

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**ESTUDIO DE LOS CARACTERES
EPIDEMIOLÓGICOS
Y CONTROL EXPERIMENTAL DE**
Campylobacter jejuni
**EN EL ENTORNO DE LA
PRODUCCIÓN DE POLLOS PARA
CARNE**

Memoria que presenta para optar al grado de Doctor

SHEILA YUBERO DELGADO

León, octubre 2019

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS Y DE LOS
ALIMENTOS**

Directores de Tesis Doctoral:

Dr. Elías Fernando Rodríguez Ferri

Dr. César Bernardo Gutiérrez Martín

Dra. Sonia Martínez Martínez

A mis padres y a mi hermana

A pesar de que en este trabajo figura sólo mi nombre, son muchas las personas que de una manera u otra ha contribuido en él, y por ello me gustaría agradecerse.

En primer lugar, dar las gracias a mis Directores de Tesis Elías F. Rodríguez Ferri, Cesar B. Gutiérrez Martín y Sonia Martínez Martínez, gracias por todo lo aprendido profesional y personalmente durante estos años de trabajo con vosotros. Ferri, muchas gracias por haber confiado en mí para la realización de este proyecto y por darme la oportunidad de haber pertenecido a este grupo.

Muchas gracias a los propietarios y responsables de las granjas por su confianza y ayuda desinteresada. Gracias a mis compañeros durante este tiempo, especialmente a Javier y a Álvaro, muchas gracias por vuestro apoyo y amistad.

Quisiera indicar que este trabajo ha sido financiado por el contrato "Caracteres de *Campylobacter jejuni* de interés epidemiológico y planteamientos de su aplicación al desarrollo de programas específicos de bioseguridad en las aves" del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gracias también a todo el personal implicado en ello.

Y, por último, muchas gracias a todos los "míos", soy muy afortunada por tener y haber tenido a tanta y a tan buena gente a mi alrededor. Gracias por cuidarme, por impulsarme, por aconsejarme, por creer en mí y por alegraros de mis triunfos tanto o más que yo misma, muchísimas gracias por todo.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

I. EL MICROORGANISMO.....	3
1.1 Historia y taxonomía.....	3
1.2 Morfología y características generales del género <i>Campylobacter</i>	4
1.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	6
1.3 Cultivo y aislamiento.....	7
1.4 Identificación.....	9
1.5 Reservorios.....	10
1.6 Formación de biopelículas.....	12
1.7 Resistencia a antibióticos.....	13
II. CAMPILOBACTERIOSIS EN HUMANOS.....	15
2.1 Evolución e incidencia estimada.....	15
2.2 Cuadro clínico.....	17
2.3 Transmisión y supervivencia en alimentos.....	18
2.4 Alimentos implicados en los casos esporádicos y brotes de la enfermedad...20	
2.5 Epidemiología. Variación estacional.....	22
2.6 Incidencia real e impacto económico.....	23
III. IMPORTANCIA EN AVES.....	25
3.1 Prevalencia.....	25
3.2 Colonización.....	26
3.3 Transmisión vertical.....	28
3.4 Transmisión horizontal.....	29
3.5 Factores de virulencia/colonización.....	32

IV. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE <i>Campylobacter</i>.....	35
4.1 Importancia del control en aves.....	35
4.2 Bioseguridad.....	37
4.2.1 Descontaminación, limpieza y desinfección.....	39
4.3 Inmunización.....	40
4.4 Aditivos alimentarios.....	42
4.5 Bacteriocinas y bacteriófagos.....	44
4.6 Otras estrategias.....	46

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....51

MATERIALES

I. INSTALACIONES UTILIZADAS.....	57
II. CEPAS BACTERIANAS.....	58
III. MEDIOS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	58
IV. MEDIOS DE CULTIVO.....	59
4.1 Medios de cultivo líquidos.....	59
4.2 Medios de cultivo sólidos.....	60
V. MEDIOS DE TRANSPORTE DE MUESTRAS.....	62
VI. SUPLEMENTOS ANTIBIÓTICOS.....	64
VII. TAMPONES Y SOLUCIONES.....	64
VIII. DESINFECTANTES.....	65
8.1 Productos activos no comerciales.....	66
8.2 Desinfectantes comerciales.....	67

MÉTODOS

I. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y MULTIPLICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i> EN CONDICIONES DE CAMPO Y EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	71
1.1 Construcción de una curva de crecimiento de <i>C. jejuni</i>	71
1.2 Estudios de supervivencia de <i>C. jejuni</i> en distintos medios y condiciones de laboratorio.....	71
1.2.1 Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en PBS.....	71
1.2.2 Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en caldo Bolton, agua de peptona y agua destilada.....	72
1.3 Estudios de supervivencia en otros sustratos.....	72
1.4 Estudios de supervivencia en medios de transporte.....	73
II. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO DE <i>Campylobacter jejuni</i>.....	76
2.1 Medios selectivos para el aislamiento y recuento de <i>C. jejuni</i>	76
2.1.1 Siembra en caldo Bolton enriquecido con distintas combinaciones antibióticas y determinación de la sensibilidad de las colonias.....	76
2.1.2 Uso combinado de filtros de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro y medios selectivos (mCCDA, Skirrow, Preston y CSM).....	78
2.2 Utilización de filtros para el aislamiento de <i>C. jejuni</i>	79
III. IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRAS Y MUESTREO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PORTADORES.....	82
3.1 Comparación entre medios de cultivo.....	82
3.2 Muestras procedentes de pollos de carne.....	82
3.2.1 Influencia de la edad de los animales y la época del año en la presencia de muestras positivas.....	82
3.2.2 Prevalencia de <i>C. jejuni</i> en pollos de carne.....	83

3.2.3 Muestras del aparato digestivo de los animales.....	84
3.3 Muestras ambientales.....	84
3.3.1 Muestras de origen fecal.....	84
3.3.2 Otras muestras ambientales.....	85
IV. PRESENCIA DE <i>Campylobacter jejuni</i> EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES.....	86
4.1 Muestreo en distintos sistemas productivos.....	86
4.2 Muestreo en otras especies animales.....	87
V. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE <i>Campylobacter jejuni</i>.....	88
5.1 Análisis de huevos de gallinas portadoras.....	88
5.2 Contaminación experimental de los huevos con <i>C. jejuni</i>	89
VI. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD O RESISTENCIA DE <i>Campylobacter jejuni</i> A DESINFECTANTES.....	91
6.1 Estudios de laboratorio.....	91
6.2 Estudios en condiciones de campo.....	92

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y MULTIPLICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i> EN CONDICIONES DE CAMPO Y EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	97
1.1 Construcción de una curva de crecimiento de <i>C. jejuni</i>	97
1.2 Estudios de supervivencia de <i>C. jejuni</i> en distintos medios y condiciones de laboratorio.....	99
1.2.1 Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en PBS.....	99

1.2.2 Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en caldo Bolton, agua de peptona y agua destilada.....	100
1.2.2.1 Mantenimiento en agua destilada.....	100
1.2.2.2 Supervivencia en agua de peptona.....	102
1.2.2.3 Supervivencia en caldo Bolton.....	104
1.3 Estudios de supervivencia en otros sustratos.....	107
1.4 Estudios de supervivencia en medios de transporte.....	109
II. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO DE <i>Campylobacter jejuni</i>.....	113
2.1 Medios selectivos para el aislamiento y recuento de <i>C. jejuni</i>	113
2.1.1 Siembra en caldo Bolton enriquecido con distintas combinaciones antibióticas y determinación de la sensibilidad de las colonias.....	113
2.1.2 Uso combinado de filtros de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro y medios selectivos (mCCDA, Skirrow, Preston y CSM).....	116
2.2 Utilización de filtros para el aislamiento de <i>C. jejuni</i>	120
III. IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRAS Y MUESTREO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PORTADORES.....	123
3.1 Comparación entre medios de cultivo.....	123
3.2 Muestras procedentes de pollos de carne.....	125
3.2.1 Influencia de la edad de los animales y la época del año en la presencia de muestras positivas.....	125
3.2.2 Prevalencia de <i>C. jejuni</i> en pollos de carne.....	128
3.2.3 Muestras del aparato digestivo de los animales.....	130
3.3 Muestras ambientales.....	133
3.3.1 Muestras de origen fecal.....	133
3.3.2 Otras muestras ambientales.....	135

IV. PRESENCIA DE <i>Campylobacter jejuni</i> EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES.....	137
4.1 Muestreo en distintos sistemas productivos.....	137
4.2 Muestreo en otras especies animales.....	140
V. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE <i>Campylobacter jejuni</i>.....	149
5.1 Análisis de huevos de gallinas portadoras.....	149
5.2 Contaminación experimental de los huevos con <i>C. jejuni</i>	151
VI. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD O RESISTENCIA DE <i>Campylobacter jejuni</i> A DESINFECTANTES.....	153
6.1 Estudios de laboratorio.....	153
6.2 Estudios en condiciones de campo.....	157
CONCLUSIONES.....	163
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
ANEXO.....	205
RESUMEN.....	209
SUMMARY.....	215

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rangos taxonómicos de <i>Campylobacter jejuni</i>	4
Figura 2. Número de casos notificados de las principales zoonosis humanas en la Unión Europea en 2017 (adaptada de EFSA, 2018).....	16
Figura 3. Estrategias de control implementadas en la producción primaria para limitar la colonización intestinal por <i>Campylobacter</i> de pollos de carne y reducir los casos de campilobacteriosis humana (adaptado de Meunier <i>et al.</i> , 2016).....	36
Figura 4. Relación estructural del trabajo.....	53
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>C. jejuni</i> a 37°C, en condiciones estáticas y en agitación.....	97
Figura 6. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> después de la inoculación de los distintos medios, a 4°C.....	105
Figura 7. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en medios de transporte mantenidos a 4°C.....	111
Figura 8. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en medios de transporte mantenidos a 20°C.....	112
Figura 9. Porcentaje de animales positivos en el muestreo de los distintos lugares del aparato digestivo.....	132
Figura 10. Porcentaje de animales positivos en el muestreo de distintas especies de animales.....	148
Figura 11. Croquis a escala de la explotación de Aranda de Duero (Burgos).....	205
Figura 12. Croquis a escala de la explotación de Riosequino de Torío (León).....	205
Figura 13. Croquis a escala de la explotación del Colegio Santa Isabel (Soria).....	206
Figura 14. Croquis a escala de la explotación de Villalón de Campos (Valladolid)....	206

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas fenotípicas para la identificación de <i>Campylobacter</i> spp. termófilos.....	9
Tabla 2. Pruebas fenotípicas para la identificación de <i>Campylobacter</i> spp. termófilos (*S→ sensible; R→ resistente).....	9
Tabla 3. Antibióticos y concentraciones en los discos utilizados, en los ensayos de inhibición de los distintos aislados.....	77
Tabla 4. Huevos procedentes de gallinas portadoras de <i>C. jejuni</i> , recogidos para su estudio y su distribución en lotes.....	88
Tabla 5. Productos desinfectantes y su concentración de uso en la prueba “ <i>in vitro</i> ”.....	92
Tabla 6. Productos desinfectantes y su concentración de uso en la prueba de campo.....	93
Tabla 7. Número de divisiones celulares “n”, velocidad de crecimiento “v” y tiempo de generación en horas “g”, calculados a partir de las curvas de crecimiento de <i>C. jejuni</i> , en condiciones estáticas y en agitación.....	98
Tabla 8. Recuentos de <i>C. jejuni</i> correspondientes a diferentes densidades ópticas.....	99
Tabla 9. Viabilidad de <i>C. jejuni</i> al cabo de distintos tiempos y su correspondencia con la densidad óptica.....	99
Tabla 10. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en agua destilada mantenida a distintas temperaturas en UFC/ml.....	103
Tabla 11. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en agua de peptona mantenida a distintas temperaturas, expresada en UFC/ml.....	103
Tabla 12. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> en caldo Bolton mantenido a distintas temperaturas, expresada en UFC/ml.....	106
Tabla 13. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> expresada en UFC/ml en agua, pienso y heces, en las condiciones habituales de la explotación y en el laboratorio (1ª prueba).....	107
Tabla 14. Supervivencia de <i>C. jejuni</i> , expresada en UFC/ml, en agua, pienso y heces, en condiciones habituales de la explotación y en el laboratorio (2ª prueba).....	108

Tabla 15. Resultados del crecimiento en placa a partir de muestras, en medio de transporte mantenido a 4°C.....	110
Tabla 16. Resultados del crecimiento en placa a partir de muestras, en medio de transporte mantenido a 20°C.....	111
Tabla 17. Resultados de susceptibilidad antibiótica de las distintas cepas (R→resistente, S→sensible, D→dudosa).....	115
Tabla 18. Crecimiento en medios cultivo selectivos por siembra directa y con filtros de celulosa.....	117
Tabla 19. Crecimiento de <i>C jejuni</i> , utilizando diferentes sistemas de filtrado.....	120
Tabla 20. Estudio comparativo de muestras cloacales de pollos de carne, cultivados en mCCDA y agar sangre.....	124
Tabla 21. Edad de aparición de los primeros resultados positivos en las heces, según las distintas estaciones y métodos utilizados.....	125
Tabla 22. Resultados de los animales muestreados en distintos momentos del ciclo...128	128
Tabla 23. Porcentaje de los animales positivos en el muestreo de los distintos lugares del aparato digestivo.....	131
Tabla 24. Porcentaje de muestras positivas en distintos días de recogida a lo largo del ciclo de crecimiento de pollos de carne.....	133
Tabla 25. Resultados del estudio sobre portadores de <i>C. jejuni</i> en distintos sistemas productivos de aves.....	138
Tabla 26. Estudio sobre la presencia de <i>C. jejuni</i> en distintos animales.....	140
Tabla 27. Resultados de tres recuentos de colonias de <i>C. jejuni</i> por placa a diferentes tiempos post-inoculación.....	151
Tabla 28. Resultados del experimento de susceptibilidad a los desinfectantes por parte de <i>C. jejuni</i> , expresados en forma de reducciones de UFC, (media de tres determinaciones).....	154
Tabla 29. Reducción del número de colonias (%) después de la desinfección de las paredes de una granja de pollos de carne con distintos productos.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AECA/WPSA	Asociación Española de Ciencia Avícola / <i>The World's Poultry Science Association</i>
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American type culture collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
A_w	<i>Activity water</i> (actividad del agua)
CBF	<i>Campylobacter blood free</i> (<i>Campylobacter</i> libre de sangre)
CCDA	<i>Charcoal-cefoperazone-deoxycholate</i> agar (agar desoxicolato-cefoperazona-carbón)
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i> (Centro de Control y Prevención de Enfermedades)
CE	Comisión Europea
CSM	<i>Charcoal based selective médium</i> (medio selectivo basado en carbón)
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (desoxirribonucleótidos-trifosfatos)
DO	Densidad óptica
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea
ECDC	<i>European Center for disease prevention and control</i> (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
EE.UU./USA	Estados Unidos / <i>United State of America</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EN	<i>European norm</i> (Norma europea)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros)

Índices

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
LPS	Lipopolisacárido
mCCDA	<i>Modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate</i> agar (agar desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado)
NCTC	<i>National collection of type cultures</i> (Colección Nacional de Cultivos Tipo)
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i> (Organización Mundial de Sanidad Animal)
OMP	<i>Outer membrane protein</i> (proteína de la membrana externa)
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud / <i>World Health Organization</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampón fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel en campo pulsado)
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i> (amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción)
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TBE	Tris borato EDTA
TSA	<i>Trypticase soy agar</i> (agar tripticasa soja)
TDI	Tecnología para el Diagnóstico e Investigación
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNE	Una norma española

INTRODUCCIÓN

I. EL MICROORGANISMO

1.1 Historia y taxonomía

Los primeros aislados de especies del género *Campylobacter* fueron obtenidos por McFadyean y Stockman en 1909, a partir de fetos abortados de ovejas. En 1919, Smith y Taylor, propusieron para este tipo de bacterias el nombre de *Vibrio fetus*, tanto por la semejanza morfológica que presentaban con bacterias del género *Vibrio* como por su origen “fetal”. En 1931, Jones *et al.* aislaron, a partir de bovinos con problemas intestinales, un nuevo tipo de “vibrión”, al que se le denominó *Vibrio jejuni* y, en 1944, Doyle describió otra bacteria similar, aislada del intestino de cerdos con diarrea, a la que denominaron *Vibrio coli*.

La primera referencia documentada de un caso de campilobacteriosis humana data de 1938 en EE.UU., y se relacionó con el consumo de leche (Levy, 1946). En 1957, King, estudiando las características de estos vibrios aislados de diferentes fuentes, estableció dos grupos con diferentes características serológicas y bioquímicas: mientras que unos eran capaces de crecer óptimamente en temperaturas entre 25 y 37°C, otros lo hacían mejor a 42°C. Estos microorganismos, denominados en esa época “vibrios termófilos o termotolerantes”, se identificaron como los agentes causantes de una diarrea aguda humana (King, 1957).

Sin embargo, las bacterias pertenecientes a este género han sufrido diversas reorganizaciones a lo largo de la historia. En 1963, Sebald y Verón propusieron un nuevo género llamado “*Campylobacter*” (del griego *kampulos*: curvado y *bactron*: barra) (Sebald y Veron, 1963) y, diez años más tarde, en 1973, Véron y Chantelain propusieron la inclusión de *Vibrio jejuni* y *V. coli* dentro del género.

Desde entonces, el género *Campylobacter* ha sido objeto de varias revisiones, incluso algunas especies asignadas a él se han ido reagrupando, formando nuevos géneros (Goodwin *et al.*, 1989; Vandamme *et al.*, 1991; Debruyne *et al.*, 2008). En la actualidad (Gilbert *et al.*, 2018), el género *Campylobacter* se compone de 39 especies y 16 subespecies, aunque tanto por el estudio de determinados ecosistemas, como por la capacidad de adaptación de estos microorganismos a nuevos hospedadores, es muy posible que esto varíe a corto plazo.

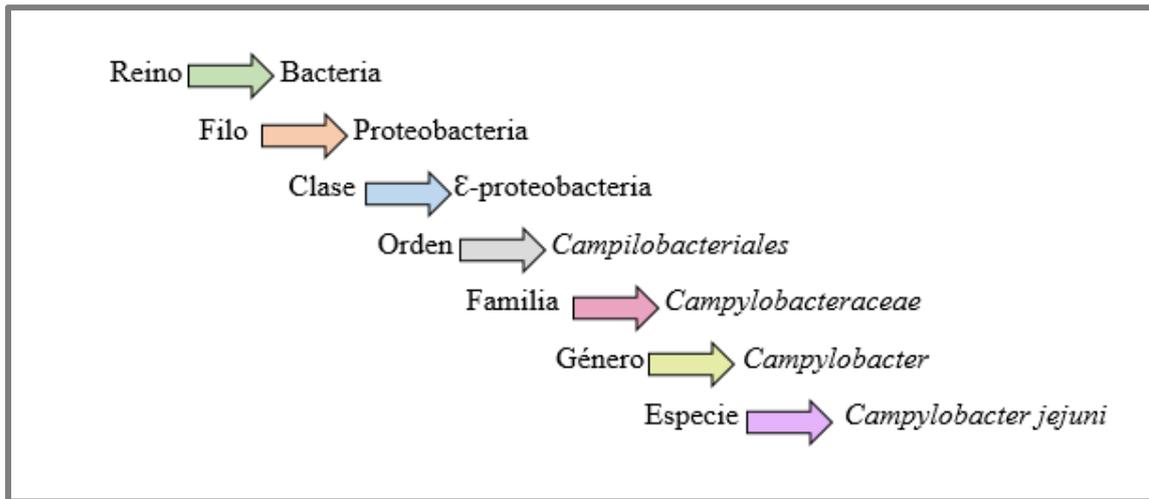


Figura 1. Rangos taxonómicos de *Campylobacter jejuni*.

1.2 Morfología y características generales del género *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacilos Gram-negativos, no sacarolíticos, generalmente de forma curvada o espiral, con extremos afilados (Griffiths y Park, 1990). Pueden formar cadenas cortas, que al microscopio se observan como una S o como la forma de alas de gaviota (Holt, 1994). Son pequeñas y su tamaño puede variar entre 0,2 y 0,8 μm de diámetro y de 0,5 a 5 μm de longitud (Keener *et al.*, 2004).

Son móviles por flagelación monótrica, bipolar o monopolar, y presentan un movimiento característico denominado “de sacacorchos”, que resulta visible bajo el microscopio de contraste de fases o de campo oscuro (Nachamkin *et al.*, 2000). El flagelo es hasta tres veces más largo que la célula bacteriana, desnudo y nace de una concavidad crateriforme ubicada en los extremos del bacilo (Power *et al.*, 1992). Las especies de este género no forman esporos ni pigmentos y son en su inmensa mayoría oxidasa positivos.

En cultivos de varios días degeneran a formas esféricas, ovaladas o cocoides, denominadas formas viables no cultivables, debido a la incapacidad para crecer en medios de cultivo de laboratorio. Esta morfología se podría considerar como una forma de resistencia de la bacteria a condiciones de estrés (ausencia de nutrientes, alta concentración de oxígeno atmosférico o temperaturas extremas), de forma semejante a lo que ocurre en el caso de los endosporos bacterianos, pero de origen diferente (Rollins y Colwell, 1986). A este respecto, existen diferentes opiniones sobre si realmente estas formas son un reflejo de una población bacteriana envejecida, un estado metabólico real

de resistencia bacteriana o incluso un artefacto formado en los medios de cultivo (Oliver, 2010). Dichas formas no presentan movilidad, conservan su viabilidad, pero no son cultivables en ningún medio de cultivo actual, ni se conoce su papel posible o potencial como agentes infecciosos (Chaisowwong *et al.*, 2012).

La mayoría de los microorganismos del género *Campylobacter* son microaerófilos y requieren una concentración de oxígeno de entre el 3 y el 15% y una concentración de dióxido de carbono de entre el 2 y el 10% (Garénaux *et al.*, 2008), existiendo algunas especies que son anaerobias facultativas. Las condiciones óptimas de crecimiento de *C. jejuni* se alcanzan en atmósferas compuestas por un 5% de oxígeno, un 10% de dióxido de carbono y un 85% de nitrógeno (Skirrow, 1977), concentraciones que puede lograrse con incubadores de microaerofilia (incubadores de CO₂) o mediante jarras de anaerobiosis con sobres comerciales, que proporcionan la atmósfera adecuada para el crecimiento de estos microorganismos y, aunque en ocasiones se utilicen jarras con velas, la presión de oxígeno producida es ligeramente superior a la deseada (Wang *et al.*, 1982).

Las especies de este género poseen un metabolismo respiratorio quimioorganotrofo, siendo capaces de obtener energía a partir de aminoácidos o del ciclo del ácido tricarbóxico, pero no a partir de los hidratos de carbono (Debruyne *et al.*, 2008), que no son capaces de fermentar ni oxidar, al carecer de la enzima fosfofructoquinasa (Dasti *et al.*, 2010). Tampoco pueden hidrolizar el colágeno, la caseína, el almidón, ni la tirosina (Debruyne *et al.*, 2008).

Todos los agentes de este género se cultivan y crecen bien en el laboratorio a temperaturas de 37°C (Debruyne *et al.*, 2008). Las especies termófilas se desarrollan a temperaturas de 42°C, pero no a 25°C. *Campylobacter jejuni* crece entre 30 y 45 °C, con un rango de temperatura óptima de entre 42 y 45°C (Silva *et al.*, 2011).

En cuanto al pH, el intervalo óptimo se sitúa entre 5,8 y 8,0, no existiendo crecimiento por debajo de 4,9 (Doyle y Roman, 1981). El crecimiento óptimo se produce, también, con una actividad de agua (a_w) de 0,997 y en una concentración aproximada de cloruro sódico (NaCl) del 0,5% m/v, no siendo capaz de crecer en ambientes con una a_w menor de 0,987 ni en concentraciones de NaCl mayores que 2% m/v (Silva *et al.*, 2011).

1.2.1 *Campylobacter jejuni*

Al tratarse de la causa bacteriana principal de la gastroenteritis humana en el mundo, *Campylobacter jejuni* es la especie más estudiada del género *Campylobacter*. De hecho, desde 2005 no ha dejado de aumentar su casuística en Europa hasta ser la causa de más de 200.000 casos al año (EFSA, 2018), al igual que ocurre en otros lugares, particularmente en Norteamérica. Este microorganismo fue aislado por primera vez de ganado con diarrea por Jones *et al.*, en 1931, denominándose por aquel entonces *Vibrio jejuni*. Por desgracia, las cepas originales se perdieron, y la especie fue redefinida al ser transferida al nuevo género *Campylobacter*, en 1973, como se ha indicado anteriormente.

C. jejuni se divide en dos subespecies: *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*, que difieren en su capacidad de reducción de nitratos a nitritos y en su crecimiento a 42°C (*C. jejuni* subsp. *doylei* no reduce los nitratos ni crece a 42°C). En esta memoria nos referiremos a *C. jejuni* subsp. *jejuni*, aunque genéricamente lo hagamos como *C. jejuni* (Vandamme *et al.*, 1991).

C. jejuni está integrado por numerosos serogrupos, organizados según la estructura antigénica de dos antígenos: el “O” (antígeno soluble derivado del lipopolisacárido -LPS- de la membrana externa), mediante el que se pueden diferenciar 60 serotipos por hemaglutinación indirecta (Penner *et al.*, 1983), y el antígeno “H” (termolábil y aglutinante, que se corresponde con el flagelo), por el que se pueden diferenciar hasta 100 serotipos (Lior *et al.*, 1982).

Mediante técnicas genéticas de clasificación (genotipificación), se puede llevar a cabo una diferenciación adecuada entre las distintas cepas de *C. jejuni*, lo que permite elaborar estudios filogenéticos y epidemiológicos, facilitando tanto el reconocimiento de casos y brotes, como la identificación de sus orígenes (Fitzgerald *et al.*, 2001). A lo largo del tiempo, se han producido incorporaciones muy interesantes, basadas en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de cebadores (*primers*) dirigidos frente a distintos genes de la bacteria, con el propósito principal de llevar a cabo la detección de *C. jejuni* a partir de alimentos, aves, agua o ambiente (Waage *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2017).

En los últimos años se han incorporado también algunos métodos de tipificación molecular (Foxman *et al.*, 2005), entre los que se incluyen los polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), la amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD), los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o la electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE).

Desde la publicación de la secuencia completa del genoma de *C. jejuni* NCTC 11168 (Parkhill *et al.*, 2000), los conocimientos genéticos con respecto a este microorganismo se han incrementado muy rápidamente. El cromosoma de la cepa secuenciada de *C. jejuni* es pequeño (1.641.481 pares de bases), en comparación con el de otros procariotas, con un bajo contenido de guanina y citosina (Parkhill *et al.*, 2000).

A diferencia de otros procariotas secuenciados, casi no existen secuencias de inserción o asociadas a fagos, y se han encontrado muy pocas secuencias repetitivas (Parkhill *et al.*, 2000). Otra característica singular de esta cepa es la falta aparente de organización de los genes del operón, así como la presencia de secuencias hipervariables, que se encuentran principalmente en los genes que codifican la biosíntesis o modificación de la estructura de su superficie (Parkhill *et al.*, 2000). Las regiones hipervariables del genoma pueden ser importantes para la adaptación y supervivencia de *C. jejuni* en diferentes ambientes y para su potencial patógeno (Linton *et al.*, 2001).

1.3 Cultivo y aislamiento

Tanto para la detección de *Campylobacter* como para el diagnóstico de la enfermedad que provoca, en la mayoría de los casos es necesario un cultivo de las muestras obtenidas, cualquiera que sea la fuente considerada (animales, alimentos o muestras ambientales, por ejemplo). Estos patógenos son considerados agentes “fastidiosos” debido sus exigencias de crecimiento (Bolton y Robertson, 1982), por lo que el aislamiento a partir de las muestras suele resultar complicado (Lastovica *et al.*, 1986), sobre todo si se considera que el material de partida suele estar contaminado con otros microorganismos menos exigentes y de crecimiento más rápido. Por estas razones, se debe utilizar un medio de enriquecimiento selectivo, que pueda proporcionar al

microorganismo las condiciones favorables de crecimiento que necesita (Debruyne *et al.*, 2008).

Existe una gran variedad de medios de enriquecimiento selectivos, así como de procedimientos para el aislamiento de *Campylobacter*. Puesto que las especies de este género difieren en su resistencia a los antibióticos, así como frente a otros agentes selectivos, un solo medio no resulta suficiente, por lo general, para el aislamiento de todas las especies. En la mayoría de los casos, son necesarios medios selectivos para permitir el aislamiento de la bacteria, teniendo en cuenta su crecimiento lento y la necesidad de impedir a la vez el crecimiento de microbiota competitiva normal presente, por ejemplo, en heces o en alimentos (Butzler *et al.*, 1992; Odongo *et al.*, 2009).

El primer paso para la solución de este problema se produjo cuando, en 1977, Skirrow desarrolló un medio sólido selectivo para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli*, a partir de muestras de heces (Skirrow, 1977). La composición del agar Skirrow se basa en el suplemento del agar sangre con antibióticos (trimetoprima, polimixina B y vancomicina). Desde entonces, se han desarrollado muchos otros medios con el mismo fin: la supresión de la microbiota contaminante, mediante la adición de diferentes agentes selectivos. Tanto los medios que contienen sangre, como el agar Butzler (Lauwers *et al.*, 1978) o Campy-BAP (Blaser *et al.*, 1980), como los medios basados en el uso de carbón, como el CCDA (Hutchinson y Bolton, 1984), han demostrado su eficacia para el aislamiento de campilobacterias de las heces humanas y animales. En 1982 se desarrolló el agar Preston para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de heces, así como de muestras del medio ambiente (Bolton y Robertson, 1982). En cualquier caso, para lograr el éxito en el aislamiento es necesario combinar los diferentes medios de cultivo con las temperaturas de crecimiento específicas. Así, para los patógenos alimentarios más comunes en este grupo, como son *C. jejuni* y *C. coli*, las condiciones óptimas para su aislamiento se alcanzarían a temperaturas de 42°C (Silva *et al.*, 2011).

Otro procedimiento utilizado para el aislamiento de las especies de este género es la técnica de filtración por membrana o filtración pasiva, que aprovecha el hecho de que *Campylobacter* spp., a diferencia de la mayoría entre las eubacterias, pasa fácilmente a través de los filtros con un tamaño de poro entre 0,45 y 0,65 µm. Para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* se utilizan preferentemente tamaños de poro de 0,65 µm, pudiéndose también utilizar otros menores, aunque con menor tasa de aislamiento bacteriano (Bolton

et al., 1988). Esta técnica en ocasiones se combina con la utilización simultánea de medios de cultivo selectivos (Debruyne *et al.*, 2008).

1.4 Identificación

Para la identificación fenotípica de las cepas de *Campylobacter* spp. termófilas, se utilizan pruebas basadas en ciertas características diferenciales. Basándose en diversos estudios fenotípicos sobre estos agentes y con el fin de establecer un protocolo de identificación común, se han elaborado normas internacionales de referencia (ISO, 2017).

En ellas, se muestran tanto las características para la identificación de las cepas (Tablas 1 y 2), como los procedimientos detallados mediante los cuales se han de realizar las pruebas.

Tabla 1. Pruebas fenotípicas para la identificación de *Campylobacter* spp. termófilos.

Prueba confirmatoria	Resultado para <i>Campylobacter</i> termófilo
Morfología	Bacilos curvados pequeños
Movilidad	Muy móviles y con forma de sacacorchos
Oxidasa	+
Crecimiento a 41,5°C en aerobiosis	–
Crecimiento a 25°C en microaerobiosis	–

Tabla 2. Pruebas fenotípicas para la identificación de *Campylobacter* spp. termófilos (*S→ sensible; R→ resistente).

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Hidrólisis de hipurato	+	–	–	–
Catalasa	+	+	+	– o ligero
Ácido nalidíxico	S	S	R/S	S
Acetato de indoxil	+	+	–	+
Cefalotina	R	R	R	S

Para la identificación de *C. jejuni*, y, sobre todo, para diferenciar esta especie de otras fenotípica y genotípicamente próximas o similares, como *C. coli* (Lior, 1984), la prueba más utilizada tradicionalmente es la hidrólisis de hipurato (Hwang y Ederer, 1975), debido a que *C. jejuni* es la única especie capaz de hidrolizarlo. Sin embargo,

algunas cepas de *C. jejuni* pueden ser negativas, lo que indica la necesidad de hacer uso de pruebas alternativas o adicionales para asegurar su identificación correcta (Fermér y Engvall, 1999).

En cualquier caso, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas que aportan mayor sensibilidad que la hidrólisis. La más utilizada es la PCR, basada en la amplificación del ADN bacteriano (Saiki *et al.*, 1988), de la que, en la actualidad, existen distintas propuestas publicadas que permiten identificar tanto las distintas campilobacterias entre sí, como estas de otros géneros.

1.5 Reservorios

Los microorganismos del género *Campylobacter* son habitantes comunes de las membranas mucosas de los aparatos gastrointestinal y reproductor (Hiett *et al.*, 2003), así como de la cavidad oral de una gran variedad de animales. Aunque su presencia es relativamente frecuente, generalmente estos animales sólo actúan como vectores de estos microorganismos y, a menudo, no muestran signos clínicos (Young *et al.*, 2007); sin embargo, en algunas ocasiones no ha sido así, ya que el primer aislamiento de *C. jejuni* estuvo asociado con la aparición de abortos en ganado bovino, relacionándose también con distintos procesos en estos animales (Welsh, 1984) y en otros como las aves (Stephens *et al.*, 1998), cabras (Anderson *et al.*, 1983), caballos (Hong y Donahue, 1989) o perros (Misawa *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta que la temperatura óptima para los *Campylobacter* termófilos se corresponde con la temperatura corporal de las aves y no con la de los mamíferos, y respondiendo al hecho de la buena adaptación de estos patógenos al aparato digestivo de las primeras, resulta bastante lógica la idea de que estos animales puedan ser los hospedadores-reservorios naturales de estos microorganismos (Wassenaar y Newell, 2000; Hermans *et al.*, 2011b). Afianzando esta teoría, se ha aislado *Campylobacter* spp. de una gran variedad de especies de aves, tanto domésticas como salvajes. En las primeras existe una alta prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli*, tanto en pollos de carne (Wedderkopp *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2004), como en lotes de reproductoras y gallinas ponedoras (Cox *et al.*, 2009). Por otra parte, la colonización de *Campylobacter* es también común en el intestino de otro tipo de aves, como pavos (Cox *et al.*, 2000), gansos (Aydin *et al.*, 2001), patos (Savill *et al.*, 2003), avestruces y codornices (Oyarzabal *et al.*, 1995).

Con respecto a las aves salvajes, *Campylobacter* spp. se ha aislado repetidamente de gran variedad de especies (Petersen *et al.*, 2001), presentando una distribución desigual en ellas. Se ha sugerido también, que algunas aves salvajes podrían actuar como reservorios del microorganismo, pudiendo ser, por tanto, las responsables de la diseminación del agente, tanto a las aves domésticas como a los seres humanos. Sin embargo, las comparaciones de los subtipos de *C. jejuni* en aves silvestres con los subtipos de los seres humanos y pollos revelan solo algunos subtipos comunes, sin que por el momento sea posible determinar qué tipo de animales ejercen como foco de infección ancestral (Broman *et al.*, 2004).

Aunque el origen más frecuente de los campilobacter termófilos son las aves, tanto *C. jejuni* como *C. coli* se encuentran también frecuentemente en las heces de los animales de abasto, como bovinos, ovinos y cerdos. En el ganado vacuno y ovino, *C. jejuni* es la especie que se aísla con más asiduidad, encontrándose *C. coli* en menor proporción (Stanley y Jones, 2003); sin embargo, en el caso del ganado porcino, la relación entre las dos especies es la contraria, con mayoría de aislados de *C. coli* (Guévremont *et al.*, 2004). En principio, teniendo en cuenta estudios previos a éste, los caballos y cabras no parecen actuar habitualmente como portadores de *Campylobacter* spp. (Rosef *et al.*, 1983).

Los perros y gatos, con y sin diarrea son, con frecuencia, portadores de *Campylobacter* (Moreno *et al.*, 1993). *C. upsaliensis* es la especie más aislada en estos animales, aunque *C. jejuni* y *C. coli* también representan una proporción sustancial de los aislamientos (Sandberg *et al.*, 2002). Pese a que son pocos los estudios que han planteado la posible presencia de *Campylobacter* spp. en los mamíferos salvajes, *C. jejuni* y *C. coli* han sido aislados en varios de ellos, como la liebre, erizo, ardilla, venado, tejón, zorro y algunos roedores (Rosef *et al.*, 1983; Petersen *et al.*, 2001).

En los últimos años se ha aislado también en insectos, como moscas (Nichols, 2005), escarabajos (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995), cucarachas (Umunabuike y Irokanulo, 1986), amebas (Axelsson-Olsson *et al.*, 2005) e incluso en agua de río, agua subterránea o de lluvia (Jones, 2001), creyéndose en algunos casos que el estudio de estos reservorios de *Campylobacter* en el medio ambiente podría desvelar información importante sobre los modos de transmisión de la bacteria.

1.6 Formación de biopelículas

Como se ha señalado en los apartados anteriores, las especies del género *Campylobacter* requieren de condiciones muy específicas para su crecimiento y son bastante susceptibles a diversos factores de estrés ambiental. Estas características, en principio, bastarían para que estos microorganismos no fuesen capaces de sobrevivir en determinados ambientes como, por ejemplo, en condiciones aerobias o a bajas temperaturas (Nguyen *et al.*, 2012), pero la realidad es que *C. jejuni* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Esta ubicuidad podría explicarse por la capacidad del patógeno de formar biopelículas, ya que es frecuente la posibilidad de aislarlo de este modo en diversos entornos naturales (Maal-Bared *et al.*, 2012).

Las biopelículas o *biofilms* son comunidades multicelulares estructuradas, de células microbianas, densamente pobladas, que crecen en las distintas superficies y se rodean una matriz secretada por ellas mismas, formada por ADN, proteínas y polisacáridos (Nadell *et al.*, 2009). Estas estructuras permiten al microorganismo sobrevivir en ambientes en los que normalmente no lo haría, lo capacitan para adquirir los nutrientes adecuados para su supervivencia y además le garantizan una protección contra antibióticos y desinfectantes (Simões *et al.*, 2010), así como frente a las defensas del hospedador (Kalmokoff *et al.*, 2006). Incluso, se cree que es la formación de estas estructuras la que permite que *Campylobacter* pueda sobrevivir en agua, al menos durante tres semanas (Lehtola *et al.*, 2006).

Dichas comunidades pueden estar formadas por una única especie microbiana, “biopelículas individuales”, o por varias, lo que se denomina “biopelículas de carácter mixto”, predominando en la mayoría de los entornos estas últimas (O’Toole *et al.*, 2000). Se ha demostrado que, salvo en condiciones muy favorables para su crecimiento, *C. jejuni* forma biopelículas asociándose a otras bacterias, como pueden ser *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* o *Staphylococcus simulans* (Joshua *et al.*, 2006, Teh *et al.*, 2010; Ica *et al.*, 2012).

Además de favorecer la supervivencia, las biopelículas aumentan la eficiencia con la que las especies del género *Campylobacter* desarrollan resistencia a determinados antibióticos (Johnson *et al.*, 2017). Por todo ello, para favorecer el control del microorganismo en la granja y, por tanto, reducir el riesgo alimentario, resulta

imprescindible conocer los mecanismos responsables de su formación, así como aplicar medidas higiénicas específicas para la eliminación de las biopelículas.

1.7 Resistencia a antibióticos

El conocimiento, desde mediados del siglo pasado, de que el uso de antibióticos a dosis subterapéuticas en la alimentación de los animales de producción favorecía el incremento en los índices de crecimiento, provocó el uso masivo de varios de estos productos (Kaakoush *et al.*, 2015). Este planteamiento, a largo plazo, ha desencadenado una alarmante resistencia de varios patógenos humanos a los antibióticos, incluyendo las especies del género *Campylobacter* (Barton, 2014).

La gran importancia de evitar este fenómeno radica principalmente en el gravísimo problema de Salud Pública a nivel mundial que produce la ineficacia, por esta causa, de los distintos tratamientos existentes frente a la campilobacteriosis humana (Helms *et al.*, 2005). Igualmente, la resistencia antibiótica de estos patógenos supone un enorme gasto económico (Duarte *et al.*, 2016).

Aunque, normalmente, las infecciones producidas por las especies del género *Campylobacter* no suelen requerir el uso de antibióticos al ser, en la mayoría de las veces, casos esporádicos y autolimitantes, en determinadas manifestaciones graves de la enfermedad, así como en individuos inmunocomprometidos, esta terapia se encuentra más que justificada (Johnson *et al.*, 2017).

En Medicina Humana, los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en la campilobacteriosis incluyen: macrólidos (eritromicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), algunas tetraciclinas (Moore *et al.*, 2006) y, en casos muy graves de enfermedad sistémica, determinados aminoglucósidos (Sáenz *et al.*, 2000). Según diversos autores, existe una relación directa entre el aumento de la utilización de terapias antibióticas, tanto en Medicina como en Veterinaria, con el incremento de aislados de especies de este género con resistencia a macrólidos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, entre otros (Aarestrup y Engberg, 2001; Wiczorek y Osek, 2013). Desde hace años se ha confirmado que el abuso de fluoroquinolonas en la industria avícola ha sido en parte responsable del aumento de la prevalencia de *C. jejuni* resistentes a estos fármacos (Smith *et al.*, 1999). También se ha sugerido que el abuso de macrólidos

y fluoroquinolonas en otros animales destinados al consumo humano podría aumentar el riesgo de resistencias en el hombre (Kashoma *et al.*, 2015; Klein-Jöbstl *et al.*, 2016) . Además, se ha demostrado que la administración de fluoroquinolonas en las aves de corral propicia la aparición de cepas resistentes al ciprofloxacino (Gupta *et al.*, 2004), lo que podría condicionar determinados tratamientos terapéuticos en estos animales.

C. jejuni puede adquirir resistencia a los antibióticos por diversos mecanismos, como por mutación espontánea o por transferencia horizontal de genes a través de transformación, transducción o conjugación (Kumar *et al.*, 2016). Como ya se ha señalado, muchas cepas presentan gran facilidad de mutación, por lo que esta especie se caracteriza por una gran diversidad y variabilidad genética, lo que potencia la posibilidad de resistencia a los antibióticos (Young *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que cuando este microorganismo ha desarrollado resistencia, puede transmitirla de manera eficaz a través de las biopelículas (Bae *et al.*, 2014) y, al tener éstas una gran facilidad para la absorción de ADN libre, pueden transferir dicha capacidad a las células contiguas sin que resulte complicado. Se ha determinado que la frecuencia de esta transferencia está vinculada con, al menos, dos factores; por una parte, se observa una correlación directa con la densidad bacteriana, seguramente debido a la existencia de una elevada cantidad de ADN extracelular (Wilson *et al.*, 2003) y, por otra, se ha revelado que se ve favorecida en condiciones limitadas de oxígeno, como sucede en el tracto gastrointestinal, lo que podría evidenciar la regulación ambiental de la transferencia horizontal de genes *in vivo* (Young *et al.*, 2007).

A medida de que las resistencias de este microorganismo se vuelven cada vez más frecuentes, resulta imprescindible profundizar en los mecanismos responsables, con el fin de desarrollar nuevos tratamientos y estrategias eficaces contra la enfermedad y que, a la vez, eviten dichos mecanismos de resistencia (Johnson *et al.*, 2017).

II. CAMPILOBACTERIOSIS EN HUMANOS

2.1 Evolución e incidencia estimada

Campylobacter spp. se aisló por primera vez en el hombre durante un brote de enteritis transmitida por la leche en 1938 (Levy, 1946). Posteriormente, alrededor de 1960, una serie de “vibriosis”, al parecer relacionados con lo que hoy conocemos como *C. jejuni* y *C. coli*, fueron aislados de seres humanos con diarrea (King, 1957, 1962). Sin embargo, no fue hasta la década de los setenta del siglo XX cuando se reconoció el potencial patógeno que representaba el género *Campylobacter* para el hombre (Dekeyser *et al.*, 1972; Franklin y Ulmer, 1974).

Más tarde, gracias a la aparición del medio de Skirrow, se asoció este grupo de patógenos con la diarrea, lo que provocó que numerosos países comunicaran la presencia de casos de campilobacteriosis (Skirrow, 1994). Durante los últimos 20 años, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado rápidamente, en gran parte debido a la mejora progresiva de los métodos de detección (Newell *et al.*, 2010).

C. jejuni es el patógeno de transmisión alimentaria que provoca el mayor número de casos de enfermedad desde el año 2005 (ECDC, 2018, 2017). Desde entonces el número de personas afectadas por episodios de campilobacteriosis en la Unión Europea (UE) ha aumentado de forma destacada, pasando de 175.561 casos en 2006 hasta 246.307 en 2017, lo que supone una media de 66 casos por cada 100.000 habitantes, con 20.810 hospitalizaciones y 45 defunciones (EFSA, 2018).

En la siguiente figura se puede observar el número de casos de las principales zoonosis notificados en la UE durante los últimos años. *Campylobacter* spp. representa el 70% del total, superando desde 2005 a *Salmonella* spp. como el agente zoonótico más frecuente (EFSA, 2015a), llegándose en 2017 a multiplicar por 2,6 los casos asociados a *Campylobacter* spp., en relación con los de *Salmonella* spp. (EFSA, 2018).

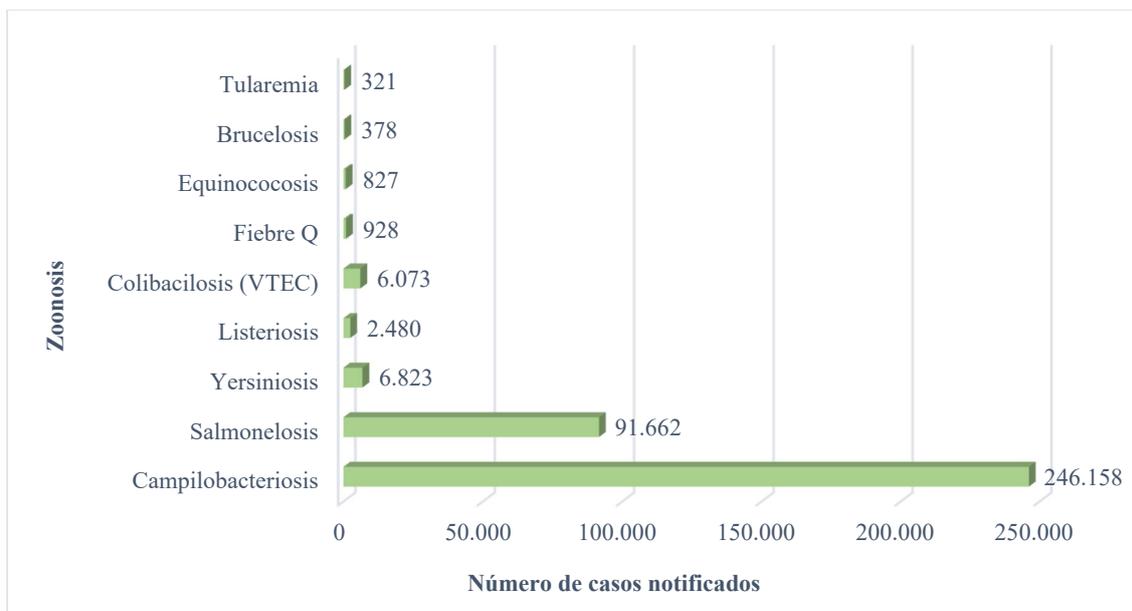


Figura 2. Número de casos notificados de las principales zoonosis humanas en la Unión Europea en 2017 (adaptada de EFSA, 2018).

La evolución en España es similar; en 2016, se notificaron un total de 15.556 casos, confirmándose 14.856, con una estimación aproximada de 30,7 casos por cada 100.000 habitantes, lo que supone un aumento considerable, si tenemos en cuenta que los confirmados en 2012 en nuestro país fueron 5.448 (EFSA, 2017). En relación con nuestra comunidad autónoma ocurre algo similar, ya que la tasa de incidencia de la enfermedad ha ido en aumento, pasando de 11,4 casos por 100.000 habitantes en 2008 a 33,5 casos en 2015 (Berradre-Sáenz *et al.*, 2017). Según los datos del Servicio de Epidemiología de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, en 2017 se notificaron 1.000 casos, lo que representa una tasa de 41,2 casos por 100.000 habitantes.

Aunque en otros países la situación es parecida, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que, tanto en países desarrollados como en desarrollo, *Campylobacter* es la principal causa de gastroenteritis bacteriana en el hombre en todo el mundo (OMS, 2018), en un estudio publicado a mediados de esta década (Havelaar *et al.*, 2015), se estimó que, en los países pertenecientes a la OMS, este patógeno provocaba aproximadamente 95 millones de casos de enfermedad al año, con más de 21.000 muertes. Además, el mismo estudio determinó que en toda la población mundial se ha perdido, una media de 400.000 años de discapacidad debidos a este microorganismo, así como más de un millón y medio de años de vida por muertes prematuras. En la actualidad, la incidencia varía notablemente en los distintos países (Kaakoush *et al.*, 2015), probablemente debido

a las diferencias en los sistemas de vigilancia, así como a las diferencias reales en la incidencia.

2.2 Cuadro clínico

La gran mayoría de los casos de campilobacteriosis en el hombre se presentan en forma de infecciones gastrointestinales (Man, 2011). La enfermedad suele ser autolimitante (Humphrey *et al.*, 2007) y el periodo de incubación varía de 2 a 5 días (Skirrow, 1994), aunque en algunos casos se prolonga hasta las dos semanas y en algunos enfermos se pueden presentar recidivas (Richardson *et al.*, 1981; Black *et al.*, 1988).

El síntoma más común es una repentina diarrea inicial, que puede ser acuosa o disenteriforme, con moco y sangre, dependiendo de la capacidad virulenta de la cepa implicada (Ketley, 1997). En los pacientes con diarrea secretora o en la primera fase acuosa de la diarrea existe un predominio de lesiones coloretcales, que comienzan con edema e hiperemia y evolucionan a petequias, hemorragias, friabilidad de la mucosa (Blaser y Engberg, 2008) e incluso ulceraciones similares a las de la colitis ulcerosa (Peterson, 1994). La colitis infecciosa causada por *C. jejuni* es similar a la producida por *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Entamoeba* spp. o *Clostridium difficile* (Pawlowski *et al.*, 2009).

La anatomía patológica del intestino afectado muestra edema, conglomerados de células polimorfonucleares y una arquitectura conservada de las criptas (Peterson, 1994). En la colitis predominan las células inflamatorias crónicas (linfocitos y plasmocitos), se altera la arquitectura de las criptas y hay depleción mucosa. Como síntomas, se aprecia dolor abdominal, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, náuseas y vómitos (Kaakoush *et al.*, 2015). La aparición de fiebre precede a menudo a la de diarrea en 12 a 24 horas (Black *et al.*, 1988). La excreción fecal de la bacteria por los individuos afectados suele continuar durante dos o tres semanas después de la aparición de los síntomas (Skirrow, 1994).

C. jejuni, junto con otros agentes como *Salmonella*, *Shigella* o *Escherichia coli*, constituye una de las causas frecuentes de lo que se conoce como “diarrea del viajero”, una enfermedad con gran incidencia (puede llegar al 50%), que afecta sobre todo a personas residentes en países industrializados, que visitan zonas tropicales y subtropicales (Arduino y DuPont, 1993).

Un pequeño porcentaje de los pacientes afectados desarrolla artritis reactiva como secuela de la enteritis causada por *C. jejuni*, pudiéndose observar el inicio de la artritis hasta cuatro semanas después de la infección (Peterson, 1994). Otra posible secuela es la inflamación aguda de los nervios periféricos, conocida como síndrome de Guillain-Barré o su variante, el síndrome de Miller Fisher (Roberts *et al.*, 1987). La mayoría de las veces, los síntomas de este síndrome aparecen cuando ya han desaparecido los de la infección original, siendo más común su aparición en individuos de edades comprendidas entre los 30 y 50 años (Black *et al.*, 1988).

Las manifestaciones extraintestinales de la infección son inusuales, pudiéndose presentar una bacteriemia transitoria en el transcurso de la infección entérica (Black *et al.*, 1988), más frecuente en individuos inmunodeprimidos que en inmunocompetentes (Skirrow *et al.*, 1993; Krause *et al.*, 2002). Otros posibles síntomas relacionados con la campilobacteriosis son el aborto (Simor *et al.*, 1986), la meningitis (Herve *et al.*, 2004), la miocarditis (Pär Wanby, 2001; Hannu *et al.*, 2005), la celulitis (Monselise *et al.*, 2004), el síndrome urémico hemolítico (Peterson, 1994) y el síndrome de Reiter (Pönkä *et al.*, 1981), entre otros, pudiendo aparecer tanto con precedentes de enteritis como sin ellos.

La muerte provocada por esta patología es poco frecuente y suele producirse de forma excepcional en pacientes muy jóvenes o de edad avanzada, o que presentan otras enfermedades graves concomitantes (Ternhag *et al.*, 2005), situándose la tasa de mortalidad en Europa y Estados Unidos (EE.UU.) en valores cercanos al 0,05 por cada mil individuos afectados (Mead *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2012). En los casos humanos de campilobacteriosis, la especie implicada más frecuentemente es *C. jejuni*, seguida por *C. coli* (Weinberger *et al.*, 2013). En cuanto a la dosis infectiva diversos estudios experimentales han demostrado que la ingestión de entre 500 y 800 microorganismos podría ser suficiente para mostrar sintomatología (Robinson, 1981), aumentándose la tasa de infectados a medida que aumenta las dosis (Black *et al.*, 1988).

2.3 Transmisión y supervivencia en alimentos

Como se ha comentado, *Campylobacter* spp. se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza, actuando como reservorio principal el aparato digestivo de distintos animales (Young *et al.*, 2007). La transmisión del patógeno se puede producir

de diversos modos. Aunque la mayoría de los casos se encuentran asociados con la ingestión del microorganismo a través de alimentos o agua contaminados (González y Hänninen, 2012), cabe destacar la importancia de la contaminación cruzada (Wilson *et al.*, 2008). De esta manera, las prácticas de higiene inadecuadas al preparar la comida, tanto en restauración colectiva como en domicilios particulares, parecen ser un riesgo importante de su transmisión (Cogan *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2005). Si la manipulación no fuese correcta, se podría producir una transferencia de las bacterias desde los alimentos contaminados hacia otros crudos o ya procesados, e incluso hacia las manos del manipulador y desde este ampliar su difusión (Humphrey *et al.*, 2001).

La capacidad de estos microorganismos para sobrevivir en distintos medios y ambiente desempeña un papel fundamental en su difusión. Así, el elevado número de casos de campilobacteriosis provocado por *C. jejuni* se asocia con su capacidad de persistencia en los alimentos durante el procesado, almacenamiento y manipulación posterior, pudiéndose encontrar en alimentos envasados en una atmósfera modificada y en comidas preparadas, listas para su consumo (Byrd *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2016).

Aunque a diferencia de otros patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter* no posee la capacidad de multiplicación en el ambiente, incluidos los alimentos, puede sobrevivir en ellos durante periodos de tiempo más o menos extensos (Park, 2002). Este grupo de bacterias son sensibles al calor (de Jong *et al.*, 2012) y no son capaces de sobrevivir a los tratamientos de pasteurización convencionales, siendo su tiempo de reducción decimal de menos de 1 minuto a 60°C (Yang *et al.*, 2001). Se ha estimado, por ejemplo, que *C. jejuni* es capaz de sobrevivir durante varias semanas en carne de pollo a 4°C (Park *et al.*, 2014), pero a temperatura ambiente se favorece su destrucción rápidamente (Hernández-Haba y Hernández-Giménez, 2007).

La congelación y descongelación de los alimentos ayuda a reducir la carga de *Campylobacter* (Bhaduri y Cottrell, 2004). Algunos autores afirman que su inactivación se produce a partir de temperaturas inferiores a 15°C (Doyle, 1989) y que se pueden recuperar a partir de muestras de pollo congeladas después de tres meses de almacenamiento, aunque a niveles mucho más escasos que los correspondientes a los productos frescos (Hernández-Haba y Hernández-Giménez, 2007). La capacidad de este patógeno de sobrevivir a bajas temperaturas reviste mucha importancia en Seguridad Alimentaria, si se tienen en cuenta la magnitud de la enfermedad que causa en humanos así como la dosis infecciosa reducida necesaria para contraerla (Black *et al.*, 1988).

