troughs and further processed for *Campylobacter* detection as described below.

- **Water**

Samples of 300 ml of water were collected from the water tank in the anteroom and filtered through 0,45 µm membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). Filters were then aseptically transferred to 100 ml of Bolton broth in containers with a small headspace and tightly closed lids, and incubated at 37°C for 4h and at 42°C for 20h. After enrichment, 100 µl of the enrichment broth was streaked onto mCCDA agar plates and incubated at 42°C for 48h in a microaerobic atmosphere.

- **Litter**

Composite samples of litter from six areas of the study house were collected during the weekly visits to farms, for pH and moisture measurements.

***Campylobacter* detection**

- **DNA extraction**

Boot sock samples and lining paper soiled with feces (10 g) from one-day-old chicks were moistened with 0,85% sterile saline solution. The homogenate was let to settle for 10 minutes, and then 1 ml was collected and centrifuged at 13.000 rpm for 7 min. The supernatant was discarded and the pellet was processed for DNA extraction, that was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA), according to manufacturer recommendations. Composite samples of 10 g from day-old chicks lining paper soiled with feces, from crates in which chicks were transported were homogenized in 100 ml sterile saline solution and DNA extraction was performed as for boot sock samples.

DNA extraction from feed samples was performed similarly to boot sock samples. A 12 g of feed was weighed, suspended in 200 ml of sterile saline solution and 1 ml of the homogenate was used for DNA extraction.

- **PCR**

Campylobacter detection by PCR was performed by using the primer pairs C412F (5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3') and Camp R2 (5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3'), as described previously (Katzav *et al.*, 2008). These primers are based on the 16S rDNA, which generates an amplicon of 857 bp. Briefly, PCR amplification was performed in 25 µl containing 2,5 µl de DNA suspension, 12,5µl of a PCR master mix (Ref. M7502, Promega Corporation, Madison, USA), 2,5µl of BSA (1µg/µl) and 1µl (10 pmols/µl) of each forward

and reverse primers, and 5,5µl nuclease free water. The amplification was performed in a Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Singapore), and the conditions were: one cycle at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 7 min.

***Campylobacter* isolation and identification**

Once any boot sock sample from the study house was *Campylobacter* positive (by means of PCR detection), cloacal swabs were individually streaked onto *Campylobacter* blood-free selective agar (mCCDA, modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar, CM739 with selective supplement, SR0155E; Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at 42°C for 48h in a microaerobic atmosphere (Anaerocult C; Merck, Darmstadt, Germany). After incubation, mCCDA plates were examined for the presence of typical *Campylobacter* colonies. One to three typical colonies per sample were subcultured onto blood agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated at 37°C for 48 h. If different colony morphologies were found on a plate, at least one of each was picked and subcultured. Presumptive *Campylobacter*, not able to grow under aerobic conditions and catalase and oxidase positive were confirmed as *Campylobacter* spp. and identified at species level by PCR with primer pairs specific for *C. jejuni* and *C. coli* (Klena et al., 2004). Primers used were IpxA-C.coli (5'-AGA CAA ATA AGA GAG AAT CAG-3') and IpxA-C.jejuni (5'-ACA ACT TGG TGA CGA TGT TGT A-3') as forward primers and a common reverse primer IpxARKK2m (5'-CAA TCA TGD GCD ATA TGA SAA TAH GCC AT-3'), which generated amplicons of 331 pb and 391 for *C. jejuni* and *C. coli*, respectively.

Environmental measurements

- ***Litter pH***

To measure the litter pH, 3 g of litter was weighted, diluted in 60 ml of distilled water and vortexed. Samples were let to settle for 10 min and pH was measured.

- ***Litter moisture***

A 5 g sample of litter was weighted, dried at 105°C for 24h, cooled down and weighted again, in order to measure the moisture (%).

Relative humidity and temperature

At each farm visit, the relative humidity (RH) and maximum and minimum temperature inside and outside the broiler house were measured.

Statistical analysis

The event of infection by *Campylobacter* spp. in the studied batches was assessed by means of a logistic regression model, including the farm as a random effect. Covariates included in all models were type of bed, type of drinker, type of ventilation, season at bird placement, maximum and minimum RH of the bed, maximum and minimum pH of the bed, maximum and minimum outdoor as well as indoor temperature, maximum and minimum outdoor and indoor RH. All results were obtained using GLIMMIX procedure of the SAS System V.9.3 (SAS Institute Inc.). Significance level was fixed at 5%.

Results

Overall, 63 flocks were monitored (12 or 13 flocks per farm) in the five studied farms and 61,90% (39/63) of flocks were *Campylobacter* positive before slaughter. None of the farms remained consistently negative throughout the study period (**Table 2**). Overall prevalence per farm (isolation of campylobacters from cloacal swabs) was 53,85%, 69,23%, 66,67%, 38,46%, and 83,33% in farms 1 to 5, respectively. Boot sock sampling allowed the early detection of *Campylobacter* in all five farms. The average age at which flocks became positive was 21,74 d (boot sock detection), with the earliest detection of *Campylobacter* being at 7 d of age from boot socks (4 samples in 3 farms) and at 10 d from cloacal swabs (1 flock in 1 farm).

In all farms at least one flock had positive birds at 14 d, with an overall of 9 flocks being positive at 10-16 d. Both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated in all farms, with a number of flocks colonized with both bacteria in all but one farm (**Table 3**). *C. jejuni* was, however, the most commonly isolated species in four out of five farms.

The day before and the same day of chick placement, boot sock sampling of the study house was performed, in order to confirm that no *Campylobacter* was present. All these samples in all five farms were negative throughout the study. Also, as a control that one-day old chicks were *Campylobacter* negative, lining paper soiled with feces from crates in which chicks were transported were analyzed, and all samples were also negative.

Table 2. *Campylobacter* detection and isolation in the five studied farms during up to 13 rearing cycles.

Flock *	Farm 1			Farm 2		Farm 3		Farm 4			Farm 5		
	NH ^a	SH ^a	B ^b	SH ^a	B ^b	SH ^a	B ^b	NH ^a	SH ^a	B ^b	NH ^a	SH ^a	B ^b
F1	–	3/6 (34d)	34/37 ^c	1/6 (20d)	27/34	0/6 (35d)	–	1/1 (24d)	3/6 (28d)	28/31	1/1 (23d)	6/6 (23d)	23/27
F2	–	6/6 (26d)	26/30	5/6 (14d) ^d	14/20	5/6 (21d)	21/25	–	4/6 (14d)	14/21	–	5/6 (28d)	28/28
F3	–	5/6 (35d)	35/35	0/6 (29d)	–	4/6 (20d)	20/20	–	0/6 (26d)	–	–	2/6 (33d)	33/33
F4	1/1 (14d)	5/6 (14d)	14/14	0/6 (31d)	–	0/6 (29d)	–	–	0/6 (31d)	–	1/1 (22d)	6/6 (22d) ^d	22/28
F5	–	0/6 (32d)	–	6/6 (39d)	39/39	6/6 (14d)	14/17	–	1/1 (8d)	14/20	1/1 (21d)	1/6 (16d)	16/21
F6	1/1 (26d)	4/6 (26d)	30/30	5/6 (28d)	28/33	0/6 (28d)	–	1/1 (22d)	0/6 (28d) ^e	–	1/1 (14d)	3/6 (14d) ^d	–
F7	–	5/6 (28d)	28/31	1/6 (14d)	21/21	3/6 (29d)	29/37	–	0/6 (28d)	–	1/1 (20d)	6/6 (20d)	20/29
F8	–	1/6 (32d) ^d	–	0/6 (35d)	–	6/6 (31d)	31/31	–	4/6 (27d)	27/30	–	0/6 (27d)	–
F9	–	1/6 (27d)	–	2/6 (14d)	18/22	5/6 (14d)	14/17	–	0/6 (33d)	–	1/1 (23d)	6/6 (23d)	23/28
F10	–	0/6 (36d) ^e	–	1/1 (7d)	–	1/1 (7d)	14/14	–	0/6 (36d)	–	–	6/6 (21d) ^d	21/25
F11	–	0/6 (32d) ^e	–	5/6 (36d)	36/39	0/6 (28d)	–	–	0/6 (34d)	–	–	6/6 (20d)	20/31
F12	–	6/6 (19d)	19/22	6/6 (22d)	21/23	6/6 (20d)	20/33	–	1/1 (7d)	10/18	1/1 (20d)	5/6 (20d)	20/29
F13	–	0/6 (27d)	–	6/6 (21d)	21/26	–	–	–	0/6 (27d)	–	–	–	–

a) Boot sock samples (PCR detection): AR, Anteroom; NH, Neighbour house; SH, Study house.

b) B: Birds from study house, *Campylobacter* detection by direct culture from cloacal swabs.

c) Age 1st detection of a positive bird / age 30 birds positive.

d) Anteroom positive (boot socks): Farm 1: flock 8, 32d; Farm 2: flock 2, 14d; Farm 5: flock 4, 15d; flock 6 and 10, 21d.

e) Path leading to the study house positive (boot socks): Farm 1: flock 10, 21d and flock 11, 15d; Farm 4: flock 6, 22d.

* All water samples were negative. Feed samples positive: Farm 2, flock 9, 14d and 18d; Farm 4, flock 8, 21d.

Table 3. *Campylobacter* species isolated in the five studied farms.

	<i>C. jejuni</i> ^a	<i>C. coli</i>	Mixed infections
Farm 1	28,57% (2/7)	57,14% (4/7)	14,28% (1/7)
Farm 2	55,55% (5/9)	11,11% (1/8)	33,33% (3/9)
Farm 3	75,00% (6/8)	25,00% (2/8)	0
Farm 4	80,00% (4/5)	0	20,00% (1/5)
Farm 5	80,00% (8/10)	0	20,00% (2/10)

a) Frequency (%) of flocks colonized by *C. jejuni*, *C. coli*, or *C. jejuni* and *C. coli* (mixed infections). In parentheses, number of flocks/total infected flocks.

Only 3 boot sock samples from the path leading to the study house were positive (1,06%, 3/283); two in farm 1, with the broiler houses remaining negative throughout the rearing cycle, and one in farm 4, at the same time as the neighbor house, but the study house remained negative throughout the rearing cycle. Five positive samples were detected in the anterooms (1,76%, 5/283) at 14d, 21d and 32d; one in farm 1 at 32d, at the end of the rearing cycle with the flock being negative until slaughter, one in farm 2 at the same time as the study house, and three in farm 5 before or at the same time as in the broiler houses. Among the 5 farms, three of them were 2-house farms, and boot sock positive samples were detected in all neighbor houses, in addition to the study house (5,19%, 11/212): two positives in farm 1, two positives in farm 4, and seven positives in farm 5. Positives in the neighbor houses were usually detected before or at the same time as in the study houses. Farm 5 was the one with an overall higher *Campylobacter* prevalence throughout the study in both the study house and the neighbor house, and the one with the higher number of positive samples in the anteroom of the study house.

None of the 283 water samples tested was positive to *Campylobacter*. Only 3 samples (0,86%, 3/349) of feed were positive; those were in farm 2 (2 positives in flock 9, at the same time *Campylobacter* was first detected in boot socks and in cloacal swabs) and farm 4 (flock 8, before *Campylobacter* detection in boot socks or cloacal swabs).

In order to determine the speed of *Campylobacter* dissemination within a flock, once a cloacal swab was positive the farm was visited immediately for subsequent random sampling of 30 birds. The flock was considered positive once all 30 cloacal swabs were positive. Frequently, at first sampling of 30 birds, all swabs were positive and the speed of colonization could not be determined. In those flocks were more than one visit to farms could be performed before all 30 cloacal swabs were positive, the minimum timing for a flock becoming colonized was just two days (farm 2), with several flocks being colonized in

3-4 days in all farms. The maximum time for a flock becoming colonized was 13 days (farm 3).

Descriptive statistics is detailed in **Table 4**, with both qualitative data (infected flocks per farm, type of bed, type of drinker, type of ventilation and season at bird placement) and quantitative data (bed maximum and minimum RH and pH, outside and inside maximum and minimum temperature and RH). Logistic regression model showed that infection with *Campylobacter* spp was more likely under higher minimal indoor temperature ($\beta= 0.452$; $P=0.008$) as well as higher minimal outdoor RH ($\beta= 0.106$; $P=0.005$). Furthermore, a significant effect of type of ventilation was found ($P= 0.021$), where infection was more likely in those farms with natural ventilation than with either kind of forced ventilation, transversal + tunnel (OR=45.20, CIOR=3.18 to 643.20) or transversal (OR=8.20, CIOR=1.08 to 62.02). No influence of any other variable tested (type of drinker, type of bed, RH and pH of the bed, season at bird placement, maximum indoor and outdoor temperature and RH) was observed on *Campylobacter* colonization of flocks.

Discussion

In the present study, *Campylobacter* was detected in different samples (either boot socks or cloacal swabs) along a two-year longitudinal study carried out in five broiler farms. Both *C. jejuni* and *C. coli* were isolated in all farms, being *C. jejuni* the most commonly isolated species. Boot socks allowed the early detection of *Campylobacter* by means of PCR, a sampling and detection method that has proven to be highly sensitive (Matt et al., 2016). *Campylobacter*-positive boot socks sampled outside the broiler houses confirmed that *Campylobacter* might be present in the surrounding environment of the farms, which can play a role in the ingress and dissemination of the pathogen into broiler farms (Guerin et al., 2007b).

However, the notably low prevalence found in these samples suggests that this is not the main cause of broiler infection. On the other hand, the simultaneous detection of *Campylobacter* in the study and neighbor rooms, or positive samples in the anteroom at the same time as the study house or the neighbor house points out to a flaw or inadequate biosecurity at house level. This is in agreement with previous studies that report that *Campylobacter* is present in footwear, clothes, tools and other work equipment, as well as on workers hands or shoes, which represent an important source of contamination among broiler houses (Hald et al., 2001). Biosecurity is thus of utmost importance to prevent the introduction and transmission of *Campylobacter* in the farms. It has been reported that chickens remain free of *Campylobacter* the first two weeks of live, probably due to the

presence of maternal antibodies and favorable environment (Evans et al., 2000; Shreeve et al., 2000; Stern et al., 2001; Ridley et al., 2011).

Table 4. Descriptive statistics of broiler house parameters assessed in the five studied farms.

