



# UNIVERSIDAD DE LEÓN

## DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PREVALENCIA, CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE  
INFRARROJOS E IDENTIFICACIÓN CON REDES NEURONALES ARTIFICIALES Y ANÁLISIS  
MULTIVARIANTE DE ESPECIES TERMOFÍLICAS DE *CAMPYLOBACTER* AISLADAS DE AVES Y  
PRODUCTOS AVÍCOLAS

Juan Prieto Gómez



## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

El Dr. Miguel Prieto Maradona, como Director de la Tesis Doctoral titulada “Prevalencia, caracterización quimiotaxonómica mediante espectroscopía de infrarrojos e identificación con redes neuronales artificiales y análisis multivariante de especies termofílicas de *Campylobacter* aisladas de aves y productos avícolas”, de la que es autor D. Juan Prieto Gómez, realizada en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa, y suscribiéndolo para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 16 de Abril de 2010

Fdo. Miguel Prieto Maradona



ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y

Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos en su reunión celebrada el día 28 de Septiembre de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Prevalencia, caracterización quimiotaxonómica mediante espectroscopía de infrarrojos e identificación con redes neuronales artificiales y análisis multivariante de especies termofílicas de *Campylobacter* aisladas de aves y productos avícolas”, dirigida por el Dr. D. Miguel Prieto Maradona, elaborada por D. Juan Prieto Gómez y cuyo título en inglés es el siguiente “Prevalence, chemotaxonomic characterization using infrared spectroscopy and identification with artificial neural networks and multivariate analysis of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from poultry and poultry products”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 28 de Septiembre de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Mª Rosario García Armesto

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Carlos Alonso Calleja



Esta tesis ha sido llevada a cabo con las ayudas económicas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), gracias al proyecto "Monitorización epidemiológica e identificación clínica de poblaciones de *Campylobacter* responsables de toxiinfecciones alimentarias mediante el análisis de su espectro infrarrojo" (Ref. 00/0930), y de la Junta de Castilla y León, con el proyecto "Identificación y tipado de microorganismos patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias: comparación del espectro infrarrojo y las secuencias del RNA ribosómico" (Ref. LE09-98), y cuyo investigador principal es el Dr. Miguel Prieto Maradona.

Asimismo, para la elaboración de este trabajo, D. Juan Prieto Gómez ha disfrutado de una beca de la Fundación MAPFRE MEDICINA entre febrero de 2001 y febrero de 2002.

Igualmente, para la elaboración de esta Tesis Doctoral, D. Juan Prieto Gómez ha obtenido financiación del Centro de Estudios e Investigación para la Gestión de Riesgos Agrarios y Medioambientales (CEIGRAM) en su convocatoria de ayudas a jóvenes investigadores de 2010.



## AGRADECIMIENTOS

Es probable que sean estas las líneas más difíciles de redactar de todo este trabajo. No ya sólo por no olvidar a nadie de quienes, en mayor o menor medida, han colaborado y me han ayudado en la elaboración de esta Tesis Doctoral, si no por la imposibilidad de plasmar mediante la palabra la enorme carga emocional que supone el trabajo, las satisfacciones, las preocupaciones, los éxitos y los fracasos de todos estos años. Reflejar por escrito tal cúmulo de sensaciones se me antoja una labor imposible de abordar, aún a pesar de contar con la valiosísima herramienta del *lenguaje libre* –que no literario-, mucho más preciso que el científico a la hora de alcanzar este objetivo.

Además, a lo largo de todo este tiempo me he ido dando cuenta de que realizar una Tesis Doctoral trasciende del ámbito científico y profesional, para convertirse en una de las, seguramente, más importantes vivencias de aquellos que nos hemos embarcado en semejante aventura. Es por ello justo y obligado, y a la vez un orgullo y un honor, recordar en este momento a todos aquellos que me han ayudado a alcanzar el lugar en el que hoy me encuentro.

En primer lugar a mi Director, el Dr. Prieto Maradona. *Miguel* me brindó su confianza el primer día y la ha mantenido en todo momento, incluso cuando los obstáculos parecían demasiados y mi camino profesional se orientaba por otras sendas alejadas de la investigación. Su comprensión y su apoyo ante una decisión tan trascendente en mi vida profesional constituyeron el más valioso de los estímulos para concluir, a pesar de las dificultades subsiguientes a asumir, un trabajo iniciado y en todo caso muy querido. Espero haber sido capaz de devolverle esa misma confianza y haber adquirido de él su rigor y su capacidad de análisis profundo con los que me ha formado estos años. Y, ante todo, le agradezco que la relación forjada en este tiempo haya ido más allá de la del maestro con su alumno y se haya transformado en una sólida amistad.

A los miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León. Todos ellos, profesores y personal de Administración y Servicios, me han brindado su colaboración en todo momento y me han ayudado a resolver las innumerables dudas y problemas que se presentan al enfrentarse a una Tesis Doctoral. Y lo han hecho, además, siempre con una sonrisa y una palabra amable, que espero haberles sabido corresponder.

Al resto de becarios que lo fueron conmigo. Compañeros de trabajo, de algunos momentos de malestar y de muchos más momentos de risas dentro y fuera del laboratorio. Quisiera nombrarlos en orden alfabético, única manera de hacerles justicia: Chema, Daniel, Fanny, Irma – nuestra gran maestra –, Isabel, Oriol, Óscar, Toño y Víctor.

A quienes me han ayudado fuera de los límites de mi querida Universidad de León, en mis estancias en las Universidades de Gante y Varsovia. Las enseñanzas, las experiencias y las vivencias compartidas por muchos de quienes, procedentes de distintas Universidades de toda Europa, me acompañaron allí, me han servido de ayuda y estímulo en numerosas ocasiones a lo largo de estos años.

Al personal de las granjas y mataderos visitados para el muestreo de este trabajo, y, de manera especial, a sus profesionales veterinarios por las enseñanzas e informaciones tan generosamente brindadas.

Sin embargo, todo el apoyo profesional y académico nunca es suficiente para ayudar a encarar las dificultades con las que se presenta una Tesis Doctoral, y, así, el empuje, los ánimos y la ilusión compartida de los más cercanos han resultado imprescindibles para llevarme a este momento. Familia, amigos y compañeros han sabido dar el aliento necesario en el momento preciso. Y entre ellos, sin duda alguna, Silvia y mi familia, de quienes confío que esta Tesis les haga seguirse sintiendo orgullosos de mí.

Silvia, ejemplo de tantas cosas y, en el ámbito académico, pese a proceder de un campo del saber humano muy diferente, por su espíritu crítico y por su rigor, pero compatibilizando en todo momento su exigencia intelectual con su dulzura y amor. Llegó en los últimos pasos de esta aventura, pero me hace enormemente feliz que pueda ser testigo de su final.

Mi hermana, Julia y, con ella, *su* Julio. Agradezco todo el cariño de la mejor de las hermanas: compañera y consejera sagaz y brillante. Por ambos siento una profunda admiración, por sus valores y principios, referencia constante en mi trayectoria.

Mis padres, Bernardino y María Teresa. Es un esfuerzo vano intentar siquiera resumir las razones de mi agradecimiento hacia ellos, tantas, tan diversas y tan profundas. La ayuda de mis padres – y refiriéndome tan solo a lo estrictamente profesional – ha sido imprescindible en todo momento. Lo fue durante mi formación como Veterinario y en mi licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, así como en mis primeros pasos profesionales y en mi ingreso en el Cuerpo Nacional Veterinario. Y, desde luego, lo ha sido durante la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Y por último, a la Profesión y a la Ciencia Veterinaria, vieja, noble y sabia profesión. Hijo como soy de veterinarios, continuador de una saga veterinaria que se adentra hasta mediados del siglo XIX, la Veterinaria está tan indefectiblemente unida a mí y a mi familia, que la llevo no sólo en el corazón, si no hasta en mi propia dotación genética. Ojalá este esfuerzo de estos años contribuya, siquiera mínimamente, a hacerla aún más grande, y sirva este trabajo de agradecimiento a la Veterinaria por todo lo que significa en mi vida.

Muchas gracias

Juan Prieto Gómez



El sueño de la razón produce monstruos

*Francisco de Goya y Lucientes*



*A los míos:  
a quienes fueron;  
a quienes son;  
a quienes hayan de ser.*



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>17</b>
<b>1 Capítulo I. Introducción</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Historia</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Fisiología y taxonomía del género <i>Campylobacter</i></b>	<b>23</b>
<b>1.3 Aislamiento y detección de <i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Pruebas fenotípicas y genotípicas en identificación y tipificación</b>	<b>25</b>
1.4.1 Métodos fenotípicos	25
1.4.2 Métodos genotípicos	28
<b>1.5 Reservorios y contaminación medioambiental</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Alimentos como vehículo de <i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Epidemiología de la gastroenteritis por <i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>31</b>
1.7.1 Incidencia	31
1.7.2 Brotes	36
<b>1.8 Campilobacteriosis y síndromes asociados</b>	<b>36</b>
<b>1.9 Producción de carne de ave en España</b>	<b>38</b>
<b>1.10 Justificación del trabajo</b>	<b>39</b>
<b>2 Capítulo II. Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp., identificación fenotípica y genotípica, y distribución de las cepas aisladas</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Introducción</b>	<b>41</b>
2.1.1 Métodos de aislamiento de <i>Campylobacter</i> termofílicos	41
2.1.2 Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp.	42
2.1.3 Objetivos del trabajo	43
<b>2.2 Material y métodos</b>	<b>44</b>
2.2.1 Tipo y número de muestras	44
2.2.2 Protocolo de aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.	47
2.2.3 Pruebas de confirmación	48
<b>2.3 Resultados y discusión</b>	<b>50</b>
2.3.1 Resultados globales de las muestras con crecimiento en Preston Agar	50
2.3.2 Resultados globales de las muestras con cepas confirmadas por pruebas fenotípicas y genotípicas	52
2.3.3 Resultados parciales de las muestras con crecimiento en Preston Agar	56
2.3.4 Resultados parciales de las muestras con cepas confirmadas por pruebas fenotípicas y genotípicas	58

<b>3</b>	<b>Capítulo III. Estudio de la antibiorresistencia de las cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas</b>	<b>69</b>
<b>3.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>69</b>
3.1.1	Monitorización y vigilancia de la resistencia antibiótica	70
3.1.2	Mecanismo de acción de los antimicrobianos	71
3.1.3	Legislación	72
3.1.4	Objetivos del trabajo	72
<b>3.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>72</b>
3.2.1	Cepas empleadas	72
3.2.2	Antibióticos empleados	72
3.2.3	Preparación de las cepas para la evaluación de la resistencia antimicrobiana	73
3.2.4	Siembra en medio de cultivo	73
<b>3.3</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>74</b>
3.3.1	Antibiorresistencia en las producciones animales	78
3.3.2	Antibiorresistencia según el lugar de muestreo	82
3.3.3	Antibiorresistencia según la estación del año	84
3.3.4	Antibiorresistencia en función de la especie microbiana	85
3.3.5	Metodología	91
<b>4</b>	<b>Capítulo IV. Aplicación de la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier para la clasificación de <i>Campylobacter</i> termofílicos</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>95</b>
4.1.1	Empleo de la espectroscopía de infrarrojos en la identificación y clasificación de microorganismos	95
4.1.2	Características de la espectroscopía de IR de utilidad en taxonomía	96
4.1.3	Utilidad de la espectroscopía de IR como método de tipado	98
4.1.4	Composición de la membrana celular en relación a los cambios medioambientales y las diferencias taxonómicas	99
4.1.5	Transformación del espectro IR y procedimiento de clasificación	101
4.1.6	Objetivos del trabajo	101
<b>4.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>102</b>
4.2.1	Cepas seleccionadas	102
4.2.2	Preparación de las muestras para su análisis	105
4.2.3	Medida del espectro infrarrojo	106
4.2.4	Pre-procesado matemático	106
4.2.5	Análisis matemático de la reproducibilidad	106
4.2.6	Estudio de la reproducibilidad según el método de preparación de la muestra	107
4.2.7	Estudio de la reproducibilidad según el tiempo de incubación	108
4.2.8	Determinación de la fluidez de la membrana usando FT-IR	108
4.2.9	Agrupamiento jerárquico final de las cepas estudiadas. Evolución y distribución de las cepas seleccionadas en función de su espectro IR	109

4.2.10	Programas de ordenador empleados en el pre-procesado, estudio de la reproducibilidad y agrupamiento jerárquico _____	109
<b>4.3</b>	<b>Resultados y discusión _____</b>	<b>110</b>
4.3.1	Pre-procesado matemático _____	113
4.3.2	Estudio de la reproducibilidad según el método de preparación de la muestra _____	113
4.3.3	Estudio de la reproducibilidad según el tiempo de incubación _____	115
4.3.4	Determinación de la fluidez de la membrana usando espectroscopia FT-IR _____	117
4.3.5	Agrupamiento taxonómico de las cepas estudiadas mediante el espectro IR. Evolución y distribución de las cepas seleccionadas _____	119
<b>5</b>	<b>Capítulo V. Identificación de especies y tipos de <i>Campylobacter</i> a partir de espectros infrarrojos procesados con Redes Neuronales Artificiales _____</b>	<b>125</b>
<b>5.1</b>	<b>Introducción _____</b>	<b>125</b>
5.1.1	Redes Neuronales Artificiales _____	125
5.1.2	Modelos de Redes Neuronales Artificiales _____	126
5.1.3	Objetivos del trabajo _____	127
<b>5.2</b>	<b>Material y métodos _____</b>	<b>128</b>
5.2.1	Cepas utilizadas para la identificación con Redes Neuronales Artificiales _____	128
5.2.2	Obtención de los espectros FT-IR _____	129
5.2.3	Pre-procesado previo _____	130
5.2.4	Desarrollo de la topología de las redes neuronales artificiales para la identificación de <i>Campylobacter</i> _____	130
5.2.5	Ensayo de la red perceptron multicapa _____	131
5.2.6	Ensayo de la red neuronal probabilística _____	132
5.2.7	Post-procesado y asignación de cepas _____	132
<b>5.3</b>	<b>Resultados y discusión _____</b>	<b>133</b>
5.3.1	Evaluación y comparación de redes neuronales artificiales supervisadas para la identificación de <i>C. jejuni</i> y de <i>C. coli</i> _____	133
<b>6</b>	<b>Capítulo VI. Identificación de especies y tipos de <i>Campylobacter</i> empleando espectros infrarrojos y técnicas de análisis estadístico multivariante (SDA e índice de diferenciación) _____</b>	<b>143</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducción _____</b>	<b>143</b>
6.1.1	Sistemática bacteriana _____	143
6.1.2	Identificación _____	143
6.1.3	Objetivos del trabajo _____	144
<b>6.2</b>	<b>Material y métodos _____</b>	<b>144</b>
6.2.1	Cepas utilizadas para la identificación con SDA e índice de diferenciación <i>D</i> _____	146
6.2.2	Obtención de los espectros FT-IR _____	146
6.2.3	Procesado previo _____	147
6.2.4	Desarrollo de la base de datos _____	147
6.2.5	Empleo del índice de diferenciación para la identificación _____	147

6.2.6	Análisis discriminante como método de identificación	148
<b>6.3</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>149</b>
6.3.1	Identificación basada en SDA	149
6.3.2	Identificación basada en el índice <i>D</i>	150
6.3.3	Comparación de los tres sistemas empleados para la identificación de cepas de <i>Campylobacter</i> termofílicos	150
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>Anexo</b>	<b>155</b>
8.1	Glosario	155
8.2	Acrónimos y abreviaturas	158
8.3	Preparación de medios de cultivo	160
	<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>161</b>
	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>163</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>167</b>

## 1 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son microorganismos Gram-negativos, termófilos, microaerófilos y capnófilos que colonizan la mucosa intestinal de muchos animales homeotermos de sangre caliente, incluyendo los animales de abasto, y el hombre. En los países industrializados, la campilobacteriosis constituye una de las infecciones alimentarias con mayor incidencia entre la población. En la Unión Europea, según datos del Informe sobre tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos en la Unión Europea publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), es el patógeno con mayor incidencia entre las enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos (EFSA, 2009b; EFSA, 2010b). En 2007, se registraron más de 200.000 casos de campilobacteriosis humana confirmados (200.507) por 24 Estados miembros (EM), con una tasa de notificación de 45,2 casos por 100.000 habitantes. En 2008 (EFSA, 2010b) el número en la UE-25 se redujo a un total de 190.566 casos, con una tasa de notificación de 40,7 casos por 100.000 habitantes. La carne de aves de corral se considera la más importante fuente de infección, generalmente por contaminación durante su obtención en matadero o por contaminación cruzada de alimentos listos para consumir. También la vía directa mano-boca durante la preparación de alimentos o el contacto con animales han sido señalados como causa de la enfermedad. Las aves son un importante reservorio de *Campylobacter* spp., y la carne procedente de ellas presenta generalmente unos niveles de contaminación elevados, de manera habitual superiores al 80% (EFSA, 2009b; EFSA, 2010a). Los datos epidemiológicos indican que aproximadamente el 80-90% de las campilobacteriosis están causadas por *C. jejuni*, seguido de *C. coli* con un 5-10%. Otras especies de *Campylobacter* spp. suponen un 1% de los casos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010). En muestras clínicas a nivel europeo, las especies de *Campylobacter* más frecuentemente identificadas en 2007 fueron *C. jejuni* (44,3%) seguido de *C. coli* (2,7%); otras especies de *Campylobacter* incluidas de forma agregada representaron el 6,9%. El resto (46%) no fueron identificadas a nivel de especie (EFSA, 2009a).

La enfermedad se caracteriza por una gastroenteritis aguda con diarrea y vómitos. En la mayoría de los casos la enfermedad es autolimitante pero en ocasiones puede estar en riesgo la vida de personas cuando éstas presentan defensas limitadas, como en ancianos o inmunodeprimidos. También existen evidencias sustanciales de la aparición de secuelas en forma de enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reactiva o el síndrome Guillain-Barré, en individuos que han tenido previamente la enfermedad gastrointestinal (Buzby et al., 1997; Molnar et al., 1982; Rees et al., 1993). Existen muchos aspectos oscuros en la epidemiología de este patógeno gastrointestinal en países industrializados. Los retos que plantea esta enfermedad hacen necesario un conocimiento más profundo de los factores epidemiológicos, la

distribución del patógeno en el medio ambiente y alimentos, la heterogeneidad de la población microbiana en diferentes puntos, para con ello ayudar en la evaluación de la eficacia de las medidas de reducción del patógeno a lo largo de la cadena alimentaria, en cada uno de sus puntos. Las evaluaciones de riesgos deben arrojar luz sobre la eficacia de las medidas de control para la reducción de la prevalencia del patógeno en granja, durante el procesado y en alimentos, para don ello reducir paralelamente la incidencia de la enfermedad. La legislación europea referente a la higiene de los alimentos presta especial atención a las estrategias de control de riesgos en seguridad alimentaria en las fases primarias de producción de los alimentos y requiere de un enfoque conjunto de toda la cadena alimentaria. Para la prevención y control de la campilobacteriosis, es imprescindible un conocimiento profundo de la epidemiología, y el desarrollo de herramientas de caracterización e identificación de los microorganismos patógenos aislados de animales, alimentos o muestras ambientales.

## 1.1 HISTORIA

La primera descripción de una bacteria adscrita probablemente al género *Campylobacter* se atribuye a Theodore Escherich quien al final del siglo XIX (Escherich, 1886) describió en heces de bebés con diarrea (*cholera infantum*) un microorganismo espiriláceo, no cultivable, al que denominó *Vibrio felinus*, por su parecido morfológico con otros aislamientos de vibrios (Lior, 1994). Es quizás la primera referencia de una infección gastroentérica debida a *Campylobacter* spp. Este microorganismo se relaciona posteriormente con abortos e infertilidad infecciosa en ganado ovino y bovino (McFadyean and Stockman, 1909; Smith and Taylor, 1919), recibiendo la denominación de *Vibrio fetus*. Una primera evidencia de la conexión de la enfermedad con el consumo de alimentos se encuentra en la información sobre un brote de gastroenteritis en Illinois (357 afectados) debido al consumo de leche cruda en un establecimiento penitenciario (Levy, 1946). En 1947, Vincent y colaboradores aislaron *Vibrio fetus* en el hombre (Vincent et al., 1947) y diez años más tarde, en 1957, King lo observó en muestras sanguíneas de mujeres embarazadas (King, 1957), distinguiendo entonces entre dos grupos en función de sus características bioquímicas y serológicas: el grupo de *Vibrio fetus* y otro al que se denominó grupo termófilo o "related *Vibrio*" (*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*). Eran microorganismos de crecimiento fastidioso, a temperaturas de 37 y 42°C cuyo aislamiento en medio de cultivo a partir de muestras fecales no fue posible hasta el desarrollo de medios selectivos. Hacia 1970, el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de aislamiento de *Campylobacter* spp. permiten un gran avance en el estudio epidemiológico de la enfermedad (Butzler et al., 1973; Dekeyser et al., 1972; Skirrow, 1977). Es también en estas fechas cuando investigadores franceses muestran que estos vibrios microaerófilos constituyen un grupo diferenciado que merecen una categoría taxonómica diferenciada (Véron and Chatelain, 1973). Desde

entonces, en los últimos años, las técnicas de caracterización molecular han permitido conocer muchos puntos oscuros sobre las relaciones taxonómicas entre los integrantes de la familia *Campylobacteraceae*. Paralelamente, la incidencia de la enfermedad ha ido en aumento hasta convertirse en la zoonosis con mayor incidencia a nivel europeo y mundial según las estadísticas epidemiológicas (EFSA, 2010b; Samuel et al., 2004).

## 1.2 FISIOLÓGIA Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO *CAMPYLOBACTER*

Etimológicamente, *Campylobacter* procede del griego *Kampulos* (καμπύλος), que significa "curvado", por ser ésta su apariencia más característica al observarlo mediante microscopía óptica. Es un bacilo Gram-negativo no esporógeno, con morfología espiralácea y tamaño entre 0,5-5  $\mu\text{m}$  de largo y 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de ancho. La mayoría de las cepas están dotadas de un flagelo polar que les confiere movilidad helicoidal, lo que facilita su penetración en la capa mucosa y constituye una cualidad importante en la patogenia (Figura 1.1). Son asacarolíticos, oxidasa

FIGURA 1.1. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

positivos, catalasa positivos y microaerófilos, que crecen en un rango de tensión de entre 3-15% de oxígeno. En medio sólido, las colonias son no hemolíticas, planas y brillantes, con borde irregular y colorido gris o ligeramente pardo. Es capaz de crecer en el rango de temperaturas de 35-42°C, pero su actividad se detiene a temperatura inferior a 30°C. La



actividad de agua apropiada para crecimiento es superior a 0,987 siendo la óptima de 0,997. Pueden crecer en un rango de pH entre 4,9 y 9 pero lo hacen de manera óptima a pH de 7. Son claramente microorganismos lábiles, inactivándose a temperaturas por encima de 55°C (valor D entre 2,12 y 2,25 min) (ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998). También son fácilmente destruidos en condiciones subóptimas o por tratamientos tecnológicos como la congelación, la deshidratación, la acidificación, y la irradiación. En fase logarítmica de crecimiento, su forma característica es delgada, curvada o espiral. En cultivos envejecidos o estresados predominan formas más esféricas, cocoides o cocobacilares (Beumer et al., 1992; Boucher et al., 1994; Münch and Grillenberger, 1996). La mayoría de las formas cocoides no son cultivables por las técnicas clásicas (Beumer et al., 1992; Hazeleger et al., 1994), pero tienen un papel importante en la supervivencia durante el ciclo de contaminación ambiental (Boucher et al., 1994). Es un estado degenerativo por su menor nivel de péptidos,

ácidos nucleicos, superoxidodismutasa y por su menor integridad celular observada al microscopio electrónico (Buck et al., 1983; Moran and Upton, 1986).

El género *Campylobacter* (Sebald and Veron, 1963; Véron and Chatelain, 1973) se incluyó originariamente en la familia *Spirillaceae*, para diferenciar *C. fetus* de otros microorganismos taxonómicamente semejantes (*Vibrio* spp.) en base a diferencias en el metabolismo no fermentativo y la composición del DNA. Posteriormente el género *Helicobacter* se escindió de *Campylobacter*, y juntamente con *Wolinella* spp. y *Flexispira* spp. constituyeron el grupo *Helicobacteraceae*. Desde la clasificación de Véron y Chatelain (Véron and Chatelain, 1973), el género *Campylobacter* contenía especies heterogéneas con características diversas que condujeron a la reestructuración del género. Los análisis de 16S rRNA han permitido una revisión completa de la taxonomía (On, 2001; Vandamme et al., 1991; Vandamme and On, 2001).

En la actualidad el género *Campylobacter* está incluido en la clase E –proteobacteria, en la familia *Campylobacteraceae* juntamente con *Arcobacter* (que comprende las especies aerotolerantes *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* y *A. skirrowii*). *Helicobacter* (*H. fennelliae* y *H. cinaedi*) ha sido separado y se incluye en la familia *Helicobacteraceae* (Garrity et al., 2005). Se han descrito diecisiete especies y seis subespecies de *Campylobacter* (Tabla 1.1). Se reconocen doce especies de *Campylobacter* spp. como patógenos humanos, entre ellas *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. sputorum* biovar *sputorum* y el biovar *paraureolyticus*, *C. upsaliensis*, y recientemente *C. curvus* (Abbott et al., 2005; On et al., 1998b). Otras especies como *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. rectus* y *C. showae* han sido detectadas de la cavidad oral en el hombre (Etoh et al., 1993), relacionándose con enfermedades periodontales (Siqueira, Jr. and Rocas, 2003). Las especies *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae*, *C. mucosalis* y *C. sputorum* biovar *faecalis* no se consideran patógenas para hombre o animales a pesar de haberse aislado de ellos (Foster et al., 2004; Inglis et al., 2005; Lawson et al., 1998; Lawson et al., 2001; Logan et al., 2000; On, 1994; On et al., 1998a; Sasaki et al., 2003; Stanley et al., 1992). Las especies termotolerantes o termófilas asociadas a procesos gastroentéricos son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*. Esta denominación se debe a que a diferencia de *C. fetus* subsp. *fetus*, son capaces de crecer a 42°C pero no a 25°C.

### 1.3 AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

El desarrollo de medios de cultivo para detección de *Campylobacter* en heces humanas, alimentos y muestras ambientales ha permitido conocer más profundamente su participación en infecciones gastrointestinales vehiculadas por alimentos. Hasta la década de los 70 no se crearon medios específicos aptos para soportar el crecimiento de *Campylobacter* (Bolton and Robertson, 1982; Butzler et

al., 1973; Skirrow, 1977). Previamente, la detección se llevaba a cabo mediante la técnica de filtración por membrana y el uso posterior de medios no selectivos, con resultados poco satisfactorios (Dekeyser et al., 1972). Skirrow desarrolla un medio que incorpora antibióticos y consigue aislar *Campylobacter* de heces sin necesidad de filtración (Skirrow, 1977). Aunque el medio de cultivo de Skirrow es efectivo en el aislamiento de cepas de *Campylobacter* spp. presentes en heces humanas, es menos adecuado para muestras animales y medioambientales debido a la presencia de flora contaminante. Esto condujo al desarrollo de los medios de cultivo Preston, más selectivos y adecuados para el aislamiento de cepas de *Campylobacter* spp. de alimentos y muestras medioambientales (Peterz, 1991). A pesar de que los medios de cultivo tienen limitaciones ya que requieren de un tiempo adicional para la incubación y su capacidad de detección es variable, son imprescindibles si se quiere aislar el microorganismo para caracterizar y confirmar la identidad de las cepas aisladas por métodos fenotípicos o genotípicos. Para el análisis de muestras de alimentos o ambientales en las que el número de células de *Campylobacter* spp. suele ser bajo y/o existe flora acompañante, se requieren etapas de enriquecimiento previas a la siembra en el medio selectivo.

## 1.4 PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS EN IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN

### 1.4.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

*Campylobacter* spp. emplea aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico como fuente de energía en un metabolismo de tipo respiratorio. Presentan crecimiento lento y prefieren medios con peptona y extracto de levadura. No oxidan ni fermentan hidratos de carbono, por lo que sólo unos pocos tests bioquímicos (producción de catalasa, hidrólisis del indoxil acetato, producción de H<sub>2</sub>S e hidrólisis del hipurato) son útiles para la diferenciación específica (Tabla 1.1). La identificación a nivel de especie empleando pruebas fenotípicas es problemática por la similitud entre las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en los resultados de pruebas bioquímicas y también la subjetividad inherente en su lectura. Muchas de las pruebas citadas dan resultados variables para diferentes cepas de la misma especie, originando problemas en su identificación (On and Holmes, 1995). Algunas pruebas tradicionalmente usadas en la diferenciación entre *C. jejuni* y *C. coli* (hidrólisis del hipurato) no resultan siempre fiables ya que se han descrito cepas de *C. jejuni* que no pueden hidrolizar el hipurato (Totten et al., 1987), lo que produce errores en la diferenciación con *C. coli* (Siemer et al., 2005). La Tabla 1.1 presenta las pruebas bioquímicas más útiles para realizar la identificación taxonómica de las especies del género *Campylobacter*.

Existen dos subespecies en *C. jejuni*, *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*, que pueden ser diferenciadas mediante el test de reducción del nitrato (*C. jejuni*

subsp. *doylei* es negativa) (Tabla 1.1), pero el papel de *C. jejuni* subsp. *doylei* en la enfermedad humana no es bien conocido y *C. jejuni* se emplea siempre para referirse a *C. jejuni* subsp. *jejuni*. La designación de subespecies de *C. fetus* se basa en la asociación de la subespecie *C. fetus* subsp. *fetus* con los abortos en el ganado vacuno y ovino, y la subespecie *C. fetus* subsp. *venerealis* con la infertilidad de etiología infecciosa en el vacuno (Skirrow, 1994). Los tres biovars de *C. sputorum* (*faecalis*, *paraureolyticus* y *sputorum*) se pueden diferenciar basándose en la catalasa (*C. sputorum* subsp. *faecalis* es positiva) y en la producción de ureasa (*C. sputorum* subsp. *paraureolyticus* es positiva) (Vandamme and On, 2001).

Para la tipificación de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* se ha empleado la serotipificación (Fricker and Park, 1989), basándose en la presencia de antígenos termoestables (heat-stable, HS) y termolábiles (heat-labile, HL) (Lior et al., 1982; Penner et al., 1983), detectando más de 60 y 100 serotipos, respectivamente. El serotipado requiere de antisueros disponibles únicamente en laboratorios de referencia, siendo otras desventajas el alto número de cepas no tipificables, y su carestía. Otros métodos fenotípicos son el biotipado (Lior, 1984) y el fagotipado (Khakhria and Lior, 1992).

TABLA 1.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DIFERENCIADORAS ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *CAMPYLOBACTER* (EUZÉBY, 2006).

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	d	+	-	+
<i>C. concisus</i>	-	d	-	-	-	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	-	(+)	(-)	(-)	(-)	-
<i>C. curvus</i>	-	+	(-)	d	-	d	-	-	+	(+)	+	-	d	(-)	+	d	+
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	+	(+)	+	+	+	+	d	-	-	-	+	-	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	(+)	+	-	-	(+)	-	+	(+)	(-)	(-)	d	-	-	-	(+)	-	-
<i>C. gracilis</i>	(-)	-	-	(+)	-	(+)	-	-	+	+	+	-	-	-	(+)	(-)	-
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	+	-	+	+	d	d	-	-	-	-	-	+	(-)	-
<i>C. hominis</i>	-	-	-	-	-	d	d	+	-	+	-	-	-	d	-		
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	+	+	-	-	(-)	+	+	(+)	+	(+)	-	-	-	(+)	+	-	(-)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	(-)	-	+	-	(-)	(+)	+	-	-
<i>C. insulaenigrae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-					
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i>	(+)	+	+	+	-	-	+	-	(-)	(+)	-	-	-	-	-	-	d
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	+	+	+	+	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	-	+	-	(+)
<i>C. lanienae</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	w	-	+	-	+	-			
<i>C. lari</i>	+	+	-	(-)	-	+	+	+	+	(-)	-	d	(-)	-	+	(+)	(+)
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	-	+	(+)	(+)	d	-	+	-	(+)	+	(-)	(+)	-
<i>C. rectus</i>	(-)	+	-	+	-	(-)	-	-	+	-	+	-	-	-	+	d	-
<i>C. showae</i>	+	D	-	d	-	d	-	-	d	-	+	-	-	d	+	+	-
<i>C. sputorum</i>	d	+	-	-	-	(+)	d	d	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	+	-	(+)	+	+	+	D	-	-	-	-	+	-	d

1) catalasa, 2) oxidasa, 3) hidrólisis hipurato, 4) hidrólisis acetato de indoxil, 5) crecimiento a 25°C, 6) crecimiento a 42°C, 7) crecimiento en 1.5% bilis, 8) crecimiento en 2% bilis, 9) crecimiento en 1% glicina, 10) crecimiento en 0,1% permanganato potásico, 11) crecimiento en anaerobiosis, 12) ureasa, 13) fosfatasa alcalina, 14) producción de H<sub>2</sub>S en TSI, 15) reducción de nitrato, 16) crecimiento en 2% de NaCl, 17) crecimiento en 0,04% de cloruro de trifeniltetrazolio.

+ = todas las cepas positivas, +w = débilmente positivas, (+) 70 a 90% positivas, d = 40 a 64% positivas, (-) = 7 a 29% positivas, - = todas las cepas negativas.

#### 1.4.2 MÉTODOS GENOTÍPICOS

Los métodos basados en el análisis de fragmentos del genoma son actualmente los que más capacidad de discriminación entre tipos poseen y más información aportan en la búsqueda de relaciones entre los taxones y en identificación. El gen 16S rRNA ha sido utilizado con este propósito mediante el empleo de técnicas como el RFLP-PCR, que permite discriminar entre *C. jejuni* y *C. coli* (Linton et al., 1997), y entre *C. helveticus* y *C. upsaliensis* (Lawson et al., 1997). También se ha ensayado el RFLP-PCR del fragmento 23S rRNA empleando dos enzimas de restricción (Fermer and Olsson, 1999; Hurtado and Owen, 1997). Debido a que el genoma de *Campylobacter* spp. es dinámico y se ve afectado por mecanismos de recombinación homóloga y transferencia lateral (Dingle et al., 2001; Miller et al., 2005; Schouls et al., 2003), se ha propuesto la secuenciación de un pequeño número de genes codificadores de proteínas altamente conservadas para el estudio de la filogenia de especies cercanas. Los genes *groEL* y *rpoB* se han propuesto para la identificación a nivel de especie de *Campylobacter* (Hill et al., 2006; Korczak et al., 2006). Son fragmentos ubicuos, conservados, pero con suficiente variación entre especies como para procurar mejores resultados en la identificación.

Para la genotipificación de *Campylobacter* spp. se emplean sobre todo las técnicas genotípicas de PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), AFLP (amplified fragment length polymorphism), ribotipado, tipado basado en el gen *fla*, y el MLST (multilocus sequence typing). El PFGE se basa en el corte del DNA genómico por enzimas de restricción de corte restringido, y la separación de los fragmentos mediante una electroforesis en campo pulsante (Hanninen et al., 2000; Michaud et al., 2001). El AFLP se basa en la digestión del DNA genómico mediante dos enzimas de restricción con lugares de reconocimiento de 4 y 6 pares de bases. El DNA digerido es amplificado mediante PCR y posteriormente los perfiles son detectados mediante electroforesis (Duim et al., 1999; Kokotovic and On, 1999). El ribotipado se basa en la digestión del DNA genómico, su separación mediante electroforesis en gel de agarosa e hibridización Southern blot con sondas específicas para genes de rRNA (de Boer et al., 2000; Ge et al., 2006; Gibson et al., 1995). Otros métodos de obtención de perfiles genotípicos empleados en la tipificación de *Campylobacter* como el RFLP-PCR están basados en el gen de la flagelina (*flaA* o *flaB*) (Harrington et al., 2003; Petersen and Newell, 2001). El sistema de tipado más novedoso es el MLST, que se basa en la secuenciación de aproximadamente 450-500 bp de fragmento de siete genes domésticos (housekeeping genes): *aspA* (aspartase A), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidroximetiltransferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transketolasa) y *uncA* (subunidad alpha ATP sintasa) (Dingle et al., 2001; Dingle et al., 2005). En función de las diferencias en pares de bases en los genes se forman los llamados sequence-types (ST) y ST-complexes. Aparentemente, el MLST tiene menor poder discriminante que el PFGE (O'Reilly et al., 2006; Sails et al., 2003b; Sails et al., 2003c) y similar al AFLP (Schouls et al., 2003) y está muy orientado al análisis de la estructura de poblaciones (Clark et al., 2005).

## 1.5 RESERVORIOS Y CONTAMINACIÓN MEDIOAMBIENTAL

El principal reservorio ambiental de las especies patógenas de *Campylobacter spp.* es el tracto digestivo de aves y mamíferos tanto salvajes como domésticos (Hald et al., 2004; Hook et al., 2005; Nadeau et al., 2002; Petersen et al., 2001; Schouls et al., 2003; Thomas et al., 1997). Son muchas las especies de animales en las que se encuentra como comensal sin manifestar síntomas en el hospedador, pero siendo excretado de manera continua en heces. Es también habitual que se encuentre como comensal en animales domésticos como roedores, perros (sobre todo cachorros) y gatos (en especial en las crías) (Acke et al., 2006; Acke et al., 2009; Acke et al., 2010; Corry et al., 1982; Fernandez and Martin, 1991; Koene et al., 2009). Otras especies animales en las que se ha aislado son las almejas, ostras y mejillones (Endtz et al., 1997; Van Doorn et al., 1998; Wilson and Moore, 1996), así como peces, corzo, jabalí, alce y liebre parda (Engvall et al., 2002) y aves como patos, gansos y gaviotas (Abulreesh et al., 2006; Hughes et al., 2009; Waldenstrom et al., 2007). Igualmente puede estar presente como comensal en el tracto intestinal humano.

Por supuesto, los animales de abasto como aves, vacuno, porcino y ovino son reservorios conocidos de *Campylobacter spp.* (Acik and Cetinkaya, 2005; Acik and Cetinkaya, 2006; Alter et al., 2005; Boes et al., 2005; Cornelius et al., 2005; Keller and Perreten, 2006; Munroe et al., 1983; Rotariu et al., 2009; Stanley and Jones, 2003). Pero las aves de aptitud cárnica son el reservorio más importante reconocido de este patógeno (Atanassova and Ring, 1999; Borck and Pedersen, 2005; Ellis-Iversen et al., 2009). Se han detectado diferencias en la distribución de *C. jejuni* y *C. coli* dependiendo del reservorio, asociándose *C. jejuni* generalmente a aves y *C. coli* a porcino. *C. jejuni* ha sido identificado en 42,5%, 86,8% y 2,1% de las cepas aisladas de broilers, vacuno y cerdos respectivamente, mientras que *C. coli* lo fue a su vez en el 13,1%, 9,5% y 87,1% de las cepas en los mismos reservorios (EFSA, 2009b). En cuanto a otras especies de *Campylobacter*, debe destacarse que no se determinó la especie en un 46,4%, 3,7% y 10,8% de las cepas aisladas de broilers, vacuno y porcino ("*Campylobacter spp.* unspecified"). Otros animales de abasto en los que se ha encontrado prevalencias significativas, aunque reducidas (en torno al 5%), son las aves de caza criadas en cautividad (Soncini et al., 2006).

Debido a la excreción continua en heces, la contaminación ambiental puede ser extensa abarcando aguas en arroyos, ríos, y lagos, o productos vegetales en contacto con materia fecal (Abulreesh et al., 2006; Brown et al., 2004; Devane et al., 2005; Garrett et al., 2007; Hansson et al., 2007b). Se ha aislado *Campylobacter spp.* de las líneas y depósitos de agua de las granjas avícolas (Newell and Fearnley, 2003), y de hábitats de agua dulce (lagos, ríos y pozos) (Brennhovd et al., 1992; Hänninen et al., 2003) consecuencia de la contaminación con aguas residuales, aguas de escorrentías de pastos y por contaminación directa por aves. De hecho, la contaminación del agua

es generalmente fruto de la previa contaminación de la manada, antes que en sentido inverso (Newell and Fearnley, 2003).

Aunque *Campylobacter* spp. no es capaz de permanecer largo tiempo como formas infectivas fuera de un hospedador animal, su capacidad de supervivencia aumenta en zonas húmedas, frías y no expuestas directamente a la luz solar, como el agua de ríos, charcas, etc. (Cools et al., 2003; El-Shibiny et al., 2009; Lind et al., 1996). La supervivencia mejora a temperaturas de refrigeración, y *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* son viables en agua a 4°C durante 15 días; 10 días a 12°C y 10-15 días en el agua de río a la misma temperatura, y disminuye progresivamente al aumentar la temperatura y la oxigenación (Buswell et al., 1998). En condiciones ambientales desfavorables, *Campylobacter* spp. adopta un estado viable pero no cultivable que no puede ser aislado por métodos de cultivo, aunque sigue siendo infeccioso (Federighi et al., 1998; Rollins and Colwell, 1986; Tholozan et al., 1999). Las células viables no cultivables de *C. jejuni* pueden permanecer en este estado durante meses y revertir al estado cultivable mediante un pase por un hospedador animal como ratones de laboratorio (Baffone et al., 2006; Cappelier et al., 1999). La supervivencia de *Campylobacter*, como la de otros patógenos, se ve favorecida cuando se encuentran inmersos en un biofilm, que les protege contra el estrés medioambiental y mejora su capacidad de adhesión (Trachoo et al., 2002; Trachoo and Frank, 2002). La viabilidad de *C. jejuni* en agua bajo condiciones de estrés medioambiental (alta concentración de oxígeno, exposición a rayos UV, escasez de nutrientes, etc.) contribuye al daño físico de las células y reduce su capacidad de recuperación en medios de cultivo selectivos (Atack and Kelly, 2009; Jackson et al., 2009; Newell and Fearnley, 2003).

## 1.6 ALIMENTOS COMO VEHÍCULO DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

De entre los alimentos, la carne de pollo ha sido considerada tradicionalmente el vehículo alimentario más importante en la campilobacteriosis, y son muchas las evidencias que soportan esta relación. La reducción en el consumo de este tipo de carne (por ejemplo, durante la crisis de las dioxinas en Bélgica (1999), o la gripe aviar en Holanda (2003)) se han visto acompañadas por un descenso significativo de los casos de enfermedad (Vellinga and Van Loock, 2002). Los serotipos presentes en broilers y aislados de casos clínicos son muy similares (Altekruse, 1998). Según estudios de atribución de fuentes empleando diversos sistemas, la carne de ave es una importante fuente de infección humana con porcentajes de atribución entre el 55 y 71% para la carne de pollo (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010). Los alimentos en los que *Campylobacter* spp. se aísla más frecuentemente son las carnes, como la de aves de corral (en especial pollo y pavo), y en menor proporción la de porcino (en este caso *Campylobacter coli*) y vacuno (Atanassova et al., 2007; Bracewell et al., 1985; Kwiatek et al., 1990; Zhao et al., 2001). El grado de contaminación de las canales de pollo es muy elevado. En el caso de las canales de pollo de venta al por menor, la prevalencia oscila enormemente entre un 0% y un 100%, con porcentajes

entre un 60% y un 90% de las canales positivas con niveles de contaminación superiores a  $10^3$  ufc/g (Allen et al., 2007; Atanassova and Ring, 1999; Chrystal et al., 2008; De Cesare et al., 2008; Johannessen et al., 2007). Varios factores ayudan a explicar estas altas prevalencias, pero sin duda, las razones primordiales residen en la alta prevalencia del patógeno en los animales vivos, el particular método de sacrificio de las aves, con etapas como el escaldado y el desplumado que contribuyen a la diseminación de la contaminación, y las condiciones de almacenamiento junto con la naturaleza de la piel de las aves que facilitan la supervivencia de células de *Campylobacter* (El-Shibiny et al., 2009; Kotula and Pandya, 1995; Lee et al., 1998).

A pesar de que el reservorio principal son las aves en producción intensiva, su aislamiento de huevos es infrecuente, debido aparentemente a su incapacidad para penetrar la cáscara y/o sobrevivir en la cáscara, clara o yema (Baker et al., 1987; Doyle, 1984; Sahin et al., 2003; Zanetti et al., 1996). El microorganismo se ha detectado tanto en leche no pasteurizada (de vaca, oveja o búfala) como en el queso elaborado a partir de la misma (Adesiyun et al., 1996; Beumer et al., 1988; Doyle and Roman, 1982; Humphrey and Beckett, 1987; Lovett et al., 1983). Además estos alimentos están estrechamente vinculados a brotes de campilobacteriosis (Birkhead et al., 1988; Fahey et al., 1995; Kornblatt et al., 1985; Levy, 1946; McNaughton et al., 1982). No es frecuente su aislamiento en leche y productos lácteos pasteurizados, por su escasa termorresistencia (D'Aoust et al., 1988; El-Nokrashy et al., 1997). En quesos acidificados madurados durante largo tiempo no se detecta normalmente (Baffone et al., 1995; Federighi et al., 1999; Whyte et al., 2004). Se ha detectado *Campylobacter* en productos vegetales listos para comer contaminados a partir de heces o agua contaminada (Beuchat, 1996; Chai et al., 2007; Evans et al., 2003; Federighi et al., 1999; Park and Sanders, 1992), pero en pocas ocasiones estos alimentos se han visto implicados en brotes de campilobacteriosis (EFSA, 2009a).

Se sabe que *Campylobacter* no puede crecer en alimentos a las T° habituales de almacenamiento (Beutling, 1998), y por tanto los alimentos funcionan como meros vectores no existiendo multiplicación en ellos (Altekruse et al., 1994). La contaminación cruzada es la causa de muchos casos de campilobacteriosis al contaminarse alimentos en el momento y lugar apropiados (ya listos para consumir), por contacto con superficies como cubiertos, tablas de cortar, etc. siendo buenos ejemplos las barbacoas o los bufés fríos (Allerberger et al., 2003; Istre et al., 1984).

## 1.7 EPIDEMIOLOGÍA DE LA GASTROENTERITIS POR *CAMPYLOBACTER* SPP.

### 1.7.1 INCIDENCIA

Las especies de *Campylobacter* asociadas con la enfermedad gastrointestinal incluyen *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus* y *C. upsaliensis*. De entre ellos *C. jejuni* y *C. coli* son los más frecuentemente aislados de muestras clínicas en hombre. *Campylobacter* spp. se

ha convertido en una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacteriana transmitida por alimentos y sobrepasa a *Salmonella* en muchos países industrializados. Según datos publicados en el Informe sobre tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos en la Unión Europea (EFSA, 2009b; EFSA, 2010b), en 2007 se registraron más de 200.000 casos confirmados de campilobacteriosis humana (200.507) en 24 Estados miembros. La tasa de notificación global fue de 45,2 casos por 100.000 habitantes. En 2008 la incidencia disminuyó a 40,7 casos por 100.000 habitantes con 196.566 casos registrados (5% de descenso). Las tasas de notificación de 2008 para los diferentes Estados miembros se presentan en la Tabla 1.2 y en la Figura 1.2. La variación en las tasas de notificación entre los Estados miembros es muy grande (de <0,1 a 193,3) y esto puede ser debido, además de a la disparidad en la prevalencia, a la distinta sensibilidad de los sistemas de vigilancia y monitorización y a los métodos microbiológicos utilizados por los Estados miembros.

**TABLA 1.2. TASAS DE NOTIFICACIÓN Y Nº DE CASOS EN LOS PAÍSES MIEMBROS DE LA UE EN 2008 (EFSA, 2010B).**

Estado miembro	Nº de casos	Incidencia*
<b>Austria</b>	4.280	51,4
<b>Bélgica</b>	5.111	47,9
<b>Bulgaria</b>	19	0,2
<b>Chipre</b>	23	2,9
<b>Rep. Checa</b>	20.067	193,3
<b>Dinamarca</b>	3.470	63,4
<b>Estonia</b>	154	11,5
<b>Finlandia</b>	4.453	84
<b>Francia</b>	3.424	5,4
<b>Alemania</b>	64.731	78,7
<b>Grecia</b>	SD	
<b>Hungría</b>	5.516	54,9
<b>Irlanda</b>	1.752	39,8
<b>Italia</b>	265	0,4
<b>Letonia</b>	0	0,0
<b>Lituania</b>	762	22,6
<b>Luxemburgo</b>	439	90,7
<b>Malta</b>	77	18,8
<b>Países Bajos</b>	3.341	39,2
<b>Polonia</b>	257	0,7
<b>Portugal</b>	SD	
<b>Rumanía</b>	2	<0,1
<b>Eslovaquia</b>	3.064	56,7
<b>Eslovenia</b>	898	44,3
<b>España</b>	5.160	11,4
<b>Suecia</b>	7.692	83,8
<b>Reino Unido</b>	55.609	90,9
<b>Total</b>	190.566	40,7

\*Incidencia: expresada en número de casos por 100.000 habitantes. SD = Sin datos.

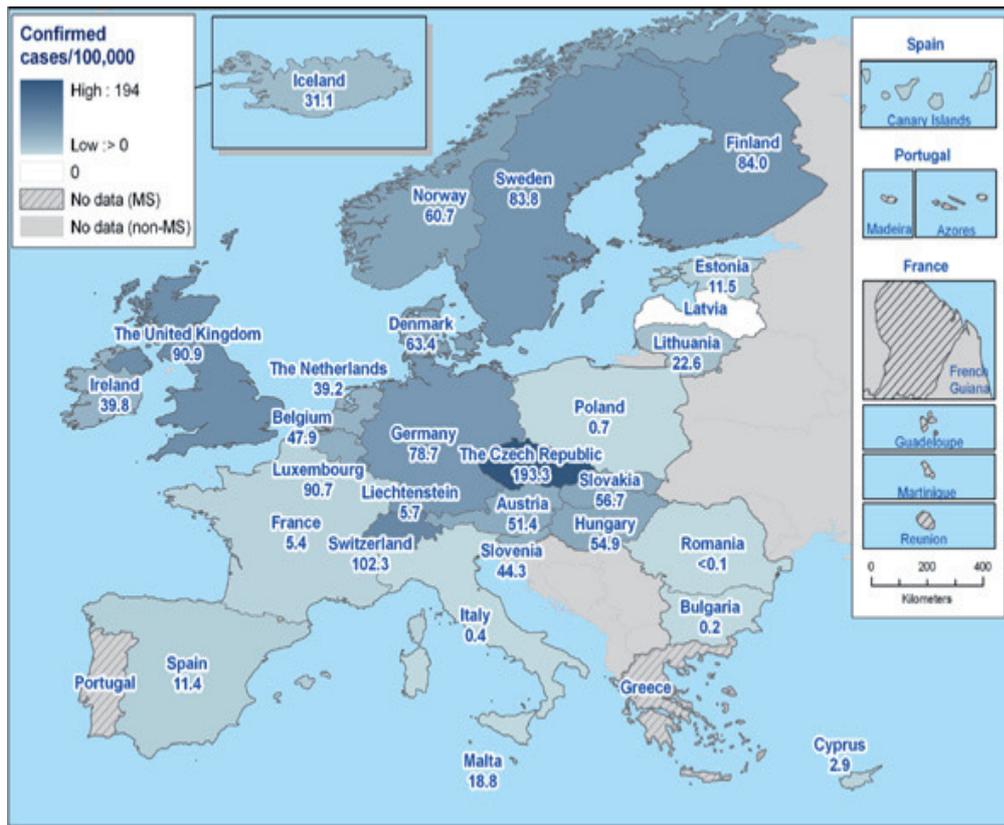


FIGURA 1.2. TASAS DE NOTIFICACIÓN DE CASOS DE CAMPILOBACTERIOSIS HUMANA POR CADA 100.000 HABITANTES EN LA UE EN 2008 (TOMADO DE EFSA, 2010).

La mayoría de los países europeos, con la excepción de Suecia, Finlandia, Países Bajos, y Francia, informaron de una ligera disminución en el número de casos confirmados en 2008, en comparación con 2007 (datos no mostrados). España continúa aparentemente una tendencia a la baja iniciada en 2004 pasando de 5.958 casos en 2004 a 5.160 en 2008, y opuesta a las cifras de la Unión Europea (Figura 1.3). Como ya se ha mencionado, al comparar los datos a nivel de la UE debe tenerse en cuenta que las cifras deben ser interpretadas con cautela debido, por ejemplo, a la modificación de los sistemas de vigilancia y presentación de informes o de los métodos de diagnóstico utilizados en uno o más países específicos, y no necesariamente reflejan un cambio en la tendencia en toda la UE. También existen países que no han emitido informe algunos años (por ejemplo, Portugal, Grecia y Eslovenia) o países con cifras tan reducidas que claramente muestran una diferencia en los criterios de recogida de información (por ejemplo, Italia).

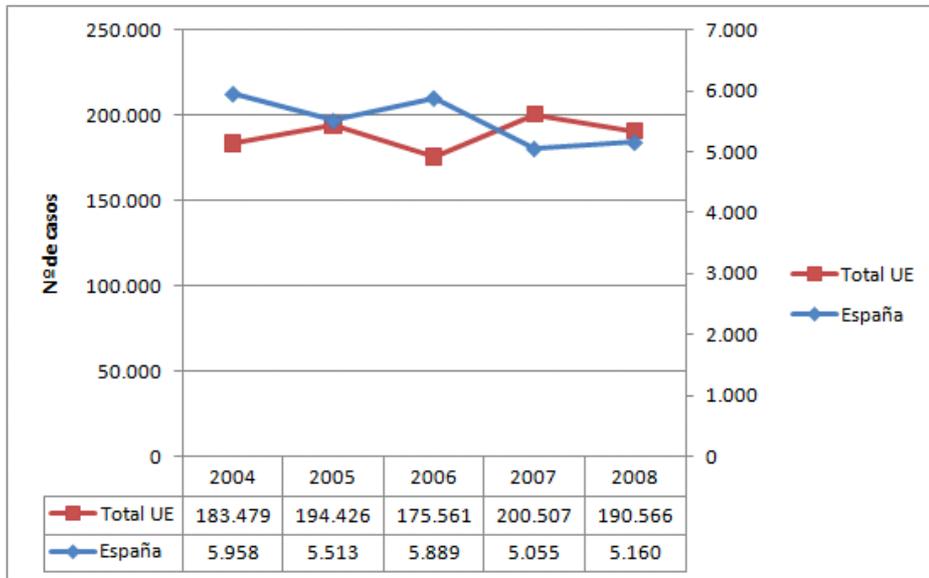


FIGURA 1.3. NÚMERO DE CASOS EN ESPAÑA Y EN LA UNIÓN EUROPEA EN LOS AÑOS 2004-2008 (EFSA, 2010)

La Figura 1.4 muestra que la mayoría de las cifras de notificación de casos de campilobacteriosis se produjeron durante los meses de verano y principios de otoño (junio-septiembre). Es llamativo que el pico de incidencia se expande también a meses de temperaturas moderadas como junio y septiembre. Según el CSR (EFSA, 2009b), no se observan diferencias significativas en la distribución estacional entre el norte y el sur de Europa.

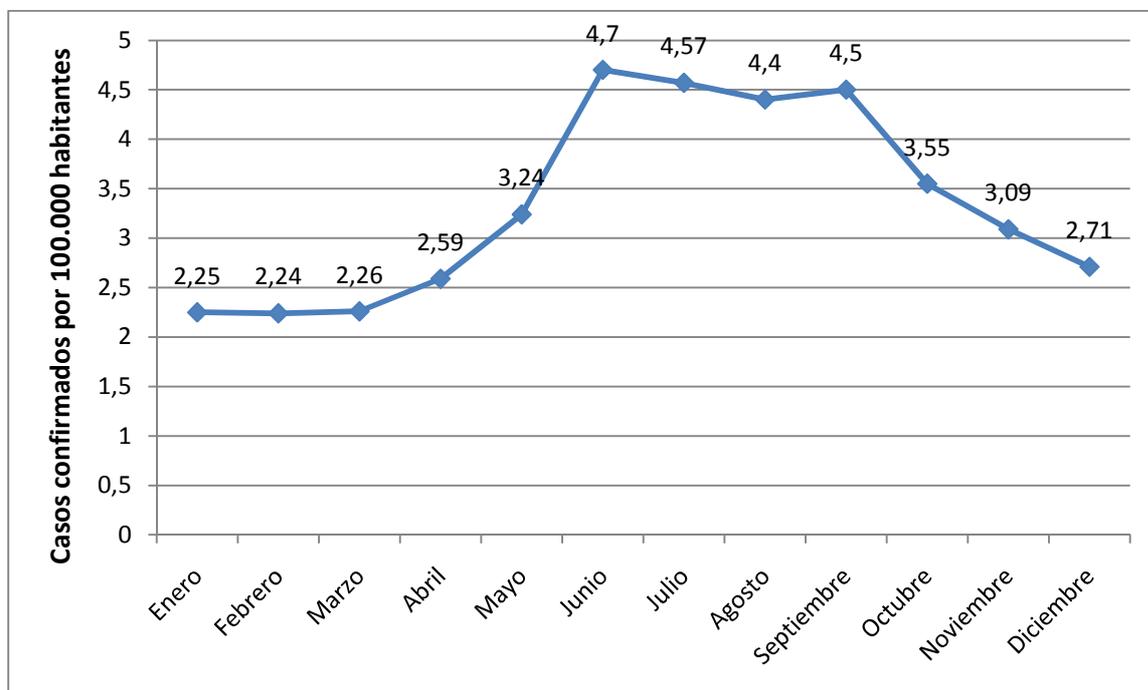
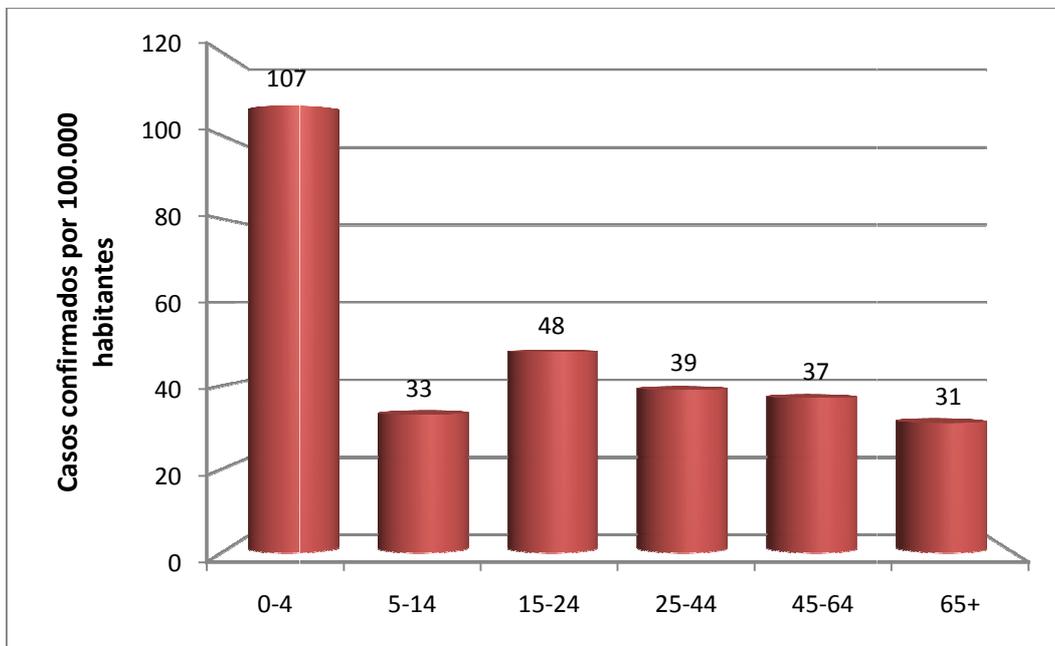


FIGURA 1.4. DISTRIBUCIÓN POR MES DEL AÑO DE CASOS CONFIRMADOS Y NOTIFICADOS DE CAMPILOBACTERIOSIS HUMANA POR 100,000 HABITANTES EN EUROPA (EFSA 2010).