C. jejuni es extremadamente sensible a la desecación, sobre todo a temperatura ambiente (Hernández-Haba y Hernández-Giménez, 2007). Esta vulnerabilidad favorece la reducción de la carga bacteriana en la superficie de las canales refrigeradas con aire, como las de cerdo, vacuno y ovino, no siendo así en el caso del pollo, donde este microorganismo se encontraría protegida por la piel (Peña *et al.*, 2006). *C. jejuni* presenta sensibilidad a elevadas concentraciones de sal, al pH ácido y a la presencia de cloro (Yang *et al.*, 2001; Hernández-Haba y Hernández-Giménez, 2007; Silva *et al.*, 2011), por lo que no permanece viable en aguas cloradas.

2.4 Alimentos implicados en casos esporádicos y brotes de la enfermedad

La campilobacteriosis se asocia con el consumo de una gran variedad de alimentos (Haba, 1993), siendo su vía de transmisión principal la carne cruda o poco cocinada, en especial la de aves de corral (Silva *et al.*, 2011; Zendehbad *et al.*, 2015). Está ampliamente documentada la presencia de *Campylobacter* en todas las partes de la cadena de producción de pollos de carne (FAO/OMS, 2003; Gruntar *et al.*, 2015). A pesar de que, como ya se ha comentado, la principal causa de infección se debe a la carne de pollo, la carne de cerdo mal cocinada, la leche cruda (sin pasteurizar o hervir) o el agua no clorada, se han implicado también en brotes de infección por *Campylobacter* (Sheppard *et al.*, 2009). Del mismo modo, las frutas y verduras regadas y/o lavadas con agua contaminada pueden ser transmisoras de estos patógenos (Chai *et al.*, 2007; Mohammadpour *et al.*, 2018), así como los moluscos, si el agua en el que se encuentran está contaminada por *Campylobacter* (Pitkanen, 2015).

Es importante destacar que la mayoría de la información sobre las fuentes de infección y las vías de transmisión de la campilobacteriosis humana se deriva de las investigaciones llevadas a cabo sobre brotes epidemiológicos. Sin embargo, como ya se ha señalado, tales brotes son relativamente infrecuentes en este patógeno, apareciendo la mayoría de las veces la enfermedad de manera esporádica o aislada (Friedman *et al.*, 2000). Con relación a los casos de campilobacteriosis esporádica, las aves de corral y los productos avícolas se consideran las fuentes de infección más comunes (Skarp *et al.*, 2016). La evidencia epidemiológica de esta hipótesis ha sido recogida durante años en numerosos estudios de casos y controles, en los que el consumo de carne de aves de corral se convierte en un factor de riesgo destacado para la campilobacteriosis (Harris *et al.*,

1986; Kapperud *et al.*, 1992; Effler *et al.*, 2001). Esta hipótesis se confirmó con la reducción repentina de las infecciones por *Campylobacter*, cuando se retiraron del mercado los productos procedentes de aves de corral durante la crisis de la dioxina en Bélgica, en junio de 1999 (Vellinga y Van Loock, 2002).

Otros estudios sugieren otras posibilidades de contagio humano con microorganismos del género *Campylobacter*, entre los que se incluyen la bebida o manipulación de materias primas, el consumo directo de leche contaminada (Eberhart-Phillips *et al.*, 1997; Studahl y Andersson, 2000), el contacto con animales diarreicos (Saeed *et al.*, 1993), con perros o con gatos (Neimann *et al.*, 2003) e incluso la natación en aguas naturales contaminadas, sobre todo como consecuencia de zambullidas, a las que se asocia la ingestión de algunas cantidades de agua (Schönberg-Norio *et al.*, 2004). Y a pesar de que en la actualidad son muchos los estudios realizados con el fin de aclarar las posibles causas de las campilobacteriosis aisladas, la mayoría de los casos esporádicos continúan aún sin explicación (Brown *et al.*, 2004).

Aunque, como se ha mencionado, en la mayoría de las ocasiones las enfermedades causadas por este patógeno aparecen de manera esporádica, a lo largo de la historia se han producido brotes importantes asociados al consumo de alimentos (Pebody *et al.*, 1997). Diversas investigaciones han concluido que los grandes brotes, con cientos o miles de casos, se asociaron con el consumo-ingestión de agua contaminada (Andersson *et al.*, 1997; Kuusi *et al.* 2005; Smith *et al.*, 2006; Jakopanec *et al.*, 2008; Karagiannis *et al.*, 2010), bien debido a la presencia única del patógeno o cuando aparece simultáneamente junto a otros agentes, como *E. coli* (Bopp *et al.*, 2003), *S. sonnei* (Maurer y Stürchler, 2000), *Cryptosporidium* spp. o *Giardia* spp.

La leche sin pasteurizar también es una causa bien documentada de brotes de campilobacteriosis (Evans *et al.*, 1996; Kálmán *et al.*, 2000; CDC, 2009, 2013), comúnmente por la contaminación fecal de la leche cruda (Birkhead *et al.*, 1988), aunque en ocasiones se ha demostrado que animales con mamitis por esta causa pueden excretar *Campylobacter* en leche, directamente de la ubre (Orr *et al.*, 1995). Aunque muchos brotes han sido relacionados con el consumo de carne de pollo (Evans *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2006; Mazick *et al.*, 2006; Inns *et al.*, 2010), la contaminación cruzada, principalmente con pollo crudo en comidas preparadas para grandes colectividades, resulta una de las causas más frecuentes de los brotes (CDC, 1998; Jiménez *et al.*, 2005).

Con menor frecuencia que en los casos anteriores, también se han asociado a brotes de enfermedad otras causas, como el consumo de mariscos (Griffin *et al.*, 1983), fruta y productos cárnicos de origen no aviar contaminado y la transmisión directa interhumana (Cohen *et al.*, 1984; Olsen *et al.*, 2001).

2.5 Epidemiología. Variación estacional

Pese a que la infección debida a *C. jejuni* afecta a individuos de todas las edades, la enfermedad presenta una distribución bimodal, apareciendo un primer pico mucho más acusado en niños menores de 5 años (Gilliss *et al.*, 2013) y otro en adultos jóvenes, de entre 15 y 30 años (Butzler, 2004). Con relación al género, no parece que la incidencia muestre una diferencia muy clara entre hombre y mujeres, a pesar de que algunos estudios señalan que la campilobacteriosis resulta más frecuente en varones (Nichols *et al.*, 2012; Schielke *et al.*, 2014).

Como quiera que el padecimiento de alguna enfermedad crónica podría considerarse un factor de riesgo para el hombre (Friedman *et al.*, 2000), los pacientes con SIDA, diabetes mellitus, úlcera péptica, hernia de hiato o problemas intestinales inferiores se asocian con mayores niveles de infección y enfermedad por problemas de campilobacteriosis, igual que de otras infecciones entéricas.

Además, como es de suponer, la infección por *Campylobacter* resulta más frecuente en personas con determinados hábitos alimentarios, como el consumo de carne de pollo poco cocinada, de comida rápida o de carne cocinada a la barbacoa, así como con el consumo de leche sin pasteurizar o de agua sin tratar (Domingues *et al.*, 2012). También los malos hábitos higiénicos (Henry *et al.*, 2011), el contacto directo con animales de abasto o mascotas (Workman *et al.*, 2005), o determinadas prácticas y actividades de ocio al aire libre, como los baños en aguas naturales (Schönberg-Norio *et al.*, 2004) o los viajes al extranjero (Norkrans y Svedhem, 1982), implican habitualmente un aumento del riesgo.

Una característica notable de la campilobacteriosis en los países de clima templado es la variación estacional. La incidencia de la enfermedad presenta uno o dos picos, que se producen en primavera y verano o principios del otoño (Nylen *et al.*, 2002). Según un estudio de la EFSA publicado en 2010, las variaciones estacionales en distintos

países europeos muestran un patrón muy similar a lo largo de los años (EFSA, 2010b). Aunque esta pauta es en gran medida inexplicable, bien podría estar relacionada con los factores climáticos que provocarían picos estacionales en la prevalencia de *Campylobacter* en pollos de carne (Patrick *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2005), o con la posibilidad de que las moscas actúen como vectores mecánicos, importantes para la transmisión de la infección durante el verano (Nichols, 2005).

Un aumento de la incidencia en primavera, concretamente en mayo en Reino Unido, también se ha asociado con el mayor consumo o manipulación de leche contaminada por aves en contacto con esta en esa época (Southern *et al.*, 1990). Otra de las causas sugeridas para explicar la presencia de los picos estacionales son determinados hábitos humanos más frecuentes durante la estación cálida, como las barbacoas, acampadas, la natación en los lagos y ríos o el consumo de agua de arroyos y lagos (Nylen *et al.*, 2002).

2.6 Incidencia real e impacto económico

A pesar de la importancia de *Campylobacter* a nivel mundial (Altekruse *et al.* 1999), y de que para facilitar su prevención en los países desarrollados hace años que se han puesto en marcha numerosos sistemas de vigilancia (Coker *et al.*, 2002; DOUE, 2003; Bartelt, 2004), existe un elevado grado de incertidumbre sobre la incidencia real de la campilobacteriosis y su impacto (Orihuel *et al.*, 2015).

El número de casos notificados de la enfermedad en el hombre difiere, en mucho, según las distintas estimaciones de los casos reales (Ailes *et al.*, 2012; EFSA, 2017), considerándose que sólo un bajo porcentaje de los casos son verificados, es decir, anotados o registrados como tales, lo que podría atribuirse a varias causas concurrentes (Peña *et al.*, 2006; Schielke *et al.*, 2014). En primer lugar, al tratarse de una enfermedad autolimitante y que en muchas ocasiones cursa con sintomatología leve, es frecuente que los pacientes no acudan al médico o, si lo hacen, su sintomatología se relacione con otra causa (Haba, 1993). En el caso de que el personal sanitario tuviera sospechas de una posible infección por *Campylobacter*, se tomaría una muestra de heces del paciente, con el objeto de determinar si el agente causante de la enfermedad es o no este patógeno (Ek Dahl y Giesecke, 2004; Ailes *et al.*, 2012). Hay que tener en cuenta que no siempre

resulta fácil la detección de este microorganismo, ya que al ser el cultivo de *Campylobacter* spp. más costoso y complicado que el de otras bacterias entéricas (Ingesa-Capaccioni *et al.*, 2015a), muchos laboratorios hospitalarios no realizan esta determinación de forma rutinaria, pudiéndose producir errores. En el caso de que la determinación del agente sea positiva, es necesario que se proceda a la notificación del caso a las autoridades sanitarias, para lo cual debe existir un sistema de vigilancia, del que no se dispone en todos los países ni se utiliza con la misma eficacia (EFSA, 2010a; WHO, 2001).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, para calcular la incidencia real de la enfermedad, en forma de casos, sería necesario aplicar un factor de corrección al número de los notificados, que tuviese en cuenta la pérdida de casos producida en cada uno de los pasos de la cadena de notificación al sistema de vigilancia (Peña *et al.*, 2006). Con el fin de determinar la incidencia real, en 1999, Mead realizó un estudio en el cual se reveló que en EE.UU. sólo se confirmaba uno de cada 38 casos (Mead *et al.*, 1999). Otros estudios, con la misma finalidad, determinaron que la incidencia real multiplicaría por ocho o incluso por cien los casos confirmados (Nachamkin *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 2004).

La OMS estima que aproximadamente el 1% de la población se infecta cada año (Hernández-Haba y Hernández-Giménez, 2007) y, según estudios de EFSA, se cree que en la UE se producen anualmente 9 millones de casos de infecciones por *Campylobacter* spp., frente a los aproximadamente 200.000 casos confirmados oficialmente, es decir, la incidencia real multiplicaría casi por 45 los casos confirmados (EFSA, 2011). En España, se estima que el factor de corrección deberá ser mucho más elevado, ya que solo se notificaría un caso por cada 238 reales.

El cálculo de los costes derivados de la infección por *Campylobacter*, al igual que el de otras enfermedades alimentarias resulta muy complejo, ya que, a la divergencia entre los casos notificados y los reales, habría que añadir la dificultad de valorar los gastos ocasionados por las secuelas que la enfermedad puede provocar (McLinden *et al.*, 2014). Se calcula que el coste ocasionado por estos agentes en la UE podría llegar a los 2.400 millones de euros anuales (EFSA, 2017), estimándose que en España este valor podía llegar a 120 millones de euros, según fuentes de Centro Nacional de Epidemiología.

III. IMPORTANCIA EN AVES

3.1 Prevalencia

Como se ha comentado, las aves domésticas y salvajes constituyen el reservorio más importante de *Campylobacter* y fuente de infección para otras especies animales y para el hombre (Young *et al.*, 2007). Tradicionalmente, se ha considerado que estos animales albergan los microorganismos en el tracto intestinal, habitualmente sin presentar signos clínicos, permaneciendo como portadores asintomáticos en la mayor parte de los casos (Young *et al.*, 2007; Cecilia *et al.*, 2013); sin embargo, más recientemente se ha demostrado que cuando *C. jejuni* coloniza el intestino de las aves, el microorganismo interactúa con el epitelio intestinal e influye en las funciones celulares del hospedador, lo que genera consecuencias sobre la absorción de nutrientes (Awad *et al.*, 2018). La EFSA estima que el reservorio aviar de *Campylobacter* es el responsable del 50 al 80% de los casos de campilobacteriosis humana, mientras que el procesado y la manipulación de los alimentos de origen animal pueden serlo del 20 al 30% (EFSA, 2010b).

La mayoría de los estudios sobre la prevalencia de *Campylobacter* en aves de corral llevados a cabo en diferentes países ofrecen resultados muy diversos, por lo que no suelen ser comparables, debido a la escasa o nula estandarización en el muestreo y la metodología utilizada en el aislamiento (Pokamunski *et al.*, 1986; Gregory *et al.*, 1997; Jore *et al.*, 2010). Con el fin de poder comparar los diversos datos obtenidos, en 2008 la UE realizó un estudio de prevalencia normalizado en todos los estados miembros, a partir de contenido de ciegos de pollos (EFSA, 2010c), en el que se obtuvo un porcentaje medio de prevalencia del 75,8%, advirtiéndose resultados muy diversos entre los distintos países, con prevalencias entre el 2% y el 100% de los lotes de pollos. Aunque se cree que algunos factores, como el número de animales por granja, la distancia entre ellas o determinados parámetros zootécnicos, pueden influir en la prevalencia de *Campylobacter*, las razones por las que se presentan tales diferencias no se conocen con certeza hasta el momento (Bouwknegt *et al.*, 2004; McDowell *et al.*, 2008; Ridley *et al.*, 2011).

En relación con las especies del género *Campylobacter* aisladas en pollo, en diversos estudios se confirma que *C. jejuni* es la más común, seguida por *C. coli* y *C. lari*; incluso en algunos casos es frecuente que los animales estén colonizados por más de un

tipo de cepa de *C. jejuni*, lo que podría ser reflejo de la diversidad de fuentes de infección para un mismo lote (Newell y Fearnley, 2003).

Es muy frecuente que durante el sacrificio y, por diversas razones, estos microorganismos, que inicialmente se encuentra en el intestino de las aves, pasen a la canal, contaminándola (Hue *et al.*, 2010). Según datos de EFSA (EFSA, 2018), la prevalencia de *Campylobacter* en carne de pollo en los estados miembros de la UE se situó en torno al 37,4% en el año 2017. En lo referente a España, un informe del año 2013 señalaba una prevalencia en matadero del 53,3%, del 26,7% en las plantas de procesado y del 70% en los puntos de venta, situándose así nuestro país como uno de los que mayor prevalencia de toda la UE (EFSA, 2015b). Al igual que lo que ocurre en los lotes de pollos, en las naves de cría, la especie que se aísla con mayor frecuencia en la carne es *C. jejuni*, seguida por *C. coli* y *C. lari* (EFSA, 2017).

Por otra parte, un informe de un estudio publicado por la OMS (WHO, 2001), reveló que existe una relación lineal entre la prevalencia de *Campylobacter* en los lotes de pollos y la incidencia de la enfermedad en humanos, por lo que es indudable que la reducción de estos patógenos en la producción primaria resultaría decisiva para la disminución de la cantidad de casos en humanos.

3.2 Colonización

Conocida la relevancia que presenta *C. jejuni* en pollos de carne en relación con la Salud Pública, a largo de los últimos años se han desarrollado diversos estudios con el fin de aclarar cómo se lleva a cabo el proceso de colonización intestinal. Generalmente, *C. jejuni* se hospeda en el intestino de las aves, actuando como comensal (Lee y Newell, 2006), colonizando principalmente las células epiteliales de la mucosa de los ciegos e intestino delgado (Beery *et al.*, 1988), aunque también se puede recuperar de otras zonas del tubo digestivo, así como de hígado y bazo (Knudsen *et al.*, 2006).

Recién nacidos, después de la eclosión, los pollitos parecen estar libres de *Campylobacter* (Jacobs-Reitsma, 1995) y, aunque es posible la infección experimental de animales de un día (Stern *et al.*, 1988), en condiciones de campo resulta raro aislar las bacterias en pollos menores de dos semanas (Berndtson *et al.*, 1996a), siendo más frecuente la condición de positivos a partir de la tercera (Evans y Sayers, 2000). Con estos

datos, se asume que la colonización natural de los pollitos está vinculada con la edad (Stas *et al.*, 1999), aunque no se sabe con exactitud cuál o cuáles pueden ser los desencadenantes de que este hecho pueda producirse (Hermans *et al.*, 2011b). Tal circunstancia podría ser atribuida a la protección que aportan los anticuerpos maternos, teniendo en cuenta que su periodo de persistencia en los pollitos (entre 15 y 21 días) coincide con su resistencia a ser colonizados (Cawthraw y Newell, 2010), aunque diversos estudios han demostrado que esta protección sería solo de tipo parcial (Ringoir *et al.*, 2007), por lo que se deduce que deben existir también otros factores que contribuirían a la susceptibilidad de los pollitos.

Por otra parte, en sus primeros días el intestino de los pollitos experimenta una gran cantidad de cambios fisiológicos, produciéndose diversas modificaciones en la microbiota intestinal y la maduración de la inmunidad de mucosas que, unidos a cambios en el manejo y el alimento podrían influir en la resistencia a la infección (Newell y Fearnley, 2003). Aunque experimentalmente se ha logrado infectar pollos con *C. jejuni* aplicando dosis tan bajas como 40 UFC (Cawthraw *et al.*, 1996), se ha demostrado que la dosis necesarias para que se produzca la colonización no siempre son similares y que dependen de la cepa bacteriana y de las características del animal (Ringoir y Korolik, 2003).

Una vez que el patógeno se ha establecido en la manada, las aves colonizadas presentan en poco tiempo un gran número de bacterias en el ciego, detectables fácilmente en heces (Stern *et al.*, 2001). La alta eliminación fecal, así como la coprofagia característica de los pollos (Gormley *et al.*, 2014), provocan que la difusión de *Campylobacter* entre los animales del lote sea extremadamente rápida (van Gerwe *et al.*, 2009), encontrándose con frecuencia porcentajes de colonización cercanos al 100%, a los pocos días de la colonización inicial (Rushton *et al.*, 2009).

Con relación a la duración de la colonización, en los pollos de carne de tipo pesado, al menos, ésta persiste durante toda la vida (Sahin *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2008a); sin embargo, en estudios llevados a cabo con animales adultos, a partir de las 8 semanas de vida se ha observado una reducción del número de aves infectadas y de la carga de *Campylobacter* en el contenido cecal (Achen *et al.*, 1998). Esta disminución con frecuencia va unida a la presencia de anticuerpos, lo que podría sugerir que la activación de la respuesta inmunitaria puede estar asociada con la eliminación de la infección (Genigeorgis *et al.*, 1986), pero la eficacia de los anticuerpos en la prevención o en la

limitación de la infección sigue siendo hasta ahora una incógnita y, aunque se han realizado estudios con diferentes vacunas, por el momento ninguna ha tenido resultados plenamente eficaces contra *C. jejuni* (Nielsen *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta estos datos, es evidente que una vez que se ha producido la colonización, resulta muy complicado frenar su avance, por lo que es imprescindible conocer los mecanismos que utiliza *Campylobacter* para introducirse en la manada y poder incidir en la eliminación de la bacteria con anterioridad, para evitar que se inicie la colonización.

3.3 Transmisión vertical

A pesar de que existen datos contradictorios (Cox *et al.*, 2012; Agunos *et al.*, 2014), la mayor parte de los estudios concluyen que en este caso no se produce transmisión vertical (Bull *et al.*, 2006; Callicott *et al.*, 2006), aunque consideramos importante y suficientemente justificado realizar una mínima reflexión sobre este aspecto, por lo que en este apartado recogemos la posibilidad de que *Campylobacter* se pueda transmitir desde los reproductores a la progenie.

En determinados estudios ha sido posible aislar *C. jejuni* de distintos órganos del aparato reproductor de las aves de corral. En el caso de las hembras, del oviducto y los folículos ováricos (Buhr *et al.*, 2002; Hiatt *et al.*, 2002a), y en los machos del semen (Hiatt *et al.*, 2003), base sobre la que podría plantearse la posibilidad de transmisión vertical a la descendencia. Sin embargo, tal planteamiento falla en la práctica, porque la prevalencia del patógeno en el interior del huevo resulta escasa o nula (Doyle, 1984; Kazwala *et al.*, 1990). Otros estudios publicados sugieren también, de manera indirecta, la posible eficacia de esta forma de transmisión; por ejemplo, el aislamiento de estas bacterias en restos de cáscara y plumón tras la eclosión y también en la propia incubadora (Hiatt *et al.*, 2002b; Byrd *et al.*, 2007), pero la realidad es que, en la mayor parte de los casos, las bacterias procederían de los restos de heces presentes en la cáscara del huevo y no en su interior (Doyle, 1984).

Por otra parte, también cabría la posibilidad de que estos microorganismos colonizaran el huevo desde el exterior, como ocurre con otros patógenos aviares (Clay y Board, 1991); sin embargo, esto se considera también poco probable si tenemos en cuenta

que *C. jejuni* no suele ser capaz de atravesar la cáscara intacta del huevo, incluso en condiciones experimentales (Allen y Griffiths, 2001) y que la supervivencia en su superficie sería además muy limitada, según estudios previos (Sahin *et al.*, 2003).

Todo esto, sumado a que no es habitual el aislamiento de cepas similares de los reproductores y la progenie (Chuma *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2001) y a que, como se ha señalado, en condiciones de campo la infección en los pollitos no suele hacerse presente hasta al menos las tres semanas de vida, lleva a pensar que este tipo de transmisión posee una relevancia baja de la infección, si es que existe.

3.4 Transmisión horizontal

Conociéndose la poca importancia que presentaría la transmisión de tipo vertical en esta infección y la gran rapidez con la que se produce la difusión dentro de la manada, es evidente que la principal ruta de introducción de *Campylobacter* en la nave ha de ser la transmisión horizontal. A lo largo del tiempo, diversos estudios han intentado esclarecer tanto las fuentes y modo de transmisión, como los factores de riesgo más relevantes asociados a la colonización de los pollos por *Campylobacter* (Sahin *et al.*, 2002), sin que hasta la fecha se haya podido establecer una forma única.

Considerando que el patógeno puede persistir en el ambiente exterior cercano a las granjas (Keener *et al.*, 2004) y la baja dosis necesaria para la colonización de los animales (Cawthraw *et al.*, 1996), resulta obvio que su introducción en las naves podría desencadenar fácilmente la infección del lote. Entre las formas de introducción probables en la manada, se debe considerar la posibilidad de persistencia de *Campylobacter* en el interior de la nave o en sus inmediaciones, entre los diferentes lotes (Newell y Fearnley, 2003), apostándose por esta vía como la responsable de aproximadamente un 20% de la prevalencia en granjas (EFSA, 2011).

Aunque en general las operaciones de limpieza y desinfección realizadas correctamente, junto con un tiempo de vaciado adecuado de las naves serían suficientes para la eliminación de *Campylobacter* del ambiente (Newell y Fearnley, 2003), con frecuencia se ha podido recuperar de zonas encharcadas (Messens *et al.*, 2009), pediluvios o rodaluvios que no han sido desinfectados adecuadamente (McDowell *et al.*, 2008). Por otra parte, es primordial recordar que, a pesar de que su supervivencia en el ambiente es

muy baja, en condiciones normales (Nachamkin, 2007) son capaces de sobrevivir durante semanas a temperaturas bajas y en condiciones adecuadas de humedad (García *et al.*, 2013). Tanto es así que se ha descrito cierta asociación entre las condiciones climatológicas y la contaminación ambiental por *Campylobacter*, siendo más habitual el aislamiento en épocas de lluvias y después de ellas (EFSA, 2010c).

En cuanto al origen de las primeras infecciones, se cree que el agua puede ser una de las principales fuentes y que su importancia en la colonización de la manada o la nave podría estar subestimada, ya que el aislamiento a partir de este elemento resulta complicado (Jones, 2001). Se ha comprobado el posible contagio de los pollos mediante el agua de bebida, al demostrar en algunos estudios la coincidencia total de las cepas aisladas de los animales con las procedentes del agua de los pozos de abastecimiento de la granja (Messens *et al.*, 2009).

Por otra parte, aunque en principio y por sí misma, el agua no proporciona las condiciones idóneas para la supervivencia durante tiempo prolongado (Jones, 2001), los microorganismos del género *Campylobacter* han sido capaces de desarrollar mecanismos para prolongarla, incluyendo los estados de formas viables no cultivables (Koenraad *et al.*, 1997), la formación de biopelículas (Buswell *et al.*, 1998) o la supervivencia intracelular en amebas de vida libre (Axelsson-Olsson *et al.*, 2005).

Además, pese a que la transmisión interhumana de la enfermedad es poco frecuente y que la infección de los animales a partir del hombre no se considera importante, varios estudios han intentado determinar el papel que la actividad humana desempeña en relación con la colonización (Newell y Fearnley, 2003). De este modo, se ha aislado *Campylobacter* de la ropa, del calzado o incluso de las manos de los trabajadores y de los visitantes de las granjas (Newell y Fearnley, 2003) y se podría establecer una relación directa entre el riesgo de contaminación del lote de aves que pueblan la nave y el número de visitas por día (Refrégier-Petton *et al.*, 2001). Con estos datos, se pone en evidencia que las personas (empleados, técnicos, visitantes, etcétera) pueden actuar como vehículo para la introducción de los microorganismos en la granja, desde el ambiente exterior.

Determinadas prácticas de manejo también constituirían un factor de riesgo importante. Sería el caso del aclarado de los lotes, ya que se ha comprobado que en granjas en las que se realiza esta práctica el riesgo de colonización aumenta

significativamente en relación con otras donde no se realiza (Allen *et al.*, 2008), lo que podría atribuirse a la limpieza inadecuada de las jaulas entre explotaciones (Patriarchi *et al.*, 2010). Otros peligros asociados al manejo pueden estar representados por el retraso en la retirada de animales muertos y la retirada o acumulación incorrecta de la cama de los animales (Cardinale *et al.*, 2004).

Al igual que sucede en el caso del hombre, algunos insectos o animales procedentes del exterior podrían ejercer un papel importante en la introducción de *C. jejuni* en las naves, desde el punto de vista epidemiológico (Humphrey *et al.*, 2007). En primer lugar, habría que considerar, por ejemplo, el riesgo que supone la presencia de aves silvestres y animales domésticos o de abasto en la explotación o incluso en los alrededores de las granjas, así como la posibilidad de que estuviesen infectados con estos microorganismos, pudiendo transmitir el agente al lote o contaminar el ambiente cercano a la nave (Craven *et al.*, 2000; Hald *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2010a). Aunque hasta ahora no se haya podido determinar con claridad cómo sucede, resulta claro el riesgo que supone la posible presencia de otras especies animales cerca de las naves, hasta el punto de que existen estudios en los cuales se han descrito casos de lotes infectados con la misma cepa aislada de las heces de los animales que conviven en sus cercanías con las aves (Hiatt *et al.*, 2002c; Ridley *et al.*, 2011a).

Con todas las consideraciones expuestas, parece evidente que el estado adecuado de conservación de las naves, así como las buenas prácticas de manejo llevadas a cabo por el personal de la granja podrían atenuar el riesgo de contagio e infección de los animales (Berndtson *et al.*, 1996b).

En relación con el papel que pudieran desempeñar insectos y roedores existe controversia, aunque varios autores han considerado la posibilidad de su intervención. Por una parte, se estima que el papel que tendrían como vectores sería limitado, debido al escaso tiempo de supervivencia de la bacteria en ellos (Strother *et al.*, 2005; Hansson *et al.*, 2007b; Hald *et al.*, 2008), así como a la poca distancia que son capaces de recorrer, en el caso de los insectos. A pesar de ello, existen estudios que aseguran que la colocación de mosquiteras en las granjas de pollos logró reducir hasta cuatro veces el porcentaje de lotes positivos (Hald *et al.*, 2007), lo que podría llevar a creer que las moscas o mosquitos podrían actuar como vectores para la introducción del patógeno; además, esta idea podría explicar los picos de prevalencia que la enfermedad suele presentar en las épocas calurosas, cuando existe más cantidad de insectos (Nichols, 2005). Además, al igual que

ocurre en el caso de la *Salmonella* spp (Wales *et al.*, 2010), se considera que el ácaro rojo (*Demanyssus gallinae*) podría representar un importante papel en la introducción del patógeno y su difusión en las naves.

Como se ha expuesto anteriormente, varios estudios han demostrado que cuando los pollitos llegan a las granjas están libres del patógeno y que es en ellas donde se produce su infección; por lo tanto, la implantación de *Campylobacter* en la nave de cría depende de la eficacia de las medidas de bioseguridad destinadas a evitar la entrada del microorganismo y la consiguiente colonización de los pollos (Meunier *et al.*, 2016).

3.5 Factores de virulencia/colonización

No es discutible que los daños producidos por las infecciones microbianas dependen fundamentalmente de la virulencia de la cepa y de la respuesta inmunitaria del hospedador. En *C. jejuni*, pese a que los conocimientos acerca de los mecanismos que determinan la virulencia han avanzado notablemente desde la secuenciación de la cepa NCTC 11168 en 2000, en la actualidad aún no se encuentran completamente definidos (Parkhill *et al.*, 2000), posiblemente debido a las diferencias entre este microorganismo y otros patógenos entéricos, cuya información habitualmente se utiliza como referencia (Dasti *et al.*, 2010).

Como ya se ha expuesto, al contrario de lo que sucede en el caso del hombre, *C. jejuni* provoca en los pollos una colonización persistente y asintomática a nivel intestinal. Al no producirse signos de enfermedad en aves, es más preciso definir estos mecanismos como factores de colonización. Está demostrado que en el intestino de los pollos existen diferentes elementos que dificultan el crecimiento óptimo de *C. jejuni* (Murphy *et al.*, 2006), por lo que este patógeno necesita utilizar múltiples estrategias para poder llevar a cabo una colonización con éxito (Newell, 2002). Es preciso que, para que la bacteria pueda colonizar el intestino de estos animales, tenga la capacidad de producir motilidad, adhesión e invasión (Bang *et al.*, 2003), a la vez que resista la acción de determinados ambientes adversos (Hermans *et al.*, 2011c).

C. jejuni posee uno o dos flagelos polares que le confieren una movilidad rápida, que se ve aumentada si incrementa la viscosidad (Shabbir *et al.*, 2018), un hecho crítico para el éxito de la colonización (Guerry, 2007). Los flagelos están compuestos por dos

flagelinas (*flaA* y *flaB*) de carácter proteico, codificadas por sus respectivos genes, *flaA* y *flaB* (Hendrixson *et al.*, 2001). Aunque la expresión de ambos genes resulta imprescindible para que la bacteria presente la máxima motilidad (McKinney *et al.*, 2010), los experimentos llevados a cabo con mutantes han demostrado que *flaA* resulta decisiva para la colonización en pollos, dado que las mutaciones inducidas en su gen producen una disminución importante de la movilidad, observándose una reducción ligera si la mutación se produce en el gen *flaB* (Wassenaar *et al.*, 1993). Además de la importancia en la movilidad, el gen *flaA* parece también corresponsable de la expresión de adherencia e invasión celular, en las que interviene (Jain *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha demostrado también que los mutantes inmóviles de *C. jejuni* pueden colonizar pollos cuando se inoculan grandes cantidades de células viables (Wösten *et al.*, 2004), concluyéndose así que todavía falta mucho por conocer en relación con la fisiología del movimiento de estos microorganismos y su intervención en la colonización del tracto gastrointestinal de los pollos. Sin embargo, se especula con que la movilidad probablemente sea necesaria para que el patógeno pueda alcanzar la capa de mucina de las células cecales (Beery *et al.*, 1988) y permitirle resistir al peristaltismo intestinal (Hendrixson y DiRita, 2004).

La quimiotaxis representa la reacción de algunas células ante la concentración de determinados agentes químicos en el medio ambiente. Este mecanismo permite a las bacterias dirigirse hacia condiciones más propicias para llevar a cabo la invasión del hospedador. En el caso de *C. jejuni*, se ha demostrado que las moléculas con las que presenta una atracción quimiotáctica más fuerte son las mucinas, un tipo de glicoproteínas que resultan ser componentes primarios del moco intestinal (Hermans *et al.*, 2011b).

Por otra parte, para que concluya con éxito la colonización es necesario que antes se haya producido la adhesión de las bacterias a las células epiteliales del intestino, hecho que en el caso de *C. jejuni* está mediado por varias adhesinas presentes en la superficie bacteriana (Jin *et al.*, 2001). Existen múltiples estudios realizados con células humanas que justifican la importancia de determinadas interacciones adhesina-receptor específicas, como la que produce la CadF (una proteína de membrana externa), la FlpA (la proteína de la fibronectina) o la JlpA (una proteína de choque térmico) (Rubinchik *et al.*, 2012), pero además de dicha interacción específica también parecen tener lugar otras inespecíficas (Crushell *et al.*, 2004), lo que evidencia que el proceso de adherencia de *C. jejuni* se compone de distintos mecanismos.

Los flagelos, además de permitir la movilidad de *C. jejuni*, también funcionan como aparato de secreción para los antígenos de invasión de las campilobacterias (proteínas Cia) (Konkel *et al.*, 2004). Se ha demostrado que dicha secreción aumenta con la exposición al moco intestinal del pollo (Biswas *et al.*, 2007), así como que resulta importante para la colonización del intestino de estas aves (Ziprin *et al.*, 2001) y para la invasión celular (Konkel *et al.*, 1999). En estudios realizados *in vitro*, parece confirmarse que estas bacterias, a pesar de ser capaces de invadir células intestinales primarias aisladas de las aves, sobreviven en enterocitos primarios de pollo *in vivo* (Van Deun *et al.*, 2007). Dado que la mayoría de los estudios se han llevado a cabo con células humanas y las condiciones de ambos hospedadores no son similares, no existe mucha información sobre los genes involucrados en la invasión de *C. jejuni* en aves.

C. jejuni posee distintos sistemas reguladores que le permiten la supervivencia en el intestino. Uno de los más estudiados es el denominado “Cme”, una bomba de flujo que, según diversos autores, confiere a la bacteria resistencia frente a diversos productos como metales pesados, antibióticos e incluso frente a las sales biliares en el intestino de las aves (Lin *et al.*, 2002). Además de ello, diversos estudios han demostrado también que *C. jejuni* posee una amplia gama de enzimas implicadas en la resistencia al estrés oxidativo y nitrosativo al que está expuesto, debido a diferentes causas y, aunque en la actualidad se han reconocido varios de estos reguladores, aún no se conocen completamente los mecanismos utilizados (Hermans *et al.*, 2011c).

Cabe destacar, por último, que estas bacterias presentan además una disparidad genética inusual y una elevada frecuencia de recombinación intragenómica, lo que podría ser utilizado para aumentar su capacidad de supervivencia y colonización en circunstancias adversas (Ridley *et al.*, 2008).

IV. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE *Campylobacter jejuni* en aves

4.1 Importancia del control en aves

A pesar de la gran relevancia que posee la campilobacteriosis aviar a nivel mundial, actualmente no existe ninguna normativa de la UE para el control de las especies patógenas productoras (*C. jejuni* y *C. coli*), siendo los países nórdicos los únicos que han establecido diversos programas de control nacional (Vargas y Hely, 2016). Como se refirió en el capítulo anterior, una elevada proporción de las manadas de pollos son positivas a *C. jejuni* en el momento del sacrificio (EFSA, 2010c), una circunstancia que, añadida a la elevada concentración microbiana en el intestino de los animales infectados, favorece de modo extraordinario la contaminación de las canales durante el procesado en el matadero, todo ello a pesar de que se extremen en las naves las medidas higiénicas a todos los niveles (Althaus *et al.*, 2017).

En los últimos años se han realizado diferentes evaluaciones de riesgo en Europa (Rosenquist *et al.*, 2006; Nauta *et al.*, 2009; EFSA, 2011), que han concluido que se podría reducir significativamente el número de casos de campilobacteriosis humana, disminuyendo la cantidad de *Campylobacter* en las canales de pollos. Según la EFSA, en teoría, si se consiguiese reducir la cantidad de *Campylobacter* presentes en las canales a cantidades inferiores a entre 1.000 y 500 UFC/g, se reduciría el riesgo atribuido a la carne, hasta en un 50 y 90%, respectivamente (EFSA, 2011).

Las especies de *Campylobacter* están presentes a lo largo de la cadena alimentaria (Gruntar *et al.*, 2015) y, aunque resulte obvio que su control puede implementarse en distintos eslabones, muchos autores reconocen que el efectuado en la granja sería el de mayor repercusión y beneficio final (Lin, 2009; EFSA, 2011; Newell *et al.*, 2011; Robyn *et al.*, 2015) debido, principalmente, a dos razones fundamentales: por una parte, a que la bacteria no sólo se propaga a través de la carne de pollo, sino que puede difundirse desde las granjas a los humanos por otras vías diferentes, como, por ejemplo, el contacto directo con animales o con fuentes ambientales (EFSA, 2011) y, en segundo lugar, a que éste es el único punto de toda la cadena en el que se puede producir una amplificación de la contaminación en el intestino de las aves infectadas.

En cualquier caso, ninguna medida utilizada de modo individual en la producción primaria, ha resultado eficaz para el control de estas bacterias, por lo que lo más conveniente sería utilizar distintas estrategias de intervención que actuaran conjuntamente en diferentes puntos del proceso (EFSA, 2011).

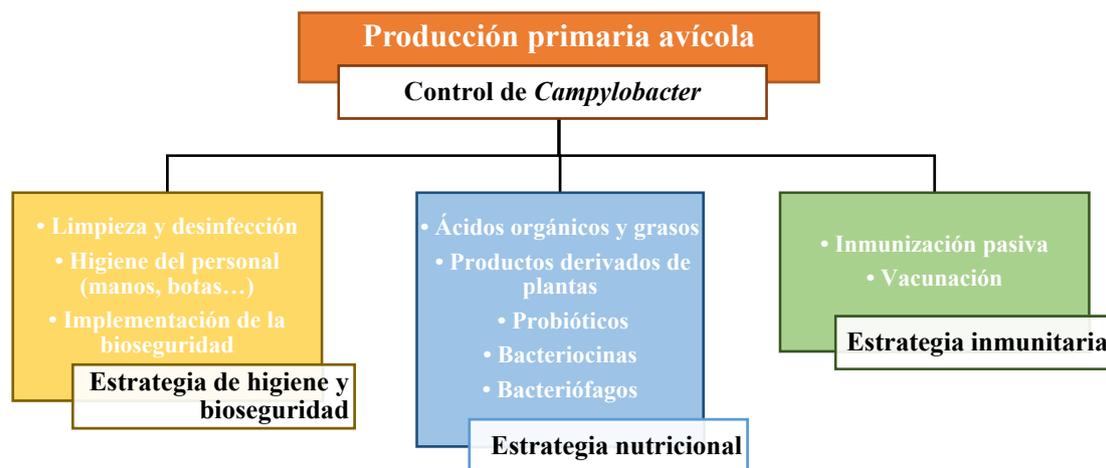


Figura 3. Estrategias de control implementadas en la producción primaria para limitar la colonización intestinal por *Campylobacter* de pollos de carne y reducir los casos de campilobacteriosis humana (adaptado de Meunier *et al.*, 2016).

Entre las distintas operaciones propuestas con el propósito de controlar estos microorganismo en la granja, se deben diferenciar las destinadas a evitar la colonización del lote y las que pretenden reducir o prevenir la multiplicación de *Campylobacter* (Hermans *et al.*, 2011d). En primer lugar, las estrategias de control deberían enfocarse a evitar que *Campylobacter* entre en la manada alojada en la nave, utilizándose principalmente medidas de bioseguridad eficaces. A la vez, por si las medidas anteriores no lo resultaran totalmente, se debería reducir la susceptibilidad de los animales a la infección, por ejemplo, mediante la utilización de aditivos o la vacunación. En segundo lugar, si no se puede evitar la colonización, resulta evidente que se debe reducir el número de *Campylobacter* en el intestino de las aves antes de que sean sacrificadas, por ejemplo, mediante el uso de bacteriófagos o bacteriocinas.

En su conjunto, los usos adecuados de estas opciones de control deberían reducir la carga de *Campylobacter* en las aves, disminuyendo a su vez la cantidad de bacterias en el medio ambiente y las que finalmente entran en la cadena alimentaria (EFSA, 2011).

4.2 Bioseguridad

La bioseguridad representa el conjunto de medidas preventivas aplicadas en la explotación para reducir el riesgo de transmisión de un agente infeccioso desde sus reservorios al hospedador natural susceptible (EFSA, 2011). En relación al control de *Campylobacter*, las medidas de bioseguridad se pueden aplicar a diferentes niveles en la granja (Newell *et al.*, 2011) y orientarse, todas ellas, hacia el mismo objetivo: prevenir la colonización de la primera ave (Meunier *et al.*, 2016). Entre dichas actuaciones se encuentran una correcta limpieza y desinfección aplicable en la granja a todos los niveles y la protección por medio de barreras físicas e higiénicas (Pasquali *et al.*, 2011).

Como se ha comentado, en *C. jejuni* se reconocen diversos reservorios, fuentes de infección en las inmediaciones de las granjas avícolas, por lo que la aplicación eficaz de las “medidas de barrera” resulta, en general, bastante compleja (EFSA, 2011). La primera dificultad consiste en concienciar al ganadero de su utilidad, lo que no siempre resulta fácil, habida cuenta del gasto que implica en inversión económica y en dedicación, lo que a sus ojos no siempre se justifica, a causa de su condición asintomática (Fraser *et al.*, 2010).

Entre las barreras físicas, se puede incluir, por ejemplo, el uso de mosquiteras que impidan la introducción desde el exterior de insectos reconocidos como vectores mecánicos de *Campylobacter* (Hald *et al.*, 2007). También se incluiría la colocación de un cercado perimetral que impermeabilizara la granja para impedir la entrada de animales (silvestres o domésticos), potenciales vectores del agente (Newell *et al.*, 2011) y, por supuesto, el mantenimiento de las instalaciones en perfectas condiciones de uso, así como el acceso restringido de vehículos y personal a la granja (Umaraw *et al.*, 2017).

Entre las medidas higiénicas se engloban diferentes precauciones, como el uso de botas especiales y de ropa de protección específica para cada lote o nave, debido a la instauración de procedimientos higiénicos de entrada y salida (Cerdà-Cuéllar *et al.*,

2015), el lavado de las manos a la entrada y a la salida de la nave y la disponibilidad de pediluvios (Gibbens *et al.*, 2001).

Existe también otra serie de medidas de bioseguridad eficaces, como la reducción de la presencia de roedores, que se consideran un vector probable de transmisión, por lo que su control supone siempre una reducción significativa de estos microorganismos en la granja (Allain *et al.* 2014). De igual modo, el uso de agua potable (Kapperud *et al.*, 1993) y la gestión adecuada de las basuras, residuos y cadáveres de los animales que, en un porcentaje mínimo, se considera inevitable en la crianza, resulta imprescindible para prevenir la diseminación de las campilobacterias (Messens *et al.*, 2009).

Hasta el momento, en los países de la UE se han probado varias estrategias de control de bioseguridad destinadas a reducir *Campylobacter* en pollos de carne, con resultados positivos (Meunier *et al.*, 2016). En el caso de Dinamarca, por ejemplo, mediante la aplicación de diversas medidas, en su mayor parte de bioseguridad, en un periodo de tan solo 5 años se redujo la prevalencia de estos microorganismos en los lotes, de un 43 a un 27% (Rosenquist *et al.*, 2009). En el mismo sentido, en Islandia, en el año 2000, también se evidenció la importancia de este tipo de medidas en la prevención de la campilobacteriosis humana (Stern *et al.*, 2003).

En el caso de España, se ha descrito la disminución de la proporción de los lotes colonizados por *Campylobacter*, promovida por el uso de este tipo de actuaciones (Cerdà-Cuéllar *et al.*, 2015), asentándose así las medidas de bioseguridad como el pilar fundamental de todos los programas de control nacionales existentes (Stern *et al.*, 2003; Hofshagen y Kruse, 2005; Hansson *et al.*, 2007a; Rosenquist *et al.*, 2009).

De todos modos, aunque pueda suceder que la aplicación rigurosa de las medidas generales de bioseguridad reduzca la posibilidad de infección y colonización de los lotes, todos los autores reconocen que, por sí solas, no resultan suficientes para resolver el problema, debido a la presión constante de contaminación a la que se encuentran sometidas las granjas avícolas (Hermans *et al.*, 2011d).

4.2.1 Descontaminación, limpieza y desinfección

Representan una parte importante del Programa de Bioseguridad de la explotación. El objetivo principal en las naves de engorde consiste en asegurar que al inicio del ciclo productivo, las instalaciones se encuentren libres de microorganismos patógenos (Orihuel *et al.*, 2015). Este tipo de prácticas preventivas son fundamentales en los programas de bioseguridad (de Castro *et al.*, 2017) y para que resulten eficaces es imprescindible que, tanto la técnica utilizada como los productos empleados, sean los más adecuados y de calidad probada (Maertens *et al.*, 2018).

Existen numerosas sugerencias, recomendaciones y protocolos para llevar a cabo las operaciones de limpieza en las naves de pollos. Todas incluyen, básicamente, las siguientes etapas: limpieza en seco o soplado, aspiración, limpieza con agua y detergente y, por último, desinfección (Meroz y Samberg, 1995; EFSA, 2011; Orihuel *et al.*, 2015).

En primer lugar, se lleva a cabo la limpieza de la nave y las instalaciones, para lograr la eliminación más completa posible de los residuos, tanto de las instalaciones como de los equipamientos, con el propósito de que el desinfectante pueda realizar su función correctamente (Ward *et al.*, 2006), siendo para ello necesario adecuar el producto utilizado al tipo de suciedad. En función de su pH, los detergentes pueden ser alcalinos, ácidos o neutros; los primeros son los más indicados para la eliminación de residuos orgánicos, mientras que los ácidos actúan principalmente frente a materias minerales y los neutros se suelen utilizar en superficies delicadas, con pocos residuos adheridos (de Castro *et al.*, 2017). En esta etapa, se deben humedecer abundantemente todas las superficies con la solución limpiadora, que luego tendrá que ser eliminada con abundante agua, una vez se haya reblandecido la suciedad (Orihuel *et al.*, 2015).

El siguiente paso esencial es la desinfección, que tiene como objeto la destrucción química de los microorganismos y, por lo tanto, el bloqueo de la transmisión de patógenos de una manada a la siguiente (Tokach *et al.*, 2012). La selección de los desinfectantes más apropiados, fáciles de aplicar y eficaces después de periodos cortos de exposición, resulta fundamental para la eliminación de los microorganismos patógenos en general, y en particular de *C. jejuni* (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2011). Existe una gran variedad de ingredientes activos utilizados como desinfectantes en la producción avícola, como el glutaraldehído, el ácido peracético o los cresoles (de Castro *et al.*, 2017). Desde hace décadas se ha comprobado que, en determinadas condiciones, *C. jejuni* es sensible

a la mayoría de los productos utilizados normalmente para la desinfección de superficies, como el hipoclorito de sodio, el etanol, el glutaraldehído y los productos yodados y fenólicos (Wang *et al.*, 1983a). Al igual que en el paso anterior, para asegurar la eficacia del proceso, es primordial que el producto entre en contacto con la totalidad de las superficies de la nave, por lo que, además de realizar una desinfección convencional por rociado o aspersión, se recomienda que se efectúe una posterior desinfección por vía aérea, para asegurar que el desinfectante llega a zonas ocultas o de difícil acceso (Orihuel *et al.*, 2015).

Por otra parte, se considera imprescindible que para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las naves, las operaciones de limpieza y desinfección se amplíen también a otros posibles vectores, como los vehículos, el calzado y el equipo del personal de la granja (Ridley *et al.*, 2011b). Hay que dedicar igualmente atención especial al caso de la desinfección del agua y de los sistemas de bebida (Kapperud *et al.*, 1993; Evans y Sayers, 2000), aunque la eficacia de los procedimientos de descontaminación aplicados a ellos genere siempre controversia (EFSA, 2011), debido a la capacidad de estos patógenos para persistir en el interior de algunos protozoos o amebas o protegidos en biopelículas, en los que la bacteria puede resistir la acción de los desinfectantes (Cox y Pavic, 2010).

4.3 Inmunización

Como ya se ha comentado, se considera que la bioseguridad, por sí sola, es insuficiente para el control de *Campylobacter* en la explotación avícola, por lo que resulta imprescindible la aplicación de otras medidas complementarias, como la inmunización, tanto activa como pasiva (Paul *et al.*, 2014). Con ella se pretende desarrollar una respuesta inmunitaria específica, dirigida a prevenir, neutralizar y evitar la colonización de *Campylobacter*, consiguiendo de este modo limitar la carga intestinal de las bacterias antes del sacrificio (Vargas y Hely, 2016).

La administración de anticuerpos específicos frente a *Campylobacter* podría resultar eficaz para prevenir la colonización fecal (Stern *et al.*, 1990), idea con la que se han desarrollado diversos estudios de inmunidad pasiva en pollos. Por ejemplo, mediante la administración de inmunoglobulinas Y específicas de *Campylobacter*, se ha conseguido incrementar el tiempo de persistencia de los anticuerpos maternos frente a

estas bacterias en pollos (Vargas y Hely, 2016), aunque el problema reside en que los efectos de dicha protección son transitorios y, después de algunos días, el microorganismo puede colonizar otra vez los ciegos (Tsubokura *et al.*, 1997). En el mismo sentido, se ha comprobado que la adición de yema de huevo hiperinmune a la alimentación de los pollos reduce la carga fecal de *Campylobacter* y, a la vez, disminuye el contagio entre las aves (Hermans *et al.*, 2014), aunque en ambos casos con los mismos inconvenientes de un efecto transitorio.

En relación con la vacunación, durante los últimos años se han realizado numerosos estudios, con el propósito de obtener una vacuna que resulte eficaz frente a la colonización por *Campylobacter* en pollos (Kobierecka *et al.*, 2016), aplicada en distintas estrategias vacunales (Pasquali *et al.*, 2011). Las primeras vacunas desarrolladas contra *Campylobacter* consistieron en células enteras, tanto vivas como inactivadas (Meunier *et al.*, 2016), propósito con el que se han utilizado multitud de combinaciones como cepas mutantes no colonizadoras, inoculadas por vía intramuscular (Ziprin *et al.*, 2002), cepas inactivadas con productos químicos inoculadas por las vías subcutáneas u oral (Rice *et al.*, 1997) o cepas inactivadas con calor inoculadas *in ovo* (Noor *et al.*, 1995), pero ninguna de ellas ha logrado prevenir completamente la colonización por *Campylobacter* en los pollos (Kaakoush *et al.*, 2015). En los últimos años, también se han llevado a cabo algunos estudios prometedores con relación a la protección frente a la colonización por *Campylobacter*, mediante vacunas vectorizadas en microorganismos atenuados, como diversas especies de *Salmonella* (Wyszyńska *et al.*, 2004; Buckley *et al.*, 2010), pero el uso de vacunas vivas de organismos potencialmente patógenos siempre supone un riesgo de seguridad biológica importante.

Otra estrategia de inmunización posible frente a *Campylobacter* está representada por el uso de vacunas de subunidades. La mayoría de las investigaciones vacunales llevadas a cabo hasta la fecha se han centrado en la utilización de la flagelina como antígeno capaz de inducir inmunidad protectora (Meunier *et al.*, 2016), aunque también se han ensayado con el mismo propósito algunas proteínas de membrana externa (OMPs) encapsuladas (Annamalai *et al.*, 2013) y otras localizadas también en la superficie bacteriana, con capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino (proteínas Cadf, FlpA, CmeC) (Neal-McKinney *et al.*, 2014). El problema de este enfoque reside en que los antígenos investigados hasta el momento no han logrado inducir una respuesta inmunitaria suficiente para prevenir la colonización intestinal, por lo que

se requiere la combinación de distintos antígenos, el uso de otros nuevos o la suplementación con adyuvantes eficaces para lograr dicha respuesta (Pasquali *et al.*, 2011).

También se han llevado a cabo iniciativas de vanguardia, en forma estudios de vacunología inversa y, aunque por el momento no se han obtenido resultados favorables, la técnica resulta una herramienta poderosa para identificar antígenos nuevos, lo que ha permitido la selección de varios candidatos para el desarrollo de una vacuna potencialmente eficaz (Meunier *et al.*, 2016).

Como quiera que sea, a pesar de que varias de las vacunas experimentales obtenidas con todos estos procedimientos consiguieron una disminución perceptible de los niveles de colonización del microorganismo en los animales de prueba, la realidad es que todavía no existe una vacuna disponible en el mercado para reducir la colonización intestinal de pollos de carne por *Campylobacter*, por lo que, para obtener la solución definitiva, resultará necesario identificar y evaluar nuevos antígenos (Meunier *et al.*, 2017).

4.4 Aditivos alimentarios

Como expresión de la inquietud investigadora por lograr productos eficaces en el control de *C. jejuni* en las aves, se han abierto nuevas líneas de estudio que incluyen la utilización de diferentes aditivos alimentarios, en definitiva, sustancias que se pueden añadir al pienso o al agua de bebida para reducir la presencia de *Campylobacter* en los animales. Dichos elementos pueden ser aditivos químicos, como sucede con diversos ácidos orgánicos, agentes biológicos (como los probióticos) (EFSA, 2011) o polisacáridos complejos (prebióticos), que favorecen el crecimiento de comensales beneficiosos frente a los patógenos.

En relación con los ácidos orgánicos, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de definir y ajustar el efecto que distintos productos de esta naturaleza pueden ejercer sobre *Campylobacter*. Con este fin, se han evaluado las reducciones de los recuentos de estos microorganismos intestinales en pollos de carne, a cuya dieta se han incorporado estas sustancias en el pienso y en el agua de bebida, aunque no se han obtenido resultados homogéneos (Meunier *et al.*, 2016). Por ejemplo, con el ácido

caprílico se ha obtenido una reducción bacteriana intestinal cuando se ha añadido al pienso de los animales en diferentes concentraciones (Solís de los Santos *et al.*, 2010), no siendo así en todos los casos, cuando el aditivo era añadido en el agua de bebida (Metcalf *et al.*, 2011; Hermans *et al.*, 2012).

En la misma línea, se ha comprobado que el uso conjunto de los ácidos fórmico y sórbico resulta también eficaz frente a *C. jejuni*, añadido al pienso (Skånseng *et al.*, 2010), como sucede con otros aditivos, como el ácido caproico y el ácido cáprico (Hermans *et al.*, 2010) o con ácidos grasos como el butirato, acetato y propionato (Van Deun *et al.*, 2008), en experimentos *in vitro*. Pese a todo, no se han obtenido los mismos efectos en estudios *in vivo*, probablemente debido al efecto protector que ejerce la capa de moco intestinal en los pollos, que dificulta la erradicación de estas bacterias del tracto intestinal, una vez colonizado (Hermans *et al.*, 2010).