Parameters	Infected	Not infected	Total
Infected flocks per farm, n (%)			
Farm 1	7 (11,3)	6 (9,7)	13 (20,9)
Farm 2	8 (14,5)	4 (6,5)	12 (19,4)
Farm 3	8 (12,9)	4 (6,5)	12 (19,4)
Farm 4	5 (8)	8 (12,9)	13 (20,9)
Farm 5	10 (16,1)	2 (3,2)	12 (19,4)
Type of bed, n (%)			
wood shavings	17 (27,4)	9 (14,5)	26 (41,9)
rice husks	10 (16,1)	2 (3,2)	12 (19,4)
straw	11 (17,7)	10 (16,1)	21 (33,8)
Type of drinker, n (%)			
nipple with cup	31 (50)	18 (29)	49 (79)
nipple without cup	9 (14,5)	4 (6,5)	13 (21)
Type of ventilation, n (%)			
natural	19 (30,6)	6 (9,7)	25 (40,3)
forced transv.	16 (25,8)	8 (12,9)	24 (38,7)
forced transv.+tunnel	5 (8)	8 (12,9)	13 (21,0)
Season at bird placement, n (%)			
winter	6 (9,7)	7 (11,3)	13 (21)
autum	12 (19,4)	5 (8)	17 (27,4)
spring	11 (17,7)	4 (6,5)	15 (24,2)
summer	11 (17,7)	6 (9,7)	17 (27,4)
Bed max RH ^a	42,6 ± 9,7	45,7 ± 11,3	43,7 ± 10,3
Bed min RH	11,5 ± 4,5	11,5 ± 4,0	11,5 ± 4,3
Bed max pH ^a	8,4 ± 0,9	8,6 ± 0,8	8,5 ± 0,9
Bed min pH	6,2 ± 0,4	6,1 ± 0,5	6,2 ± 0,4
Ext. max T ^a	22,9 ± 8,1	21,6 ± 9,6	22,5 ± 8,6
Ext. min T	12,6 ± 6,6	9,6 ± 9,8	11,6 ± 7,9
Ext. max RH ^a	70,6 ± 14,7	72,0 ± 14,4	71,1 ± 14,5
Ext. min RH	44,7 ± 11,9	39,6 ± 12,1	42,9 ± 12,1
Int. max T ^a	31,8 ± 1,6	31,6 ± 1,4	31,7 ± 1,6
Int. min T	24,2 ± 3,0	23,1 ± 3,7	23,8 ± 3,2
Int. max RH ^a	70,6 ± 9,3	71,3 ± 7,5	70,8 ± 8,6
Int. min RH	46,1 ± 10,6	46,0 ± 10,7	46,1 ± 10,5

a) maximum and minimum relative humidity (RH) and pH of bed, and of temperature (T) and RH outside (ext) and inside (int) the broiler houses.

However, in this study using boot sock sampling and PCR detection of *Campylobacter*, the time at which a bird first became colonized (7-8 days) was significantly earlier than what has been previously reported in the literature and may reflect the highly sensitive boot sock detection method used in this study (Matt et al., 2016). This early detection of a positive bird was infrequent and the minimum age common for all farms in which we isolated *Campylobacter* (cloacal swab sampling) was 14d. This finding is in agreement with previous reports and confirms the hypothesis that birds become more sensitive to infections at two-weeks-old, when levels of maternal antibodies start to decrease (Stern et al., 2001). Almost all positive boot socks in the study room, lead to a subsequent isolation of *Campylobacter* from cloacal swabs. Only in a few cases (4 samples) we failed to isolate *Campylobacter*. A possible explanation for this could be the therapeutic use of antibiotics. Antibiotics are administered during the breeding period to control infections and such as APEC (Refrégier et al., 2001., WHO, 2011), which indirectly alters *Campylobacter* colonization. On the other hand a possible false positive result cannot be ruled out.

Caecal contents are commonly the sample of choice for *Campylobacter* detection and isolation, since it is where these bacteria accumulate the most in the gut (Lee & Newell, 2006; Allen et al., 2007). However, in a previous study, we determined that caecal contents and cloacal swabs were equivalent in sensitivity for the early *Campylobacter* detection and isolation (Urdaneta et al., 2015). Thus, in this study cloacal swabs were used, since it saves time in sample collection and processing at the laboratory, and avoids sacrificing birds.

The intensive sampling once a boot sock or a cloacal swab was *Campylobacter*-positive, allowed us to determine more precisely the speed of transmission within a flock in natural conditions, once *Campylobacter* colonized a bird. Thus, it was determined that a whole flock can become colonized as fast as in 2-4 days. This is faster to what has been previously reported, being less than one week (Ringoir et al., 2007) or 4.4 to 7.2 d after colonization of the first broiler (van Gerwe et al., 2009). Overall, between 2 to 13 days was the time required for a flock becoming colonized. These results supports previous studies which report that the time of colonization may vary between flocks, influenced by several factors that are still not clear (Cogan et al., 2007). Coprophagy is presumably a determinant factor in the fast dissemination of *Campylobacter* in the farms (Shreeve et al., 2000; Newell y Fearnley, 2003). Other factors such as fluctuation of the relative humidity and temperature, as well as the immunological condition of the birds, may have also an effect in the dynamics of colonization (Line et al., 2006; Cogan et al., 2007).

Horizontal and vertical transmission has been pointed out as a responsible of *Campylobacter* dissemination. Horizontal transmission has been identified in different sources (Hald et al., 2004; McDowell et al., 2008; Zweifel *et al.*, 2008; Ridley et al., 2011), while vertical transmission between reproductive flocks is still not clear (Cox et al., 2012; Callicott et al., 2006). In our study, the absence of *Campylobacter* DNA detection by PCR in one-day-old chicks confirms that vertical transmission is not relevant in the dissemination of this pathogen, which is in agreement with previous studies (Callicott et al., 2006; Newell and Fearnly, 2003; Bettersby et al., 2016). However, Marin et al., (2015) reported the detection of *Campylobacter* DNA (by qPCR) in 1-day old chicks in few flocks (although negative by conventional culture), thus suggesting a vertical transmission.

Some specific risk factors may have accounted for the overall higher *Campylobacter* prevalence in some of the studied farms. Those farms with natural air circulation system, manual windows (open most of the time) which also requested an extra human intervention compared to other farms, may have been at higher risk than those with forced ventilation. Also, there were farms placed next to a feed factory and a dog kennel facility, and cats circulating freely within the farm, or close to a cattle or swine farm; those farms where the ones which showed an overall higher *Campylobacter* prevalence. All of these have been reported as risk factors either for a higher presence of insects in the farm facilities or as reservoirs of *Campylobacter* (Hald et al., 2004 and 2008; Humphrey et al., 2007; Refrégier et al., 2001; Ridley et al., 2011).

The farm that showed an overall lower *Campylobacter* prevalence (Farm 4) was in fact the most modern one, with facilities and management that allowed a better biosecurity. On the contrary, the farm with the highest *Campylobacter* prevalence (Farm 5) was the farm with a higher number of positive samples in the anteroom and the neighbor house; these results points to a poor biosecurity which has led to this high *Campylobacter* flock prevalence. Besides, the natural ventilation of this farm together with its location in a windy area, may have posed this farm at a higher risk, with an increased ingress of insects through the inlets (Hald et al., 2008).

Water quality and its source have been reported as a risk factor for the colonization of *Campylobacter* (Newell y Fearnley; 2003; Guerin et al., 2007; Sparcks et al., 2009). Disinfection of water mainly by chlorine is important in order to inhibit all potential pathogens present in the water (Newell, D.G. 2002). In our study, all water samples analyzed were negative to *Campylobacter*. No statistical differences were found comparing the different water sources between the studied farms. Thus, the disinfection procedures

used in the different farms were successful for the elimination of potential *Campylobacter* sp. in the water.

Feed is not considered as a major source of contamination or introduction of *Campylobacter* (Wassenaar et al., 2011), but we wanted to clarify if this could be a potential factor implicated in the colonization of *Campylobacter*. In our study, only 0.86% of the feed samples were positive. Unfortunately, it was not possible to confirm if the feed was contaminated before or after the entry of birds in the broiler farm.

Logistic regression model showed that natural ventilation favored the *Campylobacter* colonization of birds, compared to forced ventilation. Natural air systems (windows open most of the time) favor the entry of *Campylobacter* by wind (Olsen et al., 2009) or by vectors (Hald et al., 2004; Templeton et al., 2010 and Ponce et al., 2005). Higher minimal indoor temperature and higher minimal outdoor RH were also detected as risk factors. It has been reported that *Campylobacter* decreases when temperature is above 20°C (Smith et al., 2016). However, high temperatures may cause stress in birds, which express higher levels of catecholamines (norepinephrine and epinephrine) in the blood, affecting the immune status of the animal by increasing susceptibility to infections (Line et al., 2006; Cogan et al., 2007). On the other hand, RH may affect *Campylobacter* survival, since these bacteria are sensitive to desiccation (Line, 2006).

In conclusion, several factors influence the presence of *Campylobacter* in broiler farms, but not all factors have the same relevance in the entry, colonization and dissemination of *Campylobacter*. In the present study, sampling methods allowed the earliest detection reported to date of a bird being naturally colonized by *Campylobacter*. Also, results show that a proper cleaning and disinfection during downtime is important, to guarantee the complete removal of *Campylobacter* if the flock has been colonized. This is to warrant a start of the new rearing cycle free of *Campylobacter*, since the main route of transmission is horizontal. Besides, strict but achievable biosecurity measures both at farm and house level are needed in Spanish broiler farms, in order to prevent flock colonization and thus reduce the current high flock prevalence. This has proven to be feasible in a pilot study recently carried out by our group.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support received from farmers and poultry companies participating in the study, Teresa Ayats (CReSA) for excellent technical and field work support, as well as Cresa field studies staff for support in the field work. This study was supported by the projects RTA2009-00117-00-00 (INIA) and CamCon (*Campylobacter* control - novel approaches in primary poultry production, funded by the European Community's Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under grant agreement no. 244547).



Study III.

House fly (*Musca domestica*) as a vector for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Spanish broiler farms.

Abstract

Campylobacter is the leading cause of human bacterial diarrhoeal disease worldwide. The primary source of infection is raw and undercooked poultry meat and products. High *Campylobacter* prevalence in EU broiler farms has proved difficult to prevent and flies may act as vectors contributing to its transmission to broiler chickens. However, this has not been studied in a warm climate such as southern Europe. Thus, the vector potential of flies (Diptera: Brachycera) for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on 5 Spanish broiler farms was evaluated in a longitudinal field study where 1304 flies were collected in the broiler houses surroundings and cultured for *Campylobacter* isolation. Additionally, direct PCR detection was performed from Bolton enrichment broths from a subset of samples. Overall, 22 flies were positive by culture (*C. jejuni*, n=18; *C. coli*, n=4). *Musca domestica* (house fly) was the most frequent (89.8%) fly species captured and the only species from which *Campylobacter* was isolated. The prevalence of positive flies detected by culture was 1.7% (22/1304) with a peak in September, where 31.8% (7/22) of all the positive flies were found. By PCR, overall prevalence was 10.5% (87/826), with a peak of 32.18% (28/87) of positives in August. The PCR-positive flies were mainly *M. domestica*, but also few *Ophyra* sp. (black garbage fly), *Calliphora* sp. (blow fly) and *Fannia canicularis* (lesser house fly). Most of the broiler flocks became *Campylobacter* positive around the same time or just after detecting *Campylobacter* in the sampled flies. Also, same PFGE profiles were found among *Campylobacter* isolates from flies and broilers during the same rearing cycle. A high number of flies ingress into broiler houses during a rearing cycle. Therefore, flies especially *M. domestica* near broiler houses constitutes a considerable risk for infection of broilers with *C. jejuni* and *C. coli*.

Introduction

Campylobacteriosis caused by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* is the most prevalent human bacterial intestinal infection worldwide, causing millions of cases of foodborne diarrhea in industrialized countries annually (Tauxe, 2001). In the European Union 236.851 confirmed cases were reported in 2014, with a significant increasing trend since 2008 (EFSA-ECDC, 2016). However, it has been estimated that only 2.1% of all cases are reported in the EU and that the true incidence of campylobacteriosis is about 9 million cases per year (EFSA, 2011). Also, campylobacteriosis can lead to a number of sequelae such as certain neuropathies (Skirrow, 1994).

These significant public health implications are coupled to an important economic burden, as the cost of campylobacteriosis to public health systems and to lost productivity is estimated to be around 2.4 billion euros each year across the EU (EFSA, 2011). Chicken meat is the main source of human campylobacteriosis, and may account for up to 70% of cases (Boysen et al., 2014). The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler chicken batches varies widely within the EU. Among the reporting countries in 2012, *Campylobacter* occurrence ranged from 4.3% to 83.6% for flock-based data, and from 1.6% to 62.1% for slaughter-based data (EFSA 2012). It has been suggested that the most cost-effective intervention measures to reduce campylobacteriosis in humans is the prevention of *Campylobacter* broiler flock colonization, and thus it has become a European food safety priority.

Transmission routes of *Campylobacter* in broiler farms are not fully understood. However, a role of flies in *Campylobacter* spp. epidemiology has been suggested (Rosef and Kapperud, 1983; Hald et al., 2004). More recently, studies in northern Europe have demonstrated that the influx of large numbers of flies to broiler houses constitutes a considerable risk for infection of broilers with thermophilic *Campylobacter* (Hald et al., 2008). This is because flies entering the broiler houses may pick up *Campylobacter* spp. in the outside farm environment from livestock feces or from pests, pets, and wild birds. Other environmental sources where flies and other insects may be accidentally contaminated with *Campylobacter* spp. include contaminated puddles, water supply and fomites (Kapperud et al., 1993; Stanley and Jones, 2003; Ramabu et al., 2004; Bull et al., 2006). Since hundreds of flies per day pass in large numbers through ventilation inlets into broiler chicken houses, it suggests that flies may be an important vector for *Campylobacter*, particularly during the warmer months of the year when they are more abundant (Hald et al., 2004 and 2007).

Most of the studies focusing on the role of flies as potential vectors of pathogens have been performed in northern Europe, especially those related with *Campylobacter*. Also, published data have dealt mostly with flies collected in broiler houses with *Campylobacter* spp.-infected chickens. Very few studies have been published in which flies from the outside environment have been examined for *Campylobacter* spp. (Hald et al., 2004; Hansson et al., 2007). Also, there are no field studies in a warmer climate such as southern Europe, assessing the potential role of flies as carriers of *Campylobacter* in broiler farms. Thus, the aim of this study was to assess the role of flies (Diptera: Brachycera) in the transmission of thermophilic *Campylobacter* from the surroundings into broiler houses, in Spanish broiler farms.

Materials and Methods

The study

The study was conducted in 5 broiler houses (on farms 1 to 5) and their immediate surroundings, located in Catalonia (Spain). Two houses had natural ventilation, while the remaining 3 farms had transversal negative-pressure ventilation. Farm 1 was located close to a dog boarding kennel, and nearby farm 2 there was a cattle farm. Overall, 23 broiler flocks were reared in the 5 houses during the study period.