La enfermedad no se manifiesta generalmente en forma de brotes epidémicos, sino como casos esporádicos. A nivel hospitalario la incidencia registrada es elevada, a pesar de ser en la mayoría de los casos un proceso autolimitante. La infección es sintomática en países desarrollados y presenta un carácter hiperendémico en países en vías de desarrollo, con una tasa de infecciones asintomáticas muy elevada. Tanto en los países en vías de desarrollo como desarrollados la enfermedad afecta principalmente a lactantes, y en Europa la incidencia es mayor, además de en los menores de 5 años, en individuos de entre 15 y 24 años (Figura 1.5). De un total de 1.000 análisis realizados en Alemania de pacientes diarreicos, resultaron positivas un 7,8% de muestras, un 14,8% de niños de edades comprendidas entre 6 y 10 años, frente a un 13,5% en adolescentes y jóvenes adultos (Böhm and Heeschen, 1995). Los datos epidemiológicos no reflejan el número total de casos de campilobacteriosis y es presumible una mayor incidencia de infecciones por *C. jejuni* que la observada en las estadísticas oficiales puesto que la mayoría de los casos no son registrados por su sintomatología leve o fallos en el sistema de recogida de información.



**FIGURA 1.5. DISTRIBUCIÓN ETARIA DE CASOS CONFIRMADOS Y NOTIFICADOS DE CAMPILOBACTERIOSIS HUMANA POR 100,000 HABITANTES (EFSA 2010)**

La campilobacteriosis es mayoritariamente una enfermedad transmitida por alimentos aunque existen otras vías de transmisión, como el manejo de alimentos o el contacto con animales (Anonymus, 1994; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010; Molbak and Havelaar, 2008). A pesar de que no se conoce con exactitud la dosis infectiva mínima (DIM) necesaria para provocar la enfermedad, se estima que además del número de células ingeridas, el resultado de la exposición depende de la virulencia del patógeno, las características del hospedador y el vehículo (tipo de alimento)

(Buchanan et al., 2009; Chen et al., 2006; Medema et al., 1996). La dosis necesaria para desencadenar la enfermedad se ha estimado en 2-3 células por gramo o mililitro de un alimento en una ingestión de comida normal, mientras que un estudio señala que en leche bastarían 500-800 células para ocasionar la enfermedad (Black et al., 1988; ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998; Robinson, 1981; Teunis et al., 2005). La información disponible procede de un único estudio y no parece ser suficiente para establecer relaciones dosis-respuesta fiables (Robinson, 1981; Teunis et al., 2005). Los modelos de relaciones dosis/respuesta establecidos son en su mayor parte no lineales, y en ellos la dosis infectiva necesaria para provocar enfermedad depende de varios factores, como la virulencia de la cepa, el vehículo (alimento, agua) y la susceptibilidad del hospedador (Buchanan et al., 2009).

### 1.7.2 BROTES

Incluso aunque la mayor parte de las campilobacteriosis se presentan como casos aislados, se registra un número apreciable de brotes en la Unión Europea. La mayor parte de los brotes causados por especies de *Campylobacter* se asocian al consumo de leche no pasteurizada o agua de bebida no tratada (Alary and Nadeau, 1990; Brieseman, 1987; Clark et al., 2003; EFSA, 2009a; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010; Hanninen et al., 2003; Martin et al., 2006; Mentzing, 1981; Palmer et al., 1983; Robinson et al., 1979; Robinson and Jones, 1981; Vogt et al., 1982). Los brotes pueden afectar a gran número de personas (Jakopanec et al., 2008; Martin et al., 2006). Como en otros brotes de pequeño tamaño las sospechas recaen en contaminación fecal de fuentes desconocidas, en ocasiones de animales silvestres y en otras por contaminación cruzada con carne de aves (Allerberger et al., 2003; Frost et al., 2002; Jimenez et al., 2005; Mazick et al., 2006). Aparentemente existen diferencias entre regiones europeas en lo que respecta a los alimentos implicados en los brotes, siendo más frecuente la participación del agua no tratada en los países nórdicos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2008a). Estas diferencias pueden ser debidas a distintas prevalencias o de hábitos de consumo, o a diferencias en el estudio y registro de los brotes por no estar armonizados los procedimientos entre países europeos. El estudio epidemiológico de brotes y casos aislados difiere pero en ambos es difícil determinar el origen de la contaminación por ser un patógeno ampliamente distribuido en el medio ambiente y por las limitaciones técnicas de los sistemas de atribución de orígenes, que precisa de sistemas de tipificación satisfactorios.

## 1.8 CAMPILOBACTERIOSIS Y SÍNDROMES ASOCIADOS

La campilobacteriosis cursa con gastroenteritis, o diarrea inflamatoria con daños en las superficies mucosas de yeyuno, íleon y colon. Otros síntomas colaterales son malestar, fiebre y dolor abdominal, así como la presencia de náuseas pero no de vómito. El período de incubación es de 1 a 7 días con comienzo agudo acompañado de calambres

abdominales y diarrea. Aproximadamente un tercio de los pacientes con gastroenteritis sufren fiebre prodromal, cefalea, vértigo, mialgia y otras molestias inespecíficas, similares al síndrome gripal, entre 12 y 24 horas antes de la aparición de síntomas intestinales. Los síntomas pueden abarcar desde unas pocas deposiciones sueltas hasta una diarrea acuosa profusa postrante con diez o más movimientos intestinales al día. Las deposiciones pueden contener mucus y/o sangre (Blaser et al., 1979). Generalmente es un proceso autolimitante, cuyos síntomas pueden durar una semana o incluso más, que necesita de terapia de reposición de líquidos y electrolitos, y para una minoría de pacientes, debilitados o inmunocomprometidos, tratamiento antibiótico. Por esta razón, el aumento de las resistencias antibióticas en *Campylobacter* es motivo de alarma ya que este fenómeno ha aparecido de manera conjunta al empleo de antibióticos en producción animal.

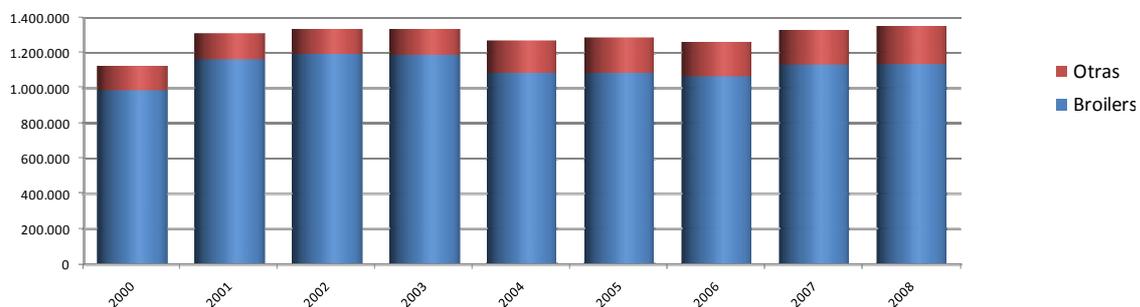
Entre las complicaciones importantes de comienzo tardío, cabe destacar el síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de Reiter, la artritis reactiva, y las infecciones crónicas en pacientes inmunodeficientes, neuropatías, apendicitis aguda, mielitis, síndrome de intestino irritable (SII) y enfermedad inflamatoria intestinal (Baar et al., 2007; Berden et al., 1979; Campbell et al., 2006; Havelaar et al., 2000; Koblar et al., 1991; Mangen et al., 2005; Smith and Bayles, 2007). También se ha documentado un incremento en la mortalidad después de una gastroenteritis aguda por *Campylobacter* (Helms et al., 2003). El síndrome de Guillain-Barré es una enfermedad infrecuente, cuya incidencia oscila entre los 1-1,5 casos/100.000 habitantes y año. No existe predisposición especial en función de la edad, sexo, raza o localización geográfica, y destaca el hecho de que algo más de la mitad de los pacientes refieren una infección gastrointestinal inespecífica, de uno a dos meses antes. Es una enfermedad autoinmune y reactiva, de la que *Campylobacter jejuni* es el antecedente patógeno más frecuente (Allos, 1997; Allos and Blaser, 1994). La infección por *Campylobacter* induce a una respuesta inmune celular y humoral y se estima que esto sucede en el 0,1% de los casos clínicos de campilobacteriosis.

El impacto combinado de las diferentes complicaciones y secuelas puede ser cuantificado mediante indicadores de salud integrados, tales como los años de vida ajustados por discapacidad (DALY, Disability Adjusted Life Years). En los Países Bajos, *Campylobacter* provoca la mayor carga de los patógenos comunes transmitidos por alimentos, seguida por *Salmonella* y *Toxoplasma* (Mangen et al., 2005). Para *Campylobacter*, la mayor contribución a la carga es por complicaciones, en particular, por el síndrome de Guillain-Barré. La mortalidad también provoca una carga relativamente elevada, mientras que la contribución de la gastroenteritis aguda es relativamente baja (Molbak and Havelaar, 2008). Un trabajo reciente (Haagsma et al., en prensa) sugiere que aproximadamente el 9% de los casos de gastroenteritis pueden llegar a desarrollar el síndrome de intestino irritable. Esto supondría aproximadamente 110.000 casos nuevos por año, explicando el 10% del total de la prevalencia de los

diagnósticos de SII. Aunque hay pocos datos sobre la gravedad y la duración del SII, se estima que el SII duplica la carga total de *Campylobacter* asociada a enfermedades en los Países Bajos, aproximadamente desde 1.600 hasta 3.000 DALYs por año (EFSA, 2009a; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010).

## 1.9 PRODUCCIÓN DE CARNE DE AVE EN ESPAÑA

En el año 2009, según datos del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), se sacrificaron en España 675 millones de aves (incluyendo el pollo -*Gallus gallus*, avestruces -*Struthio camelus*-, además de otras especies) con un peso en canal de 1.234.000 t. La Figura 1.6 muestra la evolución en toneladas del peso canal total de aves sacrificadas en España durante los años 2000-2008. De ellos el 84,9% eran broilers, un 5,3% gallinas y el resto carne de otras producciones incluyendo avestruz. La avicultura alternativa en su conjunto representa aproximadamente un 7% (86.000 t) del total de carne de ave producida en España. Las formas “extensivas” de pollo representan el 80% del total de este tipo de carne, seguido de codorniz (11%) y pato (9%). En cuanto a la producción de carne de avestruz (comunicación interna del MARM), y según estimaciones del sector productor, la producción estaría en torno a 175 t anuales, correspondientes al sacrificio de 7.500 aves en los 14 mataderos autorizados para el sacrificio de estos animales. La producción se mantiene estable tras el espectacular incremento vivido en los años 1999-2002.



**FIGURA 1.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CANAL TOTAL DE AVES SACRIFICADAS (TONELADAS) EN ESPAÑA (2000-2008).**

Por su parte, la orientación zootécnica y los sistemas de cría animal tienen una influencia directa en la epidemiología de las enfermedades zoonóticas, y por tanto también en el caso de las infecciones por *Campylobacter* spp. La avicultura industrial se caracteriza por una mayor densidad poblacional de los animales, lo que facilitaría el contagio y la diseminación una vez introducido el agente en la manada. No obstante, las prácticas sanitarias y productivas aconsejadas (vacío sanitario, aplicación de medidas de bioseguridad, aislamiento frente a vectores como aves silvestres, control higiénico-sanitario de la alimentación y de la sanidad de la cabaña, etc.) dificultan con mayor eficacia la exposición inicial de la población. Por el contrario, la avicultura

alternativa y de carácter extensivo, como los sistemas de producción ecológica de pollo, facilitan el contagio inicial de dichas poblaciones. La cría en campo abierto y con libertad de movimientos facilita el contacto con poblaciones aviares silvestres y supone, en general, la aplicación de unas medidas de bioseguridad menos drásticas. Sin embargo, la menor densidad poblacional de dichos sistemas de cría disminuye, si bien no impide, la capacidad de contagio por vía orofecal de cepas de *Campylobacter* spp. entre la población.

### 1.10 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La campilobacteriosis es actualmente la enfermedad gastrointestinal transmitida por alimentos que presenta mayor incidencia a nivel europeo, y también en España (EFSA, 2009b). A pesar de ello, no se le ha prestado suficiente atención ni se ha valorado en su justa medida el coste que supone en términos económicos, existiendo una insuficiente concienciación de la dimensión del problema a nivel sanitario (Canals i Rosell, 2001). Además de una evaluación general de la prevalencia de *Campylobacter* spp. a lo largo de la cadena alimentaria y en diversos productos, es necesario conocer las fuentes de contaminación y las vías de transmisión para poner en práctica procedimientos de control destinados a reducir la incidencia de la enfermedad. Para una eficaz evaluación y gestión de los riesgos asociados a la campilobacteriosis, es necesario reconocer la contribución relativa de distintos alimentos y otros factores de riesgo.

La emergencia de resistencias antibióticas es uno de los retos más acuciantes que se plantean en Salud Pública. Ante la emergencia de cepas resistentes a las quinolonas en países con avicultura intensiva, es preciso contar con datos de monitorización y vigilancia que permitan conocer tendencias a corto y medio plazo. Un aspecto importante que permite arrojar luz sobre estas cuestiones reside en el estudio de características fenotípicas y genotípicas de las cepas que permiten conocer la variabilidad y distribución clonal de las cepas en el medio ambiente, las especies animales y los productos derivados. Existen técnicas fenotípicas como la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) que, mediante la obtención de espectros infrarrojos (IR), permite la comparación y diferenciación de cepas en base a su espectro IR, e indirectamente, a su composición química. Para el manejo de datos numéricos complejos se emplean técnicas matemáticas multivariantes como las Redes Neuronales Artificiales (RNAs), el Análisis Discriminante (SDA) o el Índice de Discriminación ( $D$ ), pero es preciso determinar su adecuación a la caracterización e identificación de *Campylobacter* spp. empleando datos de espectros IR, mediante el estudio de su eficiencia, ventajas e inconvenientes en relación con los procesos de asignación de cepas y la detección de falsos positivos y falsos negativos.

En concreto, los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

- Conocer la prevalencia de *Campylobacter* spp. y su distribución ambiental, estacional y en determinados productos de origen animal a lo largo de la cadena alimentaria.
- Determinar el perfil de antibiorresistencias de los microorganismos aislados.
- Poner a punto la técnica de espectroscopía FT-IR y realizar una caracterización quimiotaxonómica (obteniendo e interpretando su espectro IR) y fenotípica de los microorganismos aislados.
- Desarrollar distintas Redes Neuronales Artificiales y comparar su adecuación a procesos de identificación empleando espectros IR.
- Emplear técnicas de análisis multivariante para la identificación de *Campylobacter* mediante el empleo de espectros IR.

## 2 CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* SPP., IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA, Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

### 2.1 INTRODUCCIÓN

La transmisión de *Campylobacter* desde los reservorios al hombre puede producirse por diferentes vías. Existe una vía directa (por ejemplo con las manos contaminadas tras estar en contacto con alimentos, heces o mucosas de mascotas). Debido a la eliminación vía fecal de células y la contaminación del medio ambiente, la infección se puede producir tras ingestión de agua no tratada, o vegetales crudos contaminados (Beuchat, 1996). Se han sugerido otras vías de contaminación como las moscas, que pueden transportar la bacteria al alimento (Hald et al., 2004; Nichols, 2005; Shane et al., 1985) o servir de reservorio en granjas, de la misma manera que otros insectos (Bates et al., 2004; Szalanski et al., 2004). El manejo y consumo de carne tiene una importancia mayor como vía directa e indirecta (Doyle, 1992; Friedman et al., 2004). La contaminación de canales en el matadero por contenido intestinal es más probable en el caso de las aves como pavos o pollos, por su sistema de sacrificio y carnización. Las propiedades de la piel de las canales de aves y las condiciones de almacenamiento y procesado hasta la venta favorecen la supervivencia de *Campylobacter* en comparación con las carnes rojas (Davis and Conner, 2007; Yang et al., 2001). La infección gastrointestinal puede producirse directamente por ingestión de carnes crudas o insuficientemente cocinadas o indirectamente por contaminación cruzada con alimentos preparados listos para consumir a través de las superficies y el material de la cocina como cubiertos, platos, etc. (Altekruse, 1998; Chai et al., 2008; Humphrey, 2001). Existen aún lagunas en algunos aspectos de la epidemiología de *Campylobacter* spp. por lo que son necesarios nuevos estudios sobre su distribución y extensión a nivel de granja, los reservorios, las vías de contaminación y los alimentos implicados.

#### 2.1.1 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* TERMOFILICOS

*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son bacterias termófilas que necesitan condiciones microaerófilas a 37-42°C para su crecimiento óptimo. Se emplean medios de cultivo selectivos con antibióticos para aislar los microorganismos de muestras fecales y de muestras de alimentos, por la existencia de flora competidora (Chan and Mackenzie, 1984; Corry et al., 1995; Hutchinson and Bolton, 1983; Kim et al., 2009). La presencia de microorganismos dañados por estrés ambiental, como cambios térmicos, deshidratación, oxígeno atmosférico, limitación de nutrientes o shock osmótico, hacen necesarias generalmente técnicas de enriquecimiento para recuperar las células dañadas y cuando se encuentran en números bajos o en competición con otra microflora acompañante (Fricker and Girdwood, 1984; Ribeiro et al., 1984).

No existe un método estándar aceptado universalmente para el aislamiento de *Campylobacter* spp. y se considera que los medios de cultivo disponibles en la actualidad no son óptimos para la recuperación de *Campylobacter* de muestras de diverso tipo (Kim et al., 2009). Existen numerosos métodos de aislamiento de *Campylobacter* spp. pero la metodología no está suficientemente normalizada (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), 2007). Existen múltiples técnicas disponibles que van desde la filtración, el empleo de medios no selectivos o la utilización de medios de recuperación, el empleo de enriquecimiento selectivo en caldo, y detección directa o indirecta en medio sólido selectivo (Albert et al., 1992; Aspinall et al., 1996). Las técnicas varían en su capacidad de recuperación dependiendo del número de células existentes en la muestra, el grado de daño subletal presente en dichas células (Corry et al., 1995) y el número y actividad de la flora acompañante (muestras clínicas, alimentos, muestras ambientales).

Una alternativa en la detección al empleo de los medios de cultivo la constituyen las pruebas genéticas e inmunológicas, como las que usan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o anticuerpos monoclonales. Se han desarrollado tests de aglutinación en látex y ELISA, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Tolcin et al., 2000). Por otra parte las técnicas de PCR, descritas por primera vez para *Campylobacter* en 1992, buscan amplificar el gen de la flagelina A en *C. jejuni* y *C. coli* (Oyofe et al., 1992). La técnica permite detectar un bajo número de células en muestras clínicas y es suficientemente específica para las dos especies mencionadas (Al et al., 2007; Alexandrino et al., 2004; Bang et al., 2003; Cardarelli-Leite et al., 1996; Debretsion et al., 2007; Hernandez et al., 1995; Hong et al., 2007). La técnica de PCR se ha combinado con sistemas de hibridación en microplaca (PCR-ELISA) lo que ha permitido aumentar la especificidad y la sensibilidad del proceso de detección con respecto a los medios tradicionales de cultivo (Grennan et al., 2001; Sails et al., 2001). La técnica de Real-Time PCR (LaGier et al., 2004; Sails et al., 2003a; Yang et al., 2004) permite la detección y diferenciación de las dos especies (*C. jejuni*, *C. coli*) de una manera eficaz y con elevada especificidad y sensibilidad. Aunque el empleo de métodos moleculares de detección tiene innumerables ventajas con respecto a los tradicionales de siembra en placa, estos últimos son necesarios si se desea una enumeración o una caracterización añadida de las cepas presentes en una muestra concreta.

### 2.1.2 PREVALENCIA DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

Son innumerables los trabajos publicados en los que se estudia la prevalencia de *Campylobacter* en broilers (Aho and Hirn, 1988; Arsenault et al., 2007; Atanassova and Ring, 1999; Byrd et al., 1998; Callicott et al., 2008; Chen et al., 2010; Domínguez et al., 2002; Hood et al., 1988; Humphrey et al., 1993; Jeffrey et al., 2001; Kapperud et al., 1993a; van de Giessen et al., 2006; Wedderkopp et al., 2000; Wittwer et al., 2005; Zweifel et al., 2008). Sin embargo, son muy escasos aquellos que buscan este patógeno

en otras especies de aves como el avestruz (Cuomo et al., 2007; Ley et al., 2001; Siemer et al., 2005), a pesar de que *Campylobacter* ha sido citado ocasionalmente como patógeno en avestruces jóvenes (Stephens et al., 1998; Verwoerd, 2000). Hay trabajos que investigan la prevalencia de *Campylobacter* en lo que es conocido como pollo “orgánico” o “free-range”. En algunos trabajos se encontró una prevalencia similar en animales criados en ambos sistemas (Cui et al., 2005; Sato et al., 2004) (aprox. 75% y 29% respectivamente). Otros artículos indican que el riesgo de infección por *Campylobacter* en aves criadas de manera “orgánica” o “ecológica” es mayor, por el contacto que mantienen con vectores externos (Engvall, 2001; Sulonen et al., 2007). *Campylobacter* spp. se aisló del 100% de las manadas de broiler orgánico, del 36,7% del broiler conventional y del 49,2% de las manadas de broiler criadas en extensivo pero en ciclo cerrado (Heuer et al., 2001).

Un ambicioso estudio de prevalencia de *Campylobacter* en broilers en matadero se ha llevado a cabo en 2008 en la Unión Europea, con el objetivo de obtener datos comparables entre países miembros mediante el empleo de esquemas y planes de muestreo armonizados (EFSA, 2010a). En él se tomaron diez muestras de 10.132 lotes (manadas) seleccionados aleatoriamente en 26 estados miembros más Noruega y Suiza, y tras el sacrificio en matadero se tomaron muestras de contenido intestinal (10 muestras conjuntas por lote) y canales para determinación analítica de *Campylobacter*. De los mismos lotes se muestreó una canal tras la refrigeración, tomando muestras de cuello y pechuga, con examen de presencia/ausencia así como recuentos cuantitativos de *Campylobacter* (EFSA, 2010a). Los resultados mostraron una elevada prevalencia, con valores medios en manadas (broilers) del 71,2% y del 75,8% en las canales, variando entre Estados miembro entre el 2,0% y el 100% para el contenido intestinal, y entre el 4,9% y el 100%, para las canales. Los resultados de los recuentos en las canales también variaron entre países, pero en general los altos recuentos se correlacionaron con altas prevalencias. Un 66% de los aislamientos fueron identificados como *Campylobacter jejuni*, y aproximadamente el resto como *C. coli*. Muy pocas cepas fueron asignadas a otras especies. La prevalencia observada en España fue del 88% de 389 lotes analizados (manadas) y del 92,6% en las canales, siendo una de las más elevadas entre los países europeos con producción avícola significativa.

### 2.1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Para conocer la prevalencia y las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Campylobacter* spp. presentes en medio ambiente y determinados productos de origen animal a lo largo de la cadena alimentaria, se diseñó un plan de toma de muestras en diversos puntos de la misma, a nivel de granja, matadero y producto preparado en establecimiento de venta. Se analizaron muestras recogidas en granja, tanto de aves industriales como de pollo criado según estándares de avicultura

ecológica<sup>1,2</sup>, y de una producción animal minoritaria (avestruces), como posible fuente de *Campylobacter* spp. Asimismo se recogieron y analizaron muestras procedentes de mataderos (tanto de pollo industrial como de avestruz) y de establecimientos de venta al público de este tipo de productos. Con ello se pretendía obtener una imagen del grado de contaminación, la existencia de contaminación ambiental y de la incorporación de microorganismos a la cadena alimentaria, observando asimismo la variación estacional.

En granja se analizaron muestras fecales al ser la vía oro-fecal una sistema de transmisión de *Campylobacter* spp.; también se analizaron muestras de piensos y agua de bebederos, por constituir un indicador de calidad del nivel higiénico de las explotaciones. Se investigó la presencia de *Campylobacter* spp. en matadero por constituir éste un punto crucial en la determinación del nivel de higiene alcanzado a lo largo de la cadena alimentaria y su protección evitando contaminaciones cruzadas (Slader et al., 2002) y evitando mediante medidas de higiene la presencia del microorganismo en la cadena alimentaria. En matadero se analizaron muestras hepáticas al ser el hígado el órgano interno en el que se ha observado una mayor incidencia de *Campylobacter* spp. (Moore, 2001). Se analizó también el agua de escaldado por constituir un posible foco de contaminación. Otros puntos de investigación fueron las jaulas de descarga exteriores, las jaulas de descarga interiores y zonas de clasificación por peso, para estudiar la higiene del proceso de sacrificio y faenado. Por último se analizaron también muestras de producto terminado para conocer la prevalencia en los productos comercializados.

## 2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1 TIPO Y NÚMERO DE MUESTRAS

La Tabla 2.1 presenta la distribución estacional, por lugar de muestreo y por animal de la toma de muestras realizada.

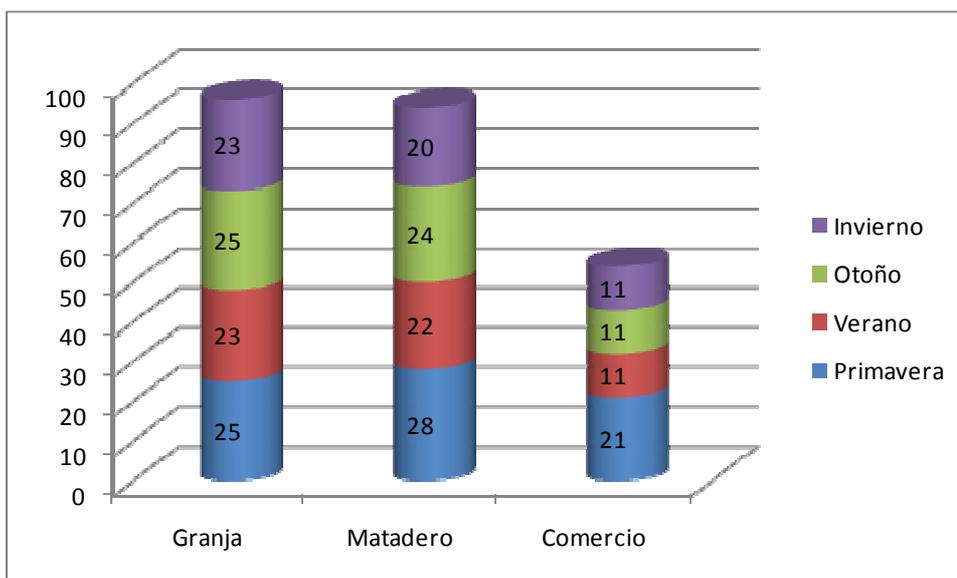
---

<sup>1</sup>La producción ecológica se encuentra regulada por el Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por los Reglamentos (CE) 889/2008 de la Comisión y (CE) 1235/2008 de la Comisión, que establecen disposiciones adicionales de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 e incorporan aspectos sobre importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países. En España, el Real Decreto 1852/1993, de 22 de octubre, sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios (modificado por el RD 506/2001 y el RD 1614/2005).

<sup>2</sup>La redacción “criado según estándares de avicultura ecológica”, “pollo ecológico” o “pollo orgánico”, presente a lo largo del texto obedece a una cuestión terminológica. De acuerdo con la legislación vigente, la granja en la que se aplicaba un sistema de cría distinto de la del pollo broiler no puede ser considerada como de cría ecológica, si bien se aproxima a los condicionantes definitorios de la misma. Es por ello que se ha respetado en el texto la denominación que, erróneamente, recibía dicha producción por parte de los mataderos y explotaciones con los que se ha colaborado en la elaboración de esta Tesis.

**TABLA 2.1. MUESTRAS RECOGIDAS DISTRIBUIDAS SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO, LUGAR DE MUESTREO Y ANIMAL**

	Broiler	Ecológico	Avestruz	Total general
<b>Comercio</b>	18	24	12	<b>54</b>
Primavera	6	12	3	<b>21</b>
Verano	4	4	3	<b>11</b>
Otoño	4	4	3	<b>11</b>
Invierno	4	4	3	<b>11</b>
<b>Granja</b>	30	30	36	<b>96</b>
Primavera	8	8	9	<b>25</b>
Verano	7	7	9	<b>23</b>
Otoño	8	8	9	<b>25</b>
Invierno	7	7	9	<b>23</b>
<b>Matadero</b>	48	8	38	<b>94</b>
Primavera	18	2	8	<b>28</b>
Verano	11	2	9	<b>22</b>
Otoño	10	2	12	<b>24</b>
Invierno	9	2	9	<b>20</b>
<b>Total general</b>	<b>96</b>	<b>62</b>	<b>86</b>	<b>244</b>



**FIGURA 2.1. MUESTRAS RECOGIDAS DISTRIBUIDAS SEGÚN LUGAR DE MUESTREO Y ESTACIÓN DEL AÑO**

Las muestras se tomaron en los puntos y lugares señalados en la Tabla 2.2.

**TABLA 2.2. PUNTOS ESPECÍFICOS DE MUESTREO**

Granja	Avestruz	Polvo y camas
		Agua de bebedero
		Pienso
	Broiler	Botas de personal
		Heces
		Polvo y camas
	Pollo ecológico	Pienso
		Agua de bebedero
		Botas de personal
Heces		
Polvo y camas		
Pienso		
Matadero	Avestruz	Agua de bebedero
		Botas de personal
		Heces
	Broiler	Muestras ambientales
		Muestra de hígado
		Muestras del agua de lavado
		Hígado
		Agua de escaldado
		Producto terminado
Pollo ecológico	Jaula de descarga exterior	
	Jaula de descarga interior	
	Zona de clasificación por peso	
Comercio minorista	Avestruz	Hígado
		Producto terminado
		Filetes de avestruz en presentación comercial, envasados al vacío, temperatura de refrigeración
	Broiler	Muslos de pollo en presentación comercial, mantenidos a temperatura de refrigeración
		Muslos de pollo en presentación comercial, mantenidos a temperatura de refrigeración
	Pollo ecológico	Muslos de pollo en presentación comercial, mantenidos a temperatura de refrigeración

Las muestras de avestruz fueron recogidas de una granja de cría en ciclo completo, que contaba con unos 400 tríos de animales. El matadero anejo homologado contaba con sala de despiece y envasado, y túnel de congelación, y disponía también de punto de venta de productos elaborados y restauración. Se sacrificaban en su momento una media de 50 avestruces por semana. Las muestras de granja para pollos broiler se obtuvieron de granjas de tamaño medio situadas en la provincia de León (12.000 aves/nave, densidad 15-17 aves/m<sup>2</sup>, producción total estimada de 396.000 animales/año). Las muestras de granja de pollo denominado ecológico se tomaron de granjas con producciones de dos lotes etarios distintos de 5.000 y de 3.000 aves (densidad aproximada de 8-9 animales/m<sup>2</sup>, producción estimada de 48.000 aves/año). Las muestras de matadero (broilers y ecológico) se obtuvieron en un establecimiento

homologado con capacidad de sacrificio para 6.000 aves al día. Para las muestras recogidas en establecimientos minoristas (supermercado), tanto para avestruz como broilers y ecológico, se seleccionaron filetes y muslos de pollo de avestruz en bandejas de presentación comercial, envasados al vacío, y a temperatura de refrigeración.

### 2.2.2 PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER SPP.*

El protocolo de aislamiento seguido fue básicamente el mismo para todas las muestras, excepto aquellas procedentes del comercio minorista, las de hígado tomadas en matadero y las de pienso tomadas en granja, las cuales se homogeneizaron en PEB mediante un homogeneizador de paletas (Stomacher Colworth 400).

Las superficies se muestrearon utilizando hisopos y material estériles. En las muestras tomadas mediante hisopo (superficies en matadero: jaula de descarga interior, jaula de descarga exterior y zona de clasificación por peso) se emplearon dos hisopos estériles por muestra: uno de ellos seco y el otro en solución estéril de peptona al 1%. Se muestreó siempre una superficie de 10 cm<sup>2</sup>. Las muestras se tomaron empleando material, hisopos y bolsas estériles. Se tomaron muestras de agua de bebedero en granja y de escaldado en matadero mediante el empleo de frascos estériles. Las muestras procedentes del mercado minorista se obtuvieron envasadas, estando las de avestruz envasadas al vacío y las de pollo industrial y ecológico en atmósfera aerobia (sobre bandejas de poliuretano). Tanto las muestras de hígado como las de mercado minorista se procesaron con instrumental (pinzas, tijeras y cuchillos) esterilizados.

### TRASLADO AL LABORATORIO DE LAS MUESTRAS

---

Las muestras se trasladaron al laboratorio manteniéndose refrigeradas ( $T^{\circ} < 8^{\circ}C$ ) en maleta de transporte hasta su procesado, en tiempo normalmente inferior a 1 hora.

### ENRIQUECIMIENTO Y SIEMBRA

---

Las muestras fueron sometidas a un primer paso de enriquecimiento mediante cultivo en Preston *Campylobacter* Selective Enrichment Broth (PEB, Oxoid. Ver Anexo 8.3). Los erlenmeyers se introdujeron en jarras de anaerobiosis (Oxoid). Se incubaron a 37°C durante 24 horas y en atmósfera microaerófila y capnófila (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, y 85% N<sub>2</sub>). Las jarras se insuflaron con atmósfera modificada de composición especificada (Carburos Metálicos S.A.), o bien con sobres de BBL™ CampyPak Plus™ (Becton Dickinson) con catalizador de paladio, en jarras de anaerobiosis. Tras el enriquecimiento, a partir de PEB se hizo una siembra en placas de Petri con Preston *Campylobacter* Selective Agar (PA, Oxoid. Ver Anexo 8.3). Las placas se incubaron durante 48 horas en idénticas condiciones.

### AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

---

De las colonias sembradas en PA y que mostraron crecimiento, se recogió una colonia por placa empleando un asa de platino estéril en placas con crecimiento abundante en

las siembras por agotamiento, seleccionándose aquellas colonias con la apariencia típica de *Campylobacter* spp. (colonias planas, brillantes, con borde redondo o irregular y colorido gris o ligeramente pardo). Las colonias recogidas se sembraron por agotamiento en placas de Petri con PA utilizando un asa de platino estéril. Las placas se incubaron durante 48 horas en idénticas condiciones.

Posteriormente se tomaron asépticamente colonias introduciendo una vez un asa de platino estéril en caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), y se sembraron por agotamiento en placas de Petri de *Campylobacter* Blood Free (CCDA, Oxoid. Ver Anexo 8.3), cultivándose en las condiciones mencionadas durante 48 horas. Las presuntas colonias de *Campylobacter* spp. aisladas a partir de CCDA fueron cultivadas de idéntica manera durante 48 horas en tubos de ensayo estériles con 10 ml de BHI y seguidamente almacenadas en tubos eppendorf estériles con glicerol.

### 2.2.3 PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Para obtener información sobre la capacidad selectiva del procedimiento de aislamiento empleado, las cepas aisladas se procesaron realizándose pruebas bioquímicas de identificación. Las cepas de referencia (*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* DSMZ 4688; *Campylobacter coli* DSMZ 4689) se emplearon como controles en las reacciones bioquímicas y para la PCR, revitalizándose de acuerdo a las instrucciones del suministrador.

#### TINCIÓN DE GRAM

---

Se realizó según técnicas descritas (Barrow and Feltham, 2004). La observación mediante microscopía óptica se realizó a distintos aumentos: 10 X, 40 X y 100 X, este último con aceite de inmersión.

#### CATALASA

---

La prueba de la catalasa se llevó a cabo depositando una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre una colonia aislada, observando la formación de burbujas inmediatamente (Harrigan and McCance, 1976).

#### OXIDASA

---

Para la oxidasa se siguió la técnica habitual consistente en preparar dos soluciones al 1% de  $\alpha$ -naftol en etanol y de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina diclorohidratada en agua destilada. Ambas soluciones debidamente protegidas de la luz se mezclaron entre sí depositando una gota sobre las colonias a estudio. Se observó si estas cambiaban de color, adoptando una coloración azulada en menos de 10 segundos, en cuyo caso se consideraban como positivas (Harrigan and McCance, 1976).

## CRECIMIENTO EN CCDA

---

Las cepas se sembraron por estría en el medio selectivo Modified *Campylobacter* Blood Free Selective Agar (CCDA, Merck). Las condiciones de incubación fueron las reseñadas anteriormente, durante 48 h.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

---

Las cepas aisladas con tinción de Gram positiva, catalasa y oxidasa positivas, que mostraron crecimiento en CCDA, se confirmaron mediante detección de genes específicos de *C. jejuni* y *C. coli* usando la reacción en cadena de la polimerasa. Una vez revitalizada la cepa, se sembraron 100 µl en tubos de 10 ml de BHI y de estos se tomó 1 ml para sembrarlo en 10 ml BHI. En idénticas condiciones se sembraron en estría 50 µl en placas de BHI. Las muestras se cultivaron en las condiciones habituales durante 48 horas. De las cepas cultivadas en BHI, se extrajo 1 ml y se dispensó en tubos eppendorf estériles. Seguidamente se centrifugaron (12.500 rpm, 5 min) y se extrajo el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido con 200 µl de agua MilliQ estéril mediante agitación, para proceder a la ruptura celular y liberación del ADN por calor seco (100°C, 5 min) en baño de calor seco (Selecta). Por último se centrifugó de nuevo a 12.500 rpm durante 5 min.

Se seleccionaron tres fragmentos para la identificación de las especies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter* spp. (Denis et al., 1999): los genes *mapA* (Stucki et al., 1995), *ceuE* (Gonzalez et al., 1997) y 16S rRNA (Linton et al., 1997). La secuencia y el origen de los cuatro fragmentos de los cebadores empleados se recogen en la Tabla 2.3. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 30µl conteniendo 0,6 U de polimerasa de *Thermus thermophilus* (Biotools), 100 µM de cada uno de los dNTP (Biotools), 0,42 µM de los cebadores MdmapA1, MdmapA2, COL3 y MDCOL2 (Roche Molecular Biochemicals) en Boehringer buffer. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal y Mastercycler Gradient con el siguiente programa: un primer ciclo de 95°C / 10 min, seguido de 35 ciclos (95°C/30s; 59°C/1 min 30s; 72°C/1 min), y por último 72°C/10 min. Las amplificaciones generaron fragmentos de 589 pares de bases (pb), de 462 pb y de 857 pb para *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter* spp. respectivamente. Para visualizar los amplicones, se sometieron alícuotas de 11µl junto con 3µl de patrón de carga, a electroforesis a 100V durante 1 hora en gel de agarosa al 1,5% (Biotools). La observación del gel se realizó tras su tinción con bromuro de etidio durante 15-20 minutos bajo luz ultravioleta, contrastándose con un marcador de 100 bp (Biotools).

**TABLA 2.3. SECUENCIA DE LOS CEBADORES EMPLEADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES Y LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS**

Gen	Iniciador	Secuencia de cebador (5-3)	Tamaño de fragmento	Especie	Referencia
16S rRNA	MD16S1	ATCTAATGGCTTAACCATTAAC	857 bp	<i>Campylobacter</i> spp.	
	MD16S2	GGACGGTAACTAGTTTAGTATT			
mapA	MDmapA1	CTATTTTATTTTGGAGTGCTTG	589 bp	<i>Campylobacter jejuni</i>	(Stucki et al., 1995)
	MDmapA2	GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATT			
ceuE	COL3	AATTGAAAATTGCTCCAATATG	462 bp	<i>Campylobacter coli</i>	
	MDCOL2	TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG			

16S rRNA: MD16S1 CCCJ609F de Linton *et al.* (1997) modificada en este trabajo.

16S rRNA: MD16S2 CCJ1442R de Linton *et al.* (1997) modificada en este trabajo.

mapA: Cebadores seleccionados de la secuencia genética del gen *mapA* (Stucki et al., 1995)

ceuE: COL3 cebador superior: Oligonucleótido empleado por (Gonzalez et al., 1997)

ceuE: MDCOL2 cebador inferior: (González et al., 1997, Denis et al., 1999).

La Tabla 2.13 recoge las cepas identificadas y confirmadas como *Campylobacter* termofílicos juntamente con el lugar de toma de muestra, la producción y la estación del año en que se recogieron. En total, 111 cepas fueron aisladas y confirmadas como *Campylobacter* termofílicos, almacenándose para las pruebas realizadas en otros capítulos.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se muestran los resultados agrupados, primeramente incluyendo los resultados globales (número de cepas y porcentaje de positividad) de las cepas presuntamente identificadas como *Campylobacter* en base a su crecimiento en PA y apariencia morfológica (Sección 2.3.1), y en segundo lugar los resultados globales de las cepas ya confirmadas (número de cepas y porcentaje de positividad) por pruebas fenotípicas y confirmación genotípica (Sección 2.3.2). A continuación se desglosan dichos resultados en función del animal de procedencia, lugar de la cadena y estación del año (Sección 2.3.3 y 2.3.4).

### 2.3.1 RESULTADOS GLOBALES DE LAS MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PRESTON AGAR

Se consideraron presuntamente positivas aquellas muestras en las que se produjo un crecimiento en Preston Agar (PA) tras incubación en atmósfera microaerofílica durante 48 horas a 37°C. De ellas se aislaron colonias crecidas de la superficie del medio sólido. Las colonias seleccionadas de la superficie del medio de cultivo eran todas ellas de color gris-parduzco, redondeadas o de borde irregular, de diámetro menor de 1 mm y de aspecto brillante. La Tabla 2.4 presenta el número de muestras tomadas, el número de muestras presuntamente positivas por su crecimiento en PA y el porcentaje de

positividad desglosado por animal y lugar de muestreo. Del total de muestras analizadas (244), en 67 muestras no se detectó crecimiento o las colonias observadas no poseían las características enunciadas previamente. Así pues, en un número de 177 muestras (72,5%) se observó el crecimiento de colonias en placa que podían considerarse presuntamente como *Campylobacter* spp.

**TABLA 2.4. RESULTADOS DE AISLAMIENTOS POSITIVOS EN PA CLASIFICADOS POR ANIMAL Y A SU VEZ POR LUGAR DE MUESTREO**

	Muestras tomadas	Aislamiento positivo	Porcentaje de positividad
<b>Broiler</b>	<b>90</b>	<b>76</b>	<b>84,4%</b>
Granja	30	21	70,0%
Matadero	42	39	92,9%
Comercio	18	16	88,9%
<b>Ecológico</b>	<b>62</b>	<b>52</b>	<b>83,9%</b>
Granja	30	21	70,0%
Matadero	8	8	100,0%
Comercio	24	23	95,8%
<b>Avestruz</b>	<b>92</b>	<b>49</b>	<b>53,3%</b>
Granja	36	26	72,2%
Matadero	44	15	34,1%
Comercio	12	8	66,7%
<b>Total general</b>	<b>244</b>	<b>177</b>	<b>72,5%</b>

La prevalencia de presuntos *Campylobacter* spp. fue superior en los meses de primavera y verano (Figura 2.2). Además, la Figura 2.2 refleja una disminución en la prevalencia en los meses de otoño e invierno de los presuntos *Campylobacter* y como se observa más adelante es similar a lo que ocurre con las especies confirmadas.

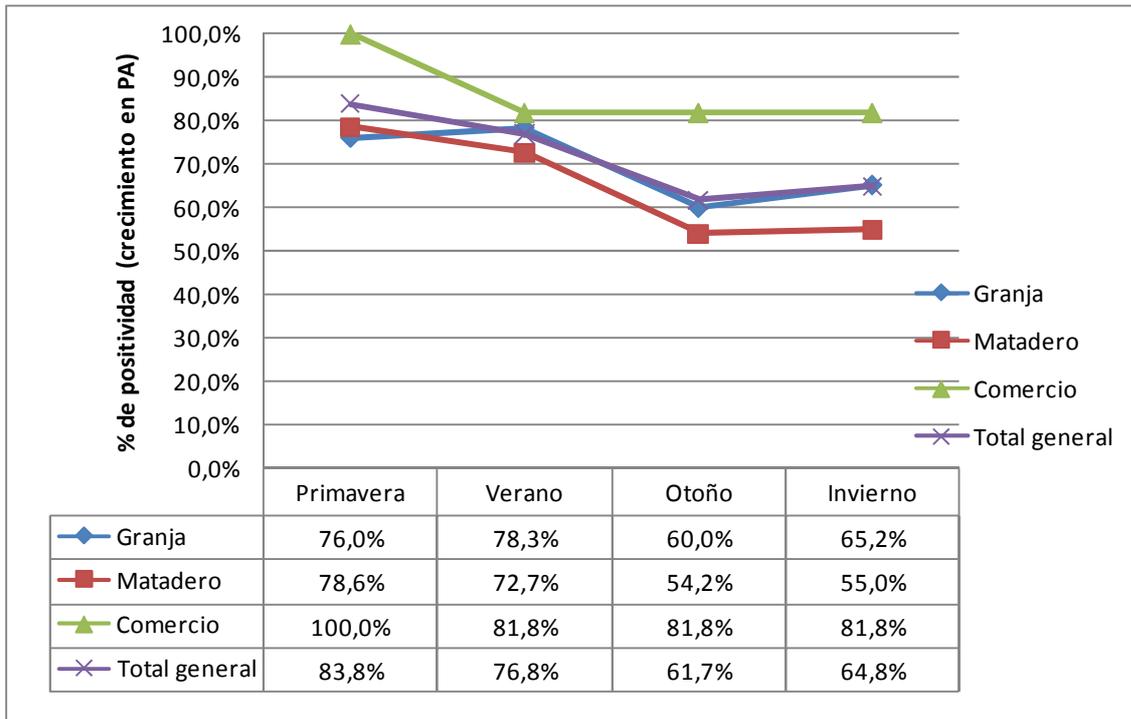


FIGURA 2.2. RESULTADOS GLOBALES DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA) SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO

### 2.3.2 RESULTADOS GLOBALES DE LAS MUESTRAS CON CEPAS CONFIRMADAS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS

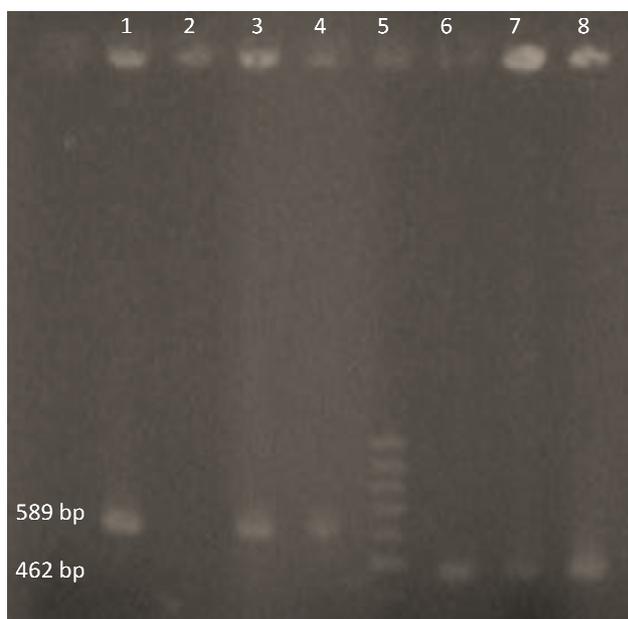
Las cepas aisladas de medio Preston Agar (PA) se sometieron posteriormente a pruebas bioquímicas para su confirmación como especies pertenecientes al género *Campylobacter*. Las pruebas utilizadas para confirmación fueron la tinción de Gram, catalasa, oxidasa y crecimiento en CCDA. Además se empleó la amplificación de genes exclusivos de *C. coli* y *C. jejuni* por PCR como prueba adicional para la adscripción a especie de las cepas a estudio (Figura 2.3). Las cepas aisladas, así como las de referencia (*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* DSMZ 4688; *Campylobacter coli* DSMZ 4689) presentaron el aspecto macroscópico típico, es decir, colonias no hemolíticas, de aspecto plano y brillante, con borde irregular y colorido gris o ligeramente pardo. Eran Gram-positivas, catalasa y oxidasa positivas y presentaban crecimiento en CCDA. Del global de las 244 muestras tomadas, en 177 se aislaron presuntos *Campylobacter* spp. (72,5%) y en 67 muestras no se obtuvo crecimiento o bien las cepas aisladas no eran *Campylobacter* (27,5%). De las 177 cepas que presentaron crecimiento en PA, 111 fueron *Campylobacter* confirmados genotípicamente y 66 no fueron confirmados (bien no crecieron en CCDA, bien las pruebas bioquímicas no permitieron la identificación o la PCR no confirmó los resultados anteriores). Por lo tanto solamente un 62,7% (111 de 172) de las cepas aisladas (con crecimiento en PA y morfología típica) resultaron ser *Campylobacter* spp., lo que denota un bajo nivel de selectividad del procedimiento de

aislamiento. El porcentaje global de muestras positivas en las muestras tomadas es por tanto de 45,5%.

#### SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La literatura científica que compara medios para el aislamiento de *Campylobacter* spp., se refiere principalmente al aislamiento cualitativo de muestras fecales (Castillo-Ayala, 1992; Corry et al., 1995; Federighi et al., 1999; Josefsen et al., 2003; Manzano et al., 1995; Scotter et al., 1993; Stern et al., 1992; Uyttendaele and Debevere, 1996). El protocolo de aislamiento de Preston tiene una mejor capacidad de recuperación que el Park-Sanders al muestrear carne de pollo (Josefsen et al., 2003). A esto añadimos otra serie de ventajas tales como ser menos laborioso, necesitar tan sólo una temperatura de incubación, su disponibilidad comercial, y su menor riesgo de contaminación a lo largo del protocolo dadas sus características. Es preciso indicar que una prueba encaminada a verificar la identidad de las cepas aisladas, fue comprobar su crecimiento en CCDA que es un medio selectivo superior en requerimientos y selectividad comparado con el Preston Agar (PA), puesto que el CCDA consigue inhibir más eficazmente el crecimiento de flora competitiva (Logue et al., 2003; Peterz, 1991).

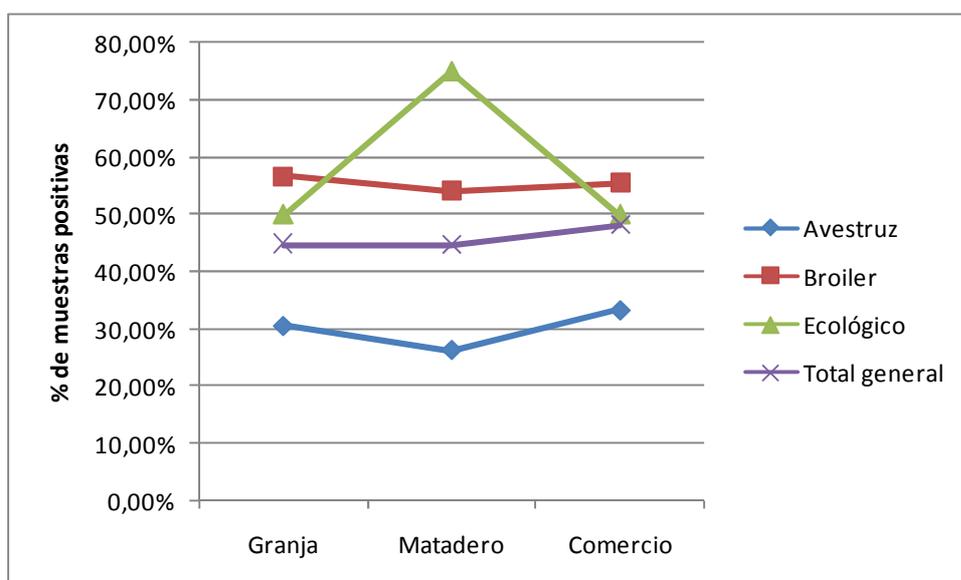
El porcentaje medio de aislamientos de *Campylobacter* en las muestras analizadas se cifra en un 45,49% (111/244) y denota una amplia distribución de *Campylobacter* spp. en las muestras ambientales y productos analizados (Tabla 2.5).



**FIGURA 2.3. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA MOSTRANDO LOS AMPLICIONES OBTENIDOS TRAS LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES POR PCR, CON LA PRESENCIA DE DOS AMPLIFICACIONES DE 589 PARES DE BASES (*CAMPYLOBACTER JEJUNI*, CALLES 1, 3 Y 4) Y 462 PARES DE BASES (*CAMPYLOBACTER COLI*, CALLES 6, 7 Y 8)**

**TABLA 2.5. NÚMERO Y PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS SEGÚN LUGAR DE LA CADENA Y ANIMAL**

	Granja	Matadero	Comercio	Total
<b>Avestruz</b>	11 / 36 (30,6%)	13 / 44 (29,5%)	4 / 12 (33,3%)	28 / 92 (30,4%)
<b>Broiler</b>	17 / 30 (56,7%)	23 / 42 (54,8%)	10 / 18 (55,6%)	50 / 90 (55,6%)
<b>Ecológico</b>	15 / 30 (50,0%)	6 / 8 (75,0%)	12 / 24 (50,0%)	33 / 62 (53,2%)
<b>Total</b>	43 / 96 (44,8%)	42 / 94 (44,7%)	26 / 54 (48,1%)	111 / 244 (45,5%)



**FIGURA 2.4. PORCENTAJE GLOBAL DE MUESTRAS POSITIVAS DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS SEGÚN LUGAR DE LA CADENA ALIMENTARIA Y ANIMAL**

La evolución del número de muestras positivas de *Campylobacter* confirmados según lugar de la cadena alimentaria y animal se muestra en la Figura 2.4 y en la Tabla 2.5. Se observa una menor prevalencia en avestruz comparado con las otras dos producciones. Las muestras de broiler fueron las más contaminadas (55,6% global) seguidas por las de pollo ecológico (53,2%) y las de avestruz (30,4%). También se aprecian diferencias no significativas en la prevalencia dependiendo del lugar de muestreo, excepto en el caso del pollo ecológico que muestra prevalencias elevadas en matadero, aunque el bajo número de muestras tomadas (6 positivas de 8 tomadas) puede haber influido en estos valores. La prevalencia media fue del 44,8% en granja, 44,7% en matadero y 48,1% en comercio, incremento considerado no significativo.

TABLA 2.6. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	13 / 25 (52%)	12 / 23 (52%)	9 / 25 (36%)	9 / 23 (39%)	43 / 96 (45%)
<b>Matadero</b>	12 / 28 (43%)	14 / 22 (64%)	10 / 24 (42%)	6 / 20 (30%)	42 / 94 (45%)
<b>Comercio</b>	7 / 21 (33%)	8 / 11 (73%)	5 / 11 (45%)	6 / 11 (55%)	26 / 54 (48%)
<b>Total</b>	32 / 74 (43%)	34 / 56 (61%)	24 / 60 (40%)	21 / 54 (39%)	111 / 244 (45%)

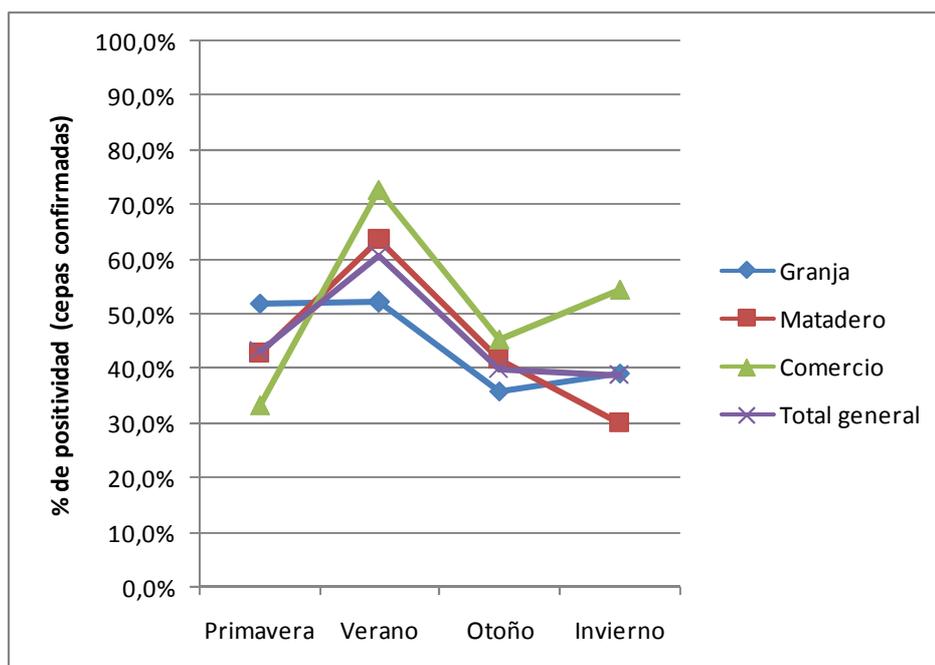


FIGURA 2.5. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL ESTACIONAL DE CEPAS POSITIVAS (CEPAS CONFIRMADAS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS)

La Figura 2.5 refleja una disminución en la prevalencia en los meses de otoño e invierno. Estos resultados concuerdan con los observados para presuntos *Campylobacter*, y se observa que los confirmados (Figura 2.5, Tabla 2.6) reflejan, de manera más clara que para los presuntos, una disminución en la prevalencia en los meses de primavera, otoño e invierno, que correspondería a un descenso en los niveles de excreción fecal y concuerda con los estudios que muestran un aumento de la incidencia de la enfermedad durante el verano, particularmente los meses de junio hasta septiembre (Figura 1.4), (Brieseman, 1985; Nylén et al., 2002). También otros autores han registrado un aumento de la prevalencia, y del nivel de contaminación en animales y alimentos durante los meses de verano (Bouwknegt et al., 2004; Hänninen et al., 1998; Hudson et al., 1999; Huneau-Salaun et al., 2007; Willis and Murray, 1997).