Por otra parte, la exclusión competitiva es una medida profiláctica que tiene como objeto aumentar la resistencia de los pollos a la infección por *Campylobacter* (Hermans *et al.*, 2011d), un fenómeno que consiste en la adición oral de uno o más microorganismos comensales obtenidos de la microbiota gastrointestinal adulta, que constituye la base de los probióticos (Pasquali *et al.*, 2011). Los cultivos microbianos utilizados para el control de este microorganismo incluyen una gran cantidad y diversidad de géneros y especies: desde bacterias del ácido láctico hasta anaerobios estrictos (Pasquali *et al.*, 2011). Este tipo de exclusión por competencia se produce tanto por una ubicación física como por nutrientes, principalmente las fuentes de carbono, en ambos casos frente a patógenos y su efecto es rápido.

Con la finalidad de comprobar la eficacia del uso de estos aditivos, se han llevado a cabo diversos estudios *in vivo* en pollos, en los que tras la administración de diversas cepas probióticas se han obtenido reducciones de *C. jejuni* a nivel cecal. Por ejemplo, Ghareeb *et al.* (2012) probaron la posible actividad de una mezcla de bacterias probióticas intestinales (*Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius* y *L. reutiri*) frente a la colonización por *Campylobacter*, después de haber obtenido con anterioridad resultados positivos *in vitro*. En el experimento, se administró la mezcla en el agua de bebida, observándose reducciones significativas de los recuentos cecales de *C. jejuni* en los animales tratados. También se han obtenido resultados esperanzadores con otras especies de *Lactobacillus* (Nishiyama *et al.*, 2014; Cean *et al.*, 2015), con bifidobacterias (Santini *et al.*, 2010) y con distintos productos

comerciales (Ghareeb *et al.*, 2012). En cualquier caso, debe señalarse que la eficacia varía mucho entre los distintos estudios, por lo que se debe continuar investigando en este campo, pues podría resultar ser una manera fácil y válida de reducir la carga intestinal de *Campylobacter* en aves de corral (Meunier *et al.*, 2016).

También se han probado, con el mismo propósito, varios compuestos derivados de plantas y aceites esenciales, a fin de reducir la colonización intestinal de *Campylobacter* en pollos de carne, con resultados bactericidas prometedores frente a *C. jejuni in vitro*, con un ingrediente derivado del aceite de canela (Hermans *et al.*, 2011a), con la alicina extraída del ajo (Robyn *et al.*, 2013) y con un tipo de timol extraído del tomillo (Epps *et al.*, 2015). Desafortunadamente, estos resultados no se correspondieron con reducciones bacterianas cuando los experimentos se llevaron a cabo *in vivo*, con animales, lo que puede deberse a que dichos productos se absorben antes de llegar al intestino. De ello se deduce que para que la administración oral de estos aditivos resulte eficaz sería necesario que estos compuestos se protejan, mediante encapsulación, por ejemplo, o se recurra a otros procedimientos, para evitar la degradación previa al lugar de acción (Meunier *et al.*, 2016).

4.5 Bacteriocinas y bacteriófagos

Otra posible opción para conseguir reducir la presencia de *Campylobacter* en pollos son las bacteriocinas (Johnson *et al.*, 2017), toxinas proteicas sintetizadas por diversas especies bacterianas, capaces de reducir la viabilidad de otras bacterias similares (Cavera *et al.*, 2015). Se han identificado varias bacteriocinas eficaces contra *Campylobacter*, producidas por bacterias comensales de intestino de los pollos y se ha estudiado su capacidad para controlar este microorganismo en las granjas (Kaakoush *et al.*, 2015).

Las bacteriocinas rompen la integridad de la membrana de la célula antagonista y, al contrario de lo que sucede con los antibióticos, que muestran una alta afinidad por un tipo de microorganismo concreto, atacan diferentes tipos de membranas con baja afinidad (Pasquali *et al.*, 2011), un modo de actuación que dificulta la adquisición de resistencia por parte del hospedador y que parece responsable de la baja prevalencia de los mutantes resistentes a bacteriocinas (Kaakoush *et al.*, 2015).

En las aves existen numerosas especies bacterianas capaces de producir bacteriocinas activas frente a *C. jejuni* como, por ejemplo, *Lactobacillus salivarius*, *L. sakei*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Enterococcus faecium*, *Carnobacterium divergens* y *Leuconostoc mesenteroides* (Ben Lagha *et al.*, 2017), muchas de ellas con características apropiadas para su uso *in vivo*. Hasta ahora, en estudios realizados en aves de corral se han descrito varias bacteriocinas purificadas, que han logrado reducciones significativas de los *C. jejuni* intestinales (Svetoch y Stern, 2010): la SRCAM 602 de *P. polymyxa* NRRL B-30644 (Svetoch *et al.*, 2005), la bacteriocina IIa de *P. polymyxa* NRRL B-30509 (Stern *et al.*, 2005), la OR-7 de *L. salivarius* NRRL B-30514 (Stern *et al.*, 2006) y las bacteriocinas E-760 y E50-52 de *E. faecium* (Line *et al.*, 2008; Svetoch *et al.*, 2008).

A pesar de que la administración oral de las bacteriocinas se pueda realizar de manera fácil, incorporándolas a la alimentación o al agua de bebida (Ben Lagha *et al.*, 2017), y de que su uso pueda representar una estrategia prometedora para mejorar la seguridad alimentaria y proteger la Salud Pública (Lin, 2009), por ahora no se conoce exactamente cuál es el efecto que pueden producir sobre la microbiota intestinal de las aves, ni sobre su estabilidad en los productos cárnicos y el posterior efecto sobre el entorno gastrointestinal humano, por lo que resulta imprescindible realizar nuevos estudios que aclaren estas cuestiones (Johnson *et al.*, 2017).

En lo que se refiere a los bacteriófagos, se trata de virus bacterianos ubicuos en el medio ambiente, que se replican específicamente en las bacterias diana, causando su muerte por lisis. La mayoría de las especies bacterianas poseen sus propios bacteriófagos y *Campylobacter* no es la excepción (Ayala-Tabares, 2016). Estos se han investigado para su uso en el control biológico de las especies de *Campylobacter*, mediante la reducción de la colonización intestinal en pollos de carne (Kaakoush *et al.*, 2015). Por su parte, en condiciones experimentales, el tratamiento con bacteriófagos de aquellos animales que aún no han sido colonizados por *Campylobacter* únicamente retrasa la colonización (Wagenaar *et al.*, 2005); por el contrario, si ya han sido colonizados, la terapia produce reducciones significativas en el intestino (Loc Carrillo *et al.*, 2005; Wagenaar *et al.*, 2005), aunque con el tiempo, las bacterias generan resistencia y los recuentos vuelven a los niveles anteriores al tratamiento (Hermans *et al.*, 2011d). Con el objeto de reducir ese riesgo, además de tratar de evitar problemas de especificidad, se han llevado a cabo estudios en los que se aplicaron simultáneamente múltiples fagos (Carvalho *et al.*, 2010)

y, después del tratamiento, los niveles de *Campylobacter* se redujeron permanentemente, disminuyendo también la tasa de resistencia (Fischer *et al.*, 2013). Por todo ello, la terapia con fagos en teoría podría disminuir el número de microorganismos en los pollos a la edad de sacrificio; sin embargo, puede no resultar suficiente cuando el contenido total de *Campylobacter* supere las 10^8 UFC/g de heces (Hansson *et al.*, 2018).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en pruebas realizadas en las condiciones controladas, en las naturales no se consigue el mismo efecto. Este hecho podría deberse en parte al excesivo tiempo transcurrido entre la colonización del patógeno y la aplicación de la terapia, ya que resulta complicado determinar el momento adecuado para el tratamiento, si no se dispone de datos previos sobre el estado de colonización de los animales (Hansson *et al.*, 2018), así como al hecho de que el cóctel puede resultar adecuado sólo frente a determinadas cepas (Vargas y Hely, 2016). Además, como señalan algunos autores, aún se desconoce la viabilidad de introducir la terapia con fagos como parte de las prácticas manejo y los costos asociados con este proceso a gran escala (Meunier *et al.*, 2016) por lo que, por ahora, su uso sería muy limitado en la práctica real (EFSA, 2011). Por ello, se requieren estudios adicionales para obtener más información de las interacciones que poseen con las bacterias, para poder destinar la terapia con fagos a un uso comercial en un futuro próximo (Fischer *et al.*, 2013).

4.6 Otras estrategias de control

Además de los sistemas anteriores, se ha evaluado la influencia de determinadas prácticas avícolas, que pueden ser útiles para la reducción de los recuentos de *Campylobacter* al final del periodo de cría y antes de la entrada en el matadero.

Como se ha señalado, existe un claro riesgo de infección como consecuencia del aclarado o despoblación parcial de las naves de engorde (Allen *et al.*, 2008) y una medida eficaz para reducir dicho riesgo sería, simplemente, eliminar esta práctica (EFSA, 2011). Del mismo modo, la prevalencia de estos microorganismos en la manada o en la nave se relaciona con la edad de los animales (Berndtson *et al.*, 1996a) y se ha comprobado que cuanto mayor es la edad de sacrificio, mayor es el riesgo de colonización por *Campylobacter* y, en consecuencia, mayores resultan los recuentos (Kapperud *et al.*, 1993; EFSA, 2010c), por lo que la reducción de la edad del sacrificio también disminuiría

la posibilidad de colonización y el correspondiente riesgo derivado. También se ha demostrado la capacidad de resistencia de determinadas líneas genéticas a la infección por *C. jejuni* (Boyd *et al.*, 2005), lo que incorpora la posibilidad de evitar la colonización mediante la cría selectiva de animales resistentes a *Campylobacter* (Kaiser *et al.*, 2009), aunque, por el momento, esta estrategia no se considera un objetivo alcanzable a corto plazo (EFSA, 2011).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El género *Campylobacter* incluye importantes patógenos del hombre y los animales. *C. jejuni*, que no supone un problema importante en los animales, sí lo es, en cambio, en Medicina Humana, representando en la actualidad la principal causa de gastroenteritis bacteriana en el hombre, en todo el mundo, tanto en los países en desarrollo como en los industrializados. *C. jejuni* causa, no sólo graves problemas de Salud Pública, al producir un elevado número de casos agudos (246.307 casos en 2017 en la UE) e importantes secuelas (artritis reactiva, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome de Reiter, entre otros), sino también problemas económicos de primer orden, derivados básicamente de los tratamientos médicos y las pérdidas de productividad ocasionadas por la enfermedad, además del absentismo laboral y pérdidas relacionadas. Todo esto se agrava todavía más, si tenemos en cuenta la subestimación de los casos reales, debido a la elevada incertidumbre que existe sobre la incidencia verdadera de la enfermedad.

Los animales, especialmente las aves productoras de carne, son el reservorio principal de *C. jejuni*. Parece ser que las aves nacen libres de estos agentes, pero, una vez que se produce la primera colonización, se alcanzan, en poco tiempo, elevadas prevalencias de animales portadores en la explotación. y debido a la rápida difusión entre los animales de la manada, al final de su ciclo de producción, en la entrada al matadero, suelen presentar tasas de portadores cercanas al 100%. Dichos animales son la principal causa de los contagios humanos con *C. jejuni* a través del consumo de la carne de ave, en particular, si la preparación no elimina la presencia microbiana, o si esta se produce después de la preparación, de forma cruzada, originando así un problema de Seguridad Alimentaria muy importante, reconocido a nivel mundial, en la Unión Europea y también en España.

Son muchos los esfuerzos centrados en la búsqueda de todo tipo de recursos para el control del patógeno, incluyendo el desarrollo de vacunas o aditivos del más variado origen en los piensos y en el agua, y también se han puesto en práctica programas rigurosos de bioseguridad, higiene y manejo en las granjas avícolas antes del sacrificio, tratando de reducir la prevalencia. Sin embargo, todavía las cifras de aves portadoras positivas siguen siendo muy elevadas y no se ha logrado resolver con eficacia el problema de su control.

La realización de numerosos estudios epidemiológicos ha confirmado, la importancia de las aves de carne en el origen de la enfermedad humana. A pesar de ello,

todavía existen muchas cuestiones sin resolver en relación con la epidemiología en pollos de carne, y se desconocen asuntos de suma importancia, como pueden ser el origen de los primeros contagios, la importancia que ejercen determinados factores en la colonización (el entorno ambiental, la fauna silvestre y sinantrópica, los invertebrados u otros elementos de tipo abiótico) o la posible transmisión del agente a la progenie.

Se precisa, por ello, un mayor conocimiento en muchos campos, en particular sobre la epidemiología general de *C. jejuni* en estos animales y, sobre todo, en lo que se refiere al mecanismo de introducción de este patógeno en las manadas, por lo que no dudamos que estos aspectos resultarían esenciales en la mejora de los programas de control actuales.

Este trabajo ha llevado a cabo diversos estudios en varias explotaciones avícolas de Castilla y León (industriales y de otro tipo), con el objetivo general de profundizar en el conocimiento de las características epidemiológicas y de transmisión de *C. jejuni*. En él se ha tratado de estudiar, no sólo, la prevalencia de la infección en los animales implicados en este grave problema, sino también de obtener una visión global del entorno en el que estos se encuentran, abarcando múltiples aspectos.

Para llevar a cabo este complejo estudio, fue necesaria la estructuración en varias fases, que implicaron la realización de análisis y ensayos experimentales, tanto de campo como *in vitro*, en el laboratorio, debido a la complejidad de este agente.

En esta línea, los objetivos específicos fijados para esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- **1.** Determinar la edad de colonización de los pollos de carne industriales, la posible relación con la estación climática, así como la prevalencia y persistencia de *C. jejuni* en diferentes secciones del aparato digestivo de estos animales.
- **2.** Estudiar los posibles reservorios, tanto bióticos como abióticos de *C. jejuni* en el interior de las naves de cría de pollos de carne comerciales, y en su entorno exterior.
- **3.** Estimar la relevancia de las posibles formas de transmisión de *C. jejuni*: verticalmente, a través de huevos y de modo horizontal (directa o indirectamente) a partir de reservorios y animales portadores de diversas especies.

- 4. Establecer la efectividad de distintos desinfectantes contra el patógeno, tanto en el laboratorio como en condiciones de campo, que aseguren una desinfección eficaz entre los lotes.

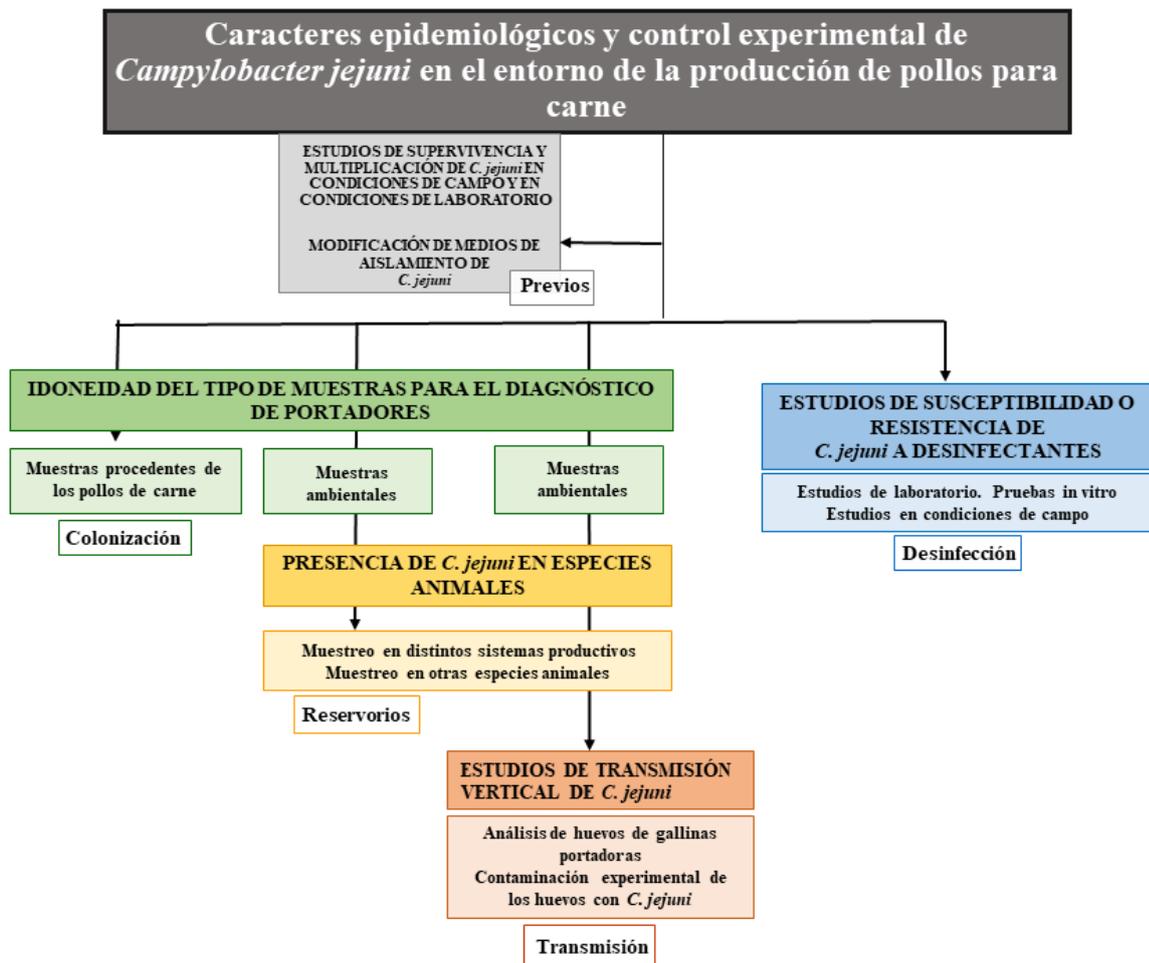


Figura 4. Relación estructural del trabajo.

MATERIALES

I. INSTALACIONES

Laboratorios e instalaciones en las que se han realizado los análisis

Los trabajos experimentales de laboratorio, así como los análisis de muestras se han llevado a cabo en los laboratorios de la Unidad de Microbiología e Inmunología, del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León.

Instalaciones de campo

La parte principal de los estudios se ha realizado en las instalaciones de una explotación de pollos, ubicada en la localidad de Riosequino de Torío, en la provincia de León. La granja engorda pollos comerciales de la línea Cobb, durante 10 semanas consecutivas, y se divide en tres naves independientes, una con capacidad para 10.000 animales y las otras dos para 8.000. La explotación lleva a cabo un sistema de manejo todo dentro-todo fuera.

Además, con el fin de completar los estudios, se desarrollaron otros trabajos en distintos lugares de la Comunidad Autónoma de Castilla y León:

- Una explotación familiar de gallinas ponedoras, situada en la localidad de Aranda de Duero (Burgos). Fue utilizada como ‘granja experimental’, con un censo de 60 gallinas.
- Una explotación de gallinas ponedoras, ubicada en la localidad de Villalón de Campos (Valladolid), compuesta por 4 naves. La explotación tiene una capacidad aproximada de 60.000 cabezas por nave y se dedica a la cría de pollitas hasta el momento de la entrada en puesta (16-18 semanas).
- La ‘Granja Escuela’ del Colegio Santa Isabel, en Soria. Este centro cuenta con distintas instalaciones, entre las que cabe destacar un edificio con varias dependencias, distribuido para el cuidado y la cría de distintos animales, así como corrales junto a un voladero donde conviven diferentes tipos de aves.

Los croquis de todas las instalaciones utilizadas en este trabajo figuran en el anexo.

II. ESPECIES Y CEPAS BACTERIANAS

Campylobacter jejuni

- *Campylobacter jejuni*. ATCC (33560)

Controles negativos

En algunos casos, se utilizó una cepa bacteriana como control negativo:

- *Pasteurella multocida*, tipo capsular A, ATCC (43137)

III. MEDIOS DE CONSERVACIÓN

3.1 Medio con leche descremada y glicerol

Para la preparación de este medio se mezclaron:

- ✓ 20 g de leche descremada (Oxoid)
- ✓ 10 g de peptona (Difco)
- ✓ 80 g de glicerol (Sigma-Aldrich)
- ✓ 320 ml de agua destilada

Se llevó a cabo una esterilización mediante tratamiento en autoclave durante 10 minutos a 110°C, alicuotándose y almacenándose en volúmenes de 1 ml a -80°C.

3.2 Caldo Bolton y glicerol

Para la realización de este medio se mezclaron en un recipiente estéril:

- ✓ 37,5 ml de caldo Bolton comercial (Oxoid), apartado 4.1.2, enriquecido al 5% con sangre de caballo desfibrinada comercial (Oxoid)
- ✓ 5 ml de suero bovino fetal comercial (Thermo Scientific)
- ✓ 7,5 ml de glicerol estéril (Sigma-Aldrich)

Las esterilizaciones se llevaron a cabo mediante tratamiento en autoclave durante 10 minutos a 110°C; posteriormente, la mezcla se dividió en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -80°C.

IV. MEDIOS DE CULTIVO

4.1 Medios de cultivo líquidos

4.1.1 Agua de peptona

Este medio se preparaba añadiendo 20 g de agua de peptona comercial (Oxoid) por cada litro de agua destilada. Se distribuyó en frascos de vidrio neutro y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, conservándose en refrigeración a 4°C hasta su uso.

La composición del agua de peptona, por litro, era la siguiente:

▪ Peptona	10 g
▪ Fosfato disódico	3,5 g
▪ Cloruro sódico	5 g
▪ Fosfato potásico dihidrogenado	1,5 g

4.1.2 Caldo Bolton enriquecido con sangre de caballo desfibrinada

El caldo Bolton presentaba la siguiente composición por litro:

▪ Peptona de carne	10 g
▪ Lactoalbúmina hidrolizada	5 g
▪ Extracto de levadura	5 g
▪ Cloruro sódico	5 g
▪ Ácido α -cetoglutárico	1 g
▪ Piruvato sódico	0,5 g
▪ Metabisulfito sódico	0,5 g
▪ Carbonato sódico	0,6 g
▪ Hemina	0,01 g

Para la preparación del caldo enriquecido con sangre se disolvieron 13,8 g de caldo Bolton comercial (Oxoid) en 500 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Previo enfriamiento, se añadieron 25 ml de sangre de caballo desfibrinada (Oxoid), con una concentración final del 5%. Se distribuyó en contenedores asépticos y mantuvo en refrigeración hasta el momento de su utilización.

4.1.3 Caldo Bolton enriquecido con sangre de caballo desfibrinada y suero fetal bovino

Para la preparación de este medio, en primer lugar, se elaboró caldo enriquecido con sangre de caballo, como en el medio anterior; sin embargo, en este caso, en el momento previo al inóculo, se atemperaba y se le añadía 1 ml de suero bovino fetal por cada 9 ml del caldo preparado, obteniéndose una concentración final de suero del 10%.

4.2 Medios de cultivo sólidos

4.2.1 Agar sangre

Se utilizaron placas comerciales de agar Columbia (Oxoid), con la siguiente composición por litro de medio preparado:

- | | | |
|---|--|--------|
| ▪ | Peptona | 5 g |
| ▪ | Tripteína | 12 g |
| ▪ | Extracto de levadura | 3 g |
| ▪ | Extracto de corazón | 3 g |
| ▪ | Almidón soluble | 1 g |
| ▪ | Cloruro sódico | 5 g |
| ▪ | Agar | 13,5 g |
| ✓ | Suplementado con un 5% de sangre de cordero (Oxoid). | |

4.2.2 mCCDA

Se utilizaron placas comerciales de mCCDA (Oxoid). La composición del medio incluyó los siguientes componentes por litro:

- | | | |
|---|------------------------|--------|
| ▪ | Polvo 'lab lembco' | 10 g |
| ▪ | Peptona | 10 g |
| ▪ | Cloruro sódico | 5 g |
| ▪ | Carbón bacteriológico | 4 g |
| ▪ | Hidrolizado de caseína | 3 g |
| ▪ | Desoxicolato sódico | 1 g |
| ▪ | Sulfato ferroso | 0,25 g |

▪ Piruvato sódico	0,25 g
▪ Cefoperazona	0,032 g
▪ Anfotericina B	0,01 g
▪ Agar agar	8 g.

4.2.3 Agar Preston

Para la preparación del medio se suspendieron 18,5 g de agar base Preston comercial (Pronadisa) en 475 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Después se enfrió hasta alcanzar los 45 °C, momento en el cual se añadieron asépticamente 25 ml de sangre de caballo desfibrinada. Resultó necesario el suplemento antibiótico correspondiente. Posteriormente, se distribuyó en placas, en condiciones estériles. La composición por litro de agar base Preston era la siguiente:

▪ Peptona de caseína	10 g
▪ Extracto de carne	10 g
▪ Cloruro sódico	5 g
▪ Agar bacteriológico	12 g.

4.2.4 Agar Karmali (CSM)

Para la preparación del medio se suspendieron 23 g de agar CSM comercial (Pronadisa) en 500 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después se enfrió hasta alcanzar los 50 °C, momento en el cual se podían añadir los suplementos antibióticos si era preciso, distribuyéndose en placas de Petri a continuación. El agar CSM presentaba la siguiente composición por litro de medio:

▪ Extracto de carne	10 g
▪ Digerido pancreático de caseína	9,88 g
▪ Digerido pancreático de corazón	2,96 g
▪ Extracto de levadura	4,94 g
▪ Hematina	0,032 g
▪ Digerido péptico de carne	4,94 g
▪ Cloruro sódico	4,94 g
▪ Fécula de maíz	1 g
▪ Agar bacteriológico	13,3 g.

4.2.5 Agar Skirrow

Se utilizaron placas comerciales de agar Skirrow (Difco), con la siguiente composición por litro de medio preparado:

- | | |
|--|---------|
| ▪ Agar Columbia | 43 g |
| ▪ Vancomicina | 10 mg |
| ▪ Polimixina B | 2500 UI |
| ▪ Anfotericina B | 2 mg |
| ▪ Trimetoprim | 5 mg |
| ▪ Cefalotina | 15 mg |
| ✓ Suplementado con un 10% de sangre de carnero desfibrinada (Oxoid). | |

V. MEDIOS DE TRANSPORTE DE MUESTRAS

5.1 Medio de Amies

Medio comercial dispensado en tubos con hisopos estériles (Pronadisa). La fórmula por litro del preparado comercial era la siguiente:

- | | |
|------------------------|--------|
| ▪ Cloruro sódico | 3,0 g |
| ▪ Cloruro cálcico | 0,1 g |
| ▪ Fosfato monopotásico | 0,2 g |
| ▪ Tioglicolato sódico | 1,0 g |
| ▪ Cloruro potásico | 0,2 g |
| ▪ Cloruro magnésico | 0,1 g |
| ▪ Fosfato disódico | 1,1 g |
| ▪ Agar bacteriológico | 7,5 g. |

5.2 Medio de Stuart

El medio se obtuvo al mezclar 14,1 g de preparado comercial (Pronadisa) con 500 ml de agua destilada, sometiéndose a una esterilización en autoclave, durante 15 minutos a 121°C.

Posteriormente, se alicuotó de forma aseptica en volúmenes de 10 ml, con una fórmula por litro de:

▪ Tioglicolato sódico	1,0 g
▪ Cloruro cálcico	0,1 g
▪ Glicerofosfato de sodio	10,0 g
▪ Azul de metileno	0,002 g
▪ Agar bacteriológico	3,0 g.

5.3 Medio de Amies con carbón o medio Charcoal

El medio se obtuvo al mezclar 23,2 g de preparado comercial (Pronadisa) con 500 ml de agua destilada, sometiéndose a una esterilización en autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Posteriormente, se alicuotó de forma aséptica en volúmenes de 10 ml.

La fórmula por litro de preparado comercial era la siguiente:

▪ Cloruro sódico	3,0 g
▪ Cloruro cálcico	0,1 g
▪ Fosfato monopotásico	0,2 g
▪ Tioglicolato sódico	1,0 g
▪ Cloruro potásico	0,2 g
▪ Cloruro magnésico	0,1 g
▪ Fosfato disódico	1,1 g
▪ Agar bacteriológico	7,5 g
▪ Carbón vegetal neutro	10,0 g.

5.4 Medio de Cary-Blair

Medio comercial dispensado en tubos con hisopos estériles (Oxoid). La fórmula por litro era de:

▪ Fosfato de hidrógeno disódico	1,1 g
▪ Tioglicolato sódico	1,5 g
▪ Cloruro sódico	5,0 g
▪ Cloruro cálcico	0,09 g
▪ Agar bacteriológico	5,6 g

VI. SUPLEMENTOS ANTIBIÓTICOS

La preparación de los suplementos se realizó resuspendiendo en 1 ml de agua y 1 ml de acetona el contenido liofilizado de cada uno de los viales comerciales (Pronadisa). Cada vial correspondía a la cantidad añadida a 500 ml del medio que suplementaba, con la siguiente composición cada uno de ellos:

6.1 Suplemento antibiótico 1 (suplemento del caldo Bolton)

▪ Cefoperazona	10 mg
▪ Vancomicina	10 mg
▪ Anfotericina B	5 mg
▪ Trimetoprim	10 mg.

6.2 Suplemento antibiótico 2 (suplemento del agar Preston)

▪ Polimixina B	2.500 UI
▪ Ciclohexamida	50 mg
▪ Rifampicina	5 mg
▪ Trimetoprim	5 mg.

6.3 Suplemento antibiótico 3 (suplemento del agar CSM)

▪ Piruvato sódico	50 mg
▪ Vancomicina	10 mg
▪ Ciclohexamida	50 mg
▪ Cefoperazona	16 mg.

VII. TAMPONES Y SOLUCIONES

7.1 Solución salina estéril

Se obtenía añadiendo cloruro sódico a agua destilada hasta una concentración final del 0,9%; posteriormente, se esterilizaba en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

7.2 Tampón PBS

Para su preparación se mezclaron los siguientes reactivos:

✓ NaCl (Sigma)	8 g
✓ KCl (Sigma)	0,2 g
✓ Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1,44 g

Posteriormente se añadieron 0,24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 7,4 con HCl y añadiéndose, por último, agua destilada hasta 1 litro. Para la esterilización se utilizó un tratamiento en autoclave de 15 minutos a 121°C.

7.3 Tampón TBE (5X)

Este medio se componía de los siguientes reactivos:

✓ Tris base (Sigma)	54 g
✓ Ácido bórico (Sigma)	27,5 ml
✓ EDTA 0,5M (pH 8)	200 ml

Se mezclaban todos los reactivos se añadía agua destilada hasta 1 litro.

7.4 Tampón de carga (6X)

Para la preparación de este tampón se añadían los siguiente componentes a 100 ml de agua destilada:

✓ Azul de bromofenol al 25% (Sigma)	0,25 g
✓ Xilencianol al 25% (Sigma)	0,25 g
✓ Sacarosa al 40% (Sigma)	40 g

La mezcla se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se conservó a 4°C, protegida de la luz.

VIII. DESINFECTANTES

A continuación, figuran los distintos productos utilizados en las pruebas realizadas con desinfectantes:

8.1 Productos activos no comerciales

8.1.1 Alcoholes

- Alcohol isopropílico (Sigma)
- Etanol (Panreac)

8.1.2 Aldehídos

- Formol (Quimon)

8.1.3 Oxidantes

- Ácido fosfórico (Sigma)
- Agua oxigenada o peróxido de hidrógeno (Cinfa)
- Permanganato potásico (Panreac)

8.1.4 Derivados clorados

- Cloramina T (Sigma)
- Hipoclorito sódico (Sigma)

8.1.5 Derivados del amonio cuaternario

- Cloruro de benzalconio (Sigma)
- Cloruro de cetilpiridium (Sigma)

8.1.6 Fenoles y derivados

- Fenol (Panreac)

8.1.7 Yodóforos

- Polivinilpirrolidona (Merck)
- Povidona yodada (Merck)

8.1.8 Derivados de la clorhexidina

- Digluconato de clorhexidina (Merck)

8.1.9 Compuestos metálicos

- Sulfato de zinc (Sigma)

8.2 Desinfectantes comerciales

8.2.1 Alcoholes

- Polimorfo[®] (José Collado):
 - ✓ Isopropanol 10%
 - ✓ P-clorometacresol 10%

8.2.2 Oxidantes

- Proxitane 15[®] (Solvay):
 - ✓ Ácido acético. < 30%
 - ✓ Peróxido de hidrógeno 21%
 - ✓ Ácido peracético 15%

8.2.3 Derivados del amonio cuaternario

- Limoseptic plus[®] (José Collado):
 - ✓ Cloruro de didecil-dimetilamonio 4,5%
- Totalcide[®] (Bio- Genetic):
 - ✓ N-duopropenida 11%

8.2.4 Productos mixtos

- CR-36 Mural[®] (José Collado), compuesto con alcoholes y un derivado del amonio cuaternario:

- ✓ Alcohol isopropílico 41%
- ✓ Bronopol 0,256%
- ✓ Cloruro de benzalconio 0,08%

- Darodor 9000[®] (José Collado), compuesto con aldehídos y un derivado del amonio cuaternario:

- ✓ Cloruro benzalconio 10%
- ✓ Glioxal 6.8%

Materiales

- ✓ Glutaraldehído 2.5%
- Limoseptic[®] (José Collado), compuesto con aldehídos y un derivado del amonio cuaternario:
 - ✓ Cloruro de Benzalconio 10%
 - ✓ Glioxal 6,8%
 - ✓ Formol 6%
 - ✓ Glutaraldehído 2,5%
- Limoseptic SF[®] (José Collado), compuesto con un aldehído y un derivado del amonio cuaternario:
 - ✓ Glutaraldehído 5%
 - ✓ Cloruro de didecil-dimetilamonio 4,5%
- Limoseptol[®] (José Collado), compuesto con aldehídos y un derivado del amonio cuaternario:
 - ✓ Cloruro de benzalconio 5%
 - ✓ Glioxal 3,4%
 - ✓ Glutaraldehído 1,25%
- Virkon-S[®], compuesto con un oxidante, un surfactante y ácidos orgánicos:
 - ✓ Monopersulfato potásico, sulfato monopotásico, sulfato potásico 50%
 - ✓ Dodecylbencenosulfonato 15%
 - ✓ Ácido sulfámico 5%
- Virocid[®] (Bayer), compuesto con un alcohol, un aldehído y derivados del amonio cuaternario:
 - ✓ Cloruro de alquil-dimetil-bencilamonio 17%
 - ✓ Isopropanol 14,6%
 - ✓ Glutaraldehído: 10,7%
 - ✓ Cloruro de didecil-dimetilamonio 7,8 %

MÉTODOS

I. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y MULTIPLICACIÓN DE *Campylobacter jejuni* EN CONDICIONES DE CAMPO Y EN CONDICIONES DE LABORATORIO

1.1 Construcción de una curva de crecimiento de *C. jejuni*

Partiendo de un crecimiento de 48 horas en medio de enriquecimiento líquido, con un título de 10^7 UFC/ml, se inoculó un volumen de 1 ml en 100 ml de caldo Bolton, suplementado al 5% con sangre de caballo desfibrinada y se mantuvo en condiciones de microaerofilia.

La tasa de crecimiento fue medida mediante un recuento en agar sangre, recogiendo alícuotas del cultivo cada dos horas, durante las diez horas siguientes a la inoculación. Entre tanto, el caldo de cultivo se mantuvo a 37°C, en condiciones de agitación y en cultivo estático. De cada una de estas alícuotas se prepararon diluciones decimales, procediéndose después a la siembra en superficie en las placas de agar. Los recuentos se llevaron a cabo después de la incubación de las placas a 42°C, durante 48 horas, en incubador de microaerofilia, bajo condiciones de crecimiento óptimas (10% de CO₂ y 5% de O₂).

1.2 Estudios de supervivencia de *C. jejuni* en distintos medios y condiciones de laboratorio

1.2.1 Supervivencia de *C. jejuni* en PBS

Se utilizaron seis densidades ópticas (DO) diferentes (0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 y 0,035). Se resuspendió en 1 ml de PBS el crecimiento de una placa de cultivo fresco en agar sangre, de la cepa de referencia de *C. jejuni*. A partir de este inóculo inicial, por medio de diferentes diluciones en PBS, se fueron obteniendo las distintas alícuotas correspondientes a las DOs estudiadas, medidas en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf), una longitud de onda (λ) de 600 nm.

Para llevar a cabo los recuentos, de cada una de las alícuotas se prepararon diluciones decimales en PBS, procediéndose después a la siembra en superficie de 100 μ l

de distintas diluciones del cultivo en placas de agar sangre, por triplicado, incubando 48 horas en microaerofilia, y se realizó el recuento de las colonias.

En una segunda parte, para los estudios de supervivencia en PBS, se llevaron a cabo recuentos, mediante las diluciones decimales correspondientes, de una de las densidades de partida (0,025 nm) a diferentes tiempos (0, 8, 16 y 24 horas), manteniéndose a temperatura de refrigeración. Este estudio se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento de siembra e incubación que en la etapa anterior.

1.2.2 Supervivencia de *C. jejuni* en caldo Bolton, agua de peptona y agua destilada

Con la cepa de referencia se preparó un inóculo de 10^6 UFC/ml, con el que se inocularon cuatro alícuotas de cada uno de los tres medios de prueba, al 10%. Se establecieron varias condiciones de mantenimiento de las muestras: a 4°C, a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), a 37°C y a 42°C, todas ellas en aerobiosis.

A lo largo de 13 semanas (92 días), asépticamente se tomaron alícuotas de cada muestra, a diferentes tiempos desde la inoculación: 0; 1; 3; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 72; 76; 80; 84; 88 y 92 días, respectivamente. En todos los casos se prepararon, por duplicado, diluciones decimales de cada alícuota, se sembraron en agar sangre y se incubaron las placas 48 horas, a 42°C en condiciones de microaerofilia.

1.3 Estudios de supervivencia en otros sustratos

En primer lugar, se utilizaron distinto tipo de materiales orgánicos procedentes de la explotación (pienso, heces y agua) y, una vez esterilizados mediante tratamiento en autoclave (a 121°C durante 20 minutos) y mantenidos a temperatura ambiente, fueron distribuidos en alícuotas de 0,9 ml. En el caso de los productos sólidos (heces o pienso), se formaba una papilla con un volumen de agua previamente calibrado, del cual se tomaba nota para, posteriormente, expresar los resultados finales en función de un peso o volumen adecuados.

Cada una de estas alícuotas fueron inoculadas con 0,1 ml (por cada 0,9 g en el caso de los sólidos, o 0,9 ml si se trataba de agua) de una suspensión de *C. jejuni*, obteniéndose un título final en cada muestra de 10^8 UFC de la cepa de prueba, ATCC (33560), que fueron selladas en su totalidad. De este modo se obtuvieron, un total de 28 alícuotas por cada tipo de material referido anteriormente, se dispusieron la mitad de ellas (14 alícuotas) en la nave seleccionada donde se llevó a cabo la crianza de los pollos y la otra mitad (las otras 14) en el laboratorio. En este último caso se ajustó la temperatura a 20-22°C, con el objeto de que las condiciones ambientales fuesen lo más similares posibles a las condiciones de la explotación aviar.

A partir de esa fecha, cada diez días, se recogían dos alícuotas de cada material de muestra y se procedía a su recuento. Partiendo de la muestra se preparaban diluciones decimales con agua estéril, sembrándose después 100 µl de dichas diluciones en la superficie de placas de medio mCCDA, incubando en microaerofilia 48 horas.

En un segundo estudio, con objeto de buscar mayor precisión en los resultados (muestras más homogéneas), se modificó la forma de preparación de las muestras; así una vez esterilizados los sustratos, se inocularon en su conjunto, se homogeneizaron y posteriormente se alicuotaron. Como en el caso anterior, los inóculos fueron de 10^8 UFC/ml de la cepa de referencia, manteniéndose el número de alícuotas y las temperaturas a las que estas habían sido sometidas, variando el tiempo de recogida y estudio de los distintos materiales alicuotados, para poder obtener resultados más precisos. Así, la recogida de las muestras se efectuó cada 5 días, realizándose el procesado de igual modo que en la prueba anterior.

1.4 Estudios de supervivencia en medios de transporte

En este apartado se utilizaron cuatro medios de transporte disponibles en el mercado y como muestra de prueba, una mezcla de heces recién emitidas, procedentes de la explotación de Riosequino de Torío (León).

Los medios de transporte utilizados fueron los siguientes:

- Amies
- Stuart
- Amies con carbón (Charcoal)
- Cary-Blair

Para la realización de la prueba, se recogieron cinco muestras de heces, que se homogeneizaron, se impregnaron con ellas hisopos y que se conservaron introducidos en los distintos medios de transporte. Adicionalmente, uno de ellos se introdujo en un tubo estéril, sin medio de transporte. Todos fueron mantenidos en el laboratorio, en las mismas condiciones de temperatura y humedad.

En la primera parte de este ensayo, se procedió a la recuperación de las inoculaciones, al cabo de una hora. A tal efecto, se recuperaron los hisopos después de ese tiempo y se resuspendió el contenido en 5 ml de medio Bolton, incubándose durante cinco horas, a 37°C, y posteriormente, 48 horas a 42°C, en microaerofilia. Después de esta incubación se prepararon diluciones decimales en agua destilada y se sembraron 100 µl del caldo inoculado en placas de mCCDA, que se mantuvieron 48 horas en ambiente de microaerofilia. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de las placas.

Con el fin de tratar de aproximar el estudio a las posibilidades reales de transporte del material de análisis, desde las explotaciones hasta el laboratorio y, debido a la imposibilidad de realizar ninguna técnica que permitiera el recuento bacteriano si se partía de muestras fecales, se decidió completar este estudio con una segunda prueba, utilizando para ella como inóculo un cultivo bacteriano puro.

Así pues, para la realización de esta parte se preparó un inóculo a partir de la cepa de referencia ATCC (33560), en caldo Bolton suplementado con un 5% de sangre de caballo y un 10% de suero fetal bovino, dejándose en incubación durante 48 horas en un ambiente de microaerofilia, a 42°C. Transcurrido este tiempo, se realizó un recuento en agar sangre, obteniéndose un crecimiento con 10^7 UFC/ml. Con este inóculo, se impregnaron hisopos de algodón, que se mantuvieron a diferentes temperaturas (4°C y 20°C) durante diferentes tiempos, en los medios de transporte seleccionados para el estudio. Así, se realizaron lecturas del título de la bacteria habiendo transcurrido 1, 3, 5, 7, 10, 13, 18 y 25 días.

El recuento se llevó a cabo del modo siguiente: una vez recuperado el hisopo del medio de transporte, se introdujo en un tubo con PBS, realizándose así una dilución 1/10. Este tubo se agitó durante 2 minutos de forma manual; posteriormente, se realizaron diluciones decimales en PBS y se sembraron 100 µl de cada dilución en placas de agar sangre, realizándose cada siembra por duplicado. Estas placas se mantuvieron en estufa a

42°C, durante 48 horas, en microaerofilia. Transcurrido el tiempo de incubación de las placas, se llevaron a cabo las lecturas.

Para comprobar el grado de error de este método de recuento, se realizó una prueba previa de la misma manera, partiendo de un hisopo a las 0 horas de la inoculación.

II. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO DE *Campylobacter jejuni*

2.1 Medios selectivos para el aislamiento y recuento de *C. jejuni*

Los medios disponibles en el mercado pueden utilizarse para el aislamiento de *C. jejuni*, pero los intentos preliminares de conseguir optimizar medios y métodos para llevar a cabo recuentos no fueron satisfactorios, por lo que decidimos poner a punto estudios paralelos, con la pretensión de encontrar una forma y un medio que pudieran facilitar estos propósitos.

2.1.1 Siembra en caldo Bolton enriquecido con distintas combinaciones antibióticas y determinación de la sensibilidad de las colonias

A partir de heces frescas recogidas directamente en la explotación, se preparó una suspensión en agua destilada estéril al 10%. De esta, se separaron 9 ml a los que se inoculó 1 ml de una suspensión reciente de *C. jejuni* con una carga aproximada de 10^7 UFC/ml. De esta mezcla se obtuvieron después alícuotas de 1 ml, que se utilizaron para inocular 9 ml de los medios que se detallan a continuación:

- Caldo Bolton
- Caldo Bolton suplementado con el suplemento antibiótico 1 (con cefoperazona y anfotericina B)
- Caldo Bolton suplementado con el suplemento antibiótico 2 (con polimixina B, ciclohexamida, rifampicina y trimetoprima)
- Caldo Bolton suplementado con el suplemento antibiótico 3 (con cefoperazona, vancomicina, anfotericina B y trimetoprima)

Transcurridas 48 horas a 42°C y en microaerofilia, se procedió a realizar diluciones decimales con los distintos medios inoculados y a su siembra en placas de medio mCCDA, incubando estas a 42°C en microaerofilia, durante 48 horas.

Después de la incubación se realizó un aislamiento de las colonias similares a *Campylobacter* que aparecieron en las placas y, junto con una colonia confirmada como positiva, se realizó un estudio de sensibilidad antibiótica de las distintas colonias con los antibióticos disponibles en el laboratorio, con el propósito de seleccionar aquellos que, teniendo acción sobre los contaminantes indeseables, no la ejercieran frente a *C. jejuni*.

Se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones, en disco, que se señalan en la Tabla 3.

Tabla 3. Antibióticos y concentraciones en los discos utilizados, en los ensayos de inhibición de los distintos aislados.

Antibiótico	Concentración en el disco
Polimixina	150 µg
Estreptomicina	100 µg
Cefalotina	66 µg
Vancomicina	5 µg
Ampicilina	10 µg
Rifampicina	30 µg
Bacitracina	40 U
Cefoperazona	5,2 µg
Trimetoprima	5,2 µg
Kanamicina	100 µg
Neomicina	30 µg
Florfenicol	30 µg

2.1.2 Uso combinado de filtros de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro y medios selectivos (mCCDA, Skirrow, Preston y CSM)

a) Siembra en medios selectivos: El siguiente paso consistió en la siembra de diluciones decimales de un inóculo similar al anterior (1 ml de heces al 10% disueltas en agua estéril, en 9 ml de agua de peptona al 0,1%), realizando la siembra de 100 µl por inundación, en placas compuestas por los distintos medios suplementados con diferentes antibióticos.

En este paso los medios utilizados fueron los siguientes:

- mCCDA (con cefoperazona y anfotericina B).
- Agar sangre (sin antibióticos).
- Agar de Skirrow modificado (con vancomicina, polimixina B, anfotericina B, trimetoprima y cefalotina).
- Agar Preston sin suplemento antibiótico.
- Agar Preston con el suplemento antibiótico 1 (con cefoperazona, vancomicina, anfotericina B y trimetoprima).
- Agar Preston con el suplemento antibiótico 2 (con polimixina B, ciclohexamida, rifampicina y trimetoprima).
- Agar Preston con el suplemento antibiótico 3 (con piruvato sódico, vancomicina, ciclohexamida y cefoperazona).
- Agar CSM sin suplemento antibiótico.
- Agar CSM con el suplemento antibiótico 1 (con cefoperazona, vancomicina, anfotericina B y trimetoprima).
- Agar CSM con el suplemento con antibiótico 2 (con polimixina B, ciclohexamida, rifampicina y trimetoprima).
- Agar CSM con el suplemento con antibiótico 3 (con piruvato sódico, vancomicina, ciclohexamida y cefoperazona).

Todas las placas fueron incubadas a 42 °C en microaerofilia, durante 48 horas.

b) Siembra con filtros de celulosa: Se llevó a cabo simultáneamente con el método anterior. En él se utilizaron los mismos medios y combinaciones antibióticas, con la diferencia de que 100 µl de las distintas diluciones decimales del inóculo anterior se depositaron sobre filtros de celulosa con un poro de 0,45 µm de diámetro (Millipore), que fueron retirados con pinzas estériles, una vez transcurrido el tiempo necesario (45 minutos). Posteriormente y al igual que en el punto anterior, las placas fueron incubadas a 42 °C en microaerofilia, durante 48 horas.

2.2 Utilización de filtros para el aislamiento de *C. jejuni*

Se partió de heces esterilizadas en autoclave (121°C durante 15 minutos) que fueron inoculadas al 10% con un cultivo de 10⁷ UFC/ml de la cepa de referencia de *C. jejuni* ATCC (33560). De este inóculo, se practicaron diluciones decimales que fueron centrifugadas (6.000 rpm, durante 1 minuto) y a partir de su sobrenadante se llevaron a cabo distintas siembras en placas:

- Siembra directa, por inundación de 100 µl, sin filtración previa.
- Siembra de 100 µl utilizando filtros de celulosa de 0,45 µm de poro (Millipore).
- Siembra por inundación de 100 µl, del líquido recogido después de utilizar un sistema de filtración con jeringuilla y un poro de 0,45 µm de diámetro (Millipore).
- Siembra por inundación, de 100 µl del líquido resultante de filtrar el inóculo con un equipo de filtración al vacío y utilización de filtros de celulosa con un poro de 0,45 µm de diámetro (Millipore).

Paralelamente, se sembraron en agar sangre y en mCCDA distintas diluciones de cada una de las muestras obtenidas, de los distintos procedimientos de filtración utilizados, y después se incubaron a 42 °C en condiciones de microaerofilia.

La identificación se realizó mediante detección molecular. Así pues, con el propósito de proceder a la detección del microorganismo objeto de estudio, en diversos puntos se llevaba a cabo una prueba de amplificación de fragmentos de ADN, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiéndose en todos los casos el método descrito por Ng *et al.* (1997), con algunas modificaciones.

Se detalla la técnica a continuación:

Anteriormente a la realización de la PCR era necesario obtener el ADN de las muestras, para lo cual, al finalizar la incubación se arrastraba con un asa el crecimiento obtenido de cada placa, procediéndose seguidamente a la extracción del ADN, que se realizó mediante la técnica de “hervido”. La muestra fue resuspendida en 100 µl de agua miliQ, se hirvió durante 10 minutos y posteriormente fue centrifugada durante 5 minutos, a 10.000 rpm y a 4°C, utilizando un equipo Centrifuge 5415 R (Eppendorf). De cada muestra fue recuperado el sobrenadante, considerándose posteriormente como “ADN extraído”.

Todas las detecciones de *C. jejuni*, se realizaron mediante PCR, en condiciones similares. Para ello, preparó una mezcla Master Mix en hielo, con volumen total de 50 µl compuesta por:

▪ Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa (Biotools)	0,5 µl
▪ dNTPs (Biotools)	0,5 µl; 25mM cada uno
▪ Tampón de la enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa (Biotools)	5,0 µl
▪ Cloruro de magnesio (Biotools)	1,5 µl
▪ Oligonucleótidos (cebadores) específicos (Tib Molbiol)	1,0 µl x2
▪ Agua libre de ADN/ARN (Sigma)	37,5 µl
▪ ADN extraído	3,0 µl

La pareja de cebadores específicos empleados en la detección consta de la siguiente secuencia:

- 5' - TGA CGC TAG TGT TGT AGG AG - 3'
- 5' - CCA TCA TCG CTA AGT GCA AC - 3'

Las muestras se dispusieron en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) y fueron sometidas a las siguientes condiciones de amplificación: un periodo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por 25 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 48°C y 30 segundos a 72°C y, por último, 10 minutos a 72°C.

Los resultados de la PCR fueron analizados por electroforesis, utilizando 15 μ l del producto de la PCR cargados en un gel de tampón TBE con agarosa al 1%, con 5 μ l de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml (Bio-Rad). La electroforesis se realizó en el equipo Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) y el gel fue sometido a 100 V durante 45 minutos. La visualización se realizó bajo luz ultravioleta y el resultado fue capturado con el sistema Gel Printer, de “Tecnología para el Diagnóstico e Investigación” (TDI) y analizado con el Programa “1-D Manager”, de TDI.

Como control, negativo (sin ADN) se utilizó agua milliQ en lugar de ADN, negativo (con ADN) se utilizó ADN de *Pasteurella multocida* ATCC (43137) y como control positivo ADN de *C. jejuni* ATCC (33560).

III. IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRAS Y MUESTREO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PORTADORES

Con el propósito de emprender este capítulo, se llevaron a cabo los correspondientes estudios sobre diferentes tipos de muestras y materiales de estudio, como hisopos de cloaca en animales vivos, muestras de tipo ambiental y heces.

3.1 Comparación entre medios de cultivo

Con el fin de determinar si existía variación en el resultado de la PCR, dependiendo de en qué medio se cultivaban las muestras, durante varios días alternos y coincidiendo con el final del ciclo productivo de las aves, se recogieron muestras de heces recién emitidas en la explotación, utilizando hisopos de algodón que fueron transportados en medio Cary-Blair a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Una vez en el laboratorio, cada uno de los hisopos se sembró en dos medios diferentes: mCCDA y agar sangre. Las placas se incubaron 48 horas a 42°C en microaerofilia y la presencia de *C. jejuni* se confirmó mediante PCR.

3.2 Muestras procedentes de pollos de carne

3.2.1 Influencia de la edad de los animales y la época del año en la presencia de muestras positivas

Semanalmente y durante cuatro ciclos consecutivos de producción, uno en cada estación climática, se tomaron diferentes muestras de heces de pollos en la explotación de Riosequino de Torío, realizándose la recogida mediante tres procedimientos diferentes:

a) Se recogieron heces de distintos lugares elegidos al azar del interior de la nave de crianza, con la ayuda de un depresor lingual estéril, depositándose una mezcla de 10 muestras en recipientes también estériles, obteniéndose un total de 5 recipientes por muestreo. Una vez en el laboratorio, las heces de cada recipiente se homogeneizaban y se trataban como muestras independientes. De este homogeneizado se recogía 1 g, que se añadía a 9 ml de agua de peptona al 0,1%, incubándose después durante 30 minutos a

37°C. Después de la incubación, se sembraba de cada una un volumen de 100 µl en placas de mCCDA. Transcurridas 48 horas a 42°C en microaerofilia, se llevó a cabo la lectura de las placas. Las colonias sospechosas se confirmaron mediante PCR.

b) Una alternativa consistió en la recogida de las heces mediante el protocolo de muestreo utilizado para la detección de determinados serotipos de salmonela en naves de ponedoras en suelo, según el Reglamento (UE) N° 517/2011 (DOUE, 2011). Para ello, se utilizaban 2 pares de calzas absorbentes, impregnadas en una solución de peptona en agua destilada estéril al 0,1%. Se dividió la nave en 2 partes y con las calzas colocadas en las botas, se recorría la mitad correspondiente de la nave, de forma que todas las partes representativas de ésta estuvieran presentes en la muestra.

Después se retiraron las calzas de forma cuidadosa, tratando de que no se desprendiera nada del material adherido a ellas y se transportaron aisladas e identificadas en un recipiente estéril, en refrigeración, hasta el laboratorio. Una vez allí cada par de calzas se sumergió en 100 ml de agua de peptona y se extrajo el material fecal, agitando en un mezclador Stomacher, durante 30 segundos. Del líquido obtenido se extrajo un volumen de 1 ml que se inoculó en 9 ml de agua de peptona al 0,1%, incubándose después durante 30 minutos, a 37°C.

Terminada la incubación se realizaron diluciones decimales, sembrando en placas de medio de cultivo, e incubando durante 48 h a 42°C. Al igual que en la modalidad anterior, las colonias sospechosas se confirmaron mediante PCR.

c) Finalmente se llevó a cabo la recogida semanal de 10 animales y, previa sedación y eutanasia, se llevó a cabo su necropsia obteniendo el contenido cecal, con el que se procedió al análisis. Se recogió una muestra del contenido cecal, con un asa de platino, se sembró por agotamiento en una placa de mCCDA y se incubó 48 h a 42°C en microaerofilia. Las colonias sospechosas se confirmaron por PCR.

3.2.2 Prevalencia de *C. jejuni* en pollos de carne

Para determinar la presencia de *C. jejuni* en animales vivos y, teniendo en cuenta las posibles variaciones a lo largo de la cría, se llevaron a cabo muestreos de la explotación en tres momentos del ciclo de producción: al final del primer tercio (23 días), al final del segundo (46 días) y al final del tercero o previo al sacrificio (69 días).

Para cada caso se tomaron muestras de cloaca. Tras la inmovilización del animal, se introdujeron hisopos de algodón estériles aproximadamente 2 cm en la cloaca de cada animal, realizándose pequeños giros en su interior. Posteriormente, se trasladaron hasta el laboratorio, mantenidos en medio Cary-Blair a temperatura ambiente 20°C. Se tomaron muestras de un total de 30 aves de la explotación, sembrándose directamente en placas con medio mCCDA. Las placas se incubaron 48 horas a 42°C en microaerofilia, como en ocasiones anteriores, y se utilizó el mismo método de identificación (PCR).