Collection of flies and broilers sampling

Each broiler farm was visited twice per rearing cycle to capture the flies (8 to 10 visits per farm in total) from April to November of 2011 and 2012. Flies samplings were performed when chickens were about 14 and 28 days old. At each visit, up to 50 flies were collected outside the broiler houses (< 10 m periphery). Overall, 1.304 flies were captured individually, placed in disposable sterile plastic bags and transported refrigerated alive to the laboratory. Once at the laboratory, flies were anesthetized in CO₂, identified to genus or species level and subsequently processed for *Campylobacter* isolation. During the rearing cycle, each broiler flock was weekly sampled. Cloacal swab samples from 30 birds were obtained at each sampling for *Campylobacter* isolation.

Campylobacter detection by PCR and culture methods

Each individual fly was aseptically macerated in plastic bags with 2.5 ml Bolton broth (CM0983 with SR0183 and SR0048) (Oxoid, Basingstoke, UK), and incubated at 42°C for 24 h in 2 ml screw cap tubes. Next, 10 µl was directly streaked onto modified *Campylobacter* blood-free selective agar (mCCDA, modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar, CM739 with selective supplement, SR0155E; Oxoid, Basingstoke, UK). The inoculated plates were incubated at 42°C for 48 h under microaerobic conditions using a microaerobic atmosphere generator (Anaerocult[®] C, Merck, Darmstadt, Germany).

Up to four *Campylobacter*-presumptive colonies were subcultured onto blood agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C for 48 h in a microaerobic atmosphere. Isolates with Gram-negative gull-shaped cells and inability to grow under aerobic conditions at 37°C, were confirmed as *Campylobacter* spp. and identified at species level by PCR with

primer pairs specific for *C. jejuni* and *C. coli* (Klena et al., 2004). If more than one colony morphology was observed, representative colonies of these were picked. A sample was considered positive if at least one colony was confirmed by PCR.

In addition to *Campylobacter* isolation from flies, direct PCR detection from the enrichments in Bolton broth was performed in those samples collected on 2012. DNA was extracted using Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). The same multiplex PCR described above using primer pairs based on the *lpxA* gene and specific for *C. jejuni* and *C. coli* was used (Klena et al., 2004).

Cloacal swab samples from broilers were cultured onto mCCDA as described above, and suspected colonies were identified at the species level by PCR as for *Campylobacter* isolates from flies.

Genotyping of *Campylobacter* isolates

In order to determine the similarities of *Campylobacter* isolates from flies with those from the chickens of those flocks reared during the flies sampling period, all those isolates were genotyped by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Overall, 46 isolates from flies and 84 isolates from chickens were analyzed. ERIC-PCR was used as a screening technique in order to reduce the number of isolates from chickens to be tested by PFGE. For each *Campylobacter* species, when two or more isolates from the same sample showed the same ERIC-PCR band pattern, only one of them was selected for PFGE genotyping.

ERIC-PCR was performed as previously described (Antilles et al., 2015). PFGE was performed according to the PulseNet standardized protocol (www.pulsenetinternational.org), using *Sma*I restriction enzyme (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The resulting PFGE patterns were analysed using the Fingerprinting II v3.0 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Similarity matrices were calculated using the Dice coefficient and cluster analysis was performed by the un-weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Results

During the first year study, between one to two flocks per farm were sampled, while on the second year 3 flocks were sampled in all farms but one were four flocks were sampled (Table 1). The results of conventional culture showed that 22 out of 1.304 flies captured in the surroundings of the broiler houses were *Campylobacter* spp. positive (1,69%). During the period April to November 2011, 1,25% (6/478) of the captured flies were *Campylobacter* spp.- positive, and all positive flies were isolated from a single farm. Since during the first year sampling positive flies were found in only one farm, the second year both culture and PCR detection of *Campylobacter* spp. in flies were attempted.

During April to November 2012, *Campylobacter* spp. positive flies were captured in all five farms, with an overall 1.94% (16/826) of positive flies by culture and a 10.53% (87/826) of positives by PCR (Table 1). The higher *Campylobacter* prevalence in flies on 2012 was found in the single farm which was positive on 2011. Both *C. jejuni* (82%) and *C. coli* (18%) were isolated in the 22 positive flies, and no coinfection with both species was found. By culture methods, a peak of positive flies was found in September, where 31.8% (7/22) of all the positive flies were found. By PCR, the peak was found in August, with a 32.18% (28/87) of all the positive flies.

Table 1. Number of *Campylobacter*-positive flies per farm and year.

Farms	2011				2012					
	Flocks ^a	Total captures	Culture		Flocks	Total captures	Culture		PCR	
		Pos. ^b	%				Pos.	%	Pos.	%
Farm 1	2	191	0	0	3	171	2	1,16	13	7,6
Farm 2	2	146	6	4,1	3	153	10	6,53	20	13,07
Farm 3	1	61	0	0	3	181	1	0,55	16	8,84
Farm 4	1	48	0	0	4	196	1	0,51	25	12,75
Farm 5	1	32	0	0	3	125	2	1,6	13	10,4
Total	7	478	6	1,25	16	826	16	1,94	87	10,53

a) number of sampled flocks

b) number of *Campylobacter*-positive flies

The overall 1304 flies captured belonged to 14 genera or species of flies, but by far *Musca domestica* (house fly) was the most frequent (89.8%) fly species captured (Table 2) and the only species from which *Campylobacter* was isolated. The abundance of each fly species and the distribution of flies on each farm are shown in Table 2.

The PCR-positive flies were mainly *M. domestica*, but also few *Ophyra* sp. (black garbage fly, n=3), *Calliphora* sp. (blow fly, n=1) and *Fannia canicularis* (lesser house fly, n=2).

Among the five studied farms, *Campylobacter* positive flies (by culture) were captured in 10 rearing cycles, of which all but 2 of them were also *Campylobacter* positive. Those farms with a higher *Campylobacter* prevalence were also those where *Campylobacter* was isolated from flies in a higher number of flocks. Overall, 46 *Campylobacter* isolates from flies and 42 from broilers were analysed by PFGE. Results of PFGE typing showed that in two out of five farms, same macrorestriction profiles were found among isolates from flies and broilers at the same farm and from flies sampled either at the same time, before or after than the broilers (**Figure 1** shows the resulting dendrogram of one of the farms).

Table 2. Number of flies by family and species captured in broiler houses surroundings from April to November 2011/2012.

Fly family and species	Number of flies tested (No. positive) ^a					Total captures
	Farm 1	Farm 2	Farm 3	Farm 4	Farm 5	
Family Muscidae						
<i>Musca domestica</i> (house fly)	340 (2)	256 (16)	234 (1)	225 (1)	151 (2)	1206 (22)
<i>Ophyra</i> sp.	9	7	6	15	0	38
<i>Stomoxys calcitrans</i> (stable fly)	2	15	0	0	0	17
<i>Muscina stabulans</i> (false stable fly)	1	3	0	2	3	10
<i>Sarcophaga</i> sp. (flesh fly)	0	0	1	0	1	2
Family Calliphoridae						
<i>Phaenicia sericata</i> (little house fly)	0	9	0	0	1	10
<i>Lucilia illustris</i> (green bottle fly)	0	4	0	0	0	4
<i>Calliphora vicina</i> (blue bottle fly)	0	2	0	1	0	3
<i>Phormia regina</i> (black blow fly)	0	0	0	0	1	1
Family Fanniidae						
<i>Fannia canicularis</i> (lesser house fly)	9	1	1	1	0	13
Family Anthomyiidae						
<i>Anthomya</i> sp.	0	2	0	0	0	2
Family Milichidae						
	0	0	0	0	0	1
Other						
Acaliptrata	1	0	0	0	0	2

a) Number of *Campylobacter*-positive flies by culture, in brackets. Positive flies by PCR were: Farm 1, *Fannia canicularis* (1); Farm 4, *Calliphora* sp. (1), *Fannia canicularis* (1) and *Ophyra* sp. (3).

Discussion

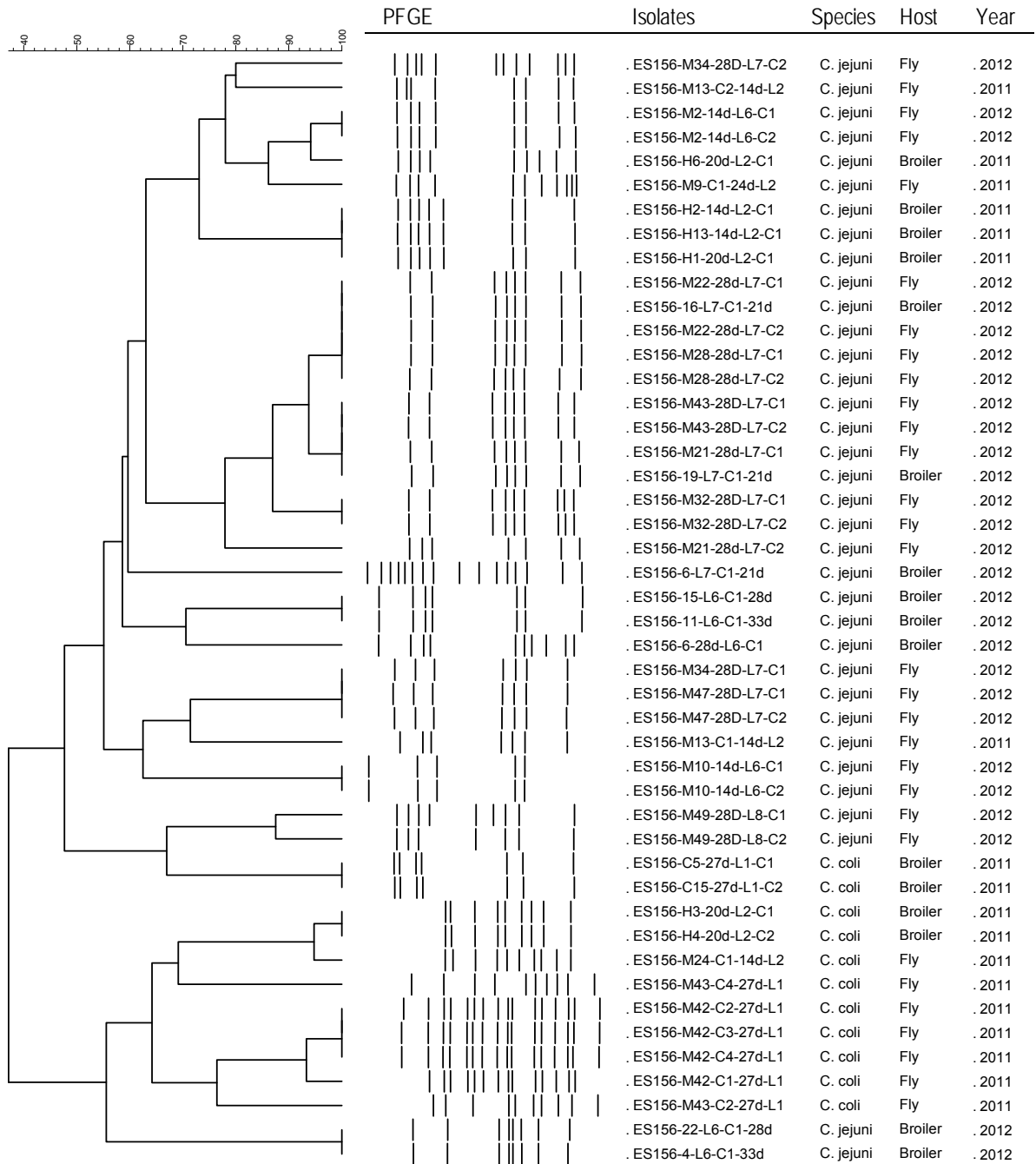
Several studies have pointed out that flies are important agents in the dissemination of numerous infectious diseases. Particularly in northern Europe, some studies have suggested that flies play a linking role in the epidemiology of *Campylobacter* spp. infections by transmitting *Campylobacter* spp. from fecal sources to poultry (Bahrndorff et al., 2013). This is the first study in southern Europe to investigate the prevalence of *Campylobacter* spp. in commercial broiler farms and demonstrating that flies captured in the outside environment nearby broiler houses are carriers of *C. jejuni* and *C. coli*. The prevalence of *Campylobacter*-positive flies was similar to what has been previously reported in Denmark (1.1%) and Sweden (1.0%) (Hansson et al, 2007; Hald. et al., 2008) but higher than in UK (0,22%) (Royden et al., 2016). Also, similarly to northern Europe countries (Rosef and Kapperud, 1983; Hald et al., 2008), house flies (*M. domestica*) were the most frequently captured fly species and the ones from were *Campylobacter* was most frequently detected or isolated. These flies are numerous during the summer period and are known to breed and forage in fresh feces where they pick up *Campylobacter* spp.

The house fly is associated with animal production as well as with human activities and can transmit several pathogens and diseases (Rosef and Kapperud, 1983; Shane et al., 1985; Hald et al., 2004). Besides *M. domestica*, other relevant flies in terms of abundance in the studied farms, although to a much lesser extent, included *Ophyra* sp., *Stomoxys calcitrans*, *Fannia canicularis* and *Phaenicia sericata*. *Campylobacter* was detected by PCR, but not by culture, from all of them except *Stomoxys calcitrans*, although at a very low prevalence. Similarly to house flies, most of these flies breed or feed on carrion and thus can also easily pick up *Campylobacter* and transmit it to the broilers.

Two flocks (each from a different farm) became *Campylobacter* positive around the same time or just after detecting *Campylobacter* in the sampled flies. In that flock which became positive after *Campylobacter* was isolated from a fly, the same macrorestriction PFGE fingerprint was found in isolates from a broiler and a fly. These results provide evidence that flies act as vectors for the ingress of *C. jejuni* and *C. coli* in Spanish broiler farms, similarly to previous reports in Denmark (Hald et al., 2004).

Thousands of flies can enter into the broiler houses through windows and ventilation inlets throughout the rearing cycle. The number of flies entering a broiler house may increase as the need for ventilation air increases as a consequence of the growth of chickens.

Figure 1. Dendrogram of PFGE profiles with *Sma*I of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from broilers and flies at a broiler Farm 2.



Thus, despite the low prevalence of *Campylobacter* spp. from flies, the risk of introducing the pathogen into a broiler house increases with the age of the chickens. Similarly, during the warmer season, there is an increased need of ventilation, and hundreds of flies per day pass through ventilation inlets into broiler chicken houses (Hald et al., 2004 and 2008). In this study, the peak of *Campylobacter*-positive flies occurred during the hottest summer months (August-September), while in countries with colder climates (Denmark) this increase has been reported earlier, in July (Hald et al., 2008). Contrary to northern Europe, in Spain with a warmer climate, the need for increased ventilation lasts for several months. Therefore, the risk of *Campylobacter* entrance to broiler houses through the flies is higher, since the peak season of flies lasts longer (6-7 months, compared to around 3 months in northern Europe).