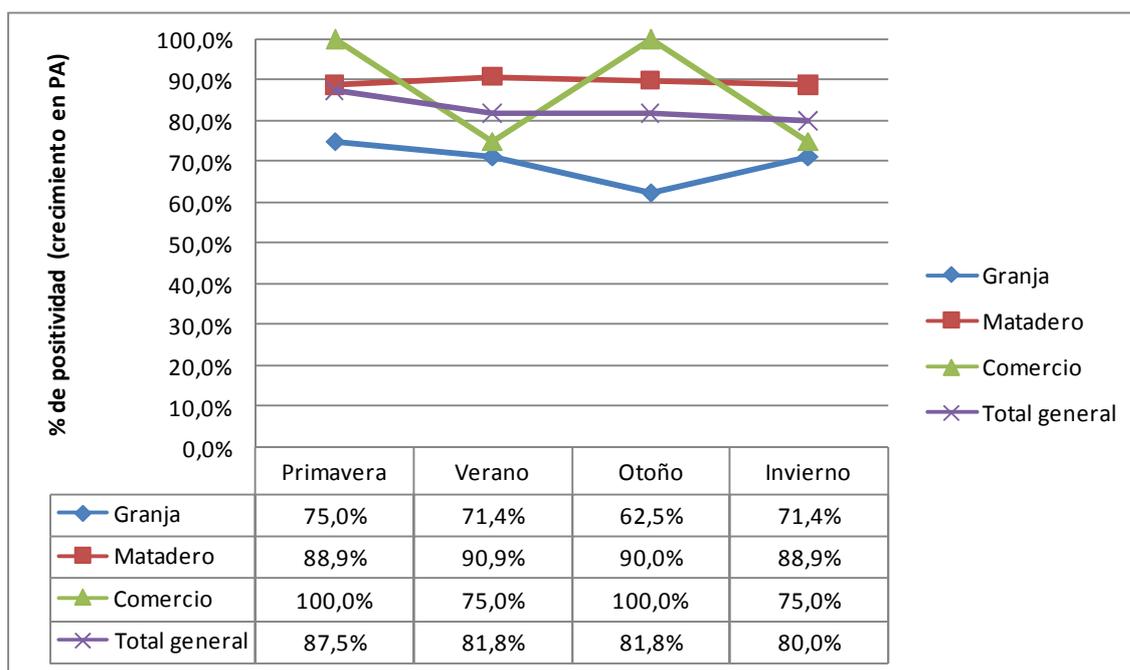
### 2.3.3 RESULTADOS PARCIALES DE LAS MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PRESTON AGAR

#### DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL POR PRODUCCIÓN ANIMAL Y LUGAR DE MUESTREO (AISLAMIENTOS EN PA)

Respecto a cada uno de los productos estudiados, la distribución de las muestras con crecimiento en PA se presenta en la Tabla 2.7 (broiler), Tabla 2.8 (pollo ecológico), y Tabla 2.9 (avestruz), y en la Figura 2.6 (broiler), Figura 2.7 (pollo ecológico), y Figura 2.8 (avestruz) donde se recogen los resultados clasificados por producción animal en cada estación y en función del lugar de aislamiento.

**TABLA 2.7. MUESTRAS POSITIVAS DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA), Nº DE MUESTRAS TOTALES, Y PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE BROILER O LUGARES RELACIONADOS SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO**

Broiler	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	6 / 8 (75%)	5 / 7 (71%)	5 / 8 (63%)	5 / 7 (71%)	21 / 30 (70%)
<b>Matadero</b>	16 / 18 (89%)	10 / 11 (91%)	9 / 10 (90%)	8 / 9 (89%)	43 / 48 (90%)
<b>Comercio</b>	6 / 6 (100%)	3 / 4 (75%)	4 / 4 (100%)	3 / 4 (75%)	16 / 18 (89%)
<b>Total</b>	28 / 32 (88%)	18 / 22 (82%)	18 / 22 (82%)	16 / 20 (80%)	80 / 96 (83%)

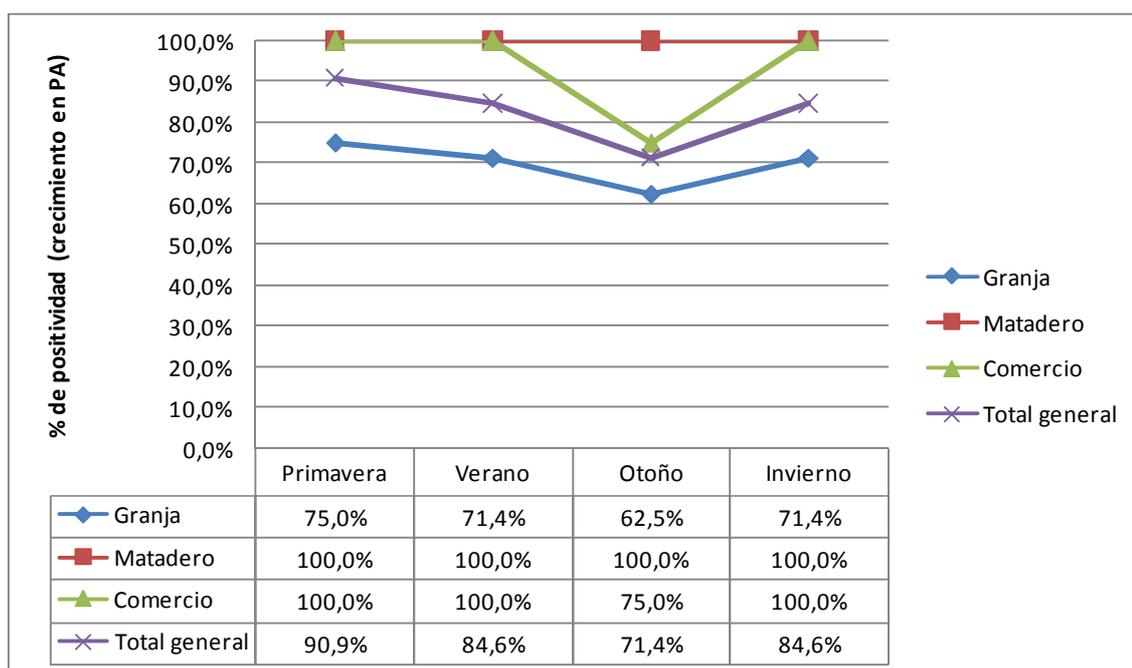


**FIGURA 2.6. EVOLUCIÓN ESTACIONAL DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA) EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE BROILER O LUGARES RELACIONADOS**

En broilers la prevalencia mostrada por las muestras con crecimiento en PA es en torno al 80% (84,6%) con valores inferiores en las muestras recogidas en granja y con poca variación estacional (Tabla 2.7 y Figura 2.6).

**TABLA 2.8. MUESTRAS POSITIVAS DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA), Nº DE MUESTRAS TOTALES, Y PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA MUESTRAS TOMADAS DE POLLO ECOLÓGICO O LUGARES RELACIONADOS SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO**

Ecológico	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	6 / 8 (75,0%)	5 / 7 (71,4%)	5 / 8 (62,5%)	5 / 7 (71,4%)	21 / 30 (70,0%)
<b>Matadero</b>	2 / 2 (100,0%)	2 / 2 (100,0%)	2 / 2 (100,0%)	2 / 2 (100,0%)	8 / 8 (100,0%)
<b>Comercio</b>	12 / 12 (100,0%)	4 / 4 (100,0%)	3 / 4 (75,0%)	4 / 4 (100,0%)	23 / 24 (95,8%)
<b>Total</b>	20 / 22 (90,9%)	11 / 13 (84,6%)	10 / 14 (71,4%)	11 / 13 (84,6%)	52 / 62 (83,9%)

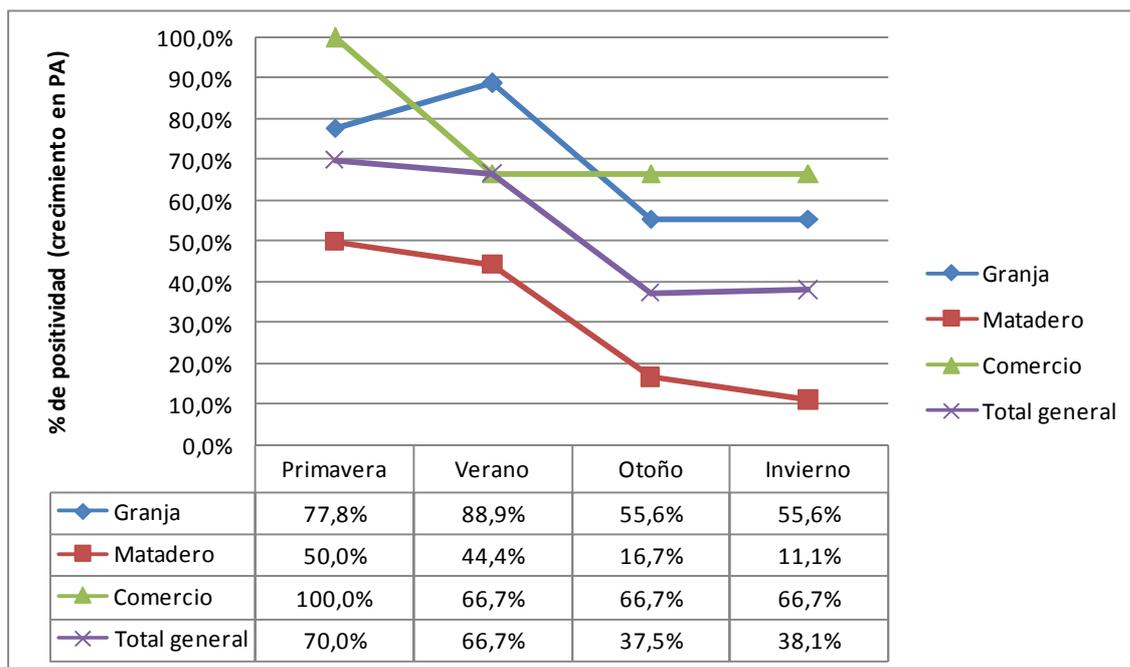


**FIGURA 2.7. EVOLUCIÓN ESTACIONAL DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA) EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE POLLO ECOLÓGICO O LUGARES RELACIONADOS**

Como en el caso de broilers, existe una prevalencia media en torno al 80% con el 100% de muestras de matadero positivas para pollo denominado ecológico (Tabla 2.8 y Figura 2.7).

**TABLA 2.9. MUESTRAS POSITIVAS DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA), Nº DE MUESTRAS TOTALES, Y PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE AVESTRUZ O LUGARES RELACIONADOS SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO**

Avestruz	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	7 / 9 (78%)	8 / 9 (89%)	5 / 9 (56%)	5 / 9 (56%)	25 / 36 (69%)
<b>Matadero</b>	4 / 8 (50%)	4 / 9 (44%)	2 / 12 (17%)	1 / 9 (11%)	11 / 38 (29%)
<b>Comercio</b>	3 / 3 (100%)	2 / 3 (67%)	2 / 3 (67%)	2 / 3 (67%)	9 / 12 (75%)
<b>Total</b>	14 / 20 (70%)	14 / 21 (67%)	9 / 24 (38%)	8 / 21 (38%)	45 / 86 (52%)



**FIGURA 2.8. EVOLUCIÓN ESTACIONAL DE AISLAMIENTOS (MUESTRAS CON CRECIMIENTO EN PA) EN LAS MUESTRAS TOMADAS DE AVESTRUZ O LUGARES RELACIONADOS**

Los resultados muestran que para avestruz, los porcentajes de positividad, aunque con un total general del 52% -sensiblemente inferior al hallado para pollo broiler y ecológico-, siguen la misma tendencia que los generales (más bajos en los meses fríos de otoño e invierno) y muestran una gran diferencia entre granja y matadero, lo cual se debe al particular sistema de sacrificio y carnización, muy diferente al que se emplea con aves. De manera distinta la positividad aumenta con las muestras tomadas en comercio, que tienen un índice medio de positividad en torno al 70% (Tabla 2.9 y Figura 2.8).

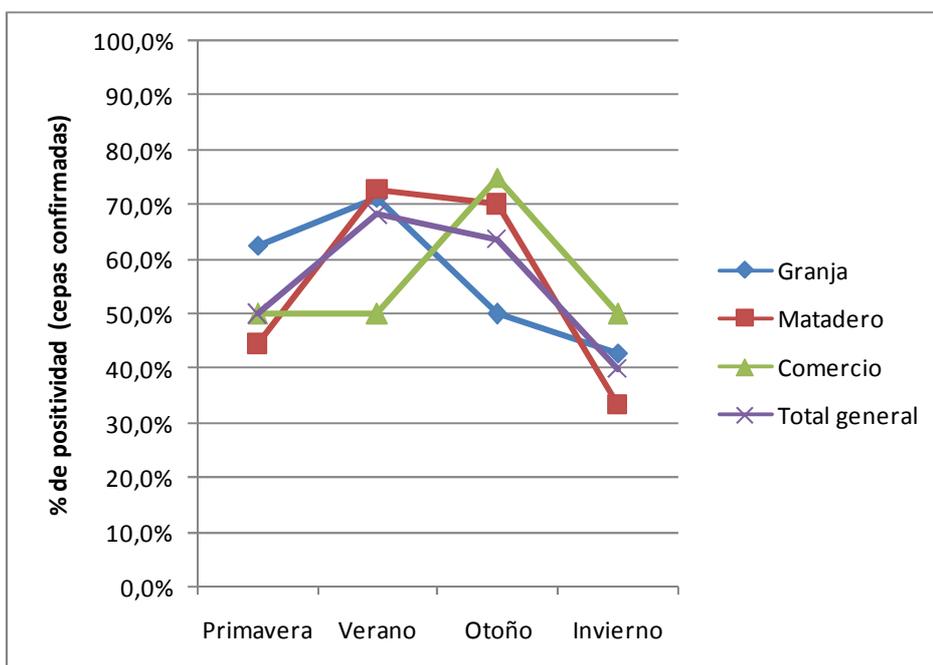
### 2.3.4 RESULTADOS PARCIALES DE LAS MUESTRAS CON CEPAS CONFIRMADAS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS

Respecto a cada uno de los productos estudiados, la distribución de las muestras con crecimiento de cepas confirmadas por pruebas fenotípicas y genotípicas se presenta en la Tabla 2.10 (broiler), Tabla 2.11 (pollo ecológico), y Tabla 2.12 (avestruz), y en la

Figura 2.9 (broiler), Figura 2.10 (pollo ecológico), y Figura 2.11 (avestruz) donde se recogen los resultados clasificados por producción animal en cada estación y en función del lugar de aislamiento.

**TABLA 2.10. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA BROILER**

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	5 / 8 (63%)	5 / 7 (71%)	4 / 8 (50%)	3 / 7 (43%)	17 / 30 (57%)
<b>Matadero</b>	8 / 18 (44%)	8 / 11 (73%)	7 / 10 (70%)	3 / 9 (33%)	26 / 48 (54%)
<b>Comercio</b>	3 / 6 (50%)	2 / 4 (50%)	3 / 4 (75%)	2 / 4 (50%)	10 / 18 (56%)
<b>Total</b>	16 / 32 (50%)	15 / 22 (68%)	14 / 22 (64%)	8 / 20 (40%)	53 / 96 (55%)

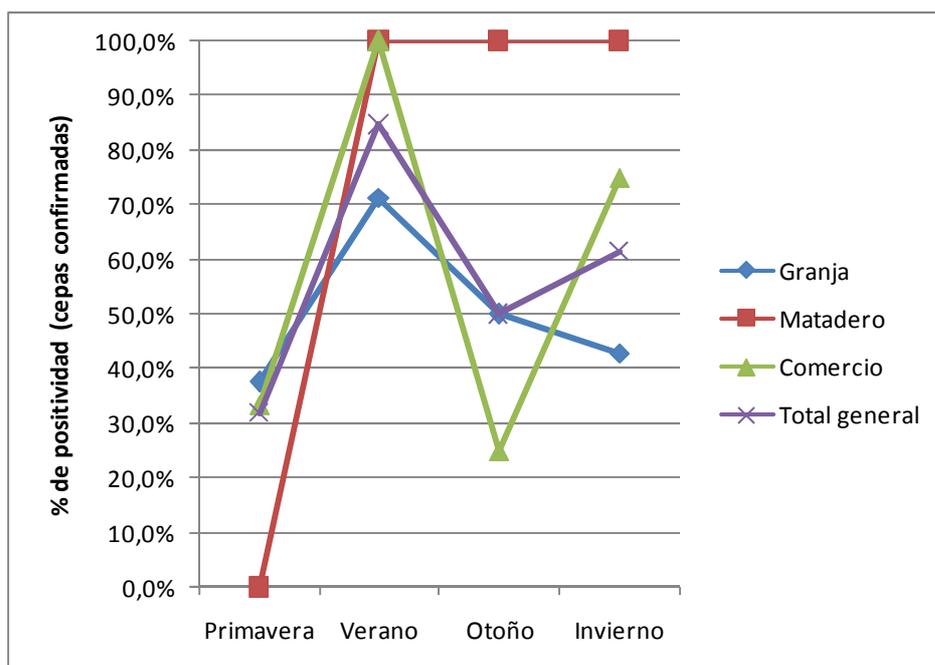


**FIGURA 2.9. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA BROILER**

De la distribución estacional de muestras con *Campylobacter* confirmados para broiler (Tabla 2.10, Figura 2.9), destaca un porcentaje global del 55% y unos porcentajes según el lugar de muestreo similares (entre un 54% en matadero y un 57% en granja). La prevalencia mayor se detectó en verano (68%) seguido del otoño (64%).

**TABLA 2.11. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA POLLO ECOLÓGICO**

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	3 / 8 (38%)	5 / 7 (71%)	4 / 8 (50%)	3 / 7 (43%)	15 / 30 (50%)
<b>Matadero</b>	0 / 2 (00%)	2 / 2 (100%)	2 / 2 (100%)	2 / 2 (100%)	6 / 8 (75%)
<b>Comercio</b>	4 / 12 (33%)	4 / 4 (100%)	1 / 4 (25%)	3 / 4 (75%)	12 / 24 (50%)
<b>Total</b>	7 / 22 (32%)	11 / 13 (85%)	7 / 14 (50%)	8 / 13 (62%)	33 / 62 (53%)



**FIGURA 2.10. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA POLLO ECOLÓGICO**

En las muestras procedentes de pollo ecológico y analizadas para *Campylobacter* confirmados (Tabla 2.11, Figura 2.10), se obtuvo un porcentaje global del 53% y unos porcentajes según el lugar de muestreo muy dispares debido al bajo número de muestras analizadas (50% para granja y comercio, 75% para matadero). La prevalencia mayor se detectó en verano (85%) seguido del otoño (62%).

TABLA 2.12. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA AVESTRUZ

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total general
<b>Granja</b>	5 / 9 (56%)	2 / 9 (22%)	1 / 9 (11%)	3 / 9 (33%)	11 / 36 (31%)
<b>Matadero</b>	4 / 8 (50%)	4 / 9 (44%)	1 / 12 (8%)	1 / 9 (11%)	10 / 38 (26%)
<b>Comercio</b>	0 / 3 (00%)	2 / 3 (67%)	1 / 3 (33%)	1 / 3 (33%)	4 / 12 (33%)
<b>Total</b>	9 / 20 (45%)	8 / 21 (38%)	3 / 24 (13%)	5 / 21 (24%)	25 / 86 (29%)

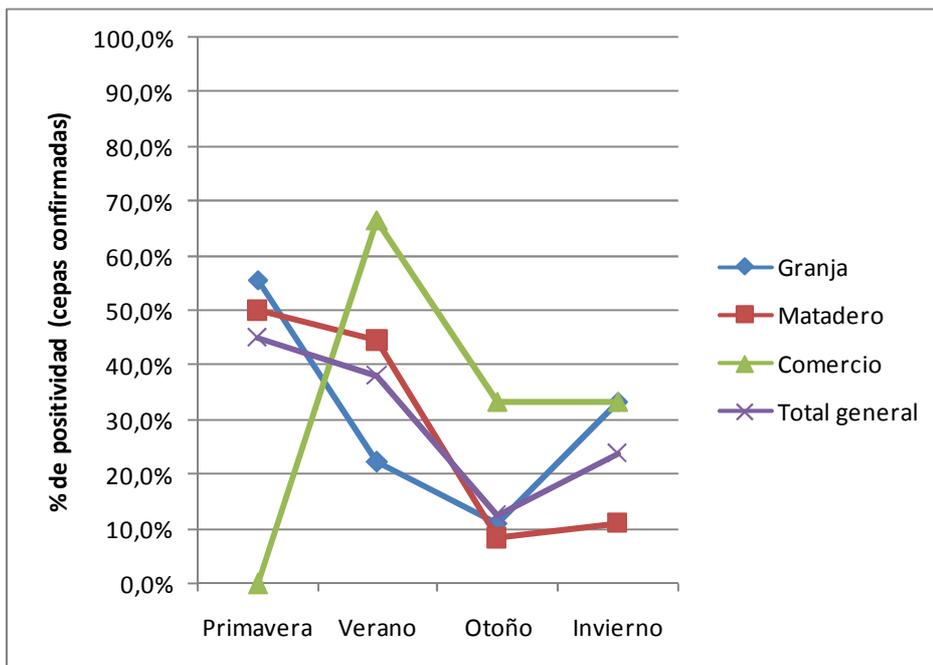


FIGURA 2.11. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* CONFIRMADOS POR PRUEBAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS PARA AVESTRUZ

Las muestras procedentes de avestruz y analizadas para *Campylobacter* confirmados presentaron las menores prevalencias (Tabla 2.12, Figura 2.11), con un porcentaje global del 29% y unos porcentajes según el lugar de muestreo bastantes similares (entre un 26% en matadero y un 33% en comercio). La prevalencia mayor se detectó en primavera (45%) seguido del verano (38%) y porcentajes de positividad muy bajos en otoño (13%) e invierno (24%).

Para la discusión sobre la influencia del punto de muestreo de la cadena alimentaria, la influencia estacional y la incidencia por tipo de producción se ha considerado únicamente los resultados de cepas aisladas y confirmadas por pruebas fenotípicas y genotípicas. Como se puede observar en la Tabla 2.5, la contaminación global a nivel de granja es del 44,8%, del 44,7% para matadero y 48,1% para comercio minorista (total de 45,5%).

Los porcentajes encontrados en la bibliografía son muy variados. En granja el porcentaje medio hallado fue del 44,8%, siendo claramente superiores a los recogidos en granja en países en los que existen procedimientos estrictos de control en etapas de producción primaria, como Suecia (Berndtson et al., 1996), Noruega (4,8% de manadas positivas) (Brennhovd et al., 1992; Hofshagen and Kruse, 2005) o Finlandia (Jore et al., 2010). También en matadero los países escandinavos son ejemplo de bajas niveles de contaminación, como Finlandia (Aho and Hirn, 1988), en el que 1,7% de canales eran positivas; en Suecia con porcentajes entre el 17 y el 22% dependiendo del tipo de muestra tomada (Hansson et al., 2004; Hansson et al., 2007a); 46% en Dinamarca (Wedderkopp et al., 2000), aunque en ocasiones se han detectado índices positivos superiores al 80% (Berndtson et al., 1992), Suecia. Las jaulas han sido señaladas como un factor de riesgo en la transmisión del patógeno (Hansson et al., 2005). En este estudio, se tomaron 10 muestras de jaulas de transporte y 5 fueron positivas, con identificaciones de *C. jejuni* (4 muestras) y *C. coli* (1 muestra). Sin embargo están por debajo de la mayoría de estudios de nuestro entorno, por ejemplo el estudio de base (EFSA, 2010a) en el que la prevalencia en España en canales es del 92,6%.

Un aspecto importante observado es que los resultados del muestreo en **granjas** de pollo de cría ecológica y pollo de cría industrial son similares (50% y 56,7% respectivamente). La semejanza de aislamientos positivos en las muestras procedentes de sistemas de producción de pollo de cría ecológica y pollo industrial pueden ser atribuidas a que las rutas de transmisión preferentes son fundamentalmente oro-fecales. La información disponible sobre la incidencia de *Campylobacter* en avestruz es muy limitada y referida a los EE.UU., no existiendo datos de Europa ni de España (Ley et al., 2001; Oyarzabal et al., 1995). En el caso de las granjas de avestruces, los porcentajes de positividad fueron inferiores (30,6%) a los de las otras explotaciones y se debe probablemente a las características intrínsecas del método de producción, con ausencia de hacinamiento y menores posibilidades de transmisión oro-fecal. Como puede verse en el capítulo IV, las cepas de *Campylobacter* aisladas son distintas y pudieran tener otra ecología medioambiental (supervivencia, distribución).

Otros autores han obtenido resultados dispares con *Campylobacter jejuni* en un 20% de las muestras fecales analizadas (Jones et al., 1991), y *Campylobacter* spp. en el 31% de muestras fecales y en el 30% de muestras de bebederos (Berndtson et al., 1996). En

Francia se obtuvieron resultados positivos en el 65,7% de las muestras fecales (Denis et al., 2001) y en EE.UU. en el 96,4% de las muestras fecales analizadas (Stern and Robach, 2003).

El **matadero** constituye uno de los principales puntos de contaminación por *Campylobacter* spp. de las canales de aves, debido a la existencia de contaminación cruzada durante el sacrificio y faenado (Berndtson et al., 1996; Norinaga et al., 2003; Oosterom et al., 1983; Slader et al., 2002; Yusufu et al., 1983). Algunos autores han encontrado los mayores niveles de contaminación por *Campylobacter* en mataderos de pollos tras las fases de escaldado y desplumado (Abu et al., 1994), siendo lógico por la gran dispersión y contaminación asociada a dichas fases.

Los datos obtenidos en este trabajo en el matadero para el pollo de cría ecológica y el de cría industrial son muy dispares, siendo del 54,8% para broiler y de 75% para pollo ecológico. A pesar de que el proceso de sacrificio y faenado en el matadero era similar, se debe resaltar el bajo número de muestras de pollo ecológico tomadas (6 positivas de 8) y correspondientes todas ellas a producto, y la variedad de orígenes en las muestras de broiler (Tabla 2.2) lo que puede haber influido en las diferencias de positividad entre muestras.

En matadero los resultados obtenidos para avestruz presentan también diferencias frente a los obtenidos en pollo de cría industrial y ecológica (29,5%) con marcadas diferencias estacionales (50,0% en primavera; 44% en verano, 17% otoño y 11% en invierno). La información disponible sobre la incidencia de *Campylobacter* en avestruz es muy limitada (Ley et al., 2001; Oyarzabal et al., 1995). Los estudios realizados indican la existencia de *Campylobacter* con un bajo porcentaje de aislamientos (en torno al 10%) en canales en matadero. Las muestras analizadas indican primeramente, la existencia de *Campylobacter* en esta especie y en segundo lugar un bajo porcentaje de aislamientos (en torno al 10%) en canales en matadero frente al 26% obtenidas en nuestro estudio (Ley et al., 2001). Estas diferencias son atribuibles a los distintos sistemas de sacrificio y carnización, que permiten una mejor higiene durante estas operaciones en el caso del avestruz. Además, mientras que en el pollo se analiza la piel del muslo por ser una de las zonas más contaminadas, en las muestras de avestruz, que son desollados durante su faenado, tan sólo se analiza el tejido muscular, que permite una menor supervivencia del microorganismo.

En las jaulas de descarga exteriores se investigó el estado higiénico en el que los animales llegan al matadero, mientras que el análisis de las jaulas de descarga interiores y de las zonas de clasificación por peso y otras superficies y estructuras a lo largo de la cadena de producción, obedece al estudio de la higiene del proceso de sacrificio y faenado. Además, se ha observado que la reutilización de jaulas contaminadas durante el procesado en matadero, incrementaba significativamente las posibilidades de contaminación por *Campylobacter* spp. de lotes no contaminados

previamente (Slader et al., 2002). También se tomaron muestras del agua de escaldado empleada. El agua de escaldado puede ser una fuente de contaminación por *Campylobacter* spp. si la temperatura alcanzada es insuficiente (Oosterom et al., 1983). En un estudio realizado en el marco del programa nacional de vigilancia de *Campylobacter* de los lotes de pollo industrial (Wedderkopp et al., 2001), dada la aplicación del sistema todo dentro-todo fuera, la transmisión de *Campylobacter* dentro de una misma nave es epidemiológicamente insignificante, indicando así la importancia de prevenir la entrada del microorganismo reforzando las medidas de bioseguridad. Por otra parte no se observó un efecto reductor significativo de la contaminación de los lotes de aves por *Campylobacter* debidos a medidas de limpieza y desinfección intensivas combinadas con un extenso período de vacío sanitario (Wedderkopp et al., 2001).

Los datos obtenidos del **comercio minorista** reflejan diferencias en la prevalencia de *Campylobacter* spp. en el pollo de cría industrial y el de cría ecológica (55,6% frente a 50% respectivamente), lo cual es coherente con los datos obtenidos para ambos tipos de aves a nivel de granja y de matadero (para broiler, Tabla 2.5). Son en todo caso datos superiores al 49,5% obtenido en 1999, dentro del mismo ámbito geográfico (Domínguez et al., 2002). Es también superior al 17-35% (Nielsen and Nielsen, 1999) en Dinamarca en 1999, el 44,0% (Gorman et al., 2002) en Irlanda en 2002, o el 81,8% en Eslovenia (Zorman and Mozina, 2002) o al 52,2% detectado en Alemania (Kullmann and Häger, 2002). Por su parte, los datos referentes a la prevalencia de *Campylobacter* spp. en las muestras de avestruz obtenidas en el comercio minorista, reflejan una incidencia significativamente menor que en los casos anteriores (33,3%).

#### INFLUENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE ORIGEN DE LA MUESTRA

Analizando los datos de la Tabla 2.5 se puede observar la contaminación microbiana a lo largo de la cadena alimentaria para cada uno de las tres producciones. Para broiler, la prevalencia media fue del 55,6%, para el pollo ecológico del 53,2 y del 30,4% para el avestruz.

En el total general de aislamientos, las cifras son muy estables a lo largo de la cadena alimentaria (44,8% en granja, 44,7% en matadero y 48,1% en comercio minorista). Si desglosamos esta información en función de la producción animal, obtenemos que los aislamientos para pollo broiler y avestruz siguen la tendencia de estabilidad general indicada a lo largo de la cadena alimentaria. Así, en pollo broiler se obtuvieron un 56,7%, 54,8% y 55,6% en granja, matadero y comercio minorista respectivamente. Por su parte, en avestruz se detectó un 30,6%, en granja, un 29,5% en matadero y un 33,3% en comercio minorista. Un comportamiento diferenciado lo muestra el pollo ecológico, que presenta índices muy similares en granja y comercio minorista (y a su vez tan sólo ligeramente superiores a los hallados en pollo broiler), pero un muy notable incremento de los aislamientos (75%) en matadero. No obstante, este dato

dispar se debe probablemente al bajo número de muestras tomadas (6 positivas de un total de 8), teniendo por tanto una menor relevancia.

#### INFLUENCIA ESTACIONAL

---

Se observó una influencia estacional, incrementándose los porcentajes de aislamientos en los meses de primavera y verano (43,4% y 61% respectivamente frente a un 40,2% y 39% en otoño e invierno respectivamente) (Tabla 2.6 y Figura 2.5). Este aumento de la prevalencia se ha ligado a un incremento en la eliminación de heces de los reservorios del microorganismo, fundamentalmente las aves en cautividad. Esta diferencia estacional se manifiesta en la misma dirección en las granjas de los tres tipos de animales analizados (Tablas 2.10, 2.11 y 2.12), siendo especialmente clara en granjas de broilers y de pollo ecológico. En el caso de las granjas de avestruz, la mayor prevalencia se observó en primavera (56%) seguido del invierno (33%), aunque esto pudiera deberse al menor número de muestras tomadas de agua de bebedero en invierno que en otoño para ambos tipos de animales, si bien su aislamiento resultó siempre negativo.

En los datos obtenidos en matadero, esta diferencia estacional no es tan manifiesta, aunque la prevalencia en verano sigue siendo globalmente superior (64%). Respecto al pollo de cría industrial en matadero (Tabla 2.10), se detectó una prevalencia del 44% en primavera, 73% en verano, 70% en otoño y 33% en invierno. En el caso del pollo de cría ecológica (Tabla 2.11), se obtuvieron porcentajes de aislamiento del 0% en primavera y del 100% en el resto del año, y son atípicos por el bajo número de muestras tomadas debido a que por razones técnicas del matadero sólo se pudieron analizar muestras de hígado y de producto terminado, es decir, de la canal ya lista para su comercialización, siendo el número de muestras bajo (dos por estación). Los datos obtenidos en el matadero para avestruz fueron de 50% en primavera, 44% en verano, 8% en otoño y 11% en invierno.

En el comercio minorista se obtuvieron los siguientes datos de prevalencia global: 33% en primavera, verano 73%, otoño 45% e invierno 55%. En broiler la prevalencia se mantiene en el 50% excepto para otoño en que se detecta un 75%. Para pollo ecológico, se observan grandes variaciones (primavera, 33%, verano 100%, otoño 25% e invierno 75%). Para avestruz, las diferencias son también acusadas, con un 0% en primavera, un 66,6% en verano, y 33,3% en otoño e invierno.

La distribución estacional para pollo industrial ha sido observada en otros estudios (Berndtson et al., 1996; Kapperud et al., 1993b; Wedderkopp et al., 2001) resultando ser siempre más altos en los meses cálidos. Generalmente los meses comprendidos entre junio y septiembre son en los que se diagnostican más casos de campilobacteriosis humana para los estudios realizados en el hemisferio Norte (Hänninen et al., 2001). Este pico primaveral es reflejado en regiones del hemisferio

Sur (Stanley and Jones, 2003), incluyendo Nueva Zelanda (Brieseman, 1990), Australia (Grau, 1991) o Sudáfrica (Franco, 1998). Se puede además hablar de un pico secundario más bajo en otoño (Stanley and Jones, 2003). No obstante, algunos autores no han observado tal variación estacional (Humphrey et al., 1993).

**TABLA 2.13. CEPAS IDENTIFICADAS Y CONFIRMADAS COMO *CAMPYLOBACTER* TERMOFÍLICAS JUNTAMENTE CON EL LUGAR DE TOMA DE MUESTRA, LA PRODUCCIÓN Y LA ESTACIÓN DEL AÑO EN QUE SE RECOGIERON**

Nº cepa	Lugar muestreo	Muestra	Producción	Estación
2	Comercio	Muslo	Broiler	Verano
4	Comercio	Muslo	Ecológico	Invierno
6	Comercio	Muslo	Ecológico	Invierno
7	Comercio	Muslo	Ecológico	Invierno
10	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera
11	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera
12	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera
13	Comercio	Muslo	Ecológico	Otoño
15	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera
17	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Verano
18	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Verano
21	Matadero	Hígado	Broiler	Invierno
24	Matadero	Hígado	Broiler	Verano
25	Matadero	Hígado	Ecológico	Otoño
26	Comercio	Muslo	Ecológico	Verano
27	Comercio	Muslo	Ecológico	Verano
28	Matadero	Jaula	Broiler	Primavera
32	Matadero	Jaula	Broiler	Invierno
33	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Otoño
36	Matadero	Jaula	Broiler	Verano
37	Matadero	Jaula	Broiler	Verano
38	Comercio	Filete	Ecológico	Verano
39	Comercio	Muslo	Ecológico	Verano
40	Granja	Heces	Ecológico	Primavera
42	Granja	Polvo y camas	Ecológico	Primavera
46	Granja	Polvo y camas	Broiler	Primavera
47	Granja	Botas	Broiler	Primavera
52	Granja	Polvo y camas	Avestruz	Primavera
55	Granja	Heces	Broiler	Verano
56	Granja	Heces	Broiler	Verano
57	Granja	Heces	Ecológico	Verano
58	Granja	Botas	Ecológico	Verano
59	Granja	Botas	Ecológico	Verano
62	Granja	Heces	Broiler	Verano
63	Granja	Polvo y camas	Broiler	Verano
64	Granja	Botas	Broiler	Verano
67	Granja	Heces	Ecológico	Invierno
71	Granja	Heces	Avestruz	Verano
73	Granja	Heces	Avestruz	Verano
74	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Primavera
79	Matadero	Hígado	Ecológico	Invierno
80	Matadero	Final línea	Broiler	Otoño
86	Matadero	Final línea	Broiler	Verano
87	Matadero	Final línea	Broiler	Otoño
89	Granja	Heces	Ecológico	Invierno
91	Granja	Heces	Avestruz	Invierno
95	Granja	Botas	Ecológico	Invierno
97	Granja	Heces	Avestruz	Invierno
98	Granja	Botas	Avestruz	Invierno
101	Granja	Heces	Broiler	Invierno
103	Comercio	Filete	Avestruz	Invierno
105	Comercio	Filete	Avestruz	Otoño
111	Comercio	Filete	Avestruz	Verano
112	Comercio	Filete	Avestruz	Verano
114	Comercio	Muslo	Broiler	Invierno
115	Comercio	Muslo	Broiler	Invierno
119	Comercio	Muslo	Broiler	Otoño

122	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Invierno
125	Matadero	Hígado	Ecológico	Invierno
126	Matadero	Hígado	Broiler	Otoño
127	Matadero	Hígado	Broiler	Primavera
130	Matadero	Final línea	Broiler	Verano
131	Matadero	Hígado	Broiler	Otoño
138	Granja	Heces	Broiler	Invierno
139	Granja	Heces	Broiler	Invierno
142	Granja	Heces	Ecológico	Otoño
149	Granja	Heces	Ecológico	Otoño
150	Granja	Polvo y camas	Ecológico	Otoño
153	Granja	Polvo y camas	Avestruz	Otoño
155	Granja	Heces	Broiler	Otoño
156	Granja	Heces	Broiler	Otoño
159	Matadero	Hígado	Ecológico	Verano
160	Matadero	Hígado	Ecológico	Verano
161	Granja	Heces	Ecológico	Verano
162	Granja	Heces	Ecológico	Verano
165	Granja	Heces	Broiler	Otoño
167	Granja	Botas	Broiler	Otoño
168	Granja	Polvo y camas	Ecológico	Otoño
171	Granja	Bebedero	Avestruz	Primavera
174	Granja	Heces	Broiler	Primavera
175	Matadero	Hígado	Broiler	Primavera
176	Matadero	Hígado	Broiler	Primavera
180	Matadero	Hígado	Ecológico	Otoño
181	Matadero	Jaula	Broiler	Otoño
183	Matadero	Jaula	Broiler	Primavera
185	Matadero	Hígado	Broiler	Verano
188	Granja	Heces	Ecológico	Primavera
190	Granja	Bebedero	Avestruz	Primavera
191	Granja	Heces	Avestruz	Primavera
192	Granja	Heces	Avestruz	Primavera
193	Granja	Heces	Broiler	Primavera
194	Granja	Heces	Broiler	Primavera
196	Comercio	Muslo	Broiler	Otoño
197	Comercio	Muslo	Broiler	Otoño
198	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera
199	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera
200	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera
204	Comercio	Muslo	Broiler	Verano
301	Matadero	Corrales	Avestruz	Primavera
302	Matadero	Final línea	Broiler	Primavera
303	Matadero	Final línea	Broiler	Primavera
305	Matadero	Superf. canal	Avestruz	Primavera
306	Matadero	Superf. canal	Avestruz	Primavera
307	Matadero	Hígado	Avestruz	Primavera
311	Matadero	Corrales	Avestruz	Verano
318	Matadero	Hígado	Avestruz	Verano
319	Matadero	Agua de lavado (goteo)	Avestruz	Verano
320	Matadero	Agua de lavado (goteo)	Avestruz	Verano
324	Matadero	Final línea	Broiler	Otoño
328	Matadero	Hígado	Avestruz	Otoño
338	Matadero	Hígado	Avestruz	Invierno

### 3 CAPÍTULO III. ESTUDIO DE LA ANTIBIORRESISTENCIA DE LAS CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* AISLADAS

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

A finales de los años cuarenta del siglo pasado se descubre que las aves alimentadas con productos de fermentación de *Streptomyces aureofaciens* muestran mejores ritmos de crecimiento, y en 1950 comienzan a emplearse piensos para animales de abasto con pequeñas dosis de antibióticos buscándose la mejora en las producciones. En los años sesenta se detectan ya aumentos de la resistencia a antibióticos en bacterias, vinculándose rápidamente al empleo de antibióticos en la formulación de los piensos. En 1969 se publica el Informe Swann (Swann et al., 1969) en el que se desaconseja el uso como promotores de crecimiento de los antibióticos también usados en medicina humana, y de antibióticos que seleccionen resistencias cruzadas.

El fenómeno de la antibiorresistencia se ha detectado en muchos grupos de bacterias y para muchos compuestos antibióticos (Aarestrup and Engberg, 2001; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2008c). Es de destacar también que aumenta la frecuencia de detección de bacterias antibiorresistentes en alimentos de origen animal. Ejemplos de ello son el aislamiento de *Enterococcus* con resistencia de alto nivel a la vancomicina en muestras de alimentos, aguas residuales y heces de humanos y de animales, relacionándose con el uso de avoparcina en producción animal. Otros ejemplos son las salmonellas multirresistentes a antibióticos o *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2008c).

La resistencia frente a antibióticos dificulta la eficacia ante tratamientos terapéuticos tanto en medicina veterinaria como en humana (Altekruse et al., 1999). Se calcula que en Europa mueren anualmente 25.000 pacientes por infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos, representando además unos costes de 1.500 millones de euros en gastos extras para el sistema sanitario (Commission of the European Communities, 2009). Aunque en muchos casos, los pacientes aquejados de una infección debida a *Campylobacter* no precisan de hospitalización, la terapia antibiótica se usa en aquellos que muestran síntomas de fiebre, diarrea sanguinolenta o defecación persistente en 24 horas, así como en pacientes inmunosuprimidos o con septicemia, o cuya sintomatología se mantiene o empeora durante un período de una semana (Prats et al., 2000). La terapia antimicrobiana puede reducir la duración y gravedad de la enfermedad y el uso de antibióticos es frecuente en el tratamiento sintomático de los pacientes con problemas gastrointestinales ya que algunos como los macrólidos y las fluoroquinolonas muestran buena actividad contra la mayoría de los patógenos entéricos (Afset and Maeland, 2001; Ashkenazi et al., 1987; Salazar-Lindo et al., 1986). Frente a la campilobacteriosis, macrólidos como la eritromicina, las fluoroquinolonas y la tetraciclina son los antibióticos de elección (Lucey et al., 2000b)

mientras que el cloramfenicol, la doxiciclina y a veces las tetraciclina serían antibióticos de empleo alternativo (Engberg et al., 2001; Ge et al., 2003). Para el tratamiento de pacientes adultos, se suele incluir una fluoroquinolona dado su amplio espectro de actividad frente a casi todas las bacterias patógenas entéricas (Engberg et al., 2004). También se señala el metronidazol como compuesto alternativo ante altas tasas de resistencia frente a quinolonas y macrólidos (Korovina et al., 1991).

### 3.1.1 MONITORIZACIÓN Y VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

La vigilancia epidemiológica sistemática y la publicación de informes de antibiorresistencia en *C. jejuni* y *C. coli* y otros patógenos entéricos se considera un aspecto de particular importancia en salud pública por su utilidad (Belanger and Shryock, 2007; Bronzwaer et al., 2009; EFSA, 2009b; EFSA, 2010a; EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2009; Moreno et al., 2000). Uno de los objetivos principales de la monitorización y vigilancia de la resistencia antimicrobiana en los patógenos entéricos es proporcionar a los gestores de riesgos información sobre tendencias, posibles estrategias de intervención y sobre la eficacia de las medidas tomadas, y a los clínicos datos que permitan seleccionar pautas de tratamiento adecuadas (Clifford and Gnanou, 2000; Moreno et al., 2000; Regula et al., 2005; Wray and Gnanou, 2000).

Según los datos epidemiológicos de que se dispone, la antibiorresistencia en *Campylobacter* spp. (y particularmente la resistencia a las fluoroquinolonas) está aumentando y se ha convertido ya en un problema de salud pública. Según el Informe sobre tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos en la Unión Europea (EFSA, 2009b), 44,2% de las cepas de *C. jejuni* aisladas en casos clínicos eran resistentes a la ciprofloxacina, 27,5% a la tetraciclina y 27,8% a la ampicilina. El fenómeno de la multirresistencia (a cuatro o más antimicrobianos) se observó en 10,8% de las cepas de *C. jejuni* aisladas. A nivel europeo se ha observado una importante variación entre países en la antibiorresistencia a la ciprofloxacina de *C. jejuni* aislados de *Gallus gallus* (6,7-94,1; 7,9%-93,8%) y a las tetraciclinas (0-82,4%; 5,3%-52,8%) (EFSA, 2009b). Este hecho se ve refrendado por las evidencias científicas que señalan que el uso de fluoroquinolonas en aves ha conducido a esta antibiorresistencia y que las cepas de aves se han diseminado en humanos (Endtz et al., 1991; Thwaites and Frost, 1999).

La aprobación del empleo de fluoroquinolonas en animales de abasto como fármacos y piensos medicamentosos ha sido seguida por la aparición de resistencias a estos antibióticos en cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras ambientales, alimentos, animales y hombre, en países como Holanda, España, Tailandia, Suecia, Reino Unido y EE.UU. (Endtz et al., 1990; Endtz et al., 1991; Gaunt and Piddock, 1996; Koenraad et al., 1995a; Kuschner et al., 1995; Piddock, 1995; Sjogren et al., 1997; Smith et al., 1999; Threlfall et al., 2000; van den Bogaard and Stobberingh, 2000; Velazquez et al., 1995; Zirnstein et al., 1999). El alto grado de resistencia a las quinolonas en *Campylobacter*

puede verse facilitado por producirse con una sola mutación genética, no requiriendo para ello DNA externo y dependiendo su diseminación únicamente de una transferencia vertical a partir del clon resistente. *Campylobacter* constituye, junto con *Salmonella*, *Escherichia coli* y el grupo de los enterococos, el género bacteriano más frecuentemente asociado con la generación de antibiorresistencias.

### 3.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

No se conocen completamente los mecanismos por los que los antibióticos mejoran los ritmos de crecimiento en animales. La hipótesis más plausible es que se produce una modificación cuantitativa y cualitativa de la flora microbiana intestinal, con disminución de la prevalencia de los patógenos causantes de enfermedades subclínicas, y reducción de la flora autóctona que compite con el huésped por nutrientes, disminuyendo las tasas de mortalidad y mejorando la productividad. Pero además, el empleo de antimicrobianos produce la selección de una parte de la población microbiana presente en nichos ecológicos, tales como el tracto gastrointestinal o respiratorio. Las bacterias sensibles al antimicrobiano son inhibidas o inactivadas, mientras que las que son capaces de resistir la presión selectiva impuesta por el compuesto, persisten y desplazan a las bacterias sensibles. Se crea además un pool o reservorio de resistencia antibiótica en un grupo de bacterias, entre las que pueden encontrarse patógenos. Los animales sirven entonces como reservorios para patógenos y los eliminan en heces de manera continua. Las bacterias patógenas antibiorresistentes pueden contaminar los productos de origen animal como leche, carne, huevos etc. y ser transmitidas al hombre a través de la manipulación o el consumo de alimentos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2008b). La aparición de antibiorresistencias constituye un fenómeno de interferencia en el proceso de selección natural, seleccionándose cepas con capacidad de supervivencia en presencia del antibacteriano. Se trata de una resistencia adquirida o extrínseca más que de una resistencia intrínseca o constitutiva del propio microorganismo. La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos puede estar causada por la adquisición de nuevos genes de antibiorresistencia o por fenómenos de mutación genética. Para las fluoroquinolonas y macrólidos, la resistencia se debe a fenómenos de mutación cromosómica mientras que para otros antibióticos relevantes, es debida a la adquisición de genes de resistencia (Aarestrup and Engberg, 2001). Se han descrito en *Campylobacter jejuni* mutaciones silenciosas sin efecto sobre la resistencia a las quinolonas (Beckmann et al., 2003). Las bacterias pueden adquirir genes de antibiorresistencia mediante elementos genéticos móviles tales como plásmidos de resistencia, transposones (elemento genético transponible) e integrones (Lucey et al., 2000a). También se conocen genes que participan conjuntamente en fenómenos de virulencia y de antibiorresistencia, como las bombas de expulsión (Lin et al., 2007; Quinn et al., 2007).

### 3.1.3 LEGISLACIÓN

Desde 1970, con la publicación de la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre aditivos en la alimentación animal, se han introducido sucesivas prohibiciones sobre el uso de antibióticos en producción animal. En la actualidad existe una total prohibición del empleo de antibióticos distintos de los coccidiostáticos e histomonostáticos (cuya autorización se mantendrá hasta el 31 de diciembre de 2012) como aditivos en piensos en el conjunto del territorio comunitario (Regl. (CE) 1831/2003. Art. 11.2). En los últimos años en la Unión Europea se ha seguido una política de prohibición de antibióticos en producción animal (empleo veterinario de la avoparcina en 1997 (Jørgensen et al., 2002), tilosina como promotor del crecimiento en 1999 (Sáenz, 2000), macrólidos como promotores del crecimiento en 1999 (Engberg et al., 2001). Hasta el año 2006 existía una prohibición del empleo de antibióticos como aditivos en piensos animales, exceptuando 4 sustancias antibióticas (flavofosfolipol, los ionóforos monensina sódica y salinomicina, y el oligosacárido avilamicina). Por supuesto están autorizados múltiples antibióticos bajo prescripción veterinaria, y respetando las indicaciones de Ingesta Diaria Admisible –IDA-, Límite Máximo de Residuos –LMR-, tiempo de espera, etc.

### 3.1.4 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se ha investigado la incidencia de resistencias a los diferentes grupos antibióticos, prestando especial atención a las sustancias más comúnmente empleadas en el tratamiento de casos clínicos de campilobacteriosis humana (ciprofloxacinas, eritromicina) (Wilson et al., 2000). Así, se ha estudiado la antibiorresistencia frente a  $\beta$ -lactámicos, lincosamidas, aminoglucósidos (aminociclitolos), cloramfenicol, antibióticos polipeptídicos, sulfamidas, trimetoprim, tetraciclinas y macrólidos. Los antibióticos se seleccionaron atendiendo a su clasificación química, para obtener datos que reflejasen un perfil amplio de antibiorresistencias. Se ha incluido la resistencia frente a la tilosina, por ser el único macrólido de uso exclusivo veterinario. Además, y considerando el origen de las cepas aisladas, se ha pretendido estudiar el mismo a lo largo del conjunto de la cadena alimentaria.

## 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1 CEPAS EMPLEADAS

Las cepas empleadas para la realización de las pruebas de antibiorresistencia fueron las aisladas y confirmadas mediante pruebas fenotípicas y genotípicas, como se describe en el Capítulo anterior (Tabla 2.13, Tabla 2.5 y Figura 2.4). Un total de 111 cepas fueron sometidas a las pruebas.

### 3.2.2 ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS

Los antibióticos empleados, sus concentraciones expresadas en  $\mu\text{g}/\text{disco}$  y el grupo químico al que pertenecen se relacionan en la Tabla 3.1 (Botana et al., 2002; Caprioli et al., 2000). Se incluyen aquellas sustancias (estreptomicina, gentamicina, neomicina,

ampicilina, tetraciclinas, cloramfenicol y sulfonamidas) más frecuentemente empleadas en los programas de monitorización de antibiorresistencia de cepas aisladas en animales (Wray and Gnanou, 2000). En el caso de la ciprofloxacina, dado su empleo en medicina humana, se ha preferido analizar la resistencia en vez de su equivalente veterinario, la enrofloxacin (Sánchez et al., 2002).

TABLA 3.1. ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS, GRUPO QUÍMICO Y CONCENTRACIONES (CC) EXPRESADAS EN µG

Grupo químico		Antibióticos	cc
<i>β-lactámicos</i>	Penicilinas	Ampicilina	25
		Oxacilina	1
	Cefalosporinas de 1ª generación	Cefalotina	30
	Cefalosporinas de 3ª generación	Cefotaxima	30
<i>Lincosamidas</i>		Clindamicina	2
<i>Aminoglucósidos</i> (aminociclitoles)		Gentamicina	100
		Kanamicina	30
		Neomicina	30
		Estreptomicina	25
<i>Cloramfenicol</i>		Cloramfenicol	30
<i>Antibióticos polipeptídicos</i>		Polimixina B	300
<i>Sulfamidas</i>		Sulfafurazol	300
<i>Trimetoprim</i>		Trimetoprim	5
<i>Tetraciclinas</i>		Tetraciclina	30
<i>Macrólidos</i>		Eritromicina	15
		Tilosina	30
	Nuevos macrólidos	Azitromicina	15
<i>Quinolonas</i>	de 1ª generación	Ácido nalidíxico	30
	de 2ª generación	Ciprofloxacina	5
		Norfloxacin	10

### 3.2.3 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Las cepas aisladas a lo largo del muestreo y almacenadas en 0,4 ml de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  se revitalizaron mediante siembra de  $65\mu\text{l}$  en 10 ml de BHI (Oxoid) y cultivo en atmósfera microaerófila y capnófila a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Posteriormente, se sembró por estría con un asa de platino estéril en medio de crecimiento no selectivo (BHI Agar) en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se dispusieron diluciones de agua destilada estéril (0,85% NaCl), y tras el cultivo en BHIA, se tomaron colonias con hisopos estériles diluyendo hasta obtener suspensiones con un contenido aproximado de  $10^4$  ufc/ml, equivalente a una turbidez de 0,5 según la escala de McFarland (Aquino et al., 2002).

### 3.2.4 SIEMBRA EN MEDIO DE CULTIVO

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión por disco o método Kirby-Bauer (Prats et al., 2000) siguiendo las recomendaciones de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000). Los tubos se inocularon en Mueller-Hinton Agar (Oxoid), más 5% de sangre desfibrinada de oveja (Oxoid) (Sáenz et

al., 2000). El inóculo se extendió por la placa y a continuación se depositaron los discos de antibióticos (al menos a 22 mm un disco de otro y a 14 mm del borde de la placa). En cada placa se depositaron 5 discos de antibióticos y se observó la presencia (y en su caso diámetro) de los halos de inhibición a las 18 horas de incubación. Se hicieron mediciones adicionales de los halos transcurridas 24, 36 y 48 horas. Todas las pruebas de antibiorresistencia fueron realizadas por duplicado para cada una de las cepas aisladas durante el muestreo.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron por duplicado los porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para las 111 cepas aisladas. Las cepas aisladas lo habían sido de puntos diversos a lo largo de la cadena alimentaria (Tabla 2.13). No se observaron variaciones apreciables en el diámetro de los halos presentes según el tiempo de incubación de los cultivos, ni disparidad de resultados entre los duplicados de las cepas investigadas. La antibiorresistencia media encontrada fue del 55,0% considerando todas las muestras investigadas. Esta resistencia varió desde un 0,0% para la gentamicina hasta un 97,3% para la oxitetraciclina, clindamicina, tilosina y eritromicina (estos dos últimos macrólidos) (Tabla 3.2, Figura 3.1). Un número variable de cepas mostró una sensibilidad intermedia, con halo en el que se apreciaba crecimiento en el mismo, aunque más débil que en el resto de la placa, estando su porcentaje entre el 0% y el 42% (Figura 3.1). Este fenómeno puede deberse a que ciertas bacterias en la población se ven inhibidas por un antibiótico determinado mientras otras son capaces de crecer.

FIGURA 3.1. PLACA DE PETRI MOSTRANDO HALOS DE INHIBICIÓN VARIABLES A DISTINTOS ANTIBIÓTICOS



**TABLA 3.2. PORCENTAJES GLOBALES DE RESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA EN LAS 111 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* ESTUDIADAS EN SU SUSCEPTIBILIDAD A 20 ANTIBIÓTICOS**

Antibiótico		Resist.	Sens. Int.	Sensib.
NOR 10*	Norfloxacina 10	12,6%	36,9%	50,5%
OX 1	Oxacilina 1	97,3%	0,0%	2,7%
PB 300	Polimixina B 300	11,7%	37,8%	50,5%
SF 300	Sulfafurazol 300	88,3%	6,3%	5,4%
T 30	Tetraciclina 30	91,9%	4,5%	3,6%
TY 30	Tilosina 30	97,3%	0,0%	2,7%
CTX 30	Cefotaxima 30	3,6%	8,1%	88,3%
KF 30	Cloramfenicol 30	18,0%	23,4%	58,6%
C 30	Cefalotina 30	28,8%	38,7%	32,4%
K 30	Kanamicina 30	27,0%	36,9%	36,0%
CIP 5	Ciprofloxacina 5	10,8%	42,3%	46,8%
CD 2	Clindamicina 2	97,3%	1,8%	0,9%
E 15	Eritromicina 15	97,3%	0,0%	2,7%
GM 100	Gentamicina 100	0,0%	5,4%	94,6%
NE 30	Neomicina 30	7,2%	14,4%	78,4%
S 25	Estreptomicina 25	81,1%	9,9%	9,0%
TM 5	Trimetoprim 5	93,7%	1,8%	4,5%
AP 25	Amplicilina 25	77,5%	13,5%	9,0%
ATH 15	Azitromicina 15	85,6%	9,0%	5,4%
NA 3	Ácido nalidíxico 30	72,1%	18,9%	9,0%

Sens. Int. Se consideraron cepas con sensibilidad intermedia aquellas que presentaron halo en el que se apreciaba crecimiento en el mismo, aunque más débil que en el resto de la placa. Las cepas sensibles mostraban ausencia de crecimiento en todo el halo.