3.2.3 Muestras del aparato digestivo de los animales

Para su realización, se estudió el contenido digestivo de los animales objeto de estudio durante su ciclo de vida. Cada 10 días se separaban aleatoriamente 10 aves procedentes de la explotación de Riosequino de Torío (León), que eran inmediatamente trasladados al laboratorio, donde se procedía a su eutanasia humanitaria por dislocación cervical, (Reglamento (CE) nº 1099/2009 del Consejo (DOUE, 2009)). Una vez sacrificados, se procedía a su necropsia y la recogida de muestras de contenido de buche, ciego y colon, en condiciones estériles. Posteriormente, se procedía a la siembra directa en medio mCCDA e incubación en condiciones estándar. Sobre las colonias sospechosas se confirmaba *C. jejuni* mediante PCR.

3.3 Muestras ambientales

3.3.1 Muestras de origen fecal

Se utilizaron heces de distinto tipo y condición, incluyendo: heces frescas (recién emitidas y aún con aspecto suave y brillante), heces antiguas (con aspecto seco y de consistencia quebradiza) y materia orgánica sin identificar, próxima a comederos y bebederos (fundamentalmente compuesta por restos de paja con excrementos).

La recogida de las muestras se realizó en los mismos periodos de tiempo que en el apartado 2.2 de este capítulo, es decir, en los días 23, 46 y 69 del ciclo de vida de los animales. De cada tipo de material de prueba se seleccionaron, un total de 10 muestras aleatorias en cada muestreo y, con la ayuda de depresores linguales estériles, se recogieron en recipientes también estériles, que fueron transportados al laboratorio a

temperatura de refrigeración en el tiempo más breve posible (directamente desde la explotación). Siempre se llevó a cabo el procesado de las muestras en un periodo inferior a una hora desde la recogida. Para favorecer la hidratación de las muestras, 1 g de cada una se incubó en 9 ml de agua de peptona al 0,1%, a 37°C durante 30 minutos; posteriormente, se procedió a la siembra en superficie de 100 µl de cada muestra en placas de cultivo mCCDA, manteniéndose en las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria y realizándose su lectura a las 48 horas y, como en casos anteriores se utilizó la PCR para la confirmación de los microorganismos.

3.3.2 Otras muestras ambientales

Las distintas muestras fueron recogidas cada 15 días, durante un ciclo completo (aproximadamente 3 meses), en diferentes periodos de la cría, coincidiendo el muestreo, por tanto, con momentos en los cuales en la nave había animales, así como con otros en los cuales la nave se encontraba vacía.

Se incluyeron en este capítulo muestras de polvo y agua, tomadas aleatoriamente en distintos lugares de la explotación y procedentes tanto del interior como del exterior de las naves de Riosequino de Torío (León). También se muestrearon el pienso, las aguas estancadas del exterior de la explotación, las superficies de comederos y bebederos, la ropa y el calzado de trabajo utilizado por el personal de la explotación. Para ello, en cada periodo se recogieron 10 muestras de cada tipo, cubriendo así las diversas áreas.

Se utilizaron distintos métodos, con el fin de comprobar si el procedimiento afectaba a los resultados. Según el tipo de muestreo, se recogía la muestra en un recipiente estéril (con el pienso o agua) o empapando un hisopo de algodón previamente humedecido en tampón PBS estéril (en el resto de las muestras), utilizándose en la segunda modalidad el medio de transporte Cary-Blair. Todas las muestras se transportaron directamente al laboratorio, a temperatura de refrigeración, y el procesado se realizó de la manera descrita en puntos anteriores.

IV. PRESENCIA DE *Campylobacter jejuni* EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES

4.1 Muestreo en distintos sistemas productivos

Para la realización de este estudio se investigaron animales de tres granjas en distintas localizaciones del territorio de Castilla y León (croquis en anexo). Una de ellas poseía carácter de ‘Granja-Escuela’ y pertenecía al Colegio Santa Isabel de Soria. Las otras dos correspondían a granjas de ponedoras industriales, ubicadas en Aranda de Duero (Burgos) y Villalón de Campos (Valladolid), respectivamente. Los estudios correspondientes a la Granja-Escuela se llevaron a cabo en los siguientes grupos de animales:

➤ **Gallinas ponedoras.** Se estudiaron 29 animales mantenidos en jaulas, a razón de 3 aves por cada una, dispuestas en dos filas y a una altura del suelo de 1 metro. Estos animales estaban localizados en una sala del edificio de cría.

➤ **Animales reproductores.** Este grupo se encontraba ubicado en la misma sala que el grupo anterior, con una separación de al menos 1 metro de distancia. El grupo de muestra estaba formado por 8 hembras y 2 machos. Los diez animales se encontraban en la misma jaula, a un metro de altura del suelo.

➤ **Gallos adultos.** Este grupo estaba formado por 9 machos, ubicados en la parte exterior del edificio, en un corral o voladero, que en parte se encontraba techado, y que compartían con otro tipo de aves.

➤ **Pollos de entre 6 meses y un año.** Se muestrearon 12 animales, que se encontraban en el voladero junto con otras aves, separados únicamente por una valla metálica del corral donde estaba situado el grupo anterior.

➤ **Pollos menores de 6 meses.** Se ubicaban también en un corral dentro del voladero, separados del resto de las aves por una valla metálica. En total se estudió un grupo de 14 machos, todos de una edad comprendida entre 1 y 6 meses.

Las granjas de Aranda de Duero y Villalón de Campos se correspondían con explotaciones industriales de características similares. En ambos casos, los animales se disponían en jaulas corridas en batería y tres alturas, con una separación del suelo no inferior a un metro. Las aves se encontraban agrupadas en grupos de 3 ó 4 por jaula, sin contacto directo con las heces de los animales que se localizaban en el piso superior. En

las dos explotaciones, la toma de hisopos se realizó de manera aleatoria, recogándose 40 muestras de la granja de Villalón de Campos y 60 de la de Aranda de Duero.

En este experimento, las aves de las tres explotaciones se muestrearon de la misma manera, utilizándose un hisopado cloacal y el medio Cary-Blair para el transporte de las muestras. Una vez en el laboratorio, el procesado se llevó a cabo de la forma habitual, procediéndose a la siembra directa del hisopo en placas de mCCDA, e incubándose después durante 48 horas a 42°C en microaerofilia. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la lectura de las placas, confirmando la presencia de *C. jejuni* por PCR.

4.2 Muestreo en otras especies animales

En este estudio se muestrearon animales de tres explotaciones confirmadas como positivas a *C. jejuni*. En el anexo, se detallan las características de las explotaciones de trabajo, así como el alojamiento de los animales muestreados en cada una de ellas.

➤ **Riosequino de Torío (León).** Se recogieron muestras de aves silvestres de la zona, en su mayoría gorriones (10 en total), y de 10 ratones.

➤ **Aranda de Duero (Burgos).** En esta explotación familiar convivían las aves muestreadas de forma habitual, con gatos y estos a su vez tenían contacto indirecto (a través de un vallado metálico) con perros que se encontraban en el exterior de la nave. En el muestreo realizado se analizaron 6 perros y 10 gatos.

➤ **Soria.** En el caso de la granja de Soria coexistían una gran diversidad de animales junto con las aves muestreadas. En este centro se ha procedido a la toma de muestras de la cloaca en aves (codornices, palomas, faisanes, ocas, pavos, patos y un pavo real), así como del recto de mamíferos (ovejas, cabras, conejos y una cobaya).

Para este trabajo, en las granjas de Burgos y Soria, se utilizó el mismo tipo de muestreo que para la detección en gallinas, es decir, hisopado cloacal o rectal, utilizándose también el mismo medio de transporte, procesamiento y detección de la bacteria que en el caso señalado. En cuanto a los estudios realizados en la explotación leonesa, los animales recogidos fueron sacrificados y se realizó la siembra de su contenido cecal, determinándose posteriormente la presencia o no del microorganismo mediante PCR.

V. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE *Campylobacter jejuni*

5.1 Análisis de huevos de gallinas portadoras

Se planteó la posibilidad de supervivencia de *C. jejuni* en los huevos procedentes de un lote de 60 gallinas portadoras-eliminadoras del agente, alojadas en la granja de la localidad de Aranda de Duero (Burgos). La prueba consistió en la recogida total de la puesta en distintos días, con un intervalo de 3 semanas.

Los huevos fueron recogidos en cajas de cartón nuevas, para evitar contaminaciones posteriores a la puesta y su transporte al laboratorio se llevó a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), no superándose en ningún caso las 6 horas entre la recogida y el procesamiento. En los tres muestreos, una vez en el laboratorio y previamente al procesado, la totalidad de los huevos recogidos se dividieron en lotes de diez unidades, procesándose cada uno de ellos de forma independiente. Los lotes quedaron constituidos del siguiente modo (Tabla 4):

Tabla 4. Huevos procedentes de gallinas portadoras de *C. jejuni*, recogidos para su estudio y su distribución en lotes.

Recogida	Nº de huevos recogidos	Nº de huevos por grupo	Nº de lotes
1ª (día 0)	30	10	3
2ª (día 21)	24	8	3
3ª (día 42)	40	10	4

Con el fin de determinar la presencia de *C. jejuni*, y su localización (interna o externa), el procesamiento se llevó a cabo del modo siguiente:

A) Presencia de *C. jejuni* en el exterior

En condiciones asépticas, los huevos se sumergieron completamente en agua de peptona, a razón de 100 ml por cada huevo, y durante 3 minutos se agitaron suavemente y con mucho cuidado, con una varilla estéril. Transcurrido este tiempo se recogió el “agua

de lavado” (agua de peptona + contenido superficial del huevo) y se procesó para el aislamiento y detección de *C. jejuni*.

B) Presencia de *C. jejuni* en la cáscara

Se procedió a la rotura del huevo de forma aséptica, procediendo después a su retirada y homogeneizado con agua de peptona (20 ml por huevo), en un dispositivo “Stomacher”, durante un tiempo de 10 segundos. La muestra se obtuvo del líquido resultante de este homogeneizado.

C) Presencia de *C. jejuni* en el contenido del huevo

Después de romper el huevo, se homogeneizó su contenido en bolsas de plástico estériles, utilizando un dispositivo “Stomacher”, llevando a cabo el proceso en dos fases de 30 segundos cada una. Este líquido se utilizó directamente como material de estudio, en el que, al contrario de lo que ocurría en los dos supuestos anteriores, no se añadió agua de peptona.

Una vez obtenidas los tres tipos de muestras procedentes de cada grupo de huevos, se procedió a la siembra por triplicado de 100 μ l, en la superficie de placas de mCCDA, extendiendo el inóculo cuidadosamente. La incubación se llevó a cabo de la manera habitual, es decir, en microaerofilia a 42°C. Transcurridas 48 horas, se procedió a la lectura de las placas y a la interpretación de los resultados.

5.2 Contaminación experimental de los huevos con *C. jejuni*

Para comprobar la supervivencia y viabilidad del microorganismo en los huevos, se llevó a cabo un estudio de contaminación superficial experimental. Para ello, previa desinfección de los huevos con etanol al 70%, cada uno de ellos se introdujo en un recipiente que contenía un volumen de 200 ml de solución de agua de peptona inoculada con *C. jejuni*, hasta una concentración de 10^6 UFC/ml, suficiente para cubrir en su totalidad el huevo, permaneciendo en ella durante 15 segundos. Transcurrido este tiempo,

los huevos se dejaban secar una campana de flujo laminar, dentro de un recipiente estéril durante de 5 minutos, momento en el que se comenzaba con el muestreo.

El procesamiento de los huevos se realizó de la misma manera que en el punto anterior, diferenciándose entre superficie, cáscara y contenido interno, analizándose en cada caso por triplicado la supervivencia de la bacteria en el huevo. Los huevos se mantuvieron a 4°C y analizaron en los distintos tiempos estudiados (0, 1, 2, 4 y 6 horas) después de la inoculación, para lo que se realizaron diluciones decimales y siembras en medio mCCDA, con posterior incubación durante 48 horas en condiciones de crecimiento óptimo.

VI. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD O RESISTENCIA DE *Campylobacter jejuni* A DESINFECTANTES

6.1 Estudios de laboratorio

Las pruebas en el laboratorio se llevaron a cabo mediante el método de la suspensión, como se describe en Reybrouck (1998). Como en el caso de inóculos anteriores, se realizó la siembra del microorganismo de referencia en caldo de Bolton enriquecido con sangre de caballo y suero bovino fetal, incubando 48 horas en microaerofilia, en condiciones de crecimiento óptimo. Posteriormente, 100 µl del cultivo se sembraron en placas de agar Preston y se incubaron durante 48 horas a 42°C en microaerofilia.

El crecimiento en superficie obtenido se arrastró con un asa de vidrio y las bacterias se resuspendieron en solución salina normal o en suero fisiológico estéril, dependiendo del propósito de la prueba, practicando diluciones para obtener una concentración de hasta 10⁹ UFC/ml. Estas suspensiones fueron utilizadas como inóculo inicial en todas las pruebas.

Los desinfectantes fueron preparados de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, con agua destilada como diluyente, utilizándose los productos reflejados en la Tabla 5.

Para la realización de la prueba, 0,1 ml de cada suspensión microbiana fue añadida a 0,9 ml del desinfectante de prueba y después de 1 minuto de contacto, se separaron 0,1 ml de la mezcla e inmediatamente se diluyeron cien veces en solución salina normal, procediendo a realizar diluciones decimales hasta 10⁻⁷. Los controles de las muestras de prueba se mezclaron con 0,9 ml de agua destilada en lugar de con el desinfectante.

A partir de las diluciones realizadas se inocularon placas de agar Preston en superficie por duplicado, utilizándose volúmenes de 1 ml por placa. Las placas se incubaron a 42°C en condiciones microaerofílicas, durante 48 horas.

Tabla 5. Productos desinfectantes y su concentración de uso en la prueba “*in vitro*”.

Productos desinfectantes no comerciales	Concentración empleada (en %)	Productos desinfectantes comerciales	Concentración empleada (en %)
Ácido fosfórico	0,45	CR-36 Mural[®]	100
Agua oxigenada	3	Darodor 9000[®]	20
Alcohol isopropílico	70	Limoseptic[®]	0,25
Cloramina T	0,4	Limoseptic plus[®]	0,25
Cloruro de benzalconio	0,02	Limoseptic SF[®]	0,25
Cloruro de cetilpiridinium	0,1	Limoseptol[®]	0,5
Digluconato de clorhexidina	2	Polimorfo[®]	0,5
Etanol	70	Proxitane 15[®]	1
Fenol	5	Totalcide[®]	0,25
Formol	3,7	Virkon-S[®]	0,5
Hipoclorito sódico	0,5	Virocid[®]	0,25
Permanganato potásico	1		
Polivinilpirrolidona	1		
Povidona yodada	1		
Sulfato de zinc	0,25		

6.2 Estudios en condiciones de campo

Se valoraron distintos productos desinfectantes seleccionados, según los resultados obtenidos en el laboratorio, en la explotación avícola de Riosequino de Torío (León), sobre las paredes de una nave que anteriormente había contenido pollos de carne. Su preparación y uso se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del proveedor y se utilizaron inmediatamente después de su preparación.

A continuación, se enumeraron los distintos agentes analizados, así como su concentración de uso en el ensayo (Tabla 6).

Tabla 6. Productos desinfectantes y su concentración de uso en la prueba de campo.

Producto desinfectante utilizado	Concentración utilizada (en %)
Cloruro de cetilpiridium	0,1
Fenol	5
Cloramina T	0,4
Formol	3,7
Polimorfo[®]	0,5
Limoseptic SF[®]	0,25
CR-36 mural[®]	100
Proxitane 15[®]	1

Para la realización de la prueba se tomaron muestras del lugar, en diferentes momentos del ensayo, mediante placas de contacto tipo Rodac, que contenían agar Preston con el suplemento antibiótico 2 (con polimixina B, ciclohexamida, rifampicina y trimetoprima).

En primer lugar, se realizó una inoculación uniforme mediante pulverización, de una solución de PBS con un total de 100 UFC/m² de *C. jejuni* (ATCC 33560) en los muros de la explotación, obteniéndose diluciones a partir de un cultivo de 24 horas de la bacteria en caldo Bolton. Inmediatamente, se tomaba una muestra del muro, para determinar el posible efecto de la pulverización sobre la viabilidad de la bacteria. Se dejaba airear durante 15 minutos y, transcurrido este tiempo, se distribuyeron mediante pulverización manual 25 ml/m² de los productos desinfectantes escogidos para la prueba, dejándose actuar durante 60 minutos, después de los cuales se procedía nuevamente a la recogida de muestras, realizándose en todos los casos un muestreo del 10% de la superficie estudiada.

Las placas de contacto eran transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y posteriormente se realizaba la incubación de todas las placas durante 48 horas en un ambiente de microaerofilia, a 42°C. Transcurrido ese tiempo, se procedía al recuento de las colonias de *C. jejuni*.

Por otra parte, se creyó oportuno determinar si se producía o no descenso de viabilidad del microorganismo, causada directamente por el diluyente, por el transcurso del tiempo, por el efecto de la pulverización o por varios de estos efectos de forma conjunta. Para ello se llevó a cabo una prueba preliminar en una de las zonas, utilizándose agua destilada en vez de desinfectante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y MULTIPLICACIÓN DE *Campylobacter jejuni* EN CONDICIONES DE CAMPO Y EN CONDICIONES DE LABORATORIO

1.1 Construcción de una curva de crecimiento de *C. jejuni*

Las especies del género *Campylobacter* muestran requisitos de crecimiento exigentes y una sensibilidad inusual al estrés ambiental. Tradicionalmente *C. jejuni* se ha considerado una bacteria microaerófila obligada, cuyo crecimiento requiere una concentración de oxígeno de entre el 3 y el 15% y de dióxido de carbono entre el 2 y el 10% (Garénaux *et al.*, 2008). A pesar de que, como microaerófilo, una alta concentración de oxígeno en el medio supondría un inconveniente importante para su crecimiento, se han aislado cepas de diferentes fuentes que han demostrado tener capacidad para adaptarse al oxígeno atmosférico (Chynoweth *et al.*, 1998).

Para determinar si la cepa de referencia utilizada en este estudio se encontraba condicionada por el estrés oxidativo, se llevó a cabo un cultivo a 37°C en caldo Bolton en aerobiosis con condiciones estáticas y en condiciones que simulaban un aumento del estrés oxidativo (con agitación).

En la Figura 5 se comparan los resultados de crecimiento de la cepa ATCC 33560 de *C. jejuni*, en agitación y en estático.

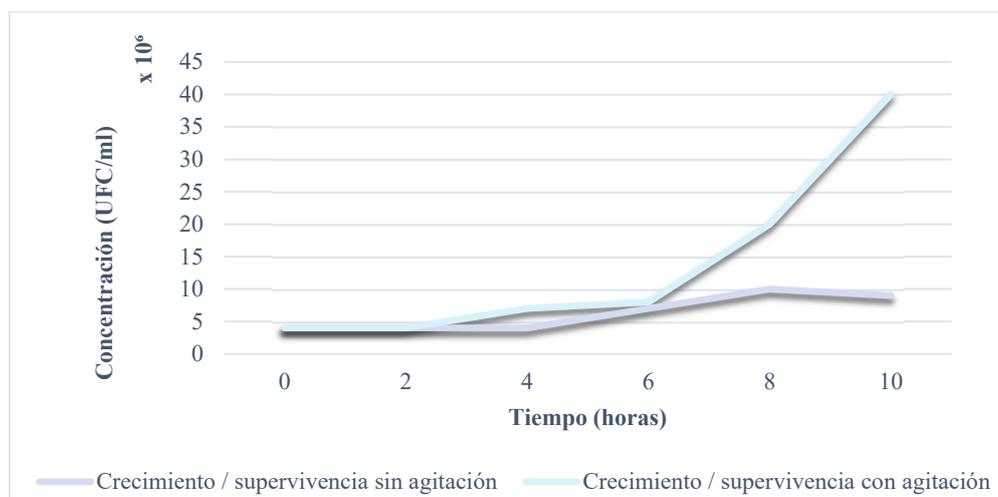


Figura 5. Curva de crecimiento de *C. jejuni* a 37°C, en condiciones estáticas y en agitación.

Si consideramos que la fase de crecimiento exponencial de ambos cultivos comienza a las 4 horas a partir de la inoculación del medio de cultivo, cuando el crecimiento celular comienza a producirse en ambas condiciones, y se estabiliza a las 8 horas de la inoculación, que es cuando aparentemente comienza la fase estacionaria del cultivo sin agitación, observamos que el tiempo de generación en el cultivo dinámico aumenta en casi un 40%, al compararlo con el obtenido en condiciones estáticas, así como que el número de generaciones en este intervalo de tiempo en el primer caso es casi cinco veces superior al registrado en el cultivo mantenido sin agitación.

A continuación, se resumen las condiciones de crecimiento de la cepa de referencia, en ambos casos a las 4 y las 8 horas de la inoculación.

Tabla 7. Número de divisiones celulares “n”, velocidad de crecimiento “v” y tiempo de generación en horas “g”, calculados a partir de las curvas de crecimiento de *C. jejuni*, en condiciones estáticas y en agitación.

Condiciones de la curva de crecimiento	n	v	g
37°C con agitación	5,32	0,53	1,88
37°C sin agitación	1,17	0,12	8,55

Los resultados del recuento bacteriano en caldo Bolton muestran que la cepa de referencia utilizada en este trabajo, ATCC (33560), a 37°C, presenta un ritmo de crecimiento más rápido cuando el cultivo se somete a agitación que cuando no se hace. Se puede observar que cuando se incuba a 37°C sin agitación, existe muy poca capacidad de crecimiento; se podría hablar de supervivencia más que de crecimiento, ya que en dichas condiciones el recuento microbiano ni siquiera aumenta una unidad logarítmica. Sin embargo, si la cepa es incubada en agitación, a 180 rpm, el crecimiento es evidente a partir de la sexta hora de incubación. La explicación es que el periodo de latencia o adaptación se prolonga en estático comparado con la agitación.

Por tanto, la cepa utilizada podría sobrevivir en este medio en condiciones ambientales normales, a pesar de no encontrarse a su temperatura óptima (42°C). Estos resultados se corresponden con investigaciones anteriores que han revelado el aislamiento cepas de *C. jejuni* aerotolerantes (Rodrigues *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2015; Karki *et al.*, 2018), que pueden sobrevivir en condiciones aeróbicas tanto en medios líquidos como sólidos. Sin embargo, se desconoce a qué se debe la mayor tasa de aislamiento del microorganismo cuando se somete a agitación y en la bibliografía revisada no se han

encontrado estudios en los que se compare la misma cepa en condiciones de agitación y sin ella.

1.2 Estudios de supervivencia de *C. jejuni* en distintos medios y condiciones de laboratorio

Para establecer un adecuado protocolo de muestreo y de trabajo, en este apartado se consideró necesario determinar la supervivencia de la cepa de referencia en distintos medios de cultivo utilizados habitualmente en el laboratorio, así como a diferentes temperaturas, siempre en condiciones de aerobiosis.

1.2.1 Supervivencia de *C. jejuni* en PBS

En esta parte del estudio se comparó la densidad óptica de una suspensión de la cepa de referencia con el recuento bacteriano del microorganismo.

Para las distintas densidades ópticas (DO) del cultivo en PBS se obtuvieron los valores que aparecen en la Tabla 8. En ella se puede observar que el crecimiento bacteriano aumenta a medida que lo hace la densidad óptica, hasta llegar a un valor de 0,030 a partir del cual prácticamente se estabiliza. En la segunda parte de esta prueba se recogieron los datos que figuran en la Tabla 9.

Tabla 8. Recuentos de *C. jejuni* correspondientes a diferentes densidades ópticas.

Densidad óptica (a 600 nm)	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030	0,035
Recuento (en UFC/ml)	1×10^2	6×10^3	7×10^5	5×10^6	1×10^7	2×10^7

Tabla 9. Viabilidad de *C. jejuni* al cabo de distintos tiempos y su correspondencia con la densidad óptica.

	Tiempo transcurrido (en horas)			
	0	8	16	24
Densidad óptica (a 600 nm)	0,025	0,024	0,026	0,024
Recuento (en UFC/ml)	9×10^6	5×10^6	9×10^6	7×10^6

Se observa que el inóculo del microorganismo, mantenido a temperatura de refrigeración durante las primeras 24 horas, no varía en la DO ni en la cantidad de células cultivables. Al igual que en otros estudios en los que se ha confirmado la viabilidad de *C. jejuni* en PBS, a temperatura de refrigeración durante 6 días (Rodgers *et al.*, 2010), se comprobó que la cepa de referencia utilizada en este trabajo (DO=0,025), conserva su viabilidad durante el tiempo suficiente para poder ser transportada a las diferentes explotaciones.

1.2.2 Supervivencia de *C. jejuni* en caldo Bolton, agua de peptona y agua destilada

La elección del diluyente para la enumeración de ciertas especies de bacterias puede afectar en gran medida al recuento de los microorganismos. Los diluyentes que son adecuados para la enumeración de una especie pueden causar pérdidas significativas de viabilidad cuando se usan con microorganismos menos resistentes (Abram y Potter, 1985).

El agua destilada y el agua de peptona han sido utilizados tradicionalmente en los laboratorios de Microbiología para la preparación, tanto de diluciones como de suspensiones bacterianas, y el caldo Bolton representa una de las mejores alternativas para el enriquecimiento de las muestras (Baylis *et al.*, 2000b).

Se considera imprescindible asegurarse tanto de la supervivencia como de la multiplicación en dichos medios de la cepa de *C. jejuni* utilizada en el estudio, previamente al uso de estos. Para ello, los diferentes medios fueron inoculados con un cultivo de 10^6 UFC/ml de la cepa de referencia de *C. jejuni*, ATCC 33560 en PBS, añadiéndose éste en una proporción del 10% con respecto a la muestra final.

1.2.2.1 Mantenimiento en agua destilada

La capacidad de *C. jejuni* para sobrevivir en ambientes acuáticos pobres en nutrientes puede diferir entre las cepas (Jones *et al.*, 1991), aunque existen diversos estudios que han analizado la supervivencia del microorganismo en “sistemas de agua simple” (Buswell *et al.*, 1998). Los sistemas experimentales utilizados han sido muy

diversos y en ningún caso han consistido en agua destilada, lo que dificulta la comparación detallada de los resultados logrados previamente con los nuestros.

La Tabla 10 recoge los resultados de supervivencia *C. jejuni* en agua destilada.

En este estudio se pudo comprobar que la cepa de trabajo sólo sobrevivió poco más de un día en agua destilada, cuando la temperatura se mantuvo a 4°C, ya que cuando se incubó a 42°C o a 37°C, las bacterias no sobrevivieron ni un día. Cuando la suspensión se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente a 20°C), únicamente pudieron recuperarse en el primer muestreo (1^{er} día). Por el contrario, cuando se mantuvieron a 4°C, el inóculo permaneció con un título similar (10^5 UFC/ml) durante 18 días, reduciéndose gradualmente una unidad logarítmica hasta los 30 días, otra hasta el día 38 y desapareciendo el crecimiento finalmente a partir del día 42.

Por tanto, el microorganismo únicamente exhibió una viabilidad elevada en agua destilada, cuando se mantuvo a bajas temperaturas (4°C), lo que se corresponde con lo publicado por otros autores, que aseguran que la supervivencia de *C. jejuni* en estos “nichos acuáticos” mejora a temperaturas bajas, con independencia de la cepa evaluada. En esta línea, Rollins y Colwell (1986) determinaron que la supervivencia de *C. jejuni* en agua corriente a 4°C, 25°C y 37°C era respectivamente de 4 meses, 28 días y 0 días. Blaser *et al.* (1980) también observaron que la viabilidad bacteriana en agua corriente esterilizada en autoclave era superior a 4°C (de 1 a 4 semanas) que cuando el microorganismo se mantenía a 25°C (apenas 4 días). Buswell *et al.* (1998) analizaron la supervivencia de diferentes cepas de *C. jejuni* en sistemas acuáticos agotados en nutrientes y estimaron que la supervivencia de las distintas cepas a 4°C se situaba entre 5 y 12 días, a temperatura ambiente (22°C) entre 1 y 2 días y a 37°C entre 9 y 36 horas. A pesar de las evidentes diferencias entre las distintas cepas, los resultados de viabilidad bacteriana a 37 °C y a temperatura ambiente de este último estudio se asemejan bastante a los datos obtenidos en el nuestro, en el que se determinó que la cepa de referencia sobrevivió no más de 24 horas a 37°C y entre 24 y 72 horas a temperatura ambiente.

A la vista de los resultados anteriores, resulta evidente que conforme aumenta la temperatura, la supervivencia de las cepas se reduce. En este estudio, cuando la suspensión se mantuvo a 42°C (igual que a 37°C), sólo se pudo detectar el microorganismo en el primer muestreo realizado (día 0), pero al no existir datos anteriores de supervivencia a dicha temperatura (42°C) no se puede confirmar este resultado.

1.2.2.2 Supervivencia en agua de peptona

El uso del agua de peptona como diluyente para prevenir la muerte bacteriana ha sido probado desde hace años (King y Hurst, 1963). De hecho, es el diluyente más utilizado en la mayoría de los métodos normalizados de recuento de bacterias ISO en alimentos en la actualidad y, en concreto en el correspondiente a *Campylobacter* (“Norma UNE-EN ISO 10272-2:2018,”). Además de su capacidad como diluyente, más recientemente se ha comprobado su idoneidad como medio de aislamiento para *C. jejuni* a partir de determinadas muestras (Oyarzabal *et al.*, 2007).

La mayor tasa de supervivencia se observó cuando el agua de peptona inoculada con el cultivo inicial de *C. jejuni* se mantuvo a 4°C, no sobreviviendo ni tan siquiera un día a 42°C y menos de tres cuando el inóculo se conservó a temperatura ambiente. Sin embargo, a 37°C, el microorganismo no sólo subsistió, sino que, además, en el día 1 se observó un ligero crecimiento con respecto al inóculo inicial y paulatinamente fue reduciéndose el título hasta llegar al día 18, en el que desapareció.

Con respecto a la evolución observada en el inóculo mantenido a 4°C, igual que en el agua destilada, permaneció con un título similar durante varias semanas, en este caso durante 22 días, disminuyendo una unidad logarítmica a partir de esta fecha hasta los 30 días y desapareciendo finalmente a partir del día 42. La Tabla 11 recoge los resultados obtenidos cuando el inóculo se diluyó en agua de peptona.

Los resultados de supervivencia de la cepa de referencia en el agua de peptona fueron similares a los que se obtuvieron en el caso del agua destilada, a excepción de los datos a 37°C, que en este medio fueron mucho más elevados (14 días en agua de peptona, frente a no más de 24 horas en agua destilada). No se sabe con certeza el porqué de este aumento de viabilidad bacteriana a esta temperatura, ni tampoco a qué se debe el aumento en dos unidades logarítmicas que se produce en las primeras horas, pero se cree que puede estar relacionado con lo observado en otros estudios, que han enunciado que ésta sería la temperatura óptima para la recuperación de *C. jejuni* en distintos medios (Hsieh *et al.*, 2018) y con la funcionalidad de que el agua de peptona podría tener como medio de pre-enriquecimiento para *Campylobacter*, al igual que se demuestra con otros microorganismos semejantes (Baylis *et al.*, 2000a).

Tabla 10. Supervivencia de *C. jejuni* en agua destilada mantenida a distintas temperaturas en UFC/ml.

Temperatura de incubación	Tiempo transcurrido (en días)														
	0	1	3	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
42°C	5x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C	5x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T ^a ambiente	5x10 ⁵	1x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C	5x10 ⁵	7x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁵	3x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ⁴	8x10 ³	2x10 ³	5x10 ²	0	0

Tabla 11. Supervivencia de *C. jejuni* en agua de peptona mantenida a distintas temperaturas, expresada en UFC/ml.

Temperatura de incubación	Tiempo transcurrido (en días)														
	0	1	3	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
42°C	4x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C	4x10 ⁵	2x10 ⁷	5x10 ⁶	9x10 ⁵	3x10 ⁵	2x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T ^a ambiente	4x10 ⁵	1x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C	4x10 ⁵	7x10 ⁵	2x10 ⁵	6x10 ⁴	1x10 ⁴	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	4x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	8x10 ²	9x10 ¹	0	0

1.2.2.3 Supervivencia en caldo Bolton

El caldo Bolton es uno de los medios de enriquecimiento más utilizados para la detección de *Campylobacter* (Chon *et al.*, 2018), siendo uno de los dos recomendados en la norma ISO vigente (UNE, 2018). Para la recuperación óptima de estos microorganismos en este medio, se recomienda una atmósfera de microaerofilia y una temperatura de 42°C. A pesar de que en este trabajo se ha utilizado un ambiente aerobio para la prueba, a esta temperatura (42°C), se ha demostrado que la supervivencia de la cepa de referencia es muy elevada, llegando incluso a los 80 días de viabilidad.

No se conocen estudios anteriores que describan la supervivencia bacteriana en caldo Bolton, pero se cree que estos datos se pueden deber al hecho de que dicho medio aportó a la cepa analizada todos los nutrientes necesarios para la supervivencia a su temperatura óptima de crecimiento (42°C). En este estudio, también se han obtenido datos de viabilidad muy altos en caldo Bolton a bajas temperaturas. Resultados de una supervivencia muy elevada a 4°C se obtuvieron también en caldo Brucella (Doyle y Roman, 1982), en los que tres cepas de *C.jejuni* apenas variaron su viabilidad durante los 14 días que duró el estudio, obteniéndose por tanto datos similares, a pesar de las posibles diferencias debidas a la composición de ambos medios, o las atribuibles a la utilización de diferentes cepas.

Al analizar los resultados de los recuentos obtenidos en caldo Bolton inoculado con el mismo título de la cepa de referencia (ATCC 33560), se pudo observar que, al contrario que en los casos anteriores, la supervivencia más prolongada no se produjo a 4°C, sino a 42°C. A dicha temperatura, el microorganismo permaneció viable durante al menos 80 días, produciéndose un crecimiento continuado de dos unidades logarítmicas hasta el día 3, recuperando el título inicial (10^5 UFC/ml) entre los días 18 y 22, e incrementándose ligeramente entre los días 26 y 30, para ir reduciéndose después lentamente hasta los días 50-54, aumentar otras dos unidades logarítmicas el día 58, mantenerse hasta el 66 y, por último, ir reduciéndose hasta desaparecer el día 84.

Cuando el caldo Bolton inoculado con 10^6 UFC/ml se mantuvo a temperatura ambiente, *C. jejuni* subsistió menos de tres días y a 37°C no desarrolló colonias a los 10 días, produciéndose un leve crecimiento en las primeras horas (día 1), disminuyendo después hasta el día 10, momento en el que no se observó crecimiento bacteriano. A 4°C, el título del microorganismo se mantuvo más o menos estable durante casi tres semanas,

reduciéndose ligera y progresivamente a partir del día 22, hasta el día 80 en el que ya no se observó crecimiento. La Tabla 12 recoge los resultados descritos.

Si se comparan los resultados obtenidos en los distintos medios a 4°C, se observa que la mayor tasa de supervivencia en el tiempo y en casi todos los muestreos realizados se alcanza con el caldo Bolton, presentándose valores ligeramente más elevados con agua destilada que con agua de peptona en la mayor parte de los muestreos, pero con la misma viabilidad en el tiempo.

En la Figura 6 se compara la progresión de los resultados de supervivencia en los distintos medios, a 4°C.

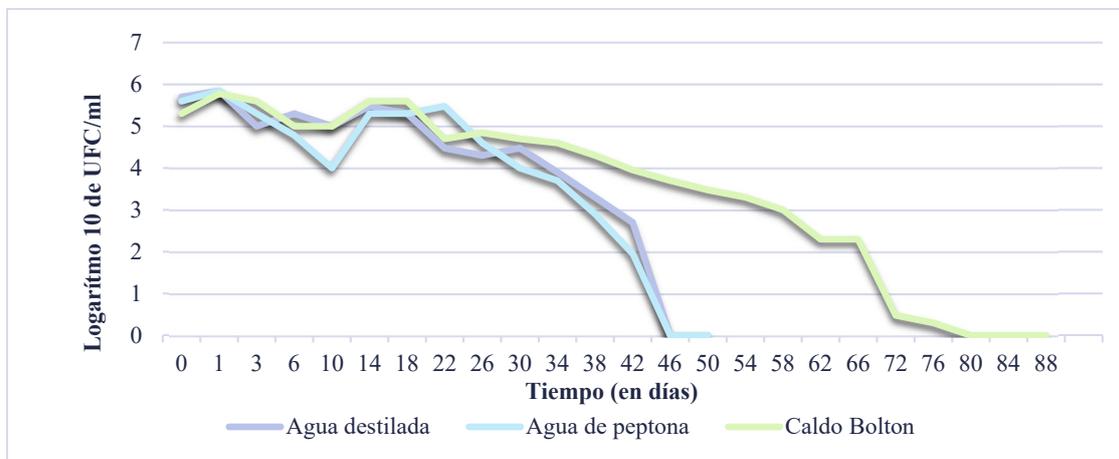


Figura 6. Supervivencia de *C. jejuni* después de la inoculación de los distintos medios, a 4°C.

Tabla 12. Supervivencia de *C. jejuni* en caldo Bolton mantenido a distintas temperaturas, expresada en UFC/ml.

Temperatura de incubación	Tiempo transcurrido (en días)														
	0	1	3	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50
42°C	2x10 ⁵	2x10 ⁶	4x10 ⁷	3x10 ⁶	2x10 ⁵	2x10 ⁴	2x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁶	6x10 ⁶	9x10 ⁵	2x10 ⁵	6x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ³
37°C	2x10 ⁵	4x10 ⁷	4x10 ⁶	1x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T^a ambiente	2x10 ⁵	6x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C	2x10 ⁵	6x10 ⁵	4x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵	5x10 ⁴	7x10 ⁴	5x10 ⁴	4x10 ⁴	2x10 ⁴	9x10 ³	5x10 ³	3x10 ³

Temperatura de incubación	Tiempo transcurrido (en días)									
	54	58	62	66	72	76	80	84	88	92
42°C	2x10 ³	2x10 ⁵	2x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁴	2x10 ⁴	2x10 ²	0	0	0
37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T^a ambiente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4°C	2x10 ³	1x10 ³	2x10 ²	2x10 ²	3	2	0	0	0	0

1.3 Estudios de supervivencia en otros sustratos

La supervivencia de *Campylobacter in vivo* se ve afectada por una amplia gama de factores, entre los que destacan la temperatura, la atmósfera, la matriz de la muestra y la humedad (Smith *et al.*, 2016). En esta parte del estudio se analizó la viabilidad de la cepa de referencia en distintos nichos ambientales de la nave de cría, tratándose de reproducir en el laboratorio las condiciones de la granja, para poder determinar si existían más elementos de variación que condicionaran la supervivencia de *C. jejuni*.

Los resultados obtenidos en una primera prueba se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13. Supervivencia de *C. jejuni* expresada en UFC/ml en agua, pienso y heces, en las condiciones habituales de la explotación y en el laboratorio (1ª prueba).

Muestra analizada	Tiempo transcurrido (en días)		
	0	10	20
Agua			
Mantenida en la granja	7×10^8	0	0
Mantenida en el laboratorio	7×10^8	0	0
Pienso			
Mantenido en la granja	7×10^8	0	0
Mantenido en el laboratorio	7×10^8	0	0
Heces			
Mantenidas en la granja	7×10^8	4×10^8	0
Mantenidas en el laboratorio	7×10^8	8×10^6	5×10^6

Se puede advertir que la supervivencia de *C. jejuni* en el agua y en el pienso, en las condiciones de este estudio, es inferior a 10 días, ya que, tanto en las muestras mantenidas en la granja como en las del laboratorio, el recuento es cero. En el caso de las heces, la viabilidad se mantiene prácticamente igual hasta los 10 días cuando las bacterias se mantienen en la granja, descendiendo 2 unidades logarítmicas si se encuentran en el laboratorio. Sin embargo, a los 20 días, en las heces mantenidas en la granja el

microorganismo no persiste, pero en las del laboratorio el recuento es similar al de la recogida anterior, manteniéndose en 10^6 UFC/ml.

Con el objeto de buscar mayor precisión, se realizó una segunda prueba, en la que se realizó la homogeneización de los sustratos con el inóculo de *C. jejuni*, previamente a la preparación de las distintas alícuotas. Los resultados obtenidos en la segunda prueba figuran a en la Tabla 14.

Tabla 14. Supervivencia de *C. jejuni*, expresada en UFC/ml, en agua, pienso y heces, en condiciones habituales de la explotación y en el laboratorio (2ª prueba).

Muestra analizada	Tiempo transcurrido (en días)					
	0	5	10	15	20	25
Agua						
Mantenida en la granja	3×10^8	0	0	0	0	0
Mantenida en el laboratorio	3×10^8	0	0	0	0	0
Pienso						
Mantenido en la granja	3×10^8	0	0	0	0	0
Mantenido en el laboratorio	3×10^8	0	0	0	0	0
Heces						
Mantenidas en la granja	3×10^8	5×10^7	7×10^6	3×10^2	0	0
Mantenidas en el laboratorio	3×10^8	8×10^7	2×10^6	7×10^4	5×10^2	0

Al igual que en el caso anterior, se confirmó que la viabilidad de la bacteria resultó muy reducida en agua y en pienso, ya que desapareció en su totalidad a los 5 días. Los resultados obtenidos en las heces siguen la misma línea que los del apartado previo, siendo más duradera la supervivencia en las muestras ubicadas en el laboratorio, aunque en este caso la viabilidad observada en el análisis realizado a los 20 días fue visiblemente inferior al del análisis anterior (15 días).

Los resultados mostrados en el agua se corresponden con los observados en la supervivencia en el agua destilada a temperatura ambiente, en los que al igual que en este caso, el microorganismo sobrevivió menos de 5 días. Estos datos se corresponden con los

publicados por Blaser *et al.*(1980) que determinaron una supervivencia de apenas 4 días en agua corriente estéril en autoclave a 25°C y con los de Buswell *et al.*(1998), de una viabilidad de entre 1 y 2 días a temperatura ambiente; sin embargo resultó mucho más baja que los 28 días de viabilidad que obtuvieron Rollins y Colwell (1986).

En el análisis sólo se pudo detectar *C. jejuni* en el pienso en el muestreo realizado en el tiempo cero tras su inoculación con el microorganismo, ya que este material, debido al bajo contenido de humedad y a su baja actividad del agua, no resulta compatible con la supervivencia de *C. jejuni* (Doyle y Roman, 1982b). En estudios anteriores, no se ha detectado el microorganismo en el pienso de pollos (Newell y Fearnley, 2003) y aunque, ocasionalmente se ha documentado la presencia de *C. jejuni* en el pienso de los comederos (Lindblom *et al.*, 1986), este hecho se atribuye a una posible contaminación por regurgitación o por las heces (Shane, 2000).

La supervivencia de *C. jejuni* en las heces osciló entre los 15 días, cuando éstas se mantenían en la granja, y los 20 días en el laboratorio. En ambos casos, se superó el tiempo de viabilidad del microorganismo observado en un estudio anterior, en heces de gallinas ponedoras mantenidas en el laboratorio, en el que a 20°C el microorganismo sobrevivía un máximo de 6 días en heces contaminadas de modo natural y hasta un máximo de 4 días en las contaminadas con un inóculo de 3×10^8 UFC/ml (Ahmed *et al.*, 2013), así como en un análisis de la viabilidad de *Campylobacter* en heces de pollos positivos, en el que el microorganismo sólo sobrevivió 2 días (Berrang *et al.*, 2004). En otras especies, se han detectado tiempos de supervivencia de *Campylobacter* más elevados, de hasta 2 semanas (Inglis *et al.*, 2010).

En esta prueba sólo se detectaron diferencias entre las muestras mantenidas en los dos lugares (granja y laboratorio), en las heces a partir del día 15. Se cree que este fenómeno es debido a que, en el interior de la nave, en determinados días del estudio se produjeron variaciones térmicas, que a largo plazo pudieron afectar a la viabilidad del microorganismo.

1.4 Estudios de supervivencia en medios de transporte

C. jejuni es una especie bacteriana muy sensible a las condiciones ambientales. Se ha demostrado que varios factores, como el oxígeno, la temperatura o la composición

media del medio, podrían afectar su supervivencia durante el transporte (Wang *et al.*, 1983b). Por ello, para garantizar la viabilidad del microorganismo durante su transporte se deben utilizar condiciones particulares y medios específicos (Omurtag *et al.*, 2011), sobre todo cuando se usan hisopos rectales, no solo por la pequeña cantidad de bacterias sino también por su mayor exposición al oxígeno (Palumbo, 1986).

En esta línea, la OIE recomienda que una vez recogidos los hisopos para la determinación de *C. jejuni* en heces de aves, se procesen en un lapso máximo de 2 días, se eviten las temperaturas superiores a los 20°C o inferiores a 0°C, así como se recomienda el uso de un medio de transporte (como Amies, Cary Blair o Stuart) (OIE, 2017).

En este apartado se llevó a cabo un estudio comparativo de recuperación por cultivo de *C. jejuni* para determinar qué medio de los disponibles en nuestro laboratorio y qué temperatura resultaban los más adecuadas para el transporte de las muestras desde las granjas. La primera parte del estudio se realizó utilizando directamente heces recién emitidas por los animales, en las cuales, además de poder portar *C. jejuni*, coexistían otros microorganismos. La presencia masiva de contaminantes en las placas de cultivo impidió la realización del recuento de *C. jejuni*. A pesar de ello, se procedió a la detección molecular de la bacteria mediante PCR, a partir del crecimiento obtenido en las placas tras la inoculación, que resultó positiva en todos los casos (en los cuatro medios de transporte del estudio).

En la segunda parte de la prueba, se utilizaron hisopos con distintos medios, impregnados con un inóculo de *C. jejuni* de título conocido. Las Tablas 15 y 16 muestran los resultados de los recuentos obtenidos, con expresión de los distintos medios (Cary Blair, Stuart, Amies y Amies con carbón) y temperaturas (4 y 20°C).

Tabla 15. Resultados del crecimiento en placa a partir de muestras, en medio de transporte mantenido a 4°C.

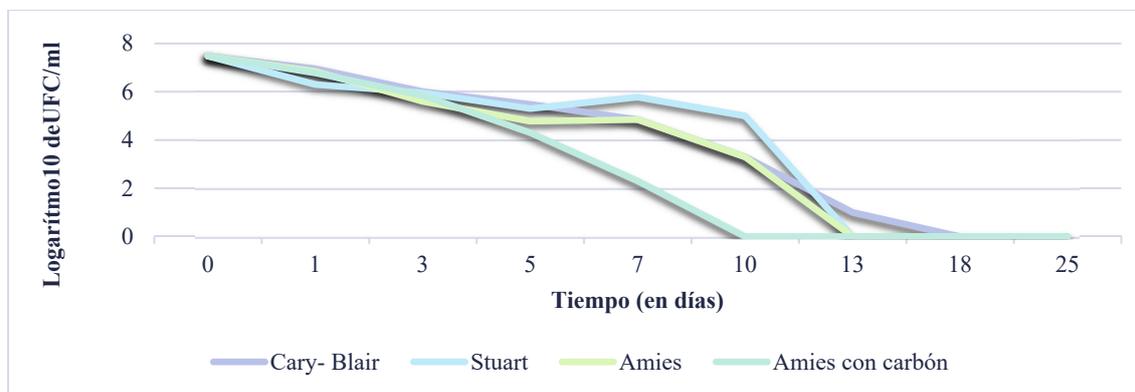
Medio de transporte utilizado	Tiempo transcurrido (en días)								
	0	1	3	5	7	10	13	18	25
Cary-Blair	3x10 ⁷	9x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁵	7x10 ⁴	2x10 ³	4x10 ¹	0	0
Stuart	3x10 ⁷	2x10 ⁶	9x10 ⁵	2x10 ⁵	6x10 ⁵	1x10 ³	0	0	0
Amies	3x10 ⁷	7x10 ⁶	4x10 ⁵	6x10 ⁴	7x10 ⁴	2x10 ³	0	0	0
Amies con carbón	3x10 ⁷	6x10 ⁶	7x10 ⁵	2x10 ⁴	2x10 ²	0	0	0	0

Tabla 16. Resultados del crecimiento en placa a partir de muestras, en medio de transporte mantenido a 20°C.

Medio de transporte utilizado	Tiempo transcurrido (en días)								
	0	1	3	5	7	10	13	18	25
Cary-Blair	3×10^7	9×10^6	1×10^6	7×10^6	6×10^6	2×10^6	3×10^5	1×10^6	0
Stuart	3×10^7	9×10^6	4×10^5	7×10^6	6×10^6	1×10^6	8×10^5	1×10^4	0
Amies	3×10^7	7×10^6	4×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^5	2×10^5	1×10^1	0
Amies con carbón	3×10^7	4×10^5	2×10^5	2×10^6	1×10^6	1×10^5	1×10^4	0	0

Los datos obtenidos reflejan que en todos los medios la supervivencia de *C. jejuni* fue superior a 20°C que a 4°C. Además, al cotejar el título de *C. jejuni* en los diferentes medios y horas, resultó más elevado a 20°C que a 4°C, excepto en dos casos.

Al examinar los datos de supervivencia a 4°C (Figura 7), *C. jejuni* sobrevivió entre 7 y 13 días, dependiendo del medio utilizado, siendo el de Cary-Blair el que más tiempo la preservó (13 días) y el de Amies con carbón el que menos (7 días). Los medios Cary-Blair, Stuart y Amies presentaron crecimientos similares, con ligeras variaciones, en todos los tiempos analizados. Por el contrario, en el medio Amies con carbón, *C. jejuni* mostró una capacidad de viabilidad visiblemente menor que en el resto, a partir del día 5.

**Figura 7.** Supervivencia de *C. jejuni* en medios de transporte mantenidos a 4°C.

En la Figura 8 se observa que, cuando los hisopos se mantienen a 20°C, *C. jejuni* mantiene una viabilidad bastante elevada, cercana a 10^5 UFC/ml, hasta el día 13 en todos los medios, desapareciendo prácticamente en el siguiente muestreo (día 18), en los dos tipos de medio Amies valorados y manteniéndose en similares niveles de supervivencia en los otros dos medios (Cary-Blair y Stuart).

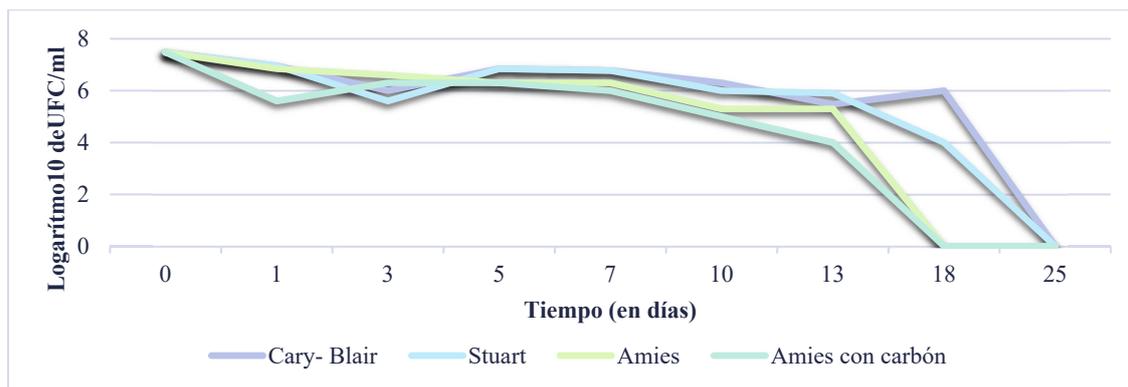


Figura 8. Supervivencia de *C. jejuni* en medios de transporte mantenidos a 20°C.

En este estudio se observaron supervivencias más elevadas en todos los medios a 20°C que a temperatura de refrigeración, por lo que se podría deducir que en principio no parece necesario el transporte a bajas temperaturas para este tipo de muestras, con independencia del medio utilizado para su transporte. Sin embargo, estos datos difieren de lo publicado por otros autores (Wasfy *et al.* 1995), que inocularon muestras de heces con $1,2 \times 10^9$ UFC/ml de *C. jejuni* y las mantuvieron en Cary-Blair a 4 y 25°C. Las muestras almacenadas a baja temperatura permanecieron viables al menos 6 días, mientras que de las otras no se pudo recuperar microorganismos después de 2 días de almacenamiento a 25°C. Tresierra-Ayala *et al.* (2006) analizaron la supervivencia de distintas cepas de *C. jejuni* en un medio de transporte suplementado con antibióticos, y observaron supervivencias similares a temperatura ambiente (entre 5 y 9 días de viabilidad) y a 4°C (entre 3 y 9 días). Estos datos sugieren que es posible que lo que realmente condicione la temperatura óptima del transporte sean las diferencias entre los microorganismos (cepas) y /o los tipos de muestras recogidas pero no los medios de transporte.

No se observaron diferencias importantes entre los distintos medios analizados, excepto en el caso del medio Amies con carbón que, a pesar de la especificidad para prevenir la formación de metabolitos tóxicos que pudieran degradar al microorganismo (Bolton *et al.*, 1984), presentó tasas de supervivencia menores. Aún con todo, se considera que, en nuestro caso, cualesquiera de los medios analizados son aptos para el transporte de muestras desde las explotaciones al laboratorio, ya que los análisis de este trabajo se realizaron en las primeras horas después de la recogida de las muestras y en este periodo todos ellos aportan elevadas viabilidades bacterianas.

II. MODIFICACIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO DE *Campylobacter jejuni*

La microbiota presente en el intestino de los pollos es muy elevada y diversa (Lu *et al.*, 2003) y, al intentar aislar *Campylobacter* del contenido intestinal, los contaminantes con frecuencia exhiben un crecimiento excesivo en las placas, ya que los protocolos de detección actuales no son lo suficientemente selectivos como para inhibir microorganismos inespecíficos (Jo *et al.*, 2017). Hasta el momento, no se ha documentado un medio o método estándar universalmente aceptado para la recuperación de *Campylobacter* (Oakley *et al.*, 2012).

Con el fin de encontrar un procedimiento adecuado para el recuento de *C. jejuni* de las distintas muestras, en esta parte del trabajo se realizaron pruebas con distintos medios de cultivo y diferentes técnicas de filtración, para que, a la vez, fuesen capaces de proporcionar el ambiente adecuado para el crecimiento de *Campylobacter* y de inhibir el desarrollo de los microorganismos contaminantes.

2.1 Medios selectivos para el aislamiento y recuento de *C. jejuni*

2.1.1 Siembra en caldo Bolton enriquecido con distintas combinaciones antibióticas y determinación de la sensibilidad de las colonias

El uso de un caldo de enriquecimiento en la detección de *C. jejuni* es necesario para facilitar el crecimiento inicial de los microorganismos presentes en una muestra, pudiendo además, suprimir las bacterias competidoras que puedan existir en la muestra (Jo *et al.*, 2017). Sin embargo, el enriquecimiento inadecuado en el caso de las muestras más contaminadas, como las heces, puede provocar niveles más escasos de crecimiento de *Campylobacter*, mientras se permite el aumento de la cantidad de contaminantes (Musgrove *et al.*, 2001).

Para mejorar la recuperación de *Campylobacter* durante el enriquecimiento, se han propuesto diferentes modificaciones en los medios utilizados. El caldo Bolton representa uno de los medios de enriquecimiento más utilizados para la detección de

Campylobacter (Chon *et al.*, 2018). Se ha demostrado que el uso de determinados antibióticos puede inhibir el crecimiento de la microbiota competitiva, al tiempo que permite el crecimiento de *Campylobacter* en distintos tipos de muestras (Corry *et al.*, 1995).

Inicialmente, la inoculación en caldo Bolton (suplementado o no) permitió observar la presencia de diferente morfología de colonias, con características macroscópicas diferenciales en las diluciones más altas. Mediante PCR se confirmó la presencia de *C. jejuni* en las colonias sospechosas procedentes de los cuatro caldos utilizados, aunque no se pudo realizar el recuento, debido a presencia abundante de otras colonias de mayor tamaño, que impidieron la identificación de las de *C. jejuni*.

En la primera parte de esta prueba, no se pudo recuperar el microorganismo, a pesar de utilizarse combinaciones de antibióticos específicas para el aislamiento de *Campylobacter* en alimentos. Varios estudios han demostrado la eficacia del enriquecimiento en caldo Bolton para aislar el patógeno de las heces y la basura (Kiehl *et al.*, 2010; Vaz *et al.*, 2014), pero ninguno de ellos, al igual que en nuestro caso, consiguió un cultivo puro.