The incidence of campylobacteriosis cases among humans has been shown to correlate with the prevalence of *Campylobacter* spp. among broiler chickens (Patrick et al., 2004). Hence, biosecurity measures both at farm and house level in broiler farms are of utmost importance to reduce the risk of infection of broiler flocks. During the peak season of flies in spring-summer in Spain, the use of fly screens to control fly entrance into broiler houses in those farms with an existing strict biosecurity, can be of relevance to reduce *Campylobacter* flock prevalence, and thereby reduce the risk of campylobacteriosis. The use of fly screens in Denmark has shown to reduce *Campylobacter* prevalence in broilers during summer (Bahrndorff et al., 2013).

This effectiveness of the fly screens has also been demonstrated in recent studies in Spain (Cerdà-Cuéllar et al., 2015). The use of fly screens may be of equal or greater value in warmer southern Europe, as the fly season is longer than in northern Europe.

In summary, the results of this study provide evidence that the presence of flies around broiler houses constitutes a substantial risk of *Campylobacter* spp. ingress into broiler houses and hence broiler flock infection. It also reinforces the importance of implementing strict biosecurity measures at house level in order to reduce *Campylobacter* prevalence on farm.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support received from farmers and poultry companies participating in the study, as well as Teresa Ayats (CReSA) for excellent technical support. This study was supported by the projects RTA2009-00117-00-00 (INIA) and CamCon (*Campylobacter* control - novel approaches in primary poultry production, funded by the European Community's Seventh Framework Programme, FP7/2007-2013, under grant agreement no. 244547).

Discusión General

La campilobacteriosis es la principal zoonosis bacteriana de transmisión alimentaria en la UE desde hace una década (EFSA, 2016). La principal fuente de infección es el consumo o manipulación de carne de pollo contaminada. Esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas a los EM debido a las bajas laborales y a gastos del servicio sanitario público. Debido a este importante impacto socio-económico, el control de *Campylobacter* en avicultura de carne es una prioridad en la UE. El principal problema radica en que, en general, las prevalencias de *Campylobacter* en granjas de *broilers* en la UE son muy elevadas, aunque hay diferencias importantes entre países. Dichas prevalencias oscilan entre un 13% a un 80%, siendo en los países nórdicos donde estas prevalencias son menores. En España en 2013 las prevalencias de *Campylobacter* en *broilers* fueron del 70% (EFSA, 2015).

Esta alta tasa de lotes de *broilers* colonizados por *Campylobacter* que llegan a matadero, junto con la elevada carga bacteriana en el intestino (de promedio 10^7 UFC/g de heces, y hasta 10^9 UFC/g en los ciegos), supone un elevado riesgo de contaminación de la canal durante el eviscerado. A ello hay que añadir un 5% de contaminación cruzada entre lotes durante el procesado en el matadero (EFSA, 2011). Todo ello hace que el riesgo de contaminación de la carne de *broilers* sea muy alta, en comparación con otras carnes frescas (pavo, cerdo, bovino) (EFSA, 2015). Es por esto que algunas organizaciones de salud a nivel mundial (WHO, EFSA, CDC) han sugerido que la reducción de las cifras de prevalencia de *Campylobacter* en granjas de *broilers*, sería la medida más efectiva y económica para reducir el número de casos en humanos. Pero para intervenir en la etapa de producción primaria mediante medidas efectivas, se requiere un buen conocimiento de la epidemiología de *Campylobacter*. A pesar de los numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años, aún se requiere profundizar en diversos aspectos. Entre ellos cabe destacar la dinámica de infección en granja, o los principales factores de riesgo a controlar, especialmente en países cálidos, donde se dispone de menos datos en comparación con países de clima más frío, como los países nórdicos.

Es bien conocido de las campilobacterias son microorganismos muy ubicuos en la naturaleza, sobreviven en hospedadores (aves y mamíferos) donde se multiplican y contaminan el medio ambiente a través de sus descargas fecales. Se han aislado de numerosas muestras ambientales de suelo, agua, pastos y heces de diferentes animales silvestres (Devane et al., 2005; Molina-López et al., 2011; Moore et al., 2005). Pero las aves (pollos y otros aves silvestres) por su elevada temperatura corporal (41- 42°C) son los hospedadores naturales de los *Campylobacter* termófilos (*C.jejuni* y *C. coli*), principales agentes etiológicos de la campilobacteriosis humana. Estas especies causan todos los años el 90% (*C. jejuni*) y 10% (*C. coli*) de los casos (EFSA, 2013a; Tauxe, 2001;). Los

Campylobacter termófilos se consideran parte de la microbiota intestinal normal de animales domésticos (Haruna et al, 2013; Roug et al., 2013), actuando los animales como portadores asintomáticos de estas bacterias, ya que aparentemente no manifiestan ninguna sintomatología y excretan grandes cantidades en heces (Hermans et al., 2012). Sin embargo, hay estudios que apuntan a que *C.jejuni* es un patógeno potencial en aves, porque produce una respuesta inflamatoria a nivel intestinal que provoca una diarrea, que predispone a daños a nivel de piel y patas debido a una yacija húmeda (Humphrey et al., 2014).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la interrelación existente entre aislados de *Campylobacter* spp. de aves de producción, fauna silvestre (en especial aves) y los seres humanos. En ellos, la comparación de genotipos de *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni*) indican que la mayoría de campilobacteriosis en el ser humano se deben a infecciones por cepas de *C. jejuni* que se encuentran habitualmente en animales de producción, especialmente aves (McCarthy et al., 2007; Manning et al., 2003; Schouls et al., 2003;). Otros estudios sugieren también que hay una circulación de cepas de *Campylobacter* en el medioambiente de las granjas, con una interacción directa entre los animales de producción y las aves silvestres (Colles et al., 2008).

La ecología de los *Campylobacter* termófilos es compleja, dada su ubicuidad en el medioambiente. El estudio de la interacción, directa o indirecta, entre los diferentes nichos puede ayudar a conocer mejor las múltiples potenciales fuentes de infección en aves de producción, y en particular *broilers*, lo cual permitirá una implementación de medidas efectivas en granja. Precisamente, tal como se ha mencionado anteriormente, para poder implementar dichas medidas, se requiere profundizar en diversos aspectos de la epidemiología de *Campylobacter* en granjas de *broilers*. Cabe destacar que, a diferencia de los países nórdicos y Reino Unido, existe muy poca información sobre la epidemiología de *Campylobacter* en aves de producción en el Sur de Europa, donde las condiciones ambientales son diferentes a las del norte. Ello determina un diferente tipo de infraestructuras, de manejos zootécnicos de las granjas avícolas, y en que las principales fuentes de contaminación pudieran ser muy variadas y persistentes. Es por ello que los estudios realizados en esta tesis se centraron en profundizar en los conocimientos de la epidemiología de *Campylobacter* en granjas de cría intensiva de *broilers*, mediante estudios por un largo periodo de tiempo (dos años) para evitar los efectos por variaciones ambientales debidos a la estacionalidad de *Campylobacter*.

Para llevar a cabo estos estudios en granja y en especial para el estudio de la dinámica de colonización de *Campylobacter* en *broilers*, se hizo necesario utilizar técnicas de muestreo

y procesado de muestras que fueran rápidas, económicas, y suficientemente sensibles y específicas para monitorear las colonizaciones en granja y detectar la presencia de *Campylobacter* de forma temprana en diferentes ambientes. Por un lado, se realizó la detección temprana de la excreción de *Campylobacter* o la presencia de la bacteria en diferentes ambientes de la granja, mediante toma de muestras de calzas y posterior detección por PCR. Este tipo de muestras y detección del patógeno ha demostrado ser una herramienta altamente sensible y específica (Matt et al., 2016). Por otro lado, dado que en el intestino de las aves donde *Campylobacter* se encuentra en mayor concentración es en los ciegos, suele ser habitual tomar este tipo de muestras para la detección del patógeno. No obstante, cuando estos muestreos deben realizarse en granja, ello implica el sacrificio de los animales. Por ello, se realizó un estudio para determinar la sensibilidad de un tipo de muestra diferente que no implicase dicho sacrificio. De este modo, se tomaron muestras de ciegos y de hisopos cloacales de *broilers* a diferentes edades, a lo largo de una o dos crianzas en cinco granjas diferentes, y se comparó la sensibilidad de ambas matrices. Los resultados mostraron que las muestras de hisopos cloacales son adecuadas o, en determinadas circunstancias, incluso mejores que las de ciegos, para la detección temprana de *Campylobacter* en los *broilers* en granja. Así, en los estudios longitudinales en granja se optó por la toma de muestras de hisopos cloacales de las aves, en lugar de ciegos, lo cual facilitó tanto el muestreo como el posterior procesado de las muestras en el laboratorio.

El estudio longitudinal durante dos años en cinco granjas de *broilers* permitió examinar en detalle la dinámica de colonización de *Campylobacter* en granja así como diversos factores de riesgo de colonización de las aves.

El aislamiento de *C.jejuni* y *C. coli* en altos porcentajes (82,05% y 35,90%, respectivamente, incluyendo las infecciones mixtas) a lo largo del estudio, probablemente refleja lo que se observa en clínica humana, donde la mayoría de casos confirmados son debidos a infecciones por *C. jejuni*, seguido de *C. coli*. Estos altos porcentajes demuestran que las infecciones por *Campylobacter* pueden ocurrir en todas las granjas avícolas intensivas del país, que la prevalencia de lotes positivos es alta (61,90%) y puede ser muy variables por granjas (38,5% a 83,3%). Estos resultados coinciden con los reportados por la EFSA entre los años 2005-2015 (EFSA, 2009; EFSA, 2016). Aunque las infecciones por *Campylobacter* fueron más frecuentes en los meses más calurosos (primavera, verano), no se pudo determinar con claridad la existencia de estacionalidad, como sucede en los países nórdicos. Ello es debido a que aunque los estudios fueron de larga duración, el número de granjas analizadas fue bajo, y de hecho el estudio no estaba particularmente diseñado para demostrar la presencia o no de dicha estacionalidad. No obstante, otro

estudio realizado en el marco del mismo proyecto que esta tesis (proyecto CamCon de la UE), donde analizamos todos los lotes producidos en 20 granjas durante 2 años (muestras de ciegos en matadero), permitieron determinar dicha estacionalidad. Observamos que en España dicha estacionalidad no es tan marcada como en los países nórdicos, y que de hecho el patrón es, en cierto modo, inverso al observado en el norte de Europa, con un clima más frío. Así, en el norte de Europa la prevalencia de *Campylobacter* en los lotes de *broilers* se mantiene baja (por debajo del 30%) a lo largo del año, con un pico de positivos durante el trimestre más cálido en verano (Bahrndorff et al., 2013). En cambio en España, las prevalencias se mantienen altas a lo largo del año (> 60-70%), con un descenso durante el trimestre más frío entre diciembre y febrero (Sommer et al., 2016).

Los muestreos durante el vacío sanitario y al inicio de crianza, donde no se detectó nunca *Campylobacter*, demostraron que una buena limpieza y desinfección durante el vacío sanitario, incluyendo el cambio de la yacija, mantienen las instalaciones libres de *Campylobacter* para la cría de un nuevo lote de *broilers*. Confirman que es un buen manejo zootécnico en comparación con la no sustitución de la yacija, pues estudios de supervivencia han demostrado que *C. jejuni* y *C. coli* pueden sobrevivir por unos 20 d en ella y es un factor de riesgo importante (Kassem et al., 2010). Por otro lado, la no detección de *Campylobacter* en ninguna de las muestras de pollitos de 1 d de vida demostró que no hubo transmisión vertical. Ello coincide con otros estudios, en los que tampoco se han encontrado evidencias de transmisión vertical (Battersby et al., 2015 y Callicott et al., 2006), siendo la transmisión horizontal la principal vía de propagación de este microorganismo (Jacobs-Reitsma et al., 1995; Newell y Wagenaar, 2000). Dicha transmisión horizontal se debe principalmente a fallos en las medidas de bioseguridad, tal como demostraron Callicott y col. (2006). Dichos autores, mantuvieron en instalaciones de cuarentena a pollos libres de *Campylobacter* por 8 semanas, que provenían de abuelas positivas y tan pronto fueron trasladados a instalaciones con menos bioseguridad, fueron rápidamente colonizados.

El suelo de los alrededores de las naves de pollos así como la antesala se ha descrito como una fuente de infección (Genigeorgis et al., 1986). No obstante, en nuestro estudio el porcentaje de muestras positivas a *Campylobacter* en este tipo de muestras fue muy bajo (1 a 2%). Ello puede ser debido a que realmente no supuso una fuente importante de *Campylobacter*, o quizás que la toma de muestras del calzado de los trabajadores hubiese reflejado mejor la transmisión horizontal de la bacteria, que se pudo constatar en las diferentes granjas a lo largo del estudio. En climas más húmedos sí que se detecta *Campylobacter* en los alrededores de las naves y más frecuentemente durante los meses más lluviosos, en invierno (Wright et al., 2015).

La evidencia de una transmisión de *Campylobacter* entre naves a lo largo del estudio denota una ausencia o deficiente bioseguridad en las granjas, especialmente a nivel de nave. La ausencia de limpieza y desinfección de manos, del calzado o de los instrumentos de trabajo cuando se pasa de una nave a otra son importantes factores de riesgo (Newell and Fernaley, 2003), y a lo largo del estudio pudimos constatar que era una práctica habitual en la mayoría de granjas que participaron en el estudio. Asimismo, mediante el estudio longitudinal con muestreos intensivos demostramos que la colonización y transmisión de *Campylobacter* se produce más pronto y rápido de lo descrito hasta la fecha (detección de la bacteria a los 7 d y transmisión a todo el lote en 2-4 d).

En general, el manejo y bioseguridad en las granjas estudiadas no era el adecuado para minimizar el riesgo de introducción de *Campylobacter* en las naves de pollos, lo cual quedó reflejado en las elevadas prevalencias encontradas. Ello es igualmente un reflejo de la situación de las granjas a nivel nacional. No obstante, en el norte de Europa se ha demostrado que la implementación de medidas de bioseguridad, incluyendo la instauración de una barrera higiénica en cada nave, es fundamental para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en granja (Hofshagen et al., 2005). Ello es igualmente factible en un país de clima cálido como el nuestro, incluso en condiciones subóptimas, tal como ha quedado demostrado en un estudio reciente (Cerdà-Cuéllar et al., 2015).