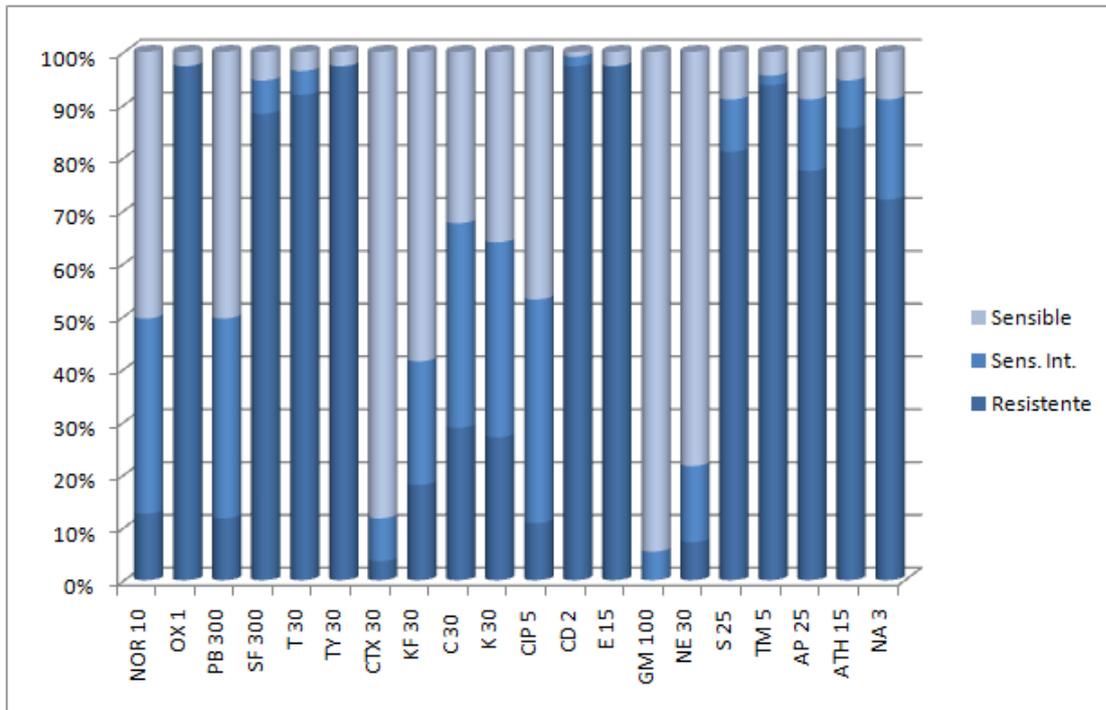


FIGURA 3.2. PORCENTAJES GLOBALES DE RESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA EN LAS 111 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* ESTUDIADAS FRENTE A 20 ANTIBIÓTICOS

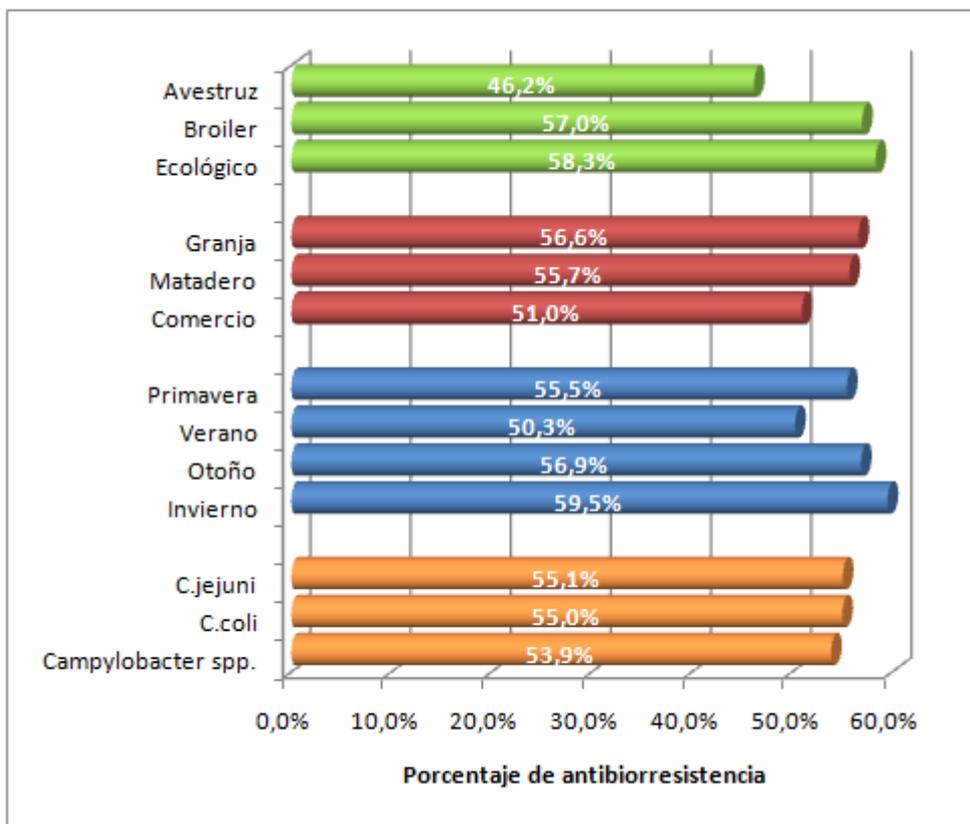
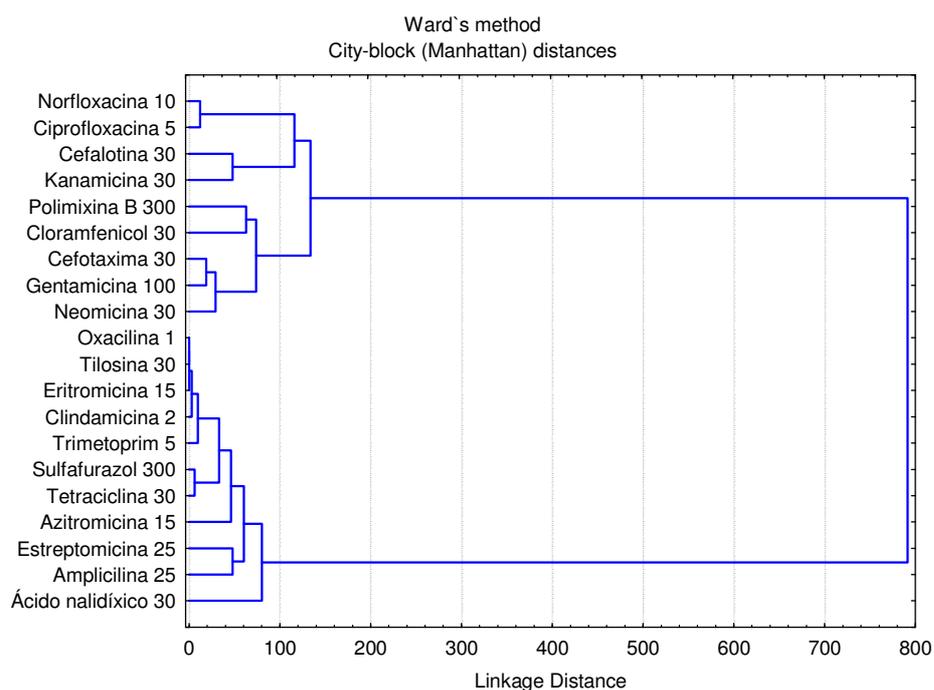


FIGURA 3.3. PORCENTAJES GLOBALES DE RESISTENCIA EN LAS 111 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* ESTUDIADAS FRENTE A 20 ANTIBIÓTICOS

La Figura 3.2 presenta los porcentajes globales de resistencia en las 111 cepas de *Campylobacter* estudiadas frente a 20 antibióticos considerando todos los antibióticos empleados conjuntamente y las cepas aisladas, separados en función de las producciones animales estudiadas, el punto de toma de muestra, la estación del año en que se tomó la muestra y la especie microbiana según la identificación realizada. Las diferencias observadas entre las antibiorresistencias se consideraron significativas para las distintas producciones, las estaciones y los puntos de muestreo.

La Figura 3.4 muestra la separación clara existente entre los antibióticos empleados en función de su nivel de antibiorresistencia. La separación se obtuvo mediante análisis cluster empleando la distancia de Manhattan y el agrupamiento con el sistema de Ward. Por un lado tenemos los antibióticos norfloxacina, ciprofloxacina, cefalotina, kanamicina, polimixina b, cefotaxima, cloramfenicol, gentamicina y neomicina, con tasas de resistencia inferiores al 10% por término medio, y por otro un conjunto de antibióticos que muestran resistencias superiores al 80% con oxaciclina, sulfafurazol, tetraciclina, tilosina, clindamicina, eritromicina, estreptomina, trimetoprim, ampicilina, azitromicina y ácido nalidíxico.



**FIGURA 3.4. AGRUPACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS DE ANTIBIORRESISTENCIA EN FUNCIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ELAS**

Teniendo en cuenta la clasificación de los antibióticos empleados en función de su naturaleza química, resulta arriesgado extraer conclusiones respecto a su uso en producción animal según su composición química. Si bien se observan grupos químicos (ver Tabla 3.1) que presentan una antibiorresistencia alta (sulfamidas, trimetoprima,

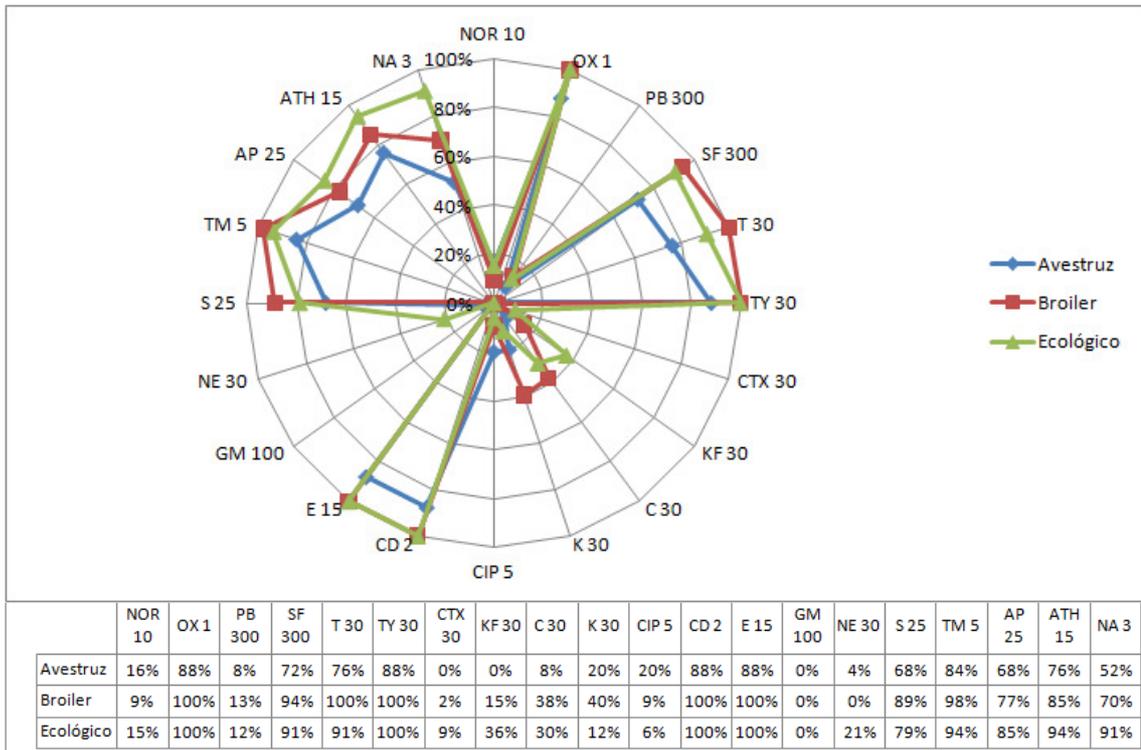
tetraciclinas y macrólidos) o baja (cloramfenicol y antibióticos polipeptídicos), el hecho de que haya grupos de antibióticos que presentan compuestos con alta y baja antibiorresistencia ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas) induce a pensar que el empleo, fraudulento o no, de determinados compuestos antibióticos obedecería más bien a la utilización de medicamentos concretos habituales en las prácticas clínicas y/o zootécnicas más que a su naturaleza química.

### 3.3.1 ANTIBIORRESISTENCIA EN LAS PRODUCCIONES ANIMALES

La Tabla 3.3 recoge el número de cepas que muestran antibiorresistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para cada una de los 20 antibióticos analizados, desglosados por producción animal. La Figura 3.5 muestra la distribución porcentual.

**TABLA 3.3. NÚMERO DE CEPAS QUE MUESTRAN ANTIBIORRESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA PARA CADA UNA DE LOS 20 ANTIBIÓTICOS ANALIZADOS SEGÚN LA PRODUCCIÓN ANIMAL**

Antibiótico	Avestruz			Broiler			Ecológico		
	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.
NOR 10	5	4	16	28	5	20	8	5	20
OX 1	0	22	3	0	53	0	0	33	0
PB 300	11	2	12	25	7	21	6	4	23
SF 300	6	18	1	1	50	2	0	30	3
T 30	5	19	1	0	53	0	0	30	3
TY 30	0	22	3	0	53	0	0	33	0
CTX 30	2	0	23	1	1	51	6	3	24
KF 30	5	0	20	14	8	31	7	12	14
C 30	9	2	14	24	20	9	10	10	13
K 30	8	5	12	17	21	15	16	4	13
CIP 5	6	5	14	28	5	20	13	2	18
CD 2	2	22	1	0	53	0	0	33	0
E 15	0	22	3	0	53	0	0	33	0
GM 100	0	0	25	4	0	49	2	0	31
NE 30	2	1	22	8	0	45	6	7	20
S 25	3	17	5	3	47	3	5	26	2
TM 5	1	21	3	0	52	1	1	31	1
AP 25	0	17	8	12	41	0	3	28	2
ATH 15	3	19	3	7	45	1	0	31	2
NA 3	6	13	6	14	37	2	1	30	2



**FIGURA 3.5. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL NIVEL DE ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN LA PRODUCCIÓN ANIMAL PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS**

Considerando todos los antibióticos empleados conjuntamente y las cepas aisladas según las producciones animales estudiadas, la tasa de resistencia media hallada fue del 58,3% en pollo de cría ecológica, 57,0% en broilers y 46,2% en avestruz (Figura 3.3). Estos valores tienen una validez relativa ya que incluyen el conjunto de las antibiorresistencias sin especificar el tipo de antibiótico, pero indican el uso extenso de antibióticos en producciones alternativas como el pollo de cría ecológica, que supuestamente debería restringirlos o eliminarlos.

#### CEPAS AISLADAS DE BROILER

Nueve compuestos antibióticos presentaron un porcentaje de antibiorresistencia superiores al 80% (Oxacilina 1 (OX 1), Tetraciclina 30 (T 30), Tilosina 30 (TY 30), Clindamicina 2 (CD 2), Eritromicina 15 (E 15), Sulfafurazol 300 (SF 300), Trimetoprim 5 (TM 5), Estreptomicina 25 (S 25) y Azitromicina 15 (ATH 15)). Constituyen un grupo heterogéneo según su composición química, con  $\beta$ -lactámicos (OX 1), macrólidos (E 15, TY 30, ATH 15), lincosamidas (CD 2), trimetoprim (TM 5) y tetraciclinas (T 30). Por debajo del 20% de resistencia se encuentran Gentamicina 100 (GM 100) y Neomicina 30 (NE 30) (0%), Cefotaxima 30 (CTX 30) (2%), Norfloxacin 10 (NOR 10) y Ciprofloxacina 5 (CIP 5) (9%), Polimixina B 300 (PB 300) (13%) y Cloramfenicol 30 (KF 30) (15%). En valores intermedios tenemos cuatro compuestos: Cefalotina 30 (C 30) (38%), Kanamicina 30 (K 30) (40%), Ácido nalidíxico 30 (NA 30) (70%) y Ampicilina 25 (AP 25) (77%). Los resultados obtenidos difieren parcialmente de los de otros autores.

En EE.UU., (Ge et al., 2003) observó que la tetraciclina fue el antibiótico con mayor resistencia (82%), encontrando para la eritromicina y el ácido nalidíxico porcentajes del 54% y 41% respectivamente, y superiores a nuestro estudio para la ciprofloxacina (35%). En Italia, se detectó tanto para *C. jejuni* como para *C. coli* a iguales concentraciones antibióticas una menor resistencia frente a la eritromicina, pero mayor a la ciprofloxacina y a la cefalotina (Pezzotti et al., 2003). En Dinamarca (Aarestrup et al., 1997), a partir de cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de pollo broiler, se detectaron respectivamente los siguientes niveles de antibiorresistencia: ampicilina (6% y 0%), cloramfenicol (4% y 0%), eritromicina (6% y 18%), ácido nalidíxico (15 y 0%), neomicina (0% para ambas especies), estreptomina (1% y 6%), tetraciclina (2% y 0%) y tilosina (6% y 18%). Más recientemente, estudiando 49 cepas de origen fecal (39 de *Campylobacter jejuni* y 10 de *Campylobacter coli*) (Engberg et al., 2004), el 5,1% de las cepas de *C. jejuni* eran resistentes al ácido nalidíxico, el 10,3% a la eritromicina, y el 2,6% a ambas sustancias. De entre las cepas de *C. coli*, tan sólo se observó resistencia frente a la eritromicina en el 10% de las mismas. Son niveles sensiblemente inferiores a los encontrados en nuestro estudio, lo cual indica diferencias en el uso de antibióticos como promotores del crecimiento (Fallon et al., 2003). En Irlanda, se encontró en pollo una resistencia frente a la tetraciclina del 19,4% y del 9,7% a la eritromicina, claramente inferiores a nuestros resultados tanto en pollo de cría industrial como ecológica (Lucey et al., 2000b). En Portugal, se detectó una resistencia inferior a la detectada en nuestro estudio, de tan sólo el 5,1% frente a la tetraciclina y de un 0% frente a los aminoglucósidos estreptomina y kanamicina (Cabrita et al., 1992). En Tailandia, se analizó la resistencia frente a dos fluoroquinolonas de gran uso, la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico, de cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en pollo a lo largo de la cadena comercial (Padungtod et al., 2003). Sus resultados fueron superiores para la ciprofloxacina con una resistencia del 70,2% (59/84), pero ligeramente inferiores al ácido nalidíxico, con un 67,9% (57/84). También en España, se ha encontrado en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de pollo una tasa elevada de resistencia frente a la ciprofloxacina (98,7%) y la eritromicina (81,1%), para cepas de *C. coli*. Nuestros resultados son diferentes de otros (Aarestrup et al., 1997; Reina et al., 1994; Sáenz et al., 2000) en el sentido de que *C. coli* es mucho más resistente que *C. jejuni* frente a la eritromicina. Los resultados detectados para la eritromicina son similares a su vez a los datos de la azitromicina (Sáenz et al., 2000).

#### CEPAS AISLADAS DE POLLO ECOLOGICO

---

Es de destacar que las antibiorresistencias encontradas en pollo ecológico son similares o superiores a las de pollo broiler. Al igual que para el pollo broiler, nueve compuestos antibióticos presentaron porcentajes de antibiorresistencias superiores al 80%, destacando el 100% de Oxacilina 1 (OX 1), Tilosina 30 (TY 30), Clindamicina 2 (CD 2) y Eritromicina 15 (E 15), seguidos por el 94% de Trimetoprim 5 (TM 5) y Azitromicina 15

(ATH 15), el 91% de Sulfafurazol 300 (SF 300), Tetraciclina 30 (T 30) y Ácido nalidíxico 30 (NA 30), y el 85% de Ampicilina 25 (AP 25). Análogamente a lo observado para el pollo broiler, también en el caso del pollo ecológico aquellos compuestos antibióticos con mayores tasas de antibiorresistencia constituyen un grupo heterogéneo por su composición química. Con tasas de antibiorresistencia inferiores al 20% se encuentran Gentamicina 100 (GM 100) (0%), Ciprofloxacina 5 (CIP 5) (6%), Cefotaxima 30 (CTX 30) (9%), Polimixina B 300 (PB 300) y Kanamicina 30 (K 30) (ambos con un 12%) y Norfloxacina 10 (NOR 10) (15%). Sólo en cuatro compuestos se observaron tasas intermedias, aunque con notables diferencias entre sí (21% Neomicina 30 (NE 30); 30% Cefalotina 30 (C 30); 36% Cloramfenicol 30 (KF 30); 79% Estreptomina 25 (S 25)). Constituyen un grupo heterogéneo según su composición química, con  $\beta$ -lactámicos (OX 1), macrólidos (E 15, TY 30, ATH 15), lincosamidas (CD 2), trimetoprim (TM 5) y tetraciclinas (T 30). Se distinguen de los resultados para el pollo de cría industrial en una mayor resistencia a la Azitromicina 15 (ATH 15), y menos para el caso de Sulfafurazol 300 (SF 300) y Estreptomina 25 (S 25).

Para pollo de cría ecológica, existen escasos estudios sobre antibiorresistencia de cepas de *Campylobacter* aisladas procedentes de productos de pollo de cría ecológica y otras formas de explotación ganadera no convencionales (Heuer et al., 2001). En Dinamarca, se encontró un bajo nivel de resistencia antimicrobiana tanto para *Campylobacter jejuni* como para *Campylobacter coli*. Sólo un 4,1% de las cepas de *C. jejuni* eran resistentes a la estreptomina y otro 4,1% a la enrofloxacina. Respecto a *C. coli*, un 20% eran resistentes a la eritromicina y otro 20% a la estreptomina (Heuer et al., 2001). En EE.UU., se detectó un incremento en la tasa de resistencia frente a antibióticos entre 1992 y 1998 en cepas aisladas de "domestic chicken". Un 14% de las cepas de *Campylobacter jejuni* eran resistentes a la ciprofloxacina, próximo al 11% detectado en nuestro estudio (Smith et al., 1999).

#### CEPAS AISLADAS DE AVESTRUZ

En el caso de las muestras de avestruz, ningún compuesto antibiótico alcanzó un 100% de antibiorresistencia, teniendo además tan sólo cinco compuestos por encima del 80% frente a los nueve del pollo broiler y ecológico (88% para OX 1, CD 2, TY 30 y E 15; 84% para TM 5). No obstante, y análogamente al pollo broiler y ecológico, se trata de un grupo heterogéneo de acuerdo con su composición química. Sin embargo, al contrario que en los casos anteriores, son numerosos, nueve, los compuestos con unas tasas de antibiorresistencia inferiores al 20% (Cefotaxima 30 (CTX 30), Gentamicina 100 (GM 100) y Cloramfenicol 30 (KF 30) con un 0%; Neomicina 30 (NE 30) con un 4%; Polimixina B 300 (PB 300) y Cefalotina 30 (C 30) con un 8%; Norfloxacina 10 (NOR 10) con un 16%; Kanamicina 30 (K 30) y Ciprofloxacina 5 (CIP 5) con un 20%). Con antibiorresistencias intermedias entre el 20% y el 80% encontramos cinco compuestos: Ácido nalidíxico 30 (NA 30) con un 52%; Estreptomina 25 (S 25) y Ampicilina 25 (AP

25) con un 68%; Sulfafurazol 300 (SF 300) con un 72% y Tetraciclina 30 (T 30) con un 76%.

Pese a no observarse en ningún caso un 100% de tasa de antibiorresistencia, las cifras más altas se presentaron para los mismos antibióticos que en la cría de pollo industrial y ecológica. En consecuencia, presentan igualmente una variada naturaleza química, con  $\beta$ -lactámicos (OX 1, AP 25), macrólidos (E 15, TY 30 y ATH 15), lincosamidas (CD 2), tetraciclinas (T 30), sulfamidas (Sulfafurazol 300 (SF 300)), trimetoprim (TM 5) y aminoglucósidos (Estreptomina 25 (S 25)). En cuanto a los mayores índices de sensibilidad, estos se dieron, análogamente a los dos casos anteriores, para un aminoglucósido -la Gentamicina 100 (GM 100) y una cefalosporina -la Cefotaxima 30 (CTX 30) (100% ambos)- , seguidas ya a mayor distancia por otro aminoglucósido -la Neomicina 30 (NE 30) (96%)- y por una quinolona -la Norfloxacin 10 (NOR 10) (84%)-

Para avestruz, la literatura científica referente a *Campylobacter* en dicha especie y/o en sus productos derivados es escasa y circunscrita a aquellos países en los que su producción y consumo tienen mayor relevancia, por lo que no se han encontrado estudios realizados en Europa. Tampoco se han encontrado estudios sobre antibiorresistencia en cepas de *Campylobacter* aisladas en avestruz o en sus productos derivados a lo largo de cualquier punto de la cadena alimentaria. Algunos autores sí han realizado estudios de antibiorresistencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas en avestruz (Ley et al., 2001).

### 3.3.2 ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN EL LUGAR DE MUESTREO

Como se aprecia en la Tabla 3.4 y la Figura 3.6, las diferencias en nivel de antibiorresistencias observadas en los distintos puntos de muestreo son escasas lo que parece indicar que, lógicamente, la resistencia se introduce en la cadena alimentaria en granja y se mantiene estable (con un ligero descenso) en los otros dos puntos muestreados.

**TABLA 3.4. NÚMERO DE CEPAS CON ANTIBIORRESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ANALIZADOS SEGÚN EL LUGAR DE MUESTREO.**

Antibiótico	Granja			Matadero			Comercio		
	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.
NOR 10	17	7	19	18	3	21	6	4	16
OX 1	0	42	1	0	42	0	0	24	2
PB 300	7	2	34	26	3	13	9	8	9
SF 300	3	37	3	2	40	0	2	21	3
T 30	3	39	1	0	42	0	2	21	3
TY 30	0	42	1	0	42	0	0	24	2
CTX 30	3	0	40	4	1	37	2	3	21
KF 30	5	12	26	15	3	24	6	5	15

C 30	16	14	13	15	15	12	12	3	11
K 30	20	12	11	10	16	16	11	2	13
CIP 5	22	7	14	19	4	19	6	1	19
CD 2	0	42	1	0	42	0	2	24	0
E 15	0	42	1	0	42	0	0	24	2
GM 100	0	0	43	4	0	38	2	0	24
NE 30	8	7	28	5	1	36	3	0	23
S 25	6	35	2	5	36	1	0	19	7
TM 5	1	41	1	0	41	1	1	22	3
AP 25	4	34	5	7	34	1	4	18	4
ATH 15	2	39	2	6	35	1	2	21	3
NA 3	8	33	2	12	26	4	1	21	4

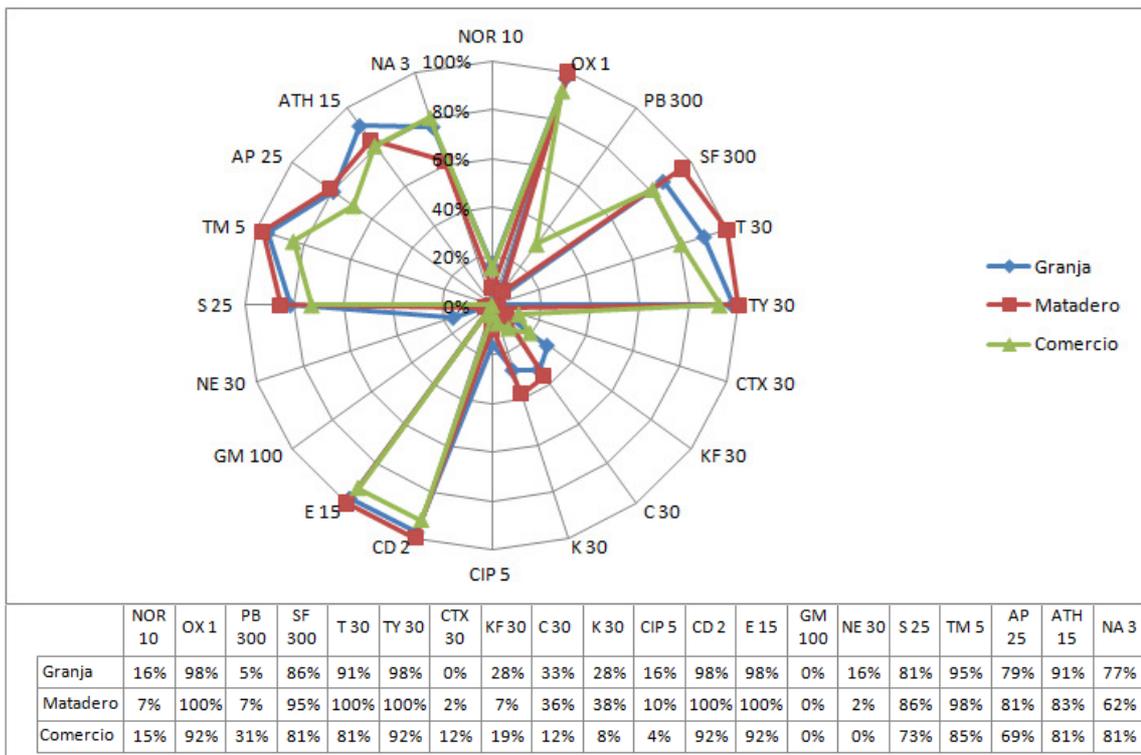


FIGURA 3.6. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL NIVEL DE ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN LUGAR DE MUESTREO PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS

Considerando todos los antibióticos empleados conjuntamente y las cepas aisladas según el punto de muestreo, la tasa de resistencia media hallada fue del 56,6% en granja, 55,7% en matadero y 51,0% en comercio minorista (Figura 3.3). Estos valores tienen una validez relativa ya que incluyen el conjunto de las antibiorresistencias sin especificar el tipo de antibiótico.

### 3.3.3 ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN LA ESTACIÓN DEL AÑO

En la Tabla 3.5 y la Figura 3.7 se representan los porcentajes de antibiorresistencia según la estación del año en la que se realizó el muestreo. También aquí las diferencias en nivel de antibiorresistencias observadas en los distintos puntos de muestreo son escasas lo que indicaría una estabilidad de las cepas a lo largo del año, y probablemente, que las prácticas de manejo (incluyendo el uso de antibióticos) se mantienen.

**TABLA 3.5. NÚMERO DE CEPAS CON ANTIBIORRESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ANALIZADOS SEGÚN LA ESTACIÓN DEL AÑO**

Antibiótico	Primavera			Verano			Otoño			Invierno		
	Sens. Int.	Resist.	Sensib.									
<b>NOR 10</b>	14	7	11	12	1	21	9	1	14	6	5	10
<b>OX 1</b>	0	32	0	0	32	2	0	24	0	0	20	1
<b>PB 300</b>	14	1	17	13	2	19	9	5	10	6	5	10
<b>SF 300</b>	4	25	3	3	31	0	0	22	2	0	20	1
<b>T 30</b>	3	26	3	2	32	0	0	24	0	0	20	1
<b>TY 30</b>	0	32	0	0	32	2	0	24	0	0	20	1
<b>CTX 30</b>	1	0	31	5	0	29	3	0	21	0	4	17
<b>KF 30</b>	8	6	18	8	5	21	6	4	14	4	5	12
<b>C 30</b>	12	11	9	19	5	10	7	8	9	5	8	8
<b>K 30</b>	10	9	13	17	4	13	9	8	7	5	9	7
<b>CIP 5</b>	13	8	11	14	1	19	14	1	9	6	2	13
<b>CD 2</b>	0	32	0	2	32	0	0	24	0	0	20	1
<b>E 15</b>	0	32	0	0	32	2	0	24	0	0	20	1
<b>GM 100</b>	3	0	29	1	0	33	1	0	23	1	0	20
<b>NE 30</b>	7	3	22	3	3	28	4	0	20	2	2	17
<b>S 25</b>	4	26	2	5	26	3	1	21	2	1	17	3
<b>TM 5</b>	2	29	1	0	31	3	0	24	0	0	20	1
<b>AP 25</b>	5	22	5	3	28	3	4	19	1	3	17	1
<b>ATH 15</b>	1	27	4	4	28	2	2	22	0	3	18	0
<b>NA 3</b>	3	27	2	11	17	6	5	18	1	2	18	1

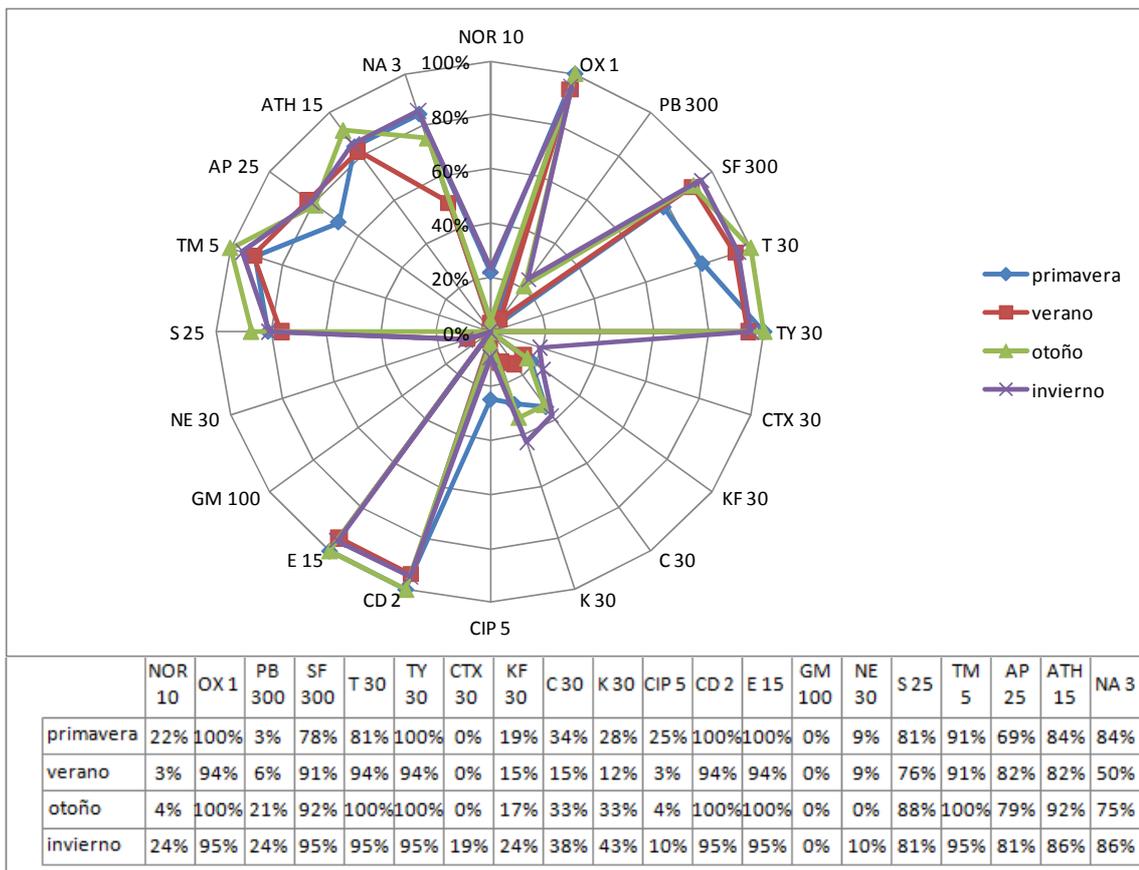


FIGURA 3.7. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL NIVEL DE ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN ESTACIÓN DEL AÑO PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS

Considerando todos los antibióticos empleados conjuntamente y las cepas aisladas según la estación del año, la tasa de resistencia media hallada fue del 55,5% en primavera, 50,3% en verano, 56,9% en otoño y 59,5% en invierno (Figura 3.3). Estos valores tienen una validez relativa ya que incluyen el conjunto de las antibiorresistencias sin especificar.

### 3.3.4 ANTIBIORRESISTENCIA EN FUNCIÓN DE LA ESPECIE MICROBIANA

Respecto a las dos especies del género *Campylobacter* identificadas y aisladas, los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 3.6 y la Figura 3.8. Se puede observar que las diferencias porcentuales en antibiorresistencia entre las dos especies son escasas para los antibióticos investigados.

TABLA 3.6. NÚMERO DE CEPAS CON ANTIBIORRESISTENCIA, SENSIBILIDAD Y SENSIBILIDAD INTERMEDIA PARA LOS 20 ANTIBIÓTICOS ANALIZADOS SEGÚN LA ESPECIE DE *CAMPYLOBACTER*

Antibiótico	<i>C. jejuni</i>			<i>C. coli</i>			<i>Campylobacter spp</i>		
	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.	Sens. Int.	Resist.	Sensib.
NOR 10	35	12	50	3	1	1	3	1	5
OX 1	0	95	2	0	5	0	0	8	1

<b>PB 300</b>	33	11	53	4	0	1	5	2	2
<b>SF 300</b>	6	85	6	0	5	0	1	8	0
<b>T 30</b>	4	89	4	0	5	0	1	8	0
<b>TY 30</b>	0	95	2	0	5	0	0	8	1
<b>CTX 30</b>	8	3	86	0	0	5	1	1	7
<b>KF 30</b>	23	20	54	2	0	3	1	0	8
<b>C 30</b>	38	28	31	3	1	1	2	3	4
<b>K 30</b>	36	26	35	2	1	2	3	3	3
<b>CIP 5</b>	40	11	46	3	1	1	4	0	5
<b>CD 2</b>	1	95	1	0	5	0	1	8	0
<b>E 15</b>	0	95	2	0	5	0	0	8	1
<b>GM 100</b>	4	0	93	1	0	4	1	0	8
<b>NE 30</b>	13	8	76	2	0	3	1	0	8
<b>S 25</b>	11	77	9	0	5	0	0	8	1
<b>TM 5</b>	2	91	4	0	5	0	0	8	1
<b>AP 25</b>	13	75	9	1	4	0	1	7	1
<b>ATH 15</b>	8	83	6	1	4	0	1	8	0
<b>NA 3</b>	19	69	9	2	3	0	0	8	1

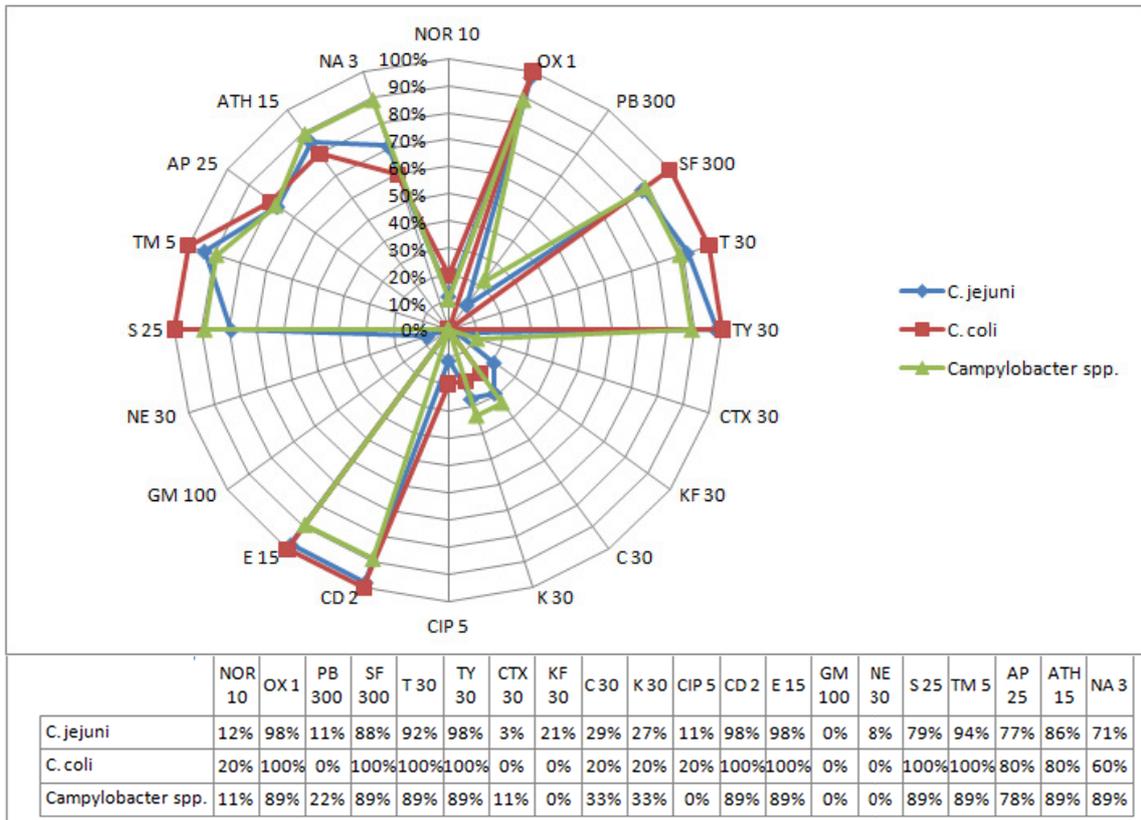


FIGURA 3.8. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL NIVEL DE ANTIBIORRESISTENCIA SEGÚN ESPECIE DE *CAMPYLOBACTER*

Considerando todos los antibióticos empleados conjuntamente y las cepas aisladas según la especie microbiana aislada, la tasa de resistencia media hallada fue del 55,1% en *C. jejuni*, 55,0% en *C. coli* y del 53,9% en *Campylobacter* spp. (Figura 3.3). Estos valores tienen una validez relativa ya que incluyen el conjunto de las antibiorresistencias sin especificar.

Considerando la batería total de antibióticos empleados y las cepas de *C. jejuni* analizadas se presentó una antibiorresistencia muy elevada (98%) frente a Oxacilina 1 (OX 1), Tilosina 30 (TY 30), Clindamicina 2 (CD 2) y Eritromicina 15 (E 15), seguidos por la Estreptomina 25 (S 25) (87,5%) y el 75% de Trimetoprim 5 (TM 5) y Amplicilina 25 (AP 25), o lo que es lo mismo, especialmente los macrólidos (E 15, TY 30), los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas: OX 1, AP 25) y las lincosamidas (CD 2).

Por su parte, y de modo similar al caso de *C. jejuni*, la sensibilidad más alta para *C. coli* se dio en el caso de la Cefotaxima 30 (CTX 30), Gentamicina 100 (GM 100) y la NE 100 (100%), es decir, principalmente un  $\beta$ -lactámico –cefalosporina de 3ª generación– (cefalosporina: Cefotaxima 30 (CTX 30)) y los aminoglucósidos (Gentamicina 100 (GM 100) y NE 100). Valores intermedios de sensibilidad antibiótica se obtuvieron para el caso de Norfloxacin 10 (NOR 10) (80%) y CIP 5 (80%), seguidos del 50% alcanzado por Cloramfenicol 30 (KF 30), Kanamicina 30 (K 30) y Cefalotina 30 (C 30) y por el 37,5% de

Polimixina B 300 (PB 300) y Sulfafurazol 300 (SF 300). Son por consiguiente más sensibles las cepas de *C. coli* a las quinolonas de 2ª generación (CIP 5 y Norfloxacin 10 (NOR 10)) y a compuestos de naturaleza variada como las cefalosporinas (Cefalotina 30 (C 30)) –un antibiótico  $\beta$ -lactámico-, aminoglucósidos (Kanamicina 30 (K 30)), cloramfenicol (KF 30), antibióticos polipeptídicos (Polimixina B 300 (PB 300)) y sulfamidas (SF 300).

A diferencia de los dos casos anteriores, para *Campylobacter* spp. no se presentó ante ningún antibiótico una resistencia del 100%, alcanzándose no obstante un 95,2% para el caso de OX 1, TY 30, CD 2, E 15, TM 5 y ATH 15. Ello supone un mayor porcentaje de presentación de antibiorresistencia para las dos últimas sustancias, en especial la azitromicina que en el caso de las dos especies termofílicas mayoritarias de *Campylobacter*. Por tanto, de modo análogo a los dos casos anteriores, los grupos antibióticos ante los que se presenta una mayor resistencia son fundamentalmente en el grupo de los macrólidos (E 15, TY 30), los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas: OX 1) y las lincosamidas (CD 2), a los que añadir un nuevo macrólido (Azitromicina 15 (ATH 15)) y el trimetoprim (TM 5).

Si comparamos los resultados obtenidos para las cepas aisladas de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter* spp. presentes en la Tabla 3.2 y la Tabla 3.6 con los obtenidos por otros autores, podemos efectuar las siguientes observaciones.

Para *Campylobacter jejuni*, en el Reino Unido, se detecta una baja resistencia en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en pollo frente a la eritromicina (1,8% frente a nuestro 100%), y tan solo un 4,9% en total (Jørgensen et al., 2002). Este mismo autor encontró una resistencia total (contabilizando cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. spp.*) del 13% frente a nuestro 30,3%. En Irlanda, donde junto con Dinamarca, Suecia, Finlandia y Austria, el suministro de antibióticos a los animales está por debajo de la media comunitaria, se encontraron en pollo de cría industrial menores tasas de resistencia frente a ampicilina (35,9%), tetraciclina (20,5%), ácido nalidíxico (20,5%), estreptomina (2,5%) y kanamicina (2,5%), pero mayor para la ciprofloxacina (17,9%) (Fallon et al., 2003). En Dinamarca, se encontró para cepas aisladas de muestras fecales de pollo de cría industrial tomadas en granja entre 1998 y 1999 una resistencia del 11,3% frente a las quinolonas (ácido nalidíxico y enrofloxacin) (Pedersen and Wedderkopp, 2003). Además de menores tasas de antibiorresistencia, y al contrario que en nuestro caso entre el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina, entre el equivalente de esta (enrofloxacin) y el ácido nalidíxico, se detectó homogeneidad en su resistencia frente a ambas sustancias (Pedersen and Wedderkopp, 2003). En productos de venta al consumidor (139 muestras de pollo, 39 de pavo, 2 de cerdo), se detectó, en cepas de *Campylobacter jejuni*, antibiorresistencia frente al ácido nalidíxico (8,5%) y a la eritromicina (2%). Para *Campylobacter coli* tales tasas ascendieron a un 29,6% frente al ácido nalidíxico y un 18,5% frente a la eritromicina (Engberg et al., 2004). En Bélgica, se

aislaron cepas procedentes de mataderos y salas de despiece de pollo de cría industrial, encontrando unas tasas de resistencia del 6,3% frente a la eritromicina, un 24,6% frente a la ampicilina, un 44,2% frente al ácido nalidíxico y a la ciprofloxacina, y un 34,4% frente a la tetraciclina, pero, al igual que en nuestro estudio, una sensibilidad del 100% a la gentamicina (Van Looveren et al., 2001). En Brasil, se investigó la antibiorresistencia de cepas de aisladas tanto de pacientes humanos (15) como de animales de abasto -porcino, ovino y pollo- (17) y de experimentación -mono rhesus y perro- (12). Entre las cepas de origen animal se detectaron menores tasas que en nuestro estudio para las cepas aisladas de pollo y avestruz: 27,3% a la sulfonamida 300µg, 0% a la norfloxacina, ciprofloxacina y eritromicina, 9,1% a la tetraciclina y 9,1% a la ampicilina 10µg (Aquino et al., 2002). En Australia, a partir de cepas aisladas de paciente humanos con diarrea y siguiendo el método de difusión en disco, se observó una baja resistencia del 3,3% a la eritromicina y del 15,5% a la tetraciclina. Por el contrario, para la ampicilina a 10µg, la resistencia observada fue del 96,6%, si bien para este antibiótico se recomienda emplear el método de la dilución en agar, con el que se observó una resistencia del 77% (Alfredson et al., 2003). En lo que respecta a España, trabajando en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en pollo, se halló un porcentaje de resistencia frente a la ampicilina del 47,4%, inferior a nuestro 70% (Sáenz et al., 2000). Además, en productos cárnicos de pollo, se detectó una resistencia frente a la tetraciclina del 65%, inferior, al revés que para el caso de *Campylobacter coli* a nuestro resultado.

Para *Campylobacter coli*, se han comparado estos datos con los ofrecidos por otros autores. En Italia, en términos generales y al revés que en nuestro caso, *C. coli* fue más resistente que *C. jejuni*, si bien para una batería de tan sólo 10 antibióticos (Pezzotti et al., 2003). En EE.UU., a diferencia de nuestro estudio, fue mayor la resistencia ofrecida por *C. coli* frente a la ciprofloxacina y la eritromicina que por *C. jejuni* (Ge et al., 2003). Esta mayor resistencia de *Campylobacter coli* frente a la ciprofloxacina que la presentada por *Campylobacter jejuni* ha sido también observada en el Reino Unido en cepas aisladas de pacientes humanos (Threlfall et al., 2000). En el Reino Unido, a diferencia de nuestros resultados, en los que la resistencia a la eritromicina fue de un 100% en cepas de *Campylobacter coli*, tan sólo se encontró un 56%, aún así sensiblemente mayor al 1,8% detectado en cepas de *Campylobacter jejuni* (Jørgensen et al., 2002). En Irlanda, se observó en cepas aisladas a partir de una planta de procesado resistencia frente a la ampicilina (9%) y la tetraciclina (18,2%), pero no frente al ácido nalidíxico, estreptomina, kanamicina y ciprofloxacina (Fallon et al., 2003). Salvo para la ciprofloxacina, son pues datos sensiblemente inferiores a los hallados en este trabajo. En Dinamarca, se encontró para cepas aisladas de muestras fecales de pollo de cría industrial tomadas en granja entre 1998 y 1999 una resistencia del 28,7% frente a las quinolonas (ácido nalidíxico y enrofloxacin) (Pedersen and Wedderkopp, 2003). Al contrario que en nuestro estudio, se detectaron mayores tasas

de resistencia frente a las quinolonas en cepas aisladas en *C. coli* que en aquellas aisladas de *C. jejuni* (Pedersen and Wedderkopp, 2003). Respecto a España, también Sáenz y colaboradores halló una mayor resistencia frente a la ampicilina en cepas de *Campylobacter coli* (90%) que de *Campylobacter jejuni* (47,4%), superior en todo caso a la diferencia observada en nuestro estudio (Sáenz et al., 2000). De modo igualmente análogo, para cepas aisladas en productos cárnicos de pollo, se observaron una resistencia del 90,9% frente a la tetraciclina (Sáenz et al., 2000). Debe destacarse por último la idéntica tasa de resistencia frente a la eritromicina presentada por *C. jejuni* y *C. coli*, cuando generalmente es mayor en *C. coli*, especialmente las cepas aisladas en cerdo (Cabrita et al., 1992; Van Looveren et al., 2001). Aún así, otros autores han encontrado el fenómeno inverso (Fallon et al., 2003).

La mayor resistencia frente a los antibióticos de *Campylobacter coli* respecto a *Campylobacter jejuni* a pesar de su menor número de aislamientos, ha sido también observada en cepas aisladas de pacientes humanos, lo que pone de relieve su manifiesta importancia. Esta realidad ha sido observada en diversos estudios realizados en múltiples regiones geográficamente distantes. En España, los estudios de Prats así lo corroboran (Prats et al., 2000).

Para ***Campylobacter spp.*** algunos autores han efectuado igualmente estudios de antibiorresistencia en cepas de *Campylobacter spp.* sin diferenciación a nivel de especie, aunque presumiblemente, dado el origen de su aislamiento (pollo) sean mayoritariamente de *C. jejuni* y, en menor medida, *C. coli*. En este sentido, son varios los estudios centrados en las quinolonas, y en especial en la ciprofloxacina. Así, en Holanda, se encontró en efluentes de matadero de pollo resistencia frente a las fluoroquinolonas (28% a la enrofloxacin y 50% al ácido nalidíxico) (Koenraad et al., 1995a). Frente a la ciprofloxacina en productos procedentes del pollo, Endtz y colaboradores detectaron en 1998 una resistencia del 8,4% (cuando 6 años antes era del 0%) y del 14% en 1989, cifra próxima a nuestro actual 14,3% (Endtz et al., 1990). En el Reino Unido, se han realizado estudios de resistencia frente a las quinolonas, habiendo detectado ya en 1991 un 4,1% resistentes a la ciprofloxacina (Gaunt and Piddock, 1996). Detectó además que todas las cepas aisladas de muestras de pollo o humanas eran resistentes a la ciprofloxacina, norfloxacina, esparfloxacina y tosufloxacina, existiendo además una asociación entre la resistencia a las fluoroquinolonas y el incremento en la concentración inhibitoria mínima (MIC) de la tetraciclina. También en EE.UU. se ha detectado resistencia frente a las quinolonas, en especial frente a la ciprofloxacina (Zirnstein et al., 1999). Smith *et al* detectó en muestras tomadas de pollo un 14% de cepas de *Campylobacter* resistentes a la ciprofloxacina (Smith et al., 1999). Por su parte, en cepas aisladas en un matadero de pollos de cría industrial se detectó una resistencia del 50%, 58,3%, 50%, 41,7% y 90,9% frente al ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ampicilina, eritromicina y tetraciclina respectivamente (Sánchez et al., 2002). No obstante, salvo para este último caso, las

tasas de resistencia máximas indicadas fueron detectadas en cepas procedentes de canales refrigeradas por inmersión en agua, superiores a las detectadas en cepas procedentes de canales refrigeradas por aire (Sánchez et al., 2002). Incluso en países como Suecia, que como se ha visto tiene un muy estricto control de empleo de antibióticos en producción animal, para cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de pacientes humanos se detectó ya a finales de la década de los 80 una resistencia del 0,7% frente a la ciprofloxacina, de un 1,4% frente a la norfloxacina y de un 7,3% frente a la eritromicina (Sjogren et al., 1992).

### 3.3.5 METODOLOGÍA

Existen diversas variaciones respecto al método seguido en este trabajo desarrolladas por otros autores. Algunos autores sustituyen el suplemento de un 5% de sangre desfibrinada ovina por un 5% de sangre desfibrinada bovina, con resultados comparables (Aarestrup et al., 1997). También se describen otros medios nutritivos de crecimiento generales distintos del Mueller-Hinton, tales como el Columbia Blood Agar Base (Oxoid) suplementado con un 5% (v/v) de sangre desfibrinada de caballo (Oxoid), obteniéndose resultados satisfactorios (Martin et al., 2002). En cualquier caso, el medio de Mueller-Hinton es un medio de crecimiento general empleado con otros microorganismos de otros orígenes o especies animales, como por ejemplo *Micrococcus luteus* aislados de pescado (Ellerbroek et al., 1997).

El método estándar de Kirby-Bauer requiere que las determinaciones se realicen a las 18 horas al ser el período de máximo metabolismo bacteriano y con máxima actividad antibiótica. Incluso aquellas especies de crecimiento más lento se han desarrollado en 18 horas lo suficiente como para poder efectuar una determinación correcta. Además, la concentración inhibitoria mínima (CIM) por sí misma no aporta datos de gran valor clínico. Dichos datos sí resultarían útiles cuando son interpretados en función de las concentraciones que el fármaco puede alcanzar en el interior del organismo. Así, una CIM determinada indicará tan solo que el microorganismo sería muy susceptible, cuando las concentraciones que el compuesto puede alcanzar *in vivo* estuvieran varias veces por encima de esa CIM, lo cual, en función de la sustancia en concreto de que se trate, se mantendrá por más o menos tiempo durante el intervalo interdosis. Por otra parte, existen alternativas al empleo de los métodos de difusión en disco, como los sistemas fotométricos de dilución y medición de la densidad óptica, pero los test de susceptibilidad antimicrobiana para *Campylobacter* spp. no están estandarizados y el método de la dilución en agar es el método de referencia (Gaudreau and Gilbert, 1998). No obstante, el método de difusión de disco puede ser un método conveniente y fiable (Gaudreau and Gilbert, 1997) y sus resultados pueden ser útiles como estudios de monitorización de resistencias, en especial para aquellos géneros bacterianos en los que el método de difusión en disco no está recomendado (*Brucella* spp., *Helicobacter pylori*, y *Legionella* spp.).

Un factor de importancia lo constituye la selección de los medios de cultivo para el estudio de la antibiorresistencia siendo importante la composición en antibióticos de los medios empleados en el aislamiento y en la determinación de los perfiles de antibiorresistencias (Preston *Campylobacter* Selective Enrichment Broth (PEB), Preston *Campylobacter* Selective Agar (PA) y Modified *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base). Respecto a este último (CCDA o m-CCDA), su idoneidad debida a una mayor especificidad con las especies bacterianas cuyo crecimiento permiten se ve apoyada por estudios (Corry and Atabay, 1997) frente a otros medios como por ejemplo el Cefoperazone, Amphotericin, Teicoplanin agar (CAT). Se restringe el crecimiento de especies microbianas acompañantes. Sin embargo, la presencia de antibióticos en la composición de los medios selectivos puede ofrecer problemas debido a su potencial toxicidad para las células de mamíferos. Por esta razón, en ocasiones se pueden sustituir determinados antibióticos por otros sin tales inconvenientes y con idénticas ventajas. Es el caso por ejemplo de la sustitución de la cicloheximida por anfotericina B como antifúngico alternativo en medios selectivos para *Campylobacter* (Martin et al., 2002).

En segundo lugar, fue necesario elegir el método de determinación de resistencia frente a los antibióticos más adecuado para nuestro estudio. La difusión por disco de papel fue el método de elección por simplicidad y economía. El fundamento de esta técnica consiste en el crecimiento simultáneo del microorganismo cultivado en placa de Petri y la difusión del antibiótico en el disco de papel, con un gradiente de dilución, por lo que a mayor distancia alcanzada, menor concentración presente. Así, a determinada distancia del disco de papel, la dilución del antibiótico no logra inhibir el crecimiento bacteriano, surgiendo un halo visible de inhibición circular. El diámetro de dicho halo será directamente proporcional a la potencia del antibacteriano frente al microorganismo bacteriano en cuestión, e inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antimicrobiano. No obstante, el diámetro del halo de inhibición depende también de las características físico-químicas de cada antibiótico (velocidad de difusión en el agar in vitro), y no tienen por qué estar correlacionadas con la actividad del antibiótico in vivo. Se trata, pues, de un resultado cualitativo (microorganismo sensible o resistente), o en el mejor de los casos semi-cuantitativo, que nos dirá si el microorganismo es sensible, de sensibilidad intermedia o resistente.