La eficacia de las distintas combinaciones de antibióticos depende de los contaminantes específicos de la muestra y estos difieren (tanto en número como en especies) entre las muestras procedentes de las heces y de los alimentos, lo que demuestra que los suplementos adecuados para unas no lo sean tanto para otras. Vaz *et al.*, (2014) observaron que en las muestras fecales enriquecidas con caldo Bolton suplementado con cefoperazona, trimetoprima, polimixina B y vancomicina (suplemento antibiótico 3), todas las cepas contaminantes eran *Proteus mirabilis*; sin embargo, en nuestro estudio con esta combinación (caldo Bolton + suplemento antibiótico 3), al igual que en las restantes, se observaron varios tipos de colonias contaminantes, aunque no se identificaron sus microorganismos.

Se realizó un estudio de sensibilidad antibiótica, con el objeto de encontrar alguno que fuese capaz de inhibir el crecimiento de los contaminantes aislados en la prueba anterior y que pudiese ser añadido al medio de enriquecimiento. Para ello se estudiaron antibióticos de uso común en el laboratorio, entre ellos, algunos de los utilizados en los medios selectivos para *Campylobacter*. Los resultados se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de susceptibilidad antibiótica de las distintas cepas (R→resistente, S→sensible, D→dudosa).

Antibiótico	Concentración en el disco	Contaminante 1	Contaminante 2	Contaminante 3	<i>C. jejuni</i>
Polimixina	150 µg	R	R	R	R
Estreptomicina	100 µg	R	R	R	S
Cefalotina	66 µg	R	R	R	R
Vancomicina	5 µg	R	R	R	R
Ampicilina	10 µg	R	R	R	S
Rifampicina	30 µg	R	R	R	R
Bacitracina	40 U	R	R	R	D
Cefoperazona	5,2 µg	R	R	R	R
Trimetoprima	5,2 µg	R	R	S	R
Kanamicina	100 µg	R	R	R	S
Neomicina	30 µg	R	R	R	S
Florfenicol	30 µg	D	S	D	S

Como puede observarse, ninguno de los antibióticos utilizados fue eficaz en la inhibición de los microorganismos indeseables (contaminantes), a las concentraciones probadas, sin que inhibiese el crecimiento de la cepa de *Campylobacter. C. jejuni*, igual que los tres contaminantes, fueron resistentes a polimixina, cefalotina, vancomicina, rifampicina, cefoperazona y trimetoprima, a excepción de la denominada “contaminante 3”, que resultó sensible este último. Esta cepa de *C. jejuni* resultó sensible a estreptomicina, ampicilina, kanamicina, neomicina y dudosa a bacitracina, mientras los contaminante fueros resistentes todos a ellos. En el caso del florfenicol, ninguno de los aislados resultó resistente, apareciendo la cepa de *C. jejuni* sensible a él.

Al igual que en nuestro estudio, otros autores han observado que ciertas cepas de *C. jejuni* eran resistentes a determinados antibióticos, como la polimixina, vancomicina, cefalotina, rifampicina, cefoperazona y trimetoprima (Plastridge *et al.*,

1964; Vanhoof *et al.*, 1978; Karmali *et al.*, 1981). Se han observado diferentes resultados con respecto a la resistencia a la ampicilina (Plastridge *et al.*, 1964). En nuestro estudio la cepa de *C. jejuni* aislada fue sensible a este antibiótico, además de la ampicilina. Por el contrario, mostró poca resistencia a la kanamicina, al igual que lo observado por Karmali *et al.*, (1981) y a la estreptomycin, neomicina y florfenicol, en contraste con lo publicado por otros autores (Sukhapesna *et al.*, 2005; Iovine, 2013; Yang *et al.*, 2019).

Otros investigadores han realizado estudios relativos a la eficacia del enriquecimiento con caldo Bolton para la detección de *Campylobacter* en muestras de heces de pollos (Musgrove *et al.*, 2001; Vaz *et al.*, 2014), obteniéndose mayores tasas de aislamiento cuando se realizaba la siembra directa en placa que cuando se enriquecía previamente; por lo tanto, no se recomienda el enriquecimiento para la detección de *Campylobacter* (Rodgers *et al.*, 2017).

2.1.2 Uso combinado de filtros de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro y medios selectivos (mCCDA, Skirrow, Preston, y CSM)

Campylobacter puede crecer en medios relativamente simples (Corry *et al.*, 1995), pero resulta necesario que contengan compuestos que inhiban el crecimiento de microorganismos competitivos y menos exigentes (Moran *et al.*, 2011). Existen varios medios selectivos utilizados para el aislamiento de estos patógenos en heces, que se pueden dividir en dos grupos fundamentales: medios que contienen sangre y medios que contienen carbón. Los componentes de la sangre y del carbón sirven para eliminar los derivados tóxicos del oxígeno (OIE, 2017). Aunque realmente, la selección en estos medios viene dada por el uso de diferentes antibióticos que inhiben el crecimiento de los contaminantes, a pesar de ello, en ocasiones crecen, lo que dificultan la lectura de las placas (Potturi-Venkata *et al.*, 2007). Por lo tanto, es importante, considerar la capacidad del medio para suprimir el crecimiento bacteriano total, así como para aislar *Campylobacter*, antes de tomar una decisión final sobre un medio selectivo (Kiess *et al.*, 2010).

En este estudio, se trató de aislar *C. jejuni* a partir de heces de pollo utilizando distintas combinaciones de antibióticos, en medios selectivos con sangre como el agar

Preston (Bolton y Robertson, 1982) y el agar Skirrow modificado, así como en medios selectivos con carbón, como el mCCDA (Hutchinson y Bolton, 1984), el agar CBF (Karmali *et al.*, 1986) y uno no selectivo, el agar sangre. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Crecimiento en medios cultivo selectivos por siembra directa y con filtros de celulosa.

Medio utilizado	Siembra directa	Siembra con filtro
mCCDA	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar sangre	Varios tipos de colonias	Varios tipos de colonias
Agar Skirrow	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar Preston sin suplemento antibiótico	Varios tipos de colonias	Varios tipos de colonias
Agar Preston + suplemento antibiótico 1	Varios tipos de colonias	Varios tipos de colonias
Agar Preston + suplemento antibiótico 2	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar Preston + suplemento antibiótico 3	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar CSM sin suplemento antibiótico	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar CSM + suplemento antibiótico 1	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar CSM + suplemento antibiótico 2	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)
Agar CSM + suplemento antibiótico 3	Varios tipos de colonias	Un tipo de colonia (positivo)

En todas las placas se observó el crecimiento de varios tipos de colonias, lo que enmascaraba el crecimiento de *C. jejuni*, no consiguiéndose el objetivo que se buscaba. Para confirmar la presencia de *Campylobacter* entre el crecimiento de las colonias contaminantes, se recogió un asa cargada con colonias de una placa de cada medio probado, se extrajo el ADN y se llevó a cabo una PCR. En todos los casos, los resultados fueron positivos, lo que evidenciaba la presencia de *C. jejuni* en el crecimiento de la placa, pero se puso de manifiesto con claridad la inutilidad del método para realizar recuentos a partir de heces.

A pesar de la presencia de antibióticos específicos para el aislamiento del microorganismo en algunos de los medios comparados, no se encontró ningún medio en el que únicamente se encontrara un único tipo de colonia. Goossens *et al.* (1986), analizaron diferentes medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Campylobacter* en heces (medio Butzler, medio Preston) y en todos ellos observaron la presencia de contaminantes. Otros autores también han observado el mismo problema en aislamientos a partir de heces con distintos medios selectivos (Hutchinson y Bolton, 1984; Steele y McDermott, 1984; Musgrove *et al.*, 2001; Moran *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2014). Esto podría deberse a que estos microorganismos poseen una tasa de crecimiento más lenta que muchas otras especies bacterianas y compiten mal fuera de su nicho intestinal (Musgrove *et al.*, 2001).

Se desconoce cuáles son las especies contaminantes observadas en el estudio. Oakley *et al.*, en 2012, realizaron un estudio de secuenciación de los distintos microorganismos presentes en medios de cultivo específicos para *Campylobacter*, a partir de muestras fecales de pollo, y determinaron que existía variación de los tipos de microorganismos presentes, en función de los medios utilizados, perteneciendo la mayoría de los taxones a unos pocos géneros entre los que se incluían *Proteus*, *Gallibacterium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Parabacteroides* y *Enterococcus*, siendo *Proteus* el más abundante. Vaz *et al.* (2014), en un estudio con diferentes medios selectivos, determinaron que *P. mirabilis* era la principal bacteria competidora en los cultivos de *Campylobacter*. *Proteus mirabilis* es resistente a las polimixinas y generalmente susceptible a las penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos, pero también se sabe que puede adquirir resistencia a determinados antibióticos de estos grupos (Oakley *et al.*, 2012). Se ha comprobado que la presencia de determinados antibióticos incluidos normalmente en los medios selectivos, como cefoperazona, trimetoprima, polimixina B, vancomicina y rifampicina no impide el crecimiento de dicho microorganismo (Vaz *et al.*, 2014).

En esta fase del estudio, se decidió comprobar la eficacia del uso de filtros para intentar mejorar el proceso de aislamiento de *C. jejuni* a partir de las heces, ya que la técnica de filtración por membrana ha permitido la recuperación de aislados de *Campylobacter* a partir de muestras clínicas (Speegle *et al.*, 2009). En la Tabla 18 se presentan los resultados obtenidos.

Para el aislamiento del microorganismo a partir de las muestras fecales se han utilizado diferentes tipos de filtro de celulosa de 0,45-0,65 μm , en ocasiones combinados con medios selectivos (Mégraud, 1987; Bolton *et al.*, 1988; Wilson y Aitchison, 2007). Un tamaño de poro mayor de 0,65 μm permite el aislamiento de más cepas de *Campylobacter* (Bolton *et al.*, 1988), pero también se produce más contaminación de las placas que al utilizar filtros de 0,45 μm (Speegle *et al.*, 2009).

No se pudo realizar el aislamiento de *C. jejuni* a partir de los medios sin suplemento antibiótico, a excepción del agar CSM. Aunque se desconoce la identidad de los distintos tipos de microorganismos presentes en dichas placas, en estudios anteriores también se observó la capacidad de determinadas especies de lactobacilos, estreptococos y coliformes procedentes de las heces para traspasar filtros de 0,45 μm de poro (Steele y McDermott, 1984) en medios no suplementados. Además, se observó un crecimiento de varios tipos de colonias en el agar Preston suplementado con cefoperazona, vancomicina, anfotericina B y trimetoprima (suplemento antibiótico 1), lo que parece señalar que dichos compuestos no son eficaces contra los contaminantes presentes en la muestra.

En la mayoría de los medios selectivos con antimicrobianos se logró el aislamiento exclusivo de *C. jejuni* cuando se utilizaron filtros, lo que determina que la composición antibiótica evita el crecimiento de los posibles contaminantes que pudieran haber traspasado el filtro de 0,45 μm . Wilson y Aitchison, en 2007, también observaron crecimientos aislados de *Campylobacter* al combinar el uso de filtros de 0,45 μm con el agar Preston suplementado (polimixina B, ciclohexamida, rifampicina y trimetoprima) en muestras de heces.

A priori, en este caso no se puede justificar la ausencia de dichos contaminantes en el medio CSM sin suplemento, ni en el mismo medio con el suplemento 1, ya que la presencia de dichos antibióticos en medio Preston no fue capaz de inhibirlos; sin embargo, estos resultados podrían deberse a la composición básica del medio CSM, es decir, que los nutrientes no sean los adecuados para ciertos contaminantes o que en él se produzca la presencia de alguna sustancia inhibitoria para dichos microorganismos. Esto último explicaría la ausencia de otras especies bacterianas en el medio mCCDA, a pesar de que su composición antibiótica (cefoperazona y anfotericina) no resultara eficaz en los medios anteriores, puesto que el desoxicolato sódico es capaz de inhibir bacterias Gram-positivas, coliformes y *Proteus*, que han sido señaladas anteriormente como posible microbiota contaminante en las muestras de heces.

En principio, la combinación de los medios que han resultado eficaces en el aislamiento de *C. jejuni* y el uso conjunto con filtros podría servir de punto de partida para el establecimiento de un procedimiento sencillo, económico y adecuado de recuento de la bacteria en heces.

2.2 Utilización de filtros para el aislamiento de *C. jejuni*

Con los resultados obtenidos en el estudio anterior, resulta evidente que es posible el aislamiento de *C. jejuni* a partir de heces por filtración pasiva, al combinar filtros de 0,45 μm de poro con determinados medios selectivos; sin embargo, el objetivo de este capítulo era proporcionar un procedimiento para el recuento del microorganismo, así que este estudio se centró en comprobar si la selección del microorganismo mediante filtros podía ser usada para estimar los números reales de *C. jejuni* existentes en una muestra.

Para ello, se llevó a cabo un experimento en el que se incorporaron, previa a la siembra en diferentes medios (mCCDA y agar sangre), modificaciones del inóculo filtrado a través de membranas de acetato de celulosa con poros de un diámetro de 0,45 μm . Estos resultados se recogen en la Tabla 19.

Tabla 19. Crecimiento de *C. jejuni*, utilizando diferentes sistemas de filtrado.

Medio utilizado	Siembra directa	Siembra con filtro de celulosa	Siembra utilizando presión positiva (sistema de filtro con jeringuilla)	Siembra utilizando presión negativa (equipo de vacío)
mCCDA	3×10^7	9×10^3	2×10^3	5×10^4
Agar sangre	2×10^7	4×10^4	5×10^3	3×10^4

En ambos medios se partió de un inóculo de 10^7 UFC/ml de la cepa de referencia de *C. jejuni*, que se confirmó con los datos obtenidos en el recuento realizado a partir de la siembra directa de las heces. En la filtración pasiva, la movilidad natural de *Campylobacter* condiciona su paso a través de los filtros y es posible que sólo una parte de las células suspendidas en la preparación de la muestra, lleguen a la superficie del agar a través de los filtros (Speegle *et al.*, 2009). Por ello, se requiere una gran cantidad de

células, cuando se utiliza este método para la detección de *Campylobacter* en una muestra (Wilson y Aitchison, 2007), ya que no queda claro qué porcentaje de células que atraviesa un filtro, produce colonias visibles (Berrang *et al.*, 2017).

En el uso de filtros de celulosa por filtración pasiva, se observó una reducción del crecimiento bacteriano de 3 unidades logarítmicas. Otros autores también han obtenido pérdidas destacadas con este método. Steele y McDermott (1984), calcularon que el 90% de las células eran retenidas por filtros de 0,45 μm , en muestras de heces y Nachamkin *et al.*(1992) determinaron no era posible la detección de *Campylobacter* mediante filtros de 0,45 μm en heces con menos de 10^5 UFC/g.

Se podría pensar que el tiempo de filtración puede influir en los datos anteriores; sin embargo, se ha indicado que, a los 45 minutos, se alcanza un paso máximo de *Campylobacter* a través del filtro sin que exista muerte celular (Berrang *et al.*, 2017), por lo que se cree que es la tasa de retención propia de la matriz del filtro lo que provoca la reducción de recuento. Por otra parte, además de la cantidad de células bacterianas presentes en la muestra, la movilidad también parece influir de modo importante en el paso de *Campylobacter* a través del filtro (Speegle *et al.*, 2009), por lo que, una movilidad reducida de las bacterias contribuiría a aumentar la tasa de retención del filtro, así que con el fin de contrarrestar este efecto y obtener mayores tasas de recuperación bacterianas tras el filtrado, se realizaron pruebas con sistemas de presión positivos, como la filtración con jeringuilla y con sistemas de presión negativos mediante equipos de vacío.

En los recuentos obtenidos en la filtración con presión positiva, con jeringuilla, se observó una reducción de 4 unidades logarítmicas con respecto a la siembra directa, siendo incluso más elevada que la referida a la filtración pasiva. Otros autores han utilizado el método de filtración mediante jeringuilla para el aislamiento de *Campylobacter*. Chon *et al.*, en 2017, compararon este método con la siembra en placa para la detección en muestras de canales de pollo y observaron que el número de células recuperadas era ligeramente mayor en las muestras sin filtrar que en las filtradas, pero sin apreciarse diferencias destacadas entre ellas. Hou *et al.* (2018) determinaron la eficacia de los filtros de jeringuilla de 0,45 μm frente a los filtros de membrana con diferentes tamaños de poro, en la recuperación de un inóculo puro de *C jejuni*. En la filtración mediante jeringuilla se logró una tasa de recuperación de la suspensión bacteriana del 0,29%, la cual fue mayor que las observadas en la filtración pasiva (0,01% y $1,3 \times 10^{-3}\%$, con poros de 0,6 y 0,4 μm , respectivamente).

Cuando se utilizó para la filtración el equipo de vacío, también se observó una reducción respecto al número total de bacterias en siembra directa, obteniéndose valores similares a los observados en la filtración pasiva. No se tiene constancia de que hasta el momento se hayan realizado otros estudios con este método de filtración.

En la comparación entre los medios de cultivo sólidos utilizados en esta prueba, no se observaron diferencias importantes. En este caso, se considera que al ser la muestra de partida un inóculo puro de *C. jejuni* la selección de dichos medios no era necesaria. De hecho, se ha publicado que el agar Brucella e incluso el agar tripticasa soja (TSA) no suplementado con carbón o sangre son igualmente eficientes para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de determinadas muestras (Oyarzabal y Fernández, 2016).

A la vista de los resultados obtenidos en este capítulo no se pudo establecer un método eficaz para el recuento de *C. jejuni*, ya que, con los sistemas comparados, se reducía la viabilidad bacteriana o lo impedía la presencia de contaminantes en la placa.

III. IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRAS Y MUESTREO PARA EL DIAGNÓSTICO DE PORTADORES

La infección por *Campylobacter* en avicultura es un evento multifactorial y los principales factores de riesgo para una colonización eficaz se relacionan con el medio ambiente, el manejo y las propias aves (EFSA, 2011). En este capítulo se determinó la presencia de *C. jejuni* en distinto tipo de muestras procedentes de los animales y del entorno interior y exterior de la nave de cría.

3.1 Comparación entre medios de cultivo

Debido a su importancia en la Salud Pública, existe una necesidad creciente de métodos rápidos y sensibles para la detección e identificación de microorganismos zoonóticos como *C. jejuni* (Lund *et al.*, 2004); del mismo modo, resulta primordial que estos métodos sean simples y económicos, para facilitar su uso generalizado en cualquier laboratorio.

En el caso que nos ocupa, no resulta sencillo cumplir a satisfacción estos condicionantes, ya que, los requisitos exigentes de crecimiento, la taxonomía compleja y las pruebas bioquímicas poco fiables representan desafíos importantes en la identificación de las especies de *Campylobacter* (On, 2001).

La técnica de PCR presenta varias ventajas sobre la Bacteriología clásica y se ha aplicado con éxito a la identificación de *C. jejuni* (Linton *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1997; Vanniasinkam *et al.*, 1999), aunque presenta determinadas limitaciones, que pueden condicionar su utilidad en el caso de las heces, como la presencia de inhibidores en la materia fecal (Inglis y Kalischuk, 2003) o la imposibilidad de obtener suficiente material genético específico para la amplificación.

En cualquier caso, como ya se ha señalado, *Campylobacter* puede crecer en medios relativamente simples, como agar sangre y, además, es posible la detección de *C. jejuni* en este medio a partir de muestras de heces de pollo. El agar sangre es un medio básico ampliamente utilizado de manera rutinaria en laboratorios de todo el mundo y relativamente económico en relación con otros más específicos (Drancourt y Raoult, 2007). Por su parte, mCCDA es uno de los medios de cultivo más utilizados en los

estudios de *Campylobacter*, y el cultivo directo de los contenidos cecales en mCCDA se considera un método de detección eficaz para el microorganismo en los pollos de carne (Rodgers *et al.*, 2017).

Con el fin de disponer de un criterio que permitiera relacionar el método más conveniente, en esta parte del trabajo se llevó a cabo un estudio comparativo entre el agar sangre y el mCCDA para determinar si existía variación en los resultados de la PCR, en función del uso de uno u otro medio para la detección de *C. jejuni*, a partir de heces de pollo.

Los datos obtenidos figuran en la Tabla 20.

Tabla 20. Estudio comparativo de muestras cloacales de pollos de carne, cultivados en mCCDA y agar sangre.

Recogida	Agar sangre		mCCDA	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
1	0	5	4	1
2	2	3	4	1
3	1	4	5	0

Como se puede observar, el número de resultados positivos frente a *C. jejuni* mediante PCR resulta claramente superior cuando se siembra en medio mCCDA que cuando se utiliza agar sangre, detectándose en este último únicamente el 23 % de muestras positivas en relación con las detectadas en el primero. Es importante reseñar que las dos muestras que resultaron negativas lo fueron en ambos medios de cultivo, por lo que se considera que en ellas no estaba presente *C. jejuni*.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, resulta evidente que la siembra en agar sangre reduce las tasas de aislamiento de *C. jejuni* en muestras de heces, en relación con el mCCDA, por lo que no se considera adecuado su uso para la detección de este agente en heces.

3.2 Muestras procedentes de pollos de carne

3.2.1 Influencia de la edad de los animales y la época del año en la presencia de muestras positivas

Para obtener más información sobre las posibles fuentes y vías de infección o contaminación, es decir de averiguar el modo de introducción de *Campylobacter* en las naves, parece importante conocer el momento en que se produce la colonización de las aves (van Gerwe *et al.*, 2009), pues hasta ahora se desconocen con exactitud los factores que influyen en la colonización de *C.jejuni* en los pollos de carne (Awad *et al.*, 2016). A este respecto, vuelve a ser importante conocer las ventajas (o inconvenientes) de los métodos de muestreo de heces para la detección de *C.jejuni* de pollos pues por el momento no existe ninguno estandarizado o que pueda ser considerado referente (Vidal *et al.*, 2013). Para la realización de este estudio se utilizaron tres alternativas para la toma de muestras: recogida directa, uso de calzas absorbentes y extracción cecal, con el objeto de determinar cuál de ellos era más adecuado para la detección de *C. jejuni*.

La Tabla 21 recoge los resultados obtenidos en relación con las muestras positivas y su aparición en función de la edad de las aves y la época del año.

Tabla 21. Edad de aparición de los primeros resultados positivos en las heces, según las distintas estaciones y métodos utilizados.

Tipo de recogida	Edad de los animales (en semanas)																			
	1				2				3				4				5			
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Directa en recipiente estéril	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uso de calzas absorbentes	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracción del contenido cecal de los animales	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

El muestreo con calzas absorbentes se desarrolló como un método simple, económico y fácil de ejecución para la evaluación de la prevalencia de *Salmonella* en las

aves de corral, en las que se ha demostrado que en las salmonelas es hasta 60 veces más sensible que otros métodos convencionales, como la recolección directa de heces (Gradel *et al.*, 2002), por lo que se ha establecido como la técnica de muestreo oficial para las encuestas de referencia de *Salmonella* de la UE pollos de carne. A diferencia de otros sistemas de toma de muestras, como la recogida directa de heces o el análisis del contenido cecal, con el muestreo mediante calzas absorbentes se recoge material fecal de un elevado número de animales, lo que determina en su mayor sensibilidad (Vidal *et al.*, 2013).

En este estudio confirmamos que, del mismo modo que en *Salmonella*, el uso de calzas absorbentes para la detección de *C. jejuni* en la granja resultó más eficaz que las otras dos técnicas. Igual que se ha demostrado previamente por otros autores (Vidal *et al.*, 2013) el procedimiento presenta una mayor sensibilidad al combinarse el uso de calzas con la utilización de medios selectivos para el transporte. Sin embargo, otros investigadores no han apreciado diferencias entre dichos métodos, e incluso han informado de muestreos en los que el microorganismo no era detectable mediante el uso de calzas pero sí con otros métodos, como hisopos cloacales o contenido fecal y cecal (Ingresa-Capaccioni *et al.*, 2015).

En los otros dos procedimientos de muestreo, se observó menor sensibilidad en la detección en el contenido cecal, al no ser posible la detección de *C. jejuni* en una ocasión, mientras que, la recogida directa de heces como por medio de calzas absorbentes sí lo fue, seguramente debido a que la muestra resulta menos representativa, ya que mediante la extracción cecal se analizó el contenido de 10 animales y en la recogida de heces se realizó una mezcla de 50 muestras, correspondientes a 50 animales distintos. Woldemariam *et al.* (2008) observaron que la sensibilidad de detección de *Campylobacter* en broilers mediante cultivo de heces fue inferior a la obtenida por cultivo cecal. Tal diferencia fue atribuida en parte a la mayor prevalencia natural del microorganismo en el ciego y también al posible “daño” sustituido por las bacterias, debido al mal manejo de las muestras fecales (Woldemariam *et al.*, 2008).

Influencia de la edad.- No se sabe el motivo, pero parece una evidencia que la colonización de los pollitos está relacionada con la edad (Stas *et al.*, 1999), puesto que la mayoría de las manadas se colonizan a partir de la segunda o la tercera semana de vida (Shreeve *et al.*, 2000; Cawthraw y Newell, 2010), permaneciendo después colonizados durante toda su vida productiva (Sahin *et al.*, 2002). En esta línea, la detección de *C.*

jejuni en este estudio, adopta un patrón lógico, relacionado con la edad de los animales. En todos los muestreos los resultados positivos se obtuvieron a partir de la segunda (calzas absorbentes) o tercera semana de vida (contenidos cecales y heces), sin obtenerse resultados positivos anteriores a los 14 días de vida de los animales, al igual que otros autores (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Evans y Sayers, 2000; Bull *et al.*, 2006; Gormley *et al.*, 2014). Además, a partir de dicha colonización, se confirmó la persistencia de *C. jejuni* mediante todos los métodos de toma de muestras valorados, confirmándose su presencia en el intestino de los animales durante todo el ciclo, incluso en especies con un periodo de cría superior al de los broilers, como en este caso. Dicha persistencia podría deberse a un aumento de la probabilidad de infección conforme aumenta la edad de los animales, ya que a más longevidad mayores son las probabilidades a posibles fuentes de contagio.

Junto con la edad, otros condicionantes de la colonización de los pollos de carne por *Campylobacter* son el área geográfica y la estación climática (Kapperud *et al.*, 1993). La mayoría de los estudios realizados en el norte de Europa han revelado que resulta más probable la presencia *C. jejuni* en los lotes de pollos en meses cálidos (EFSA, 2005; Ellerbroek *et al.*, 2010) aunque, en otros estudios no se detectó esa influencia estacional (Humphrey *et al.*, 1993).

En nuestro estudio, a la vista de los resultados obtenidos en los diferentes muestreos, se podría señalar que no existieron diferencias destacadas en la persistencia de *C. jejuni* entre las distintas estaciones del año, si bien en otoño *C. jejuni* no pudo ser detectada por ninguno de los métodos, hasta la tercera semana, mientras que en el caso del contenido cecal no se observaron valores positivos hasta la cuarta, lo que podría reflejar una menor prevalencia del microorganismo en esa estación. En las demás estaciones, *C. jejuni* se detectó partir de la segunda semana, en el muestreo realizado con calzas absorbentes, y a partir de la tercera en los otros dos procedimientos. En otros estudios realizados en nuestro país; Urdaneta (2016), no observó asociación entre la prevalencia de *Campylobacter* y la estación climática, pero Torralbo (2013) si determinó que, los meses de otoño representaban aparentemente menos riesgos para la infección de los broilers. Aunque no se conoce a qué se deben estas diferencias entre los distintos periodos, podría deberse a la presencia habitual, en estos periodos más cálidos, de moscas, que podrían actuar como vectores de este microorganismo (Nichols, 2005).

3.2.2 Prevalencia de *C. jejuni* en pollos de carne

Un punto clave para reducir la prevalencia *C. jejuni* en aves de corral durante la producción pasa por el mejor conocimiento de los factores aviarios y bacterianos de colonización (Bailey *et al.*, 2018).

En los sistemas habituales de producción de pollos de carne, se ha demostrado que, después de la infección, *C. jejuni* alcanza muy rápidamente altas concentraciones en el ciego y es eliminado con las heces (Wassenaar *et al.*, 1993). Una vez que se produce la colonización, la transmisión del microorganismo tiene lugar de forma fácil y rápida dentro de la explotación, debido a los altos niveles de excreción del microorganismo con las heces (Shreeve *et al.*, 2000b) y a determinados hábitos de estos animales, como la coprofagia (Gormley *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2019). En tales condiciones, si *C. jejuni* contagia precozmente la manada es probable que en el momento de su sacrificio un gran número de los pollos se encuentren colonizados, llegándose a prevalencias cercanas al 100% (Stern *et al.*, 2001); sin embargo, la prevalencia de los casos positivos también depende del tamaño del lote y del tipo de sistema de producción (Newell y Fearnley, 2003). Además, se ha demostrado que la cinética de colonización en los pollos de carne puede verse influida, entre otros factores, por la raza de los animales (Han *et al.*, 2016).

Debido a las diferencias existentes entre los animales de nuestro estudio con los broilers, no resulta posible asegurar que el comportamiento de *C. jejuni* en este tipo de animales sea similar, en términos de tasa de incidencia del microorganismo en la explotación, a los descritos en investigaciones anteriores, por lo que, se consideró relevante determinar la posible variación de la prevalencia de *C. jejuni* en momentos concretos: al final del primer tercio de su ciclo de vida, una vez confirmada la colonización de los animales (23 días); al final del segundo tercio (46 días) y al final de su ciclo productivo o previo al sacrificio (69 días). Los resultados obtenidos en el muestreo con escobillones cloacales en broilers, se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de los animales muestreados en distintos momentos del ciclo.

Día de recogida	Nº de muestras	Nº de muestras positivas	% de casos positivos
23	30	25	83,3
46	30	24	80,0
69	30	26	86,7

Como se puede observar, los animales positivos a *C. jejuni* en los distintos momentos de los muestreos fueron bastante elevados en los tres casos y las diferencias entre ellos resultaron pequeñas, variando en porcentajes de entre el 80 y el 87% de casos de positivos, aproximadamente.

A los 23 días de vida (1^{er} tercio) se observaron resultados positivos del 83,3%. En pruebas anteriores se determinó que la colonización se producía en torno a la segunda semana de vida; por lo tanto, el periodo entre la primera infección y estos valores positivos en heces es relativamente corto. En este estudio, se pudo confirmar, por tanto, que al igual que lo observado en otros tipos de pollos de carne (Gregory *et al.*, 1997; Evans y Sayers, 2000; Pérez-Arnedo y González-Fandos, 2019), una vez que se producía la colonización de la manada, se propagaba muy rápidamente entre los animales.

En el segundo muestreo (46 días), la tasa de incidencia de *C. jejuni* fue del 80%. Si estimamos la prevalencia en función de la edad de los animales estos datos se encuentran también dentro del rango observado en otros estudios similares, que señalan prevalencias superiores al 80% al final de su vida productiva (Shreeve *et al.*, 2002; Stern y Robach, 2003; Hansson *et al.*, 2010b). Por lo tanto, en este caso tampoco se observaron diferencias importantes en las prevalencias entre estos animales y otras razas y tipos de producción.

En los días previos al sacrificio, los valores positivos del rebaño fueron del 86,7%. Colles *et al.* (2011) determinaron que las altas tasas de incidencia de *Campylobacter* en heces de pollos de carne convencionales o broilers, al final de su vida productiva, eran debidas básicamente a que la edad del sacrificio coincidía con el periodo de mayor prevalencia, pero que posteriormente dichas tasas se reducían drásticamente. Dichos autores atribuyeron esta reducción a la madurez inmunológica de los animales de mayor edad; sin embargo, en nuestro estudio no se observó dicha disminución. Estas variaciones en la persistencia de la prevalencia podrían deberse a la cepa colonizante, ya que se ha demostrado que existen tres tipos de fenotipos de cepas, en función de su capacidad de colonización y persistencia en los animales (Hermans *et al.*, 2011).

En cuanto a la evolución de la persistencia de *C. jejuni* a lo largo de la crianza, se observaron únicamente pequeñas variaciones porcentuales en los tres tiempos analizados. Esta diferencia en el porcentaje se correspondió con una mínima variación de

animales positivos en estos muestreos (25, 24 y 26, respectivamente), por lo que se consideró que no existían variaciones de la prevalencia a lo largo del ciclo.

No obstante, en otros estudios también se han demostrado ligeras variaciones en la excreción de *Campylobacter* en heces de pollos. Esta variación podría deberse a que en estos animales se producía una excreción intermitente del microorganismo, posiblemente relacionada con el vaciado cíclico del contenido cecal (Udayamputhoor *et al.*, 2003). Si asumimos esta posibilidad y consideramos que la contaminación de las heces de los animales portadores de *C. jejuni* es discontinua, se podría concluir que la prevalencia del microorganismo en el aparato digestivo de los pollos sería más elevada que la observada aquí; por lo tanto, *C. jejuni* colonizaría a la práctica totalidad de la manada en muy poco tiempo, permaneciendo viable en los animales y con capacidad infecciosa durante toda su vida.

3.2.3 Muestras del aparato digestivo de los animales

La colonización exitosa del tracto gastrointestinal de las aves de corral por *Campylobacter* es un proceso con implicación de múltiples factores, cuya importancia relativa aún no está clara; sin embargo, la dinámica de la población de el microorganismo dentro de los animales infectados todavía no se conoce bien (Hermans *et al.*, 2011) .

Cuando *C. jejuni* accede al intestino de los pollos de carne, la bacteria alcanza el ciego y una vez allí se multiplica, dando como resultado una población colonizadora establecida dentro de las 24 horas posteriores a la entrada (Coward *et al.*, 2008). Se cree que una vez allí, el microorganismo se disemina por el tracto gastrointestinal inferior, localizándose principalmente en las criptas cecal y cloacal (Beery *et al.*, 1988).

Para esclarecer la relevancia de las distintas partes del tubo digestivo en la colonización y persistencia de *C. jejuni* en los pollos de carne, en este punto se determinó la prevalencia del microorganismo en distintas partes del aparato digestivo de los pollos y en diferentes momentos del ciclo de producción.

La Tabla 23 resume los resultados obtenidos a partir de muestras del aparato digestivo de los pollos (buche, ciego y colon).

Tabla 23. Porcentaje de los animales positivos en el muestreo de los distintos lugares del aparato digestivo.

Zona del aparato digestivo analizada	Edad de los animales (en días)				
	0	10	20	30	40
Buche	0	0	0	20	60
Ciego	0	0	60	90	100
Colon	0	0	40	70	100

Se puede observar que los animales son portadores *C. jejuni* a partir del día 20 del ciclo, aumentándose la proporción de animales positivos a medida que transcurre el tiempo. Dichos datos coinciden con resultados obtenidos en puntos anteriores, mediante los cuales se confirma que la colonización de los animales se produce a partir de la segunda semana de vida. Además, se puede apreciar que, a diferencia con las partes distales del aparato digestivo, en el buche no se recupera la bacteria en ninguno de los animales hasta el día 30, esto refuerza la hipótesis anteriormente citada de que el microorganismo en primer lugar se disemina por el tracto digestivo inferior.

El mayor porcentaje de positivos en todos los muestreos se recoge en el ciego, observándose porcentajes del 60% a partir de los 20 días de vida, y cercanos al 100% en los siguientes muestreos (el día 30, el 90% de animales positivos y el día 40, el 100%, respectivamente). Los recuentos a partir de contenido en colon resultan más bajos en las primeras semanas, observándose un 40% de animales portadores el día 20 y un 60% el día 30, aunque a día 40 los datos son iguales a los obtenidos en ciego (100%). Esta disparidad entre ambas zonas se corresponde con la encontrada por Beery *et al.* (1988), que después de una infección experimental en pollitos *C. jejuni* fue recuperado de un 55% de las muestras de ciego y de un 35% de las de intestino distal y cloaca.

En la bibliografía consultada no existen datos de prevalencias temporales de el microorganismo en estas localizaciones, sin embargo, estos mismos autores (Beery *et al.*, 1988) determinaron que *C. jejuni* parece colonizar el moco, preferentemente dentro de las criptas cecales y cloacales, sin adherirse a la superficie de la cripta y en estudios *in vitro* Hugdahl *et al.* (1988), observaron que la mucina puede servir como un único sustrato para el crecimiento de la bacteria; lo que podría favorecer el aumento progresivo del microorganismo en estas zonas y por tanto de las tasas de animales positivos.

En contenido de buche no se recupera en ninguno de los casos la misma cantidad de bacteria que en contenidos de partes más distales del aparato digestivo, llegándose a detectar la bacteria únicamente en el 60% de los animales que resultaron positivos en las otras zonas en el día 40 y observándose tasas de prevalencia de sólo el 20% en el día 30, mientras en ciego y recto eran del 90 y del 70% respectivamente. Otros autores (Byrd *et al.*, 1988) han determinado incidencias similares de *Campylobacter* en buches pollos comerciales a la edad de sacrificio, sin embargo, en este caso el porcentaje de positividad en heces resultó ser muy inferior al del contenido en buche (4% frente al 62%).

Se puede observar que los animales son portadores de *C. jejuni* a partir del día 20 del ciclo de producción, aumentando esa proporción conforme transcurre el tiempo. Se recogieron porcentajes más altos de positivos en todos los muestreos, con valores superiores al 50%, a partir de los 20 días de vida, y cercanos al 100% en los siguientes muestreos (días 30 y 40). Resultaron ligeramente más bajos los recuentos a partir del contenido en colon, ya que, aunque el día 40 los datos fueron similares a los obtenidos en el ciego, en muestreos anteriores resultaron inferiores. Por último, en el contenido del buche no se recuperó nunca la misma cantidad de microorganismos que en las partes más distales del aparato digestivo, llegándose a detectar solamente en el 60% de los animales que resultaron positivos en las otras localizaciones corporales.

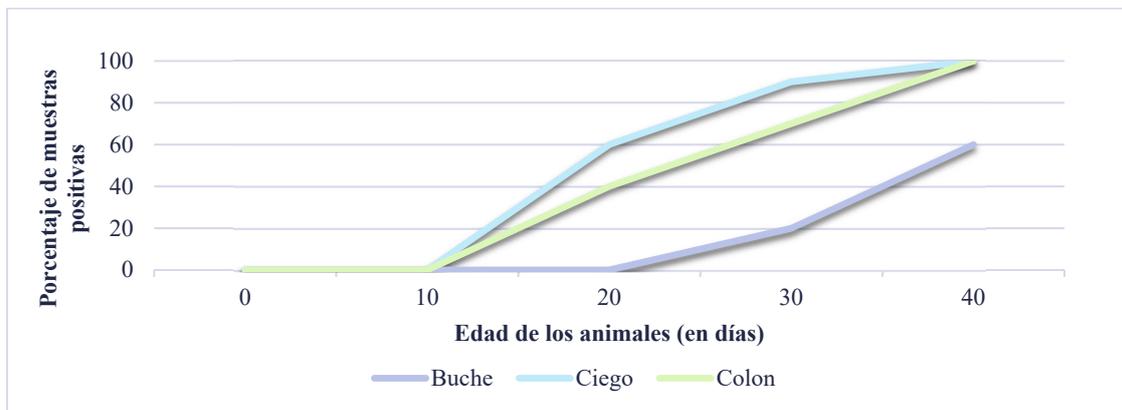


Figura 9. Porcentaje de animales positivos en el muestreo de los distintos lugares del aparato digestivo.

A la vista de estos resultados se puede deducir que, aunque la colonización del lote se produce anteriormente al día 20 de vida, hasta al menos el día 40 no se produce un crecimiento masivo en las partes distales del aparato digestivo de los animales, consideradas como las zonas posibles de crecimiento del microorganismo, ni en la totalidad de las aves del lote.

3.3 Muestras ambientales

A pesar de que *C. jejuni* no puede multiplicarse fuera de un hospedador animal y responde mal al estrés ambiental (Huang *et al.*, 2009), se ha demostrado que puede persistir en el entorno de las granjas de pollos infectados en distintas matrices (Jones, 2001; Keener *et al.*, 2004), pudiendo actuar como vector de transmisión del patógeno a las aves.

3.3.1 Muestras de origen fecal

Las heces constituyen una de los vehículos más importantes de transmisión de *C. jejuni* entre los animales dentro de las naves, una vez que se ha producido la colonización (Shreeve *et al.*, 2000b). Además del importante papel que estos sustratos pueden representar en la transmisión entre las aves debido a la elevada capacidad de supervivencia del microorganismo en ellas (Inglis *et al.*, 2010), si el manejo no es el adecuado podrían participar en la transmisión de la infección entre lotes, al contaminar el ambiente, tanto interior como exterior de las granjas (Smith *et al.*, 2016).

En esta prueba se determinó la prevalencia de *C. jejuni* mediante el porcentaje de muestras positivas, en diferentes estados o formatos de la materia fecal y en materia la orgánica en la granja durante un ciclo productivo. Los resultados obtenidos figuran en la siguiente Tabla 24.

Tabla 24. Porcentaje de muestras positivas en distintos días de recogida a lo largo del ciclo de crecimiento de pollos de carne.

Día de recogida	Heces frescas	Heces antiguas	Materia orgánica
23	80	80	60
46	100	80	40
69	100	100	60

En las muestras de heces frescas, se pudo verificar que la cantidad de muestras positivas al microorganismo era muy elevada en todos los muestreos y que a medida que progresaba la crianza, el porcentaje de eliminadores fecales de *C. jejuni* iba aumentando,

resultando prácticamente la totalidad de las muestras positivas a partir del día 46. Salvo ligeras variaciones, atribuidas principalmente a los distintos métodos de muestreo, estos datos se corresponderían con los resultados de prevalencia observados en los apartados anteriores de este capítulo (2.2 “muestreo con hisopos cloacales” y 2.3 “contenido fecal en el recto”).

En los resultados obtenidos en heces antiguas, sucedió lo mismo que en el caso anterior: al aumentar la edad de los animales aumentaba el porcentaje de heces positivas y/o de supervivencia bacteriana en ellas, aunque en menor medida, ya que en el día 46 sólo resultaron ser positivas el 80% de las muestras, mientras que en el caso anterior (heces frescas) se alcanzó el 100%.

En relación con la materia orgánica recogida próxima a las heces, en la detección de *C. jejuni* no se observó un incremento a lo largo de la vida de los animales, ya que en el primero y en el último muestreo (días 23 y 69) se detectó *C. jejuni* en el 60% de las muestras, pero dicho porcentaje se redujo hasta el 40% en el segundo (día 46). A diferencia de los casos anteriores, en este sustrato no se advirtió un incremento del número de muestras positivas a lo largo del ciclo.

La cantidad de materia seca presente en la muestra determinó la capacidad de supervivencia del microorganismo, debido a que *C. jejuni* no posee mecanismos osmoadaptativos eficaces (Cameron *et al.*, 2012), lo que provoca una baja resistencia a la desecación (Hernández Haba y Hernández Giménez, 2007). Se estima que el porcentaje de contenido seco en las heces de aves de corral es del 25-30%, mientras que el de la materia orgánica de la cama de las naves de cría estaría en torno al 70% (Smith *et al.*, 2016). Estas diferencias de humedad justificarían la menor tasa de resultados positivos en las muestras de materia orgánica, así como el menor porcentaje obtenido en el segundo muestreo de heces antiguas, en comparación con los de heces frescas, recién emitidas.

La elevada cantidad de muestras positivas de origen fecal para *C. jejuni*, obtenidas en este estudio, junto con la alta capacidad de supervivencia del microorganismo en las heces corroborada previamente en estudios de laboratorio (capítulo I apartado 3), sugiere que estos sustratos podrían actuar como vehículos del microorganismo entre diferentes lotes de animales. Para evitarlo, se debería actuar a varios niveles: la implantación de indicaciones de trabajo diario adecuados (por ejemplo, el uso exclusivo de determinados utensilios, ropa y calzado para cada nave), el

establecimiento de protocolos estrictos de limpieza y desinfección de la nave entre los diferentes lotes y, finalmente, el manejo adecuado de los productos de desecho (por ejemplo, la no utilización directa de la cama como abono).

3.3.2 Otras muestras ambientales

Se ha descrito que el mayor riesgo de contaminación de los lotes de pollos por *Campylobacter* era la contaminación del ambiente de la granja (tanto dentro como fuera de las naves), posiblemente debido a una limpieza y desinfección insuficientes o ineficaces (Agunos *et al.*, 2014). En este estudio se tomaron muestras ambientales de distintas zonas de la explotación de pollos de carne, para determinar la presencia de *C. jejuni*.

➤ **Agua potable del interior y del exterior de la nave.** No se encontró ninguna muestra positiva a pesar de que el agua potable se ha postulado como uno de los principales factores de riesgo para la colonización del lote (Smith *et al.*, 2016), *C. jejuni* solo se recuperó ocasionalmente del suministro de agua en las granjas colonizadas (Kapperud *et al.*, 1993). Esta aparente discrepancia puede explicarse por la presencia de células viables pero no cultivables en el agua (Rollins y Colwell, 1986)

➤ **Aguas estancadas en el exterior de la explotación.** Tampoco se observó ninguna muestra positiva. Otros autores han confirmado la presencia del microorganismo en charcos cercanos a las granjas tanto cuando los pollos eran portadores como cuando no lo eran (Herman *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2006b).

➤ **Polvo del interior y del exterior de la nave.** No se detectó *C. jejuni* en ninguna de las muestras de polvo, tampoco Schets *et al.* (2017) lo detectaron al recoger este material mediante esponjas humedecidas en agua de peptona.

➤ **Pienso y superficies de comederos.** En ninguno de los muestreos realizados se detectaron muestras positivas. Diversos estudios apuntan que los piensos de los animales no suponen un reservorio para *C. jejuni* (Gregory *et al.*, 1997; Evans y Sayers, 2000), puesto que este alimento resulta demasiado seco (Doyle y Roman, 1982b).

➤ **Superficies de bebederos.** En este caso, se detectó un caso positivo en la cuarta semana de vida de los animales, sin obtenerse ninguno más durante el estudio. Es

posible que este resultado fuera debido a que con esta muestra se arrastrase parte de materia orgánica cercana, dado que sólo uno de los hisopos de las 60 muestras de este tipo recogidas resultó positiva. Sin embargo, Evans y Sayers (2000) también detectaron *Campylobacter* en bebederos sin limpiar, tras la desinfección, por lo que es probable que el ambiente húmedo y la presencia de restos orgánicos favorezca la supervivencia de la bacteria.

➤ **Monos y botas de trabajo.** No se detectaron muestras positivas en los monos de trabajo; en cambio, todas las muestras de las botas resultaron positivas a partir de la tercera semana de vida, coincidiendo este momento con los casos positivos de las muestras de heces a *C. jejuni* en otros muestreos, como la recogida directa de heces o calzas, el hisopado rectal, etcétera. Estos datos coincidieron con los observados en otros estudios (Annan-Prah y Janc, 1988; Gregory *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2013).

No se sabe si la presencia de *C. jejuni* en las botas de trabajo supuso la introducción del microorganismo en la nave o contribuyó a su propagación dentro de ella y hacia el exterior. A la vista de los resultados, resulta evidente que la limpieza periódica y la desinfección eficaz de las botas de trabajo podría reducir el riesgo de colonización de los pollos, ya que éstas se presentan como los vectores de transmisión más frecuente e importante a la manada desde las heces (Ramabu *et al.*, 2004).

De este tipo de muestras ambientales, no se ha obtenido ningún resultado positivo a *C. jejuni* en el interior de la nave, anterior a la colonización de la nave, lo que coincide con lo publicado por otros autores (Evans y Sayers, 2000b; Cardinale *et al.*, 2004; Bull *et al.*, 2006b).

Sin embargo, a pesar de la importancia del ambiente en la transmisión de *Campylobacter* a los pollos destacada en la bibliografía, la mayor parte de las muestras (excepto en las de tipo fecal y en las de materia orgánica), fueron negativas, incluso cuando previamente se había demostrado la presencia del microorganismo en otro tipo de muestras como, por ejemplo, en las heces. Esto podría deberse en parte a la baja sensibilidad que presentan las técnicas convencionales de muestreo en este tipo de muestras (Olsen *et al.*, 2009), por lo que no podría excluirse la posibilidad de que no pudieran ser detectadas pequeñas cantidades de *C. jejuni* en las muestras, por la metodología utilizada en este estudio.

IV. PRESENCIA DE *Campylobacter jejuni* EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES

La presencia de animales en las inmediaciones de las instalaciones se considera como un factor importante en el aumento de la prevalencia del microorganismo en las granjas de pollos (Hansson *et al.*, 2010a). Por lo tanto, determinadas especies animales domésticas o silvestres podrían suponer una fuente potencial de contaminación para las aves (Kapperud *et al.*, 1993), bien como transmisores directos o como transmisores pasivos, mediante la difusión de material contaminado con heces (Hald *et al.*, 2000).

Así pues, el conocimiento de la presencia de *C. jejuni* en distintas especies animales y su relación con otros animales portadores podría aportar información sobre la forma de transmisión del microorganismo a las aves. Por esa razón, en este estudio se determinó la prevalencia de *C. jejuni* en distintos grupos de animales localizados en el entorno de pollos o gallinas positivas.

4.1 Muestreo en distintos sistemas productivos

Las aves constituyen el principal reservorio de *Campylobacter* (Young *et al.*, 2007). Dentro de ellas la presencia de *C. jejuni* en los broilers constituye el principal riesgo de transmisión a humanos (Shane, 1992). Existen pocos datos, sin embargo, del papel que podrían desempeñar otros individuos de la misma especie, como es el caso de gallinas, gallos o pollos de corral, en la transmisión del patógeno.

En este trabajo, estudiamos la prevalencia de *C. jejuni*, mediante hisopado cloacal, de distintos grupos de individuos de la especie *Gallus gallus domesticus*, en varias explotaciones de diversas características de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, cuyos resultados se recogen en la Tabla 25.

La producción de aves de consumo puede realizarse de forma intensiva, con un sistema cerrado, controlado y con alta densidad de aves en el medio, o puede hacerse de forma abierta o ecológica, donde los animales disponen de un terreno al aire libre por el que moverse más o menos libremente. Se ha demostrado que la cría de aves de corral en libertad podría estar asociada con unas altas tasas de infección por *Campylobacter* (Economou *et al.*, 2015). En este estudio, tanto los gallos muestreados como los pollos se

encontraban en este tipo de sistema productivo, alojados en recintos similares y con la única diferencia entre ellos de la edad.

Tabla 25. Resultados del estudio sobre portadores de *C. jejuni* en diversos grupos de aves.

Grupo de animales	N° de animales muestreados	N° de animales positivos	Porcentaje de animales positivos
Explotación industrial			
Pollitas de recría (Villalón de Campos)	40	40	100
Explotación familiar			
Gallinas ponedoras (Aranda de Duero)	60	60	100
Explotación docente: en jaulas			
Gallinas ponedoras (Soria)	29	27	93
Animales reproductores (Soria)	8+2	8+2	100
Explotación docente: ecológicos			
Gallos mayores de un año (Soria)	9	9	100
Pollos de 6 meses a un año (Soria)	12	12	100
Pollos menores de 6 meses (Soria)	14	14	100

➤ **Pollos de corral.** En los animales analizados se obtuvieron resultados del 100% de prevalencia de *C. jejuni*, independientemente de su edad. Aunque no se poseen datos de prevalencias dentro del lote, algunos estudios anteriores han estimado que en los sistemas de producción ecológicos de pollos aparecen mayores tasas de prevalencia de *Campylobacter* que en las granjas convencionales (100% frente a un 36,7%) (Heuer *et al.*, 2001). Estos resultados podrían deberse a que en este tipo de cría se produce una mayor exposición a diferentes agentes ambientales, que podrían actuar como fuente de infección continua para los animales.

➤ **Gallos.** Todos los animales muestreados resultaron positivos a *C. jejuni*. No se conocen estudios similares que hayan analizado la presencia del microorganismo en este tipo de animales, pero se cree que, al igual que ocurre en el caso de los pollos de corral, el tipo de cría y su edad (superior a un año en todos los casos) justificaría esta elevada prevalencia de la bacteria.

➤ **Gallinas ponedoras y pollitas de recría.** Para la determinación de la prevalencia en este tipo de animales, se muestrearon tres explotaciones con distintas características de manejo y edades diversas. En todas ellas los animales presentaron porcentajes muy elevados de casos positivos frente a *C. jejuni* en muestreos mediante hisopado cloacal: 100% de prevalencia en las granjas de Villalón de Campos y Aranda de Duero y 93% en Soria. Otros autores han detectado prevalencias inferiores: Doyle (1984) determinó que en este tipo de gallinas alojadas en jaulas individualmente, la máxima prevalencia de *C. jejuni* era del 25%, manteniéndose la colonización durante al menos 42 semanas, mientras que Cox *et al.* (2009) observaron valores positivos del 20 al 70% en animales de entre 11 y 15 semanas de vida. En nuestro caso, los animales de Villalón de Campos contaban con una edad no superior a 16 semanas, pero a diferencia del estudio de Doyle (1984) permanecían alojados en grupos, lo que pudo favorecer la transmisión entre ellos. Este tipo de alojamiento en grupos se repitió en las otras dos explotaciones, siendo los animales muestreados de diversas edades, en su mayoría con más de 52 semanas de edad, lo que podría justificar estas tasas. Las gallinas ponedoras infectadas excretan regularmente grandes cantidades de *C. jejuni* con sus heces (Ahmed *et al.*, 2013); por lo tanto, según las altas tasas de casos positivos obtenidos en este estudio, se podría deducir que estos animales podrían representar un reservorio de la infección dentro de la manada y para los animales cercanos.

➤ **Animales reproductores.** Los animales de este grupo (8 hembras y 2 machos) resultaron positivos en un 100%. Buhr *et al.* (2002) también obtuvieron tasas muy elevadas de *Campylobacter* en heces de hembras reproductoras comerciales, mantenidas en corrales (100%) y en jaulas (64%) de entre 60 y 64 semanas de vida. Colles *et al.*, (2011) observaron una prevalencia del 88% en un lote compuesto por machos y hembras de 11 semanas de edad, criados en corrales interiores. A la vista de estos estudios, la edad o el tipo de alojamiento pueden influir aparentemente en la colonización. En nuestro caso, no se conocía la edad concreta de los animales, ya que, debido al carácter no comercial de la explotación, las aves iban siendo sustituidas aleatoriamente. Con respecto al alojamiento en el que se encontraban los animales, parece ser que la ubicación en las jaulas no redujo la tasa de colonización.

Según estos resultados, se puede advertir que en las tres explotaciones (Villalón de Campos, Aranda de Duero y Soria) la tasa de casos positivos frente a *C. jejuni* de los animales fue muy elevada, pudiéndose confirmar que, en estas explotaciones de aves

positivas, el porcentaje de portadores podría alcanzar con facilidad la totalidad del censo de la nave.

4.2 Muestreo en otras especies animales

A pesar de que *C. jejuni* se localiza principalmente en el tracto intestinal de las aves, este microorganismo se encuentra muy difundido en la naturaleza, bien adaptado a varias especies animales (Sahin *et al.*, 2017), pudiendo actuar algunas de ellas como reservorios del microorganismo (Ellis-Iversen *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012). En este estudio se analizó la prevalencia de *C. jejuni* en diferentes animales que se hallaban en el entorno de aves positivas.

Los resultados obtenidos del muestreo se recogen en la Tabla 26.

Tabla 26. Estudio sobre la presencia de *C. jejuni* en distintos animales.

Animales	n° de animales muestreados	n° de animales positivos	Porcentaje de animales positivos
Aves silvestres (gorriones)	10	0	0
Ratones sinantrópicos	10	0	0
Perros	6	0	0
Gatos	10	4	40
Cobayas	1	0	0
Conejos	4	0	0
Palomas	5	0	0
Pavo real	1	0	0
Faisanes	2	1	50
Ocas	4	3	75
Patos	10	7	70
Codornices	10	7	40
Cabras	4	2	50
Ovejas	17	7	41

➤ **Ratones sinantrópicos.** En estos animales se ha demostrado una fácil colonización y recuperación en heces de *C. jejuni* (Berndtson *et al.*, 1994) y se ha considerado que podrían actuar como fuentes probables de introducción del patógeno en las aves domésticas (Annan-Prah y Janc, 1988), al asociarse la presencia de roedores con un mayor riesgo de introducción de *Campylobacter* en gallineros (Kapperud *et al.*, 1993; Hald *et al.*, 2000). En este estudio, todos los ratones que fueron muestreados en las inmediaciones de las naves de pollos fueron negativos a *C. jejuni*. Nuestros resultados concuerdan con los de Jones *et al.*, (1991), que no pudieron aislar el microorganismo del intestino de ratones atrapados vivos (tanto en las inmediaciones como en el interior de las naves de pollos) y con los de Gregory *et al.*, en 1997, que tampoco detectaron el microorganismo a partir de hisopos rectales de estos animales. Durante este estudio se observó frecuentemente la presencia de ratones en el interior de las naves, por lo que este hecho, unido a los resultados negativos de dichos roedores al patógeno, a pesar de los casos positivos de los pollos de carne, en el momento del muestreo, podría indicar que, de actuar como vectores del patógeno, lo harían de forma pasiva, al no encontrarse el microorganismo en sus heces.