Un potencial factor de riesgo a tener en cuenta, sobretodo en países cálidos como España, son los insectos. Tal como se ha demostrado en diversos estudios en granjas de *broilers* del norte de Europa (Hald et al., 2004 y 2008), como en nuestro estudio en España, los insectos, y en particular determinadas especies de moscas, son un factor de riesgo de introducción de *Campylobacter* en las naves de pollos. Este riesgo se puede reducir fácilmente, instalando mosquiteras en las ventanas en aquellas granjas con ventilación forzada. Dicha actuación únicamente tiene sentido si en las granjas se han implementado previamente las suficientes medidas de bioseguridad, para bloquear otras posibles vías de entrada de *Campylobacter* más importantes dentro de las naves. La efectividad de las mosquiteras se demostró inicialmente en Dinamarca (Bahrndorff et al., 2013; Hald et al., 2007), países de clima frío y con naves más cerradas que en España, donde se requiere de mayor ventilación para mantener una temperatura adecuada en las naves. Recientemente en España, donde la temporada de moscas es más larga y por tanto el riesgo es más sostenido en el tiempo, se ha demostrado también su efectividad (Cerdà-Cuéllar et al., 2015).

Tal como queda reflejado en las múltiples publicaciones que existen al respecto, y tal como hemos visto en nuestros estudios, hay diversos factores que influyen en la colonización de los pollos, todos ellos relacionados con el nivel de bioseguridad en las granjas y el bienestar de las aves. Los más destacables se indican a continuación:

a) La infraestructura, el equipamiento y la antigüedad de las granjas, todo ello relacionado con la facilidad para mantener una limpieza adecuada de las instalaciones, tanto durante la crianza como durante el vacío sanitario (Ramadu et al., 2004; McDowell et al., 2008).

b) Los sistemas de ventilación. La ventilación natural, en comparación con la ventilación forzada, supone un mayor riesgo de colonización de *Campylobacter* en los *broilers*, posiblemente debido a que las ventanas permanecen la mayor parte del tiempo abiertas, facilitando la entrada aérea de *Campylobacter* (Olsen et al., 2009) o a través de vectores mecánicos como las moscas, escarabajos o cucarachas (Hald et al., 2004; Templeton et al., 2010 y Ponce et al., 2005). Por el contrario, las naves con sistemas de ventilación forzada y ventanas con trampillas, abren las ventanas por muy poco tiempo y manteniendo por más tiempo el hermetismo de la nave. Este sistema automatizado de ventilación, permite mantener una temperatura de confort en el interior de las naves a lo largo de la crianza, lo cual podría evitar el estrés térmico, que es un factor que influye en la predisposición de las aves a las infecciones bacterianas (Cogan et al., 2007).

c) La calidad y la fuente del agua se considera un factor de riesgo muy importante, ya que aves u otros animales silvestres pueden contaminar frecuentemente con sus heces este tipo suministro (Guerin et al., 2007b, Perez-Boto et al., 2010). Se trata de un factor de riesgo fácil de controlar, mediante el uso de cloro o peróxido con dosificadores automáticos para potabilizar el agua de bebida y los bebederos, que permiten mantener el agua libre de *Campylobacter* viables a lo largo de la crianza.

d) El alimento. A pesar de que no es una fuente habitual de introducción de *Campylobacter* a las naves (Wassenaar et al., 2011), es necesario tomar medidas para evitar su contaminación, tanto en el exterior como en el interior de las naves. Se debe de hacer una buena desinfección de todo el sistema de alimentación automática de los comederos (silos, ductos, tolvas y comederos) que garanticen la ausencia de la forma viable de este patógeno.

e) La temperatura y la humedad relativa. El aumento de la temperatura interna puede causar generalmente un estrés térmico en las aves, provocando liberación de catecolaminas y por consiguiente una depresión del sistema inmune, haciendo a las aves más susceptibles a la infección (Cogan et al., 2007), todo ello a pesar de que temperaturas

por encima de los 20°C, disminuyen la supervivencia de *Campylobacter* en el medio ambiente, tanto en cama como en las heces (Smith et al., 2016). Por otro lado, la HR alta puede impedir la disipación de calor y favorecer la supervivencia de las bacterias en el aire y la cama (Line, 2006). Sin embargo, recientemente Smith y col., (2016) no encontraron diferencias significativas para la supervivencia de *C. jejuni* al comparar diferentes condiciones de HR, durante un estudio de impacto de condiciones ambientales sobre la supervivencia de dicha bacteria en la yacija y las heces de *broilers*.

f) La presencia de otros animales domésticos dentro de la granja o en sus alrededores es otro factor de riesgo importante (van Giessen et al., 1996, Ridley et al., 2011, Zweifel et al., 2008). Esto es debido a que la mayoría de animales actúan como reservorios de *Campylobacter*, contribuyendo al mantenimiento de la bacteria en el medioambiente exterior de las naves de pollos.

g) La presencia de insectos y roedores. Tal como se ha comentado anteriormente, los insectos, y en especial algunas especies de moscas, actúan como vectores de introducción de *Campylobacter* en las naves. Los roedores, del mismo modo que otros animales, también pueden actuar como portadores de la bacteria, pudiendo entrar fácilmente dentro de las naves y contaminar a los pollos (Nichols, 2005; McDowell et al., 2008). Por ello, es importante mantener un control permanente con rodenticidas y mantener al máximo el hermetismo de las naves.

h) El vaciado parcial o aclarado hacia el final de la crianza. Esta práctica habitual en muchos países, persigue llevar al mercado animales de menor peso (en función de la demanda) y permitir que el resto de las aves tengan mayor espacio y se puedan bajar los parámetros de conversión alimentarios y mortalidad de los lotes. Sin embargo, se ha demostrado que es un factor de riesgo importante, aumentando notablemente la prevalencia de colonizaciones por *Campylobacter* en los animales que se mantienen en la nave hasta el vaciado final de la misma (Hald et al., 2001). Ello es debido a la introducción a las naves de equipos contaminados con la bacteria (cestas y carros de recolección) y a la entrada de personal a las naves, provocando una rotura de la barrera higiénica (Slader et al., 2002; Hansson et al., 2005 y 2010). Asimismo, esta actividad causa estrés en las aves, aumentando la susceptibilidad a ser colonizadas. Entre el vaciado parcial y el final de una nave suele transcurrir una semana, a lo sumo; ello es tiempo más que suficiente para que todo el lote sea colonizado, tal como hemos demostrado en nuestros estudios (velocidad de diseminación menor de 4 d).

Dado el amplio abanico de factores de riesgo, el objetivo de las medidas de bioseguridad es impedir la introducción de *Campylobacter* al interior de las naves de engorde y minimizar el riesgo de transmisión a las naves vecinas, una vez la bacteria ha colonizado la manada de una nave. A ello cabe añadir las medidas a tomar durante el transporte y el procesado en el matadero. Con todo ello se pretende: (i) reducir el número de lotes colonizados por *Campylobacter*, (ii) reducir el número de *Campylobacter* en las aves antes de ir a matadero; (iii) evitar la contaminación de lotes de pollos negativos que van a sacrificio.

Todas estas intervenciones tienen un coste, que puede ser diferente en cada país, y han sido objeto de estudio en diversos análisis de coste-beneficio (EFSA, 2011; Elliot et al., 2012). Estos costes son difíciles de extrapolar y son decisivos para la aceptación y aplicación de estas medidas por los ganaderos. Sin embargo, deben ser sopesados respecto al coste que causan las infecciones por *Campylobacter* todos los años a la salud pública de cada país (van Wegerber y van Horne, 2016).

Todas aquellas intervenciones que permitan mejorar la bioseguridad en puntos claves del sistema de producción primario son importantes para lograr la reducción de la prevalencia y niveles de *Campylobacter* en el producto final que llega al consumidor, y por tanto reducir los riesgos para la salud pública. No obstante, se requieren medidas adicionales de control y prevención complementarias a la bioseguridad, para lograr una reducción suficiente del patógeno. Estas medidas no están disponibles aún, encontrándose en fase de desarrollo o de evaluación experimental y con resultados desiguales: terapias con bacteriocinas, bacteriófagos, estrategias nutricionales (prebióticos y probióticos) y vacunas (Carvalho et al., 2010; El-Shibiny et al., 2009; Fischer et al., 2013; Gracia et al., 2015; Kittler et al., 2013; Meunier et al., 2015; Skanseng et al., 2010; Svetoch et al., 2008, 2010 y 2011; Stern et al., 2006; Wagenaar et al., 2005). La finalidad de la mayoría de ellas es promover una inmunidad humoral activa o tratar de reducir las cargas intestinales de *Campylobacter*, mediante exclusión competitiva o modificando las condiciones del hábitat intestinal.

A día de hoy, es difícil valorar cuáles serán las mejores estrategias para un control efectivo de *Campylobacter* en avicultura de carne, que permitan tanto una reducción significativa de la prevalencia en granja, como una reducción de la carga bacteriana en los lotes positivos. Seguramente la combinación de dos medidas (una vacuna y un aditivo en el pienso) junto con la aplicación de estrictas medidas de bioseguridad, podrían ser la clave para lograr este objetivo.

Según Romero-Barrios y col., (2013), puede esperarse un efecto acumulativo si se combina una vacuna y un aditivo para el pienso, que podrían reducir en $3 \log_{10}$ la carga en contenido cecal y reducir el riesgo de campilobacteriosis humana en más de 90%.

Las medidas de control en granja son imprescindibles para lograr minimizar el riesgo de contaminación de la canal durante el procesado en el matadero, y consecuentemente, el riesgo de infección en el consumidor. No obstante, también sería necesario implementar medidas a nivel de matadero y en el resto de la cadena alimentaria. Se ha estimado que someter las canales de pollos a tratamiento químico (ácidos orgánicos, bacteriocinas), o por un período de congelación corto o largo o mediante inmersión en agua caliente, podría reducir los casos de campilobacteriosis humana en un 37% a 98% (Romero-Barrios et al., 2013). La irradiación o cocinar la carne a escala industrial podría incluso eliminar la campilobacteriosis humana. Sin embargo, es bien conocido que estos procesos afectan generalmente la calidad de la carne. Por lo tanto, el control de *Campylobacter* en pollos de engorde a nivel de granja, sigue siendo la mejor estrategia de prevención de la campilobacteriosis, y podría ser muy beneficioso para la salud pública debido a su impacto a lo largo de toda la cadena alimentaria. Se ha estimado que una reducción del nivel de la colonización cecal en pollos entre 2 y $3 \log_{10}$, podría reducir el riesgo de campilobacteriosis humana entre un 76% a un 100% (Rosenquist et al., 2003).

Sin embargo, sin una adecuada campaña o políticas gubernamentales para concienciar a los ganaderos y las empresas integradoras de cada país, así como la necesidad de crear programas de bonificaciones, subsidios o financiación a los ganaderos, que permitan motivarlos y cubrir los costes de las intervenciones, será difícil ver a corto y mediano plazo una solución a esta complicada problemática que cada año afecta a millones de personas en todo el mundo.

Conclusiones

- 1.- En la detección temprana y aislamiento de *Campylobacter* en pollos de engorde en granja, las muestras de hisopos cloacales demostraron ser tan o más sensibles que las muestras de ciegos. Ello facilita tanto la toma de muestras como su posterior procesado.
- 2.- Las prevalencias de *Campylobacter* en las granjas estudiadas fueron elevadas, aunque con gran variabilidad entre granjas, oscilando entre un 38,46% y un 83,33%. En todas las granjas hubo lotes colonizados por *C. jejuni* o *C. coli*.
- 3.- El muestreo mediante calzas y posterior detección por PCR permitió confirmar la ausencia de transmisión vertical. Igualmente, permitió determinar, con más precisión que lo descrito hasta la fecha, la edad en que un pollo es colonizado por primera vez por *Campylobacter* en condiciones naturales, siendo ésta de tan sólo 7 días.
- 4.- El muestreo intensivo permitió establecer con exactitud la velocidad de transmisión de *Campylobacter* en un lote de pollos, una vez un individuo es colonizado. De este modo, se determinó que todo un lote puede llegar a ser colonizado en tan sólo 2 a 4 días, una diseminación mucho más rápida de lo se había descrito hasta la fecha.
- 5.- Los principales factores de riesgo que favorecen las colonizaciones de *Campylobacter* en las granjas estudiadas, están principalmente asociados a fallos de bioseguridad, infraestructura inadecuada, presencia de otros animales en granja o en las cercanías, el tipo de ventilación, e incrementos de temperatura y humedad relativa ambientales.
- 6.- La mosca común o doméstica (*Musca domestica*) en los alrededores de las naves de pollos constituye un factor de riesgo importante de introducción de *C. jejuni* y *C. coli* en las granjas de pollos en España.
- 7.- Es necesario implementar en España mejoras en las medidas de bioseguridad, tanto a nivel de granja como de las naves, para prevenir la colonización por *Campylobacter* en los lotes de pollos y en consecuencia, reducir las elevadas prevalencias existentes en granja.

Referencias

- Acuff, G.R., Vanderzant, C., Gardner, F.A. and Golan, F.A., 1982. Examination of turkey eggs, poults, and brooder house facilities for *Campylobacter jejuni*. J Food Prot 45: 1279-1281.
- Adak, G.K., Long, S.M., O'Brien, S.J., 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. Gut 51, 832-841.
- Adkin, A., Hartnett, E., Jordan, L., Newell, D. and Davison, H., 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers, J Appl Microbiol 100; 306-315.
- Alderton, M.R., Korolik, V., Coloe, P.J., Dewhirst, F.E. and Paster, B.J., 1995. *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. Int J Syst Bacteriol 45, 61-66.
- Allen, V.M., Bull, S.A., Corry, J.E.L., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J.A., Whyte, R., González, A., Elviss, N. and Humphrey, T.J., 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonization. Int J Food Microbiol 113, 54-61.
- Annamalai, T., Pina-Mimbela, R., Kumar, A., Binjawadagi, B., Liu, Z., Renukaradhya, G.J. and Rajashekara, G., 2013. Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. Poult Sci 92, 2201-2211.
- Antilles, N., Sanglas, A., Cerdà-Cuellar, M., 2015. Free-living waterfowl as a source of zoonotic bacteria in a dense wild bird population area in Northeastern Spain. Transb Emerg Dis 62:516-521.
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., Yamasaki, S., 2008. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. FEMS Immunology & Medical Microbiology 52, 260-266.
- Atabay, H.I., Corry, J.E., 1998. The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. Journal of Applied Microbiology 84, 733-740.
- Baggerman, W.I., Koster, T., 1992. A comparison of enrichment and membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh and frozen foods. Food Microbiology 9, 87-94.
- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., Hald, B., 2013. Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. Emerg Infect Dis 19(3):425-30. doi: 10.3201/eid1903.111593.