De los resultados reflejados en las tablas, se pueden extraer varias conclusiones. Teniendo en cuenta el corto ciclo vital del pollo en sus dos orientaciones zootécnicas (siempre inferior a la duración de una estación climatológica), pudiera inferirse un mayor suministro de antibióticos en las estaciones más frías (otoño y fundamentalmente invierno), lo que se correspondería con la mayor antibiorresistencia observada en dicho periodo. En el caso de los avestruces, dicha distribución estacional no obedece la tendencia observada para el caso del pollo. Ello pudiera deberse a la

gran resistencia natural de esta especie a las condiciones medioambientales, lo que facilita su cría y reduce el empleo de antibióticos, y en segundo lugar, al menor grado de intensificación productiva en la cría de avestruces con respecto a la avicultura tradicional, que emplea menos sustancias antibióticas.

Sin embargo, tampoco se han de obviar los datos totales referentes a la resistencia observada, elevándose en avestruz a un 46,2% de las pruebas efectuadas, frente a los 57,0% del pollo de cría industrial y 58,3% del pollo de cría ecológica. Este dato revelaría la mayor resistencia natural del avestruz respecto al pollo y el menor grado de intensificación productiva en esta forma de avicultura.

La antibiorresistencia múltiple a distintas sustancias es también observada por otros autores (Ge et al., 2003). En carne de aves en establecimientos minoristas, un 13% de los aislamientos de *Campylobacter* presentaba multirresistencias (Jørgensen et al., 2002). También se observó resistencia múltiple entre un 1,3% y un 7,7% en cepas de *Campylobacter jejuni* frente a una batería de hasta cinco antibióticos (Fallon et al., 2003). Definiendo la multirresistencia como la presentada a cuatro ó más antibióticos, se observó en el 7,6% de las cepas de *C. jejuni* y el 17% de *C. coli* (Van Looveren et al., 2001). Se halló una menor tasa de resistencia múltiple frente al ácido nalidíxico (una quinolona) y la eritromicina (un macrólido), presentándose tan sólo en el 0,7% de las cepas de *Campylobacter jejuni* y en el 3,7% de las cepas de *Campylobacter coli* (Engberg et al., 2004). Ello constituye un hecho indeseable, sobre todo en los casos en los que existe resistencia cruzada a dos o más de los antibióticos de elección frente a la campilobacteriosis. Es el caso de la resistencia cruzada entre macrólidos y fluoroquinolonas, por ser empleados en el tratamiento estándar de la campilobacteriosis (Engberg et al., 1999) y estar ambos grupos considerados como de primera y segunda línea en el tratamiento de la campilobacteriosis (Engberg et al., 2001). Algunos estudios realizados en pacientes humanos han revelado altas tasas de resistencia múltiple, como el 100% hallado en Tailandia entre la azitromicina y la ciprofloxacina a lo largo de dos años de vigilancia (Hoge et al., 1995).

A la vista de los resultados presentados, se debe hacer hincapié en las opciones de control disponibles: un uso prudente de los antibióticos y el control de las infecciones por medidas variadas. La limitación del uso de macrólidos y fluoroquinolonas en animales de abasto, a ocasiones en las que no se dispone de otras opciones terapéuticas y por supuesto su erradicación de las prácticas de promoción del crecimiento. En el ámbito de la vigilancia epidemiológica de la antibiorresistencia presentada por *Campylobacter* es necesario avanzar en la armonización y estandarización de la metodología empleada en la Unión Europea (Bronzwaer et al., 2009; Greenwood, 2000; Wray and Gnanou, 2000). Se permitiría la comparación de los resultados entre los distintos países y se establecería la base para un informe de alcance comunitario. Además, dicho informe debería completarse con los datos

relativos al consumo de antibióticos en cada estado miembro en el ánimo de evaluar el impacto del empleo de cada sustancia en el desarrollo de antibiorresistencias. Sin embargo, algunos autores sostienen que en el ámbito internacional, salvo para la necesaria comunicación de los datos entre países, no sería estrictamente necesario uniformar universalmente las metodologías empleadas (Greenwood, 2000). Sería innecesario imponer tal uniformidad cuando diferencias organizacionales requieren soluciones diferentes para la consecución de un servicio microbiológico fiable (Greenwood, 2000).

## 4 CAPÍTULO IV. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADA DE FOURIER PARA LA CLASIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER* TERMOFÍLICOS

### 4.1 INTRODUCCIÓN

La identificación y tipado de microorganismos patógenos puede contribuir significativamente al estudio de las fuentes y rutas de contaminación en los distintos eslabones de la cadena alimentaria, a la evaluación de las medidas de control de microorganismos patógenos y a la vigilancia y monitorización epidemiológicas de las enfermedades transmitidas por alimentos. El empleo de metodologías de tipificación está orientado a la atribución de enfermedades infecciosas como las gastroenteritis transmitidas por alimentos (Batz et al., 2005; Havelaar et al., 2007). La atribución se basa en la comparación de los subtipos causantes de enfermedad con aquellos aislados de diferentes orígenes (animales, alimentos, etc.). La tipificación conlleva la caracterización por sistemas fenotípicos o genotípicos que permiten detectar pequeñas diferencias entre tipos bacterianos pertenecientes a la misma especie (por ejemplo, serotipado, fagotipado, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR), PFGE o tipado basado en secuencias nucleotídicas, como el multi-locus sequence typing (MLST). En las últimas décadas se han desarrollado enormemente los procedimientos basados en el análisis de perfiles nucleicos y secuencias nucleotídicas y aún existe espacio para la investigación de métodos fenotípicos alternativos, con propiedades adecuadas en cuanto a sensibilidad y capacidad de tipado a nivel de subespecie. Para *Campylobacter* spp. la búsqueda de un método de tipificación adecuado se ha visto obstaculizada por la naturaleza del patógeno, al consistir de innumerables clones con una relación más o menos estrecha con un reservorio animal.

#### 4.1.1 EMPLEO DE LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La espectroscopía de infrarrojos se ha aplicado con éxito a la identificación y clasificación de microorganismos tanto a nivel de especie como de subespecie. En 1950 varios investigadores (Goulden and Sharpe, 1958; Riddle et al., 1956; Thomas and Greenstreet, 1954) identificaron bacterias acidolácticas utilizando determinadas longitudes de onda dentro del espectro infrarrojo (IR) medio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ). Desde 1990, se ha avanzado en el desarrollo de los espectrómetros interferométricos IR y las técnicas de transformada de Fourier. Desde las publicaciones pioneras de Naumann y colaboradores (Naumann et al., 1991), la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) se ha empleado en la caracterización microbiana y clasificación (Mariey et al., 2001). Desde 2001, se han estudiado otros grupos y géneros bacterianos, como *Lactobacillus* (Curk et al., 1994b; Oust et al., 2004a; Oust et al., 2004b), *Carnobacterium* (Lai et al., 2004), *Bacillus* (Beattie et al., 1998), *Brucella*

(Miguel Gomez et al., 2003), *Acinetobacter* (Winder et al., 2004), levaduras (Kummerle et al., 1998; Sandt et al., 2003), enterococos (Goodacre et al., 1996; Guibet et al., 2003; Kirschner et al., 2001); coryneformes (Maquelin et al., 2003; Oberreuter et al., 2002), *Burkholderia cepacia* (Coutinho et al., 2009), actinomicetes (Zhao et al., 2004), y especies termofílicas de *Campylobacter* (Mouwen et al., 2005; Mouwen et al., 2006). Esta técnica también se ha empleado como complemento a la investigación taxonómica por su capacidad de detectar la composición de estructuras básicas en Sistemática bacteriana como la pared y la membrana celular (Amiel et al., 2001; Bosch et al., 2000; Guibet et al., 2003; Winder et al., 2004). Por último, se ha empleado en la detección de cambios moleculares que se producen en las células microbianas ante modificaciones en el medio ambiente, que provocan respuestas celulares de adaptación a las condiciones circundantes (Álvarez-Ordóñez et al., 2010; Curk et al., 1994a; Ede et al., 2004; Moen et al., 2009; Papadimitriou et al., 2008). Esto es debido a que la exposición bacteriana a condiciones subletales puede conducir a cambios en las estructuras celulares y en las moléculas que se reflejan en el espectro IR.

#### 4.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECTROSCOPÍA DE IR DE UTILIDAD EN TAXONOMÍA

La radiación infrarroja en la región media del espectro IR es capaz de excitar determinados grupos moleculares, lo que provoca la absorción de esta radiación, produciendo vibración molecular en longitudes de onda específicas en forma de alargamiento, torsión o rotación de los enlaces interatómicos. Las moléculas muestran movimientos moleculares de estiramiento (stretching), y flexión (bending) (Figura 4.1), en diferentes rangos del espectro infrarrojo medio, y estos movimientos están asociados a cambios discretos en los niveles de energía. Si una muestra se irradia con un espectro continuo de luz IR, se obtiene una banda de absorción de resonancia característica (Figura 4.2). Las células microbianas purificadas tienen grupos químicos muy diversos (incluidos en ácidos grasos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, compuestos mayoritarios presentes) y su espectro IR se compone de un grupo denso de bandas de absorción con contornos anchos, complejos y solapados, en vez de picos diferenciados como ocurre en sustancias unimoleculares.

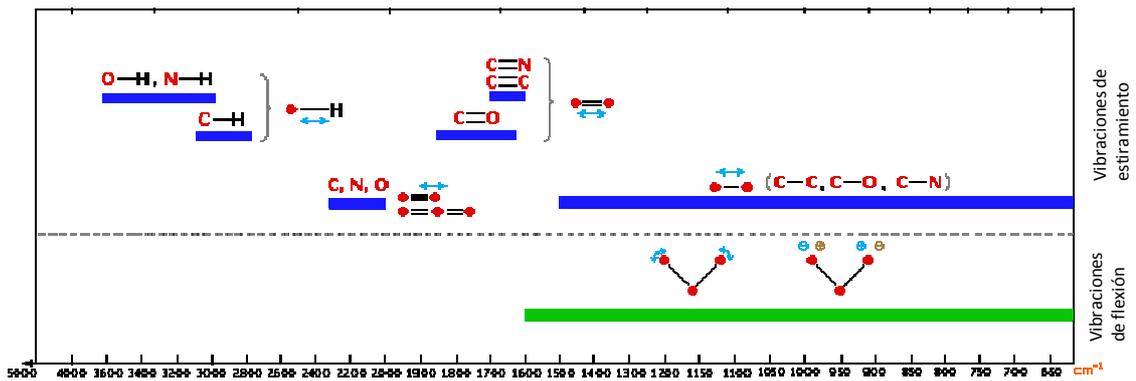


FIGURA 4.1. VIBRACIONES DE ESTIRAMIENTO Y DE ALARGAMIENTO DE DIVERSOS GRUPOS QUÍMICOS EN EL ESPECTRO IR AL SER EXCITADOS POR LA RADIACIÓN INFRARROJA.

Estos espectros pueden analizarse matemáticamente para desvelar las diferencias químicas entre muestras, lo que a su vez desvela las diferencias existentes en estructura y composición de los microorganismos. El espectro IR puede subdividirse en ventanas o regiones espectrales, cada una de ellos con propiedades características y modelos de absorción (Figura 4.2).

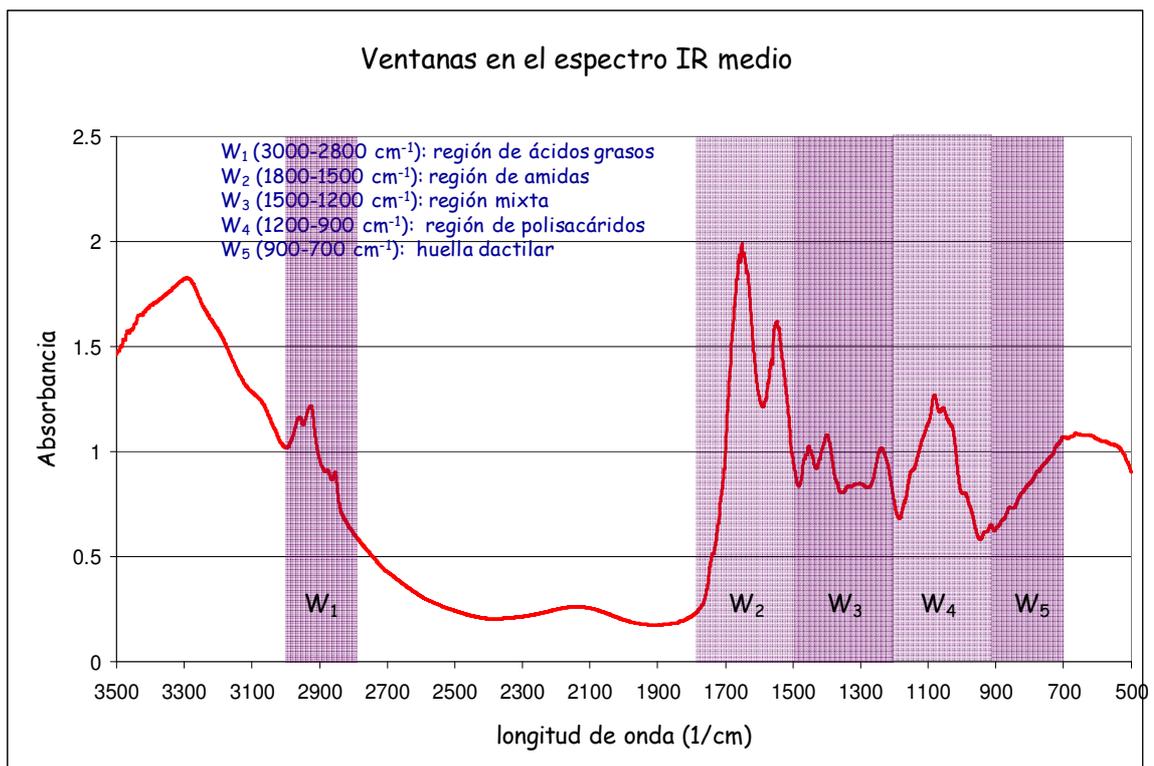


FIGURA 4.2. ESPECTRO DE ABSORBANCIA EN LA REGIÓN DEL INFRARROJO MEDIO OBTENIDO DE BIOMASA DE CÉLULAS PURIFICADAS DE *CAMPYLOBACTER* MOSTRANDO LAS CINCO VENTANAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN (W<sub>1</sub>-W<sub>5</sub>).

Las ventanas o rangos con más poder discriminante se incluyen en la Figura 4.2 y son las siguientes (Naumann et al., 1991):

- $w_1$  (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ): esta región IR se caracteriza por la absorción predominante de los grupos moleculares presentes en ácidos grasos.
- $w_2$  (1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ): en esta región IR los grupos amida pertenecientes a proteínas y péptidos son mayoritarios.
- $w_3$  (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ): región mixta, en la que hay influencia de proteínas, ácidos grasos y otros compuestos que contienen fosfato.
- $w_4$  (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ): es la región en que absorben mayoritariamente compuestos químicos presentes en los polisacáridos.
- $w_5$  (900-700  $\text{cm}^{-1}$ ): denominada “huella dactilar verdadera”, con patrones de absorción muy específicos, característicos a nivel de especie.

Dentro de las ventanas, hay determinados picos que se corresponden con la absorción mostrada por grupos químicos concretos (Naumann, 2000), (Tabla 4.1).

**TABLA 4.1. ASIGNACIÓN DE ALGUNAS BANDAS ENCONTRADAS FRECUENTEMENTE EN EL ESPECTRO IR.**

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
<b>2959-2852</b>	CH, $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$ en ácidos grasos
<b>1655-1637</b>	Bandas amida I
<b>1548</b>	Banda amida II
<b>1515</b>	Deformación C-H de $\text{CH}_2$
<b>1468</b>	Banda de metileno ( $\text{CH}_2$ )
<b>1310-1240</b>	Banda amida III de proteínas
<b>1250-1220, 1084-1088</b>	$\text{PO}_2$ estiramiento de fosfodiésteres
<b>1200-900</b>	C-O-C, C-O de polisacáridos
<b>720</b>	C-H flexión asimétrica de $\text{CH}_2$
<b>900-700</b>	Huella dactilar

#### 4.1.3 UTILIDAD DE LA ESPECTROSCOPÍA DE IR COMO MÉTODO DE TIPADO

Las diferencias taxonómicas entre los microorganismos (a nivel de género, especie y subespecie) tienen lógicamente un trasfondo químico, y se deben a cambios en la composición química de las estructuras celulares. Esas diferencias en composición (por variaciones en la composición de proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono) de células microbianas se reflejan por tanto en el espectro IR. El resultado es que los espectros IR pueden ser considerados como una huella digital microbiana característica. Las diferencias en composición entre bacterias, incluso de mínimo alcance taxonómico, pueden apreciarse en la intensidad y posición de las bandas de absorción, por medio del apropiado tratamiento matemático. Este tratamiento

(conocido como pre-tratamiento) comprende generalmente operaciones matemáticas como normalización, alisado (smoothing), derivatización e interpolación de los datos espectrales, y persigue la reducción de variabilidad debida a la obtención y manipulación de la muestra (cultivo de las cepas, preparación de la muestra, variabilidad en la medición del espectro). Si el pre-tratamiento es correcto, las diferencias que se detecten en el espectro IR serán debidas a diferencias en la composición química entre las muestras y podrán tener significación taxonómica. La automatización en el tratamiento de los datos es necesaria y se consigue mediante el empleo de espectrómetros interferométricos, potentes ordenadores y software de análisis multivariante. Otras ventajas son la capacidad en número de muestras procesadas y el coste por muestra analizada. Asimismo, pueden obtenerse mediciones de todos los microorganismos, permitiendo tipificar todas las bacterias.

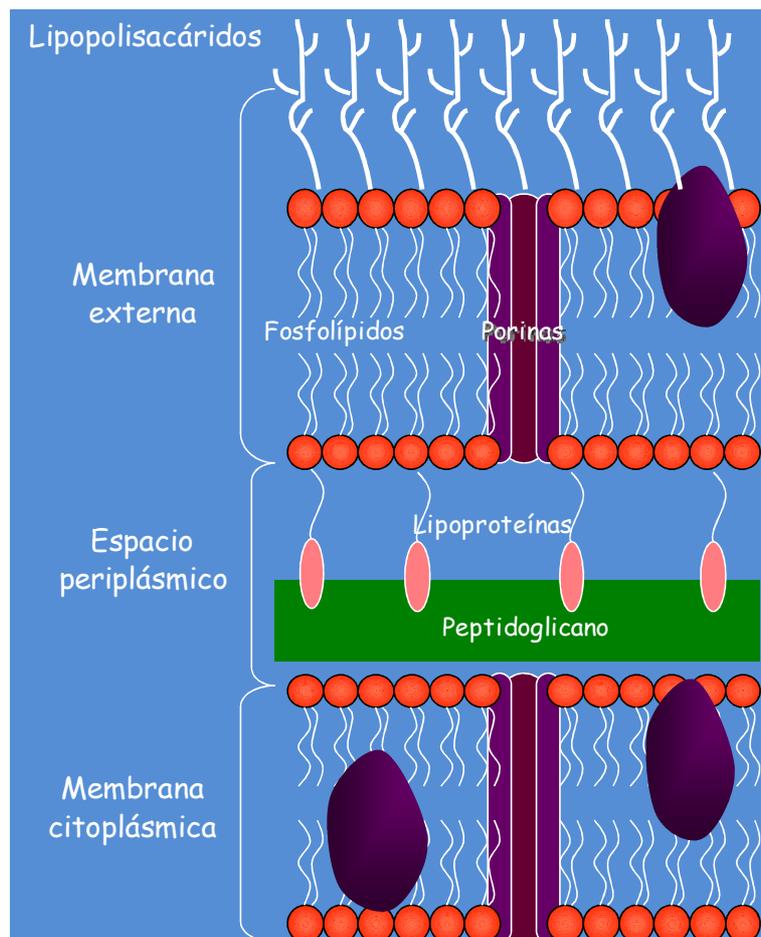
#### 4.1.4 COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR EN RELACIÓN A LOS CAMBIOS MEDIOAMBIENTALES Y LAS DIFERENCIAS TAXONÓMICAS

La membrana celular en bacterias Gram-negativas (Figura 4.3) puede variar su composición en función del medio ambiente que le rodea. Esta membrana celular está compuesta de una membrana citoplásmica, el periplasma,

una fina capa de peptidoglicano y una membrana exterior, donde se localizan los factores antigénicos como el lipopolisacárido (LPS) y donde se asientan las proteínas de la membrana exterior (porinas, entre otros). Las funciones que realizan son numerosas como actuar de barrera osmótica, en el transporte, biosíntesis, transferencia de energía, y servir de punto de anclaje de proteínas, el lipopolisacárido (LPS) y flagelos.

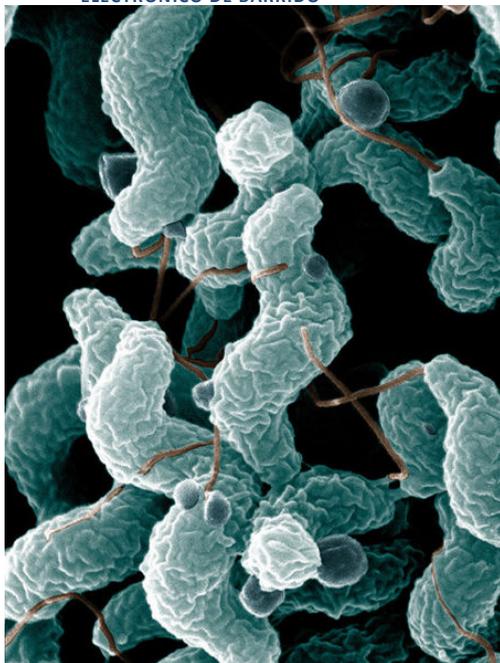
El peptidoglicano

FIGURA 4.3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS



presente es muy fino y con un bajo grado de entrecruzamiento con una baja cantidad de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). El LPS se ancla en la membrana externa y es un glicolípido de composición anfifílica y heterogénea que se encuentra anclado en la cara externa de la membrana. Está formado por tres dominios unidos covalentemente: el lípido A (endotoxina), asociado con la actividad endotóxica y la base de su estructura es un disacárido (D-glucosamina). Por su parte, el núcleo (core) aporta a la membrana externa la capacidad de barrera para ciertas sustancias como antimicrobianos. Por último, la fracción antigénica (antígeno O) del LPS está compuesta de un oligosacárido con alta variabilidad estructural, formado por unidades repetitivas de azúcares diferentes, algunos comunes (glucosa, heptosa, galactosa,

FIGURA 4.4. IMAGEN DE *CAMPYLOBACTER* SPP. TOMADA MEDIANTE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO



glucosamina, etc.), y otros encontrados poco frecuentemente (deoxihexosas y 3,6-dideoxihexosas).

Durante la incubación de células de *Campylobacter jejuni*, se producen cambios estructurales típicos, visibles con el microscopio óptico, y apreciables en la forma de las células (Buck et al., 1983). El prolongamiento de la incubación se traduce generalmente en situaciones de escasez o deficiencia de nutrientes y este hecho acelera la aparición de células cocoides (Moran and Upton, 1987; Tangwatcharin et al., 2006). Se ha visto que no existe apenas cambio en los perfiles de proteínas presentes en la

membrana celular (Hazeleger et al., 1995), pero sí se ha observado un cambio en el perfil de ácidos grasos dependiente de la temperatura de incubación, fenómeno que es común a otros microorganismos. Bacterias como *Salmonella Typhimurium* y *S. Enteritidis* modulan la composición de su pared celular en respuesta a cambios en la temperatura de crecimiento, y especialmente el perfil de ácidos grasos de la membrana celular (Álvarez-Ordóñez et al., 2008). Por ejemplo, se ha observado que la transición desde las formas espirales a cocoides (común en cultivos en caldo viejos) se traduce en variaciones en algunos componentes químicos de la membrana celular, mientras otros permanecen estables (Amano and Shibata, 1992).

#### 4.1.5 TRANSFORMACIÓN DEL ESPECTRO IR Y PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN

Los espectros IR pueden ser considerados como una huella digital característica de cada microorganismo, y su análisis matemático persigue desvelar las diferencias químicas entre muestras (Naumann et al., 1988). Las diferencias en los espectros IR se detectan en la intensidad y posición de las bandas de absorción y se traducen en diferencias taxonómicas entre las bacterias (Helm et al., 1991). El pretratamiento o transformación matemática busca la reducción de la variabilidad metodológica e incluye operaciones como normalización, alisado y derivatización. Posteriormente los espectros se comparan mediante coeficientes de distancia (Pearson, distancia euclídea) y se agrupan mediante técnicas multivariantes como el análisis cluster o análisis de componentes principales. El análisis cluster permite realizar una clasificación de elementos o taxones sin conocer de antemano las relaciones taxonómicas entre los microorganismos estudiados. Por ello es empleado frecuentemente en Sistemática bacteriana para detectar grupos de cepas en base a las semejanzas en su fenotipo o genotipo (Álvarez-Ordóñez et al., 2010; Blaser et al., 1983; Callicott et al., 2008; Gibson et al., 1997). Es un procedimiento no supervisado (a diferencia de otros análisis como el análisis discriminante que obliga a una preclasificación previa) que permite definir la similitud entre espectros IR. El análisis consta de dos pasos que consisten en el cálculo de similitudes entre los elementos a estudio y el agrupamiento de los elementos (Helm et al., 1991). Como complemento del análisis cluster se ha ensayado el análisis de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA), que busca reducir la multidimensionalidad de un conjunto complejo de datos como el espectro IR, pero mostrando las relaciones entre los elementos a clasificar al mantener la variabilidad subyacente (Goodacre, 1996). Para ello, empleando la matriz de covarianza o la de coeficientes de correlación obtenidas mediante transformación lineal, se representan las variables a clasificar en un nuevo sistema de coordenadas incorporando en el primer eje (Primer Componente Principal) la varianza de mayor tamaño; en el segundo eje, la segunda varianza más grande y así sucesivamente. Aunque se reduce la dimensionalidad del grupo de datos, se mantienen aquellos atributos del conjunto de datos que más contribuyen a su variabilidad.

#### 4.1.6 OBJETIVOS DEL TRABAJO

La búsqueda de procedimientos de tipado viene dada por la necesidad de información epidemiológica sobre la diseminación microbiana en el espacio (a lo largo de la cadena alimenticia) y el tiempo (diferencias estacionales), sobre diferencias encontradas entre cepas epidémicas y endémicas, sobre la diseminación de células viables, no cultivables, o sobre las fuentes de contaminación en un brote concreto. Además, en el diagnóstico clínico, es preciso disponer de métodos fiables, rápidos y altamente discriminatorios para la diferenciación de *C. jejuni*, *C. coli* y las otras especies termofílicas. Se necesita

información adicional sobre el papel jugado en la epidemiología por las células viables no cultivables. También, la clasificación y tipado de cepas permitirá estudios de patogenicidad y estudios de cepas antibiorresistentes. El objetivo global del trabajo ha sido emplear la técnica de espectroscopía FT-IR para comprobar su eficacia como herramienta de tipificación y diferenciación de cepas de *Campylobacter* spp.

## 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

En la Figura 4.5 se presenta el protocolo seguido en el que se incluyen las etapas de preparación y análisis de las muestras, así como el pretratamiento y análisis y los parámetros de comparación y agrupamiento.

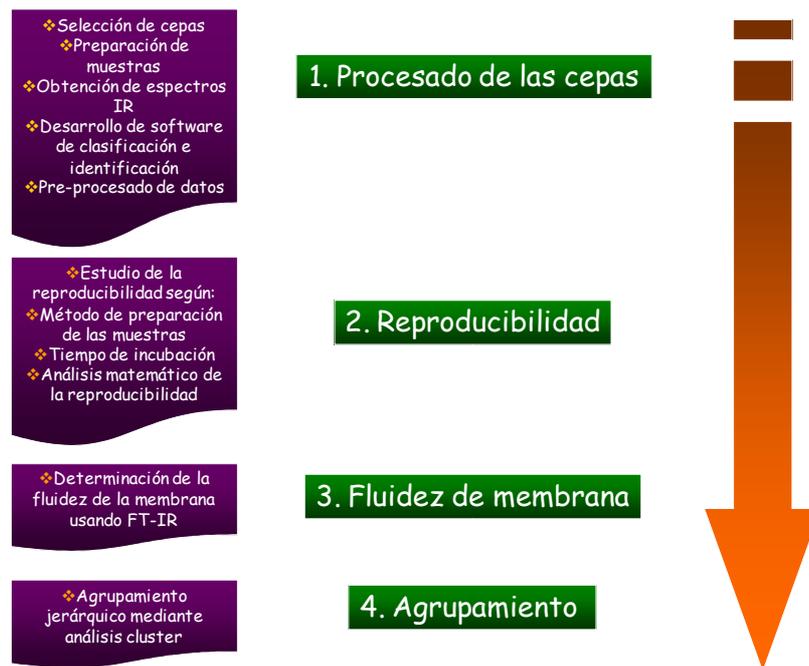


FIGURA 4.5. PASOS SEGUIDOS EN LA PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE CLASIFICACIÓN

### 4.2.1 CEPAS SELECCIONADAS

Se seleccionaron 68 cepas de *Campylobacter* spp. que agrupaban aislamientos recogidos en diferentes puntos de la cadena alimentaria, producciones animales y estación del año. Debido al distinto número de cepas aislado, la distribución no fue homogénea y los aislamientos procedentes de granja y matadero eran más numerosos así como las cepas procedentes de broiler (Figura 4.6). La relación completa de las cepas seleccionadas, junto con la información de su lugar de aislamiento, el animal y la estación del año en que fueron recogidas, se presentan en la Tabla 4.2.

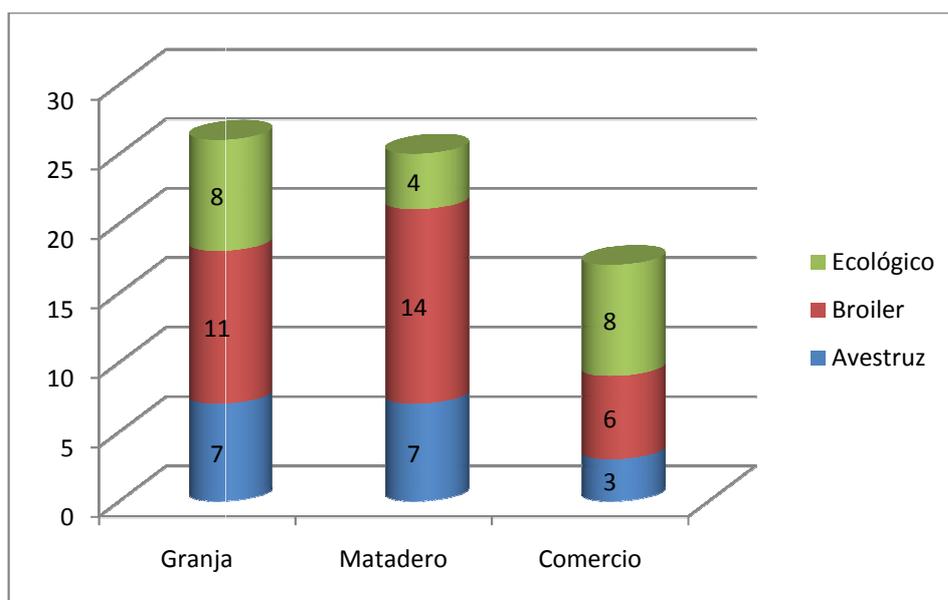


FIGURA 4.6. DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO DE LOS ESPECTROS INFRARROJOS SEGÚN LUGAR DE OBTENCIÓN Y PRODUCCIÓN DE PROCEDENCIA

TABLA 4.2. RELACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO TAXONÓMICO EN BASE AL ESPECTRO IR, CON LA INFORMACIÓN DE SU LUGAR DE AISLAMIENTO, EL ANIMAL, LA ESTACIÓN DEL AÑO EN QUE FUERON RECOGIDAS.

Nº Cepa	Lugar	Lugar2	Animal	Estación	Selec. método	Selec. tiempo
4	Comercio	Muslo	Ecológico	Invierno		
6	Comercio	Muslo	Ecológico	Invierno		
10	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera	*	*
11	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera		
12	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera	*	*
13	Comercio	Muslo	Ecológico	Otoño		
15	Comercio	Muslo	Ecológico	Primavera	*	*
17	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Verano	*	*
24	Matadero	Hígado	Broiler	Verano		
25	Matadero	Hígado	Ecológico	Otoño	*	*
28	Matadero	Jaula	Broiler	Primavera		
32	Matadero	Jaula	Broiler	Invierno	*	*
33	Matadero	Agua de escaldado	Broiler	Otoño		
36	Matadero	Jaula	Broiler	Verano	*	*
38	Comercio	Filete	Ecológico	Verano	*	*
40	Granja	Heces	Ecológico	Primavera	*	*
42	Granja	Polvo y camas	Ecológico	Primavera		
46	Granja	Polvo y camas	Broiler	Primavera		
47	Granja	Botas	Broiler	Primavera		
55	Granja	Heces	Broiler	Verano		

57	Granja	Heces	Ecológico	Verano		
62	Granja	Heces	Broiler	Verano	*	*
64	Granja	Botas	Broiler	Verano		
71	Granja	Heces	Avestruz	Verano		
73	Granja	Heces	Avestruz	Verano		
79	Matadero	Hígado	Ecológico	Invierno		
80	Matadero	Final línea	Broiler	Otoño		
91	Granja	Heces	Avestruz	Invierno		
95	Granja	Botas	Ecológico	Invierno		
98	Granja	Botas	Avestruz	Invierno		
103	Comercio	Filete	Avestruz	Invierno		
105	Comercio	Filete	Avestruz	Otoño		
111	Comercio	Filete	Avestruz	Verano		
115	Comercio	Muslo	Broiler	Invierno		
125	Matadero	Hígado	Ecológico	Invierno		
126	Matadero	Hígado	Broiler	Otoño		
131	Matadero	Hígado	Broiler	Otoño		
139	Granja	Heces	Broiler	Invierno		
149	Granja	Heces	Ecológico	Otoño		
150	Granja	Polvo y camas	Ecológico	Otoño		
156	Granja	Heces	Broiler	Otoño		
159	Matadero	Hígado	Ecológico	Verano		
162	Granja	Heces	Ecológico	Verano		
165	Granja	Heces	Broiler	Otoño		
167	Granja	Botas	Broiler	Otoño		
171	Granja	Bebedero	Avestruz	Primavera		
175	Matadero	Hígado	Broiler	Primavera		
176	Matadero	Hígado	Broiler	Primavera		
183	Matadero	Jaula	Broiler	Primavera		
188	Granja	Heces	Ecológico	Primavera		
190	Granja	Bebedero	Avestruz	Primavera		
191	Granja	Heces	Avestruz	Primavera		
193	Granja	Heces	Broiler	Primavera		
194	Granja	Heces	Broiler	Primavera		
197	Comercio	Muslo	Broiler	Otoño		
198	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera		
199	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera		
200	Comercio	Muslo	Broiler	Primavera		
204	Comercio	Muslo	Broiler	Verano		
302	Matadero	Final línea	Broiler	Primavera		
303	Matadero	Final línea	Broiler	Primavera		
305	Matadero	Superf. canal	Avestruz	Primavera		

306	Matadero	Superf. canal	Avestruz	Primavera
307	Matadero	Hígado	Avestruz	Primavera
311	Matadero	Corrales	Avestruz	Verano
319	Matadero	Agua de lavado (goteo)	Avestruz	Verano
320	Matadero	Agua de lavado (goteo)	Avestruz	Verano
338	Matadero	Hígado	Avestruz	Invierno

Las cepas seleccionadas para el estudio de la reproducibilidad del método y del tiempo de incubación se señalan con asterisco (\*)

Las cepas de referencia de la DSMZ (*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* DSMZ 4688; *Campylobacter coli* DSMZ 4689) se emplearon como controles incluyéndose en los análisis. También se incluyeron cuatro cepas propias, identificadas y tipificadas genéticamente por el sistema ERIC-PCR. ERIC-PCR genera patrones o perfiles de bandas genéticas específicas empleando primers que hibridan secuencias nucleotídicas denominadas ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus). Las secuencias ERIC son elementos repetitivos de 126 pares de bases (bp) que contienen una secuencia conservada, repetida en la parte central, de 40 bp y que han sido detectados en regiones intergénicas de *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* (Hulton et al., 1991). Se consigue discriminar entre las cepas estudiadas gracias a los perfiles electroforéticos individuales obtenidos de los productos PCR (Giesendorf et al., 1994; Weijtens et al., 1999).

#### 4.2.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS

Para los distintos experimentos, la preparación de las cepas de *Campylobacter* spp. se realizó de manera similar. Las cepas purificadas se guardaron en tubos eppendorf con glicerol al 40% a  $-80^{\circ}\text{C}$ . De las cepas originales se hicieron réplicas sembrando  $65\mu\text{l}$  de las mismas en 10 ml de Brain Heart Infusion (BHI) e incubándolas posteriormente en jarras de anaerobiosis durante 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de composición 5%  $\text{O}_2$ , 15%  $\text{CO}_2$  y 85%  $\text{N}_2$  (Oxoid Microaerophilic Gas Generating Kit). Las cepas se cultivaron usando un esquema de tres pasos para obtener la suficiente cantidad de biomasa. Primeramente se cultivaron en caldo BHI en condiciones de microaerofilia durante al menos 24 horas. Se transfirió 1 ml a 25 ml de BHI incubándose durante 48 horas. Tras la incubación final, las células se centrifugaron (5.500 rpm, 15 minutos) y lavaron en 10 ml de agua destilada estéril. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente, se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron de nuevo (11.000 rpm, 10 minutos) eliminándose el sobrenadante.

Se emplearon dos métodos de preparación de muestras a partir de las cepas liofilizadas para un número limitado de muestras: mediante placas de seleniuro de zinc (ZnSe) y mediante pastillas de bromuro potásico (KBr) (ver 4.2.6). El objetivo era comparar ambos procedimientos de preparación para emplear el más adecuado con el total de las muestras.

### 4.2.3 MEDIDA DEL ESPECTRO INFRARROJO

El espectro infrarrojo se obtuvo con un Espectroscopio de infrarrojos dotado de Transformada de Fourier (Perkin Elmer System 2000 FT-IR, Buckinghamshire, UK). Para evitar la influencia de factores ambientales en los espectros, se hicieron medidas de referencia cada tres muestras, empleando el background adecuado en cada caso (placas de ZnSe y pastillas de KBr). Las medidas se recogieron en el rango 4.000 - 600  $\text{cm}^{-1}$ , con un intervalo de número de onda de 0,5  $\text{cm}^{-1}$ . La resolución espectral fue de 4  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro final se logró promediando 25 escaners.

### 4.2.4 PRE-PROCESADO MATEMÁTICO

Los espectros infrarrojos digitalizados correspondientes a la región IR medio (4.000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) se almacenaron en disco y fueron transformados con el objetivo de reducir la variabilidad debida a error metodológico (por ejemplo, aquella causada por la cantidad de muestra analizada). A tal fin, se ensayaron dos procedimientos de tratamiento de espectros que constaban de los siguientes pasos:

- Truncado
- Normalización
- Alisado
- Interpolación
- Derivatización

Se ensayaron dos procedimientos para la transformación matemática de los espectros IR. El primer procedimiento incluyó un alisado (smoothing) de factor 5 y cálculo de la 1ª derivada (algoritmo Savitzky-Golay). En el segundo procedimiento se aplicó un alisado de factor 10 y la 2ª derivada. En ambos casos la normalización se realizó a escala 1 y el truncado y la interpolación eliminaron aquellas partes del espectro no utilizables.

Un examen visual de los espectros mostró que las mayores diferencias entre las cepas (incluyendo las cepas de referencia) se localizaban en la región 1400-700  $\text{cm}^{-1}$ , resultado que se confirmó por el análisis matemático (varianza y desviación standard). Además, esta región tenía las mejores propiedades discriminatorias desde el punto de vista taxonómico, ofreciendo agrupamientos significativos. Según Naumann et al. (1990), este rango abarca una subdivisión la región mixta (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ), la región de polisacáridos (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) y la auténtica huella dactilar (900-700  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 4.2.5 ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LA REPRODUCIBILIDAD

Se obtuvieron medidas de reproducibilidad (variabilidad interna), mediante la media de 3 medidas independientes del coeficiente de correlación de Pearson (entre las

réplicas 1-2, 2-3 y 1-3), y se expresó este valor como el índice de diferenciación (Differentiation Index,  $D$ ; (Naumann, 2000)).

$$r_{y_1 y_2} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{1i} y_{2i} - n \bar{y}_1 \bar{y}_2}{\sqrt{\sum_{i=1}^n y_{1i}^2 - n \bar{y}_1^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_{2i}^2 - n \bar{y}_2^2}}$$

En donde  $y_{1i}$ , y  $y_{2i}$  son valores individuales de absorbancia de los dos espectros a comparar;  $n$  es el número de puntos en el rango de espectro a comparar;  $\bar{y}_1$  y  $\bar{y}_2$  son los valores de media aritmética de  $y_1$  y  $y_2$ .

Del valor del coeficiente de correlación obtenido, ( $r_{y_1 y_2}$ ), se define el Índice de diferenciación  $D_{y_1 y_2}$  de acuerdo a la ecuación:  $D_{y_1 y_2} = (1 - r_{y_1 y_2}) * 1000$ .  $D^3$  puede tener valores entre 0 y 2000.

El índice de Diferenciación ( $D$ ) se obtuvo para el rango de espectro completo (rangos 3000-2800 y 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ ) e independientemente para las cinco ventanas espectrales arriba descritas.

#### 4.2.6 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Un total de 10 cepas (ver Tabla 4.2) se procesaron empleando dos sistemas de preparación de la muestra y obtención del espectro, mediante la colocación de biomasa celular en una placa de ZnSe o la preparación de pastillas de KBr. De cada cepa, y para cada sistema se procesaron tres réplicas obtenidas en distintos experimentos pero en las mismas condiciones de crecimiento y análisis.

##### PLACAS DE ZNSE

Las cepas liofilizadas, en cantidad de 1 mg, se rehidrataron con 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, agitándose vigorosamente, para seguidamente tomar 50  $\mu\text{l}$  y depositarlos en una placa

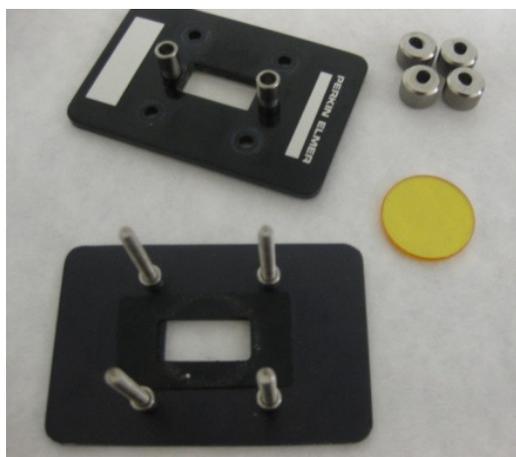


FIGURA 4.7. SOPORTE Y PLACA DE ZNSE UTILIZADA EN LAS MEDICIONES DE ESPECTROSCOPIA FTIR

<sup>3</sup>  $D$  será cero cuando los valores en los rangos espectrales son idénticos, 1000 para valores que presentan una correlación inversa, y 2000 para espectros con correlación completa negativa (espectros no correlacionados).

de ZnSe previamente limpiada con metanol (Figura 4.7). A continuación la placa de ZnSe se sometió a un tratamiento de secado (50°C durante 5 min). Las placas se limpiaron con metanol entre dos medidas. La obtención de blanco con placa limpia se hizo cada tres medidas para eliminar interferencias ambientales.

#### PASTILLAS DE KBR

Las cepas se liofilizaron (12 horas a -20°C, vacío 0,01 mm Hg) y se almacenaron en Silica-gel. Se homogeneizaron conjuntamente 1 mg de polvo liofilizado y 200 mg. de KBr (Merck) en mortero de ágata, presionándose por medio de una prensa hidráulica (Figura 4.8; Graseby Specac Ltd., UK) a 7-8 tons de presión durante 10 minutos.

#### 4.2.7 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN

Para estudiar la reproducibilidad y seleccionar el sistema de crecimiento de cepas más adecuado, diez cepas (las mismas que en el experimento anterior, Tabla 4.2) se procesaron tras crecimiento en las condiciones señaladas durante 48, 72 y 96 h de incubación, con posterior análisis del espectro mediante la colocación de biomasa celular en placa de ZnSe. Se eligió este sistema de preparación de la muestra a la vista de los resultados

obtenidos respecto a la reproducibilidad (Figura 4.12, Tabla 4.3, Tabla 4.4) y teniendo en cuenta el menor tiempo y necesidad de equipamiento empleados en la preparación. De cada cepa, y para cada tiempo de incubación se procesaron tres réplicas obtenidas en distintos experimentos manteniendo lógicamente las mismas condiciones de crecimiento, medida y pre-tratamiento matemático. Para la búsqueda de diferencias estadísticamente significativas entre muestras se llevó a cabo un análisis de varianza.

#### 4.2.8 DETERMINACIÓN DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA USANDO FT-IR

Se estudiaron las variaciones en la fluidez de membrana en función del tiempo de incubación de los cultivos de *Campylobacter*, observando los cambios experimentados en el espectro IR. Para conocer la influencia del tiempo de incubación sobre la fluidez de membrana y el espectro IR, las diez cepas recogidas en la Tabla 4.2, se procesaron tras crecimiento en las condiciones señaladas durante 48, 72 y 96 h de incubación y



FIGURA 4.8. PRENSA HIDRÁULICA EMPLEADA PARA LA PREPARACIÓN DE LAS PASTILLAS DE KBR

posterior análisis del espectro mediante la colocación de la biomasa celular en placa de ZnSe. De cada cepa, y para cada tiempo de incubación se procesaron tres réplicas obtenidas en distintos experimentos pero en las mismas condiciones de crecimiento y pre-tratamiento matemático, y se obtuvo la media de los espectros obtenidos en los tres experimentos. La fluidez de membrana se evaluó monitorizando los modos vibracionales de estiramiento (stretching) de la cadena acyl  $\nu_s\text{CH}_2$ , que se localiza aproximadamente a  $2850\text{ cm}^{-1}$ . La localización exacta del pico  $\nu_s\text{CH}_2$  se calculó obteniendo la segunda derivada, y determinando la localización del máximo del pico. El número de onda del pico  $\nu_s\text{CH}_2$  se representó en función de la variable estudiada (tiempo de incubación) para explicar los efectos de esta variable sobre la fluidez de membrana.

#### 4.2.9 AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO FINAL DE LAS CEPAS ESTUDIADAS. EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN FUNCIÓN DE SU ESPECTRO IR

Se seleccionaron 66 cepas de *Campylobacter jejuni* y dos de *C. coli* para mostrar la capacidad de la técnica de espectroscopía FT-IR en el análisis epidemiológico y la posibilidad de desvelar relaciones taxonómicas en un grupo de cepas de *Campylobacter* aisladas de estaciones, producciones, y lugares distintos. Para el análisis de los datos de espectros se utilizaron las medias de tres réplicas de 68 cultivos incubados durante 48 horas, procedentes de muestras procesadas en experimentos independientes, y se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico sobre un número de 68 espectros. Además se utilizaron las cepas de referencia y otras cepas aisladas de experimentos previos. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson (Pearson's product moment correlation coefficient) como medida de similitud entre espectros. El agrupamiento final se obtuvo empleando el algoritmo de Ward, usando diferentes ventanas espectrales.

Paralelamente se empleó un análisis de componentes principales (PCA) para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, clasificar y representar gráficamente los taxones. Mediante transformación lineal empleando la matriz de covarianza o la de coeficientes de correlación, se escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño es representada en el primer eje (llamado el Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Aunque se reduce la dimensionalidad del grupo de datos, se mantienen aquellas características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza.

#### 4.2.10 PROGRAMAS DE ORDENADOR EMPLEADOS EN EL PRE-PROCESADO, ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD Y AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO

Se emplearon varios programas de ordenador para gestionar la base de datos de espectro, realizar el pre-procesado y análisis de los espectros. El programa

“Transform.oy”, escrito para el entorno InfraRed Data Manager (IRDM v.3.50, Perkin-Elmer Ltd.), se usó para modificar el espectro, incluyendo su truncado, normalización, alisado y primera derivada. Tras la transformación, los espectros se grabaron en formato ASCII. El segundo programa (“WinSpectra.exe”; (Maradona, 1996)), escrito en Visual Basic (Microsoft Corp., v. 3.0), se usó para manejo de las bases de datos y para los cálculos de reproducibilidad. El programa Essential FT-IR (Operant, LLC. 2008) se empleó para ensayar análisis y modificaciones en los espectros infrarrojos. Para el manejo de bases de datos y conversión de formatos numéricos se emplearon también hojas de cálculo como Quattro Pro (Borland International Inc.), Microsoft Excel y Statistica for Windows v. 7.0 (Statsoft, Inc.). Los programas Statistica for Windows v. 7.0 (Statsoft, Inc.) y MVSP v. 3.1 (Kovach Computing Services) se emplearon en los análisis matemáticos de cálculo de similitudes y agrupamiento de patrones IR mediante análisis cluster o análisis PCA.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 4.9 representa el espectro IR no transformado obtenido a partir de biomasa celular perteneciente a una cepa de *Campylobacter jejuni*, tras su crecimiento en caldo BHI a 37°C en atmósfera microaerofílica, preparación de la muestra y obtención del espectro IR empleando espectroscopía FT-IR en placa de ZnSe, y en el rango IR medio 4000-600 cm<sup>-1</sup>.

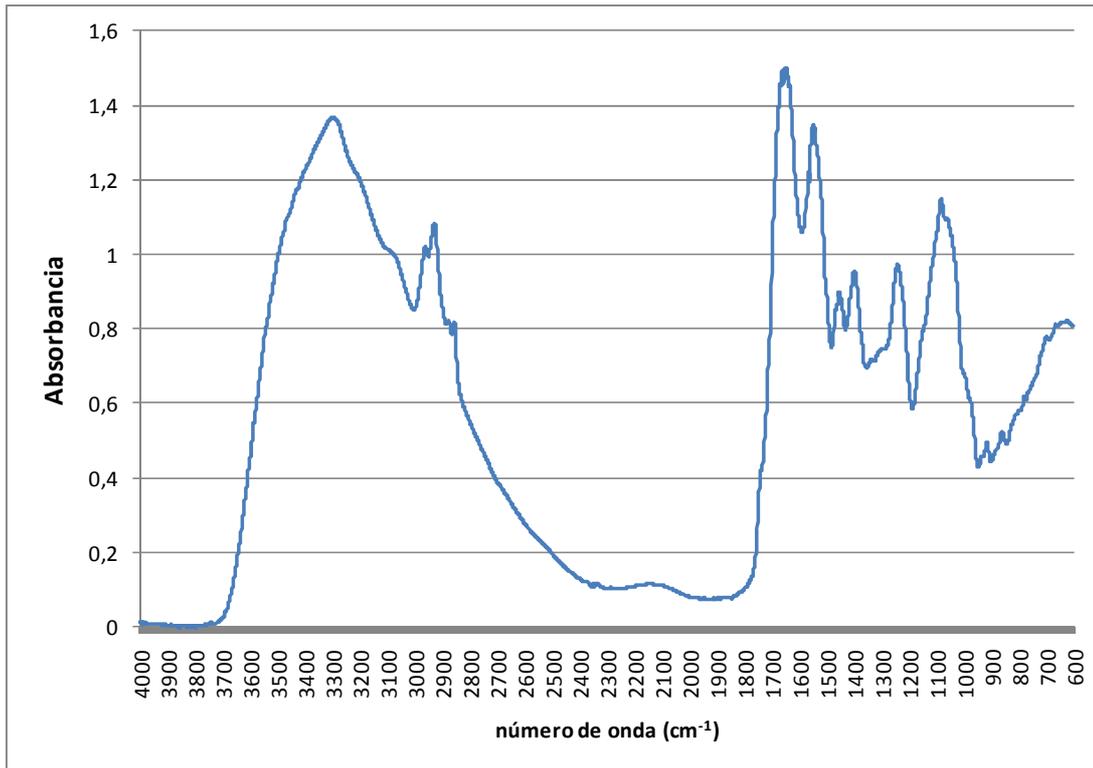


FIGURA 4.9. ESPECTRO IR DE BIOMASA CELULAR PERTENECIENTE A UNA CEPA DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, TRAS SU PREPARACIÓN Y MEDIDA EMPLEANDO ESPECTROSCOPÍA FT-IR EN PLACA ZnSe, RANGO 4000-600  $\text{cm}^{-1}$

En las siguientes figuras se ilustran las diferencias encontradas al procesar y transformar tres espectros procedentes de tres réplicas de la misma cepa (Figura 4.10) y tres espectros obtenidos de tres cepas distintas (Figura 4.11). Para obtener el alto grado de reproducibilidad (valor  $D$  medio igual a 0,8356) alcanzado en el experimento de la Figura 4.10, las tres réplicas de una cepa de *Campylobacter jejuni* se han obtenido en experimentos distintos, y se han sometido a transformación matemática incluyendo normalización, alisado, y derivatización, en la ventana espectral  $w_1$ . Las figuras muestran que las diferencias son mínimas, que es preciso obtener un alto grado de reproducibilidad entre réplicas, y que es necesario transformar los espectros y de hacer uso del análisis multivariante para revelar las diferencias existentes entre cepas. El valor  $D$  obtenido en el experimento de la Figura 4.11 fue de 2,5378.

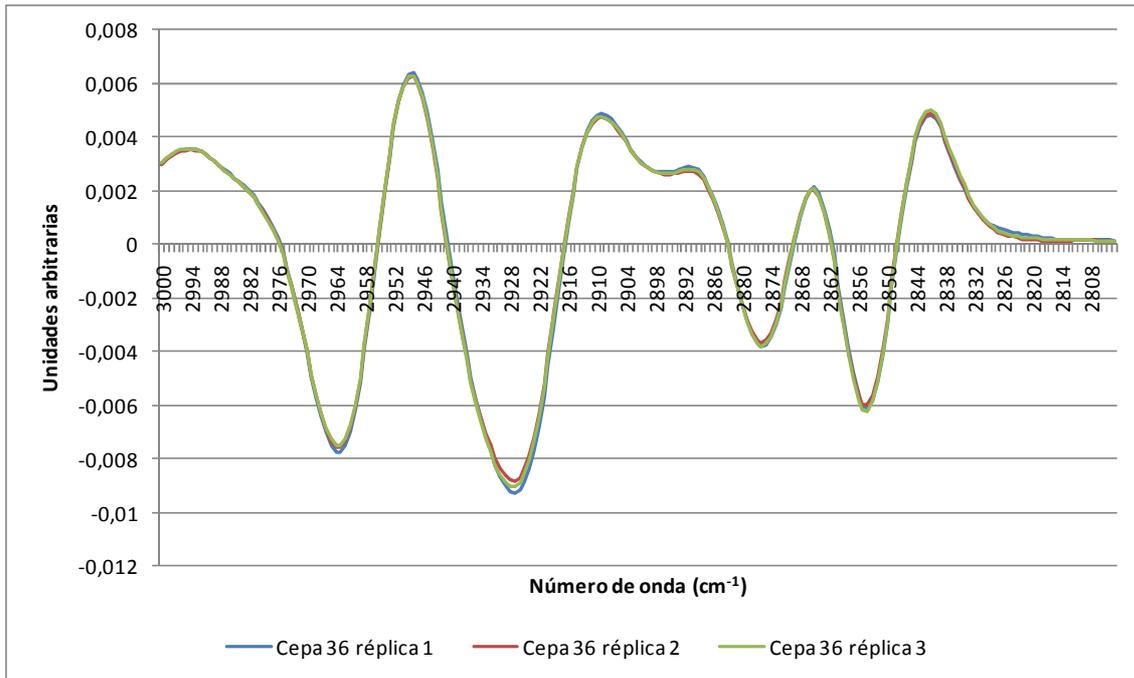


FIGURA 4.10. RÉPLICAS DE ESPECTROS IR TRANSFORMADOS EN LA REGIÓN  $w_1$  CORRESPONDIENTES A BIOMASA CELULAR PERTENECIENTE A UNA CEPA DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, TRAS SU PREPARACIÓN Y MEDIDA EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA FT-IR EN PLACA ZnSe.

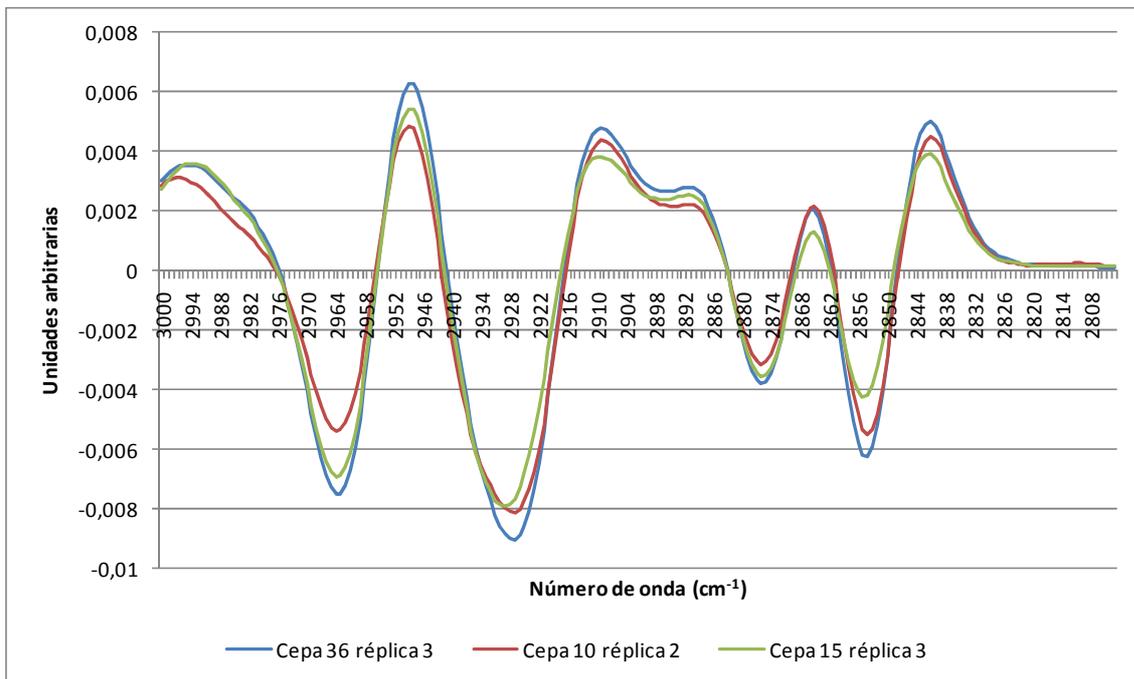


FIGURA 4.11. ESPECTROS IR DE BIOMASA CELULAR PERTENECIENTES A TRES CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, TRAS SU PREPARACIÓN Y MEDIDA EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA FT-IR EN PLACA ZnSe, Y TRANSFORMACIÓN EN LA REGIÓN  $w_1$ .