➤ **Aves silvestres.** Las campilobacterias son componentes normales de los microorganismos entéricos de las aves silvestres (Cabrita *et al.*, 1992). Existen diversos estudios que muestran prevalencias muy diferentes en relación con la presencia de *C. jejuni* en diferentes muestras intestinales de aves silvestres, capturadas cerca de explotaciones avícolas, que varían desde el 0 al 90% (Ito *et al.*, 1988; Craven *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2011; Hald *et al.*, 2016). Las diferentes prevalencias pueden atribuirse a varios factores (Milton *et al.*, 2017), como las diferencias entre las especies muestreadas (hábitos de alimentación o migración de las aves), la capacidad de colonización de las cepas de *C. jejuni*, la presencia de animales domésticos en las inmediaciones, etcétera. En nuestro estudio, no se observó ningún animal positivo, a pesar de que las aves silvestres (en su mayoría gorriones) podrían acceder al interior de las instalaciones donde se encontraban los pollos y que, como en el caso de los ratones, los muestreos se realizaron en los periodos de casos positivos en el rebaño, posiblemente debido a alguno de los factores descritos anteriormente.

➤ **Perros y gatos.** Los animales de compañía (perros y gatos) son reservorios de varias especies de *Campylobacter* (Acke *et al.*, 2009; Koene *et al.*, 2009), por tanto podrían suponer una fuente de contaminación potencial para los pollos en el caso de que

en la explotación convivan con aquellos. Aunque la mayoría de los perros y gatos infectados por estos microorganismos no presentan signos clínicos, algunos pueden desarrollar enteritis leve o moderada, una situación que se asocia en la mayoría de los casos a la infección por *C. jejuni* (Acke, 2018).

En los perros, no se detectó ningún animal positivo a *C. jejuni*. Estudios anteriores han estimado prevalencias variables del 3 al 40% (Mohan, 2015), dependiendo otros factores (edad, estado sanitario), tipo de muestra (heces frescas o hisopos rectales) o del método y medios de cultivo utilizados (mCCDA, CAT), entre otros. Un estudio realizado por Bojanić *et al.*, en 2017, en perros adultos y mediante hisopado rectal (con similares características al nuestro) mostró una prevalencia de *C. jejuni* del 13%, pero a pesar de existir algunas semejanzas entre este estudio y el nuestro, también se observaron muchas diferencias, siendo una de las más significativas el tipo de cultivo utilizado, ya que en dicho estudio se pudo comprobar que los aislamientos de *C. jejuni* fueron más abundantes cuando se cultivó en CAT que cuando la detección se efectuó mediante mCCDA, como fue nuestro caso.

En el caso de los gatos, se obtuvo un porcentaje de casos positivos del 40%, siendo estos más elevados que en estudio de Bojanić *et al.* (2017), en el cual se detectaron estos microorganismos en el 5% de los animales. El relativamente elevado porcentaje de positivos en nuestro estudio puede explicarse porque todos los animales formaban parte de una explotación familiar donde convivían con las aves que resultaron positivas.

➤ **Ovejas y cabras.** Igual que en otros de los animales, los rumiantes también son portadores frecuentes de *Campylobacter* spp. (Thépault *et al.*, 2018), pudiendo actuar como reservorios de estos microorganismos en el entorno de las granjas de pollos no industriales, donde puede darse esta convivencia, ya que por legislación en programas de Bioseguridad esto está prohibido en las explotaciones industriales. A pesar de que en estos animales se han aislado diversas especies, en los pequeños rumiantes especie más frecuente es *C. jejuni* (Kaakoush *et al.*, 2015).

En este estudio se encontró una prevalencia del 41% de *C. jejuni* en muestras de hisopos cloacales de ovejas, cifra muy superior a la descrita en otros estudios con tasas cercanas al 5% en muestras intestinales de ovejas (Raji *et al.*, 2000), próximas al 11% en muestras cecales y del 13,6% en muestras fecales (Prescott y Bruin-Mosch, 1981). En las ovejas, como en otras especies, existen multitud de factores, como la edad, la estación, la

procedencia y tipo de muestras o los métodos de aislamiento, que podrían ser responsables de las variaciones en el aislamiento descritas (Açık y Çetinkaya, 2006). Por lo tanto, debido a la disparidad de estos factores en los diferentes estudios, las prevalencias obtenidas no resultan comparables. Sin embargo, hay que reseñar que, en el caso de los gatos, los valores aquí encontrados estarían condicionados a la presencia mixta de las ovejas con otras especies (sobre todo gallinas) que resultaron positivas.

En el caso de las cabras, se obtuvo una prevalencia del 50%, estos datos no serían representativos, ya que presentan el condicionante del pequeño número de muestras (sólo 4 cabras muestreadas), además, como en casos anteriores, las cabras tenían contacto con las aves portadoras. En otros estudios Cortés *et al.*, (2006) no encontraron *Campylobacter* en las heces de cabras de leche sanas en España, confirmando lo publicado por Rosef *et al.*, (1983), que tras el análisis tanto de hisopos rectales como de muestras de heces de 110 cabras, no detectaron el patógeno en ninguna de ellas. Sin embargo, otros investigadores han obtenido tasas positivas muy diversas, Prescott y Bruin-Mosch (1981) contemplaron una prevalencia de 2,7 % en Canadá, mientras que en otro estudio Abrahams *et al.* (1990) detectaron el patógeno en el 33,3% de las cabras analizadas. Estas diferentes tasas podrían atribuirse al contacto de las cabras con otras especies animales; de hecho se ha observado que las cabras alejadas de otros animales de granja, fueron negativas para *Campylobacter* spp., sin embargo, tres de cada 20 cabras confinadas a un área pequeña, pero en contacto con animales positivos, se infectaron, lo que sugiere que las cabras no positivas habrían sido contagiadas a partir de otras especies, como las aves de corral (Jiwa *et al.*, 1994). De esta manera, la alta prevalencia de *C. jejuni* en relación con algunos estudios previos podría deberse a que las cabras no se encontraban en contacto con otros animales, al contrario de lo que sucedía en nuestro caso.

➤ **Conejos.** A diferencia de las aves de corral y el cerdo, el tracto intestinales del conejo no proporciona un ambiente óptimo para la colonización de *Campylobacter* (Piccirillo *et al.*, 2011). En lo que se refiere a la presencia de *C. jejuni* en heces de conejos, la mayor parte de los estudios realizados han revelado prevalencias insignificantes, bajas o nulas. Así, en un estudio llevado a cabo en mataderos de conejos, Prescott y Bruin-Mosch (1981) informaron de una tasa del 11,3% en heces de conejos sanos, mientras que Kohler *et al.* (2008) sólo detectaron 2 muestras fecales portadoras, de un total de 500 analizadas. En estudios realizados en granjas de conejos de España, no se detectaron positivos a partir de contenido cecal (Marín *et al.*, 2016), igual que en Italia a partir de

hisopos rectales (Piccirillo *et al.*, 2011). Por tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio en relación con esta especie (0% de prevalencia) estarían en consonancia con los publicados antes. Estos resultados podrían deberse entre otras razones a que, al igual que en nuestro estudio, los conejos generalmente se crían en jaulas con el suelo de malla de alambre, que evitan el contacto entre los animales y las heces, reduciendo así el riesgo de transmisión oral-fecal de patógenos (Piccirillo *et al.*, 2011), además de que probablemente el conejo sea más resistente a este microorganismo, así que podemos aventurar que el conejo no es una especie importante para la transmisión de *Campylobacter*, aunque en la vida salvaje esto no resulte tan claro, ya que Kwan *et al.* (2008) aislaron el 73,7% de los genotipos de *C. jejuni* más relevantes en infecciones humanas, a partir de conejos de monte.

➤ **Cobayas.-** Algunos estudios realizados en animales de laboratorio han evidenciado que los cobayas pueden portar *Campylobacter* (Weber *et al.*, 1982), y por tanto, podrían participar en la epidemiología de las infecciones provocadas por estos microorganismos (Komba *et al.*, 2014). En nuestro estudio, sólo se pudo analizar un único animal que resultó negativo, por lo que el resultado carece de significación. No obstante, a pesar de que los estudios en estos animales son escasos, se han publicado varios relacionados con el análisis de la prevalencia de *C. jejuni*. Komba *et al.* (2014) detectaron un 13,3% de positivos del en muestras fecales de cobayas de laboratorio, mientras que Meanger Marshall, en 1989, habían detectado una prevalencia del 7,7% en los mismos animales muestreados con hisopos rectales. Sin embargo, al analizarse la prevalencia en cobayas criados con gallinas o en contacto con ellas (Graham *et al.*, 2016) las prevalencias fueron muy superiores, de hasta el 72,5%. La diferencia en estos valores podría relacionarse con la posibilidad de que estos animales entren o no, en contacto con heces infectadas. Así todo, no parece que las cobayas ni los conejos puedan actuar como foco de transmisión de *C. jejuni* en las granjas de pollos.

➤ **Palomas y patos.** Las aves silvestres urbanas, como palomas y patos, provocan una enorme contaminación fecal del medio ambiente. Algunos estudios de biología poblacional sobre *Campylobacter* spp. han demostrado que estas especies de aves no pueden descartarse de constituir fuentes contribuyentes de infección para animales de granja o incluso para humanos (Mohan, 2015).

En nuestro caso, no se recuperó *C. jejuni* de ninguna de las palomas muestreadas, a diferencia de otros estudios realizados que reflejaron tasas de infección muy variables,

entre un 3% en Oslo (Lillehaug *et al.*, 2005) hasta un 50% en Japón (Kinjo *et al.*, 1983). En España se han llevado a cabo estudios en palomas urbanas de Barcelona y Madrid, obteniéndose prevalencias del 26,2% y del 69,1% de media, respectivamente (Casanovas *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 2010). En los referidos estudios, se han observado variaciones notables debidas, tanto a los diferentes métodos analíticos utilizados, como a la época del año en la que se había realizado el estudio. Se sospecha que una de las posibles fuentes de infección de estos animales podría ser los excrementos de otras aves y el consumo de alimentos contaminados (Gabriele-Rivet *et al.*, 2016). Esto concordaría con los resultados de nuestro estudio, ya que las palomas muestreadas se encontraban en una pajarera, y desde su nacimiento, permanecieron aisladas de este tipo de fuentes de contaminación.

Los patos representan también un riesgo potencial de transmisión de *Campylobacter* (Emmanue Nonga y Muhairwa, 2009), con prevalencias muy dispares en las diferentes investigaciones, que varían desde el 13% al 75% (Colles *et al.*, 2011). Esta diferencia en las estimaciones es atribuible a distintos factores, como las técnicas de muestreo, el tipo de muestras y la sensibilidad de las técnicas de cultivo (Mohan, 2015). En nuestro estudio, los patos presentaron una tasa de infección del 70% de *C. jejuni*, que se correspondería bien con estudios previos como los de Pacha *et al.* (1988), los cuales observaron una tasa de recuperación del 73% en patos salvajes cuando la muestra, al igual que la nuestra, se tomaba con hisopos cloacales. Colles *et al.* (2011) obtuvieron tasas del 74,6% en animales de granja y Emmanue-Nonga y Muhairwa (2009) registraron valores del 65,5% en el contenido cecal en animales caseros en contacto con pollos.

➤ **Codornices.** A pesar de que las codornices comunes, como aves migratorias, pueden propagar un amplio rango de patógenos, se sabe poco sobre su papel en la propagación de agentes zoonóticos (Dipineto *et al.*, 2014). En este estudio, se detectó *C. jejuni* en el 40% de las codornices muestreadas, datos que se corresponden con los resultados obtenidos por McCrea *et al.*, en 2006, quienes, al muestrear mediante hisopos cloacales codornices de tres granjas diferentes, obtuvieron incidencias de *Campylobacter* del 41, 26 y 14%. Las referencias de investigaciones específicas de *C. jejuni* en estos animales aportan datos muy dispersos; mientras Graham *et al.* (2016) informaron de tasas de incidencia del 66,7%, Minakshi *et al.* (1988) detectaron una prevalencia del 17,4% de *C. jejuni* en codornices domésticas.

➤ **Faisanes.** *Campylobacter* puede encontrarse en el intestino de los faisanes aparentemente sanos y, por tanto, esta especie podría considerarse un portador potencial

(Dipineto *et al.*, 2008). Uno de los dos animales analizados en este estudio resultó positivo frente a *C. jejuni*, por lo que la prevalencia obtenida fue bastante más elevada que la publicada por otros autores, aunque su significación es dudosa. Dipineto (2008) observó en Italia una incidencia del 5,8% a partir de hisopos rectales. Atanassova y Ring (1999), al examinar distintos tipos de muestras en Alemania, obtuvo un 18% de animales positivos frente a *C. jejuni* y Nebola *et al.* (2007) registraron una tasa de 29,1% de aves portadores del microorganismo en República Checa al analizar el contenido intestinal de los animales de granja. Estos mismos estudios encontraron variaciones importantes en la presencia de *Campylobacter* en relación con varios factores, como los casos positivos más elevados en individuos adultos con respecto a los jóvenes, 83,3% frente al 3,3% (Dipineto *et al.*, 2008) o en animales procedentes de granja en relación con los salvajes, 70,2% frente al 27,5% (Nebola *et al.*, 2007). En nuestro estudio, se desconoce la edad de los animales muestreados y es importante resaltar que dichos individuos se encontraban compartiendo alojamiento con otras aves positivas a *C. jejuni*.

➤ **Ocas.** A pesar de que los gansos salvajes son considerados una fuente de transmisión de *Campylobacter* en el medio natural (Varslot *et al.*, 1996), existen pocos datos sobre las ocas, que puedan contribuir a esclarecer el papel que estos animales pueden ejercer en la transmisión del patógeno. Aydin *et al.* (2001) detectaron una prevalencia del 100% de *C. jejuni* en ocas domésticas, en muestras de hisopos cloacales. En relación con ello, 3 de los 4 animales muestreados en el presente estudio resultaron positivos para el microorganismo. Con respecto a sus homólogos salvajes, se han obtenido tasas de incidencia de *C. jejuni* muy variables, que oscilan entre 0% en muestras fecales (Lillehaug *et al.*, 2005) y el 50,2% observado en heces frescas (Colles *et al.*, 2008). Las diferencias en este caso pueden atribuirse, al igual que en otras especies, a los diferentes tipos de muestreo utilizados en los estudios y a los distintos hábitos de comportamiento de los animales salvajes, en relación con los de granja como, por ejemplo, la dinámica cambiante de las aves migratorias (Colles *et al.*, 2008).

➤ **Pavo real.** Al igual que en el caso de las anteriores, el conocimiento sobre la presencia de *C. jejuni* en pavos reales es escaso e incompleto, y lo mismo que nuestro caso, en ninguno de los estudios anteriores aparecieron animales positivos. Stern *et al.* (2004) no detectaron el microorganismo al muestrear 2 individuos y, del mismo modo, al analizar 31 pavos reales en diferentes zoológicos, Hollamby *et al.* (2003), no encontraron animales portadores de *Campylobacter* en heces. A la vista de los resultados,

es posible que, a diferencia de la mayoría de aves, estos animales presenten cierta resistencia a la colonización por *Campylobacter*; sin embargo, existen muy pocos datos al respecto.

No obstante, en determinados grupos, cualquier conclusión en relación con los resultados obtenidos en este estudio está bastante condicionada por el número limitado de animales de los que se disponía para el muestreo, por lo conviene reflexionar sobre los resultados obtenidos, teniendo en cuenta el tipo de contacto que cada uno de los grupos de animales tenía con los animales confirmados como portadores fecales de *C. jejuni*.

Si se estudian los resultados atendiendo a la procedencia de las muestras en las distintas explotaciones, como se recoge en la Figura 10, se puede observar que ninguno de los animales analizados procedentes de la explotación de Riosequino de Torío (León) (aves silvestres y ratones de campo) fueron portadores de *C. jejuni*. En el muestreo de la explotación burgalesa de Aranda de Duero, resultaron positivos el 40% de los gatos analizados. Entre los perros no se encontró ningún positivo. En concordancia con el caso de la granja escuela del Colegio Santa Isabel de Soria, se observan porcentajes positivos superiores al 50% en la mayor parte de las aves (ocas, patos y faisanes), cuando cohabitaban con pollos y gallinas y sólo levemente valores inferiores (40%), en el caso de las codornices. Aparecieron resultados similares en los pequeños rumiantes (50% de positivos en cabras y 41% en ovejas), que permanecían en contacto indirecto con las gallináceas portadoras, mostrándose ausencia de *C. jejuni* (ningún animal positivo) en las especies sin contacto, igual que en el pavo real. Debe hacerse constar, el escaso número de muestras disponibles en cada caso, que resta valor a los resultados y exige mucha precaución a la hora de concluir en términos epidemiológicos.

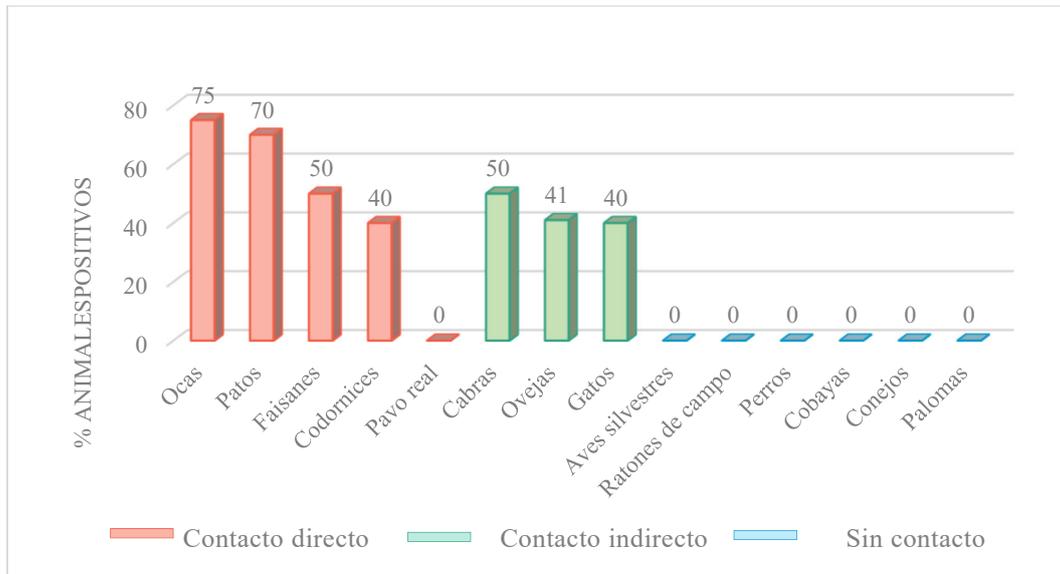


Figura 10. Porcentaje de animales positivos en el muestreo de distintas especies de animales.

Como ya se ha mencionado, en este estudio, no se detectó ningún animal positivo entre las especies separadas de las gallináceas portadores del microorganismo, lo que podría significar que el reservorio principal en este caso no son los animales muestreados en esta parte del estudio, sino las gallinas (en el caso, de las explotaciones de Burgos y Soria) y los pollos (en la de León). Los resultados de los otros dos grupos de estudio (en contacto directo e indirecto) apoyarían esta hipótesis ya que, en general, se observan prevalencias superiores a las que entrarían dentro de lo esperado para estas especies, según autores anteriores.

A pesar de todo, y aunque el aislamiento de *C. jejuni* de algunos de los diversos tipos de animales muestreados en nuestro estudio, no implica necesariamente que estos individuos puedan actuar como una fuente de transmisión del patógeno a las aves de corral o como un reservorio de éste, indudablemente se deduce que actúan como portadores de *C. jejuni* y, por tanto, suponen un riesgo que debe ser teniendo en cuenta.

V. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE *Campylobacter jejuni*

5.1 Análisis de huevos de gallinas portadoras

Existe gran controversia entre los diferentes autores sobre la importancia de la transmisión vertical de *C. jejuni* en pollos y, aunque existen estudios que sugieren que las gallinas reproductoras podrían considerarse una fuente de infección para sus descendientes (Hiett *et al.*, 2003a) y se ha descrito la presencia del microorganismo en el tracto reproductor de las gallinas (Buhr *et al.* 2002), hasta el momento no se ha podido comprobar que las gallinas de puesta portadoras de este patógeno sean capaces de producir huevos contaminados y, por tanto, su progenie (Sahin *et al.*, 2003). En este estudio, se analizó la posible presencia de *C. jejuni* en huevos de gallinas confirmadas portadoras y la posible penetración de la bacteria en huevos contaminados experimentalmente.

Algunos datos obtenidos en estudios anteriores sugieren que la transmisión vertical de *C. jejuni* en aves no es fácil en condiciones naturales (Shanker *et al.*, 1986). Con objeto de comprobar la posibilidad de transmisión del microorganismo desde las gallinas portadoras a sus huevos y su supervivencia en ellos, se examinó la presencia de *C. jejuni* en la superficie de huevos procedentes de gallinas portadoras del agente. También se analizó la presencia del patógeno en la cáscara y en el interior de dichos huevos, para determinar su capacidad de penetración y viabilidad en el contenido interno del huevo.

Para comprobar la presencia del microorganismo en los huevos fue necesario determinar previamente los casos positivos en los animales, lo que se realizó, al igual que en experimentos anteriores, mediante el hisopado cloacal de cada uno de los animales. De esta manera, se confirmó que una semana antes de la primera recogida, el 100% las de gallinas eran portadoras fecales de *C. jejuni*. Para realizar el análisis se utilizó un método muy similar al descrito por otros autores (Doyle, 1984), recogiendo los huevos asépticamente durante las primeras horas posteriores a la puesta y analizando la superficie, cáscara y contenido interno.

Al realizar la identificación de las colonias obtenidas en el cultivo sólido, por PCR, no se confirmó la presencia de *C. jejuni* en ninguna de las muestras analizadas. Los

resultados obtenidos en esta parte del estudio reflejan que no fue posible la detección de *C. jejuni* en la superficie, ni en la cáscara, ni en el contenido de los huevos procedentes de gallinas portadoras en heces. Estos resultados coinciden con lo expuesto por otros autores (Sahin *et al.* en 2003), que no pudieron detectar *Campylobacter* a partir de huevos comerciales (con menos de 2 días) obtenidos de gallinas colonizadas por *Campylobacter*, a pesar de que, como en nuestro caso, la contaminación fecal de la cáscara de huevo era evidente en algunos de los huevos. Además, se corrobora lo publicado por Doyle, en 1984, en cuyo estudio sólo se pudo aislar *C. jejuni* en la superficie de 2 huevos de los 226 analizados y en ningún caso en su contenido de estos. Por ello, este autor parecía afirmar que no parecía probable que el microorganismo contaminara el contenido de los huevos sanos. Tampoco Acuff *et al.* (1982), lograron detectar *C. jejuni* en huevos de pavo, a pesar del alto porcentaje de los hisopos fecales positivos en las pavas.

Sin embargo, es probable que en este experimento, de existir el microorganismo en la superficie del huevo en el momento de la puesta, este no hubiese logrado sobrevivir, debido a la sensibilidad que presenta a la desecación y al oxígeno (Neill *et al.*, 1985), teniendo en cuenta que el tiempo transcurrido entre la puesta y el procesado de los huevos fue de entre 4 y 6 horas, y que se transportaron a temperatura ambiente, sin protección atmosférica especial.

Por lo tanto, con los datos obtenidos no es posible determinar si la ausencia de *C. jejuni* en la superficie de los huevos analizados se debe a su escasa capacidad de supervivencia en el tiempo o a que las gallinas no transmiten el microorganismo a los huevos, a pesar de ser portadoras fecales. La ausencia de resultados positivos en el experimento también podría deberse a que la cantidad de huevos analizados no hubiera sido suficiente para la detección, ya que según los estudios de Doyle, en 1984, *C. jejuni* estaba presente en la cáscara de aproximadamente el 1% de los huevos de gallinas excretoras de este microorganismo.

Además, tampoco se detectó *C. jejuni* ni en la cáscara de los huevos analizados, ni en su contenido, lo que podría apuntar a varias hipótesis: que el microorganismo no hubiese sido transferido al huevo; que, por el contrario, sí se hubiera transferido pero que no hubiera sido capaz de penetrar la cáscara, o que, a pesar de transferirse y penetrar en el huevo, no fuera capaz de sobrevivir en la cáscara, ni en su interior.

5.2 Contaminación experimental de los huevos con *C. jejuni*

Se realizó una contaminación experimental con el fin de determinar la supervivencia de *C. jejuni* en la superficie, así como su capacidad para penetrar en la cáscara y colonizar el interior de los huevos.

Se han cotejado datos sobre la posible variación, teniendo en cuenta el tipo de inoculación artificial utilizada y al comparar la inoculación mediante frotado superficial (con y sin diferencia de presiones), inmersión e inoculación en la albúmina, sólo se obtuvieron evidencias de colonización (recuperación de *C. jejuni* de huevos mantenidos a 37°C durante 28 días) cuando *C. jejuni* fue inoculado (Shanker *et al.*, 1986). Sin embargo, en estudios más recientes, no observaron diferencias entre la inoculación mediante inmersión en agua de peptona y por inoculación directa en la membrana interna (Teodoro-Paula *et al.*, 2009). En este último caso, al igual que en el nuestro, se corroboró que la viabilidad del microorganismo en agua de peptona no se veía reducida durante al menos el periodo que duró el experimento (6 horas).

La contaminación superficial de los huevos se realizó con una suspensión de 10^6 UFC/ml de *C. jejuni*, dosis similar a la observada en heces de gallinas portadoras del microorganismo (Grant *et al.*, 1980). Los resultados obtenidos en el estudio directo de la contaminación superficial se recogen en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados de tres recuentos de colonias de *C. jejuni* por placa, a diferentes tiempos post-inoculación.

Tiempo transcurrido desde la inoculación (en horas)	Superficie del huevo	Cáscara del huevo	Contenido interno
0	60/68/71	0/2/3	0/0/0
1	2/1/1	0/0/0	0/0/0
2	0/0/0	0/0/0	0/0/0
4	1/0/0	0/0/0	0/0/0
6	0/0/0	0/0/0	0/0/0

Se puede ver que se produjo una elevada recuperación de *C. jejuni* en la superficie del huevo en el tiempo “0”, reduciéndose drásticamente en el segundo análisis

(1 hora) y no detectándose ninguna colonia en los siguientes análisis. Estos datos afianzan la hipótesis planteada antes y confirmarían la escasa capacidad de supervivencia de *C. jejuni* en la superficie del huevo. Shane *et al.*, en 1986, comprobaron que en huevos contaminados con una suspensión fecal de $1,35 \times 10^8$ UFC/g de *C. jejuni*, este microorganismo se podía recuperar hasta las 16 horas, pero al utilizarse las heces y al hacerlo con una dosis tan elevada como fuente de infección, este dato no se consideró representativo, ya que era posible que la presencia del microorganismo durante tanto tiempo se debiera a la protección ejercida por la presencia de materia orgánica (Tatchou-Nyamsi-König *et al.*, 2007). No se conocen datos previos sobre la supervivencia de *C. jejuni* en la superficie del huevo sin presencia de heces, ya que no se ha analizado este particular, debido al tipo de procesado con el que se han realizado otros estudios similares.

La recuperación de *C. jejuni* a partir de la cáscara sólo fue posible en dos de los tres análisis en el tiempo “0” y en muy poca cantidad de células, y en ninguno de los casos en el contenido interno. Estos resultados están en consonancia con lo publicado por Doyle (1984), y por Neill *et al.* (1985), que demostraron que *C. jejuni* no penetraría en el contenido de los huevos, y sólo podría aislarse ocasionalmente de la cáscara interna y de las membranas de los huevos infectados. En esta línea, Teodoro-Paula *et al.* (2009) no observaron valores positivos para *C. jejuni* en huevos inoculados directamente en su interior, ni en los inoculados por inmersión en agua de peptona. Y Fonseca *et al.* (2014) tampoco obtuvieron recuperación del microorganismo ni en huevos inoculados en la yema, ni en otros en contacto con virutas de madera inoculadas con *C. jejuni*.

A la vista de estos resultados, se considera que *C. jejuni* no tiene capacidad de colonización de los huevos, a pesar de que fisiológicamente, debido a su tamaño y a su movilidad, sería posible que el microorganismo atravesase la cáscara (Fonseca *et al.*, 2014). Esto podría deberse en parte a la acción que determinados componentes del huevo podrían ejercer sobre la supervivencia de la bacteria; en concreto, la clara, por su contenido en albúmina y a determinadas enzimas (Cogan *et al.*, 2001), ya que se ha comprobado que la albúmina por sí sola no es capaz de ejercer un efecto letal en *C. jejuni* (Clark y Bueschkens, 1986), pero se cree que podría hacerlo añadida a otros factores (Fonseca *et al.*, 2014).

VI. ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD O RESISTENCIA DE *Campylobacter jejuni* A DESINFECTANTES

La contaminación microbiológica y la colonización de las aves puede prevenirse y controlarse mediante una bioseguridad rigurosa, con prácticas de gestión adecuadas y productos como los desinfectantes, cuyo objetivo principal es reducir la cantidad de patógenos en el medio ambiente. Con este estudio, se pretendió establecer la eficacia de determinados desinfectantes frente a *C. jejuni*, realizándose en primer lugar experimentos de eficacia *in vitro* en el laboratorio y posteriormente en la granja.

6.1 Estudios de laboratorio

El método de la suspensión ha sido utilizado previamente para determinar la eficacia de los desinfectantes frente a bacterias tanto Gram-positivas (Best *et al.*, 1988, 1990), como negativas (Gutiérrez *et al.*, 1995; Rodríguez Ferri *et al.*, 2010). En este estudio, se probó la resistencia de la cepa de referencia con y sin suero, que ejercía el papel protector de la materia orgánica, con el fin de simular las condiciones en las que habitualmente se realizan los procesos de desinfección en las explotaciones avícolas. Aunque se encuentra ampliamente documentado que los residuos de materia orgánica pueden reducir la acción de los desinfectantes y que su eliminación previa parece fundamental para el éxito de los programas de limpieza y desinfección (Luyckx *et al.*, 2016; de Castro *et al.*, 2017), no siempre se puede asegurar que dicha materia haya sido eliminada por completo en las zonas de difícil acceso.

Por otra parte, el tiempo de contacto entre un desinfectante y un agente infeccioso puede variar desde varios segundos, para la desinfección de superficies, hasta varias horas, en el caso de instrumentos y ropa, por lo que es aconsejable que el agente sea eficaz un tiempo de contacto mínimo. Por este motivo, en este estudio se estableció un tiempo de actuación de 1 minuto, siguiendo así los pasos de estudios anteriores (Best *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 28.

Tabla 28. Resultados del experimento de susceptibilidad a los desinfectantes por parte de *C. jejuni*, expresados en forma de reducciones de UFC. (Media de tres determinaciones).

Producto desinfectante utilizado	Reducción del número de colonias en % ($\mu \pm \sigma$)	
	Sin suero	Con suero
Productos no comerciales		
Ácido fosfórico	$>10^6$	$>10^6$
Agua oxigenada	$>10^6$	$(2,49 \pm 1,48) \times 10^4$
Alcohol isopropílico	$>10^6$	$>10^6$
Cloramina T	$>10^6$	$>10^6$
Cloruro de benzalconio	$>10^6$	$(8,48 \pm 7,15) \times 10^4$
Cloruro de cetilpiridinium	$>10^6$	$>10^6$
Digluconato de clorhexidina	$>10^6$	$>10^6$
Etanol	$>10^6$	$>10^6$
Fenol	$>10^6$	$>10^6$
Formol	$>10^6$	$>10^6$
Hipoclorito sódico	$3,80 \pm 2,00$	$3,09 \pm 3,10$
Permanganato potásico	$(8,80 \pm 5,43) \times 10^2$	$1,95 \pm 0,61$
Polivinilpirrolidona	$2,67 \pm 0,91$	$1,22 \pm 0,12$
Povidona yodada	$>10^6$	$>10^6$
Sulfato de zinc	$(1,17 \pm 1,35) \times 10^3$	$(2,35 \pm 1,04) \times 10^2$
Productos comerciales		
CR-36 Mural[®]	$>10^6$	$>10^6$
Darodor 9000[®]	$>10^6$	$>10^6$
Limoseptic[®]	$>10^6$	$>10^6$
Limoseptic plus[®]	$>10^6$	$>10^6$
Limoseptic SF[®]	$>10^6$	$>10^6$
Limoseptol[®]	$>10^6$	$>10^6$
Polimorfo[®]	$>10^6$	$>10^6$
Proxitane 15[®]	$>10^6$	$>10^6$
Totalcide[®]	$>10^6$	$>10^6$
Virkon-S[®]	$>10^6$	$(2,02 \pm 1,89) \times 10^3$
Virocid[®]	$>10^6$	$>10^6$

Según se desprende de los datos recogidos aquí, de los desinfectantes comerciales comparados, diez produjeron como mínimo una reducción logarítmica de 6 unidades, siendo éste el máximo nivel de detección posible, tanto en presencia de materia orgánica, utilizando suero de caballo estéril como portador, como en su ausencia, al diluir el crecimiento en solución salina estéril. Sólo se produjo un caso en el que la incorporación de suero como control de la presencia de materia orgánica redujo la capacidad desinfectante, el que corresponde al Virkon-S[®] que, de una reducción de 6 unidades logarítmicas, cuando se ensayó con solución salina pasó a tan sólo entre 3 y 4 reducciones logarítmicas al realizarse el ensayo con suero.

Respecto a los productos activos no comerciales empleados, nueve (ácido fosfórico, alcohol isopropílico, cloramina T, cloruro de cetilpiridinium, digluconato de clorhexidina, etanol, fenol, formol y povidona yodada) se comportaron del mismo modo que los nueve productos comerciales anteriores; es decir, con la máxima eficacia posible. Además, otros dos, el agua oxigenada y el cloruro de benzalconio, produjeron como mínimo 6 reducciones logarítmicas en ausencia de materia orgánica, pero al incorporar suero a la suspensión, se vio disminuida su eficacia hasta un valor de reducción mayor de 4 y menor de 5. El sulfato de zinc en presencia de solución salina produjo 3 reducciones logarítmicas, pero, cuando se recurrió al empleo de suero estéril, el valor obtenido fue diez veces menor, de tan solo 2 reducciones logarítmicas. Por último, los otros tres productos comparados (hipoclorito sódico, permanganato potásico y polivinilpirrolidona), en la mayoría de los casos, no produjeron ni una reducción logarítmica respecto al control de crecimiento sin desinfectante, con independencia de la presencia o no de materia orgánica en las explotaciones.

Los agentes liberadores de cloro y yodo son los halógenos más importantes utilizados en desinfección. En este estudio, la cloramina-T fue extremadamente activa, incluso en presencia de suero como representante de la materia orgánica, al igual que lo observado en otros organismos Gram-negativos (Gutiérrez *et al.*, 1995). Anteriormente, el cloro había demostrado ser eficaz para la destrucción de *C. jejuni* en biopelículas mixtas (Trachoo y Frank, 2002), no siendo así en la eliminación de la bacteria en aves de corral (Yogasundram *et al.*, 1987) ni en la piel (Chantarapanont *et al.*, 2004). El otro agente liberador de cloro utilizado (hipoclorito de sodio) fue completamente ineficaz contra *C. jejuni*, a pesar de que en estudios anteriores se habían obtenido resultados eficaces para una concentración de 0,63% durante 5 minutos (Avrain *et al.*, 2003) o para una

concentración del 5,25% durante 15 minutos (Wang *et al.*, 1983a), por lo que, probablemente, un tiempo de exposición más prolongado o una concentración más alta podrían haber hecho efectivo el hipoclorito de sodio en este estudio.

En relación a los yodóforos, el que contenía un 0,1% de yodo disponible resultó ineficaz, justo lo contrario que la solución de povidona yodada, que contenía una concentración de yodo disponible 10 veces mayor que la de yodóforo, lo que podría justificarse por la diferente concentración del producto activo en cada caso. Estos resultados coinciden, en general, con los publicados, tanto para *C. jejuni* como para otros Gram-negativos (Wang *et al.*, 1983a; Girardo *et al.*, 1989; Gutiérrez *et al.*, 1995)

Entre los agentes oxidantes comparados, solo el peróxido de hidrógeno y el Proxitane 15[®] resultaron ser muy eficaces, lo que concordó con lo publicado en estudios previos (McDonnell y Russell, 1999; Bauermeister *et al.*, 2008), a pesar de que se haya descrito la tolerancia al peróxido de hidrógeno para algunas cepas de *C. jejuni* (Grant y Park, 1995). El permanganato de potasio resultó ineficaz en todas las condiciones probadas, aunque el Virkon-S[®], compuesto por varios derivados de potasio, resultó más eficaz que el permanganato de potasio solo, reduciéndose considerablemente su actividad en presencia de suero. Esta mayor eficacia podría deberse a la mayor concentración de potasio en el producto comercial o a la combinación de este con otros agentes químicos activos, como el ácido sulfámico y el dodecibencenosulfonato de sodio.

Los compuestos de amonio cuaternario se emplean con frecuencia como agentes bactericidas en desinfección (McDonnell y Russell, 1999). Tanto el cloruro de benzalconio como el cloruro de cetilpiridio resultaron eficaces para la destrucción de *C. jejuni*, al igual que en otro estudio en el que fue utilizado este último compuesto en concentraciones superiores y durante 5 minutos de exposición (Avrain *et al.*, 2003). Además, se evaluaron ocho formulaciones basadas en compuestos de amonio cuaternario y todas resultaron eficaces, lo cual refuerza estudios anteriores con resultados similares (Wang *et al.*, 1983a).

Con respecto a los alcoholes, se confirma la excelente actividad del etanol, isopropanol y el Polimorfo[®] contra *C. jejuni*. Un estudio anterior con etanol, en el cual se utilizaba la misma concentración, arrojó resultados similares en ausencia de materia orgánica (Wang *et al.*, 1983a). El isopropanol también ha resultado eficaz frente a otras bacterias, en presencia de suero (Martínez-Martínez *et al.*, 2016).

El digluconato de clorhexidina, a pesar de que su capacidad desinfectante se considera muy reducida en presencia de materia orgánica (Russell y Day, 1993), demostró ser muy eficaz frente a *C. jejuni*, de acuerdo con lo descrito anteriormente para otros organismos Gram-negativos (Gutiérrez *et al.*, 1995).

El formaldehído, el fenol y el ácido fosfórico también mostraron excelentes actividades contra *C. jejuni*, aunque anteriormente se observó una reducción en su actividad contra otros organismos Gram-negativos en presencia de suero (Gutiérrez *et al.*, 1995). Entre los compuestos metálicos, solo el sulfato de zinc produjo resultados satisfactorios, pero fue inactivado por el suero.

Como resultado general, se puede concluir que nueve de los 15 agentes químicos activos y 10 de las 11 formulaciones comerciales mostraron el mayor nivel de actividad contra las cepas de *C. jejuni* en todas las condiciones *in vitro* probadas y, en consecuencia, estos compuestos podrían ser de gran ayuda como de medida de control contra este patógeno, en condiciones de campo.

6.2 Estudios en condiciones de campo

En la realización de esta parte del estudio se valoraron algunos de los productos eficaces en el laboratorio, para determinar si eran igualmente activos contra *C. jejuni*, en el ambiente de la granja.

Para establecer la eficacia de estos productos, al igual que en pruebas similares, los desinfectantes fueron pulverizados en las superficies de estudio (de Castro *et al.*, 2017) y para la recuperación de la bacteria se utilizaron placas de contacto tipo Rodac, utilizadas con frecuencia para el control microbiológico de superficies planas e impermeables (Burguet-Lago *et al.*, 2013). De manera semejante a otros estudios (Russell y Axtell, 2005), el tiempo de contacto entre el desinfectante y *C. jejuni* fue de una hora.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 29.

Tabla 29. Reducción del número de colonias (%) después de la desinfección de las paredes de una granja de pollos de carne con distintos productos.

Producto utilizado en la prueba	Reducción del número de colonias en % ($\mu \pm \sigma$)
Agua destilada	6 \pm 6,38
Cloruro de cetilpiridium	45,28 \pm 11,00
Fenol	96,53 \pm 8,49
Cloramina T	100 \pm 0
Formol	100 \pm 0
Polimorfo[®]	60,77 \pm 27,13
Limoseptic SF[®]	94,67 \pm 5,14
CR-36 Mural[®]	96,95 \pm 5,40
Proxitane 15[®]	100 \pm 0

De los productos analizados con tres de ellos se obtuvo una inactivación total de la bacteria en 60 minutos: el formol, la Cloramina T y el Proxitane 15[®], lo que confirma los obtenidos en la primera parte del estudio. No se conocen estudios anteriores que hayan comprobado la eficacia de dichos compuestos, en condiciones similares a las utilizadas en el estudio, aunque Battersby *et al.* (2017), demostraron que concentraciones menores de peróxido de hidrógeno (componente del Proxitane 15[®]) no resultaban activas en la destrucción de *C. jejuni*.

Se obtuvieron también, reducciones muy elevadas, superiores al 96%, con el fenol. Al igual que en este estudio, se ha observado que algunos compuestos fenólicos poseen actividades antibióticas contra diversas bacterias patógenas (Daglia, 2012), incluido *C. jejuni* (Klančnik *et al.*, 2012), ya que eran capaces de modificar la permeabilidad de la membrana y, por tanto, permitir la inactivación de la bacteria (Oh y Jeon, 2015)

Los productos CR-36 Mural[®] y Limoseptic SF[®] resultaron muy eficaces frente al microorganismo, lo que parece evidente ya que se ha demostrado que sus componentes principales, el cloruro de benzalconio y el glutaraldehído, respectivamente resultaron

eficaces frente a *C. jejuni* a dosis menores que las empleadas en este estudio (Yogasundram *et al.*, 1987b; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2011).

Casi el 40% de las colonias iniciales permanecían transcurridos 60 minutos de la pulverización con Polimorfo[®], aunque debe señalarse que los resultados obtenidos con este producto resultaron bastante irregulares, con índices de crecimiento comprendidos entre el 7,3% y el 78,1%, por lo que no se pudo determinar su actividad real frente a la bacteria, en condiciones de campo.

En esta parte del estudio, la reducción de la viabilidad microbiana provocada por el cloruro de cetilpiridium, fue mucho menor que la observada en el laboratorio, utilizando la misma concentración de producto. Esta reducción podría deberse a la disminución del efecto de los productos derivados del amonio cuaternario en presencia de biopelículas (Trachoo y Frank, 2002). Esta menor eficacia podría recuperarse al aumentar la concentración del producto. Arritt *et al.* (2002) analizaron el compuesto frente a *C. jejuni* en piel de pollo a esta concentración (0,1%) y a concentraciones más elevadas (0,5%) y solo se obtuvieron variaciones significativas (reducciones del 93%) con las concentraciones más altas.

Con objeto de evaluar si la pulverización del inóculo, el paso del tiempo o el diluyente podían haber reducido la viabilidad del microorganismo y, por lo tanto, distorsionado los resultados obtenidos, en una de las zonas se testó la reducción microbiana producida únicamente con el uso de agua destilada, obteniéndose valores muy bajos (entorno al 6% de reducción), por lo que se descartó dicha posibilidad.

Los resultados obtenidos indican que *C. jejuni* es susceptible a diferentes principios activos biocidas comunes y a determinados productos comerciales de uso pecuario, empleados a las dosis y condiciones habituales; sin embargo, hay que tener en cuenta que este microorganismo posee la capacidad de formar biopelículas, que podrían condicionar esta susceptibilidad a dichos productos (Bridier *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

1. En pollos de carne se confirmó la presencia de *C. jejuni* a partir de la 2^a-3^a semana de vida, que coincide con descripciones anteriores, y desde entonces se mantuvo de forma persistente hasta el final del ciclo, incluso por encima de los periodos habituales, sin regresión.
2. En las crianzas realizadas en los meses de otoño se produce un retraso en la detección hasta la 3^a semana, respecto de las que se inician en otras estaciones, que en el caso del contenido cecal se retrasa hasta la 4^a, tal vez reflejo de una menor circulación ambiental de *C. jejuni* coincidiendo con otros factores climáticos.
3. En los pollos de carne, cualquiera que sea la duración del ciclo de producción y el tipo de muestreo, las tasas de positivos son muy elevadas, alcanzando valores cercanos al 90% de los animales, con escasa variación según el momento del muestreo, que permanecen más o menos estables a partir de la 4^a semana.
4. La colonización masiva en los tramos distales del aparato digestivo de los pollos no se produce hasta el final de la 5^a semana de vida.
5. No existe duda de que la abundante presencia de *C. jejuni* en heces representa la fuente de infección habitual entre los animales del lote, y la transmisión fecal-oral, el modo principal de contagio.
6. Aunque los resultados de detección en determinadas muestras ambientales (agua, polvo, pienso, etcétera) no fueron determinantes, no se excluye su interés en la transmisión, habida cuenta de la baja sensibilidad de los métodos de detección utilizados, en este tipo de muestras.

7. Cualquiera que fuera el sistema donde se situaban los animales que fueron objeto de estudio (pollitas de recría, ponedoras domésticas, pollos de corral, gallos o animales reproductores) e independientemente del sistema de alojamiento (en suelo o en jaula), las tasas de prevalencia fueron siempre muy elevadas, alcanzando a la práctica totalidad del censo. Sin embargo, de entre el resto de especies animales analizadas, sólo los que tuvieron contacto con los anteriores fueron positivas, confirmando el papel de los primeros como reservorio fundamental.

8. Los huevos no representan, en ningún caso, elemento de transmisión de *C. jejuni*, ni en superficie ni en contenido, procedan de animales sanos o de portadores fecales. En experimentos llevados a cabo contaminando la superficie de los huevos con una suspensión de *C. jejuni*, su supervivencia fue muy escasa e incapaz de colonizar el tegumento.

9. Tanto *in vitro*, como en condiciones de campo, *C. jejuni* es susceptible a un variado grupo de biocidas que incluyen: alcoholes, aldehídos, fenoles, oxidantes, derivados clorados y derivados del amonio cuaternario, pudiendo ser utilizados cualquiera de ellos o sus combinaciones compatibles en programas de bioseguridad en la producción de pollos de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. M. y Engberg, J. (2001) "Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*", *Veterinary Research*, 32(3-4): 311-321.
- Abrahams, C. A., Agbodaze, D., Nakano, T., Afari, E. A. y Longmatey, H. E. (1990) "Prevalence and antibiogram of *Campylobacter jejuni* in domestic animals in rural Ghana", *Archives of Environmental Health*, 45(1): 59-62.
- Abram, D. D. y Potter, N. N. (1985) "Diluents and the enumeration of stressed *Campylobacter jejuni*", *Journal of Food Protection*, 48(2): 135-137.
- Achen, M., Morishita, T. Y. y Ley, E. C. (1998) "Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day of hatch to slaughter age", *Avian Diseases*, 42(4): 732-737.
- Açık, M. N. y Çetinkaya, B. (2006) "Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep", *Veterinary Microbiology*, 115(4): 370-375.
- Acke, E. (2018) "Campylobacteriosis in dogs and cats: a review", *New Zealand Veterinary Journal*, 66(5): 221-228.
- Acke, E., McGill, K., Golden, O., Jones, B. R., Fanning, S. y Whyte: (2009) "Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland", *Veterinary Record*, 164(2): 44-47.
- Acuff, G. R., Vanderzant, C., Gardner, F. A. y Golan, F. A. (1982) "Examination of turkey eggs, poults and brooder house facilities for *Campylobacter jejuni*", *Journal of Food Protection*, 45(14): 1279-1281.
- Agunos, A., Waddell, L., Léger, D. y Taboada, E. (2014) "A Systematic review characterizing on farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens", *PLOS ONE*, 9(8): e104905.
- Ahmed, M. F. M., Schulz, J. y Hartung, J. (2013) "Survival of *Campylobacter jejuni* in naturally and artificially contaminated laying hen feces", *Poultry Science*, 92(2): 364-369.
- Ailes, E., Scallan, E., Berkelman, R. L., Kleinbaum, D. G., Tauxe, R. V. y Moe, C. L. (2012) "Do differences in risk factors, medical care seeking, or medical practices explain the geographic variation in campylobacteriosis in foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) sites?", *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl_5): S464-S471.
- Allen, K. J. y Griffiths, M. W. (2001) "Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs", *Journal of Food Protection*, 64(12): 2058-2062.
- Allen, V. M., Weaver, H., Ridley, A. M., Harris, J. A., Sharma, M., Emery, J., Sparks, N., Lewis, M. y Edge, S. (2008) "Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks", *Journal of Food Protection*, 71(2): 264-270.
- Althaus, D., Zweifel, C. y Stephan, R. (2017) "Analysis of a poultry slaughter process: Influence of process stages on the microbiological contamination of broiler carcasses", *Italian Journal of Food Safety*, 6(4): 190-194.
- Anderson, K. L., Hamoud, M. M., Urbance, J. W., Rhoades, H. E. y Bryner, J. H. (1983) "Isolation of *Campylobacter jejuni* from an aborted caprine fetus", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(1): 90-92.
- Andersson, Y., de Jong, B. y Studahl, A. (1997) "Waterborne *Campylobacter* in Sweden: The cost of an outbreak", *Water Science and Technology*, 35(11): 11-14.
- Annamalai, T., Pina-Mimbela, R., Kumar, A., Binjawadagi, B., Liu, Z., Renukaradhya, G. J. y Rajashekara, G. (2013) "Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens", *Poultry Science*, 92(8): 2201-2211.

- Annan-Prah, A. y Janc, M. (1988) "The mode of spread of *Campylobacter jejuni/coli* to broiler flocks", *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35(1-10): 11-18.
- Arduino, R. C. y DuPont, H. L. (1993) "Travellers' diarrhoea", *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, 7(2): 365-385.
- Arritt, F. M., Eifert, J. D., Pierson, M. D. y Sumner, S. S. (2002) "Efficacy of Antimicrobials Against *Campylobacter jejuni* on Chicken Breast Skin", *The Journal of Applied Poultry Research*, 11(4): 358-366.
- Atanassova, V. y Ring, C. (1999) "Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany", *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3): 187-190.
- Avrain, L., Allain, L., Vernozy-Rozand, C. y Kempf, I. (2003) "Disinfectant susceptibility testing of avian and swine *Campylobacter* isolates by a filtration method", *Veterinary Microbiology*, 96(1): 35-40.
- Awad, W. A., Dublec, F., Hess, C., Dublec, K., Khayal, B., Aschenbach, J. R. y Hess, M. (2016) "*Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut", *Poultry Science*, 95(10): 2259-2265.
- Awad, W. A., Hess, C. y Hess, M. (2018) "Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction: a review", *Avian Pathology*, 47(4): 352-363.
- Axelsson-Olsson, D., Waldenström, J., Broman, T., Olsen, B. y Holmberg, M. (2005) "Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2): 987-992.
- Ayala-Tabares, A. (2016) "Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos líticos no biocontrole de *Campylobacter jejuni*". Disertación postgraduado. Universidad Federal de Viçosa, (Brasil).
- Aydin, F., Atabay, H. I. y Akan, M. (2001) "The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*)", *Journal of Applied Microbiology*, 90(4): 637-642.
- Bae, J., Oh, E. y Jeon, B. (2014) "Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12): 7573-7575.
- Bailey, R. A., Kranis, A., Psifidi, A., Watson, K. A., Rothwell, L., Hocking, M., Kaiser, P., Stevens, M. P. y Avendano, S. (2018) "Colonization of a commercial broiler line by *Campylobacter* is under limited genetic control and does not significantly impair performance or intestinal health", *Poultry Science*, 97(12): 4167-4176.
- Bang, D. D., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K. y Madsen, M. (2003) "PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates", *Journal of Applied Microbiology*, 94(6): 1003-1014.
- Bartelt, E. (2004) "Monitoring and risk assessment of *Campylobacter* infections", *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 111(8): 326-331.
- Barton, M. D. (2014) "Impact of antibiotic use in the swine industry", *Current Opinion in Microbiology*, 19: 9-15.
- Battersby, T., Walsh, D., Whyte, y Bolton, D. (2017) "Evaluating and improving terminal hygiene practices on broiler farms to prevent *Campylobacter* cross-contamination between flocks", *Food Microbiology*, 64: 1-6.

- Bauermeister, L. J., Bowers, J. W. J., Townsend, J. C. y McKee, S. R. (2008) "The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic acid as an antimicrobial treatment", *Poultry Science*, 87(11): 2390-2398.
- Baylis, C. L., MacPhee, S. y Betts, R. P. (2000a) "Comparison of two commercial preparations of buffered peptone water for the recovery and growth of *Salmonella* bacteria from foods", *Journal of Applied Microbiology*, 89(3): 501-510.
- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J. y Betts, R. P. (2000b) "Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods", *Journal of Applied Microbiology*, 89(5): 884-891.
- Beery, J. T., Hugdahl, M. B. y Doyle, M. P. (1988) "Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*", *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10): 2365-2370.
- Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M. y Grenier, D. (2017) "Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production", *Veterinary Research*, 48(1): 22.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M. L. y Engvall, A. (1994) "Experimental colonization of mice with *Campylobacter jejuni*", *Veterinary Microbiology*, 41(1-2): 183-188.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M.-L. y Engvall, A. (1996a) "*Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process", *International Journal of Food Microbiology*, 32(1): 35-47.
- Berndtson, E., Emanuelson, U., Engvall, A. y Danielsson-Tham, M.-L. (1996b) "A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 Swedish chicken farms", *Preventive Veterinary Medicine*, 26(3): 167-185.
- Berradre-Sáenz, B., Yáñez-Ortega, J. L., García-Sánchez, L., Melero-Gil, B., Rovira-Carballido, J., Carramiñana-Martínez, I., Tejero-Encinas, S., Ruiz-Sopeña, C. y Fernández-Arribas, S. (2017) "Epidemiology of Campylobacteriosis in Castile and Leon, Spain, during the period 2008-2015", *Revista Espanola De Salud Publica*, 91, p: e201703030.
- Berrang, M. E., Meinersmann, R. J. y Cox, N. A. (2017) "Passage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* subtypes through 0.45- and 0.65-micrometer-pore-size nitrocellulose filters", *Journal of Food Protection*, 80(12): 2029-2032.
- Berrang, M. E., Northcutt, J. K. y Cason, J. A. (2004) "Recovery of *Campylobacter* from broiler feces during extended storage of transport cages", *Poultry Science*, 83(7): 1213-1217.
- Beery, J. T., Hugdahl, M. B. y Doyle, M. P. (1988). "Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*", *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10): 2365.
- Best, M., Kennedy, M. E. y Coates, F. (1990) "Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp.", *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2): 377-380.
- Best, M., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S. y Kennedy, M. E. (1988) "Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests.", *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11): 2856-2858.
- Bhaduri, S. y Cottrell, B. (2004) "Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7103-7109.
- Birkhead, G., Vogt, R. L., Heun, E., Evelt, C. M. y Patton, C. M. (1988) "A multiple-strain outbreak of *Campylobacter* enteritis due to consumption of inadequately pasteurized milk", *The Journal of Infectious Diseases*, 157(5): 1095-1097.