- Battersby, T., Whyte, P. and Bolton, D.J., 2016. The pattern of *Campylobacter* contamination on broiler farms; external and internal sources. *Journal of Applied Microbiology* 120, 1108-1118.
- Benjamin, J., Leaper, S., Owen, R.J. and Skirrow, M.B., 1983. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr Microbiol* 8, 231-238.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A.W., Dam-Deisz, W.D., Havelaar, A.H., Nagelkerke, N.J., Henken, A.M., 2004. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med* 62:35-49.
- Boysen, L., Rosenquist, H., Larsson, J.T., Nielsen, E.M., Sørensen, G., Nordentoft, S., Hald, T., 2014. Source attribution of human campylobacteriosis in Denmark. *Epidemiology & Infection* 142:1599-1608.
- Buckley, A.M., Wang, J., Hudson, D.L., Grant, A.J., Jones, M.A., Maskell, D.J. and Stevens, M.P., 2010. Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine* 28, 1094-1105.
- Bull, S.A., Allen, M.V., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J., Humphrey, T.J., 2006. Sources of *Campylobacter* spp. Colonizing Housed Broiler Flocks during Rearing. *Applied and Environmental Microbiology* p. 645-652
- Bull, S.A., Humphrey T., Ellis-Iversen. J., Cook A.J., Lovell. R., Jorgensen. F., 2008. Flock health indicators and *Campylobacter* spp. in commercial housed broilers reared in Great Britain. *Appl Environ Microbiol* 74: 5408-5413.
- Busvine, J.R. Disease transmission by insects. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1993.
- Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F., 1973. Related vibrio in stools. *The Journal of Pediatrics* 82, 493-495.
- Butzler, J.P., Skirrow, M.B., 1979. *Campylobacter* enteritis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 8, 737-765.
- Bovill, R.A., Mackey, B.M., 1997. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 143, 1575-1581.
- CDC (2012) www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/
- Callicott, K.A., Friethriksdottir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J.R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hielt, K.L. et al., 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol* 72, 5794-5798.

- Carrillo, C.D., Taboada, E., Nash, J.H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P.C., Verhulp, R., Mykytczuk, O., Sy, J., Findlay, W.A., Amoako, K., Gomis, S., Willson, P., Austin, J.W., Potter, A., Babiuk, L., Allan, B., Szymanski, C.M., 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 20327-20338.
- Carvalho, C.M., Gannon, B.W., Halfhide, D.E., Santos, S.B., Hayes, C.M., Roe, J.M. and Azeredo, J., 2010. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol* 10, 232.
- Cawthraw, S.A. and Newell, D.G., 2010. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis* 54, 86-93.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D.A., Urlings, H.A., Lipman, L.J., van Knapen, F., 2002. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poult Sci* 81(5):621-628.
- Cerdà-Cuéllar, M., Laureano, L., Ayats, T., Corujo, A., Hald, Birthe, Dolz, R., 2015. Efficacy of biosecurity measures in Spanish broiler farms to prevent thermophilic *Campylobacter* colonization. *Proceedings of the 18th International workshop on Campylobacter, Helicobacter & Related Organisms - CHRO 2015: Delegate Handbook*. New Zealand, p. 89.
- Chen, L., Geys, H., Cawthraw, S., Havelaar, A., Teunis, P., 2006. Dose response for infectivity of several strains of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Risk Anal* 26:1613-21.
- Chmielewski, R., Wieliczko, A., Kuczkowski, M., Mazurkiewicz, M.M.U., 2002. Comparison of ITS profiling, REP and ERIC-PCR of *Salmonella enteritidis* isolates from Poland. *Journal of Veterinary Medicine B* 49, 163-168.
- Clark, A.G., 1986. The effect of toxigenic and invasive human strains of *Campylobacter jejuni* on broiler hatchability and health. *Proc 35th West Poult Dis Conf*, pp. 25-27.
- Clark, J.D., Oakes, R.D., Redhead, K., Crouch, C.F., Francis, M.J., Tomley, F.M. and Blake, D.P., 2012. Eimeria species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine* 30, 2683-2688.
- Cloekaert, A., 2006. Introduction: emerging antimicrobial resistance mechanisms in the zoonotic foodborne pathogens *Salmonella* and *Campylobacter*. *Microbes and Infection* 8, 1889-1890.

- Cogan, T.A., Thomas, A.O., Rees, L.E.N., Taylor, A.H., Jepson, M.A., Williams, P.H., Ketley, J., Humphrey, T.J., 2007. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 56:1060-1065.
- Colles, F.M., Dingle, K.E., Cody, A.J., Maiden, M.C.J., 2008. Comparison of *Campylobacter* populations in wild geese with those in starlings and free-range poultry on the same farm. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3583-3590.
- Cox, N.A., Richardson, L.J., Maurer, J.J., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, .P.J., Buhr, R.J., Byrd, J.A., Lee, M.D., Hofacre, C.L, O'Kane, P.M., Lammerding, A.M., Clark, A.G., Thayer, S.G., Doyle, M.P., 2012. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *J Food Prot* 75:1896-1902.
- Debretsion, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Nganwa, D., Yehualaeshet, T., 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Molecular and Cellular Probes* 21, 177-181.
- Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P., 2005. "Taxonomy of the family Campylobacteraceae," In *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M. J. (Eds.). American Society for Microbiology press, Washington, D. C. 3-27.
- Debruyne, L., On, S.L., De Brandt, E., Vandamme, P., 2009. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1126-1132.
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstrom, S., Olsen, B., On, S.L., Vandamme, P., 2010a. *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 815-819.
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstrom, S., Olsen, B., On, S.L., Vandamme, P., 2010b. *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1870-1875.
- Deckert, A., Valdivieso-Garcia, A., Reid-Smith, R., Tamblyn, S., Seliske, P., Irwin, R., Dewey, C., Boerlin, P., McEwen, S.A., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken in two health units in Ontario. *J Food Prot* 73 (7):1317-24.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J., 1972. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 125, 390-392.

- Davane, M.L., Nicol, C., Ball, A., Klena, J.D., Scholes, P., Hunbson, J.A., Baker, M.G., Gilpin, B.J., Garrett, N., Savill, M.G., 2005. The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J Appl Microbiol* 98 (4):980-90.
- Doyle, L.P., 1944. A vibrio associated with swine dysentery. *American Journal of Veterinary Research* 5, 3-5.
- Doyle, M.P., 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl Environ Microbiol* 47: 533-536.
- Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainer, W., Bates, M., 1997. Campylobacteriosis in New Zealand: results of a case-control study. *Journal of Epidemiology and Community Health* 51, 686-691.
- EFSA, 2006. Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs. Spain.
- EFSA, 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223.
- EFSA, 2011. Panel on Biological Hazards, Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain, *EFSA Journal*. 9:2105-2245.
- EFSA, 2012. European Food Safety Authority, 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 2010; *EFSA Journal*; 10: 2597.
- EFSA, 2013a. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*; 11, 3129-3379.
- EFSA, 2015. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13: 3991.
- EFSA, 2016. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*; 13: 4329.

- Elliott, J., Lee, D., Erbilgic, A., Jarvis, A., 2012. Analysis of the Costs and Benefits of Setting Certain Control Measures for Reduction of *Campylobacter* in Broiler Meat at Different Stages of the Food Chain. ICF GHK in association with ADAS, London, UK, p. 105.
- El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metawea, Y., Connerton, P. and Connerton, I., 2009. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. J Food Prot 72: 733-740.
- Escherich, T., 1886. Articles adding to the knowledge of intestinal bacteria, III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies. Münchener medizinische Wochenschrift 33: 815-817.
- Etoh, Y., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Yamamoto, A., Goto, N., 1993. *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. International Journal of Systematic Bacteriology 43, 631-639.
- Evans, S.J. and Sayers, A.R., 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Preventive Veterinary Medicine 46: 209-223.
- Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S., Vila, J., 2008. Quinolone resistance in the food chain. J Antimicrob Agents 31(4):307-15.
- Ferrero, R.L., Lee, A., 1988. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. Journal of General Microbiology 134, 53-59.
- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G. and Glunder, G., 2013. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. PLoS One 8, e78543.
- Fox, J.G., Taylor, N.S., Edmonds, P. and Brenner, D.J., 1988. *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* subsp. nov. isolated from the gastric mucosa of ferrets (*Mustela putorius furo*), and an emended description of *Campylobacter pylori*. Int J Syst Bacteriol 38, 367-370.
- Fox, J.G., Chilvers, T., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I. and Brenner, D.J., 1989. *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. Int J Syst Bacteriol 39: 301-303.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. Epidemiologic Perspectives and Innovations 2: 10.

- Friedman, C.R., Hoekstra, R.M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., Reddy, S., Ahuja, S.D., Helfrick, D.L., Hardnett, F., Carter, M., Anderson, B., Tauxe, R.V., 2004. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 38: S285-S296.
- Fitzgerald, C., Tu, Z. C., Patrick, M., Stiles, T., Lawson, A. J., Santovenia, M., Gilbert, M. J., van Bergen, M., Joyce, K., Pruckler, J., Stroika, S., Duim, B., Miller, W. G., Loparev, V., Sinnige, J. C., Fields, P. I., Tauxe, R. V., Blaser, M. J. and Wagenaar, J. A., 2014. *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 2944-2948.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Lawson, P.A., Thorne, P., Byrer, D.E., Ross, H.M., Xerry, J., Thompson, P.M., Collins, M.D., 2004. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2369-2373.
- Frederick, A., Huda, N., 2011. Salmonellas, poultry house environments and feeds: A review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 679-685.
- Fullerton, K., Oz Food Net Working Group., 2008. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the Oz Food Net Network, 2007. *Commun Dis Intell Q Rep* 32:400-24.
- Gebhart, C.J., Edmonds, P., Ward, G.E., Kurtz, H.J. and Brenner, D.J., 1985. "*Campylobacter hyointestinalis*" sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J Clin Microbiol* 21: 715-720.
- Genigeorgis, C., Hassuneh, M., Collins, P., 1986. *Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat during slaughtering. *J Food Prot* 49, 896-903.
- Gibbens, J.C., Pascoe, S.J., Evans, S.J., Davies, R.H. and Sayers, A.R., 2001. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Prev Vet Med* 48, 85-99.
- Gilbert, M. J., Kik, M., Miller, W. G., Duim, B. and Wagenaar, J.A., 2015. *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 975-982.
- Glünder, G., Spiering, N. and Hinz, K., 1997. Investigations on parenteral immunization of chickens with a *Campylobacter* mineral oil vaccine. In *COST Action 97 Pathogenic micro-organisms in poultry and eggs* eds. Nagy, B. and Mulder, R., pp. 247-253. Budapest, Hungary.
- Godschalk, P.C.R., Heikema, A.P., Gilbert, M., Komagamine, T., Ang, C.W., Glerum, J., Brochu, D., Li, J.J., 2004. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* 114, 1659-1665.

- Gracia, M.I., Mill'an, C., Sanchez, J., Guyard-Nicod`eme, M., Mayot, J., Y. Carre, Y., A. Csorbai, A., Chemaly, M. and Medel, P., 2015. Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period: Part B Poultry Science 00:1-7
- Griffiths, P.L., Park, R.W., 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. The Journal of Applied Bacteriology 69, 281-301.
- Guerin, M.T., Wayne, M., Reiersen, J., Berke, O., McEvan, S.A., Bisailon, J.R. and Lowman, R., 2007a. House-level risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. BMC Veterinary Research 3:30.
- Guerin, M.T., Wayne, M., Reiersen, J., Berke, O., McEvan, S.A., Bisailon, J.R. and Lowman, R., 2007b. A farm-level study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. Acta Vet Scand 49, 18.
- Hald, B., Rattenborg, E. and Madsen, M., 2001. Role of batch depletion of broiler houses on the occurrence of *Campylobacter* spp. in chicken flocks. Lett Appl Microbiol 32:253-256.
- Hald, B., Skovgård, H., Duong Bang, D., Pedersen, K., Dybdahl, J., Jespersen, J.B. and Madsen, M., 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. Emerg Infect Dis 10(8):1490-92.
- Hald, B., Sommer, H.M. and Skovgård, H., 2007. Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. Emerg Infect Dis 13:1951-1953.
- Hald, B., Skovgard, H., Pedersen, K. and Bunkenborg, H., 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. Poult Sci 87:1428-1434.
- Hansson, I., Ederoth, M., Anderson, L., Vågsholm, I. and Olsson Engvall, E., 2005. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. J Appl Microbiol 99, 1149-1157.
- Hansson, I., Vågsholm, I., Svensson, L. and Olsson, E., 2007. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. J Appl Microbiol 103:640-649.
- Hansson I., Engvall, E.O., Vågsholm, I., Nyman, A., 2010. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter*-positive broiler flocks in Sweden. Prev Vet Med 96, 114-21.
- Haruna, M., Sasaki, Y., Murakami, M., Asai, T., Ito, K., Yamada, Y., 2013: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from beef cattle and pigs in Japan. Journal of Veterinary Medical Science 75, 625-628.

- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. PLoS Med 3;12(12): e1001923.
- Hendrixson, D.R., DiRita, V.J., 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. Mol Microbiol 52(2):471-84.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K. and Haesebrouck, F., 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. Vector Borne Zoonotic Dis 12, 89-98.
- Hermans, D., Van Steendam, K., Verbrugge, E., Verlinden, M., Martel, A., Seliwiorstow, T., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., De Zutter, L., Deforce, D. and Pasmans, F., 2014. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. Vet Res 45, 27.
- Hofshagen, M. and Kruse, H., 2005. Reduction in the flock prevalence of *Campylobacter* spp. in broilers in Norway following the implementation of an action plan. J Food Prot 68 (10): 2220-2223.
- Høg, B., Sommer, B., Larsen, H.M., Sørensen, L.S., David, A.I., Hofshagen, B., Rosenquist, H., 2016. Farm specific risk factors for *Campylobacter* colonisation in Danish and Norwegian broilers. Prev Vet Med 1;130:137-45. doi: 10.1016/j.prevetmed. 2016.04.002. Epub 2016 Apr 5.
- Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C., 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and coli in animals. Anaerobe 15 (1-2):18-25
- Huang, J.L., Yin, Y.X., Pan, Z.M., Zhang, G., Zhu, A.P., Liu, X.F. and Jiao, X.A., 2010. Intranasal immunization with chitosan/pCAGGS-flaA nanoparticles inhibits *Campylobacter jejuni* in a White Leghorn model. J Biomed Biotechnol, Article ID 589476, 8 pages.
- Hulton, C.S., Higgins, C.F., Sharp, P.M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other enterobacteria. Molecular Microbiology 5, 825-834.
- Humphrey, T., 2006. Are happy chickens safer chickens. Poultry welfare and disease susceptibility. British Poultry Science Volume 47, Number 4, pp. 379-391.
- Humphrey, T., O'Brien, S. and Madsen, M., 2007. Review: Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol 117, 237-257.

- Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K., Davidson, N., Williams, N., Kipar, A., Humphrey, T. and Wigley, P., 2014. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. MBio 5, e01364-01314.
- Inglis, G.D., Hoar, B.M., Whiteside, D.P., Morck, D.W., 2007. *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 2636-2644.
- ISO (International Organization for Standardization), 2006. ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method.
- Jackson, D.N., Davis, B., Tirado, S.M., Duggal, M., van Frankenhuyzen, J.K., Deaville, D., Wijesinghe, M.A., Tessaro, M., 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. Antonie Van Leeuwenhoek 96, 377-394.
- Jacobs-Reitsma, W.F., van de Giessen, A.W., Bolder, N.M., Mulder, R.W., 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. Epidemiol Infect 114:413-21.
- Jacobs-Reitsma, W.F., 2000. *Campylobacter* in the food supply, in: Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Eds.), *Campylobacter*, 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC, 467-481.
- Jagannathan, A., Penn, C., 2005. "Motility," in *Campylobacter*. Molecular and Cellular Biology. Ketley J. M., Konkel M. E., (Eds). Norfolk: Horizon Bioscience, 331-347.
- Janez, N. and Loc-Carrillo, C., 2013. Use of phages to control *Campylobacter* spp. J Microbiol Methods 95, 68-75.
- Johnsen, G., Kruse, H. and Hofshagen, M., 2006. Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. Journal of Applied Microbiology 101; 1130-1139.
- Jones, F.S., Orcutt, M., Little, R.B., 1931. Vibrios (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. The Journal of Experimental Medicine 53, 853-863.
- Kapperud, G., Rosef, O., 1983. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway. Applied and Environmental Microbiology 45, 375-380.
- Kapperud, G., E. Skjerve, L. Vik, K. Hauge, A. Lysager, I. Aalmen, S. M. Ostroff, and M. Potter. 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. Epidemiol Infect 111:245-255.

- Kang, Y.S., Cho, Y.S., Yoon, S.K., Yu, M.A., Kim, C.M., Lee, J.O., Pyun, Y.R., 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken meat and human stools in Korea. *J Food Prot* 69(12):2915-23.
- Kassem, Il., Sanad, Y., Gangaiah, D., Lilburn, M., Lejeune, J., Rajashekara, G., 2010. Use of bioluminescence imaging to monitor *Campylobacter* survival in chicken litter. *J Appl Microbiol* 109(6):1988-97.
- Katzav, M., Isohanni, P., Lund, M., Hakkinen, M., Lyhs, U., 2008. PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. *Food Microbiology* 25, 908-914.
- Kelly, D.J., 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 90: 16S-24S.
- Ketley, J.M., 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143, 5-21.
- Khoury, C.A. and Meinersmann, R.J., 1995. A genetic hybrid of the *Campylobacter jejuni* flaA gene with LT-B of *Escherichia coli* and assessment of the efficacy of the hybrid protein as an oral chicken vaccine. *Avian Dis* 39, 812-820.
- Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Nicholson, M.A., Baker, C.N., Patton, C.M., Steigerwalt, A.G. and Wachsmuth, I.K., 1991. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J Clin Microbiol* 29, 376-385.
- Kidd, T.J., Grimwood, K., Ramsay, K.A., Rainey, P.B., Bell, S.C., 2011. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 263-268.
- Kittler, S., Fischer, S., Abdulmawjood, A., Glunder, G. and Klein, G., 2013. Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 79, 7525-7533.
- King, E.O., 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio* isolated from cases of human vibriosis. *The Journal of Infectious Diseases* 101, 119-128.
- Klena, J.D., Parker, C.T., Knibb, K., Ibbitt, J.C., Devane, P.M., 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. *J Clin Microbiol* 42, 5549-57.

- Koolman, L., Whyte. and Bolton, D.J., 2014. An investigation of broiler caecal *Campylobacter* counts at first and second thinning. *Journal of Applied Microbiology* 117, 876-881.
- Koziel, M., O'doherty, P., Vandamme, P., Corcoran, G. D., Sleator, R. D. and Lucey, B., 2014. *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). *Int. J Syst Evol Microbiol* 64, 2878-2883.
- Kuroki, S., Haruta, T., Yoshioka, M., Kobayashi, Y., Nukina, M., Nakanishi, H., 1991. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 10, 149-151.
- Laniewski, P., Kuczkowski, M., Chrzastek, K., Wozniak, A., Wyszynska, A., Wieliczko, A. and Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2014. Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA protein delivered by *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 281-292.
- Layton, S.L., Morgan, M.J., Cole, K., Kwon, Y.M., Donoghue, D.J., Hargis, B.M. and Pumford, N.R., 2011. Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin Vaccine Immunol* 18, 449-454.
- Lawson, G.H.K., Leaver, J.L., Pettigrew, G.W. and Rowland, A.C., 1981. Some features of *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* subsp. nov., nom. rev. and their taxonomic significance. *Int J Syst Bacteriol* 31, 385-391.
- Lawson, A.J., On, S.L., Logan, J.M., Stanley, J., 2001. *Campylobacter hominis* sp. from the human gastrointestinal tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 651-660.
- Lee, M.D., Newell, D.G., 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis* 50(1):1-9.
- Lehtola, M.J., Pitkanen, T., Miebach, L., Miettinen, I.T., 2006. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research* 54, 57-61.
- Lehtola, M.J., Loades, C.J., Keevil, C.W., 2005. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *J Microbiol Methods* 62 (2): 211-9.
- Leonard, E.E., Tompkins, L.S., Falkow, S. and Nachamkin, I., 2004. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barre syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. *Infect Immun* 72, 1199-1203.

- Line, J.E., 2006. Influence of relative humidity on transmission of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poult Sci* 85:1145-50.
- Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., Siragusa, G.R. and Stern, N.J., 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1094-1100.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J., and Gill, P., 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin Microbiol* 20, 636-640.
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R.J., El-Shibiny, A., Connerton, P.L., Dillon, E., Scott, A. and Connerton, I.F., 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 71, 6554-6563.
- Logan, J.M.J., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A.J. and Stanley, J., 2000. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 865-872.
- Louis, V.R., Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Russek-Cohen, E., Pearson, A.D., Colwell, R.R., 2005. Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 85-92.
- Lyngstad, T.M., Jonsson, M.E., Hofshagen, M., Heier, T., 2008. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poult Sci* 87:1987-94.
- McCarthy, N.D., Colles, F.M., Dingle, K.E., Bagnall, M.C., Manning, N.G., Maiden, Falush, D., 2007. Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. *Emerg Infect Dis* 13 (2): 267-72.
- Manning, G., Dowson, C.G., Bagnall, M.C., Ahmed, I.H., West, M., Newell, D.G., 2003. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6370-6379.
- Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Pearman, J.W., Warren, J.R. and Armstrong, J.A., 1984. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett* 25, 83-88.
- Marín, C., Peñaranda, D.S., Ingesa-Capaccioni, S., Vega, S., Marco-Jiménez, F., 2015. Molecular Detection of *Campylobacter* spp in Day-Old Chick Demonstrate Vertical Transmission in Poultry Production. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*; 2(4): 32-36.

- Maruyama, S., Katsube, Y., 1990. Isolation of *Campylobacter jejuni* from the eggs and organs in experimentally infected laying Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Nihon Juigaku Zasshi 52(3):671-674.
- Maruyama, S., Tanaka, T., Katsube, Y., Nakanishi, H., Nukina, M., 1990. Prevalence of thermophilic campylobacters in crows (*Corvus leuillanti*, *Corvus corone*) and serogroups of the isolates. Nihon Juigaku Zasshi 52(6):1237-1244.
- Matt, M., Nordentoft, S., Kopackac, I., Pözl, T., Lassnig, H., Jelovcand, S., Peter, H., Stüger, P.H., 2016. Estimating sensitivity and specificity of a PCR for boot socks to detect *Campylobacter* in broiler primary production using Bayesian latent class analysis, Preventive Veterinary Medicine 128: 51-57.
- Matushek, M.G., Bonten, M.J., Hayden, M.K., 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 34, 2598-2600.
- McClung, C.R., Patriquin, D.G. and Davis, R.E., 1983. *Campylobacter nitrofigilis* of *Spartina alterniflora* Loisel. Int J Syst Bacteriol 33, 605-612.
- McDowell, S.W.J., Menzies, F.D., McBride, S.H., Oza, A.N., McKenna, J.P., Gordon, A.W., Neill, S.D., 2008. *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. Preventive Veterinary Medicine 84, 261-276.
- McFadyean, F., Stockman, S., 1913. Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Enquire into Epizootic Abortion, Part III. Abortion in sheep. Her Majesty's Stationery Office. London.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases 5, 607-625.
- Meerburg, B.G., W.F. Jacobs-Reitsma, J.A. Wagenaar. and A. Kijlstra., 2006. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. Appl Environ Microbiol 72:960-962.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prevost, H., Pilet, M.F., Chobert, J.M., Manai, M. and Dousset, X. (2012) Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. Food Microbiol 32, 129-134.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Dory, D. and Chemaly, M., 2016. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. J Appl Microbiol 120, 1139-1173.

- Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Mégraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A. and Whyte, P., 2005. *Campylobacter*. Vet Res 36, 351-382.
- Molina-Lopez, R.A., Valverde, N., Martin, M., Mateu, E., Obon, E., Cerdà-Cuéllar, M., Darwich, L., 2011. Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. The Veterinary Record 168, 565.
- Muller, A., Thomas, G.H., Horler, R., Brannigan, J.A., Blagova, E., Levdikov, V.M., Fogg, M.J., Wilson, K.S. and Wilkinson, A.J., 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. Mol Microbiol 57, 143-155.
- Muñoz-Carneado, L., Dolz, R., Urdaneta, S., Cerdà-Cuéllar, M. 2012. Prevalencia y nivel de contaminación de *Campylobacter* en pollos de engorde a la edad de sacrificio en España (2011-2012) Congreso AVEDILA, Badajoz.
- Neal-McKinney, J.M., Samuelson, D.R., Eucker, T.P., Nissen, M.S., Crespo, R. and Konkell, M.E., 2014. Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination. PLoS One 9, e114254.
- Neill, S.D., Campbell, J.N., Greene, J.A., 1984. *Campylobacter* species in broilers chickens. Avian Pathol 13, 777-785.
- Neill, S.D., Campbell, J.N., O'brien, J.J., Weatherup, S.T.C. and Ellis, W.A., 1985. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 35, 342-356.
- Neimann, J., Engberg, J., Mølbak, K., Wegener, H.C., 2003. A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. Epidemiology and Infection 130, 353-366.
- Newell, D.G., Wagenaar, J.A., 2000. Poultry infections and their control. In: *Campylobacter*, 2nd ed. I. Nachamkin, ed. J.J. Blaser. ASM Press, Washington, DC., 497-510.
- Newell, D.G., 2002. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment, Int. J Infect Dis 6, S16-S21.
- Newell, D.G. and Fearnley, C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol 69, 4343-4351.
- Newell, D.G., Elvers, K.T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Gittins, J., Stern, N.J., Davies, R., Connerton, I., Pearson, D., Salvat, G. and Allen, V.M., 2011. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. Appl Environ Microbiol 77, 8605-8614.

- Nachamkin, I., Allos, B.M., Ho, T.W., 2000. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. Washington: ASM Press; p. 155-75.
- Nichols, G.L., 2005. Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis* 11:361-4.
- Niemann, S., Puhler, A., Tichy, H.V., Simon, R., Selbitschka, W., 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology* 82, 477-484.
- Nylen, G., Dunstan, F., Palmer, S.R., Andersson, Y., Bager, F., Cowden, J., Feierl, G., Galloway, Y., Kapperud, G., Megraud, F., Molbak, K., Petersen, L.R., Ruutu, P., 2002. The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol Infect* 128(3):383-90.
- Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1661-1669.
- Olsen, K.N., Lund, M., Skov, J., Christensen, L.S., Hoorfar, J., 2009. Detection of *Campylobacter* Bacteria in Air Samples for Continuous Real-Time Monitoring of *Campylobacter* Colonization in Broiler Flocks. *Appl Environ Microbiol* 75, 2074-2078.
- On, S.L., Bloch, B., Holmes, B., Hoste, B., Vandamme, P., 1995. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 767-774.
- On, S.L., 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology* 90, 1S-15S.
- Park, S.F., 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 74, 177-188.
- Patrick, M.E., Christiansen, L.E., Waino, M., Ethelberg, S., Madsen, H., Wegener, H.C., 2004. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl Environ Microbiol* 70, 7474-7480.
- Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Feltham, K.A., Healing, T.D., Donaldson, J., Jones, D.M. and Colwell, R.R., 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol* 62: 4614-4620.

- Pérez-Boto, David., García-Peña, Francisco.J., Abad-Moreno, Juan.C., Hurtado- Pizarro, M.Dolores., Pérez-Cobo, Iratxe., Echeita, M.Aurora., 2010. Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathology* 39:6, 483-487.
- Pérez-Losada, Marcos; Cabezas, Patricia., Castro-Nallar, Eduardo., Crandall, Keith. A., 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution (Vairão, Portugal)* 16: 38-53.
- Penner, J.L., 1988. International Committee on Systematic Bacteriology. Taxonomic subcommittee on Enterobacteriaceae. Minutes of the Meeting. Manchester, England *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 223-224.
- Penner, J.L., Hennessy, J.N., Congi, R.V., 1983. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur J Clin Microbiol* 2: 378-383.
- Pfaller, M.A., 1999. Molecular epidemiology in the care of patients. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 123, 1007-1010.
- Pickett, C.L., Auffenberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L., Jusuf, S.S., 1992. Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 60, 3872-3877.
- Pires, S.M., Vigre, H., Makela, P., Hald, T., 2010. Using outbreak data for source attribution of human Salmonellosis and Campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog and Dis* 7, 1351-1361.
- Poly, F., Guerry, P., 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current opinion in Gastroenterology* 24, 27-31.
- Ponce, G., Cantú, P., Flores, A., Badii, M., Barragán, A., Zapata, R., Fernández, I., 2005. Cucarachas: Biología e importancias en salud pública, *Salus cum propositum vitae*, Vol 6, 3.
- Pope, C., Wilson, J., Taboada, E.N., Mackinnon, J., Felipe Alves, C.A., Nash, J.H., Rahn, K., Tannock, G.W., 2007. Epidemiology, relative invasive ability, molecular characterization, and competitive performance of *Campylobacter jejuni* strains in the chicken gut. *Appl Environ Microbiol* 73(24):7959-66.
- Portner, D.C., Leuschner, R.G., Murray, B.S., 2007. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology* 54, 265-270.
- Potter, M.E., Blaser, M.J., Sikes, R.K., Kaufmann, A.F., Wells, J.G., 1983. Human *Campylobacter* infection associated with certified raw milk. *American Journal of Epidemiology* 117, 475-483.