#### 4.3.1 PRE-PROCESADO MATEMÁTICO

El procedimiento matemático de preparación de espectros más conveniente para su comparación incluyó un alisado con factor 10 y la derivada 2ª. En la bibliografía se encuentran diversas modificaciones en las condiciones de pre-procesado, dependiendo generalmente los resultados del grupo bacteriano a estudio con lo que es difícil encontrar *a priori* un procedimiento universal óptimo.

#### 4.3.2 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

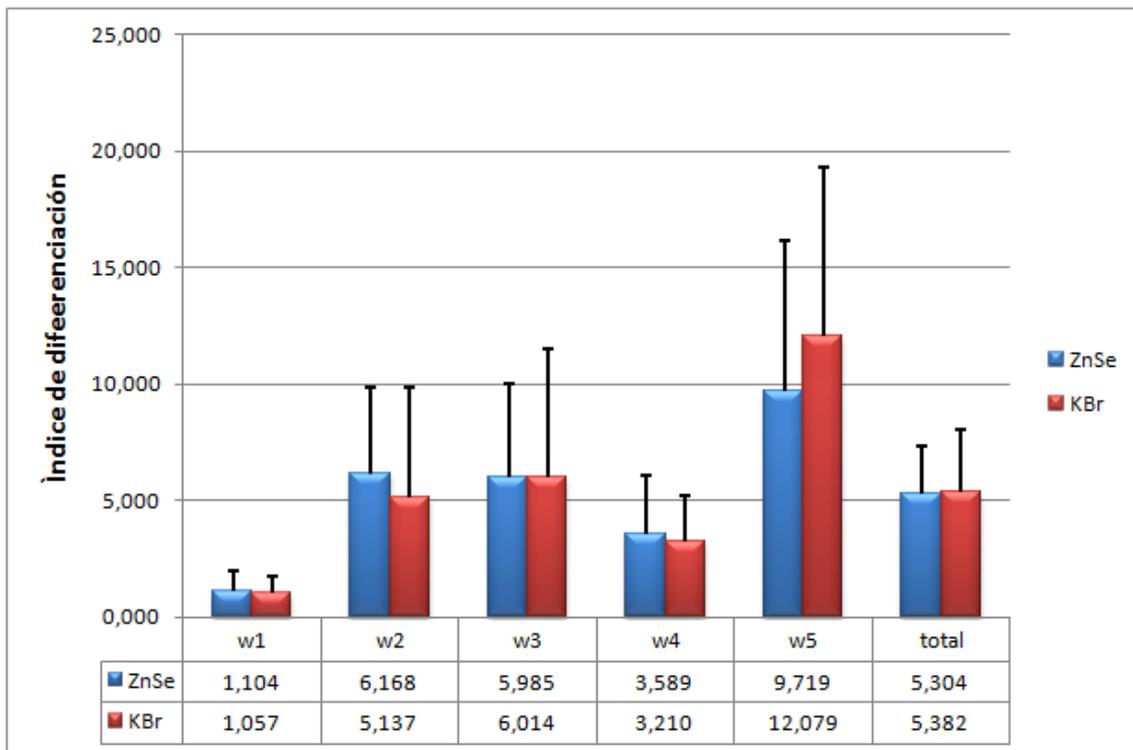
La reproducibilidad se estudió detalladamente para los cinco rangos definidos y para el espectro completo, incluyendo tres réplicas por cepa, obtenidas y procesadas en ensayos independientes. Se empleó para ello un grupo reducido de cepas (ver Tabla 4.2). Es sabido que existen muchos factores ambientales que influyen sobre la reproducibilidad de los espectros (el lote y la preparación del medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación), así como las condiciones de medida del espectro (la preparación de la muestra, la calibración del espectrómetro y las condiciones de medida) (Naumann, 2000). Para obtener esquemas de clasificación y obtener identificaciones correctas, la variabilidad intra-réplicas debe ser minimizada al máximo, lo que se consigue empleando una cuidadosa estandarización del protocolo laboratorial y un adecuado pretratamiento de espectros IR. Cuando se emplea el Índice de Diferenciación para evaluar la reproducibilidad, valores globales entre 7 y 10 se consideran adecuados al analizar las réplicas de muestras preparadas en ensayos independientes, y los valores  $D$  pueden ser de hasta 300 al comparar cepas de distintos géneros (Naumann, 2000). No obstante, estos valores dependen de los tipos de microorganismo a estudio y de las diferencias en composición química entre ellos, ya que para cepas muy similares es necesario normalizar las condiciones de preparación y medida de la muestra con objeto de reducir al mínimo la variabilidad metodológica.

En el experimento para determinar la reproducibilidad según el método de preparación de la muestra, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos sistemas de preparación, bien con la pastilla de KBr o en placa de ZnSe. La ventana  $w_5$  mostró los valores  $D$  más altos, que variaban entre 9,719 (ZnSe) y 12,079 (KBr), mientras que la ventana  $w_1$  tenían los más bajos, entre 1,104 (ZnSe) y 1,057 (KBr) (Figura 4.12). El valor medio fue de 5,304 (ZnSe) y 5,382 (KBr) con una desviación estándar de 0,64 y 1,34.

Los resultados obtenidos indican que se obtuvo una buena estandarización de las condiciones de análisis y que el método de preparación de la muestra no afecta a los valores obtenidos. No obstante la preparación de la muestra es más laboriosa y requiere más tiempo para las pastillas de KBr, aunque éstas tienen una ventaja como es la posibilidad de conservación de la muestra para futuros análisis. Para los experimentos subsiguientes se decidió uniformizar la metodología empleando el

sistema de preparación en placa de ZnSe por las razones arriba apuntadas. Otra conclusión obtenida del estudio es la diferencia en reproducibilidad observada entre ventanas, que se atribuye a variaciones detectadas en el espectro IR debidas a los cambios en compuestos químicos de la muestra. A pesar de la estandarización, se observa que la ventanas  $w_2$ ,  $w_3$  y  $w_5$  son las más variables. Por el contrario, la ventana  $w_1$  muestra un alto grado de estabilidad química mostrado por los bajos valores  $D$  (1,104-1,057). Como se observa en la Figura 4.13, esta estabilidad desaparece al aumentar el tiempo de incubación, y considerando que esta ventana refleja en parte la composición en ácidos grasos de la muestra, se infiere que al aumentar el tiempo de incubación con mayor presencia de formas cocoides, se produce una modificación en la composición de la membrana celular.

FIGURA 4.12. ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN ( $D$ ) Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR GLOBALES PARA LAS 10 CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (MEDIANTE PASTILLA DE KBr O EN PLACA DE ZnSe), CALCULADA PARA EL ESPECTRO COMPLETO Y LAS 5 VENTANAS ESPECTRALES.



**TABLA 4.3. CORRELACIONES MEDIAS ENTRE RÉPLICAS PARA PROCESADO DE MUESTRAS, MEDIANTE VENTANAS DE ZNSE**

w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>4</sub>	w <sub>5</sub>	wt	cepa
0,99951	0,99009	0,99555	0,9983	0,98628	0,994211	<b>10</b>
0,99882	0,99682	0,99727	0,9951	0,98437	0,994632	<b>11</b>
0,9997	0,99135	0,99402	0,9968	0,99207	0,995628	<b>12</b>
0,99932	0,99271	0,9985	0,9933	0,99851	0,994663	<b>13</b>
0,99895	0,99968	0,99208	0,99945	0,97413	0,993592	<b>15</b>
0,99903	0,98599	0,99693	0,9959	0,99378	0,993915	<b>17</b>
0,9964	0,99362	0,99293	0,9976	0,98697	0,994871	<b>24</b>
0,9991	0,999818	0,99437	0,9985	0,9894	0,995999	<b>25</b>
0,9991	0,99528	0,99897	0,9982	0,98726	0,994839	<b>28</b>
0,99993	0,99527	0,98644	0,9974	0,99054	0,994328	<b>32</b>
0,99804	0,99079	0,99498	0,9955	0,99439	0,994732	<b>33</b>
0,99788	0,99498	0,98597	0,9991	0,99569	0,995201	<b>36</b>
0,9996	0,9945	0,99106	0,9938	0,99943	0,994935	<b>38</b>
0,99916	0,99275	0,99714	0,9908	0,99111	0,994192	<b>40</b>

**TABLA 4.4. CORRELACIONES MEDIAS ENTRE RÉPLICAS PARA PROCESADO DE MUESTRAS, MEDIANTE PASTILLAS DE KBr**

w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>4</sub>	w <sub>5</sub>	wt	cepa
0,9991	0,9809	0,99565	0,9984	0,98328	0,992668	<b>10</b>
0,99882	0,99832	0,9924	0,9955	0,98431	0,993903	<b>11</b>
0,99971	0,99435	0,99402	0,99453	0,98707	0,99382	<b>12</b>
0,9992	0,99271	0,9985	0,9946	0,98351	0,995659	<b>13</b>
0,99896	0,99968	0,9958	0,9995	0,99413	0,9954	<b>15</b>
0,99903	0,99549	0,99333	0,9943	0,98378	0,994806	<b>17</b>
0,9968	0,99423	0,99673	0,9966	0,99777	0,996169	<b>24</b>
0,9991	0,9983	0,99432	0,9985	0,98934	0,9944	<b>25</b>
0,99913	0,99528	0,99947	0,9982	0,97236	0,992265	<b>28</b>
0,99943	0,9927	0,97644	0,9974	0,99224	0,993227	<b>32</b>
0,9983	0,99349	0,99498	0,9989	0,98839	0,996473	<b>33</b>
0,9988	0,9998	0,99597	0,9968	0,9993	0,996406	<b>36</b>
0,9993	0,9953	0,99106	0,99343	0,9943	0,994709	<b>38</b>
0,99952	0,99753	0,99714	0,9984	0,98111	0,99474	<b>40</b>

#### 4.3.3 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN

La reproducibilidad se estudió también en función del método del tiempo de incubación de los cultivos, siendo ésta la única condición cambiada en el experimento y

procesándose 10 cepas (tres réplicas por condición de cultivo) con este propósito. Los valores de reproducibilidad (medidos mediante el Índice de Diferenciación  $D$ ) aumentaron con el tiempo de incubación, observándose diferencias significativas para los días de incubación, en todas las ventanas estudiadas. Se midieron valores máximos individuales para cepas incubadas durante 96 h oscilando entre 7,3 y 24 (datos no mostrados). Las desviaciones estándar fueron también mayores para incubaciones prolongadas. Estas variaciones son similares a las obtenidas en experimentos similares (Mouwen et al., 2005) pero inferiores a las halladas por otros autores. Los resultados obtenidos nos indican que los espectros obtenidos poseían una buena calidad (reproducibilidad) y que la influencia las condiciones experimentales se ha minimizado suficientemente como para atribuir las variaciones entre espectros a diferencias en la composición química de las muestras.

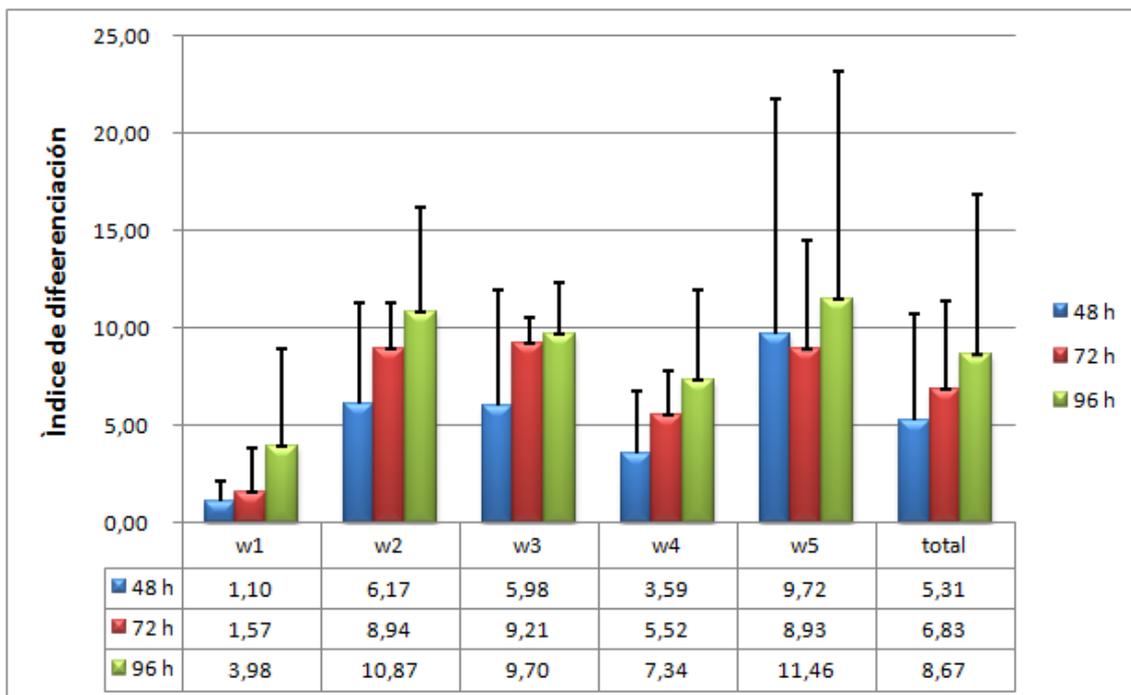


FIGURA 4.13. ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN ( $D$ ) Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA LAS 10 CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN (48, 72 Y 96 HORAS), CALCULADA PARA EL ESPECTRO COMPLETO Y LAS 5 VENTANAS ESPECTRALES

#### 4.3.4 DETERMINACIÓN DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA USANDO ESPECTROSCOPIA FT-IR

Los cambios de fluidez de membrana de *Campylobacter* en función del tiempo de incubación se determinaron midiendo los modos vibracionales de la banda simétrica de estiramiento de la cadena acyl  $\nu_s\text{CH}_2$ , utilizando espectroscopía FT-IR. Diversos autores han mostrado (Beney et al., 2004; Scherber et al., 2009), que un aumento en la frecuencia del pico de la banda  $\nu_s\text{CH}_2$  indica un aumento de la fluidez de membrana y viceversa. La región espectral  $w_1$  ( $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ ) ha sido utilizada con este motivo al permitir obtener información de la composición y modos vibracionales de los ácidos grasos presentes en la muestra, manteniendo al mismo tiempo una reproducibilidad aceptable (ver figura anterior). Es sabido que *Campylobacter*, al igual que otros microorganismos como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, modula la composición de la pared celular y la membrana para adaptarse a los cambios medioambientales. La temperatura de crecimiento afecta de manera clara a la composición de la membrana y especialmente al perfil de ácidos grasos de la membrana (Álvarez-Ordóñez et al., 2008), y se acepta que estos cambios en la composición química sirven para mantener un grado de fluidez compatible con la llamada adaptación homeoviscosa, ya que asegura un transporte de solutos adecuado y las funciones asociadas a la membrana, como por ejemplo la generación de energía.

La presencia creciente de células cocoides al aumentar el tiempo de incubación modifica lógicamente el espectro IR como se ha demostrado anteriormente. Las variaciones en reproducibilidad observadas (Figura 4.12) se atribuyen a cambios en la composición química de la muestra, y son superiores a las detectadas entre muestras de *Campylobacter* procesadas en ensayos independientes. Se han detectado cambios claros en el espectro con variaciones en la frecuencia del pico perteneciente a la banda  $\nu_s\text{CH}_2$ , lo cual puede atribuirse a las modificaciones sufridas por la membrana celular al pasar a forma cocoide. Al aumentar el tiempo de incubación, se modifica el número de onda al que la absorbancia es máxima, desplazándose en el eje el máximo del pico  $\nu_s\text{CH}_2$  (Figura 4.13 y Figura 4.14).

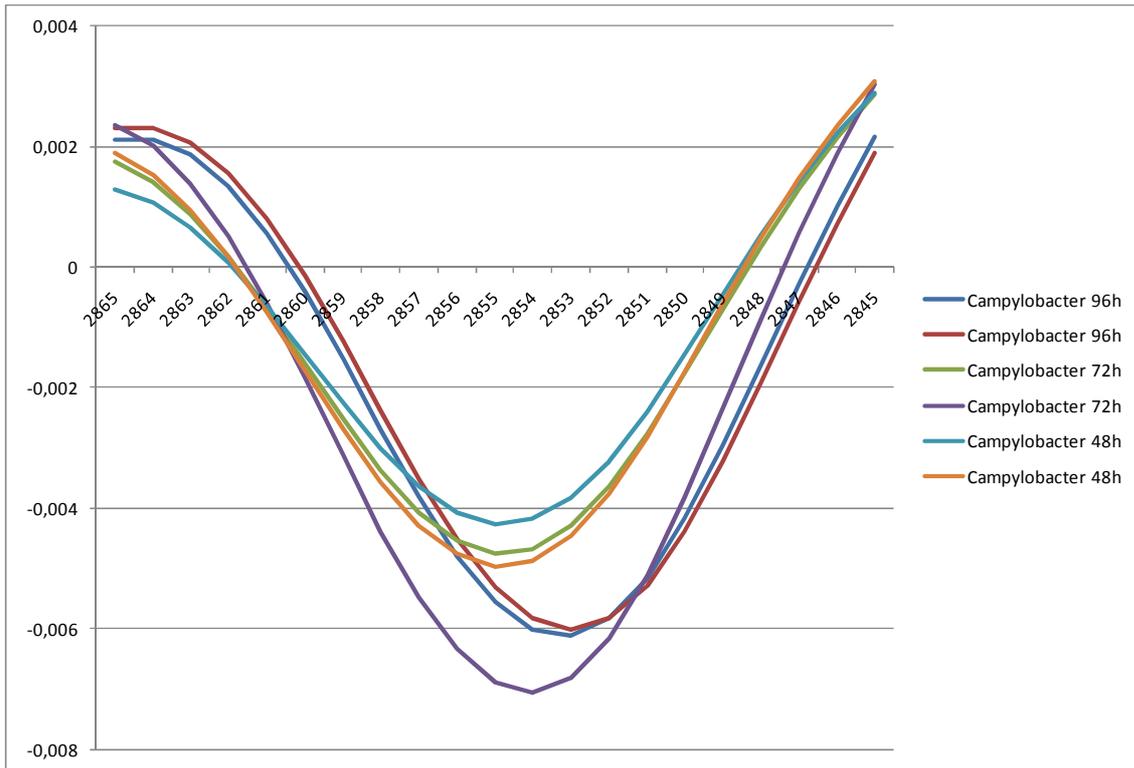
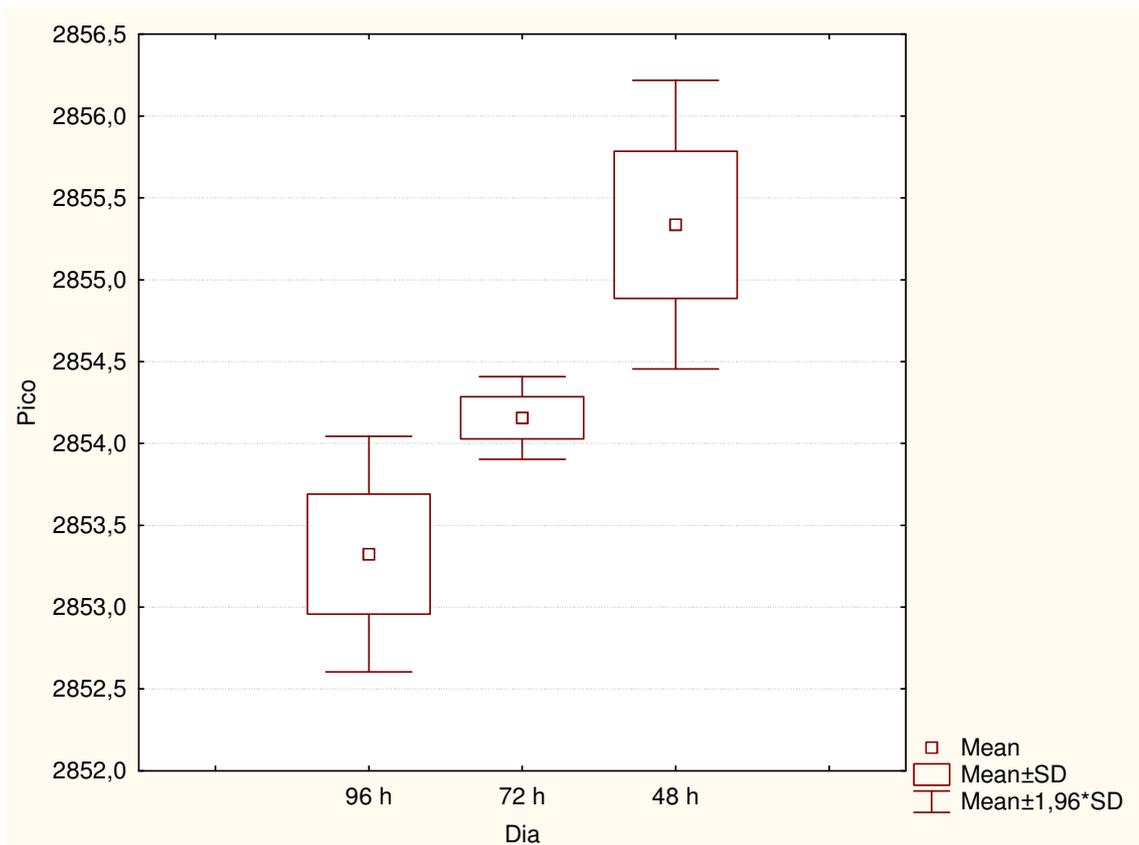


FIGURA 4.14. REPRESENTACIÓN DEL PICO MÁXIMO  $\nu_s\text{CH}_2$  (SEGUNDA DERIVADA, ALREDEDOR DE  $2850\text{ cm}^{-1}$ , REGIÓN  $w_1$ ) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN (48, 72 Y 96 HORAS)

Esto indicaría que al prolongarse la incubación se modifica la composición y la fluidez de la membrana citoplásmica, probablemente debido a que la composición química de la membrana celular en la forma cocoide (un estado de menores necesidades energéticas, con menor actividad metabólica) no exige una fluidez de membrana alta al disminuir las funciones vitales celulares.



**FIGURA 4.15. REPRESENTACIÓN BOX-WHISKER DE LOS VALORES DEL PICO MÁXIMO  $\nu_5\text{CH}_2$  (SEGUNDA DERIVADA DEL ESPECTRO IR, ALREDEDOR DE  $2850\text{ cm}^{-1}$ , REGIÓN  $w_1$ ) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN (48, 72 Y 96 HORAS).**

#### 4.3.5 AGRUPAMIENTO TAXONÓMICO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS MEDIANTE EL ESPECTRO IR. EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

La Figura 4.16 nos muestra el agrupamiento jerárquico obtenido mediante el cálculo de similitudes entre cepas (usando el coeficiente de correlación de Pearson) y el análisis cluster (método de Ward) de los espectros IR de 68 cepas de *Campylobacter* spp. obtenidos por espectroscopía FT-IR. Los datos obtenidos nos muestran la existencia de cinco clusters compactos de entre los que destaca el cluster 2 que comprende cepas aisladas de avestruz, el cluster 3 (cepas aisladas de pollo ecológico) y el cluster 4 (broiler). Los otros clusters (1 y 5) contienen elementos heterogéneos con cepas aisladas de broiler y producción ecológica. No se aprecia ninguna agrupación clara en función del lugar de toma de la muestra o del momento en el año (estación).

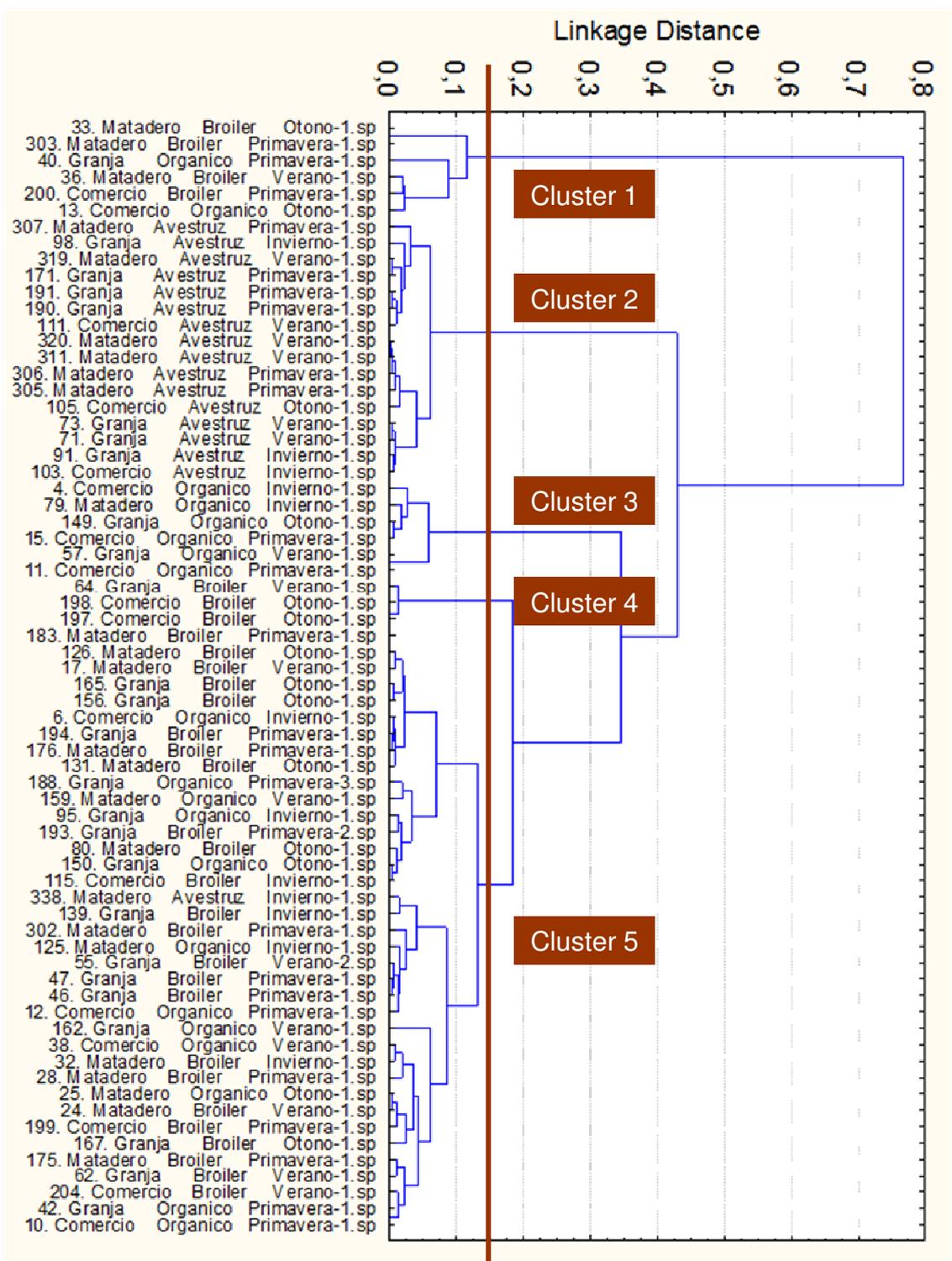


FIGURA 4.16. AGRUPAMIENTO TRAS CÁLCULO DE SIMILITUDES (COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON) Y ANÁLISIS CLÚSTER (MÉTODO WARD) DE 68 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP. TRAS OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LA VENTANA  $W_4$  DEL ESPECTRO IR.

Esta separación en función del tipo de producción animal es corroborada por los análisis de componentes principales (Figura 4.17) en los que de nuevo se observa una diferenciación según el tipo de producción animal. De la misma manera que en el análisis cluster, no se observa una agrupación clara de tipos basada en el FT-IR en función de la etapa de la cadena alimenticia (granja, matadero, distribución comercial) o de la estación del año (Figura 4.18, Figura 4.19). Estos resultados son destacables ya que es de esperar una división clara en las cepas microbianas en función de la producción animal de procedencia, mucho mayor que la que se puede encontrar en función del lugar o la estación del año donde se aíslan. En Suecia, los estudios taxonómicos empleando Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) y análisis cluster de los perfiles genotípicos de *C. jejuni* aislados de gaviotas, gallinas y hombre, detectó dos grupos principales agrupándose las cepas de gaviota en un cluster, mientras las cepas de gallina y procedencia humana mostraban una más amplia distribución y cercanía (Broman et al., 2002). Al compararse 49 cepas de procedencia humana con 87 procedentes de aves silvestres solamente dos de estas últimas tenían similitud reseñable a las de procedencia humana (Broman et al., 2004). Esta distinción entre genotipos aislados de diversas especies ha sido observada también en otro estudio realizado (también empleando PFGE) en Dinamarca donde se detectaron diferencias entre los perfiles de *C. jejuni* aislados de broilers y los de un grupo de mamíferos y aves silvestres (Petersen et al., 2001), agrupándose los aislados de procedencia humana en 7 clusters conjuntamente con aislamientos de broiler, y no incluyendo aislados de otros orígenes. También empleando pruebas fenotípicas, se ha visto que las cepas de procedencia humana están más relacionadas con las de animales de granja que con las de animales salvajes (Devane et al., 2005; Garrett et al., 2007).

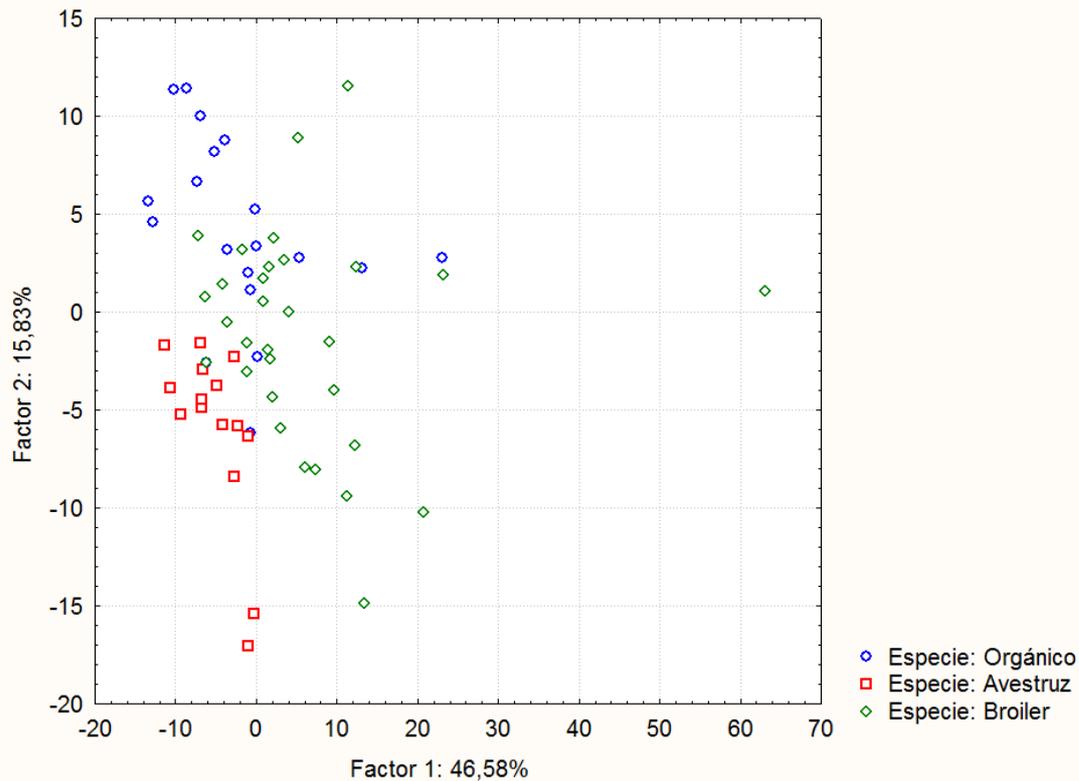


FIGURA 4.17. REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LAS MUESTRAS SEGÚN PRODUCCIÓN ANIMAL, OBTENIDA MEDIANTE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE 68 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER SPP.* TRAS OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LA VENTANA  $w_4$  DEL ESPECTRO IR

En cuanto al agrupamiento temporal, diversos autores han encontrado una distribución estacional clara pero referida al número de células encontradas en muestras (Jore et al., 2010; Kovats et al., 2005; Louis et al., 2005), en la que la temperatura parece tener una importancia clara al influir sobre el grado de excreción de *Campylobacter* al medio ambiente. Ahora bien, existe controversia sobre si los tipos presentes en el medio ambiente son los mismos. Varios estudios llevado a cabo en Nueva Zelanda (Garrett et al., 2007; Hudson et al., 1999) en el que se compararon aislamientos de muestras tomadas en invierno y verano encontraron claras diferencias en subtipos entre los dos períodos. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este trabajo (Figura 4.19), donde, como puede verse existe una distribución homogénea de subtipos en las cuatro estaciones, y con los hallados por otros autores que tampoco han encontrado diferencias en tipos según estaciones (Koenraad et al., 1994; Koenraad et al., 1995b).

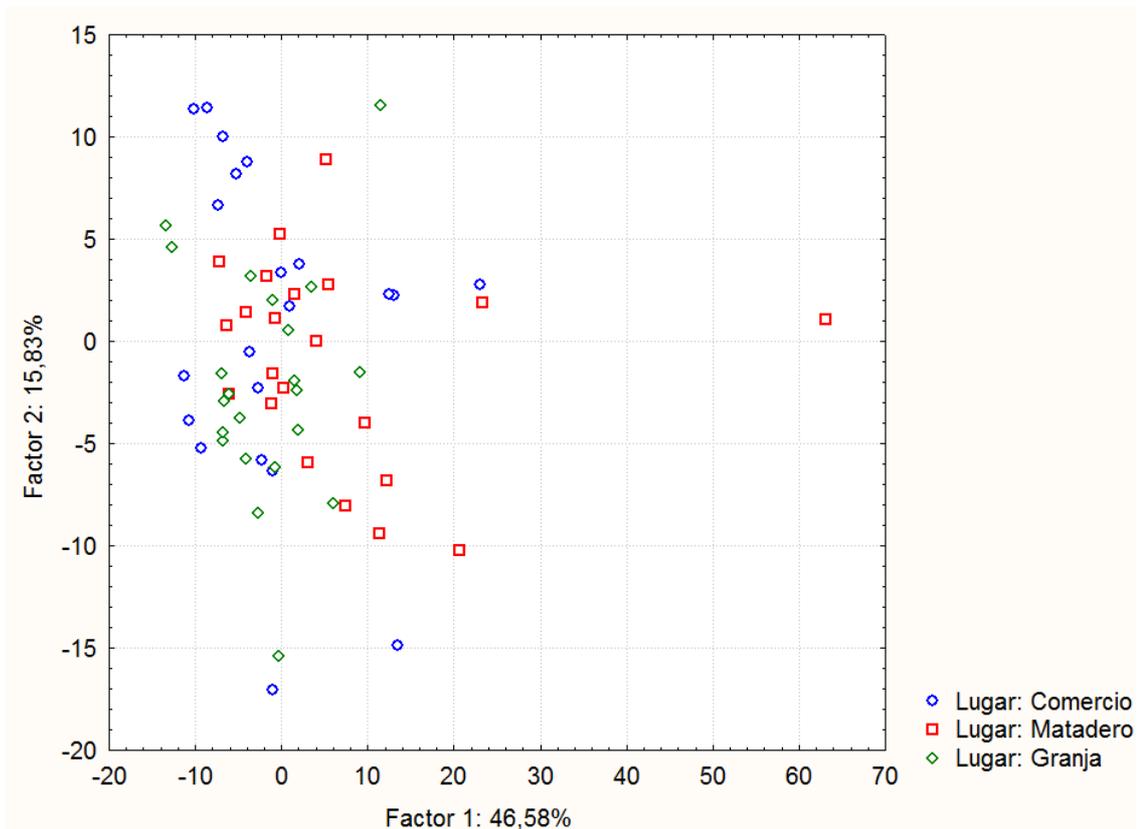


FIGURA 4.18. REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LAS MUESTRAS SEGÚN LUGAR OBTENIDA MEDIANTE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE 68 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP. TRAS OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LA VENTANA  $W_4$  DEL ESPECTRO IR

Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo parecen confirmar la existencia de reservorios bien definidos, que mantienen una población estable de genotipos de *Campylobacter* spp. y que son continuamente eliminados en heces, independientemente de la estación del año, contaminando el medio ambiente, y los alimentos procedentes de los reservorios. En cuanto a la capacidad del método de FT-IR de servir para la discriminación de subtipos de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, los resultados confirman los mostrados en otros artículos (Mouwen et al., 2005) en los que se estudian las propiedades del FT-IR referidas a capacidad discriminante, reproducibilidad y correlación con métodos genotípicos. Los métodos fenotípicos presentan problemas derivados de falta de reproducibilidad y estandarización (Frost et al., 1998; Hanninen et al., 1999), y la presencia de una alta proporción de cepas que no se pueden tipificar (Wassenaar and Newell, 2000). Los dos métodos genotípicos no basados en secuenciación más usados para *Campylobacter* spp. son el PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) y el AFLP (amplified fragment length polymorphism). De entre ellos el AFLP parece estar en desventaja al tener menor capacidad discriminatoria con respecto al origen de las cepas (Duim et al., 1999; Hopkins et al., 2004; Schouls et al., 2003; Siemer et al., 2004; Wieland et al., 2006). Los métodos basados en secuenciación del DNA (multi-locus sequence typing, MLST) presentan ventajas considerables por su

reproducibilidad y poder discriminante. Para *Campylobacter* se secuencian siete fragmentos de genes que codifican para funciones metabólicas esenciales (Dingle et al., 2001), escogidos para permitir el tipado de todas las cepas y la búsqueda de relación genética entre ellas. Esto permite la detección de cepas cercanas que comparten alelos idénticos y que pertenecen por tanto a un complejo clonal determinado.

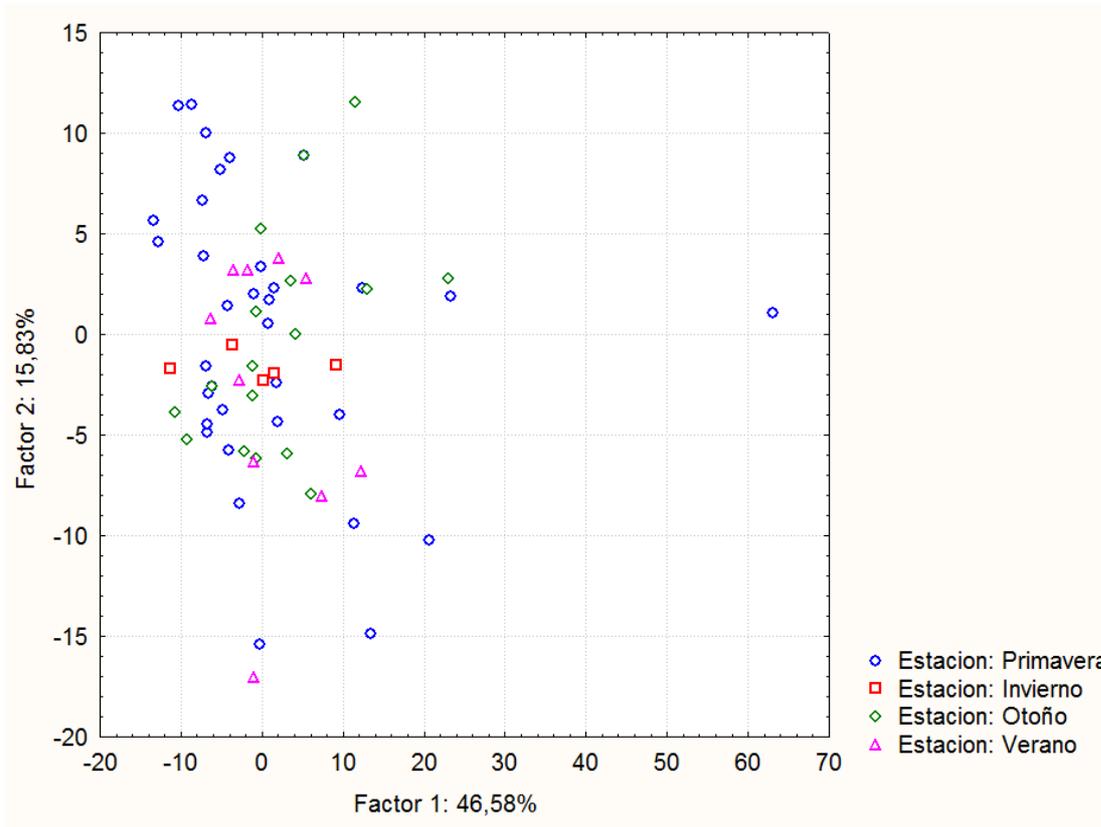


FIGURA 4.19. REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LAS MUESTRAS SEGÚN ESTACIÓN OBTENIDA MEDIANTE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE 68 CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP. TRAS OBTENCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LA VENTANA  $W_4$  DEL ESPECTRO IR

## 5 CAPÍTULO V. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y TIPOS DE *CAMPYLOBACTER* A PARTIR DE ESPECTROS INFRARROJOS PROCESADOS CON REDES NEURONALES ARTIFICIALES

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Para estudiar la epidemiología de la campilobacteriosis, su prevención y control, es esencial disponer de herramientas capaces de identificar y tipificar a nivel de subespecie aislamientos (Wassenaar and Newell, 2000). La identificación y clasificación de microorganismos basada en las diferencias de sus espectros IR obtenidos mediante espectroscopía FT-IR se ha utilizado con éxito en la identificación de muchos grupos y especies bacterianos (Mariey et al., 2001), incluyendo *Campylobacter* (Mouwen et al., 2005). El espectro IR de una muestra compuesta por biomasa celular purificada exhibe rasgos particulares que hacen de él una huella digital única, al constar de bandas características de absorción obtenidas al irradiar la muestra con un rango continuo de luz IR. Este espectro IR se compone de un conglomerado de bandas de absorción con contornos amplios y complejos en vez de picos diferenciados (Figura 4.2). Como se ha visto en el Capítulo IV, los rasgos característicos en los espectros de FT-IR tienen un trasfondo químico, y por lo tanto pueden ser utilizados para la clasificación y la identificación. Para encontrar diferencias entre los espectros IR, se pueden emplear sistemas adecuados de reconocimiento de patrones, dado que los datos espectrales de FT-IR son complejos, no lineales, y presentan un alto grado de solapamiento.

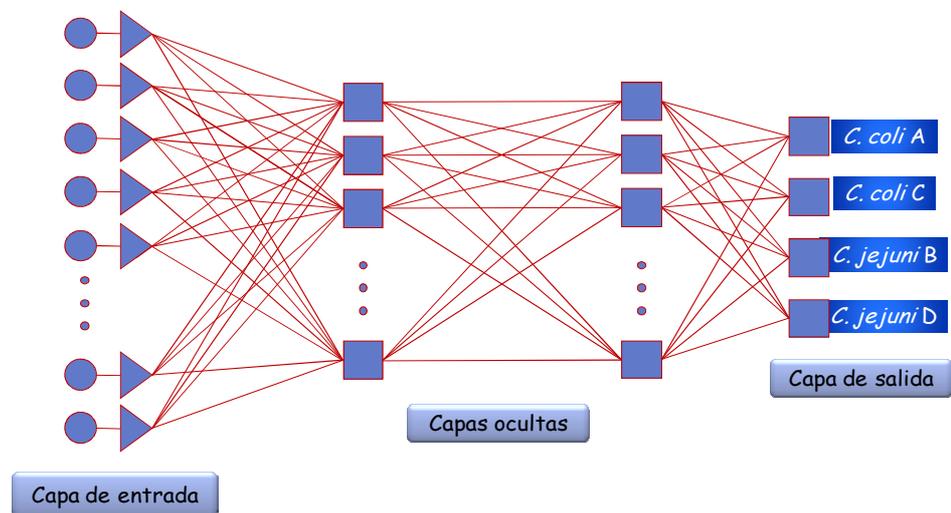


FIGURA 5.1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA RED NEURONAL ARTIFICIAL, MOSTRANDO LA CAPA DE ENTRADA, CAPAS OCULTAS Y LA CAPA DE SALIDA

#### 5.1.1 REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Las Redes Neuronales Artificiales (RNAs) constituyen un procedimiento supervisado que permite llevar a cabo estrategias de generalización, resolver problemas no lineales, y reconocer datos degradados, incompletos o con ruidos (Basheer and Hajmeer, 2000;

Haykin, 1999). Las RNAs simulan la estructura y el comportamiento de las redes neuronales biológicas mediante procesos de aprendizaje y procesamiento automático. Una red neuronal (Figura 5.1) es un modelo de cómputo paralelo que abarca un gran número de unidades de proceso adaptativas o neuronas (Figura 5.2), dispuestas en capas e interconectadas por medio de sinapsis o de conexiones con las fuerzas variables asociadas (pesos de conexión), y una función de activación (normalmente funciones sigmoideas no lineales como la logística) que determina la salida, dada la suma ponderada de las entradas. Las neuronas en la capa de la entrada reciben la información externa (datos experimentales), mientras que las neuronas situadas en la parte oculta y las capas de salida procesan esta información usando la suma ponderada de entradas como un argumento para la función de la activación. La entrada a cada neurona recoge la salida de todas las otras neuronas que estén conectadas con ella. La red está entrenada mediante la aplicación de un grupo de patrones de ensayo (datos

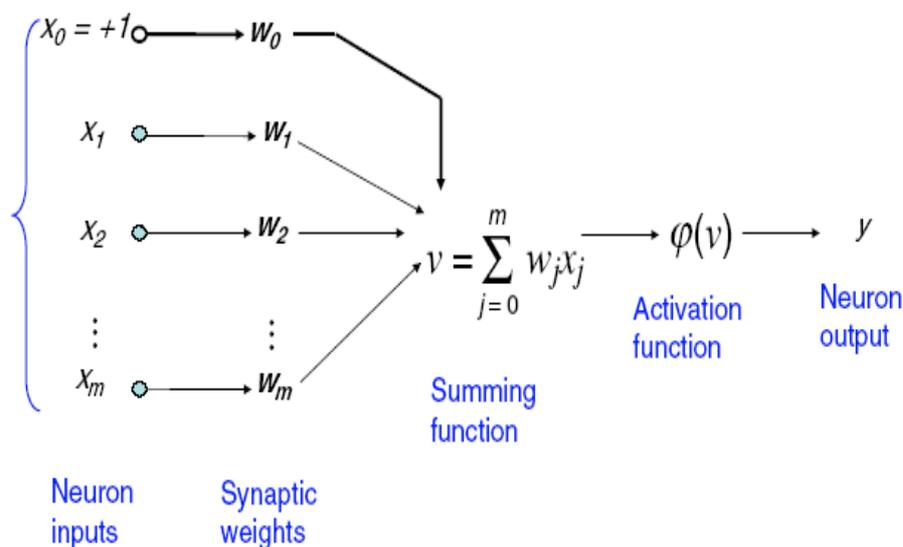


FIGURA 5.2. ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UNA NEURONA ARTIFICIAL

de

entrada

emparejados con una salida deseada) que permite ajustar los pesos/ponderaciones asociados con las conexiones en la red repetidamente hasta lograr un nivel adecuado de error. El modelo obtenido se utiliza entonces, por ejemplo, para la identificación, ofreciendo una respuesta de salida ante un patrón desconocido.

### 5.1.2 MODELOS DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Entre los modelos de redes neuronales adecuadas para la clasificación e identificación, la red perceptrón multicapa (MLP) y la red neuronal probabilística (PNN) se han utilizado en la identificación de microorganismos (Carson et al., 1995; Chun et al., 1993; Freeman et al., 1994; Goodacre et al., 1998). Ambos tipos de red tienen una

topología unidireccional o feed-forward, están estructuradas en varias capas (entrada, ocultas y capa de la salida), y emplean una metodología de aprendizaje supervisada. En la red de topología unidireccional o feed-forward, los valores a analizar ingresan en la red neuronal a través de las unidades de entrada como valores de activación de dichas unidades. En el aprendizaje supervisado, la red crea un modelo que relaciona datos de entrada de ensayo (en nuestro caso, datos de espectros IR) con la respuesta o salida deseada (en nuestro caso la clase taxonómica de pertenencia). La red aprende cada vez que un patrón de ensayo (compuesto de datos de entrada y salida) se aplica a la red, modificándose los pesos/ponderaciones de conexión, y esto se realiza cientos o miles de veces (iteraciones o epochs) hasta que se alcanza un nivel adecuado, suficientemente bajo, de error.

Las RNAs han sido utilizadas en identificación microbiana empleando distintos datos: perfiles del ácido graso (Bertone et al., 1996; Noble et al., 2000; Xu et al., 2003), pirólisis/espectrometría de masas (Chun et al., 1993; Freeman et al., 1994; Goodacre et al., 1994; Wilkes et al., 2005), pirólisis/cromatografía de gases (Donohue and Welsh, 2004), patrones de DNA (Carson et al., 1995; Moschetti et al., 2001; Noble et al., 1997; Tuang et al., 1999), o datos de las proteínas de toda la célula (Giacomini et al., 2000; Piraino et al., 2006). Aunque con menor frecuencia, los espectros de FT-IR también han sido empleados con éxito en la identificación microbiana basada en redes neuronales artificiales (Goodacre et al., 1996; Mouwen et al., 2006; Tintelnot et al., 2000; Udelhoven et al., 2000).

### 5.1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo general de este capítulo ha sido comprobar la utilidad de las RNAs en la identificación microbiana usando espectros IR. El desarrollo y funcionamiento de una RNA es complejo pero la información previa disponible indicaba la plena adecuación y capacidad de estos modelos matemáticos en el tratamiento de patrones espectrales pertenecientes a bacterias. En este trabajo se han usado algunas características de RNAs no empleadas anteriormente: se ha ensayado con redes de cuatro capas y se ha modificado el procesado posterior (post-processing) para construir una red robusta capaz de lograr altos porcentajes de identificación, así como la detección de patrones muy similares pero atípicos. Para reducir el pre-procesado se analizan rangos enteros del espectro IR. El propósito final es reducir al mínimo el número de falsos negativos y falsos positivos que pueden interferir en sistemas de identificación asistidos por ordenador, especialmente importantes si se trabaja con microorganismos patógenos. Con este propósito, se han construido dos prototipos de RNA (MLP, PNN), ensayados y probados con huellas digitales espectrales pertenecientes a cepas de *Campylobacter*, algunas identificadas y tipificadas previamente como *C. jejuni* y *C. coli*, y otras pertenecientes a otros géneros, empleadas para comprobar la capacidad de las RNAs para la identificación a nivel de género y especie y la detección de falsos positivos. La

utilidad y eficacia de los dos prototipos de RNA se evaluó considerando sus porcentajes de éxito y de rechazo.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

En la Figura 5.3 se presenta el protocolo seguido en el que se incluyen las etapas de preparación y análisis de las muestras, así como el desarrollo y topología de las RNAs, su ensayo y la selección de niveles para el post-procesado y asignación de patrones.



FIGURA 5.3. PASOS SEGUIDOS EN LA PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA LA IDENTIFICACIÓN USANDO RNAs.

### 5.2.1 CEPAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN CON REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Se investigó la capacidad de las RNAs descritas en la identificación de *Campylobacter* spp. Para la construcción de la RNA se trabajó con un grupo de cepas de *Campylobacter* termofilicos previamente clasificadas (Tabla 5.1). Parte de ellas, pertenecientes a las especies *C. coli* y *C. jejuni* habían sido subclasificadas en 4 tipos según la técnica genotípica ERIC-PCR (Mouwen et al., 2005; Weijters et al., 1999). Además, otras cepas tipo (Tabla 5.1) también fueron incluidas en el análisis con el objetivo de probar la capacidad de detección de falsos positivos o rechazo por parte de la RNA. También se incluyeron cepas aisladas en este trabajo (20) para comprobar la capacidad de la red en identificación y detección de falsos positivos. Todas las cepas se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caldo BHI (Oxoid) al 20% de glicerol. Las cepas de *Campylobacter* spp. se cultivaron en caldo de BHI a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas en condiciones de microaerofilia (5%  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ , 85%  $\text{N}_2$ ). Las cepas pertenecientes a otros géneros fueron cultivadas a  $30^{\circ}\text{C}$  (bacterias ácido-lácticas) o a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en condiciones aeróbicas. Los inóculos se transfirieron con un asa de platino a placas

de BHI agar e incubaron (37°C, 48 h) en la atmósfera elegida. De cada cepa se obtuvieron tres réplicas de espectros IR en procesos independientes.

**TABLA 5.1. IDENTIDAD, PERFIL ERIC-PCR, NÚMERO, CÓDIGO Y PATRONES DE LAS CEPAS DE REFERENCIA Y DE CAMPO EMPLEADAS PARA ENSAYAR Y VERIFICAR LAS RNAs**

Especie	Perfil ERIC-PCR	Nº de cepas	Código	Patrones en grupo de ensayo / verificación	Patrones en grupo de test
<i>C. coli</i>	A	6	25w, 26w, 27w, 510w, 511w, 512w	6	10
<i>C. coli</i>	C	8	371w, 425w, 427w, 457w, 458w, 360w, 444w, 459w	17	10
<i>C. jejuni</i>	B	6	22w, 503w, 222w, 361w, 557w, 527w	13	10
<i>C. jejuni</i>	D	6	34w, 38w, 45w, 46w, 47w, 299w	4	10
<i>Campylobacter lari</i>		1	CCUG 19512		3
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i>		1	CCUG 24982		3
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		1	CCUG 19559		3
<i>Escherichia coli</i>		1	CECT 101		3
<i>Lactobacillus sakei</i>		1	DSM 20017		3
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1	CECT 220		3
<i>Weissella viridescens</i>		1	ATCC 12706		3
<i>C. jejuni</i>		18	6, 10, 13, 32, 40, 42, 47, 71, 105, 111, 131, 156, 167, 183, 198, 204, 305, 306		54
<i>C. coli</i>		2	165, 302		6

### 5.2.2 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS FT-IR

Se empleó un asa de platino estéril para recoger colonias de la superficie de las placas de agar y suspenderlas posteriormente en 100 µl de agua estéril destilada. Se colocaron en una ventana de ZnSe, y se secaron en estufa (5 minutos, 60°C). Los espectros IR se midieron empleando un espectroscopio de infrarrojos con transformación de Fourier (Perkin-Elmer System 2000 FT-IR) equipado con un detector DTGS. Las medidas se registraron en el rango de número de onda de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, con intervalo de 1 cm<sup>-1</sup>. La resolución espectral fue de 4 cm<sup>-1</sup>. El espectro final de la muestra se obtuvo promediando un número de 20 espectros. Los espectros IR digitalizados (representados por un total de 3500 puntos) se almacenaron para la transformación posterior.

### 5.2.3 PRE-PROCESADO PREVIO

El espectro infrarrojo requiere un pre-procesado previo a su utilización como entrada a una red neuronal artificial. El alisado (10 puntos de alisado) se realizó para reducir la cantidad de ruido. Se realizó una normalización (valor de absorción mínimo a  $1800\text{ cm}^{-1}$ , puesto a 0; valor de absorción máximo a alrededor de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , puesto a 1) para reducir al mínimo cambios y desviaciones de la línea de fondo. La primera derivada (algoritmo de Savitzky-Golay) se aplicó para realzar la resolución espectral. Finalmente, se escogió la parte más informativa del espectro ( $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ ;  $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ). Este pre-procesado fue realizado por una aplicación (Transform.oy) que funciona en el entorno "IR Data Manager" proporcionado por el fabricante (Perkin-Elmer). Una vez transformados, los espectros estaban listos para ser procesados por la RNA.

### 5.2.4 DESARROLLO DE LA TOPOLOGÍA DE LAS REDES NEURONALES ARTIFICIALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER*

Se utilizaron dos RNAs supervisadas (red perceptron multicapa (MLP) y red neuronal probabilística (PNN)), para comparar su capacidad de reconocimiento de especies y genotipos de *C. coli* y *C. jejuni*, y distinguirlos de otros espectros, en base a las diferencias observadas entre los espectros IR. Para desarrollar las RNAs se empleó el software Statistica Neural Networks (Statsoft Inc.). Se emplearon por separado dos ventanas del espectro medio IR,  $w_4$  ( $1200$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ ) y  $w_5$  ( $900$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ ) como sets de ensayo o vectores de entrada. No se realizaron reducciones de la multidimensionalidad del conjunto de datos (por ejemplo, mediante un análisis de varianza o análisis de componentes principales). Por lo tanto el conjunto de datos a procesar por la capa de entrada de las RNAs consistió en 300 ó 200 puntos de entrada, según se utilizase la ventana  $w_4$  o la  $w_5$ .



FIGURA 5.4. VARIANTES ENSAYADAS COMO RNAs (8) PARA ENCONTRAR UNA ÓPTIMA SOLUCIÓN DE IDENTIFICACIÓN. RED PERCEPTRON MULTICAPA (MLP) Y RED NEURONAL PROBABILÍSTICA (PNN).

La capa oculta estaba compuesta de un número de neuronas calculadas empíricamente por el software, buscando el equilibrio entre la capacidad de aprendizaje y la bondad de ajuste a los datos presentados. Se optimizó la topología de la red modificando el número de capas y neuronas ocultas y calculando el error cruzado de validación entre las salidas predichas y las reales de los datos de ensayo y verificación. Es sabido que el número de neuronas en cada capa debe mantenerse preferiblemente bajo, ya que un número elevado, aunque consigue buenos ajustes al set de ensayo, impide un correcto reconocimiento de datos de entrada atípicos. En la estructura de las redes, cada ensayo de entrada está emparejado con un valor de salida (blanco de clasificación asignado), constituyendo un patrón de ensayo. Para la identificación a nivel de especie la capa de salida consistió en dos neuronas de salida (2 especies: *C. coli* y *C. jejuni*), mientras que en la identificación a nivel de subespecie la capa de salida consistió en cuatro neuronas de salida (4 genotipos: *C. coli* A, *C. coli* C, *C. jejuni* B y *C. jejuni* D).