- Biswas, D., Fernando, U. M., Reiman, C. D., Willson: J., Townsend, H. G. G., Potter, A. A. y Allan, B. J. (2007) "Correlation between in vitro secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens", *Current Microbiology*, 54(3): 207-212.
- Black, A. P., Kirk, M. D. y Millard, G. (2006) "*Campylobacter* outbreak due to chicken consumption at an Australian capital territory restaurant", *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report*, 30(3): 373-377.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. y Blaser, M. J. (1988) "Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans", *The Journal of Infectious Diseases*, 157(3): 472-479.
- Blaser, M. J. y Engberg, J. (2008) "Clinical Aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections", *Campylobacter, Third Edition*: 99-121.
- Blaser, M. J., Hardesty, H. L., Powers, B. y Wang, W. L. (1980) "Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus.", *Journal of Clinical Microbiology*, 11(4): 309-313.
- Bojanić, K., Midwinter, A. C., Marshall, J. C., Rogers, L. E., Biggs: J. y Acke, E. (2017) "Isolation of *Campylobacter* spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand", *Zoonoses and Public Health*, 64(6): 438-449.
- Bolton, F. J., Coates, D. y Hutchinson, D. N. (1984) "The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide", *The Journal of Applied Bacteriology*, 56(1): 151-157.
- Bolton, F. J., Hutchinson, D. N. y Parker, G. (1988) "Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces", *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(2): 155-160.
- Bolton, F. J. y Robertson, L. (1982) "A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*.", *Journal of Clinical Pathology*, 35(4): 462-467.
- Bopp, D. J., Sauders, B. D., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., Dziewulski, D., Wallace, B. J., Kelly, M., Halse, T., Musser, K. A., Smith: F., Morse, D. L. y Limberger, R. J. (2003) "Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak", *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1): 174-180.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A. W., Dam-Deisz, W. D. C., Havelaar, A. H., Nagelkerke, N. J. D. y Henken, A. M. (2004) "Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks", *Preventive Veterinary Medicine*, 62(1): 35-49.
- Boyd, Y., Herbert, E. G., Marston, K. L., Jones, M. A. y Barrow: A. (2005) "Host genes affect intestinal colonisation of newly hatched chickens by *Campylobacter jejuni*", *Immunogenetics*, 57(3-4): 248-253.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. y Dubois-Brissonnet, F. (2011) "Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review", *Biofouling*, 27(9): 1017-1032.
- Broman, T., Waldenström, J., Dahlgren, D., Carlsson, I., Eliasson, I. y Olsen, B. (2004) "Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans", *Journal of Applied Microbiology*, 96(4): 834-843.
- Brown: E., Christensen, O. F., Clough, H. E., Diggle: J., Hart, C. A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A. J. H., Moore, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N. J., Wright, E. J. y French, N. P. (2004) "Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp.", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11): 6501-6511.

- Buckley, A. M., Wang, J., Hudson, D. L., Grant, A. J., Jones, M. A., Maskell, D. J. y Stevens, M. P. (2010) "Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry", *Vaccine*, 28(4): 1094-1105.
- Buhr, R. J., Cox, N. A., Stern, N. J., Musgrove, M. T., Wilson, J. L. y Hiatt, K. L. (2002) "Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens", *Avian Diseases*, 46(4): 919-924.
- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J. E. L., Gillard-King, J. y Humphrey, T. J. (2006) "Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing", *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 645-652.
- Burguet-Lago, N., Brito-Godoy, L. C. y Cánovas-Borges, I. (2013) "Evaluación de la efectividad de un desinfectante mediante el método de placas de contacto", *Revista Cubana de Farmacia*, 47(2): 185-192.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T., Marsh, D., Keevil, C. W. y Leach, S. A. (1998) "Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and rRNA staining", *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2): 733-741.
- Butzler, J., Glupczynski, Y. y Goossens, H. (1992) "*Campylobacter* and *Helicobacter* infections", *Current Opinion in Infectious Diseases*, 5(1): 80-87.
- Butzler, J. P. (2004) "*Campylobacter*, from obscurity to celebrity", *Clinical Microbiology and Infection*, 10(10): 868-876.
- Byrd, J. A., Sams, A. R., Hargis, B. M. y Caldwell, D. J. (2011) "Effect of selected modified atmosphere packaging on *Campylobacter* survival in raw poultry", *Poultry Science*, 90(6): 1324-1328.
- Byrd, J. A., Corrier, D. E., Hume, M. E., Bailey, R. H., Stanker, L. H. y Hargis, B. M. (1998), "Incidence of *Campylobacter* in crops of preharvest market-age broiler chickens", *Poultry Science*, 77(9): 1303-1305.
- Byrd, J., Bailey, R. H., Wills, R. y Nisbet, D. (2007) "Recovery of *Campylobacter* from commercial broiler hatchery trayliners", *Poultry Science*, 86(1): 26-29.
- Cabrita, J., Rodrigues, J., Bragança, F., Morgado, C., Pires, I. y Penha Gonçalves, A. (1992) "Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from Northeast Portugal", *The Journal of applied bacteriology*, 73: 279-85.
- Callicott, K. A., Friethriksdóttir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J.-R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hiatt, K. L., Needleman, D. S. y Stern, N. J. (2006) "Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens", *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 5794-5798.
- Cameron, A., Fridrich, E., Huynh, S., Parker, C. T. y Gaynor, E. C. (2012) "Hyperosmotic stress response of *Campylobacter jejuni*", *Journal of Bacteriology*, 194(22): 6116-6130.
- Cardinale, E., Tall, F., Guèye, E. F., Cisse, M. y Salvat, G. (2004) "Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks", *Preventive Veterinary Medicine*, 64(1): 15-25.
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M. y 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 Microbiology*, 10: 232.

- Casanovas, L., de Simón, M., Ferrer, M. D., Arqués, J. y Monzón, G. (1995) "Intestinal carriage of campylobacters, salmonellas, yersinias and listerias in pigeons in the city of Barcelona", *The Journal of Applied Bacteriology*, 78(1): 11-13.
- de Castro Burbarelli, M. F., do Valle Polycarpo, G., Deliberali Lelis, K., Granghelli, C. A., Carão de Pinho, A. C., Ribeiro Almeida Queiroz, S., Fernandes, A. M., Moro de Souza, R. L., Gaglianone Moro, M. E., de Andrade Bordin, R. y de Albuquerque, R. (2017) "Cleaning and disinfection programs against *Campylobacter jejuni* for broiler chickens: productive performance, microbiological assessment and characterization", *Poultry Science*, 96(9): 3188-3198.
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D. y Chikindas, M. L. (2015) "Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5): 494-501.
- Cawthraw, S. A. y Newell, D. G. (2010) "Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens", *Avian Diseases*, 54(1): 86-93.
- Cawthraw, S. A., Wassenaar, T. M., Ayling, R. y Newell, D. G. (1996) "Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks.", *Epidemiology and Infection*, 117(1): 213-215.
- CDC (1998) "Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food--Oklahoma, 1996.", *Morbidity and mortality weekly report*, 47(7): 129-131.
- CDC (2009) "*Campylobacter jejuni* infection associated with unpasteurized milk and cheese--Kansas, 2007.", *Morbidity and mortality weekly report*, 57(51): 1377-1379.
- CDC (2013) "Recurrent outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with a raw milk dairy-Pennsylvania, April-May 2013.", *Morbidity and mortality weekly report*, 62(34): 702.
- Cean, A., Stef, L., Simiz, E., Julean, C., Dumitrescu, G., Vasile, A., Pet, E., Drinceanu, D. y Corcionivoschi, N. (2015) "Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry", *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(2): 122-130.
- Cecilia, H. C., Arreola, M. G. A. y Graciela, C. E. (2013) "*Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(2): 77-84.
- Cerda-Cuellar, M., Laureano, L., Ayats, T., Corujo, A., Hald, B. y 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 - 2015*: 89-89.
- Chai, L. C., Robin, T., Ragavan, U. M., Gunsalam, J. W., Bakar, F. A., Ghazali, F. M., Radu, S. y Kumar, M. P. (2007) "Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia", *International Journal of Food Microbiology*, 117(1): 106-111.
- Chaisowwong, W., Kusumoto, A., Hashimoto, M., Harada, T., Maklon, K. y Kawamoto, K. (2012) "Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat", *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(1): 43-50.
- Chantarapanont, W., Berrang, M. E. y Frank, J. F. (2004) "Direct microscopic observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skin treated with selected chemical sanitizing agents", *Journal of Food Protection*, 67(6): 1146-1152.
- Chon, J. W., Kim, H. S., Kim, D. H., Kim, Y. J., Sung, K., Kim, H. y Seo, K. H. (2017) "Efficacy of syringe filtration for the selective isolation of *Campylobacter* from chicken carcass rinse", *Journal of Food Protection*, 80(6): 1050-1053.

- Chon, J. W., Kim, Y. J., Rashid, F., Sung, K., Khan, S., Kim, H. y Seo, K. H. (2018) "Improvement of Bolton broth by supplementation with tazobactam for the isolation of *Campylobacter* from chicken rinses", *Poultry Science*, 97(1): 289-293.
- Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K. y Yugi, H. (1997) "Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene", *The Journal of Veterinary Medical Science*, 59(11): 1011-1015.
- Chynoweth, R. W., Hudson, J. A. y Thom, K. (1998) "Aerobic growth and survival of *Campylobacter jejuni* in food and stream water", *Letters in Applied Microbiology*, 27(6): 341-344.
- Clark, A. G. y Bueschgens, D. H. (1986) "Survival and growth of *Campylobacter jejuni* in egg yolk and albumen", *Journal of Food Protection*, 49(2): 135-141.
- Clay, C. E. y Board, R. G. (1991) "Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated hens' shell eggs", *Epidemiology & Infection*, 106(2): 271-281.
- Cogan, T. A., Bloomfield, S. F. y Humphrey, T. J. (1999) "The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen", *Letters in Applied Microbiology*, 29(5): 354-358.
- Cogan, T. A., Domingue, G., Lappin-Scott, H. M., Benson, C. E., Woodward, M. J. y Humphrey, T. J. (2001) "Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media", *International Journal of Food Microbiology*, 70(1-2): 131-141.
- Cohen, D. I., Rouach, T. M. y Rogol, M. (1984) "A *Campylobacter* enteritis outbreak in a military base in Israel", *Israel Journal of Medical Sciences*, 20(3): 216-218.
- Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O. y Obi, C. L. (2002) "Human campylobacteriosis in Developing Countries¹", *Emerging Infectious Diseases*, 8(3): 237-243.
- Colles, F. M., Ali, J. S., Sheppard, S. K., McCarthy, N. D. y Maiden, M. C. J. (2011) "*Campylobacter* populations in wild and domesticated mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)", *Environmental Microbiology Reports*, 3(5): 574-580.
- Colles, F. M., Dingle, K. E., Cody, A. J. y 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(11): 3583-3590.
- Colles, F. M., McCarthy, N. D., Layton, R. y Maiden, M. C. J. (2011) "The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age", *PLOS ONE*, 6(12): e22825.
- Corry, J. E. L., Post, D. E., Colin, y Laisney, M. J. (1995) "Culture media for the isolation of campylobacters", *International Journal of Food Microbiology*, 26(1): 43-76.
- Cortés, C., de la Fuente, R., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J. C., Martínez, S. y Orden, J. A. (2006) "A survey of *Salmonella* spp and *Campylobacter* spp in dairy goat faeces and bulk tank milk in the Murcia region of Spain", *Irish Veterinary Journal*, 59(7): 391-393.
- Coward, C., Diemen, P. M. van, Conlan, A. J. K., Gog, J. R., Stevens, M. P., Jones, M. A. y Maskell D. J. (2008). "Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit variable population structures *in vivo*", *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12): 3857-3867.
- Cox, J. M. y Pavic, A. (2010) "Advances in enteropathogen control in poultry production", *Journal of Applied Microbiology*, 108(3): 745-755.
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J. y Fedorka-Cray: J. (2009) "*Campylobacter* species occurrence within internal organs and tissues of commercial caged Leghorn laying hens", *Poultry Science*, 88(11): 2449-2456.

- Cox, N. A., Richardson, L. J., Maurer, J. J., Berrang, M. E., Fedorka-Cray: J., Buhr, R. J., Byrd, J. A., Lee, M. D., Hofacre, C. L., O'Kane: M., Lammerding, A. M., Clark, A. G., Thayer, S. G. y Doyle, M. P. (2012) "Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny", *Journal of Food Protection*, 75(10): 1896-1902.
- Cox, N. A., Stern, N. J., Craven, S. E., Berrang, M. E. y Musgrove, M. T. (2000) "Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in the cecal droppings of turkeys during production", *The Journal of Applied Poultry Research*, 9(4): 542-545.
- Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A. y Fedorka-Cray: (2000) "Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings", *Avian Diseases*, 44(3): 715-720.
- Crushell, E., Harty, S., Sharif, F. y Bourke, B. (2004) "Enteric *Campylobacter*: purging its secrets?", *Pediatric Research*, 55(1): 3-12.
- Daglia, M. (2012) "Polyphenols as antimicrobial agents", *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 174-181.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E. y Groß, U. (2010) "*Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms", *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4): 205-211.
- Debruyne, L., Gevers, D. y Vandamme: (2008) "Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*", *Campylobacter, Third Edition*: 3-25.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P. y Sternon, J. (1972) "Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures", *The Journal of Infectious Diseases*, 125(4): 390-392.
- Dipineto, L., Gargiulo, A., Bossa, L. M. D. L., Rinaldi, L., Borrelli, L., Menna, L. F. y Fioretti, A. (2008) "Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in pheasants (*Phasianus colchicus*)", *Avian Pathology*, 37(5): 507-508.
- Dipineto, L., Russo, T. P., Gargiulo, A., Borrelli, L., Bossa, L. M. D. L., Santaniello, A., Buonocore, P., Menna, L. F. y Fioretti, A. (2014) "Prevalence of enteropathogenic bacteria in common quail (*Coturnix coturnix*)", *Avian Pathology*, 43(6): 498-500.
- Domingues, A. R., Pires, S. M., Halasa, T. y Hald, T. (2012) "Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections", *Epidemiology & Infection*, 140(6): 970-981.
- DOUE (2003) "Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo", *Diario Oficial de la Unión Europea*, 325: 31-40.
- DOUE (2009) "Reglamento (CE) n° 1099/2009 del Consejo, de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza", *Diario Oficial de la Unión Europea*, 303: 1-30.
- DOUE (2011) "Reglamento (UE) n° 517/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al objetivo de la Unión de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonela en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifican el Reglamento (CE) n° 2160/2003 y el Reglamento (UE) n° 200/2010 de la Comisión" *Diario Oficial de la Unión Europea*, 138: 45-51.
- Doyle, M. (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", *Applied and Environmental Microbiology*, 47(3): 533-536.
- Doyle, M. P. y Roman, D. J. (1981) "Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH", *Journal of Food Protection*, 44(8): 596-601.
- Doyle, M. P. y Roman, D. J. (1982a) "Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk.", *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5): 1154-1158.
- Doyle, M. P. y Roman, D. J. (1982b) "Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying", *Journal of Food Protection*, 45(6): 507-510.
- Drancourt, M. y Raoult, D. (2007) "Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2): 83.
- Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M. y Domingues, F. C. (2016) "Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp.", *Food Control*, 61: 115-122.
- Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainger, W. y Bates, M. (1997) "Campylobacteriosis in New Zealand: results of a case-control study.", *Journal of Epidemiology and Community Health*, 51(6): 686-691.
- ECDC (2018) "Campylobacteriosis" - *Annual Epidemiological Report for 2015, European Centre for Disease Prevention and Control*.
- Economou, V., Zisides, N., Gousia, P., Petsios, S., Sakkas, H., Soultos, N. y Papadopoulou, C. (2015) "Prevalence and antimicrobial profile of *Campylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey", *Food Control*, 56: 161-168.
- Effler, P., Jeong, M. C., Kimura, A., Nakata, M., Burr, R., Cremer, E. y Slutsker, L. (2001) "Sporadic *Campylobacter jejuni* infections in Hawaii: associations with prior antibiotic use and commercially prepared chicken", *The Journal of Infectious Diseases*, 183(7): 1152-1155.
- EFSA (2010a) "Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates", *EFSA Journal*, 8(3): 1503.
- EFSA (2010b) "Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008 - Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples", *EFSA Journal*, 8(8): 1522.
- EFSA (2010c) "Scientific Opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU", *EFSA Journal*, 8(1): 1437.
- EFSA (2011) "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(4): 2105.
- EFSA (2015a) "The European Union summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2014", *EFSA Journal*, 13(12): 4329.
- EFSA (2015b) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013", *EFSA Journal*, 13(1): 3991.
- EFSA (2017) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016", *EFSA Journal*, 15(12):5077.

- EFSA (2018) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017", *EFSA Journal*, 16(12):550.
- EFSA (2005) "Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs", *EFSA Journal*, 3(4): 173.
- Ekdahl, K. y Giesecke, J. (2004) "Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, campylobacter and giardia infection as examples", *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 9(9): 6-9.
- Ellerbroek, L. I., Lienau, J.-A. y Klein, G. (2010) "*Campylobacter* spp. in broiler flocks at farm level and the potential for cross-contamination during slaughter", *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8): 81-88.
- Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Morris, V., Sowa, A., Harris, J., Atterbury, R., Sparks, N. y Allen, V. (2012) "Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry", *Epidemiology and Infection*, 140(5): 916-924.
- Emmanue-Nonga, H. y Muhairwa, A. (2009) "Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* isolates from free range domestic duck (*Cairina moschata*) in Morogoro municipality, Tanzania", *Tropical animal health and production*, 42: 165-72.
- Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Byrd, J. A., Petrujkić, B. T., Sedej, I., Beier, R. C., Phillips, T. D., Hume, M. E., Anderson, R. C. y Nisbet, D. J. (2015) "Comparative effect of thymol or its glucose conjugate, thymol- β -D-glucopyranoside, on *Campylobacter* in avian gut contents", *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50(1): 55-61.
- Evans, M. R., Lane, W., Frost, J. A. y Nylen, G. (1998) "A *Campylobacter* outbreak associated with stir-fried food", *Epidemiology and Infection*, 121(2): 275-279.
- Evans, M. R., Roberts, R. J., Ribeiro, C. D., Gardner, D. y Kembrey, D. (1996) "A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit", *Epidemiology and Infection*, 117(3): 457-462.
- Evans, S. J. y Sayers, A. R. (2000) "A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain", *Preventive Veterinary Medicine*, 46(3): 209-223.
- FAO/OMS (2003) "Evaluación de Riesgos de *Campylobacter* spp. en Pollos Para Asar y *Vibrio* Spp. en Pescados Y Mariscos" *Consultas sobre inocuidad de los alimentos*, Estudio FAO alimentación y nutrición 75.
- Fermér, C. y Engvall, E. O. (1999) "Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*", *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10): 3370-3373.
- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G. y Glünder, 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(10): 78543.
- Fitzgerald, C., Hesel, L. O., Nicholson, M. A., Olsen, S. J., Swerdlow, D. L., Flahart, R., Sexton, J. y Fields: I. (2001) "Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler", *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7): 2386-2390.
- Fonseca, B. B., Beletti, M. E., de Melo, R. T., Mendonça, E. P., Coelho, L. R., Nalevaiko: C. y Rossi, D. A. (2014) "*Campylobacter jejuni* in commercial eggs", *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 76-79.

- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D. y Marrs, C. F. (2005) "Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies", *Epidemiologic perspectives & innovations: EP+I*, 2: 10-18.
- Franklin, B. y Ulmer, D. D. (1974) "Human infection with *Vibrio Fetus*", *The Western Journal of Medicine*, 120(3): 200-204.
- Fraser, R. W., Williams, N. T., Powell, L. F. y Cook, A. J. C. (2010) "Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on-farm biosecurity measures", *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8): 109-115.
- Friedman, C. R., Neimann, J., Wegener, H. C. y Tauxe, R. V. (2000) "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations", en *Campylobacter*. 2 edn, vol. II/6, ASM International, Washington, USA: 121-138.
- Gabriele-Rivet, V., Fairbrother, J.H., Tremblay, D., Harel, J., Côté, N. y Arsenault, J. (2016) "Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Coxiella burnetii*, and Newcastle disease virus in feral pigeons (*Columba livia*) in public areas of Montreal, Canada", *Canadian Journal of Veterinary Research*, 80(1): 81-85.
- García, F. J., Abad, J. C., Serrano, T., Frías N., Castro, M., y Lorente, S. (2013) "Epidemiología de *Campylobacter* en avicultura", en *Simposio WPSA-AECA*. 50 Congreso científico de avicultura.
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., de Jonge, R., Denis, M., Federighi, M. y Ritz, M. (2008) "Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature", *Current Microbiology*, 56(4): 293-297.
- Genigeorgis, C., Hassuneh, M. y Collins: (1986) "*Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughtering", *Journal of Food Protection*, 49(11): 895-903.
- van Gerwe, T., Mifflin, J. K., Templeton, J. M., Bouma, A., Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W. F., Stegeman, A. y Klinkenberg, D. (2009) "Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks", *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3): 625-628.
- Ghareeb, K., Awad, W. A., Mohnl, M., Porta, R., Biarnés, M., Böhm, J. y Schatzmayr, G. (2012) "Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens", *Poultry Science*, 91(8): 1825-1832.
- Gibbens, J. C., Pascoe, S. J. S., Evans, S. J., Davies, R. H. y Sayers, A. R. (2001) "A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens", *Preventive Veterinary Medicine*, 48(2): 85-99.
- Gilbert, M. J., Zomer, A. L., Timmerman, A. J., Spaninks, M. P., Rubio-García, A., Rossen, J. W., Duim, B. y Wagenaar, J. A. (2018) "*Campylobacter blaseri* sp. nov., isolated from common seals (*Phoca vitulina*)", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5): 1787-1794.
- Gilliss, D., Cronquist, A. B., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K., Lathrop, S., Zansky, S., Cieslak: R., Dunn, J., Holt, K. G., Lance, S., Crim, S. M., Henao, O. L., Patrick, M., Griffin: M. y Tauxe, R. V. (2013) "Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food — Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996–2012", *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(15): 283-287.
- Girardo, P., Reverdy, M. E., Martra, A. y Fleurette, J. (1989) "Determination of bactericidal minimum concentrations of 3 antiseptics and 1 disinfectant on 580 hospital gram-negative bacilli", *Pathologie-Biologie*, 37(5 Pt 2): 605-611.

- González, M. y Hänninen, M.-L. (2012) "Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of *Campylobacter jejuni* in well water: application of the Weibull model", *Journal of Applied Microbiology*, 113(2): 284-293.
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnell, W. y Harper, W. E. S. (1989) "Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4): 397-405.
- Goossens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van den Borre, C. y Butzler, J. P. (1986) "Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium, and a filtration system", *Journal of Clinical Microbiology*, 24(5): 840-843.
- Gormley, F. J., Bailey, R. A., Watson, K. A., McAdam, J., Avendaño, S., Stanley, W. A. y Koerhuis, A. N. M. (2014) "*Campylobacter* colonization and proliferation in the broiler chicken upon natural field challenge is not affected by the bird growth rate or breed", *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21): 6733-6738.
- Gradel, K. O., Andersen, J. y Madsen, M. (2002) "Comparisons of sampling procedures and time of sampling for the detection of *Salmonella* in Danish infected chicken flocks raised in floor systems", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1): 21-30.
- Graham, J. P., Vasco, K. y Trueba, G. (2016) "Hyperendemic *Campylobacter jejuni* in guinea pigs (*Cavia porcellus*) raised for food in a semi-rural community of Quito, Ecuador", *Environmental microbiology reports*, 8(3): 382-387.
- Grant, I. H., Richardson, N. J. y Bokkenheuser, V. D. (1980) "Broiler chickens as potential source of *Campylobacter* infections in humans.", *Journal of Clinical Microbiology*, 11(5): 508-510.
- Grant, K. A. y Park, S. F. (1995) "Molecular characterization of katA from *Campylobacter jejuni* and generation of a catalase-deficient mutant of *Campylobacter coli* by interspecific allelic exchange", *Microbiology*, 141 (Pt 6): 1369-1376.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D. W., Stern, N. J. y Corn, J. L. (1997) "Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: Source, time of colonization, and prevalence", *Avian Diseases*, 41(4): 890-898.
- Griffin, M. R., Dalley, E., Fitzpatrick, M. y Austin, S. H. (1983) "*Campylobacter* gastroenteritis associated with raw clams", *The Journal of the Medical Society of New Jersey*, 80(8): 607-609.
- Griffiths: L. y Park, R. W. A. (1990) "Campylobacters associated with human diarrhoeal disease", *Journal of Applied Bacteriology*, 69(3): 281-301.
- Gruntar, I., Biasizzo, M., Kušar, D., Pate, M. y Ocepek, M. (2015) "*Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level", *Food Microbiology*, 50: 97-101.
- Guerry: (2007) "*Campylobacter* flagella: not just for motility", *Trends in Microbiology*, 15(10): 456-461.
- Guévremont, E., Higgins, R. y Quessy, S. (2004) "Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans", *Journal of Food Protection*, 67(2): 228-234.
- Gupta, A., Nelson, J. M., Barrett, T. J., Tauxe, R. V., Rossiter, S. P., Friedman, C. R., NARMS Working Group (2004). "Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001". *Emerging infectious diseases*, 10(6): 1102-1109.

- Gutiérrez, C. B., Rodríguez Barbosa, J. I., Suárez, J., González, O. R., Tascón, R. I. y Rodríguez Ferri, E. F. (1995) "Efficacy of a variety of disinfectants against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *American Journal of Veterinary Research*, 56(8): 1025-1029.
- Gutiérrez-Martín, C. B., Yubero, S., Martínez, S., Frandoloso, R. y Rodríguez-Ferri, E. F. (2011) "Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylobacter jejuni* strains by a suspension test", *Research in Veterinary Science*, 91(3): 44-47.
- Haba, J. H. (1993) "Incidence and control of *Campylobacter* in foods", *Microbiología: Publicación de la Sociedad Española de Microbiología* 9: 57-65.
- Hald, B., Skov, M. N., Nielsen, E. M., Rahbek, C., Madsen, J. J., Wainø, M., Chriél, M., Nordentoft, S., Baggesen, D. L. y Madsen, M. (2016) "*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58: 11.
- Hald, B., Skovgård, H., Pedersen, K. y Bunkenborg, H. (2008) "Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses", *Poultry Science*, 87(7): 1428-1434.
- Hald, B., Sommer, H. M. y Skovgård, H. (2007) "Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses", *Emerging Infectious Diseases*, 13(12): 1951-1953.
- Hald, B., Wedderkopp, A. y Madsen, M. (2000) "Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks", *Avian Pathology*, 29(2): 123-131.
- Han, Z., Willer, T., Pielsticker, C., Gerzova, L., Rychlik, I. y Rautenschlein, S. (2016) "Differences in host breed and diet influence colonization by *Campylobacter jejuni* and induction of local immune responses in chicken", *Gut Pathogens*, 8: 56.
- Hannu, T., Mattila, L., Rautelin, H., Siitonen, A. y Leirisalo-Repo, M. (2005) "Three cases of cardiac complications associated with *Campylobacter jejuni* infection and review of the literature", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 24(9): 619-622.
- Hansson, I., Engvall, E. O., Lindblad, J., Gunnarsson, A. y Vågsholm, I. (2004) "Surveillance programme for *Campylobacter* species in Swedish broilers, July 2001 to June 2002", *The Veterinary Record*, 155(7): 193-196.
- Hansson, I., Engvall, E. O., Vågsholm, I. y Nyman, A. (2010a) "Risk factors associated with the presence of *Campylobacter*-positive broiler flocks in Sweden", *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1): 114-121.
- Hansson, I., Forshell, L. P., Gustafsson, P., Boqvist, S., Lindblad, J., Engvall, E. O., Andersson, Y. y Vågsholm, I. (2007a) "Summary of the Swedish *Campylobacter* program in broilers, 2001 through 2005", *Journal of Food Protection*, 70(9): 2008-2014.
- Hansson, I., Pudas, N., Harbom, B. y Engvall, E. O. (2010b) "Within-flock variations of *Campylobacter* loads in caeca and on carcasses from broilers", *International Journal of Food Microbiology*, 141(1): 51-55.
- Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R. y Engvall, E. O. (2018) "Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis", *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(S1): 30-48.
- Hansson, I., Vågsholm, I., Svensson, L. y Engvall, E. O. (2007b) "Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks", *Journal of Applied Microbiology*, 103(3): 640-649.

- Harris, N. V., Weiss, N. S. y Nolan, C. M. (1986) "The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis", *American Journal of Public Health*, 76(4): 407-411.
- Helms, M., Simonsen, J., Olsen, K. E. P. y Mølbak, K. (2005) "Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* Species: A registry-based cohort study", *The Journal of Infectious Diseases*, 191(7): 1050-1055.
- Hendrixson, D. R., Akerley, B. J. y DiRita, V. J. (2001) "Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility", *Molecular Microbiology*, 40(1): 214-224.
- Hendrixson, D. R. y DiRita, V. J. (2004) "Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract", *Molecular Microbiology*, 52(2): 471-484.
- Henry, I., Reichardt, J., Denis, M. y Cardinale, E. (2011) "Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean)", *Preventive Veterinary Medicine*, 100(1): 64-70.
- Herman, L., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Vandekerchove, D., Rollier, I. y De Zutter, L. (2003) "Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse.", *Epidemiology and Infection*, 131(3): 1169-1180.
- Hermans, D., Martel, A., van Deun, K., van Immerseel, F., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2011a) "The cinnamon-oil ingredient trans-cinnamaldehyde fails to target *Campylobacter jejuni* strain KC 40 in the broiler chicken cecum despite marked in vitro activity", *Journal of Food Protection*, 74(10): 1729-1734.
- Hermans, D., Martel, A., Garmyn, A., Verlinden, M., Heyndrickx, M., Gantois, I., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2012) "Application of medium-chain fatty acids in drinking water increases *Campylobacter jejuni* colonization threshold in broiler chicks", *Poultry Science*, 91(7): 1733-1738.
- Hermans, D., Martel, A., Van Deun, K., Verlinden, M., Van Immerseel, F., Garmyn, A., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2010) "Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids", *Poultry Science*, 89(6): 1144-1155.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K. y Haesebrouck, F. (2011b) "Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*", *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(2): 89-98.
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. y Pasmans, F. (2011c) "Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut", *Veterinary Research*, 42(1): 82.
- Hermans, D., Van Deun, K., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M. y Pasmans, F. (2011d) "*Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research", *Veterinary Microbiology*, 152(3): 219-228.
- Hermans, D., Van Steendam, K., Verbrugge, E., Verlinden, M., Martel, A., Seliwiorstow, T., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., De Zutter, L., Deforce, D. y Pasmans, F. (2014) "Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens", *Veterinary Research*, 45(1): 27.
- Hernández-Haba, J. y Hernández-Giménez, E. (2007) "*Campylobacter*, líder en patología intestinal infecciosa". Discurso de recepción de académico electo y discurso de contestación de académico numerario. Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana.

- Herve, J., Aissa, N., Legrand, P., Sorkine, M., Calmette, M. J., Santin, A., Roupie, E. y Renaud, B. (2004) "*Campylobacter fetus* meningitis in a diabetic adult cured by imipenem", *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(9): 722-724.
- Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S. y Madsen, M. (2001) "Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks", *Letters in Applied Microbiology*, 33(4): 269-274.
- Hiett, Kelli L., Cox, N. A., Buhr, R. J. y Stern, N. J. (2002a) "Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens", *Current Microbiology*, 45(6): 400-404.
- Hiett, Kelli L., Cox, N. A. y Stern, N. J. (2002b) "Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples", *Avian Diseases*, 46(1): 219-223.
- Hiett, K. L., Siragusa, G. R., Cox, N. A., Buhr, R. J., Musgrove, M. T., Stern, N. J. y Wilson, J. L. (2003) "Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from the gastrointestinal tracts and the reproductive tracts of broiler breeder roosters", *Avian Diseases*, 47(2): 406-414.
- Hiett, K. L., Stern, N. J., Fedorka-Cray, P., Cox, N. A., Musgrove, M. T. y Ladely, S. (2002c) "Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations", *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 6220-6236.
- Hofshagen, M. y Kruse, H. (2005) "Reduction in flock prevalence of *Campylobacter* spp. in broilers in Norway after implementation of an action plan", *Journal of Food Protection*, 68(10): 2220-2223.
- Hollamby, S., Sikarskie, J. G. y Stuht, J. (2003) "Survey of peafowl (*Pavo cristatus*) for potential pathogens at three Michigan zoos", *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 34(4): 375-379.
- Holt, J. G. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hong, C. B. y Donahue, J. M. (1989) "Campylobacteriosis in an aborted equine fetus", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194(2): 263-264.
- Hong, S. H., Kim, H. S. y Yoon, K. S. (2016) "Survival and risk comparison of *Campylobacter jejuni* on various processed meat products", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6): 580.
- Hou, S., Wu, X., Zhou, Y., He, y Chen, S. (2018) "Use of syringe filters to isolate *Campylobacter* species from stool samples", *Journal of Microbiological Methods*, 155: 78-81.
- Hsieh, Y.-H., Simpson, S., Kerdahi, K. y Sulaiman, I. M. (2018) "A comparative evaluation study of growth conditions for culturing the isolates of *Campylobacter* spp.", *Current Microbiology*, 75(1): 71-78.
- Huang, J. L., Xu, H. Y., Bao, G. Y., Zhou, X. H., Ji, D. J., Zhang, G., Liu, H., Jiang, F., Pan, Z. M., Liu, X. F. y Jiao, X. A. (2009) "Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients", *Epidemiology & Infection*, 137(8): 1111-1120.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M.-J., Allain, V., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., Quesne, S., Gloaguen: Y., Picherot, M., Santolini, J., Salvat, G., Bougeard, S. y Chemaly, M. (2010) "Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse", *Food Microbiology*, 27(8): 992-999.
- Hugdahl, M. B., Beery, J. T. y Doyle, M. P. (1988). "Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*", *Infection and Immunity*, 56(6):1560-1566.

- Humphrey, T. J., Henley, A. y Lanning, D. G. (1993) "The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations.", *Epidemiology and Infection*, 110(3): 601-607.
- Humphrey, T. J., Martin, K. W., Slader, J. y Durham, K. (2001) "*Campylobacter* spp. in the kitchen: spread and persistence", *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6): 115S-120S.
- Humphrey, T., O'Brien, S. y Madsen, M. (2007) "Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective", *International Journal of Food Microbiology*, 117(3): 237-257.
- Hutchinson, D. N. y Bolton, F. J. (1984) "Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens.", *Journal of Clinical Pathology*, 37(8): 956-957.
- Hwang, M.-N. y Ederer, G. M. (1975) "Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci", *Journal of Clinical Microbiology*, 1(1): 114-115.
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H. D., Ahmed, B., Call, D. R. y Beyenal, H. (2012) "Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4): 1033-1038.
- Inglis, G. D. y Kalischuk, L. D. (2003) "Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces", *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3435-3447.
- Inglis, G. D., McAllister, T. A., Larney, F. J. y Topp, E. (2010) "Prolonged survival of *Campylobacter* species in bovine manure compost", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4): 1110-1119.
- Ingesa-Capaccioni, S., Catalá-Gregori, P., Morais-Ezquerro, S., Maqueira-Catalá, A., Vega-García, S., Marco Jiménez, F. y Martín-Orenga, C. (2015a) "*Campylobacter*: una bacteria difícil de identificar. ¿puede la innovación servir para controlarla a nivel de campo?" en. *Simposio WPSA-AECA*. 52 Congreso científico de avicultura.
- Ingesa-Capaccioni, S., González-Bodí, S., Jiménez-Trigos, E., Marco-Jiménez, F., Catalá, P., Vega, S. y Marin, C. (2015b) "Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp.", *Poultry Science*, 94(4): 766-771.
- Inns, T., Foster, K. y Gorton, R. (2010) "Cohort study of a campylobacteriosis outbreak associated with chicken liver parfait, United Kingdom, June 2010", *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 15(44): 19704.
- Iovine, N. M. (2013) "Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*", *Virulence*, 4(3): 230-240.
- ISO (2017) "Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method", ISO 10272-1:2017.
- Ito, K., Kubokura, Y., Kaneko, K., Totake, Y. y Ogawa, M. (1988) "Occurrence of *Campylobacter jejuni* in free-living wild birds from Japan", *Journal of Wildlife Diseases*, 24(3): 467-470.
- Jacobs-Reitsma, W. F. (1995) "*Campylobacter* bacteria in breeder flocks", *Avian Diseases*, 39(2): 355-359.
- Jacobs-Reitsma, W. F., van de Giessen, A. W., Bolder, N. M. y Mulder, R. W. (1995) "Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms", *Epidemiology and Infection*, 114(3): 413-421.
- Jain, D., Prasad, K. N., Sinha, S. y Husain, N. (2008) "Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains", *Journal of Medical Microbiology*, 57(3): 267-272.

- Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R. y Nygård, K. (2008) "A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety", *BMC infectious diseases*, 8: 128.
- Jiménez, M., Soler, P., Venanzi, J. D., Canté, P., Varela, C. y Martínez Navarro, F. (2005) "An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain", *Euro Surveillence: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 10(4): 118-121.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E. K., Sherman, y Chan, V. L. (2001) "JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells", *Molecular Microbiology*, 39(5): 1225-1236.
- Jiwa, S. F. H., Kazwala, R. R. y Namahungu, E. (1994) "Prevalence of *Campylobacter* spp. in clinically normal goats kept under various management systems in urban Tanzania", *Small Ruminant Research*, 15(1): 97-100.
- Jo, Y., Oh, H.-M., Yoon, Y., Lee, S.-Y., Ha, J.-H., Kim, W.-I., Kim, H.-Y., Han, S. y Kim, S.-R. (2017) "Enrichment broth for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in fresh produce and poultry", *Journal of Food Protection*: 1842-1850.
- Johnson, T. J., Shank, J. M. y Johnson, J. G. (2017) "Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans", *Frontiers in Microbiology*, 8: 487.
- Jones, D. M., Sutcliffe, E. M. y Curry, A. (1991) "Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*", *Journal of General Microbiology*, 137(10): 2477-2482.
- Jones, F. S., Orcutt, M. y Little, R. B. (1931) "Vibrios (*Vibrio jejuni*, N.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves", *Journal of Experimental Medicine*, 53(6): 853-863.
- Jones, F. t., Axtell, R. c., Rives, D. v., Scheideler, S. e., Tarver, F. r., Walker, R. l. y Wineland, M. j. (1991) "A survey of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing systems", *Journal of Food Protection*, 54(4): 259-262.
- Jones, K. (2001) "Campylobacters in water, sewage and the environment", *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6): 68S-79S.
- de Jong, A. E. I., van Asselt, E. D., Zwietering, M. H., Nauta, M. J. y de Jonge, R. (2012) "Extreme heat resistance of food borne pathogens *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Typhimurium on chicken breast fillet during cooking", *International Journal of Microbiology*, 2012: 196841.
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B. T., Borck, B., Ethelberg, S., Hakkinen, M., Kuusi, M., Reiersen, J., Hansson, I., Olsson Engvall, E., Løfdahl, M., Wagenaar, J. A., van Pelt, W. y Hofshagen, M. (2010) "Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007", *Preventive Veterinary Medicine*, 93(1): 33-41.
- Joshua, G. W. P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V. y Wren, B. W. (2006) "Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*", *Microbiology*, 152(2): 387-396.
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M. y Man, S. M. (2015) "Global epidemiology of *Campylobacter* infection", *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3): 687-720.
- Kaiser, P., Howell, M. M. J., Fife, M., Sadeyen, J.-R., Salmon, N., Rothwell, L., Young, J., Poh, T.-Y., Stevens, M., Smith, J., Burt, D., Swaggerty, C. y Kogut, M. (2009) "Towards the selection of chickens resistant to *Salmonella* and *Campylobacter* infections", *Bulletin Et Memoires De l'Academie Royale De Medecine De Belgique*, 164(1-2): 17-26.

- Kálmán, M., Szöllösi, E., Czermann, B., Zimányi, M., Szekeres, S. y Kálmán, M. (2000) "Milkborne *Campylobacter* infection in Hungary", *Journal of Food Protection*, 63(10): 1426-1429.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.-L., Foss, M., Lau: C., Sanders, G., Austin, J., Kelly, J. y Szymanski, C. M. (2006) "Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation", *Journal of Bacteriology*, 188(12): 4312-4320.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N. H., Ostroff, S. M. y Lassen, J. (1992) "Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway", *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12): 3117-3121.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S. M. y Potter, M. (1993) "Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks", *Epidemiology and Infection*, 111(2): 245-255.
- Karagiannis, I., Sideroglou, T., Gkolfinopoulou, K., Tsouri, A., Lampousaki, D., Velonakis, E. N., Scoulica, E. V., Mellou, K., Panagiotopoulos, T. y Bonovas, S. (2010) "A waterborne *Campylobacter jejuni* outbreak on a Greek island", *Epidemiology and Infection*, 138(12): 1726-1734.
- Karki, A. B., Marasini, D., Oakey, C. K., Mar, K. y Fakhr, M. K. (2018) "*Campylobacter coli* from retail liver and meat products is more aerotolerant than *Campylobacter jejuni*", *Frontiers in Microbiology*, 9: 2951.
- Karmali, M. A., De Grandis, S. y Fleming: C. (1981) "Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates.", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(4): 593-597.
- Karmali, M. A., Simor, A. E., Roscoe, M., Fleming: C., Smith, S. S. y Lane, J. (1986) "Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces.", *Journal of Clinical Microbiology*, 23(3): 456-459.
- Kashoma, I. P., Kassem, I. I., Kumar, A., Kessy, B. M., Gebreyes, W., Kazwala, R. R. y Rajashekara, G. (2015) "Antimicrobial resistance and genotypic diversity of *Campylobacter* Isolated from pigs, dairy, and beef cattle in Tanzania", *Frontiers in Microbiology*, 6: 1240.
- Kazwala, R. R., Collins, J. D., Hannan, J., Crinion, R. A. y O'Mahony, H. (1990) "Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production", *The Veterinary Record*, 126(13): 305-306.
- Keener, K. M., Bashor, M. P., Curtis: A., Sheldon, B. W. y Kathariou, S. (2004) "Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(2): 105-116.
- Keller, J. I., Shriver, W. G., Waldenström, J., Griekspoor: y Olsen, B. (2011) "Prevalence of *Campylobacter* in wild birds of the mid-Atlantic region, USA", *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3): 750-754.
- Ketley, J. M. (1997) "Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*", *Microbiology*, 143(1): 5-21.
- Kiess, A. S., Parker, H. M. y McDaniel, C. D. (2010) "Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* ssp. from broiler litter", *Poultry Science*, 89(8): 1755-1762.
- King, E. O. (1957) "Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio", *The Journal of Infectious Diseases*, 101(2): 119-128.
- King, E. O. (1962) "The laboratory recognition of *Vibrio fetus* and a closely related vibrio isolated from cases of human vibriosis", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 98(3): 700-711.

- King, W. L. y Hurst, A. (1963) "A note on the survival of some bacteria in different diluents", *Journal of Applied Bacteriology*, 26(3): 504-506.
- Kinjo, T., Morishige, M., Minamoto, N. y Fukushi, H. (1983) "Prevalence of *Campylobacter jejuni* in feral pigeons", *Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 45(6): 833-835.
- Klančnik, A., Možina, S. S. y Zhang, Q. (2012) "Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*", *PLoS ONE*, 7(12): 51800.
- Klein-Jöbstl, D., Sofka, D., Iwersen, M., Drillich, M. y Hilbert, F. (2016) "Multilocus sequence typing and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy calves in Austria", *Frontiers in Microbiology*, 7: 72.
- Knudsen, K. N., Bang, D. D., Andresen, L. O. y Madsen, M. (2006) "*Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin are invasive in chickens after oral challenge", *Avian Diseases*, 50(1): 10-14.
- Kobierecka, A., Wszyńska, A. K., Gubernator, J., Kuczkowski, M., Wiśniewski, O., Maruszewska, M., Wojtania, A., Derlatka, K. E., Adamska, I., Godlewska, R. y Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2016) "Chicken anti-*Campylobacter* vaccine – comparison of various carriers and routes of immunization", *Frontiers in Microbiology*, 7: 740.
- Koene, M. G. J., Houwers, D. J., Dijkstra, J. R., Duim, B. y Wagenaar, J. A. (2009) "Strain variation within *Campylobacter* species in fecal samples from dogs and cats", *Veterinary Microbiology*, 133(1-2): 199-205.
- Koenraad: M. F. J., Rombouts, F. M. y Notermans, S. H. W. (1997) "Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: A review", *Water Environment Research*, 69(1): 52-63.
- Kohler, R., Krause, G., Beutin, L., Stephan, R. y Zweifel, C. (2008) "Shedding of food-borne pathogens and microbiological carcass contamination in rabbits at slaughter", *Veterinary Microbiology*, 132(1-2): 149-157.
- Komba, E., Mdegela, R., Msoffe, P., Matowo, D. y Maro, M. (2014) "Occurrence, species distribution and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from farm and laboratory animals in Morogoro, Tanzania", *Veterinary World*, 7: 559-565.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Rivera-Amill, V. y Garvis, S. G. (1999) "Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells", *Molecular Microbiology*, 32(4): 691-701.
- Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B. y Mickelson, J. (2004) "Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus", *Journal of Bacteriology*, 186(11): 3296-3303.
- Krause, R., Ramschak-Schwarzer, S., Gorkiewicz, G., Schnedl, W. J., Feierl, G., Wenisch, C. y Reisinger, E. C. (2002) "Recurrent septicemia due to *Campylobacter fetus* and *Campylobacter lari* in an immunocompetent patient", *Infection*, 30(3): 171-174.
- Kumar, A., Drozd, M., Pina-Mimbela, R., Xu, X., Helmy, Y. A., Antwi, J., Fuchs, J. R., Nislow, C., Templeton, J., Blackall: J. y Rajashekara, G. (2016) "Novel anti-*Campylobacter* compounds identified using high throughput screening of a pre-selected enriched small molecules library", *Frontiers in Microbiology*, 7: 405.
- Kwan: S. L., Barrigas, M., Bolton, F. J., French, N. P., Gowland, P., Kemp, R., Leatherbarrow, H., Upton, M. y Fox, A. J. (2008) "Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* populations in dairy cattle, wildlife, and the environment in a farmland area", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16): 5130-5138.

- Lastovica, A. J., Le Roux, E. y Penner, J. L. (1986) "Mixed infections with different species and serotypes of *Campylobacter*", *The Journal of Infectious Diseases*, 154(2): 375.
- Lauwers, S., Boeck, M. D. y Butzler, J. P. (1978) "*Campylobacter* enteritis in Brussels", *The Lancet*, 311(8064): 604-605.
- Lee, M. D. y Newell, D. G. (2006) "*Campylobacter* in Poultry: Filling an ecological niche", *Avian Diseases*, 50(1): 1-9.
- Lehtola, M. J., Pitkänen, T., Miebach, L. y 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(3): 57-61.
- Levy, A. J. (1946) "A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*", *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 18(4): 243-258.1.
- Lillehaug, A., Jonassen, C., Bergsjø, B., Hofshagen, M., Tharaldsen, J., Nesse, L. y Handeland, K. (2005) "Screening of feral pigeon (*Colomba livia*), mallard (*Anas platyrhynchos*) and graylag goose (*Anser anser*) populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., avian Influenza virus and avian Paramyxovirus", *Acta veterinaria Scandinavica*, 46: 193-202.
- Lin, J. (2009) "Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry", *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7): 755-765.
- Lin, J., Overbye Michel, L. y Zhang, Q. (2002) "CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7): 2124-2131.
- Lindblom, G. B., Sjörgren, E. y Kaijser, B. (1986) "Natural *Campylobacter* colonization in chickens raised under different environmental conditions", *The Journal of Hygiene*, 96(3): 385-391.
- 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. y Stern, N. J. (2008) "Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3): 1094-1100.
- Linton, D., Karlyshev, A. V. y Wren, B. W. (2001) "Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from the genome sequence", *Current Opinion in Microbiology*, 4(1): 35-40.
- Linton, D., Owen, R. J. y Stanley, J. (1996) "Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals", *Research in Microbiology*, 147(9): 707-718.
- Lior, H. (1984) "New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and «*Campylobacter laridis*»", *Journal of Clinical Microbiology*, 20(4): 636-640.
- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J. y Gill: (1982) "Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors", *Journal of Clinical Microbiology*, 15(5): 761-768.
- Liu, K. C., Jinneman, K. C., Neal-McKinney, J., Wu, W.-H. y Rice, D. H. (2017) "Simultaneous identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* with smartcycler-based multiplex quantitative polymerase chain reaction", *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(7): 371-378.
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., El-Shibiny, A., Connerton: L., Dillon, E., Scott, A. y Connerton, I. F. (2005) "Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6554-6563.

- Louis, V. R., Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Russek-Cohen, E., Pearson, A. D. y Colwell, R. R. (2005) "Temperature-driven campylobacter seasonality in England and Wales", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 85-92.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J. y Lee, M. D. (2003) "Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken", *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6816-6824.
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K. y Madsen, M. (2004) "Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR", *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11): 5125-5132.
- Luyckx, K., Van Coillie, E., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., Heyndrickx, M. y De Reu, K. (2016) "Identification and biocide susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler houses", *Poultry Science*, 96(4): 938-949.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R. y Hall, E. R. (2012) "*Campylobacter* spp. distribution in biofilms on different surfaces in an agricultural watershed (Elk Creek, British Columbia): Using biofilms to monitor for *Campylobacter*", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(3): 270-278.
- Maertens, H., De Reu, K., Van Weyenberg, S., Van Coillie, E., Meyer, E., Van Meirhaeghe, H., Van Immerseel, F., Vandenbroucke, V., Vanrobaeys, M. y Dewulf, J. (2018) "Evaluation of the hygienogram scores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry houses in Flanders during the period 2007 to 2014", *Poultry Science*, 97(2): 620-627.
- Man, S. M. (2011) "The clinical importance of emerging *Campylobacter* species", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(12): 669-685.
- Marín, C., Soto, V. y Marco-Jimenez, F. (2016) "Short communication: Absence of *Campylobacter* spp. In intensive rabbit farming in eastern Spain, preliminary results", *World Rabbit Science*, 24(4): 327-331.
- Martínez-Martínez, S., Yubero-Delgado, S., Rodríguez-Ferri, E.-F., Frandoloso, R., Álvarez-Estrada, Á. y Gutiérrez-Martín, C.-B. (2016) "*In vitro* efficacy of several disinfectants against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Escherichia coli* strains from poultry", *Ciência Rural*, 46(8): 1438-1442.
- Maurer, A. M. y Stürchler, D. (2000) "A waterborne outbreak of small round structured virus, *Campylobacter* and *Shigella* co-infections in La Neuveville, Switzerland, 1998", *Epidemiology and Infection*, 125(2): 325-332.
- Mazick, A., Ethelberg, S., Nielsen, E. M., Mølbak, K. y Lisby, M. (2006) "An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005", *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(5): 137-139.
- McCrea, B. A., Tonooka, K. H., VanWorth, C., Boggs, C. L., Atwill, E. R. y Schrader, J. S. (2006) "Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry", *Poultry Science*, 85(1): 136-143.
- McDonnell, G. y Russell, A. D. (1999) "Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance", *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1): 147-179.
- McDowell, S. W. J., Menzies, F. D., McBride, S. H., Oza, A. N., McKenna, J. P., Gordon, A. W. y Neill, S. D. (2008) "*Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors", *Preventive Veterinary Medicine*, 84(3-4): 261-276.
- McLinden, T., Sargeant, J. M., Thomas, M. K., Papadopoulos, A. y Fazil, A. (2014) "Component costs of foodborne illness: a scoping review", *BMC Public Health*, 14: 509.

- Mead: S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin: M. y Tauxe, R. V. (1999) "Food-related illness and death in the United States.", *Emerging Infectious Diseases*, 5(5): 607-625.
- Meanger, J. D. y Marshall, R. B. (1989) "*Campylobacter jejuni* infection within a laboratory animal production unit", *Laboratory Animals*, 23(2): 126-132.
- Mégraud, F. (1987) "Isolation of *Campylobacter* spp. from pigeon feces by a combined enrichment-filtration technique.", *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6): 1394-1395.
- Meroz, M. y Samberg, Y. (1995) "Disinfecting poultry production premises", *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 14(2): 273-291.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L. y Heyndrickx, M. (2009) "Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*", *Veterinary Microbiology*, 138(1): 120-131.
- Metcalf, J. H., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Reyes-Herrera, I., Aguiar, V. F., Blore: J. y Donoghue, D. J. (2011) "Water administration of the medium-chain fatty acid caprylic acid produced variable efficacy against enteric *Campylobacter* colonization in broilers", *Poultry Science*, 90(2): 494-497.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Dory, D. y Chemaly, M. (2016) "Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination", *Journal of Applied Microbiology*, 120(5): 1139-1173.
- Meunier, Marine, Guyard-Nicodème, M., Hirschaud, E., Parra, A., Chemaly, M. y Dory, D. (2016) "Identification of novel vaccine candidates against *Campylobacter* through reverse vaccinology", *Journal of Immunology Research*, 2016: 5715790.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Vigouroux, E., Poezevara, T., Beven, V., Quesne, S., Bigault, L., Amelot, M., Dory, D. y Chemaly, M. (2017) "Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers", *PLOS ONE*, 12(11): 0188472.
- Milton, A. A. P., Agarwal, R. K., Priya, G. B., Saminathan, M., Aravind, M., Reddy, A., Athira, C. K., Anjay, Ramees, T. P., Dhama, K., Sharma, A. K. y Kumar, A. (2017) "Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in captive wildlife species of India", *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3): 177.
- Minakshi, null, Dogra, S. C. y Ayyagari, A. (1988) "Isolation of *Campylobacter jejuni* from quails: an initial report", *The British Veterinary Journal*, 144(4): 411-412.
- Misawa, N., Kawashima, K., Kondo, F., Kushima, E., Kushima, K. y Vandamme: (2002) "Isolation and characterization of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea", *Veterinary Microbiology*, 87(4): 353-364.
- Mohammadpour, H., Berizi, E., Hosseinzadeh, S., Majlesi, M. y Zare, M. (2018) "The prevalence of *Campylobacter* spp. in vegetables, fruits, and fresh produce: a systematic review and meta-analysis", *Gut Pathogens*, 10: 41.
- Mohan, V. (2015) "Faeco-prevalence of *Campylobacter jejuni* in urban wild birds and pets in New Zealand", *BMC Research Notes*, 8:1.
- Monselise, A., Blickstein, D., Ostfeld, I., Segal, R. y Weinberger, M. (2004) "A case of cellulitis complicating *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* bacteremia and review of the literature", *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(9): 718-721.
- Moore, J. E., Barton, M. D., Blair, I. S., Corcoran, D., Dooley, J. S. G., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A. J., Lowery, C. J., Matsuda, M., McDowell, D. A., McMahon, A., Millar, B. C., Rao,

- J. R., Rooney: J., Seal, B. S., Snelling, W. J. y Tolba, O. (2006) "The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*", *Microbes and Infection*, 8(7): 1955-1966.
- Moran, L., Kelly, C., Cormican, M., McGettrick, S. y Madden, R. (2011) "Restoring the selectivity of Bolton broth during enrichment for *Campylobacter* spp. from raw chicken", *Letters in applied microbiology*, 52: 614-8.
- Moreno, G. S., Griffiths: L., Connerton, I. F. y Park, R. W. (1993) "Occurrence of campylobacters in small domestic and laboratory animals", *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(1): 49-54.
- Murphy, C., Carroll, C. y Jordan, K. N. (2006) "Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*", *Journal of Applied Microbiology*, 100(4): 623-632.
- Murphy, O., Gray, J., Gordon, S. y Bint, A. J. (1995) "An outbreak of campylobacter food poisoning in a health care setting", *Journal of Hospital Infection*, 30(3): 225-228.
- Musgrove, M. T., Berrang, M. E., Byrd, J. A., Stern, N. J. y Cox, N. A. (2001) "Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment", *Poultry Science*, 80(6): 825-828.
- Nachamkin, I. (2007) "*Campylobacter jejuni*", *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*: 237-248.
- Nachamkin, I., Blaser, M. J. y Tompkins, L. S. (1992) *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. American Society for Microbiology.
- Nachamkin, I., Engberg, J. y Aarestrup, F. M. (2000) "Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species", en: *Campylobacter*. Washington DC, USA: ASM Press: 45-66.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B. y Foster, K. R. (2009) "The sociobiology of biofilms", *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1): 206-224.
- Nauta, M., Hill, A., Rosenquist, H., Brynestad, S., Fetsch, A., van der Logt, P., Fazil, A., Christensen, B., Katsma, E., Borck, B. y Havelaar, A. (2009) "A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat", *International Journal of Food Microbiology*, 129(2): 107-123.
- Neal-McKinney, J. M., Christensen, J. E. y Konkel, M. E. (2010) "Amino-terminal residues dictate the export efficiency of the *Campylobacter jejuni* filament proteins via the flagellum", *Molecular Microbiology*, 76(4): 918-931.
- Neal-McKinney, J. M., Samuelson, D. R., Eucker, T. P., Nissen, M. S., Crespo, R. y Konkel, M. E. (2014) "Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination", *PLoS ONE*, 9(12): 114254.
- Nebola, M., Borilova, G. y Steinhäuserova, I. (2007) "Prevalence of *Campylobacter* subtypes in pheasants (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) in the Czech Republic", *Veterinarni Medicina*, 52: 496-501.
- Neill, S. D., Campbell, J. N. y O'Brien, J. J. (1985) "Egg penetration by *Campylobacter jejuni*", *Avian Pathology*, 14(3): 313-320.
- Neimann, J., Engberg, J., Mølbak, K. y Wegener, H. C. (2003) "A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark", *Epidemiology and Infection*, 130(3): 353-366.
- Neves, M. I., Malkawi, I., Walker, M., Alaboudi, A., Abu-Basha, E., Blake, D. P., Guitian, J. y Crotta, M. (2019) "The transmission dynamics of *Campylobacter jejuni* among broilers in semi-commercial farms in Jordan", *Epidemiology and Infection*, 147: 134.
- Newell, D. G. (2002) "The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment", *International Journal of Infectious Diseases*, 6: 16-21.