- Radu, S., Vincent, M., Apun, K., Abdul-Rahim, R., Benjamin, P.G., Yuherman, Rusul, G., 2002. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains in Miri, Sarawak (Malaysia). *Acta tropica* 83, 169-176.
- Ramadu, S.S., Boxall, N.S., Madie, P., Fenwick, S.G., 2004. Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broilers chickens. *Lett Appl Microbiol* 39:252-256.
- Ramírez Pérez, J., 1989. La cucaracha como vector de agentes patógenos. *Bol Of Sanit Panam* 107(1):41-53.
- Refrégier, J., Rose, N., Denis, M., Salvat, G., 2001. Risk factors for *Campylobacter* spp. Contamination in french broiler chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 50, 89-100.
- Ridley, A., Morris, V., Gittins, J., Cawthraw, S., Harris, J., Edge, S. and Allen, V., 2011. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *J Appl Microbiol* 111, 233-244.
- Ringoir, D.D., Szylo, D., Korolik, V., 2007. Comparison of 2- day-old and 14-day-old chicken colonization models for *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 49:155-158.
- Royden, A., Wedley, A., Merga, J.Y., Rushton, S., Hald, B., Humphrey, T., Williams, N.J., 2016. A role for flies (Diptera) in the transmission of *Campylobacter* to broilers. *Epidemiol Infect* 15:1-9
- Rollins, D.M., Colwell, R.R., 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 531-538.
- Romero-Barrios, P., Hempen, M., Messens, W., Stella, P., Hugas, M., 2013. Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of food-borne zoonoses at the European level. *Food Control* 29, 343-349.
- Rosef, O. and G. Kapperud., 1983. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 45:381-383.
- Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B., Christensen, B.B., 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int J Food Microbiol* 83, 87-103.
- Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S. and Borck, B., 2009. Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. *Epidemiol Infect* 137, 1742-1750.

- Roop, R.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., Krieg, N.R., 1985. *Campylobacter mucosalis* comb. nov.: emended description. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 35, 189-192.
- Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R.G., Manfreda, G., Revez, J., Vandamme, P., 2009. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 2364-2369.
- Roug, A., Byrne, B.A., Conrad, P.A., Miller, W.A., 2013. Zoonotic fecal pathogens and antimicrobial resistance in county fair animals. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 36, 303-308.
- Rushton, S.P., Humphrey, T.J., Shirley, M.D.F., Bull, S., Jørgensen, F., 2009. *Campylobacter* in housed broiler chickens: a longitudinal study of risk factors. Epidemiology and Infection: In Press.
- Sahin, O., Luo, N., Huang, S., Zhang, Q., 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. Appl Environ Microbiol 69, 5372-5379.
- Samuel, M.C., Vugia, D.J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., Kassenborg, H., Reilly, K., Kennedy, M., Angulo, F., Tauxe, R.V., 2004. Emerging Infectious Program Food Net Working Group. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet. 1996–1999. Clinical Infectious Diseases 38 (Suppl 3), S165-S174.
- Sandstedt, K., Ursing, J., 1991. Description of the *Campylobacter upsaliensis* sp. nov.: previously known as the CNW group. Systematic and Applied Microbiology 14, 39-45.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. Emerg Infect Dis 17:7-15.
- Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J.A., Willems, R.J., Dingle, K.E., Colles, F.M., Van Embden, J.D., 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. J Clin Microbiol 41(1):15-26.
- Schorr, D., Schmid, H., Rieder, H.L., Baumgartner, A., Vorkauf, H., Burnens, A., 1994. Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 196, 327-337.
- Slader, J., Domingue, G., Jørgensen, F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J., Humphrey, T.J., 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. Appl Environ Microbiol 68, 713-719.

- Sebald, M., Veron, M., 1963. Base DNA content and classification of Vibrios. *Annales de l'Institut Pasteur* 105, 897-910.
- Shane, S.M., Montrose, M.S., Harrington, K.S., 1985. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis* 29:384-91.
- Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Pattison, M., Newell, D.G., 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. *Avian Dis* 44:983-8.
- Singh Dhillon, A., Shivaprasad, H. L., Schaberg, D., Wier, F., Weber, S., Bandli, D., 2006. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Diseases* 50:55-58.
- Skirrow, M.B., 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *British Medical Journal* 2, 9-11.
- Skirrow, M.B., Blaser, M.J., 1992. Clinical and epidemiologic considerations. In *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. Nachamkin, I., Blaser, M.J., Tompkins, L.S., (Eds.). Washington, DC ASM Press, 3-8.
- Skirrow, M.B., 1994. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of Comparative Pathology* 111: 113-149.
- Skirrow, M., Butzler, J., 2000. In *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M.J., (Eds.). American Society for Microbiology press, Washington, D. C, 89-120.
- Skånseng, B., Magne Kaldhusdal., Knut Rudi., 2006. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes* 20(5): 269-279.
- Skånseng, B., Kaldhusdal, M., Moen, B., Gjevre, A.G., Johannessen, G.S., Sekelja, M., Trosvik, P., Rudi, K., 2010. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. *J Appl Microbiol* 109 (4):1265-73.
- Slee, K.J., 1972. Human vibriosis, an endogenous infection. *Australian Journal of Medical Technology* 3, 7-12.
- Smith, T., Taylor, M.S., 1919. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n.sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *The Journal of Experimental Medicine* 30, 299-311.
- Smith, S., Meade, J., Gibbons, J., McGill, K., Bolton, D., Whyte, P., 2016. The impact of environmental conditions on *Campylobacter jejuni* survival in broiler faeces and litter. *Infect Ecol Epidemiol* 28; 6: 31685.
- Sommer, H.M., Nauta, M.J., Rosenquist, H., 2016. Translation of risk factor estimates into on-farm interventions and their effect on *Campylobacter* broiler flock prevalence. *Microbiol Risk Anal.* this issue.

- Sparks, N.H.C. 2009. The role of the water supply system in the infection and control of *Campylobacter* in chicken. *Worlds Poult Sci J*; 65:459-473.
- Stanley, J., Burnens, A.P., Linton, D., On, S.L., Costas, M., Owen, R.J., 1992. *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *Journal of General Microbiology* 138, 2293-2303.
- Stanley, K. and K. Jones., 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol* 94 (Suppl):104S-113S.
- Stern, N.J., Cox, N.A., Musgrove, M.T., 2001. Incidence and levels of *Campylobacter* in broilers after exposure to an inoculated seeder bird. *J Appl Poult Res* 10, 315-318.
- Stern, N.J., Hiett, K.L., Alfredsson, G.A., Kristinsson, K.G., Reiersen, J., Hardardottir, H., Briem, H., Gunnarsson, E., Georgsson, F., Lowman, R., Berndtson, E., Lammerding, A.M., Paoli, G.M. and Musgrove, M.T., 2003. *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol Infect* 130, 23-32.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Kovalev, Y.N., Volodina, L.I., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., 2005b. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. *J Food Prot* 68, 1450-1453.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S., 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3111-3116.
- Stern, N.J., Eruslanov, B.V., Pokhilenko, V.D., Kolvaley, Y.N., Volodina, L.L., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Stepanshin, Y.G. and Svetoch, E.A., 2008. Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microb Ecol Health Dis* 20, 74-79.
- Steele, T.W. and Owen, R.J., 1988. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 38, 316-318.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kovalev, Y.N., Stepanshin, Y.G., Siragusa, G.R., Seal, B.S., Stern, N.J., 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J Agric Food Chem* 56, 1942-1948.

- Svetoch, E.A. and Stern, N.J., 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry- A review. *Poult Sci* 89, 1763-1768.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Levchuk, V.P., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal, B.S. and Stern, N.J., 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Appl Environ Microbiol* 77, 2749-2754.
- Tauxe, R.V., 2001. The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. In World Health Organization, 42-43.
- Tanner, A.C.R., Badger, S., Lai, C.-H., Listgarten, M.A., Visconti, R.A., Socransky, S.S., 1981. *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and Description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from Humans with Periodontal Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31, 432-445.
- Ternhag, A., Asikainen, T., Giesecke, J., Ekdahl, K., 2007. A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with *Campylobacter* species. *Clin Infect Dis* 1;44 (5):696-700.
- Templeton, J., Amanda. J., De Jong., Blackall, P.J., Milflin, J.K., 2006. Survival of *Campylobacter* spp. in Darkling Beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7909-7911.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2233-2239.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection Control and Hospital Epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 18, 426-439.
- Theoret, J.R., Cooper, K.K., Zekarias, B., Roland, K.L., Law, B.F., Curtiss, R., 3rd and Joens, L.A., 2012. The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 19, 1426-1431.
- Tiwari, R., Dhama, K., Kumar, A., Rahal, A. and Kapoor, S., 2014. Bacteriophage therapy for safeguarding animal and human health: a review. *Pak J Biol Sci* 17, 301-315.

- Torrallbo, A., Borge, C., Allepuz, A., Garcia-Bocanegra, I., Sheppard, S.K., Perea, A., Cabonero, A., 2014. Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Prev Vet Med* 114, 106-113.
- Totten, P., Fennell, C.L., Tenover, F.C., Wezenberg, J.M., Perine, P.L., Stamm, W.E. and Holmes, K.K., 1985. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.), and *Campylobacter fennelliae* (sp.nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J Infect Dis* 151, 131-139.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M. and Hammarstrom, L., 1997. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clin Exp Immunol* 108, 451-455.
- Ugarte-Ruiz, M., Gómez-Barrero, S., Porrero, M.C., Álvarez, J., García, M., Comerón, M.C., Wassenaar, M.T., Domínguez, L., 2012. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *J Appl Microbiol* 113, 200-208.
- Urdaneta, S., Dolz, R., Cerdà-Cuellar, M., 2015. Assesment of two different types of sample for the early detection and isolation of termophilic *Campylobacter* in broiler farms. *Avian Pathol* 44(2):103-105.
- van de Giessen, A.W., Bloemberg, B.P., Ritmeester, W.S., Tilburg, J.J., 1996. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiol Infect* 117:245-250.
- van Gerwe, T., Mifflin, J.K., Templeton, J.M., Bouma, A., Wagenaar, J.A., Jacobs-Reitsma, W.F., Stegeman, A., Klinkenberg, D., 2009. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol* 75, 625-628.
- van Wagenberg, C.P.A and P.L.M. van Horne., 2016. Impact of technical and economic performance on costs of *Campylobacter* interventions on broiler farms in six European countries, *Microbial Risk Analysis*, 1-10.
- van Vliet, A.H., Ketley, J.M., 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Symposium series. Society for Applied Microbiology 90, 45-56.
- Vandamme, P., De ley, J., 1991. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 451-455.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J., 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 88-103.
- Vandamme, P., Daneshvar, M.I., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Kersters, K., Goossens, H., Moss, C.W., 1995. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and

- Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 145-152.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., Falsen, E., 2010. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60, 2016-2022.
- Velayudhan, J., Jones, M.A., Barrow, P.A., Kelly, D.J., 2004. L-serine catabolism via an oxygen-labile L-serine dehydratase is essential for colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 72: 260-268.
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19, 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology 5, 25-40.
- Versalovic, J., Lupski, J.R., 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. Trends in Microbiology 10, S15-21.
- Véron, M., Chatelain, R., 1973. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron International Journal of Systematic Bacteriology 23, 122-134.
- Vidal, A.B., Rodgers, J., Arnold, M. & Clifton-Hadley, F., 2013. Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. Zoonosis and Public Health 60, 412-425.
- Wagenaar, J.A., Van Bergen, M.A., Mueller, M.A., Wassenaar, T.M., Carlton, R.M., 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol 109, 275-283.
- Walker, R.L., Schmauder-Chock, E.A., Parker, J.L., Burr, D., 1988. Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M cells of rabbit Peyer's patches. Canadian Journal of Microbiology 34, 1142-1147.
- Wassenaar, T.M., 2011. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. Lett Appl Microbiol 53(3):253-63.
- WHO, 2001. The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and proceedings of a WHO consultation of experts. <http://www.who.int/emc>.

- WHO, 2011. World Health Organization. Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Food borne Disease in 2010. PLOS Med. 12:e1001923.
- WHO, 2012. The global view of campylobacteriosis. Report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.
- Widders, P.R., Thomas, L.M., Long, K.A., Tokhi, M.A., Panaccio, M., Apos, E., 1998. The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. Vet Microbiol 64, 39-50.
- Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E.M., Gerner-Smidt, P., Wegener, H.C., Molbak, K., 2006. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. Emerg Infect Dis 12: 280-285.
- Wheeler, J.R., Siroky, M.B., Pavlakis, A., Krane, R.J., 1984. The urodynamic aspects of the Guillain-Barré syndrome. Journal of Urology 131: 917s-919s.
- Wilson, I.G. and Moore, J.E., 1996. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. Epidemiol Infect 116(2):147-53.
- Winner, J.B., 2001. Guillain-Barré syndrome. Molecular Pathology 54: 381-385.
- Woldemariam, E., Bouma, A., Vernooij, J.C.M. & Stegeman, A., 2008. The sensitivity and specificity of fecal and cecal culture for the detection of *Campylobacter* in Dutch broiler flocks quantified by Bayesian analysis. International Journal of Food Microbiology 121, 308-312.
- Wright, E., Wigley, P., Glover, C., Humphrey, T., Bennett, M., O'Brien, S., Williams, N., 2015. Survival of *Campylobacter* in the poultry farm environment. 18th International Workshop CHOR, p.133.
- Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2004. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. Vaccine 22, 1379-1389.
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S., De Luca, G., 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. International Journal of Food Microbiology 33, 315-321.
- Zanoni, R.G., Debruyne, L., Rossi, M., Revez, J., Vandamme, P., 2009. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 1666-1671.
- Ziprin, R.L., Hume, M.E., Young, C.R. and Harvey, R.B., 2002. Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of *Campylobacter jejuni*: evaluation of protection against a colonizing strain. Curr Microbiol 44, 221-223.

- Zweifel, C., Scheu, K.D., Keel, M., Renggli, F., Stephan, R., 2008. Occurrence and genotypes of *Campylobacter* in broiler flocks, other farm animals, and the environment during several rearing periods on selected poultry farms. *Int J Food Microbiol* 125, 182-187.