El conjunto de datos de entrada o espectros infrarrojos preparados se dividió en tres subconjuntos: ensayo, verificación y examen (training, verification, test), según se indica en la Tabla 5.1. Para cada una de las 8 RNAs ensayadas se utilizaron en total un número de 121 patrones (espectros IR en su rango  $w_4$  o  $w_5$ ) en el ensayo, verificación y prueba de las redes. El ensayo de las RNAs se realizó con 40 espectros (33,06%) del total; y entre ellos 13 espectros como patrones de verificación (10,74%). Además, 81 patrones fueron empleados para comprobar la capacidad de identificación de las RNAs (66,94%). De entre ellos, 60 patrones correspondían a espectros de cepas de campo aisladas en experimentos previos (ver capítulo II), nueve patrones fueron obtenidos de otras especies de *Campylobacter* (*C. fetus* subsp *fetus*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) y doce de cepas de otros géneros distintos a *Campylobacter* (*Escherichia coli*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens*). Estos dos últimos grupos se procesaron para comprobar la capacidad de rechazo de elementos atípicos por las RNAs.

### 5.2.5 ENSAYO DE LA RED PERCEPTRON MULTICAPA

Un diagrama esquemático de la topología de la red perceptrón multicapa (MLP) se muestra en la Figura 5.1. En relación al número de capas, y específicamente para la topología de la RNA MLP, los ensayos se hicieron con topologías de tres y cuatro capas (1 ó 2 capas ocultas respectivamente). El número de capas ocultas, así como el número de las unidades en cada capa, son puntos clave en el diseño de la topología de la red, puesto que determinan la capacidad de la RNA de aprender (durante el ensayo) los patrones de ensayo de los espectros IR. Para optimizar y acelerar el proceso del ensayo de la red, el algoritmo de retropropagación (back-propagation, que utiliza la diferencia entre la salida deseada y el valor estimado para ajustar los pesos, y retroalimenta en dirección contraria modificando los pesos (Rumelhart et al., 1986), fue programado con una ratio de aprendizaje adaptativo entre 0,1 y 0,6 (interpolando entre los dos valores en cada iteración (epoch) y una ratio de momentum entre 0,1 y 0,3. Para

determinar el estatus de las iteraciones de ensayo y parada, la RNA fue preparada para obtener una suma de cuadrados del error inferior a 0,05. Para evitar el sobreaprendizaje, el error final para el set de verificación se obtuvo mediante validación cruzada con los sets de verificación de datos no usados en el ensayo. El ensayo se detenía automáticamente si el error de verificación superaba el valor de 0,01.

#### 5.2.6 ENSAYO DE LA RED NEURONAL PROBABILÍSTICA

Las redes neuronales probabilísticas (Specht, 1990) tienen en común con las MLP la topología de red (unidireccional o feed-forward) y el algoritmo de ensayo supervisado. En vez de ajustar los pesos de la capa de la entrada como ocurre en la red MLP, cada patrón de ensayo de entrada se utiliza para calcular el peso de conexión con una nueva unidad oculta, y por lo tanto el número de unidades ocultas es igual al número de elementos en el patrón de ensayo (200 ó 300 según la ventana IR empleada). Las unidades de la capa de clasificación agregan las salidas para el patrón para cada clase, estimando la probabilidad de pertenencia de un patrón desconocido a una clase. La identificación con PNN es inmediata porque las activaciones de la unidad de salida son realmente probabilidades de la pertenencia a una clase, y por lo tanto son mucho más fáciles de interpretar. Los resultados de identificación puede ser ajustados correctamente usando el llamado factor de alisado para evitar identificaciones incorrectas.

#### 5.2.7 POST-PROCESADO Y ASIGNACIÓN DE CEPAS

Una vez se ensayaron las redes, los espectros FT-IR pertenecientes al conjunto de examen se interrogaron por la RNA correspondiente, para asignar así la correspondiente identificación. Se consideró la mejor red aquella que alcanza un buen rendimiento en la identificación, así como en el rechazo de patrones atípicos, lo cual significa niveles bajos de falsos negativos y falsos positivos. La función de post-procesado realiza identificaciones comprobando los niveles de activación de la unidad de salida frente a dos umbrales ajustables: el nivel de aceptación y el nivel de rechazo. Se considera que la identificación es adecuada (desde el punto de vista técnico) si la unidad de salida tiene una activación por encima del umbral de aceptación, y las otras unidades por debajo del umbral de rechazo (en caso contrario no se alcanza identificación ya que el patrón no es asignado). Estos niveles de aceptación/rechazo se pueden interpretar como estimaciones de confianza: es decir, cuanto más alto es el nivel de aceptación, mayor es la confianza en la identificación alcanzada, y cuanto menor es el nivel del rechazo, mayor es la confianza en las asignaciones rechazadas. La opción extrema sería admitir la unidad de salida más alta de la RNA como valor de identificación, independientemente del valor alcanzado (el patrón desconocido se asigna a la neurona de salida con el valor más alto, o neurona ganadora), pero esta estrategia no se probó dado que ello no produciría ningún rechazo y un alto porcentaje de identificaciones erróneas. Se emplearon varios niveles de aceptación/rechazo para

comprobar cómo influyen en el porcentaje de identificaciones erróneas y patrones sin asignar.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES SUPERVISADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *C. JEJUNI* Y DE *C. COLI*

La Figura 5.5 muestra cómo funciona esquemáticamente una RNA, mostrando mediante intensidad de color la activación de neuronas en la capa de entrada, las capas ocultas y la capa de salida.

Los espectros IR obtenidos se dividieron previamente en tres sets o conjuntos: ensayo, verificación y prueba. El set de ensayo se utiliza solamente para obtener una correcta topología y para ajustar los pesos de la conexión. El set de verificación (usado solamente en las redes MLP, en las redes PNN se emplea un set conjunto ensayo/verificación) comprueba el funcionamiento basándose en el error de verificación, identifica la mejor red, y detiene el ensayo en caso de sobreaprendizaje (over-learning). El set de prueba proporciona una evaluación independiente (capacidad de generalización, o de identificación correcta de patrones no analizados anteriormente) del funcionamiento de la red. La capacidad de generalización se evaluó mediante el porcentaje de identificaciones correctas y de rechazos correctos. El porcentaje de rechazo nos indica la capacidad de la red de detectar cepas cuyo patrón no se incluye en la base de datos (detección de falsos positivos).

#### IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

---

**Set de ensayo/validación.** Una vez concluido el ensayo, las redes fueron primeramente interrogadas con los mismos sets de ensayo y validación. Para la identificación a nivel de especie, el número de iteraciones del ensayo (Tabla 5.2) fue de 100 (MLP,  $w_4$ ), y 80 (MLP,  $w_5$ ). Las redes PNN no necesitan realizar iteraciones para alcanzar la convergencia necesaria. Se obtuvo un error final de ensayo más bajo para la red MLP, lo que indica un mejor funcionamiento global y un mejor ajuste. Para ambas redes, todas las cepas incluidas en los sets de ensayo y validación (100% de 40 patrones espectrales) fueron asignadas correctamente a sus clases respectivas (dos especies), independientemente del tipo de red o ventana. Este resultado no es sorprendente, puesto que estos tipos de redes neuronales pueden ajustar a cualquier función con la exactitud requerida. La mayor parte de los autores alcanzan un éxito del 100% al trabajar con el set de ensayo (Giacomini et al., 2000; Goodacre et al., 1996; Moschetti et al., 2001; Tintelnot et al., 2000).

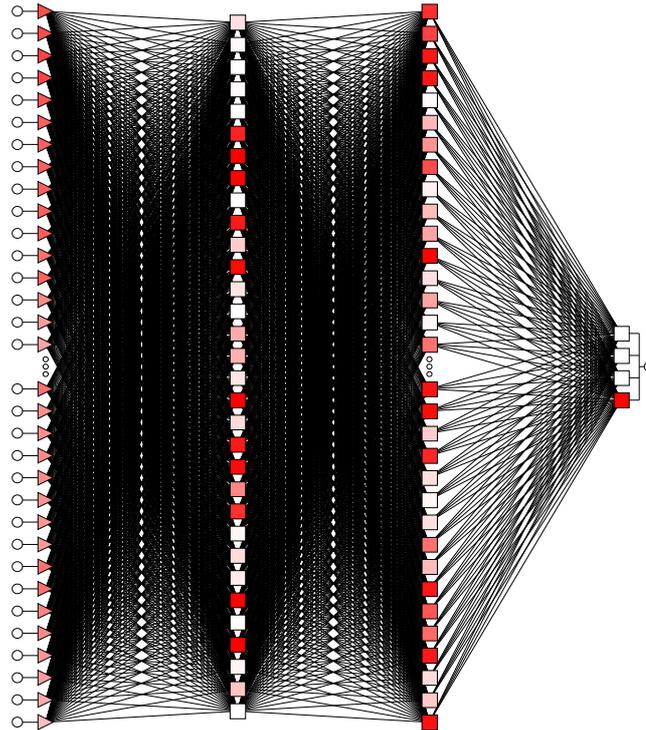


FIGURA 5.5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA RED NEURONAL ARTIFICIAL EN FUNCIONAMIENTO, MOSTRANDO MEDIANTE INTENSIDAD DE COLOR LA ACTIVACIÓN DE NEURONAS EN LA CAPA DE ENTRADA, LAS CAPAS OCULTAS Y LA CAPA DE SALIDA

**Set de datos de prueba.** La Tabla 5.2 muestra asimismo los porcentajes de éxito en el reconocimiento de patrones para el set de datos de prueba (60 patrones espectrales). Para la identificación a nivel de especie (Tabla 5.2) se obtuvieron identificaciones del 100% con las dos RNA, para el rango  $w_4$  y con un nivel del aceptación/rechazo de 50/50. Sin embargo el rango de ventana empleado fue determinante, ya que la ventana  $w_5$  ofreció valores menores en identificación. Con la MLP se identificaron correctamente 59 cepas de 60 (98,3%) y con la PNN, 58 (96,7%).

Uno de los objetivos principales del estudio era comprobar si las RNAs eran capaces de discriminar entre patrones estrechamente relacionados pertenecientes a otras cepas de *Campylobacter* y otros géneros. Esto conferiría a las RNAs una ventaja con respecto a otras técnicas multivariantes tales como el análisis cluster o el análisis discriminante. Con este objetivo, se emplearon varios patrones atípicos (Tabla 5.1). La red MLP dejó sin asignar todos los patrones atípicos. Por el contrario, el PNN identificó erróneamente varios patrones, asignando las huellas digitales de *C. lari* como pertenecientes a *C. jejuni* D. Así pues la capacidad de las redes para detectar elementos atípicos fue distinta, comportándose mejor la red MLP, que consiguió un 100% de detección tanto con el rango  $w_4$  como con el  $w_5$ . Por el contrario, la red PNN obtuvo porcentajes muy bajos, y no fue capaz de detectar 3 cepas de 21 (85,71%) para el rango  $w_4$  y 5 cepas de 21 (76,19%) para el rango  $w_5$ .

La efectividad de las RNAs en la identificación (expresado por las ratios de identificación y rechazo) está influida por varios factores: el tipo y la complejidad de la red, la calidad y el número de patrones en los datos del set de ensayo, y el equilibrio entre el set de ensayo (número de ejemplos de ensayo para cada clase a identificar) (Al-Haddad et al., 2000; Basheer and Hajmeer, 2000; Moschetti et al., 2001). Aunque ambos tipos de redes (MLP, PNN) presentaron buenos porcentajes de identificación, la red MLP de cuatro capas ofreció resultados más positivos. La calidad de los datos de ensayo influyó también significativamente ya que de las dos ventanas usadas como entradas (Tabla 5.2), el rango  $w_4$  de la ventana obtuvo las ratios más altas de identificación y esto además de acuerdo con sus mejores propiedades de reproductibilidad (ver Capítulo 0). La variabilidad dentro del rango  $w_5$  es más alta que la de  $w_4$ , e impide una buena discriminación por las RNAs. A pesar de emplearse sets de ensayo pequeños (40 patrones) en comparación el set de prueba (para que el proceso de computación no se sobrecargara), éste no interfirió en la capacidad de identificación de las redes, como describen otros autores (Carson et al., 1995; Freeman et al., 1994; Giacomini et al., 2000; Goodacre et al., 1994). El set de ensayo tenía el tamaño y la calidad adecuadas para cubrir todas las variaciones biológicas intragenotípicas dentro de cada taxón. Por esta razón, el set de ensayo no estaba equilibrado (los genotipos que demostraban alta variabilidad interna estaban sobrerrepresentados), pero el funcionamiento de las redes neuronales artificiales no se vio afectado.

**TABLA 5.2. FUNCIONAMIENTO DE DOS RNAs CON RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE DE *C. COLI* Y *C. JEJUNI* EMPLEANDO LA PRIMERA DERIVADA DE ESPECTROS DE FT-IR DEL SET DE PRUEBA, CON UN NIVEL DE ACEPTACIÓN/RECHAZO DE 0,5/0,5.**

Identificación a nivel de especie				
Tipo de red	MLP		PNN	
	$w_4$	$w_5$	$w_4$	$w_5$
Rango IR				
Topología	300-38-38-2	200-36-36-2	300-27-2	200-27-2
Nº de iteraciones	100	80		
Error final (training sum-square)	0,003342	0,004954	0,001301	0,00251
Error final (test sum-square)	0,177627	0,144983	0,213745	0,293414
% cepas correctamente identificadas	100	98,33	100	96,67
% cepas erróneamente identificadas	0,0	1,67	0	3,33
% cepas no asignadas	0	0	0	0
% de valor de rechazo correcto	100	100	85,71	76,19

La Figura 5.6 y la Figura 5.7 muestran el porcentaje de éxito de la RNA MLP al modificar el nivel de aceptación/rechazo, para los rangos  $w_4$  y  $w_5$ , respectivamente. Un nivel más alto de aceptación aumenta la confianza de la identificación, puesto que los patrones “dudosos” se dejan sin asignar. La confianza de la identificación puede ser medida y ajustada de esta manera, lo cual es importante en identificaciones que requieren rigurosidad como la identificación de patógenos. Para la red MLP, bajando el nivel de aceptación no se aumentó el porcentaje de identificaciones incorrectas. Otros autores han obtenido porcentajes de éxito variables aunque las diferencias en la metodología y en la tipología de RNAs no facilitan una comparación directa. Por ejemplo, usando una combinación de 3 patrones genómicos distintos, con tres redes de MLP se obtuvo un 100% de éxito en identificación (Tuang et al., 1999). Se han obtenido también porcentajes superiores al 80%, superando métodos tales como el análisis discriminante (Moschetti et al., 2001). Tintelnot *et al.* (2000a) obtuvieron un 100% de discriminaciones entre dos especies de *Candida*.

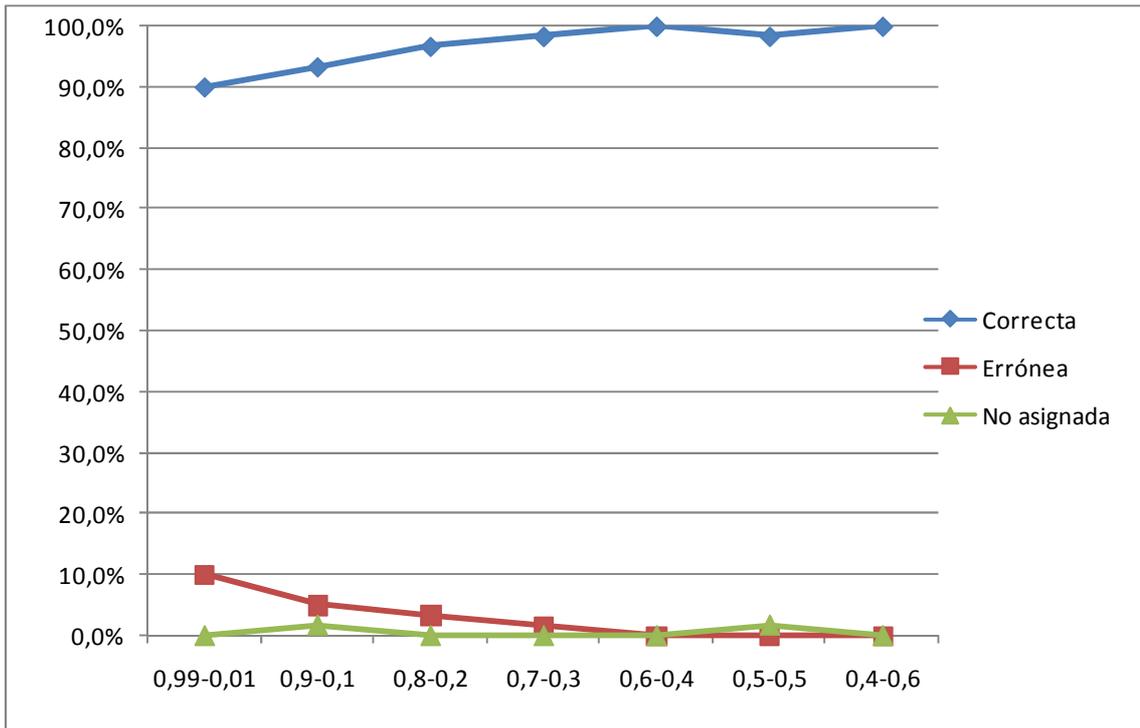


FIGURA 5.6. RESULTADOS DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA PARA LA RNA. FUNCIONAMIENTO DE LA RED MLP (% IDENTIFICACIONES CORRECTAS, ERRÓNEAS Y SIN ASIGNAR) PARA EL SET DE PRUEBA, EN EL RANGO  $W_4$ , EMPLEANDO DISTINTOS NIVELES DE ACEPTACIÓN/RECHAZO

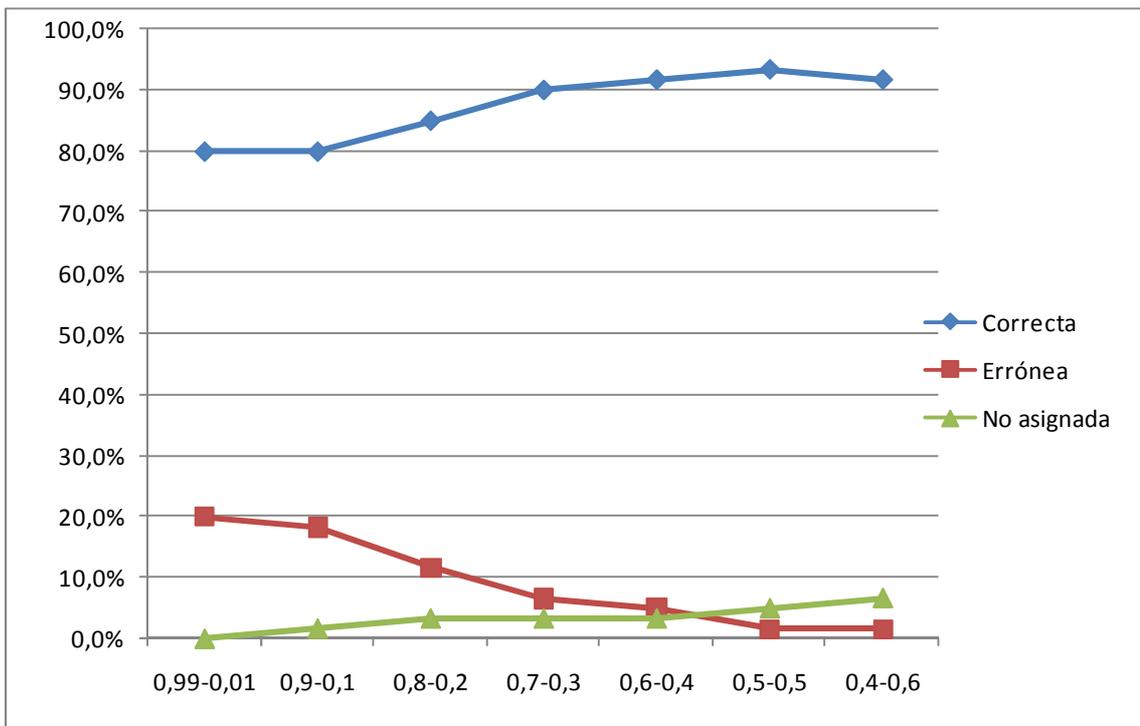


FIGURA 5.7. RESULTADOS DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA PARA LA RNA. FUNCIONAMIENTO DE LA RED MLP (% IDENTIFICACIONES CORRECTAS, ERRÓNEAS Y SIN ASIGNAR) PARA EL SET DE PRUEBA, EN EL RANGO  $W_5$ , EMPLEANDO DISTINTOS NIVELES DE ACEPTACIÓN/RECHAZO.

En lo referente a la complejidad de la red, las redes MLP de cuatro capas con grandes sets de entrada (300 ó 200 puntos de las ventanas  $w_4$  y  $w_5$ ), con topología compleja (elevado número de neuronas de entrada y ocultas), era más lenta de ensayar pero no demostró problemas de sobreajuste (over-fitting) y por esa razón, se asumió que las técnicas para reducir la multidimensionalidad de los datos (PCA, (Goodacre et al., 1996); ANOVA, (Tintelnot et al., 2000)) eran innecesarias, simplificando el pre-procesado.

#### IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE SUBESPECIE

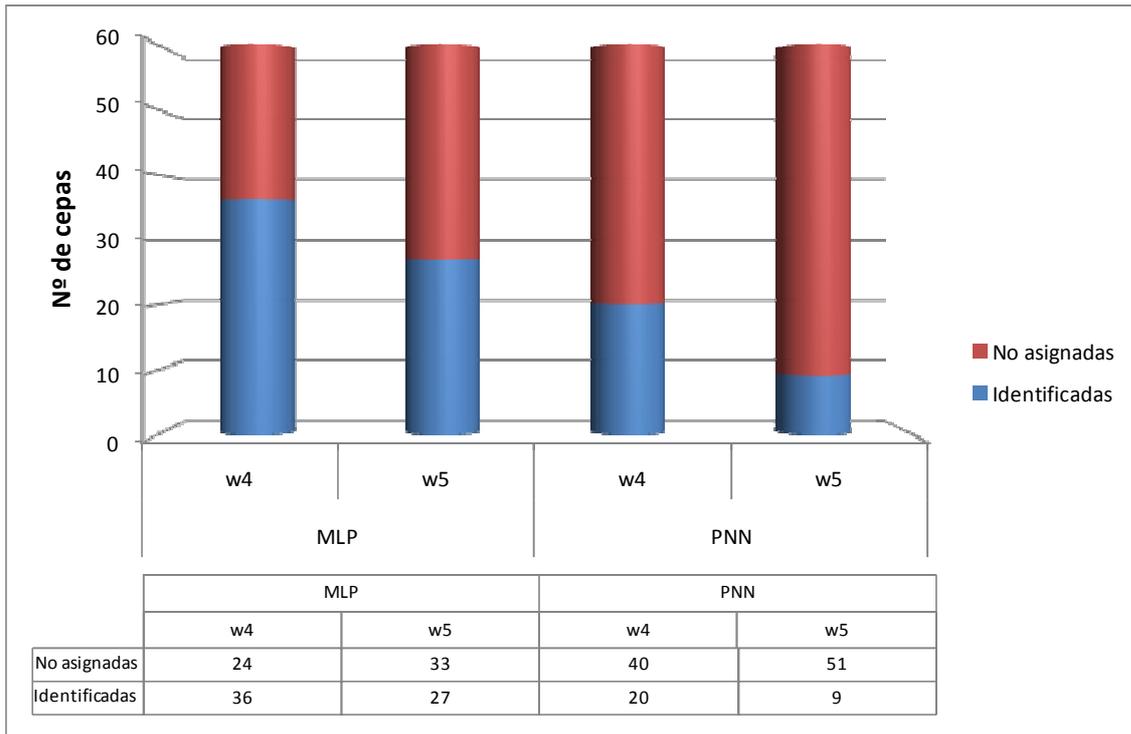
Los resultados mostrados en el anterior apartado ilustran la capacidad de la red neuronal artificial de cuatro capas para procesar los datos espectrales de FT-IR. En este experimento se quiso comprobar la capacidad de discriminación entre un número limitado de genotipos de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, teniendo en cuenta que presumiblemente, en las cepas de campo aisladas, no se encontrarían los patrones incluidos en la base de datos, y considerando el éxito obtenido en la identificación a nivel de especie. Los resultados obtenidos (Tabla 5.3) indican que las redes alcanzaron bajos porcentajes de identificación, lo que sería atribuible a la calidad del set de ensayo/verificación, que no contenía la mayoría de patrones espectrales pertenecientes a los genotipos presentes en las cepas de campo aisladas en nuestros experimentos anteriores. Así, empleando la ventana  $w_4$ , la red MLP consiguió asignar un 60% de las cepas, y la PNN, un exiguo 33,33%. Por su parte, utilizando la ventana  $w_5$  como datos de entrada, la red MLP alcanzó un 45% de asignación (27 cepas) y la PNN un 15% (9 cepas) (Figura 5.8).

Estos resultados ponen de manifiesto, 1), la capacidad de las redes para dejar sin asignar los patrones no reconocidos en la base de datos, lo cual es una cualidad importante en los procedimientos de identificación, 2) que las bases de datos basadas en tipos FT-IR necesitan un gran número de patrones para que espectros nuevos puedan ser asignados con fiabilidad, 3), la necesidad de contar con patrones de calidad, lo que se pone de manifiesto observando la diferencia en eficiencia entre las ventanas  $w_4$  y  $w_5$ .

**TABLA 5.3. FUNCIONAMIENTO DE DOS RNA CON RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE SUBESPECIE DE *C. COLI* Y *C. JEJUNI* (4 GENOTIPOS) EMPLEANDO LA PRIMERA DERIVADA DE ESPECTROS IR, CON UN NIVEL DE ACEPTACIÓN/RECHAZO DE 0,5/0,5**

Identificación a nivel de subespecie				
Tipo de red	MLP		PNN	
	W <sub>4</sub>	W <sub>5</sub>	W <sub>4</sub>	W <sub>5</sub>
Rango IR				
Topología	300-46-46-4	200-43-43-4	300-24-4	200-24-4
Nº de iteraciones	310	250		
Error final (training sum-square)	0,08342	0,1249	0,0332	0,07841
Error final (test sum-square)	0,431747	0,557491	0,21281	0,649314
% cepas identificadas	60,00	45	33,33	15
% cepas no asignadas	40,00	55	66,67	85

La mayoría de las redes MLP desarrolladas para identificación microbiana se componen de 3 capas (con una única capa oculta), y la topología de cuatro capas no se ha utilizado apenas. En cualquier caso, al aumentar el número de neuronas en capas ocultas, igualmente lo hace la capacidad de modelización de la RNA (ajuste a patrones y capacidad de reconocimiento), pero también se enlentece el ensayo, y hay una tendencia mayor al sobreajuste (overfitting). Las RNAs desarrolladas con topología MLP de cuatro capas eran superiores en su funcionamiento, no viéndose afectada la capacidad de generalización. Las redes de cuatro capas han demostrado ser más eficaces que las de tres capas en la solución de problemas de gran complejidad, como por ejemplo el análisis gráfico de electroencefalogramas (Zhang and Roy, 2006) o la extracción de información (Han et al., 2003). De los resultados obtenidos se infiere que el reconocimiento de espectros derivatizados se consigue mejor con redes de cuatro capas. Es de destacar que se emplearon rangos completos del espectro ( $w_4$  y  $w_5$ ) como datos de entrada, y quizás esto explica el excelente comportamiento de este tipo de RNAs.



**FIGURA 5.8. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE SUBESPECIE DE *C. COLI* Y *C. JEJUNI* (4 GENOTIPOS) EMPLEANDO LA PRIMERA DERIVADA DE ESPECTROS IR, PARA DOS VENTANAS ESPECTRALES ( $w_4$  Y  $w_5$ ), EMPLEANDO DOS RNAs (MLP Y PNN), CON UN NIVEL DE ACEPTACIÓN/RECHAZO DE 0,5/0,5.**

Los dos prototipos de RNA, perceptron multicapa (MLP) y neuronal probabilística (PNN), fueron utilizados para analizar los datos de los espectros IR obtenidos de células intactas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Para establecer un procedimiento de identificación y tipificado consistente, los espectros infrarrojos medios de estas especies fueron obtenidos mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR). Los patrones de FT-IR de 81 cepas fueron preprocesados (normalizado, alisado y derivatización) y agrupados en sets de ensayo, de verificación y de prueba. Las dos topologías probadas (PNN, MLP) fueron desarrolladas y ensayadas para identificar o rechazar un número de patrones IR. Dos rangos de ventana ( $w_4$ , 1200 - 900  $\text{cm}^{-1}$ ; y  $w_5$ , 900 - 700  $\text{cm}^{-1}$ ) en el espectro medio IR se usaron como entrada a modelos de RNA empleados como sistemas de reconocimiento de patrón. Independientemente del sistema de RNA utilizado, todos los sets de ensayo fueron identificados correctamente a nivel de especie. Para el set de prueba, la red de cuatro capas de MLP resultó apropiada para reconocer datos de FT-IR puesto que identificó correctamente el 99,16% de patrones previamente desconocidos usando la ventana  $w_4$ , y consiguió detectar patrones atípicos de cepas estrechamente relacionadas de *Campylobacter* y otras especies bacterianas. La red PNN obtuvo porcentajes más bajos en asignación y rechazo. En conjunto, las RNAs constituyen una herramienta matemática excelente en la identificación microbiana, puesto que pueden

reconocer con un alto grado de confianza huellas digitales FT-IR típicas y atípicas de *Campylobacter* spp.

En el procedimiento de identificación de RNA desarrollado, una característica es la eficiencia desde el punto de vista del tiempo empleado puesto que elimina los pasos intermedios en el análisis matemático, simplemente realizando asignaciones a desconocidos. Si la red es desarrollada adecuadamente y se ensaya con los patrones de calidad, logra índices excelentes en la identificación y el rechazo, eliminando los problemas comunes en los ejercicios de identificación, tales como la existencia de falsos negativos y de falsos positivos.



## 6 CAPÍTULO VI. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y TIPOS DE *CAMPYLOBACTER* EMPLEANDO ESPECTROS INFRARROJOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE (SDA E INDICE DE DIFERENCIACIÓN)

### 6.1 INTRODUCCIÓN

#### 6.1.1 SISTEMÁTICA BACTERIANA

En Taxonomía bacteriana, la Clasificación es el agrupamiento de organismos en grupos taxonómicos sobre la base de las relaciones o similitudes entre sus características. La Identificación se define como el proceso mediante el cual se asigna un elemento desconocido, representado por un conjunto de caracteres, a un grupo taxonómico encuadrado en una clasificación previa establecida y nominada. Es, por tanto, un proceso secundario en el tiempo, que presupone la existencia de información, adecuadamente catalogada, sin la cual el proceso posterior de asignación resulta infructuoso. Tanto la clasificación como la identificación hacen uso de técnicas matemáticas de agrupamiento y asignación. Clasificación e Identificación, forman, juntamente con la Nomenclatura (el proceso de asignar nombres a los grupos taxonómicos), lo que es conocido como Sistemática, que estudia la diversidad y los vínculos entre los organismos (Magee, 1993; Priest and Williams, 1993).

#### 6.1.2 IDENTIFICACIÓN

Entre los elementos comunes en todo proceso de asignación o identificación, se encuentran:

- Base de datos fenotípicos o genotípicos donde se ordena la información referente a los diferentes grupos taxonómicos.
- Elemento desconocido (a identificar) definido por un conjunto de caracteres fenotípicos o genotípicos.
- Procedimientos matemáticos empleados para asignar el elemento desconocido al grupo taxonómico. Estos procedimientos comparan el elemento desconocido con la base de datos, midiéndose el grado de semejanza por medio de diversos coeficientes.

El éxito del procedimiento de identificación va a depender de la clasificación previa, así como de la cantidad y calidad de los atributos utilizados en la caracterización. Por supuesto, la comparación matemática es clave.

Existen disponibles una gran variedad de métodos fenotípicos y genotípicos para la clasificación e identificación de microorganismos patógenos, incluyendo *Campylobacter* (Moore and Madden, 2003; Wassenaar and Newell, 2000). Muchos de estos métodos generan patrones complejos cuya interpretación en los procesos de

clasificación e identificación necesita de técnicas estadísticas multivariantes (Moschetti et al., 2001). Entre las técnicas que ya se han descrito anteriormente se incluyen PFGE, AFLP, RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR), o FT-IR. El tratamiento estadístico para clasificación de los patrones genotípicos o fenotípicos conlleva el cálculo de una matriz de similitudes o distancias y el uso de un procedimiento de agrupamiento como el análisis cluster (Mouwen et al., 2005). Una vez se dispone de una base de datos de patrones sistematizados (clasificados y nombrados) se puede realizar identificaciones o asignaciones de patrones desconocidos a los grupos ya establecidos.

Entre los métodos para asignar elementos desconocidos a grupos ya establecidos está el análisis discriminante, mediante el cual se calculan funciones lineales (variables canónicas) de las variables que permiten una mejor discriminación de los taxones a diferenciar, al estar más cercanos al centroide de un grupo (Jackson et al., 1996; Jenrich, 1960; Moschetti et al., 2001). Otro procedimiento es el empleo de coeficientes que miden el grado de semejanza entre el elemento a identificar y los elementos incluidos en la base de datos. Un ejemplo de ello es el Índice de Diferenciación (Dziuba et al., 2007; Keirse et al., 2006; Naumann et al., 1988; Naumann, 2000), que se ha empleado ocasionalmente en procesos de identificación.

### 6.1.3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se ha pretendido evaluar y comparar la eficacia de dos sistemas de identificación numéricos (Análisis discriminante e Índice de Diferenciación), con el propósito final de minimizar los falsos negativos y falsos positivos que pueden interferir en sistemas de identificación asistidos por ordenador, especialmente importantes si se trabaja con microorganismos patógenos. Para ello se ha hecho uso de una base de datos de espectros IR pertenecientes a especies de *Campylobacter*, con el suficiente grado de separación taxonómica para permitir el uso de coeficientes de distancia o similitud.

## 6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

En la Figura 6.1 y la Figura 6.2 se presentan los protocolos seguidos en los que se incluyen las etapas de preparación y análisis de las muestras, así como el desarrollo de las bases de datos, y la realización del proceso de identificación, bien con el Índice de Diferenciación o mediante el Análisis Discriminante (SDA).

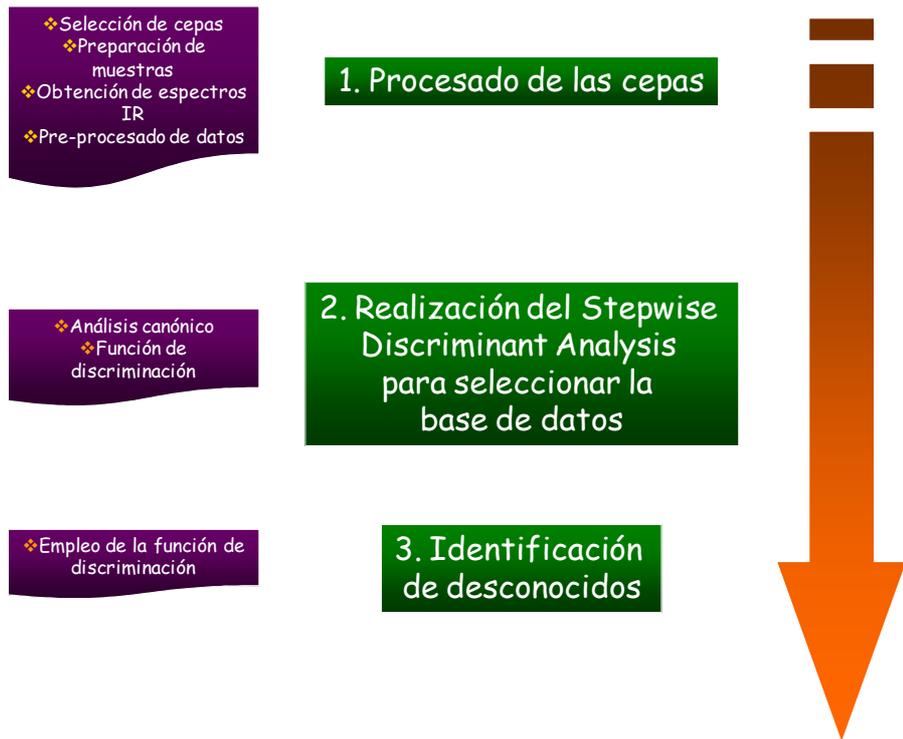


FIGURA 6.1. PASOS SEGUIDOS EN LA PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN USANDO SDA.

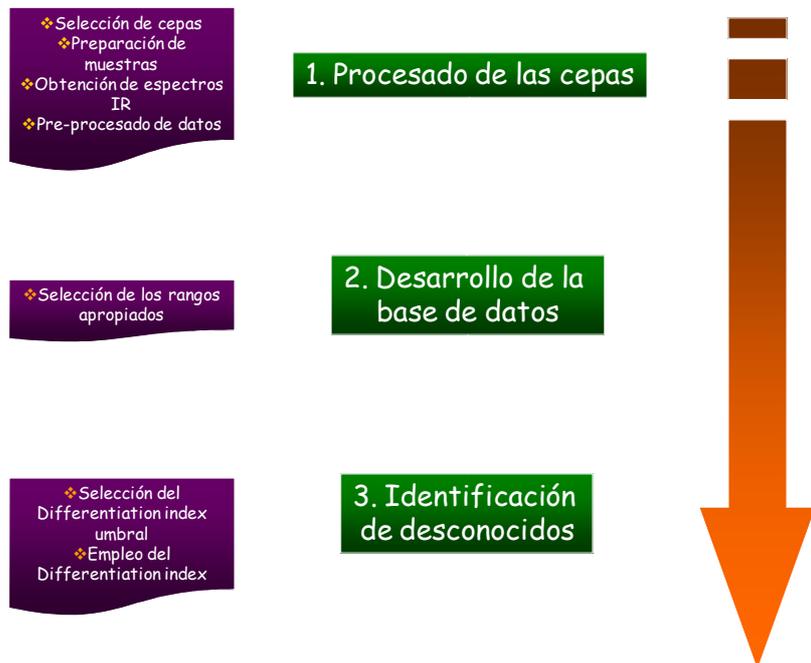


FIGURA 6.2. PASOS SEGUIDOS EN LA PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN USANDO EL ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN (D).

### 6.2.1 CEPAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN CON SDA E ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN *D*

Para la construcción de la base de datos se seleccionó un grupo de cepas previamente identificadas de *Campylobacter* termofílicos (Tabla 6.1), pertenecientes a las especies *C. coli* y *C. jejuni*, previamente genotipificadas en 4 tipos ERIC-PCR (Mouwen et al., 2005; Weijtens et al., 1999). Además, se incluyeron en el análisis otras cepas tipo del género *Campylobacter* (Tabla 6.1) para probar la capacidad del sistema de identificación de detección de falsos positivos o rechazo. El resto de las cepas (20) permitió comprobar la capacidad de los sistemas en identificación y detección de falsos positivos. El mantenimiento de cepas y preparación de los inóculos se realizó como se ha descrito en 5.2.1.

TABLA 6.1. IDENTIDAD, PERFIL ERIC-PCR, NÚMERO, Y CÓDIGO DE LAS CEPAS DE REFERENCIA INCLUIDAS EN LA BASE DE DATOS PARA LA IDENTIFICACIÓN

Especie	Perfil ERIC-PCR	Nº cepas	Código	Espectros
<i>Campylobacter coli</i>	A	3	25w, 26w, 27w	3
<i>Campylobacter coli</i>	C	3	371w, 425w, 427w	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	B	3	22w, 503w, 222w	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	D	3	34w, 38w, 45w	3
<i>Campylobacter lari</i>		1	CCUG 19512	3
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>		1	CCUG 24982	3
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		1	CCUG 19559	3
<i>Escherichia coli</i>		1	CECT 101	3
<i>Lactobacillus sakei</i>		1	DSM 20017	3
<i>Lactobacillus plantarum</i>		1	CECT 220	3
<i>Weissella viridescens</i>		1	ATCC 12706	3
<i>C. jejuni</i>		18	6, 10, 13, 32, 40, 42, 47, 71, 105, 111, 131, 156, 167, 183, 198, 204, 305, 306	54
<i>C. coli</i>		2	165, 302	6

### 6.2.2 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS FT-IR

Tras recogerse las colonias de la superficie de las placas de agar Brain Heart Infusion (BHIA) con asa de platino estéril, se suspendieron en 100 µl de agua estéril destilada y colocaron en una ventana de ZnSe, y se secaron en estufa (5 minutos, 60°C). Los espectros IR se midieron empleando un espectroscopio FT-IR (Perkin-Elmer System 2000 FT-IR) equipado con un detector DTGS. Las medidas se registraron en el rango 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, con intervalo de 1 cm<sup>-1</sup> y resolución espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Se promediaron 20 espectros para obtener el espectro final. Los espectros IR se almacenaron digitalmente para la transformación posterior.

### 6.2.3 PROCESADO PREVIO

Los espectros IR se procesaron (Transform.oy, "IR Data Manager", Perkin-Elmer) conforme a lo explicado en el capítulo IV. El alisado (10 puntos de alisado) se realizó para reducir la cantidad de ruido. Se realizó una normalización (valor de absorción mínimo a  $1800\text{ cm}^{-1}$ , puesto a 0; valor de absorción máximo a alrededor de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , puesto a 1) para reducir al mínimo cambios y desviaciones de la línea de fondo. La primera derivada (algoritmo Savitzky-Golay) se aplicó para realzar la resolución espectral. Finalmente, se escogió la parte más significativa del espectro ( $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ ;  $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ).

### 6.2.4 DESARROLLO DE LA BASE DE DATOS

Como primer paso del proceso de identificación, se creó una base de datos de referencia incluyendo un rango (450 puntos de las ventanas  $w_1$ ,  $w_4$  y  $w_5$ ) perteneciente a espectros IR (primera derivada) seleccionados de un número de cepas reducido (7). En comparación con la base de datos empleada en la identificación empleando RNA, la base de datos es mucho más reducida ya que teóricamente el proceso de identificación no requiere de muchos patrones IR, aunque sí se necesita que incluya una amplia representación de taxones caracterizados para que se produzcan identificaciones correctas. Aun disponiendo de un número bajo de cepas de referencia, se optó por limitar el número de réplicas, e incluir sólo aquellas genotipadas.

### 6.2.5 EMPLEO DEL ÍNDICE DE DIFERENCIACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de espectros IR se calculó el índice de diferenciación (Differentiation Index,  $D$ ; (Naumann, 2000)), que representa una medida de la similitud o diferencias existentes entre dos espectros IR.

$$r_{y_1y_2} = \frac{\sum_{i=1}^n y_{1i} y_{2i} - n \bar{y}_1 \bar{y}_2}{\sqrt{\sum_{i=1}^n y_{1i}^2 - n \bar{y}_1^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_{2i}^2 - n \bar{y}_2^2}}$$

En donde  $y_{1i}$ ,  $y_{2i}$  son valores individuales de absorbancia de los dos espectros a comparar;  $n$  es el número de puntos en el rango de espectro a comparar;  $\bar{y}_1$  y  $\bar{y}_2$  son los valores de media aritmética de  $y_1$  y  $y_2$ . Del valor del coeficiente de correlación obtenido, ( $r_{y_1y_2}$ ), se define el Índice de diferenciación  $D_{y_1y_2}$  de acuerdo a la ecuación:  $D_{y_1y_2} = (1 - r_{y_1y_2}) * 1000$ .  $D^4$  puede tener valores entre 0 y 2000.

---

<sup>4</sup>  $D$  será cero cuando los valores en los rangos espectrales son idénticos, 1000 para valores que presentan una correlación inversa, y 2000 para espectros con correlación completa negativa (espectros no correlacionados).

El índice de Diferenciación ( $D$ ) se obtuvo empleando una fracción del espectro IR (primera derivada) perteneciente a las ventanas  $w_1$ ,  $w_4$  y  $w_5$  compuesta de 450 puntos, comparando dicha fracción del espectro a examen con los espectros de taxones incluidos en la base de datos. En el proceso de identificación, el espectro a identificar se compara con todos aquellos incluidos en la base de datos, asignándose a aquél cuyo valor  $D$  es inferior. De acuerdo a la fórmula matemática, un valor  $D$  próximo a cero nos indica un alto grado de similitud entre los espectros comparados. De manera empírica se ha determinado que cuando se emplea el índice de diferenciación  $D$  para evaluar la similitud entre dos cepas, valores globales inferiores a 10 se consideran adecuados al analizar réplicas de muestras preparadas en ensayos independientes, y los valores  $D$  pueden ser de hasta 300 al comparar cepas de distintos géneros (Naumann, 2000). En otros estudios se acepta generalmente que valores inferiores a 75 indican que las cepas a estudio pertenecen a la misma especie (Mouwen et al., 2005). Hay que puntualizar que estos valores se ven influidos por la heterogeneidad del grupo microbiano a estudio y la variabilidad en su composición química.

#### 6.2.6 ANÁLISIS DISCRIMINANTE COMO MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN

Se empleó un análisis discriminante (SDA, Stepwise Discriminant Analysis) (Jenrich, 1960) para seleccionar la parte del espectro (números de onda individuales) con el mayor poder de discriminación. En primer término se llevó a cabo un análisis canónico (canonical analysis) para crear una función de clasificación que permitiera diferenciar las cepas de la base de datos (a nivel de especie/subespecie). En procedimientos de identificación supervisados como el SDA, se lleva a cabo una clasificación previa de los elementos antes del análisis. En nuestro estudio, se pre-clasificaron las cepas de referencia en 7 grupos o clases, de acuerdo a los taxones identificados o genotipados disponibles.

El análisis canónico maximiza la varianza existente entre categorías o clases y minimiza la presente dentro de cada grupo o clase. Durante el desarrollo de la función discriminante, se añaden o eliminan variables en función de su efecto sobre el parámetro lambda de Wilks (relación entre la variabilidad general intra-categoría y la variabilidad total) y su significación estadística medida por un test F. Se estiman las funciones lineales (variables canónicas) de las variables que dan lugar a la mejor discriminación de casos entre los grupos/clases predefinidos, y los casos sin asignar se atribuyen mediante la función de clasificación al grupo para el que se obtiene la mayor puntuación, o de manera equivalente, al grupo cuyo centroide está más próximo. Los valores canónicos (scores) y la distancia Mahalanobis se calculan de igual manera para presentar elementos gráficos en dos dimensiones. La distancia Mahalanobis,  $M$ , se define como  $M_{12}=(x_1-x_2)S^{-1}(x_1-x_2)$ , en donde  $S$  es la estimación conjunta de la matriz de covarianza intra-grupos y  $x_1$  y  $x_2$  son los vectores medios para los dos grupos. Así,  $M_{12}$  es la distancia entre grupos en unidades de desviación estándar intra-grupos.

Todos los análisis, (incluyendo el cálculo de coeficientes, el agrupamiento de variables, el análisis canónico y los gráficos) se realizaron con el programa Statistica for Windows v. 4.5 (Statsoft Inc., USA).

## 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.3.1 IDENTIFICACIÓN BASADA EN SDA

Para construir el esquema de identificación, se realizó un SDA usando la ventana  $w_4$  ( $1,200-900 \text{ cm}^{-1}$ ) con las cepas de referencia (7 cepas pertenecientes al género *Campylobacter*, Tabla 6.1). El proceso matemático seleccionó 15 puntos (números de onda) como parte de la función discriminante de identificación. La significación estadística de la separación de los grupos se detecta mediante la F ratio. El F ratio se calcula para cada pareja de clases o grupos, y el estadístico F se compara con la distribución F. Este valor (F) superó el valor crítico ( $P < 0.001$ ) (lo que indica que la varianza entre grupos es superior a la varianza intra-grupos) para todas las clases (7) consideradas. La separación de las clases previamente definidas se aprecia en la Figura 6.3 donde se presenta el gráfico con las dos primeras dimensiones canónicas.

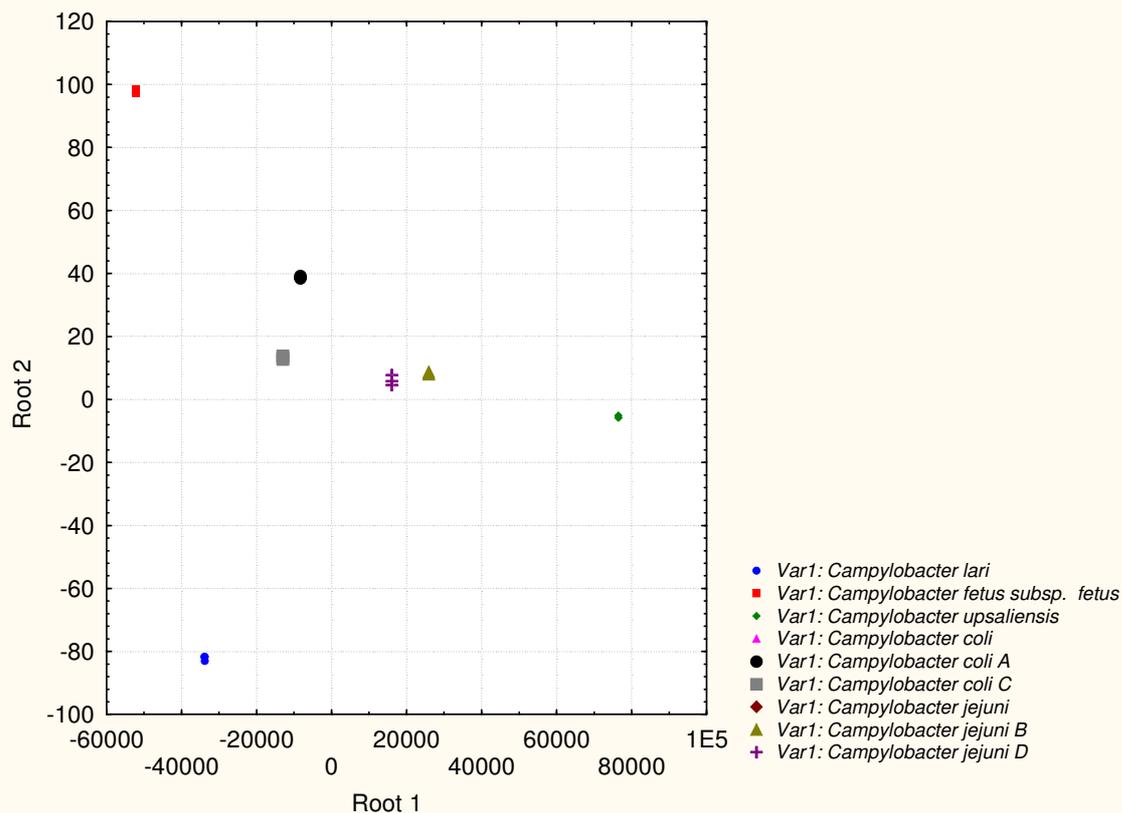


FIGURA 6.3. DIFERENCIACIÓN DE 7 CEPAS DE REFERENCIA DE *CAMPYLOBACTER* EMPLEANDO LOS COEFICIENTES DE LAS DIMENSIONES CANÓNICAS PRIMERA Y SEGUNDA EXTRAÍDAS DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE DE LA DERIVADA SEGUNDA DEL ESPECTRO IR EN EL RANGO 1,200-900  $\text{cm}^{-1}$ . SE INCLUYERON TRES RÉPLICAS PERTENECIENTES A LAS CEPAS DE REFERENCIA.

### 6.3.2 IDENTIFICACIÓN BASADA EN EL ÍNDICE $D$

La identificación empleando el índice de diferenciación permitió la asignación de 21 espectros, no pudiendo realizarse para 39 patrones. Todas estas identificaciones se realizaron alcanzándose valores  $D$  inferiores a 75. El valor de 75 indica que, para el rango empleado (450 puntos de las ventanas  $w_1$ ,  $w_4$  y  $w_5$ ) existe un 92,5% de similitud entre los espectros comparados. Este valor de 75 ha sido seleccionado de manera empírica, pudiéndose emplear otro valor cercano. El empleo de valores inferiores incrementa la seguridad de la identificación y al mismo tiempo reduce el porcentaje de asignaciones. Se consideró el valor  $D$  de 75 como el idóneo después de consultar la bibliografía, y a la vista de las pruebas realizadas con el valor  $D$  de 50 (9 espectros asignados) y de 100 (100% de espectros asignados).

### 6.3.3 COMPARACIÓN DE LOS TRES SISTEMAS EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* TERMOFÍLICOS

La Figura 6.4 presenta los resultados obtenidos por los tres sistemas de identificación empleados.

Los resultados muestran que las RNA poseen una mayor capacidad de discriminación e identificación, aunque debe señalarse que los porcentajes de identificación a nivel de subespecie son bajos. Las RNA identificaron al 60% de los espectros presentados mientras que el índice de diferenciación lo hizo con el 35% mientras que el SDA se quedó en el 25%. Estos porcentajes son en general muy inferiores a los obtenidos por otros autores, siendo usual encontrar valores superiores al 80-90% de cepas identificadas con sistemas clásicos o moleculares.

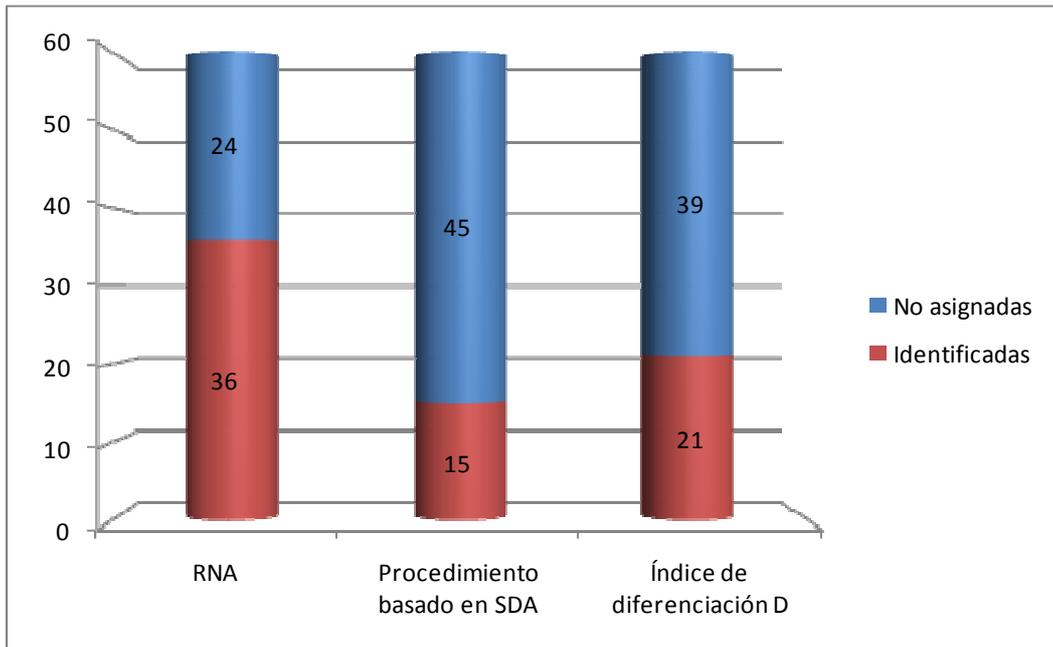


FIGURA 6.4. RESULTADOS DEL PROCESO DE IDENTIFICACIÓN REALIZADO POR LOS SISTEMAS RNA (REDES NEURONALES ARTIFICIALES, MLP CON 4 CAPAS Y RANGO DE ENTRADA  $w_4$ ), SDA (STEPWISE DISCRIMINANT ANALYSIS) Y D (DIFFERENTIATION INDEX) SOBRE EL CONJUNTO DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER*.

Existen varias razones que justifican estos pobres resultados en la identificación. En primer lugar, la base de de datos de referencia que se empleó era muy limitada en número y la representación de especies y genotipos mucho más reducida que la hallada por ejemplo en muestras de campo. Otro factor que puede tener gran influencia es el grado de diferenciación entre los distintos taxones, aunque el análisis SDA nos indica que la variabilidad intergrupos es muy superior a la intragrupos.

En cuanto a la diferencia en porcentaje de identificación entre los métodos, existen varias razones que explican la distinta capacidad y eficacia de los sistemas. Uno de los motivos es quizás el número de puntos utilizados en cada sistema, siendo el más bajo para el SDA (15). El sistema de RNA emplea un rango entero ( $w_4$  o  $w_5$ ) con lo que el número de puntos empleados es de 300 ó 200 respectivamente. En el caso del índice de discriminación, se emplearon 450 puntos. Quizás el motivo más importante sea las diferencias en los análisis matemáticos, las que explican la eficiencia en términos de

porcentajes de identificación. Las RNAs emplean un grupo de patrones de ensayo (datos de entrada emparejados con una salida deseada) como entrenamiento y ajustan las ponderaciones asociadas con las conexiones mediante iteraciones hasta minimizar el error. El modelo de red obtenido permite realizar identificaciones, al reconocer un patrón desconocido y asignarlo a un elemento de la base de datos, incluso en caso de datos erróneos, o incompletos.

## 7 CONCLUSIONES

1. La prevalencia media de *Campylobacter* termofílicos confirmados genotípicamente y detectada en el conjunto de muestras tomadas fue del 45,5%, lo que representa tasas inferiores a las registradas a nivel nacional en otros estudios. Según el lugar de muestreo, la prevalencia media fue del 44,8% en granja, 44,7% en matadero y 48,1% en comercio. Las muestras de broiler fueron las más contaminadas (55,6% global) seguidas por las de pollo ecológico (53,2%) y las de avestruz (30,4%). La prevalencia detectada en primavera fue del 43,4%, 61% en verano, 40,2% en otoño, y 39% en invierno.
2. La antibiorresistencia media encontrada en *Campylobacter* termofílicos fue del 55,0% considerando las cepas aisladas y confirmadas genotípicamente. La tasa de resistencia media hallada fue del 58,3% en pollo de cría ecológica, 57,0% en broilers y 46,2% en avestruz, lo que indica un importante uso de antibióticos en todos los tipos de producciones. Según el lugar de muestreo, la tasa de resistencia media hallada fue del 56,6% en granja, 55,7% en matadero y 51,0% en comercio minorista. Según la estación del año, la tasa de resistencia media hallada fue del 55,5% en primavera, 50,3% en verano, 56,9% en otoño y 59,5% en invierno.
3. La espectroscopía FT-IR posee propiedades apropiadas para su uso como método de caracterización y tipificación y para el estudio de relaciones taxonómicas entre las cepas. Puede asimismo emplearse en la identificación microbiana, requiriendo para ello una apropiada puesta a punto, una base de datos extensa y heterogénea, y un correcto análisis multivariante. Basándose en el análisis multivariante de los datos de espectros IR se observó un agrupamiento en función de la producción animal de procedencia, con las cepas aisladas de avestruz representando un clúster homogéneo y separado del resto.
4. Las Redes Neuronales Artificiales constituyen un procedimiento adecuado para su empleo en la identificación de *Campylobacter* mediante espectros IR, siempre que la base de datos sea cualitativa y cuantitativamente adecuada en la inclusión de taxones. Empleando redes de cuatro capas, la ventana  $w_4$  como datos de entrada y con un nivel de aceptación/rechazo de 50/50, se obtuvo un porcentaje de identificación a nivel de especie del 100% con las dos RNA. A nivel de subespecie, la red MLP consiguió asignar un 60% de las cepas, y la PNN, un 33,33%. Las redes mostraron una gran efectividad en la detección de falsos positivos. Empleando la ventana  $w_4$ , ambas redes

detectaron el 100% de patrones atípicos, descendiendo al 85,71% y 76,19% para MLP y PNN respectivamente cuando se utilizaba la ventana  $w_5$ .