- 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. y Allen, V. M. (2011) "Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24): 8605-8614.
- Newell, D. G. y Fearnley, C. (2003) "Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens", *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4343-4351.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., der Giessen, J. van y Kruse, H. (2010) "Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge", *International Journal of Food Microbiology*, 139: 3-15.
- Ng, L. K., Kingombe, C. I., Yan, W., Taylor, D. E., Hiratsuka, K., Malik, N. y Garcia, M. M. (1997) "Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR.", *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4558-4563.
- Nguyen, V. T., Fegan, N., Turner, M. S. y Dykes, G. A. (2012) "Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems", *Journal of Food Protection*, 75(1): 195-206.
- Nichols, G. L. (2005) "Fly transmission of *Campylobacter*", *Emerging Infectious Diseases*, 11(3): 361-364.
- Nichols, G. L., Richardson, J. F., Sheppard, S. K., Lane, C. y Sarran, C. (2012) "*Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011", *BMJ Open*, 2(4): 001179.
- Nielsen, L. N., Luijckx, T. A., Vegge, C. S., Johnsen, C. K., Nuijten, P., Wren, B. W., Ingmer, H. y Kroghfelt, K. A. (2012) "Identification of immunogenic and virulence-associated *Campylobacter jejuni* proteins", *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(2): 113-119.
- Nishiyama, K., Seto, Y., Yoshioka, K., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y. y Mukai, T. (2014) "*Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*", *PloS One*, 9(9): 108827.
- Noor, S. M., Husband, A. J. y Widders: R. (1995) "In ovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens", *British Poultry Science*, 36(4): 563-573.
- Norkrans, G. y Svedhem, Å. (1982) "Epidemiological aspects of *Campylobacter jejuni* enteritis", *Epidemiology & Infection*, 89(1): 163-170.
- Nylen, G., Dunstan, F., Palmer, S., Andersson, Y., Bager, F., Cowden, J., Feierl, G., Galloway, Y., Kapperud, G., Megraud, F., Mølbak, K., R Petersen, L. y Ruutu: (2002) "The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand", *Epidemiology and infection*, 128: 383-90.
- Oakley, B. B., Morales, C. A., Line, J. E., Seal, B. S. y Hiatt, K. L. (2012) "Application of high-throughput sequencing to measure the performance of commonly used selective cultivation methods for the foodborne pathogen *Campylobacter*", *FEMS microbiology ecology*, 79(2): 327-336.
- Odongo, R., Reilly, S. S. y Gilliland, S. E. (2009) "Validation of an improved method for detection of *Campylobacter jejuni* in foods", *Journal of Food Science*, 74(5): 207-212.
- Oh, E. y Jeon, B. (2015) "Synergistic anti-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds", *Frontiers in Microbiology*, 6: 1129.

- Oh, E., McMullen, L. y Jeon, B. (2015) "Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions", *Frontiers in Microbiology*, 6: 695.
- OIE (2017) "Infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*", *The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, chapter 3.9.3. (Acceso: 16 de septiembre de 2019).
- Oliver, J. D. (2010) "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria", *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4): 415-425.
- Olsen, K. N., Lund, M., Skov, J., Christensen, L. S. y Hoorfar, J. (2009) "Detection of *Campylobacter* bacteria in air samples for continuous real-time monitoring of *Campylobacter* Colonization in broiler flocks", *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 2074-2078.
- Olsen, S. J., Hansen, G. R., Bartlett, L., Fitzgerald, C., Sonder, A., Manjrekar, R., Riggs, T., Kim, J., Flahart, R., Pezzino, G. y Swerdlow, D. L. (2001) "An outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with food handler contamination: the use of pulsed-field gel electrophoresis", *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1): 164-167.
- Omurtag, I., Aydin, F., Paulsen, P., Hilbert, F. y Smulders, F. J. M. (2011) "Simple media and conditions for inter-laboratory transport of *Campylobacter jejuni* isolates", *Veterinary Quarterly*, 31(2): 73-75.
- OMS (2018) *Campylobacter*, datos y cifras. *Centro de prensa de la OMS*.
- On, S. L. (2001) "Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns", *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, (30): 1-15.
- Orihuel, E., Bertó, R., Lorenzo, F., Corujo, A., Sanz, M., Milvaques, A. Y Canet, J. J. (2015) *Campylobacter la bacteria discreta*, Betelgeux, S.L.
- Orr, K. E., Lightfoot, N. F., Sisson: R., Harkis, B. A., Tweddle, J. L., Boyd, P., Carroll, A., Jackson, C. J., Wareing, D. R. y Freeman, R. (1995) "Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis.", *Epidemiology and Infection*, 114(1): 15-24.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. y Kolter, R. (2000) "Biofilm formation as microbial development", *Annual Review of Microbiology*, 54: 49-79.
- Oyarzabal, O. A., Conner, D. E. y Hoerr, F. J. (1995) "Incidence of campylobacters in the intestine of avian species in Alabama", *Avian Diseases*, 39(1): 147-151.
- Oyarzabal, O. A. y Fernández, H. (2016) "Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. in Poultry", en: *Campylobacter spp. and related organisms in poultry*. Springer, Cham.
- Oyarzabal, O., Backert, S., Nagaraj, M., Miller, R., K Hussain, S. y A Oyarzabal, E. (2007) "Efficacy of supplemented buffered peptone water for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from broiler retail products", *Journal of microbiological methods*, 69: 129-36.
- Pacha, R. E., Clark, G. W., Williams, E. A. y Carter, A. M. (1988) "Migratory birds of central Washington as reservoirs of *Campylobacter jejuni*", *Canadian Journal of Microbiology*, 34(1): 80-82.
- Palumbo, S. A. (1986) "*Campylobacter jejuni* in foods: Its occurrence, isolation from foods, and injury", *Journal of Food Protection*, 49(2): 161-166.
- Pär Wanby, B. O. (2001) "Myocarditis in a Patient with *Salmonella* and *Campylobacter* enteritis", *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33(11): 860-862.

- Park, N. Y., Ro, E. Y., Jo, H. J., Park, K. S. y Yoon, K. S. (2014) "Effect of packaging and temperature on survival kinetics of *Campylobacter jejuni* on precooked chicken breast", *Journal of Food Safety*, 34(4): 371-379.
- Park, S. F. (2002) "The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens", *International Journal of Food Microbiology*, 74(3): 177-188.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M.-A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H. M., Whitehead, S. y Barrell, B. G. (2000) "The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences", *Nature*, 403(6770): 665-668.
- Pasquali, F., Cesare, A. D., Manfreda, G. y Franchini, A. (2011) "*Campylobacter* control strategies in European poultry production", *World's Poultry Science Journal*, 67(1): 5-18.
- Patriarchi, A., Fox, Á., Maunsell, B., Fanning, S. y Bolton, D. (2010) "Molecular characterization and environmental mapping of *Campylobacter* isolates in a subset of Intensive poultry flocks in Ireland", *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1): 99-108.
- Patrick, M. E., Christiansen, L. E., Wainø, M., Ethelberg, S., Madsen, H. y Wegener, H. C. (2004) "Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7474-7480.
- Paul, N. C., Al-Adwani, S., Crespo, R. y Shah, D. H. (2014) "Evaluation of passive immunotherapeutic efficacy of hyperimmunized egg yolk powder against intestinal colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens", *Poultry Science*, 93(11): 2779-2787.
- Pawlowski, S. W., Warren, C. A. y Guerrant, R. (2009) "Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea", *Gastroenterology*, 136(6): 1874-1886.
- Pebody, R. G., Ryan, M. J. y Wall: G. (1997) "Outbreaks of *Campylobacter* infection: rare events for a common pathogen", *Communicable disease report*, 7(3): R33-37.
- Penner, J. L., Hennessy, J. N. y Congi, R. V. (1983) "Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens", *European Journal of Clinical Microbiology*, 2(4): 378-383.
- Peña, F. J. G., Cobo, I. P. y Sarrionandía, A. E. (2006) "Campilobacteriosis: Aspectos clínicos y epidemiológicos. Programas de seguimiento y control", *Profesión veterinaria*, 16(64): 66-74.
- Pérez-Arnedo, I. y González-Fandos, E. (2019) "Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant", *Foods*, 8(3): 111.
- Petersen, L., Nielsen, E. M., Engberg, J., On, S. L. W. y Dietz, H. H. (2001) "Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans", *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 3115-3121.
- Petersen, L, Nielsen, E. M. y On, S. L. W. (2001) "Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks", *Veterinary Microbiology*, 82(2): 141-154.
- Peterson, M C (1994) "Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults.", *Western Journal of Medicine*, 161(2): 148-152.
- Peterson, M. C. (1994) "Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults", *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 23(4): 167-170.

- Piccirillo, A., Giacomelli, M., Lonardi, C., Menandro, M. L., Martini, M. y Grilli, G. (2011) "Absence of thermophilic *Campylobacter* species in commercially reared rabbit does (*Oryctolagus cuniculi*) in Italy", *Veterinary Microbiology*, 150(3-4): 411-413.
- Pitkanen, H. (2015) "Members of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*", en: *Global Water Pathogen Project, Third part*.
- Plastringe, W. N., Williams, L. F. y Trowbridge, D. G. (1964) "Antibiotic sensitivity of physiologic groups of microaerophilic vibrios.", *American Journal of Veterinary Research*, 25: 1295-1299.
- Pokamunski, S., Kass, N., Borochoyich, E., Marantz, B. y Rogol, M. (1986) "Incidence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks monitored from hatching to slaughter", *Avian Pathology*, 15(1): 83-92.
- Pönkä, A., Martio, J. y Kosunen, T. U. (1981) "Reiter's syndrome in association with enteritis due to *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*.", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 40(4): 414-415.
- Potturi-Venkata, L. P., Backert, S., Lastovica, A. J., Vieira, S. L., Norton, R. A., Miller, R. S., Pierce, S. y Oyarzabal, O. A. (2007) "Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers", *Poultry Science*, 86(7): 1304-1311.
- Power, M. E., Alm, R. A. y Trust, T. J. (1992) "Biochemical and antigenic properties of the *Campylobacter* flagellar hook protein.", *Journal of Bacteriology*, 174(12): 3874-3883.
- Prescott, J. F. y Bruin-Mosch, C. W. (1981) "Carriage of *Campylobacter jejuni* in healthy and diarrheic animals", *American Journal of Veterinary Research*, 42(1): 164-165.
- Raji, M. A., Adekeye, J. O., Kwaga, J. K. P. y Bale, J. O. O. (2000) "Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria", *Small Ruminant Research*, 37(3): 215-221.
- Ramabu, S. S., Boxall, N. S., Madie: y Fenwick, S. G. (2004) "Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens", *Letters in Applied Microbiology*, 39(3): 252-256.
- Refrégier-Petton, J., Rose, N., Denis, M. y 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(1): 89-100.
- Reybrouck, G. (1998) "The testing of disinfectants", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3): 269-272.
- Rice, B. E., Rollins, D. M., Mallinson, E. T., Carr, L. y Joseph, S. W. (1997) "*Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection", *Vaccine*, 15(17): 1922-1932.
- Richardson, N. J., Koornhof, H. J. y Bokkenheuser, V. D. (1981) "Long-term infections with *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*.", *Journal of Clinical Microbiology*, 13(5): 846-849.
- Ridley, A. M., Morris, V. K., Cawthraw, S. A., Ellis-Iversen, J., Harris, J. A., Kennedy, E. M., Newell, D. G. y Allen, V. M. (2011a) "Longitudinal molecular epidemiological study of thermophilic campylobacters on one conventional broiler chicken farm", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1): 98-107.
- Ridley, A. M., Toszeghy, M. J., Cawthraw, S. A., Wassenaar, T. M. y Newell, D. G. (2008) "Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine", *Journal of Applied Microbiology*, 105(1): 95-104.
- Ridley, A., Morris, V., Gittins, J., Cawthraw, S., Harris, J., Edge, S. y Allen, V. (2011b) "Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel", *Journal of Applied Microbiology*, 111(1): 233-244.

- Ringoir, D. D. y Korolik, V. (2003) "Colonisation phenotype and colonisation potential differences in *Campylobacter jejuni* strains in chickens before and after passage in vivo", *Veterinary Microbiology*, 92(3): 225-235.
- Ringoir, D. D., Szylo, D. y Korolik, V. (2007) "Comparison of 2-day-old and 14-day-old chicken colonization models for *Campylobacter jejuni*", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(1): 155-158.
- Roberts, T., Shah, A., Graham, J. G. y McQueen, I. N. (1987) "The Miller Fischer syndrome following *Campylobacter* enteritis: a report of two cases.", *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 50(11): 1557-1558.
- Robinson, D. A. (1981) "Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk.", *British Medical Journal*, 282 (6276): 1584-1584.
- Robyn, J., Rasschaert, G., Hermans, D., Pasmans, F. y Heyndrickx, M. (2013) "Is allicin able to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in broilers when added to drinking water?", *Poultry Science*, 92(5): 1408-1418.
- Robyn, J., Rasschaert, G., Pasmans, F. y Heyndrickx, M. (2015) "Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: Risk factors and intervention", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2): 81-105.
- Rodgers, J. D., Clifton-Hadley, F. A., Marin, C. y Vidal, A. B. (2010) "An evaluation of survival and detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler caecal contents using culture-based methods", *Journal of Applied Microbiology*, 109(4): 1244-1252.
- Rodgers, J. D., Simpkin, E., Lee, R., Clifton-Hadley, F. A. y Vidal, A. B. (2017) "Sensitivity of direct culture, enrichment and PCR for detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler flocks at slaughter", *Zoonoses and Public Health*, 64(4): 262-271.
- Rodrigues, R. C., Pocheron, A.-L., Hernould, M., Haddad, N., Tresse, O. y Cappelier, J.-M. (2015) "Description of *Campylobacter jejuni* Bf, an atypical aero-tolerant strain", *Gut Pathogens*, 7:30.
- Rodríguez Ferri, E. F., Martínez, S., Frandoloso, R., Yubero, S. y Gutiérrez Martín, C. B. (2010) "Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5", *Research in Veterinary Science*, 88(3): 385-389.
- Rollins, D. M. y 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(3): 531-538.
- Rosef, O., Gondrosen, B., Kapperud, G. y Underdal, B. (1983) "Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway.", *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4): 855-859.
- Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S. y Borck, B. (2009) "Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects", *Epidemiology & Infection*, 137(12): 1742-1750.
- Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L. y Christensen, B. B. (2006) "The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*", *International Journal of Food Microbiology*, 108(2): 226-232.
- Rubinchik, S., Seddon, A. y Karlyshev, A. V. (2012) "Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells", *European Journal of Microbiology & Immunology*, 2(1): 32-40.

- Rushton, S. P., Humphrey, T. J., Shirley, M. D. F., Bull, S. y Jørgensen, F. (2009) "*Campylobacter* in housed broiler chickens: a longitudinal study of risk factors", *Epidemiology & Infection*, 137(8): 1099-1110.
- Russell, A. D. y Day, M. J. (1993) "Antibacterial activity of chlorhexidine", *Journal of Hospital Infection*, 25(4): 229-238.
- Russell, S. M. y Axtell, S. P. (2005) "Monochloramine versus sodium hypochlorite as antimicrobial agents for reducing populations of bacteria on broiler chicken carcasses", *Journal of Food Protection*, 68(4): 758-763.
- Saeed, A. M., Harris, N. V. y DiGiacomo, R. F. (1993) "The role of exposure to animals in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis", *American Journal of Epidemiology*, 137(1): 108-114.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M. J., Baquero, F. y Torres, C. (2000) "Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2): 267-271.
- Sahin, O., Kobalka, y Zhang, Q. (2003) "Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs", *Journal of Applied Microbiology*, 95(5): 1070-1079.
- Sahin, O., Morishita, T. Y. y Zhang, Q. (2002) "*Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission", *Animal Health Research Reviews*, 3(2): 95-105.
- Sahin, O., Yaeger, M., Wu, Z. y Zhang, Q. (2017) "*Campylobacter*-associated diseases in animals", *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1): 21-42.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. y Erlich, H. A. (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science (New York)*, 239(4839): 487-491.
- Samuel, M. C., Vugia, D. J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., Kassenborg, H., Reilly, K., Kennedy, M., Angulo, F. y Tauxe, R. V. (2004) "Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996–1999", *Clinical Infectious Diseases*, 38 (3): S165-S174.
- Sandberg, M., Bergsjø, B., Hofshagen, M., Skjerve, E. y Kruse, H. (2002) "Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs", *Preventive Veterinary Medicine*, 55(4): 241-253.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D. y Biavati, B. (2010) "Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*", *International Journal of Food Microbiology*, 141 (1): 98-108.
- Santos, R. M. de, Sáez, A. C., Marteache, A. H. y López, A. M. (2012b) "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp. en carne fresca de aves (pollo)", *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (16): 21-55.
- Savill, M., Hudson, A., Devane, M., Garrett, N., Gilpin, B. y Ball, A. (2003) "Elucidation of potential transmission routes of *Campylobacter* in New Zealand", *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 47(3): 33-38.
- Schets, F., Jacobs-Reitsma, W., Plaats, R., Heer, L., van Hoek, A., Hamidjaja, R., de Roda Husman, A. M. y Blaak, H. (2017) "Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment", *Journal of Water and Health*, 15: 2017119.
- Schielke, A., Rosner, B. M. y Stark, K. (2014) "Epidemiology of campylobacteriosis in Germany – insights from 10 years of surveillance", *BMC Infectious Diseases*, 14: 30.

- Schönberg-Norio, D., Takkinen, J., Hänninen, M.-L., Katila, M.-L., Kaukoranta, S.-S., Mattila, L. y Rautelin, H. (2004) "Swimming and *Campylobacter* infections", *Emerging Infectious Diseases*, 10(8): 1474-1477.
- Sebald, M. y Veron, M. (1963) "Base DNA content and classification vibrios.", *Annales de l'Institut Pasteur*, 105: 897-910.
- Shabbir, M. A. B., Tang, Y., Xu, Z., Lin, M., Cheng, G., Dai, M., Wang, X., Liu, Z., Yuan, Z. y Hao, H. (2018) "The Involvement of the Cas9 Gene in Virulence of *Campylobacter jejuni*", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8: 285
- Shane, S. M. (1992) "The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: a review", *Avian Pathology*, 21(2): 189-213.
- Shane, S. M. (2000) "*Campylobacter* infection of commercial poultry", *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(2): 376-395.
- Shane, S. M., Gifford, D. H. y Yogasundram, K. (1986) "*Campylobacter jejuni* contamination of eggs", *Veterinary Research Communications*, 10(1): 487-492.
- Shanker, S., Lee, A. y Sorrell, T. (1986) "*Campylobacter jejuni* in broilers: The role of vertical transmission", *The Journal of hygiene*, 96: 153-9.
- Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Strachan, N. J. C., MacRae, M., McCarthy, N. D., Wilson, D. J., Gormley, F. J., Falush, D., Ogden, I. D., Maiden, M. C. J. y Forbes, K. J. (2009) "*Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection", *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(8): 1072-1078.
- Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Pattison, M. y Newell, D. G. (2000) "Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house", *Avian Diseases*, 44(4): 983-988.
- Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Ridley, A. y Newell, D. G. (2002) "The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks", *Avian Diseases*, 46(2): 378-385.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, A. y Teixeira: (2011) "*Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A Review", *Frontiers in Microbiology*, 2: 200.
- Simões, L. C., Simões, M. y Vieira, M. J. (2010) "Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19): 6673-6679.
- Simor, A. E., Karmali, M. A., Jadavji, T. y Roscoe, M. (1986) "Abortion and perinatal sepsis associated with *Campylobacter* infection", *Reviews of Infectious Diseases*, 8(3): 397-402.
- Skånseng, B., Kaldhusdal, M., Moen, B., Gjevne, A.-G., Johannessen, G. S., Sekelja, M., Trosvik: y Rudi, K. (2010) "Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids", *Journal of Applied Microbiology*, 109(4): 1265-1273.
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M.-L. y Rautelin, H. I. K. (2016) "Campylobacteriosis: the role of poultry meat", *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2): 103-109.
- Skirrow, M. B. (1977) " *Campylobacter* enteritis: a «new» disease.", *British Medical Journal*, 2(6078): 9-11.
- Skirrow, M. B. (1994) "Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria", *Journal of Comparative Pathology*, 111(2): 113-149.
- Skirrow, M. B., Jones, D. M., Sutcliffe, E. y Benjamin, J. (1993) " *Campylobacter* bacteraemia in England and Wales, 1981-91.", *Epidemiology and Infection*, 110(3): 567-573.

- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G. K., Nichols, G. y Chalmers, R. M. (2006) "Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003", *Epidemiology and Infection*, 134(6): 1141-1149.
- Smith, K. E., Besser, J. M., Hedberg, C. W., Leano, F. T., Bender, J. B., Wicklund, J. H., Johnson, B. P., Moore, K. A. y Osterholm, M. T. (1999) "Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998", *New England Journal of Medicine*, 340(20): 1525-1532.
- Smith, S., Meade, J., Gibbons, J., McGill, K., Bolton, D. y Whyte: (2016) "The impact of environmental conditions on *Campylobacter jejuni* survival in broiler faeces and litter", *Infection Ecology & Epidemiology*, 6: 31685.
- Smith, T. y 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", *Journal of Experimental Medicine*, 30(4): 299-311.
- Solís de los Santos, F., Hume, M., Venkitanarayanan, K., Donoghue, A. M., Hanning, I., Slavik, M. F., Aguiar, V. F., Metcalf, J. H., Reyes-Herrera, I., Blore: J. y Donoghue, D. J. (2010) "Caprylic acid reduces enteric *Campylobacter* colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations", *Journal of Food Protection*, 73(2): 251-257.
- Southern, J. P., Smith, R. M. M. y Palmer, S. R. (1990) "Bird attack on milk bottles: possible mode of transmission of *Campylobacter jejuni* to man", *The Lancet*, 336(8728): 1425-1427.
- Speegle, L., Miller, M. E., Backert, S. y Oyarzabal, O. A. (2009) "Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. from naturally contaminated retail broiler meat", *Journal of Food Protection*, 72(12): 2592-2596.
- Stanley, K. y Jones, K. (2003) "Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*", *Journal of Applied Microbiology*, 94 Suppl: 104S-113S.
- Stas, T., Jordan, F. T. W. y Woldehiwet, Z. (1999) "Experimental infection of chickens with *Campylobacter jejuni*: Strains differ in their capacity to colonize the intestine", *Avian Pathology*, 28(1): 61-64.
- Steele, T. W. y McDermott, S. N. (1984) "The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces", *Pathology*, 16(3): 263-265.
- Stephens, C. P., On, S. L. y Gibson, J. A. (1998) "An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*", *Veterinary Microbiology*, 61(3): 183-190.
- Stern, N. J., Bailey, J. S., Blankenship, L. C., Cox, N. A. y McHan, F. (1988) "Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca", *Avian Diseases*, 32(2): 330-334.
- Stern, N. J., Bannov, V. A., Svetoch, E. A., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Volozhantsev, N. V., Gusev, V. V. y Perelygin, V. V. (2004) "Distribution and characterization of *Campylobacter* spp. from Russian poultry", *Journal of Food Protection*, 67(2): 239-245.
- Stern, N. J., Cox, N. A., Musgrove, M. T. y Park, C. M. (2001) "Incidence and levels of *Campylobacter* in broilers after exposure to an inoculated seeder bird", *The Journal of Applied Poultry Research*, 10(4): 315-318.
- Stern, N. J., Hiatt, 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. y Musgrove, M. T. (2003) "*Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease.", *Epidemiology and Infection*, 130(1): 23-32.
- Stern, N. J., Meinersmann, R. J. y Dickerson, H. W. (1990) "Influence of antibody treatment of *Campylobacter jejuni* on the dose required to colonize chicks", *Avian Diseases*, 34(3): 595-601.

- Stern, N. J. y Robach, M. C. (2003) "Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses", *Journal of Food Protection*, 66(9): 1557-1563.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Volodina, L. I., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P. y Levchuk, V. P. (2005) "*Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens", *Journal of Food Protection*, 68(7): 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. y 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", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9): 3111-3116.
- Strother, K. O., Steelman, C. D. y Gbur, E. E. (2005) "Reservoir competence of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Campylobacter jejuni* (Campylobacterales: Campylobacteraceae)", *Journal of Medical Entomology*, 42(1): 42-47.
- Studahl, A. y Andersson, Y. (2000) "Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study", *Epidemiology & Infection*, 125(2): 269-275.
- Sukhapesna, J., Amavisit, P., Wajjwalku, W. y Thamchaipenet, A. (2005) "Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken in Nakhon Pathom province, Thailand", *Kasetsart Journal Natural Science* 39(2): 240– 246.
- 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. y Stern, N. J. (2008) "Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6): 1942-1948.
- Svetoch, E. A. y Stern, N. J. (2010) "Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-A review", *Poultry Science*, 89(8): 1763-1768.
- Svetoch, E. A., Stern, N. J., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Volodina, L. I., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Borzenkov, V. N., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E. y Kudriavtseva, T. Y. (2005) "Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins", *Journal of Food Protection*, 68(1): 11-17.
- Tatchou-Nyamsi-König, J.-A., Moreau, A., Fédérighi, M. y Block, J.-C. (2007) "Behaviour of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated bottled natural mineral water", *Journal of Applied Microbiology*, 103(2): 280-288.
- Teh, K. H., Flint, S. y French, N. (2010) "Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations", *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 118-124.
- Teodoro-Paula, A., Fonseca, B., Silva, S. M. y Rossi, A. D. (2009) "Viability of *Campylobacter jejuni* in commercial eggs", *Bioscience Journal*, 25: 143-148.
- Ternhag, A., Törner, A., Svensson, Å., Giesecke, J. y Ekdahl, K. (2005) "Mortality following *Campylobacter* infection: a registry-based linkage study", *BMC Infectious Diseases*, 5: 70.
- Thépault, A., Rose, V., Quesne, S., Poezevara, T., Béven, V., Hirchaud, E., Touzain, F., Lucas, P., Méric, G., Mageiros, L., Sheppard, S. K., Chemaly, M. y Rivoal, K. (2018) "Ruminant and chicken: important sources of campylobacteriosis in France despite a variation of source attribution in 2009 and 2015", *Scientific Reports*, 8: 9305.
- Tokach, M. D., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., Dritz, S. S. y Nelssen, J. L. (2012) "Feeding and barn management strategies that maximize feed efficiency", *Feed efficiency in swine*: 41-62.

- Torrallbo Montoro, A. (2013) "*Campylobacter* spp. en granjas y matadero de broilers y en perros domésticos en Andalucía: estudio microbiológico, epidemiológico y de sensibilidad antimicrobiana". Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Trachoo, N. y Frank, J. F. (2002) "Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms", *Journal of Food Protection*, 65(7): 1117-1121.
- Tresierra-Ayala, A., Grandez, C., Bendayan, M. E. y Fernández, H. (2006) "Survival rates of thermotolerant *Campylobacter* species in a transport and enrichment medium under different environmental conditions", *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(4): 662-664.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M. y Hammarström, L. (1997) "Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens", *Clinical and Experimental Immunology*, 108(3): 451-455.
- Udayamputhoor, R. S., Hariharan, H., Van Lunen, T. A., Lewis, J., Heaney, S., Price, L. y Woodward, D. (2003) "Effects of diet formulations containing proteins from different sources on intestinal colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens", *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(3): 204-212.
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V. y Singh, V. P. (2017) "Control of *Campylobacter* in poultry industry from farm to poultry processing unit: A review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4): 659-665.
- Umunabuiké, A. C. y Irokanulo, E. A. (1986) "Isolation of *Campylobacter* subsp. *jejuni* from Oriental and American cockroaches caught in kitchens and poultry houses in Vom, Nigeria", *International Journal of Zoonoses*, 13(3): 180-186.
- UNE (2018) "Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y la enumeración de *Campylobacter* spp. Parte 2: Técnica de recuento de colonias", UNE-EN-ISO 10272-2:2017.
- Urdaneta, S. U. (2016) "Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. y Pasmans, F. (2007) "Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin", *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 10): 1284-1289.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. y Pasmans, F. (2008) "Short-chain fatty acids and L-lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers", *Avian Pathology*, 37(4): 379-383.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. y 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 and Evolutionary Microbiology*, 41(1): 88-103.
- Vanhoof, R., Vanderlinden, M. P., Dierickx, R., Lauwers, S., Yourassowsky, E. y Butzler, J. P. (1978) "Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty-nine antimicrobial agents", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(4): 553-556.
- Vanniasinkam, T., Lanser, J. A. y Barton, M. D. (1999) "PCR for the detection of *Campylobacter* spp. in clinical specimens", *Letters in Applied Microbiology*, 28(1): 52-56.
- Varslot, M., Resell, J. y Fostad, I. G. (1996) "Water-borne campylobacter infection-probably caused by pink-footed geese. Two outbreaks in Nord-Trøndelag, Stjørtal in 1994 and Verdal in 1995",

- Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke*, 116(28): 3366-3369.
- Vaz, C. S. L., Voss-Rech, D., Pozza, J. S., Coldebella, A. y Silva, V. S. (2014) "Isolation of *Campylobacter* from Brazilian broiler flocks using different culturing procedures", *Poultry Science*, 93(11): 2887-2892.
- Vázquez, B., Esperón, F., Neves, E., López, J., Ballesteros, C. y Muñoz, M. J. (2010) "Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1): 45.
- Vellinga, A. y Van Loock, F. (2002) "The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis", *Emerging Infectious Diseases*, 8(1): 19-22.
- Véron, M. y Chantelain, 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 and Evolutionary Microbiology*, 23(2): 122-134.
- Vidal, A. B., Rodgers, J., Arnold, M. y 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", *Zoonoses and Public Health*, 60(6): 412-425.
- Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V. y Kapperud, G. (1999) "Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay", *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4): 1636-1643.
- Wagenaar, J. A., Bergen, M. A. P. V., Mueller, M. A., Wassenaar, T. M. y Carlton, R. M. (2005) "Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers", *Veterinary Microbiology*, 109(3): 275-283.
- Wales, A. D., Carrique-Mas, J. J., Rankin, M., Bell, B., Thind, B. B. y Davies, R. H. (2010) "Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles", *Zoonoses and Public Health*, 57(5): 299-314.
- Wang, W. L., Luechtefeld, N. W., Blaser, M. J. y Reller, L. B. (1982) "Comparison of CampyPak II with standard 5% oxygen and candle jars for growth of *Campylobacter jejuni* from human feces", *Journal of Clinical Microbiology*, 16(2): 291-294.
- Wang, W. L., Powers, B. W., Leuchtefeld, N. W. y Blaser, M. J. (1983a) "Effects of disinfectants on *Campylobacter jejuni*.", *Applied and Environmental Microbiology*, 45(4): 1202-1205.
- Wang, W. L., Reller, L. B., Smallwood, B., Luechtefeld, N. W. y Blaser, M. J. (1983b) "Evaluation of transport media for *Campylobacter jejuni* in human fecal specimens.", *Journal of Clinical Microbiology*, 18(4): 803-807.
- Ward: J., Fassenko, G. M., Gibson, S. y McMullen, L. M. (2006) "A microbiological assessment of on-farm food safety cleaning methods in broiler barns", *The Journal of Applied Poultry Research*, 15(2): 326-332.
- Wasfy, M., Oyofu, B., Elgindy, A. y Churilla, A. (1995) "Comparison of preservation media for storage of stool samples", *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8): 2176-2178.
- Wassenaar, T. M. y Newell, D. G. (2000) "Genotyping of *Campylobacter* spp.", *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1): 1-9.
- Wassenaar, T. M., van der Zeijst, B. A., Ayling, R. y Newell, D. G. (1993) "Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression", *Journal of General Microbiology*, 139 (6): 1171-1175.

- Weber, A., Lembke, C. y Schäfer, R. (1982) "The occurrence of *Campylobacter jejuni* in rabbits, guinea pigs, rats and mice in the laboratory animal unit", *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 95(24): 488-489.
- Wedderkopp, A., Rattenborg, E. y Madsen, M. (2000) "National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998", *Avian Diseases*, 44(4): 993-999.
- Weinberger, M., Lerner, L., Valinsky, L., Moran-Gilad, J., Nissan, I., Agmon, V. y Peretz, C. (2013) "Increased incidence of *Campylobacter* spp. infection and high rates among children, Israel", *Emerging Infectious Diseases*, 19(11): 1828-1831.
- Welsh, R. D. (1984) "*Campylobacter jejuni* abortion in a heifer", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(5): 549-551.
- WHO (2001) "The increasing incidence of human campylobacteriosis" *Report and proceedings of a WHO. consultation of experts*. 2001.7
- Wieczorek, K. y Osek, J. (2013) "Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*", *BioMed Research International*, 2013: 340605.
- Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J. H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C. A. y Diggle, J. (2008) "Tracing the source of campylobacteriosis", *PLoS Genetics*, 4(9): 1000203.
- Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S. y Linz, J. E. (2003) "Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture", *Microbiology*, 149(12): 3603-3615.
- Wilson, G. y Aitchison, L. B. (2007) "The use of a combined enrichment–filtration technique for the isolation of *Campylobacter* spp. from clinical samples", *Clinical Microbiology and Infection*, 13(6): 643-644.
- Woldemariam, E., Bouma, A., Vernooij, J. C. M. y 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(3): 308-312.
- Workman, S. N., Mathison, G. E. y Lavoie, M. C. (2005) "Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados", *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2642-2650.
- Wösten, M. M. S. M., Wagenaar, J. A. y van Putten, J. P. M. (2004) "The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*", *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16): 16214-16222.
- Wyszyńska, A., Raczko, A., Lis, M. y 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(11): 1379-1389.
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C. y Yin, Y. (2003) "Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(3): 265-271.
- Yang, H., Li, Y. y Johnson, M. G. (2001) "Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling", *Journal of Food Protection*, 64(6): 770-776.
- Yang, Y., Feye, K. M., Shi, Z., Pavlidis, H. O., Kogut, M., J. Ashworth, A. y Ricke, S. C. (2019) "A historical review on antibiotic resistance of foodborne *Campylobacter*", *Frontiers in Microbiology*, 10: 1509.

- Yogasundram, K., Shane, Simon M., Grodner, R. M., Lambremont, E. N. y Smith, R. E. (1987) "Decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken drumsticks using chemicals and radiation", *Veterinary Research Communications*, 11(1): 31-40.
- Young, K. T., Davis, L. M. y DiRita, V. J. (2007) "*Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis", *Nature Reviews Microbiology*, 5(9): 665-679.
- Zendehbad, B., Khayatzaheh, J. y Alipour, A. (2015) "Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates of retail broiler meat in Iran", *Food Control*, 53: 41-45.
- Ziprin, R. L., Hume, M. E., Young, C. R. y Harvey, R. B. (2002) "Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of *Campylobacter jejuni*: evaluation of protection against a colonizing strain", *Current Microbiology*, 44(3): 221-223.
- Ziprin, R. L., Young, C. R., Byrd, J. A., Stanker, L. H., Hume, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J. y Konkel, M. E. (2001) "Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization", *Avian Diseases*, 45(3): 549-557.

ANEXO

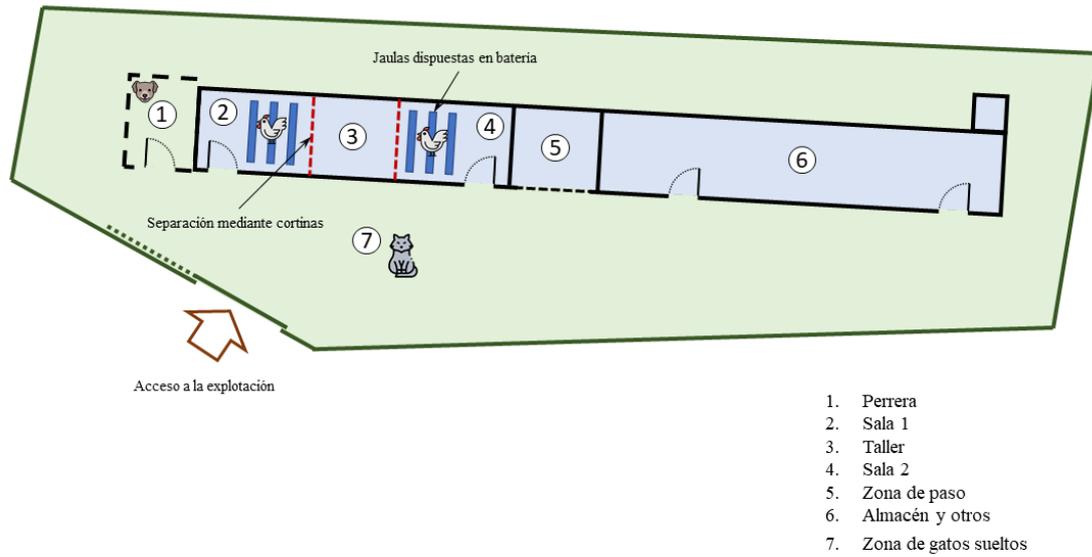


Figura 11. Croquis a escala de la explotación de Aranda de Duero (Burgos).

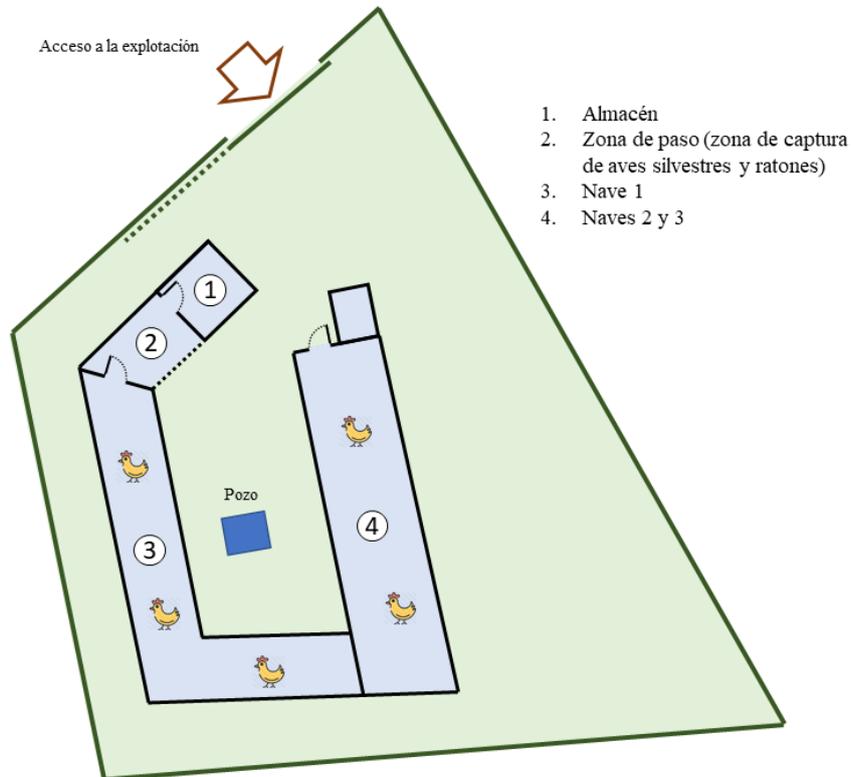


Figura 12. Croquis a escala de la explotación de Riosequino de Torío (León).

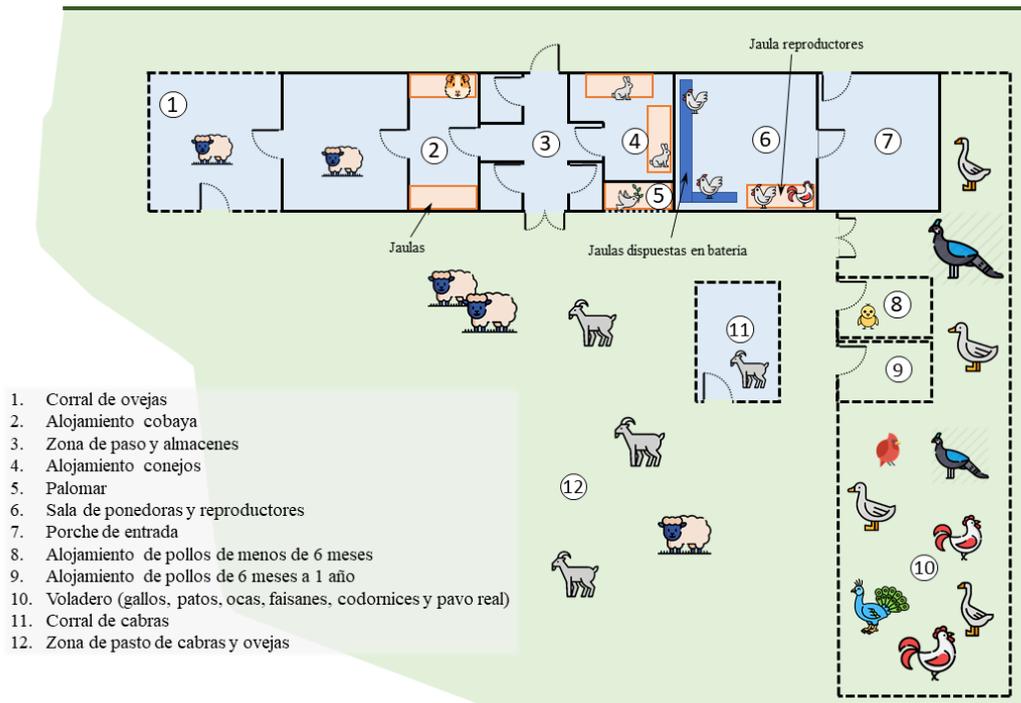


Figura 13. Croquis a escala de la explotación del Colegio Santa Isabel (Soria).

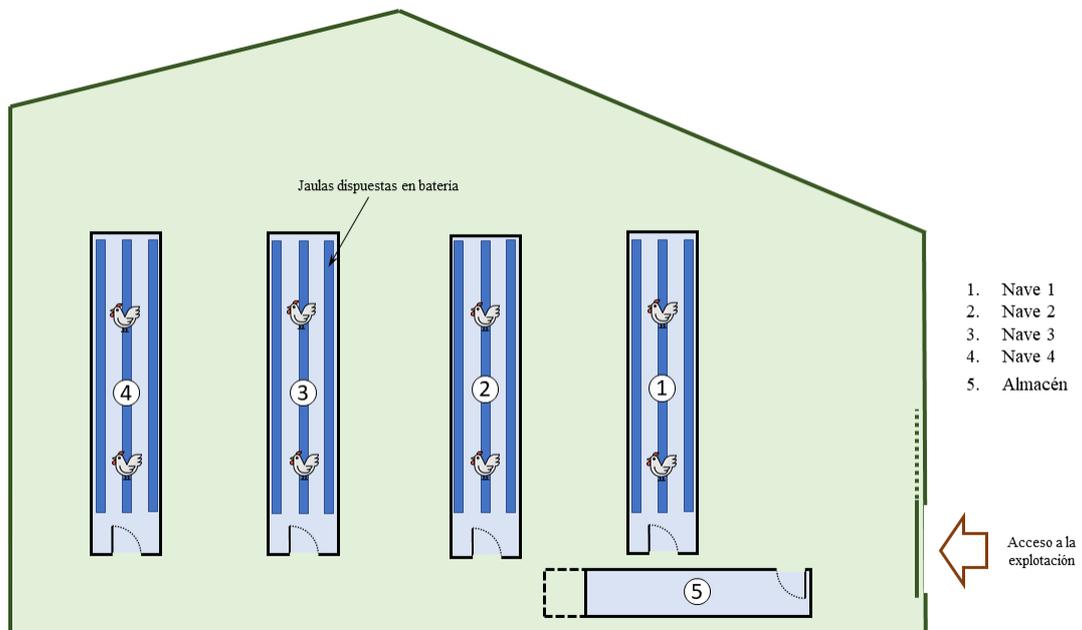


Figura 14. Croquis a escala de la explotación de Villalón de Campos (Valladolid).

RESUMEN

Las especies del género *Campylobacter*, además de ser consideradas tradicionalmente como patógenos veterinarios clásicos, responsables de una diversidad de procesos en animales domésticos, en la actualidad, poseen gran trascendencia e interés tanto en Medicina Humana como en Seguridad Alimentaria, por su relación, como primera causa de gastroenteritis bacteriana en el hombre. Los pollos son el reservorio principal de *C. jejuni* y el consumo de su carne, constituye la principal fuente de los contagios humanos, bien de forma directa, o indirectamente, a consecuencia de la contaminación cruzada desde otros alimentos o utensilios utilizados en su preparación en la cocina. Por todo ello, para intentar reducir o eliminar el problema, es imprescindible la reducción de la presencia y circulación del agente en la producción primaria.

A pesar de los numerosos esfuerzos realizados orientados en la búsqueda de soluciones para el control del patógeno en estos animales, las cifras de aves positivas en matadero siguen siendo muy elevadas y aún no ha sido posible resolver el problema de su control. Evitar la introducción del agente en las manadas sería fundamental para reducir el problema, y en esta línea, conocer el modo en el que se produce la transmisión de *C. jejuni* a los pollos de carne resulta por el momento una incógnita necesaria de resolver.

En esta Tesis Doctoral se pretende profundizar en el conocimiento global de las características epidemiológicas y de transmisión de *C. jejuni* en los pollos de carne. A tal efecto, se llevaron a cabo diversos estudios de detección del microorganismo en explotaciones de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, tanto en los animales como en el entorno ambiental.

Previamente a los estudios en las explotaciones, debido a que *C. jejuni* muestra requisitos de crecimiento exigentes y una sensibilidad inusual al estrés ambiental, fue necesario determinar la capacidad de supervivencia de la cepa de referencia en distintos medios y condiciones, con el objeto de poder diseñar un adecuado protocolo de muestreo y trabajo. En todos los casos se confirmó que la cepa utilizada pudo sobrevivir en los diferentes medios y condiciones necesarias, el tiempo suficiente para la realización de los estudios *in vivo*.

También se llevaron a cabo numerosas pruebas con distintos medios de cultivo y diferentes técnicas de filtración buscando un procedimiento adecuado, económico y

sencillo para el recuento de *C. jejuni* en placa a partir de heces, no hallándose, al final, ningún método totalmente eficaz para ese propósito, debido, bien a la presencia de contaminantes microbianos que impedían el aislamiento (en el caso del uso de los medios selectivos sin filtro), o a que se provocaba una reducción considerable del número final de *C. jejuni* cuando se empleaban filtros, lo que falseaba el resultado.

Con objeto de conocer el momento y las circunstancias en que tiene lugar la colonización de las aves con *C. jejuni*, a fin de poder controlar la introducción del microorganismo en las naves, se llevaron a cabo distintos estudios de detección y aislamiento en una explotación de pollos comerciales, para determinar la edad de colonización y la influencia de la estación climática en esta, utilizando distintos procedimientos y protocolos de muestreo. La edad de colonización se estableció aproximadamente en la segunda semana de vida, a partir de un sistema de muestreo que utilizaba calzas absorbentes, sin encontrar diferencias entre las distintas estaciones del año, si bien durante los meses de otoño *C. jejuni* no se pudo detectar hasta la tercera semana de vida de los animales.

En una manada aislada, se determinó la prevalencia de la infección por *C. jejuni* a lo largo de la cría, utilizando hisopos (en cloaca) y a partir del contenido de distintos tramos del aparato digestivo (buche, ciego y colon). Se pudo confirmar la presencia de *C. jejuni* a partir de los 20 días de vida (colonizando ciego y colon); además, se observaron altísimas prevalencias en cloaca (83,3% el día 23), en ciego (90% el día 30) y en colon (70% el día 30), que fueron aumentando progresivamente a lo largo de la crianza, hasta llegar a la práctica totalidad de las aves, permitiendo deducir que *C. jejuni* colonizaría completamente a la manada al cumplirse no más de los dos tercios del periodo de cría.

Con el fin de obtener más información sobre los posibles reservorios que pudieran actuar como fuentes de infección o vías de transmisión horizontal, se llevaron a cabo estudios de detección en una explotación de pollos de carne, analizando para ello diferente tipo de muestras, potenciales fuentes de contagio procedentes del entorno interior y exterior de la nave. La mayor parte de las muestras, exceptuando las muestras de tipo fecal y de materia orgánica, fueron negativas, incluso cuando previamente se había demostrado la presencia del microorganismo en otro tipo de materias como, por ejemplo, en las heces.

Dado que la presencia de animales en las inmediaciones de las instalaciones se considera siempre un factor importante en el aumento de la prevalencia del microorganismo en las granjas de pollos, con la misma finalidad que en el caso anterior, se determinó la presencia de *C. jejuni* en otros sistemas productivos, así como en otras especies animales (mamíferos y aves) ubicadas en el entorno de aves positivas. En todos los sistemas productivos analizados se observaron prevalencias elevadas del microorganismo. Además de ello, una gran variedad de especies animales de las que estaban en contacto con aves portadoras albergó *C. jejuni* y se pudo detectar su presencia en heces, lo que permite sospechar que posiblemente puedan actuar como reservorio. No obstante, debe precisarse que, entre las especies animales separadas de las aves portadoras del microorganismo, no se detectó ningún animal positivo, lo que podría significar que el reservorio principal son las aves de carne, únicamente.

Los estudios de transmisión horizontal de *C. jejuni* se completaron con los de transmisión vertical, desde las gallinas a los huevos. A este respecto, se llevó a cabo un estudio en el que se analizó la presencia de *C. jejuni* en distintas partes (superficie, cáscara e interior), en huevos procedentes de gallinas positivas, no detectándose el agente. También se llevó a cabo un estudio de persistencia en huevos inoculados experimentalmente en la superficie, comprobándose la escasa capacidad de supervivencia de *C. jejuni* en la superficie de huevos (sólo persistió 1 hora) así como la incapacidad de éste para colonizar en interior de los huevos, ya que no fue capaz de atravesar la cáscara.

Finalmente, con el objetivo de establecer qué productos podrían ser útiles para el control ambiental de *C. jejuni*, se comprobó la eficacia de 15 principios activos y 11 desinfectantes comerciales, utilizándose un método de suspensión con una cepa de referencia de *C. jejuni* en presencia y ausencia de suero, probando la capacidad bactericida de los desinfectantes. Con algunos de los productos que mostraron un nivel elevado de reducción *in vitro*, se llevó a cabo una prueba adicional con el fin de comprobar si también resultaban activos contra *C. jejuni* en el ambiente de la granja. El microorganismo fue susceptible a 3 de los 4 principios activos (fenol, cloramina T y formol) y a 3 de los 4 productos comerciales probados (Limoseptic SF[®], CR-36 Mural[®] y Proxitane 15[®]).

SUMMARY

The species of genus *Campylobacter*, besides being considered traditionally as classical veterinarian pathogens, responsible for a range of processes in domestic animals, currently, have a lot of importance and interest both in Human Medicine and Food Security, for their connection, as the first cause of bacterial gastroenteritis in human beings. Poultry are the main reservoir of *C. jejuni* and the intake of their meat, represents the main source of human contagion, directly or indirectly, from cross contamination from other food or utensils used during their preparation. Because of this, to try to reduce or eliminate the problem, it is indispensable to reduce the presence and circulation of the agent in the primary production.

Despite the effort made in order to find solutions to control the pathogen in this animals, the numbers of positive poultry in slaughterhouses continues being very high and the problem has not been able to be solved yet. Avoiding the introduction of the agent in the flock would be essential to reduce the problem, and also to know the way in which the transmission of *C. jejuni* to poultry is produced seems to be an unknown necessary to solve.

This Doctoral Thesis aims at increasing the global knowledge of the epidemiological and transmission characteristics of *C. jejuni* in poultry. For this, several studies to detect the microorganism were carried out in farms in the Autonomous Region of Castille and Leon, both in animals and environment.

Before these studies, due to the fact that *C. jejuni* shows demanding growing requirements and an unusual sensibility to environmental stress, it was necessary to determine the survival capacity of the reference strain in different media and conditions, in order to design a proper sampling and work protocol. In every case, it was confirmed that the strain used could survive in different media and conditions, enough time to carry out the studies *in vivo*.

Also several tests were carried out with different culture media and different filtration techniques looking for a suitable, economical and simple procedure for the count of *C. jejuni* on plate from feces, finally not finding any method completely effective for that purpose, due to microbial contaminants that prevented the isolation (in selective media without filters) or because a considerable reduction in the final number of *C. jejuni* was caused when the filters were used, which made the results false.

In order to know the moment and the circumstances in which poultry colonization by *C. jejuni* takes place, so as to be able to control the introduction of microorganism in the flock, several studies of detection and isolation were carried out in a commercial poultry farm, to determine the age of colonization and the influence of the climate season in this, using different sampling protocols and procedures. The age of colonization was established about the second week of life, from a sampling system which used boot swabs, without finding differences among the different seasons of the year, although in the months of autumn *C. jejuni* could not be detected until the third week of life in these animals.

In an isolated flock, the prevalence of *C. jejuni* infection was determined during the breeding, using swabs (in cloaca) and from intestinal content (in crop, cecum and colon). *C. jejuni* presence could be confirmed from 20 days of life (colonizing cecum and colon), besides, very high prevalences were observed in cloaca (83,3%, on 23rd day), in cecum (90%, on 30th day) and in colon (70%, on 30th day), which were progressively increasing during the breeding, until reaching almost the vast majority of poultry which allows deducing that *C. jejuni* would colonize nearly the whole flock at two thirds of the total breeding period.

In order to obtain more information about the possible reservoirs that could be infectious as sources or horizontal transmission routes, studies of detection were carry out in a poultry farm, analyzing different types of samples, potential sources of contagion from inside or outside the house. The vast majority of the samples, except the ones from feces and organic materia, were negative, even when the presence of microorganism had been previously demonstrated in other type of materia, for example, in feces.

Since the presence of animals around the house is always considered an important factor in the increasing prevalence of the microorganism in the poultry farms, with the same purpose as in the previous case, the presence of *C. jejuni* was determinated in other productive systems, and in other animal species (mammals and birds) located near the positive poultry. High prevalences of the microorganism were observed in all the productive systems analyzed. Besides, a great variety of animal species that were in contact with the positive poultry had *C. jejuni* and their presence in feces could be detected, which allows us to suspect that they could act as reservoirs. However, we must determine that, among the animal species separated from the positive poultry, no positive animal was detected, which could mean that the main reservoir is only the poultry.

Studies of horizontal transmission of *C. jejuni* were completed with others of vertical transmission, from hens to eggs. In this regard, a study was carried out in which the presence of *C. jejuni* was analyzed in different parts (surface, shell and interior), in eggs from positive hens, the agent was never detected. A persistence study was also carried out on eggs experimentally inoculated on the surface, demonstrating the low survival capacity of *C. jejuni* on the surface of eggs (only 1 hour persisted) as well as the inability to colonize the inside of eggs, since *C. jejuni* was not able to get through the shell.

Finally, in order to establish which products could be useful for the *C. jejuni* environmental control, the efficacy of 15 active ingredients and 11 commercial disinfectants was tested, using a suspension method with a *C. jejuni* reference strain in the presence and absence of serum, testing the bactericide capacity of the disinfectants. With some of the products that showed a high level of reduction *in vitro*, an additional test was carried out in order to check if they were also active against *C. jejuni* in the farm environment. The microorganism was susceptible to 3 of the 4 active substances (phenol, chloramine T and formaldehyde) and 3 of the 4 commercial products tested (Limoseptic SF[®], CR-36 Mural[®] and Proxitane 15[®]).