5. Los procedimientos de identificación de *Campylobacter* a nivel de subespecie basados en el Análisis discriminante y el Índice de diferenciación obtuvieron resultados inferiores a las RNAs con porcentajes de identificación del 35% (*D*) y del 25% (*SDA*), mostrando que ambos poseen menor flexibilidad que las RNA y requieren de bases de datos amplias, no siendo además completamente eficaces en la detección de elementos atípicos.

## 8 ANEXO

### 8.1 GLOSARIO

**Absorbancia.** Unidad usada para la medición de la cantidad de radiación IR absorbida por una muestra. La absorbancia, empleada generalmente como unidad del eje Y en la representación de los espectros IR, viene definida por la Ley de Beer y es directamente proporcional a la concentración.

**Alisado.** Técnica de manipulación de espectros empleada para reducir la cantidad de “ruido” presente en el mismo.

**Aprendizaje supervisado.** Procedimiento empleado al disponer de conjuntos de datos de entrada previamente clasificados o cuya respuesta objetivo se conoce. En el aprendizaje no supervisado o autoorganizado, no necesitan de tal conjunto previo.

**Aprendizaje.** Consiste en proporcionar a la RNA datos como entrada a su vez que se le indica cuál es la salida (respuesta) esperada.

**Co-adición.** El proceso de añadir interferogramas para aumentar la relación señal/ruido.

**Corresistencia.** Se produce cuando la información genética que codifica varios mecanismos de resistencia no relacionados se transmite en una sola ocasión/un solo proceso (generalmente mediante elementos móviles tales como plásmidos) y se expresa en los nuevos huéspedes bacterianos.

**Detector DTGS (Deuterated Triglycine Sulfate).** Detector piroeléctrico de sulfato de triglicina deuterada. Usado en los espectroscopios FT-IR, dado su fácil manejo, buena sensibilidad, amplia respuesta espectral y excelente linealidad.

**Espectro de fondo (background).** Espectro adquirido sin muestra interpuesta en el haz infrarrojo. El objetivo de un espectro de fondo es medir la contribución del instrumental y del medio al espectro.

**Función de Activación.** Se utiliza para, en una neurona, definir la salida a partir de una entrada o un conjunto de entradas. La función de activación combina el potencial postsináptico, que nos proporciona la función de propagación, con el estado actual de la neurona para conseguir el estado futuro de activación de la neurona.

**Función de error.** Se usan al ensayar una RNA, existiendo varios tipos según el tipo de red. Por ejemplo, se puede emplear el criterio de mínimos cuadrados para medir el ajuste de la red entre el patrón de ensayo y el valor esperado (salida real y esperada). El error de la neurona se propaga normalmente dentro del algoritmo de aprendizaje de otra neurona. Este término de error es algunas veces denominado error actual. El error

nos da una medida de la capacidad del modelo para predecir los datos de ensayo/verificación.

**Función de propagación (o ponderación).** Se encarga de transformar las entradas que provienen de la sinapsis en el potencial de la neurona. Normalmente se usa como función de propagación la suma ponderada de las entradas multiplicadas por los pesos.

**Función de Salida.** Esta función convierte el estado de la neurona en la salida hacia la siguiente neurona que se transmite por las sinapsis. Usualmente no se considera y se toma la identidad, esto es, de manera que la salida es el propio estado de activación de la neurona.

**Gen doméstico (housekeeping gene).** Gen involucrado en el mantenimiento de las funciones básicas de la célula.

**Interferograma.** Es la medida original obtenida por un espectroscopio FT-IR, la cual sufre la transformación de Fourier para generar un espectro infrarrojo.

**Iteración o epoch.** Al realizarse el ensayo de la red neuronal, es una exposición única del conjunto de ensayo completo, seguida por la exposición del set de verificación.

**Longitud de onda.** Distancia entre dos máximos adyacentes o valles de una onda de luz.

**Neurona artificial.** Dispositivo simple de cálculo que, a partir de un vector de entrada procedente del exterior o de otras neuronas, proporciona una única respuesta o salida.

**Neurona.** Una unidad de la red neuronal.

**Normalización.** El resultado de dividir todos los valores de absorbancia de un espectro por el valor máximo de absorbancia. Ello sitúa la escala del eje Y en un valor entre 0 y 1.

**Número de onda.**  $1/\text{longitud de onda}$ ; la unidad del número de onda es  $\text{cm}^{-1}$ , y se emplean frecuentemente como unidades del eje X en la representación de los espectros infrarrojos ( $1 \mu\text{m} = 1,000 \text{ nm} = 10,000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{m} = 5,000 \text{ nm} = 2,000 \text{ cm}^{-1}$ ).

**Producción ecológica.** De acuerdo a lo establecido en el Reglamento (CE) Nº 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, la producción ecológica incluye el uso de métodos de producción conformes a las normas establecidas en dicho Reglamento en todas las etapas de la producción, preparación y distribución.

**Red Neuronal Probabilística (PNN).** Son un tipo de RNA que usa aproximaciones (basadas en kernel) para obtener una estimación de las funciones de densidad de probabilidad de clases para resolver un problema de clasificación.

**Red perceptron multicapa (MLP).** Son un tipo de RNA que constan de una capa de entrada y una capa de salida y una o más capas ocultas. Dichas capas se unen de forma total hacia delante, esto es, la capa entrada se une con la primera capa oculta y esta con la siguiente y la última capa oculta se une con la capa de salida (ver Figura 5.1).

**Redes neuronales artificiales (RNA).** Son sistemas que hacen uso de los principios conocidos de la organización del cerebro humano. Consisten en un número de procesadores independientes y simples, llamadas neuronas. Estas neuronas se comunican con otras por medio de conexiones ponderadas, los pesos sinápticos.

**Redes unidireccionales o feedforward.** Son redes multicapa, en las que las neuronas de cada capa reciben información de las de la capa precedente y la transmiten a la capa siguiente, y donde las neuronas no están interconectadas dentro de cada capa de la red.

**Resistencia cruzada.** Se refiere al fenómeno de resistencia antibiótica mediado por un mismo mecanismo bioquímico que confiere resistencia para múltiples drogas. El término Resistencia cruzada se usa para referirse a una cepa que posee un mecanismo de resistencia que le permite sobrevivir a los efectos de varias moléculas antimicrobianas.

**Resistencia múltiple o multirresistencia.** Se define cuando una cepa bacteriana es resistente a varios antimicrobianos o tipos de antimicrobianos distintos.

**Resolución.** Medida de la capacidad de un espectrómetro IR para distinguir rasgos o características en un espectro próximas entre sí. Por ejemplo, si dos atributos están separados por  $4 \text{ cm}^{-1}$  y pueden ser fácilmente distinguidos, el espectro tiene al menos una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

**Retropropagación (back propagation).** Es un potente algoritmo de ensayo muy usado en la mayor parte de las RNA, y muy apropiado para los ensayos con las redes perceptron multicapa. El sistema de ensayo retropropagación consiste en:

- Empezar con unos pesos sinápticos cualquiera (generalmente elegidos al azar).
- Ensayar unos datos de entrada elegidos al azar.
- Dejar que la red genere un vector de datos de salida (propagación hacia delante).
- Comparar la salida generada por la red con la salida deseada.
- La diferencia obtenida entre la salida generada y la deseada (denominada error) se usa para ajustar los pesos sinápticos de las neuronas de la capa de salida.
- El error se propaga hacia atrás (back-propagation), hacia la capa de neuronas anterior, y se usa para ajustar los pesos sinápticos en esta capa.
- Se continua propagando el error hacia atrás y ajustando los pesos hasta que se alcance la capa de entradas.

**Sobreaprendizaje.** Al emplear un algoritmo de ensayo iterativo, se produce sobreaprendizaje cuando el algoritmo se ejecuta en muchas ocasiones (epochs), con lo que la red aprende los patrones del conjunto de ensayo de forma muy precisa, pero

pierde en capacidad de generalización al enfrentarse a nuevos datos del conjunto de validación.

**Topología de la RNA.** Se refiere a la estructura de la RNA incluyendo el número de elementos (neuronas de las distintas capas, etc.) así como a la interconexión entre ellos.

**Transformada de Fourier.** Cálculo realizado en un interferograma para convertirlo en un espectro infrarrojo.

**Umbral de clasificación.** Las RNA que realizan clasificación deben traducir el nivel de activación numérica de la neurona de salida a una variable nominal. En nuestro caso, el nivel de activación numérica de la neurona de salida determina la clase (o grupo taxonómico) de salida.

**Verificación cruzada (cross-verification, cross-validation).** Empleo de un conjunto de datos auxiliares (conjunto de verificación) durante el ensayo. Mientras que el conjunto de ensayo se usa para ajustar los pesos, el conjunto de verificación mantiene un control independiente que garantiza que la RNA aprende a generalizar.

## 8.2 ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

**AFLP.** Amplified Fragment Length Polymorphism

**Bp.** Pares de bases

**CSR.** Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union

**DALY.** Disability Adjusted Life Years

**DSMZ.** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

**DTGS.** Sulfato de triglicina deuterada

**ECDC.** European Center for Disease Prevention and Control

**EFSA.** European Food Safety Authority

**ELISA.** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

**ERIC-PCR.** Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction

**FT-IR spectroscopy (Fourier Transform Infrared spectroscopy).** Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier

**ICMSF.** International Commission on Microbiological Specifications for Foods

**ICSB.** International Committee on Systematic Bacteriology

**ICSP.** International Committee on Systematics of Prokaryotes

**IR.** Infrarrojos

**LPS.** Lipopolisacárido

**MAPA.** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

**MARM.** Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino

**MSC.** Ministerio de Sanidad y Consumo

**NACMCF.** National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods

**NAG.** N-acetilglucosamina

**NAM.** Ácido N-acetilmurámico

**NCCLS.** National Committee for Clinical Laboratory Standards

**OFSP.** Office Fédéral de la Santé Publique (Suiza)

**PCA.** Principal Components Analysis (Análisis de componentes principales)

**PFGE.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de campo pulsante)

**RFLP-PCR.** Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction

**RNA.** Red Neuronal Artificial

**rRNA.** Acido ribonucleico ribosomal

**SDA.** Stepwise Discriminant Analysis

**SII.** Síndrome de intestino irritable

**SIM.** Sistema de Información Microbiológica

**USDA-FSIS.** United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service

### 8.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Preston *Campylobacter* Selective Enrichment Broth (PEB): Se disolvieron 12,5 g de Nutrient Broth (Oxoid) en 475 ml de agua destilada y se esterilizó mediante autoclavado (15 min.; 121°C). Seguidamente se enfrió en baño de agua a 47°C y posteriormente se añadieron en condiciones asépticas 25 ml de sangre lisada de caballo (Oxoid), un vial de Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid) reconstituido con 2 ml 50/50 de agua destilada estéril y acetona (Panreac), y un vial de *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid) con 2 ml de agua destilada estéril.

Preston *Campylobacter* Selective Agar (PA): Se disolvieron 18,5 g de *Campylobacter* Agar Base (Oxoid) en 475 ml de agua destilada y se llevó a ebullición hasta disolución, esterilizándose mediante autoclavado a 121°C, 15 min. Seguidamente se enfrió en baño de agua a 47 °C y se añadieron asépticamente 25 ml de sangre lisada de caballo (Oxoid), y un vial de Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid) reconstituido con 2 ml 50/50 de agua destilada estéril y acetona.

*Campy*-Blood Free Selective Medium (CCDA): Se disolvieron 45,5 g de medio en 1l de agua purificada mediante enérgica agitación y se llevó a ebullición hasta disolución, esterilizándose mediante autoclavado a 121°C durante 15 min. Tras enfriarse a 45 - 50°C, se añadieron 4 ml de una solución acuosa filtrada y esterilizada con 32 mg de cefoperazona. Tras su mezclado final del medio se prepararon las placas de Petri.

TABLA 8.1. COMPOSICIÓN DE LOS DIFERENTES SUPLEMENTOS Y MEDIOS

Nutrient Broth Nº2 (OXOID CM67)	Lab-Lemco Powder (10 g / l) Peptona (10 g / l) Cloruro sódico (5 g / l) pH = 7,5 +/- 0,2
<i>Campylobacter</i> Agar Base (OXOID CM689)	Lab-Lemco Powder (10 g / l) Peptona (10 g / l) Cloruro sódico (5 g / l) Agar (12 g / l) pH = 7,5 +/- 0,2
<i>Campylobacter</i> Selective Supplement (OXOID SR117)	Polimixina B 2500 IU Rifampicina 5 mg Trimetoprim 5 mg Cicloheximida 50 mg
<i>Campylobacter</i> Growth Supplement (OXOID SR 84)	Piruvato sódico 0,125 g Metabisulfito sódico 0,125 g Sulfato ferroso 0,125 g
<i>Campy</i> -Blood Free Selective Medium (Modified CCDA-Preston)	Caldo nutritivo nº 2 25 g Carbón bacteriológico (charcoal) 4 g Hidrolizado ácido de caseína 3 g Desoxicolato sódico 1 g Sulfato ferroso 0,25 g Piruvato sódico 0,25 g Agar 12 g

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características fenotípicas diferenciadoras entre especies del género <i>Campylobacter</i> (Euzéby, 2006).....	27
Tabla 1.2. Tasas de notificación y nº de casos en los países miembros de la UE en 2008 (EFSA, 2009) .....	32
Tabla 2.1. Muestras recogidas distribuidas según estación del año, lugar de muestreo y animal.....	45
Tabla 2.2. Puntos específicos de muestreo.....	46
Tabla 2.3. Secuencia de los cebadores empleados en la amplificación de los genes y longitud de los fragmentos de ADN amplificados .....	50
Tabla 2.4. Resultados de aislamientos positivos en PA clasificados por animal y a su vez por lugar de muestreo .....	51
Tabla 2.5. Número y porcentaje de muestras positivas de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas según lugar de la cadena y animal .....	54
Tabla 2.6. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas .....	55
Tabla 2.7. Muestras positivas de aislamientos (muestras con crecimiento en PA), nº de muestras totales, y porcentaje de positividad en las muestras tomadas de broiler o lugares relacionados según estación del año .....	56
Tabla 2.8. Muestras positivas de aislamientos (muestras con crecimiento en PA), nº de muestras totales, y porcentaje de positividad para muestras tomadas de pollo ecológico o lugares relacionados según estación del año.....	57
Tabla 2.9. Muestras positivas de aislamientos (muestras con crecimiento en PA), nº de muestras totales, y porcentaje de positividad en las muestras tomadas de avestruz o lugares relacionados según estación del año .....	58
Tabla 2.10. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para broiler .....	59
Tabla 2.11. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para pollo ecológico.....	60
Tabla 2.12. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para avestruz.....	61
Tabla 3.1. Antibióticos empleados, grupo químico y concentraciones (cc) expresadas en µg.73	
Tabla 3.2. Porcentajes globales de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia en las 111 cepas de <i>Campylobacter</i> estudiadas en su susceptibilidad a 20 antibióticos.....	75
Tabla 3.3. Número de cepas que muestran antibiorresistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para cada una de los 20 antibióticos analizados según la producción animal .....	78
Tabla 3.4. Número de cepas con antibiorresistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para los 20 antibióticos analizados según el lugar de muestreo. ....	82
Tabla 3.5. Número de cepas con antibiorresistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para los 20 antibióticos analizados según la estación del año.....	84

Tabla 3.6. Número de cepas con antibiorresistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia para los 20 antibióticos analizados según la especie de <i>Campylobacter</i> .....	85
Tabla 4.1. Asignación de algunas bandas encontradas frecuentemente en el espectro IR. ....	98
Tabla 4.2. Relación de cepas seleccionadas para el estudio taxonómico en base al espectro IR, con la información de su lugar de aislamiento, el animal, la estación del año en que fueron recogidas.....	103
Tabla 4.3. Correlaciones medias entre réplicas para procesado de muestras, mediante ventanas de ZnSe .....	115
Tabla 4.4. Correlaciones medias entre réplicas para procesado de muestras, mediante pastillas de KBr.....	115
Tabla 5.1. Identidad, perfil ERIC-PCR, número, código y patrones de las cepas de referencia y de campo empleadas para ensayar y verificar las RNAs.....	129
Tabla 5.2. Funcionamiento de dos RNAs con resultados de la identificación a nivel de especie de <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> empleando la primera derivada de espectros de FT-IR del set de prueba, con un nivel de aceptación/rechazo de 0,5/0,5. ....	135
Tabla 5.3. Funcionamiento de dos RNA con resultados de la identificación a nivel de subespecie de <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> (4 genotipos) empleando la primera derivada de espectros IR, con un nivel de aceptación/rechazo de 0,5/0,5 .....	139
Tabla 6.1. Identidad, perfil ERIC-PCR, número, y código de las cepas de referencia incluidas en la base de datos para la identificación.....	146
Tabla 9.1. Composición de los diferentes suplementos y medios.....	160

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Microfotografía electrónica de <i>Campylobacter</i> spp.....	23
Figura 1.2. Tasas de notificación de casos de campilobacteriosis humana por cada 100.000 habitantes en la UE en 2008 (Tomado de EFSA, 2010). .....	33
Figura 1.3. Número de casos en España y en la Unión Europea en los años 2004-2008 (EFSA, 2010) .....	34
Figura 1.4. Distribución por mes del año de casos confirmados y notificados de campilobacteriosis humana por 100,000 habitantes en Europa (EFSA 2010). .....	34
Figura 1.5. Distribución etaria de casos confirmados y notificados de campilobacteriosis humana por 100,000 habitantes (EFSA 2010).....	35
Figura 1.6. Evolución del peso canal total de aves sacrificadas (toneladas) en España (2000-2008). .....	38
Figura 2.1. Muestras recogidas distribuidas según lugar de muestreo y estación del año .....	45
Figura 2.2. Resultados globales de aislamientos (muestras con crecimiento en PA) según estación del año .....	52
Figura 2.3. Resultados de la Electroforesis en gel de agarosa mostrando los amplicones obtenidos tras la amplificación de los genes por PCR, con la presencia de dos amplificaciones de 589 pares de bases ( <i>Campylobacter jejuni</i> , calles 1, 3 y 4) y 462 pares de bases ( <i>Campylobacter coli</i> , calles 6, 7 y 8) .....	53
Figura 2.4. Porcentaje global de muestras positivas de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas según lugar de la cadena alimentaria y animal .....	54
Figura 2.5. Distribución porcentual estacional de cepas positivas (cepas confirmadas por métodos fenotípicos y genotípicos).....	55
Figura 2.6. Evolución estacional de aislamientos (muestras con crecimiento en PA) en las muestras tomadas de broiler o lugares relacionados.....	56
Figura 2.7. Evolución estacional de aislamientos (muestras con crecimiento en PA) en las muestras tomadas de pollo ecológico o lugares relacionados .....	57
Figura 2.8. Evolución estacional de aislamientos (muestras con crecimiento en PA) en las muestras tomadas de avestruz o lugares relacionados .....	58
Figura 2.9. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para broiler .....	59
Figura 2.10. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para pollo ecológico.....	60
Figura 2.11. Distribución estacional de las muestras con presencia de <i>Campylobacter</i> confirmados por pruebas fenotípicas y genotípicas para avestruz.....	61
Figura 3.1. Placa de Petri mostrando halos de inhibición variables a distintos antibióticos ....	74
Figura 3.2. Porcentajes globales de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia en las 111 cepas de <i>Campylobacter</i> estudiadas frente a 20 antibióticos .....	76
Figura 3.3. Porcentajes globales de resistencia en las 111 cepas de <i>Campylobacter</i> estudiadas frente a 20 antibióticos .....	76

Figura 3.4. Agrupación de los antibióticos empleados en las pruebas de antibiorresistencia en función de los resultados obtenidos en ellas.....	77
Figura 3.5. Distribución porcentual del nivel de antibiorresistencia según la producción animal para los 20 antibióticos estudiados .....	79
Figura 3.6. Distribución porcentual del nivel de antibiorresistencia según lugar de muestreo para los 20 antibióticos estudiados .....	83
Figura 3.7. Distribución porcentual del nivel de antibiorresistencia según estación del año para los 20 antibióticos estudiados .....	85
Figura 3.8. Distribución porcentual del nivel de antibiorresistencia según especie de <i>Campylobacter</i> .....	87
Figura 4.1. Vibraciones de estiramiento y de alargamiento de diversos grupos químicos en el espectro IR al ser excitados por la radiación infrarroja. ....	97
Figura 4.2. Espectro de absorbancia en la región del infrarrojo medio obtenido de biomasa de células purificadas de <i>Campylobacter</i> mostrando las cinco ventanas empleadas en la caracterización e identificación ( $w_1$ - $w_5$ ). ....	97
Figura 4.3. Representación esquemática de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas .....	99
Figura 4.4. Imagen de <i>Campylobacter</i> spp. tomada mediante un microscopio electrónico de barrido.....	100
Figura 4.5. Pasos seguidos en la preparación y análisis de las muestras para el estudio de clasificación .....	102
Figura 4.6. Distribución de las cepas seleccionadas para el estudio de los espectros infrarrojos según lugar de obtención y producción de procedencia.....	103
Figura 4.7. Soporte y placa de ZnSe utilizada en las mediciones de espectroscopía FTIR.....	107
Figura 4.8. Prensa hidráulica empleada para la preparación de las pastillas de KBr.....	108
Figura 4.9. Espectro IR de biomasa celular perteneciente a una cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> , tras su preparación y medida empleando espectroscopía FT-IR en placa ZnSe, rango 4000-600 $\text{cm}^{-1}$ .....	111
Figura 4.10. Réplicas de espectros IR transformados en la región $w_1$ correspondientes a biomasa celular perteneciente a una cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> , tras su preparación y medida empleando espectroscopía FT-IR en placa ZnSe.....	112
Figura 4.11. Espectros IR de biomasa celular pertenecientes a tres cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> , tras su preparación y medida empleando espectroscopía FT-IR en placa ZnSe, y transformación en la región $w_1$ .....	112
Figura 4.12. Índice de diferenciación ( $D$ ) y desviación estándar globales para las 10 cepas incluidas en el estudio de la reproducibilidad según el método de preparación de la muestra (mediante pastilla de KBr o en placa de ZnSe), calculada para el espectro completo y las 5 ventanas espectrales. ....	114
Figura 4.13. Índice de diferenciación ( $D$ ) y desviación estándar para las 10 cepas incluidas en el estudio de la reproducibilidad según el tiempo de incubación (48, 72 y 96 horas), calculada para el espectro completo y las 5 ventanas espectrales .....	116

Figura 4.14. Representación del pico máximo $\nu_s\text{CH}_2$ (segunda derivada, alrededor de $2850\text{ cm}^{-1}$ , región $w_1$ ) en función del tiempo de incubación (48, 72 y 96 horas).....	118
Figura 4.15. Representación Box–whisker de los valores del pico máximo $\nu_s\text{CH}_2$ (segunda derivada del espectro IR, alrededor de $2850\text{ cm}^{-1}$ , región $w_1$ ) en función del tiempo de incubación (48, 72 y 96 horas). .....	119
Figura 4.16. Agrupamiento tras cálculo de similitudes (coeficiente de correlación de Pearson) y análisis clúster (método Ward) de 68 cepas de <i>Campylobacter</i> spp. tras obtención y transformación de la ventana $w_4$ del espectro IR. ....	120
Figura 4.17. Representación espacial de las muestras según producción animal, obtenida mediante análisis de componentes principales de 68 cepas de <i>Campylobacter</i> spp. tras obtención y transformación de la ventana $w_4$ del espectro IR.....	122
Figura 4.18. Representación espacial de las muestras según lugar obtenida mediante análisis de componentes principales de 68 cepas de <i>Campylobacter</i> spp. tras obtención y transformación de la ventana $w_4$ del espectro IR.....	123
Figura 4.19. Representación espacial de las muestras según estación obtenida mediante análisis de componentes principales de 68 cepas de <i>Campylobacter</i> spp. tras obtención y transformación de la ventana $w_4$ del espectro IR.....	124
Figura 5.1 Representación esquemática de una Red Neuronal Artificial, mostrando la capa de entrada, capas ocultas y la capa de salida .....	125
Figura 5.2. Esquema de funcionamiento de una neurona artificial.....	126
Figura 5.3. Pasos seguidos en la preparación y análisis de las muestras para la identificación usando RNAs. ....	128
Figura 5.4. Variantes ensayadas como RNAs (8) para encontrar una óptima solución de identificación. red perceptron multicapa (MLP) y red neuronal probabilística (PNN). .....	130
Figura 5.5. Representación esquemática de una Red Neuronal Artificial en funcionamiento, mostrando mediante intensidad de color la activación de neuronas en la capa de entrada, las capas ocultas y la capa de salida.....	134
Figura 5.6. Resultados del método de Validación cruzada para la RNA. Funcionamiento de la red MLP (% identificaciones correctas, erróneas y sin asignar) para el set de prueba, en el rango $w_4$ , empleando distintos niveles de aceptación/rechazo .....	137
Figura 5.7. Resultados del método de Validación cruzada para la RNA. Funcionamiento de la red MLP (% identificaciones correctas, erróneas y sin asignar) para el set de prueba, en el rango $w_5$ , empleando distintos niveles de aceptación/rechazo. ....	137
Figura 5.8. Resultados de la identificación a nivel de subespecie de <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> (4 genotipos) empleando la primera derivada de espectros IR, para dos ventanas espectrales ( $w_4$ y $w_5$ ), empleando dos RNAs (MLP y PNN), con un nivel de aceptación/rechazo de 0,5/0,5. .	140
Figura 6.1. Pasos seguidos en la preparación y análisis de las muestras para el análisis e identificación usando SDA.....	145
Figura 6.2. Pasos seguidos en la preparación y análisis de las muestras para el análisis e identificación usando el Índice de diferenciación ( $D$ )......	145

Figura 6.3. Diferenciación de 7 cepas de referencia de *Campylobacter* empleando los coeficientes de las dimensiones canónicas primera y segunda extraídas del análisis discriminante de la derivada segunda del espectro IR en el rango 1,200-900  $\text{cm}^{-1}$ . Se incluyeron tres réplicas pertenecientes a las cepas de referencia..... 150

Figura 6.4. Resultados del proceso de identificación realizado por los sistemas RNA (redes neuronales artificiales, MLP con 4 capas y rango de entrada  $w_4$ ), SDA (stepwise discriminant analysis) y  $D$  (differentiation index) sobre el conjunto de cepas de *Campylobacter*. ..... 151

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M. and Engberg, J.** (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res.* 32, 311-321.
- Aarestrup, F. M., Nielsen, E. M., Madsen, M. and Engberg, J.** (1997). Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2244-2250.
- Abbott, S. L., Waddington, M., Lindquist, D., Ware, J., Cheung, W., Ely, J. and Janda, J. M.** (2005). Description of *Campylobacter curvus* and *C. curvus*-like strains associated with sporadic episodes of bloody gastroenteritis and Brainerd's diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 43, 585-588.
- Abu, R. A., Sawaya, W. N., Dashti, B. H., Murad, M. and Al, O. H.** (1994). Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *J. Food Protect.* 57, 887-892.
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A. and Goulder, R.** (2006). *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7122-7131.
- Acik, M. N. and Cetinkaya, B.** (2005). The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 397-403.
- Acik, M. N. and Cetinkaya, B.** (2006). Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet. Microbiol.* 115, 370-375.
- Acke, E., McGill, K., Golden, O., Jones, B. R., Fanning, S. and Whyte, P.** (2009). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. *Vet. Rec.* 164, 44-47.
- Acke, E., McGill, K., Lawlor, A., Jones, B. R., Fanning, S. and Whyte, P.** (2010). Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from pets in Ireland. *Vet. Rec.* 166, 102-106.
- Acke, E., Whyte, P., Jones, B. R., McGill, K., Collins, J. D. and Fanning, S.** (2006). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland. *Vet. Rec.* 158, 51-54.
- Adesiyun, A. A., Webb, L. A., Romain, H. and Kaminjolo, J. S.** (1996). Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in bulk milk, cows' faeces and effluents of dairy farms in Trinidad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 49, 303-309.

- Afset, J. E. and Maeland, J. A.** (2001). [Erythromycin and ciprofloxacin resistant *Campylobacter jejuni*]. *Tidsskr. Nor Laegeforen.* 121, 2152-2154.
- Aho, M. and Hirn, J.** (1988). Prevalence of campylobacteria in the Finnish broiler chicken chain from the producer to the consumer. *Acta Veterinaria Scandinavica* 29, 451-462.
- Al, A. A., Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., Al-Mahmeed, A. E. and Botta, G. A.** (2007). Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J. Med. Microbiol.* 56, 1350-1355.
- Al-Haddad, L., Morris, C. W. and Boddy, L.** (2000). Training radial basis function neural networks: effects of training set size and imbalanced training sets. *J. Microbiol. Meth.* 43, 33-44.
- Alary, M. and Nadeau, D.** (1990). An outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with a community water supply. *Canadian Journal of Public Health* 81, 268-271.
- Albert, M. J., Tee, W., Leach, A., Asche, V. and Penner, J. L.** (1992). Comparison of a blood-free medium and a filtration technique for the isolation of *Campylobacter* spp. from diarrhoeal stools of hospitalised patients in central Australia. *J. Med. Microbiol.* 37, 176-179.
- Alexandrino, M., Grohmann, E. and Szewzyk, U.** (2004). Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Res.* 38, 1340-1346.
- Alfredson, D. A., Akhurst, R. J. and Korolik, V.** (2003). Antimicrobial resistance and genomic screening of clinical isolates of thermophilic *Campylobacter* spp. from south-east Queensland, Australia. *J. Appl. Microbiol.* 94, 495-500.
- Allen, V. M., Bull, S. A., Corry, J. E., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J. A., Whyte, R., Gonzalez, A., Elviss, N. and Humphrey, T. J.** (2007). *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 54-61.
- Allerberger, F., Al-Jazrawi, N., Kreidl, P., Dierich, M. P., Feierl, G., Hein, I. and Wagner, M.** (2003). Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infection* 31, 19-23.
- Allos, B. M.** (1997). Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre syndrome. *J. Infect. Dis.* 176 Suppl 2, S125-S128.
- Allos, B. M. and Blaser, M. J.** (1994). *Campylobacter jejuni* infection and the Guillain-Barre syndrome: mechanisms and implications. *Zentralbl. Bakteriologie* 281, 544-548.
- Altekruse, S. F.** (1998). *Campylobacter jejuni* in foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1734-1735.
- Altekruse, S. F., Hunt, J. M., Tollefson, L. K. and Madden, J. M.** (1994). Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 57-61.

- Altekruse, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I. and Swerdlow, D. L.** (1999). *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28-35.
- Alter, T., Gaull, F., Kasimir, S., Gurtler, M., Mielke, H., Linnebur, M. and Fehlhaber, K.** (2005). Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Vet. Microbiol.* 108, 251-261.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernandez, A., Lopez, M., Arenas, R. and Bernardo, A.** (2008). Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 212-219.
- Álvarez-Ordóñez, A., Halisch, J. and Prieto, M.** (2010). Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 97-105.
- Amano, K. and Shibata, Y.** (1992). Structural studies of peptidoglycans in *Campylobacter* species. *Microbiol. Immunol.* 36, 961-967.
- Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P. and Travert, J.** (2001). FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Le Lait* 81, 249-255.
- Anonymus.** (1994). The epidemiology of foodborne *Campylobacter* infections in the United States. *J. Food Protect.* 57, 1109-1112.
- Aquino, M. H. C., Filgueiras, A.L.L., Ferreira, M. C. S., Oliveira, S. S., Bastos, M. C. and Tibana, A.** (2002). Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 149-153.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S. and Boulianne, M.** (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *J. Food Prot.* 70, 1820-1828.
- Ashkenazi, S., Danziger, Y., Varsano, Y., Peilan, J. and Mimouni, M.** (1987). Treatment of *Campylobacter* gastroenteritis. *Arch. Dis. Child* 62, 84-85.
- Aspinall, S. T., Wareing, D. A., Hayward, P. G. and Hutchinson, D. N.** (1996). A comparison of a new *Campylobacter* selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 645-650.
- Atack, J. M. and Kelly, D. J.** (2009). Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. *Future. Microbiol.* 4, 677-690.
- Atanassova, V., Reich, F., Beckmann, L. and Klein, G.** (2007). Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49, 141-145.

- Atanassova, V. and Ring, C.** (1999). Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 187-190.
- Baar, I., Jacobs, B. C., Govers, N., Jorens, P. G., Parizel, P. M. and Cras, P.** (2007). *Campylobacter jejuni*-induced acute transverse myelitis. *Spinal Cord.* 45, 690-694.
- Baffone, W., Bruscolini, F., Pianetti, A., Biffi, M. R., Brandi, G., Salvaggio, L. and Albano, V.** (1995). Diffusion of thermophilic *Campylobacter* in the Pesaro-Urbino area (Italy) from 1985 to 1992. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 83-86.
- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E. and Donelli, G.** (2006). *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 83-91.
- Baker, R. C., Paredes, M. D. and Qureshi, R. A.** (1987). Prevalence of *Campylobacter jejuni* in eggs and poultry meat in New York State. *Poult. Sci.* 66, 1766-1770.
- Bang, D. D., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K. and 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. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1003-1014.
- Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A.** (2004). *Cowan and Steel's Manual for the Identification for Medical bacteria.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Basheer, I. A. and Hajmeer, M.** (2000). Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiol. Methods* 43, 3-31.
- Bates, C., Hiett, K. L. and Stern, N. J.** (2004). Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis.* 48, 138-147.
- Batz, M. B., Doyle, M. P., Morris, G., Jr., Painter, J., Singh, R., Tauxe, R. V., Taylor, M. R. and Lo Fo Wong, D. M.** (2005). Attributing illness to food. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 993-999.
- Beattie, S. H., Holt, C., Hirst, D. and Williams, A. G.** (1998). Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS-Microbiology Letters* 164, 201-206.
- Beckmann, L., Muller, M., Lubber, P., Schrader, C., Bartelt, E. and Klein, G.** (2003). [Suitability of SSCP-PCR analysis for molecular detection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 116, 487-490.
- Belanger, A. E. and Shryock, T. R.** (2007). Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 715-723.
- Berden, J. H., Muyltjens, H. L. and van de Putte, L. B.** (1979). Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *Br. Med. J.* 1, 380-381.

- Berndtson, E., Danielsson, T. M. and Engvall, A.** (1996). *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 35-47.
- Berndtson, E., Tivemo, M. and Engvall, A.** (1992). Distribution and number of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 45-50.
- Bertone, S., Giacomini, M., Ruggiero, C., Piccarolo, C. and Calegari, L.** (1996). Automated Systems for Identification of Heterotrophic Marine Bacteria on the Basis of Their Fatty Acid Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2122-2132.
- Beuchat, L. R.** (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Protect.* 59, 204-216.
- Beumer, R. R., Cruysen, J. J. and Birtantie, I. R.** (1988). The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 93-96.
- Beumer, R. R., Vries, J. d. and Rombouts, F. M.** (1992). *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 153-163.
- Beutling, D.** (1998). Incidence and survival of *Campylobacter* in food. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene* 49, 13-15.
- Birkhead, G., Vogt, R. L., Heun, E., Evelt, C. M. and Patton, C. M.** (1988). A multiple-strain outbreak of *Campylobacter* enteritis due to consumption of inadequately pasteurized milk. *J. Infect. Dis.* 157, 1095-1097.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. and Blaser, M. J.** (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157, 472-479.
- Blaser, M. J., Berkowitz, I. D., LaForce, F. M., Cravens, J., Reller, L. B. and Wang, W. L.** (1979). *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 91, 179-185.
- Blaser, M. J., Duncan, D. J., Osterholm, M. T., Istre, G. R. and Wang, W. L.** (1983). Serologic study of two clusters of infection due to *Campylobacter jejuni*. *J. Infect. Dis.* 147, 820-823.
- Boes, J., Nersting, L., Nielsen, E. M., Kranker, S., Enoe, C., Wachmann, H. C. and Baggesen, D. L.** (2005). Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J. Food Prot.* 68, 722-727.
- Böhm, H. D. and Heeschen, W.** (1995). *Das neue Milch-Hygienerrecht '95. (Grundlagen der Milchhygiene. Milchverordnung mit anlagen. Amtliche Begründung Kommentierung. Allgemeiner Hygienekodex).* Gelsenkirchen Buer: Verlag Th. Mann.
- Bolton, F. J. and Robertson, L.** (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni* / *coli*. *J Clin Pathol* 35, 462-467.

- Borck, B. and Pedersen, K.** (2005). Pulsed-field gel electrophoresis types of *Campylobacter* spp. in Danish turkeys before and after slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 63-72.
- Bosch, A., Massa, N. E., Donolo, A. and Yantorno, O.** (2000). Molecular characterisation by infrared spectroscopy of *Bordetella pertussis* grown as biofilm. *Physica status solidi* 220, 635-640.
- Botana, L. M., Landoni, F. and Martín-Jiménez, T.** (2002). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill.
- Boucher, S. N., Slater, E. R., Chamberlain, A. L. and Adams, M. R.** (1994). Production and viability of coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 303-307.
- Bouwknegt, M., van de Giessen, A. W., Dam-Deisz, W. D., Havelaar, A. H., Nagelkerke, N. J. and Henken, A. M.** (2004). Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev. Vet. Med.* 62, 35-49.
- Bracewell, A. J., Reagan, J. O., Carpenter, J. A. and Blankenship, L. C.** (1985). Incidence of *Campylobacter jejuni/coli* on pork carcasses in the northeast Georgia area. *J. Food Protect.* 48, 808-810.
- Brennhovd, O., Kapperud, G. and Langeland, G.** (1992). Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 327-338.
- Brieseman, M. A.** (1985). The epidemiology of *Campylobacter* infections in Christchurch 1981-83. *N. Z. Med. J.* 98, 391-393.
- Brieseman, M. A.** (1987). Town water supply as the cause of an outbreak of *Campylobacter* infection. *N. Z. Med. J.* 100, 212-213.
- Brieseman, M. A.** (1990). A further study of the epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *N. Z. Med. J.* 103, 207-209.
- Broman, T., Palmgren, H., Bergstrom, S., Sellin, M., Waldenstrom, J., nielsson-Tham, M. L. and Olsen, B.** (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4594-4602.
- Broman, T., Waldenstrom, J., Dahlgren, D., Carlsson, I., Eliasson, I. and Olsen, B.** (2004). Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J. Appl. Microbiol.* 96, 834-843.
- Bronzwaer, S., Hugas, M., Collins, J. D., Newell, D. G., Robinson, T., Makela, P. and Havelaar, A.** (2009). EFSA's 12th Scientific Colloquium--assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 284-285.
- Brown, P. E., Christensen, O. F., Clough, H. E., Diggle, P. J., Hart, C. A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A. J., Moore, A., Sutherst, J. et al.** (2004). Frequency and spatial

distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6501-6511.

- Buchanan, R. L., Havelaar, A. H., Smith, M. A., Whiting, R. C. and Julien, E.** (2009). The Key Events Dose-Response Framework: its potential for application to foodborne pathogenic microorganisms. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 718-728.
- Buck, G. E., Parshall, K. A. and Davis, C. P.** (1983). Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 18, 420-421.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 733-741.
- Butzler, J. P., Dekeyser, P., Detrain, M. and Dehaen, F.** (1973). Related *Vibrio* in stools. *Journal of Pediatrics* 82, 493-495.
- Buzby, J. C., Allos, B. M. and Roberts, T.** (1997). The economic burden of *Campylobacter*-associated Guillain-Barre syndrome. *J. Infect. Dis.* 176 Suppl 2, S192-S197.
- Byrd, J. A., Corrier, D. E., Hume, M. E., Bailey, R. H., Stanker, L. H. and Hargis, B. M.** (1998). Incidence of *Campylobacter* in crops of preharvest market-age broiler chickens. *Poult. Sci.* 77, 1303-1305.
- Cabrita, J., Rodrigues, J., Braganca, F., Morgado, C., Pires, I. and Penha, G. A.** (1992). Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from Northeast Portugal. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 279-285.
- Callicott, K. A., Hargardottir, H., Georgsson, F., Reiersen, J., Frigriksdottir, V., Gunnarsson, E., Michel, P., Bisailon, J. R., Kristinsson, K. G., Briem, H. et al.** (2008). Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6483-6494.
- Campbell, L. K., Havens, J. M., Scott, M. A. and Lamps, L. W.** (2006). Molecular detection of *Campylobacter jejuni* in archival cases of acute appendicitis. *Mod. Pathol.* 19, 1042-1046.
- Canals i Rosell, A.** (2001). Campylobacteriosis en aves de corral. *Eurocarne*.
- Cappelier, J. M., Magras, C., Jouve, J. L. and Federighi, M.** (1999). Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology* 16, 375-383.
- Caprioli, A., Busani, L., Martel, J. L. and Helmuth, R.** (2000). Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 295-301.

- Cardarelli-Leite, P., Blom, K., Patton, C. M., Nicholson, M. A., Steigerwalt, A. G., Hunter, S. B., Brenner, D. J., Barrett, T. J. and Swaminathan, B.** (1996). Rapid identification of *Campylobacter* species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 62-67.
- Carson, C. A., Keller, J. M., McAdoo, K. K., Wang, D., Higgins, B., Bailey, C. W., Thorne, J. G., Payne, B. J., Skala, M. and Hahn, A. W.** (1995). *Escherichia coli* O157:H7 restriction pattern recognition by artificial neural network. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2894-2898.
- Castillo-Ayala, A.** (1992). Comparison of selective enrichment broths for isolation of *Campylobacter jejuni/coli* from freshly deboned market chicken. *J. Food Protect.* 55, 333-336.
- Chai, L. C., Lee, H. Y., Ghazali, F. M., Abu, B. F., Malakar, P. K., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Radu, S.** (2008). Simulation of cross-contamination and decontamination of *Campylobacter jejuni* during handling of contaminated raw vegetables in a domestic kitchen. *J. Food Prot.* 71, 2448-2452.
- Chai, L. C., Robin, T., Ragavan, U. M., Gunsalam, J. W., Bakar, F. A., Ghazali, F. M., Radu, S. and Kumar, M. P.** (2007). Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 106-111.
- Chan, F. T. and Mackenzie, A. M.** (1984). Advantage of using enrichment-culture techniques to isolate *Campylobacter jejuni* from stools. *J. Infect. Dis.* 149, 481-482.
- Chen, L., Geys, H., Cawthraw, S., Havelaar, A. and Teunis, P.** (2006). Dose response for infectivity of several strains of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Risk Anal.* 26, 1613-1621.
- Chen, X., Naren, G. W., Wu, C. M., Wang, Y., Dai, L., Xia, L. N., Luo, P. J., Zhang, Q. and Shen, J. Z.** (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet. Microbiol.*
- Chrystal, N. D., Hargraves, S. J., Boa, A. C. and Ironside, C. J.** (2008). Counts of *Campylobacter* spp. and prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *J. Food Prot.* 71, 2526-2532.
- Chun, J., Atalan, E., Kim, S. B., Kim, H. J., Hamid, M. E., Trujillo, M. E., Magee, J. G., Manfio, G. P., Ward, A. C. and Goodfellow, M.** (1993). Rapid identification of streptomycetes by artificial neural network analysis of pyrolysis mass spectra. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 115-119.
- Clark, C. G., Bryden, L., Cuff, W. R., Johnson, P. L., Jamieson, F., Ciebin, B. and Wang, G.** (2005). Use of the oxford multilocus sequence typing protocol and sequencing of the flagellin short variable region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* sp. strains in Walkerton, Ontario, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2080-2091.
- Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G., Jamieson, F., Ciebin, B., Li, A. and Ellis, A.** (2003). Characterization of waterborne outbreak-

associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1232-1241.

- Clifford, W. and Gnanou, J. C.** (2000). Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 291-294.
- Commission of the European Communities.** (2009). Commission Staff Working Document. Detailed analysis of Member States' reports on the implementation of the Council Recommendation (2002/77/EC) on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine. Available from: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_threats/com/mic\\_res/am\\_051222\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_threats/com/mic_res/am_051222_en.pdf). Accessed 17 January 2010.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. J. and Debevere, J.** (2003). Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 94, 886-892.
- Cornelius, A. J., Nicol, C. and Hudson, J. A.** (2005). *Campylobacter* spp. in New Zealand raw sheep liver and human campylobacteriosis cases. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 99-105.
- Corry, J. E. L. and Atabay, H. I.** (1997). Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 201-209.
- Corry, J. E. L., Post, D. E., Colin, P. and Laisney, M. J.** (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 43-76.
- Corry, J. E. L., Roberts, D. and Skinner, F. A.** (1982). Isolation, cultivation and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In *Isolation and identification methods for food poisoning microorganisms* (eds. J. E. L. Corry, D. Roberts and F. A. Skinner), pp. 313-329. New York: Academic Press.
- Coutinho, C. P., Sa-Correia, I. and Lopes, J. A.** (2009). Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex from different species and ribopatterns. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 2161-2171.
- Cui, S., Ge, B., Zheng, J. and Meng, J.** (2005). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4108-4111.
- Cuomo, A., Dipineto, L., Santaniello, A., Matteoli, G., Sarli, T., Vecchia, D. D., Fioretti, A. and Menna, L. F.** (2007). Detection of thermotolerant *Campylobacter* in ostriches (*Struthio camelus*) in Italy. *Vet. J.* 174, 439-441.
- Curk, M. C., Peladan, F. and Hubert, J. C.** (1994b). Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS-Microbiol. Lett.* 123, 241-248.

- Curk, M. C., Peladan, F. and Hubert, J. C.** (1994a). Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS-Microbiol. Lett.* 123, 241-248.
- D'Aoust, J. Y., Park, C. E., Szabo, R. A., Todd, E. D., Emmons, D. B. and McKellar, R. C.** (1988). Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 71, 3230-3236.
- Davis, M. A. and Conner, D. E.** (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. *Poult. Sci.* 86, 765-767.
- de Boer, P., Duim, B., Rigter, A., Van der, P. J., Jacobs-Reitsma, W. F. and Wagenaar, J. A.** (2000). Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1940-1946.
- De Cesare, A., Parisi, A., Bondioli, V., Normanno, G. and Manfreda, G.** (2008). Genotypic and phenotypic diversity within three *Campylobacter* populations isolated from broiler ceca and carcasses. *Poult. Sci.* 87, 2152-2159.
- Debretson, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Nganwa, D. and Yehualaeshet, T.** (2007). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell Probes* 21, 177-181.
- Dekeyser, J., Godduin-Detrain, M., Butzler, J. P. and Sternon, J.** (1972). Acute enteritis due to related vibrio. First positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases* 125, 390.
- Denis, M., Refrégier-Petton, J., Laisney, M. J., Ermel, G. and Salvat, G.** (2001). *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 255-267.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. and Colin, P.** (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 406-410.
- Devane, M. L., Nicol, C., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Hudson, J. A., Baker, M. G., Gilpin, B. J., Garrett, N. and Savill, M. G.** (2005). The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J. Appl. Microbiol.* 98, 980-990.
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Falush, D. and Maiden, M. C.** (2005). Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 340-347.
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Bootsma, H. J., Willems, R. J., Urwin, R. and Maiden, M. C.** (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 14-23.

- Domínguez, C., Gómez, I. and Zumalacárregui, J.** (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 165-168.
- Donohue, J. P. and Welsh, W. J.** (2004). Speciation of *Listeria* via pyrolysis/gas chromatography. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 72, 221-228.
- Doyle, M. P.** (1984). Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 533-536.
- Doyle, M. P.** (1992). A new generation of foodborne pathogens. *Dairy* 12, 490, 492-490, 493.
- Doyle, M. P. and Roman, D. J.** (1982). Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1154-1158.
- Duim, B., Wassenaar, T. M., Rigter, P. and Wagenaar, J.** (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2369-2375.
- Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D. and Niklewicz, M.** (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *International Dairy Journal* 17, 183-189.
- Ede, S. M., Hafner, L. M. and Fredericks, P. M.** (2004). Structural changes in the cells of some bacteria during population growth: a Fourier transform infrared-attenuated total reflectance study. *Appl. Spectrosc.* 58, 317-322.
- EFSA.** (2009a). The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 271, 1-128.
- EFSA.** (2009b). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 223, 1-312.
- 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. *The EFSA Journal* 8, 1503.
- EFSA.** (2010b). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* 8, 1496.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2008a). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Overview of methods for source attribution for human illness from food borne microbiological hazards. *The EFSA Journal* 764, 1-43.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2008b). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal* 765, 1-87.

- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2008c). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal* 765, 1-87.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2009). Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *The EFSA Journal* 7, 1372.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2010). Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *The EFSA Journal* 8, 1437.
- El-Nokrashy, S., El-Magduib, N., El-Dairouty, R. K., Sharaf, O. M. and Ebraheim, H.** (1997). Isolation, characterization and thermal inactivation of *Campylobacter* spp. from Egyptian raw milk. *Egyptian Journal of Microbiology* 32, 117-127.
- El-Shibiny, A., Connerton, P. and Connerton, I.** (2009). Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 197-202.
- Ellerbroek, L., Schwarz, C., Hildebrandt, G., Weise, E., Bernoth, E. M., Pluta, H. J. and Arndt, G.** (1997). Zur mikrobiologischen Erfassung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe beim Fish. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 48, 1-24.
- Ellis-Iversen, J., Jorgensen, F., Bull, S., Powell, L., Cook, A. J. and Humphrey, T. J.** (2009). Risk factors for *Campylobacter* colonisation during rearing of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 89, 178-184.
- Endtz, H. P., Mouton, R. P., Reyden, T. v., Ruijs, G. J., Biever, M. and Klingerren, B. v.** (1990). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* spp. isolated from human stools and poultry products. *Lancet* 335, 787, 5.
- Endtz, H. P., Ruijs, G. J., van Klingerren, B., Jansen, W. H., van der Reyden, T. and Mouton, R. P.** (1991). Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 27, 199-208.
- Endtz, H. P., Vliegthart, J. S., Vandamme, P., Weverink, H. W., Braak-NP, v. d., Verbrugh, H. A. and Belkum, A. v.** (1997). Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 79-88.
- Engberg, J., Aarestrup, F. M., Taylor, D. E., Gerner-Smidt, P. and Nachamkin, I.** (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 24-34.
- Engberg, J., Andersen, S., Skov, R., Aarestrup, F. M. and Gerner-Smidt, P.** (1999). Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods, including the Etest, for antibiotic susceptibility testing of thermophilic *Campylobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 5, 580-584.

- Engberg, J., Neimann, J., Nielsen, E. M., Aarestrup, F. M. and Fussing, V.** (2004). Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1056-1063.
- Engvall, A.** (2001). May organically farmed animals pose a risk for *Campylobacter* infections in humans? *Acta Vet. Scand. Suppl* 95, 85-87.
- Engvall, E. O., Brändström, B., Gunnarsson, A., Mörner, T. and Wahlström, H.** (2002). Validation of a polymerase chain reaction / restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic campylobacters isolated from domestic and wild animals. *J. Appl. Microbiol.* 92, 47-54.
- Escherich, T.** (1886). Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Über das Vorkommen von Vibrionen in Darmcanal und den Stuhlgängen der Säulinge. *Münch. Med. Wochschr.* 33, 815-817.
- Etoh, Y., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Yamamoto, A. and Goto, N.** (1993). *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 631-639.
- Evans, M. R., Ribeiro, C. D. and Salmon, R. L.** (2003). Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1219-1225.
- Fahey, T., Morgan, D., Gunneburg, C., Adak, G. K., Majid, F. and Kaczmarek, E.** (1995). An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurisation. *J. Infect.* 31, 137-143.
- Fallon, R., O'Sullivan, N., Maher, M. and Carrol, C.** (2003). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 277-281.
- Federighi, M., Magras, C., Pilet, M. F., Woodward, D., Johnson, W., Jugiau, F. and Jouve, J. L.** (1999). Incidence of thermotolerant *Campylobacter* in foods assessed by NF ISO 10272 standard: results of a two-year study. *Food Microbiology* 16, 195-204.
- Federighi, M., Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P. and Jouve, J. L.** (1998). Evidence of non-cocoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiology* 15, 539-550.
- Fermer, C. and Olsson, E. E.** (1999). Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3370-3373.
- Fernandez, H. and Martin, R.** (1991). *Campylobacter* intestinal carriage among stray and pet dogs. *Rev. Saude Publica* 25, 473-475.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Lawson, P. A., Thorne, P., Byrer, D., Ross, H. M., Xerry, J., Thompson, P. M. and Collins, M. D.** (2004). *Campylobacter insulaenigrae*

sp. nov., isolated from marine mammals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2369-2373.

**Franco, D. A.** (1998). *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. *J. Food Protect.* 51, 145-153.

**Freeman, R., Goodacre, R., Sisson, P. R., Magee, J. G., Ward, A. C. and Lightfoot, N. F.** (1994). Rapid identification of species within the Mycobacterium tuberculosis complex by artificial neural network analysis of pyrolysis mass spectra. *J. Med. Microbiol.* 40, 170-173.

**Fricker, C. R. and Girdwood, R. W.** (1984). Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J. Clin. Pathol.* 37, 599-600.

**Fricker, C. R. and Park, R. W. A.** (1989). A two-year study of the distribution of "thermophilic" campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 477-490.

**Friedman, C. R., Hoekstra, R. M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., Reddy, S., Ahuja, S. D., Helfrick, D. L., Hardnett, F. et al.** (2004). Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38 Suppl 3, S285-S296.

**Frost, J. A., Gillespie, I. A. and O'Brien, S. J.** (2002). Public health implications of *Campylobacter* outbreaks in England and Wales, 1995-9: epidemiological and microbiological investigations. *Epidemiol. Infect.* 128, 111-118.

**Frost, J. A., Oza, A. N., Thwaites, R. T. and Rowe, B.** (1998). Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 335-339.

**Garrett, N., Devane, M. L., Hudson, J. A., Nicol, C., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Baker, M. G., Gilpin, B. J. and Savill, M. G.** (2007). Statistical comparison of *Campylobacter jejuni* subtypes from human cases and environmental sources. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2113-2121.

**Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T.** (2005). Class V. Epsilonproteobacteria class. nov., vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer.

**Gaudreau, C. and Gilbert, H.** (1997). Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 707-712.

**Gaudreau, C. and Gilbert, H.** (1998). Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2106-2108.

- Gaunt, P. N. and Piddock, L. J.** (1996). Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. in humans: an epidemiological and laboratory study. *J. Antimicrob. Chemother.* 37, 747-757.
- Ge, B., Girard, W., Zhao, S., Friedman, S., Gaines, S. A. and Meng, J.** (2006). Genotyping of *Campylobacter* spp. from retail meats by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J. Appl. Microbiol.* 100, 175-184.
- Ge, B., White, D. G., McDermont, P. F., Girard, W., Zhao, S., Hubert, S. and Meng, J.** (2003). Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* Species from Retail Raw Meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3005-3007.
- Giacomini, M., Ruggiero, C., Calegari, L. and Bertone, S.** (2000). Artificial neural network based identification of environmental bacteria by gas-chromatographic and electrophoretic data. *J. Microbiol. Methods* 43, 45-54.
- Gibson, J., Lorenz, E. and Owen, R. J.** (1997). Lineages within *Campylobacter jejuni* defined by numerical analysis of pulsed-field gel electrophoretic DNA profiles. *J. Med. Microbiol.* 46, 157-163.
- Gibson, J. R., Fitzgerald, C. and Owen, R. J.** (1995). Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. *Epidem. Infect.* 115, 215-225.
- Giesendorf, B. A., Goossens, H., Niesters, H. G., van Belkum, A., Koeken, A., Endtz, H. P., Stegeman, H. and Quint, W. G.** (1994). Polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting for epidemiological studies on *Campylobacter* spp. *J Med Microbiol* 40, 141-147.
- Gonzalez, I., Grant, K. A., Richardson, P. T., Park, S. F. and Collins, M. D.** (1997). Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J. Clin. Microbiol.* 35, 759-763.
- Goodacre, R., Neal, M. J., Kell, D. B., Greenham, L. W., Noble, W. C. and Harvey, R. G.** (1994). Rapid identification using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks of *Propionibacterium acnes* isolated from dogs. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 124-134.
- Goodacre, R., Timmins, E. M., Burton, R., Kaderbhai, N., Woodward, A. M., Kell, D. B. and Rooney, P. J.** (1998). Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* 144, 1157-1170.
- Goodacre, R., Timmins, E. M., Rooney, P. J., Rowland, J. J. and Kell, D. B.** (1996). Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS-Microbiol. Lett.* 140, 233-239.

- Gorman, R., Bloomfield, S. and Adley, C. C.** (2002). A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 76, 143-150.
- Goulden, J. D. S. and Sharpe, M. E.** (1958). The infra-red absorption spectra of Lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 19, 76-86.
- Grau, F. H.** (1991). *Campylobacter jejuni/coli*. In *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance* (ed. K. E. Buckle), pp. 136-151: AIFST (NSW Branch): Food Microbiology Group.
- Greenwood, D.** (2000). Detection of antibiotic resistance in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 303-306.
- Grennan, B., O'Sullivan, N. A., Fallon, R., Carroll, C., Smith, T., Glennon, M. and Maher, M.** (2001). PCR-ELISAs for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry samples. *BioTechniques* 30, 602-610.
- Guibet, F., Amiel, C., Cadot, P., Cordevant, C., Desmots, M. H., Lange, M., Marecat, A., Travert, J., Denis, C. and Mariey, L.** (2003). Discrimination and classification of Enterococci by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 33, 133-142.
- Hald, B., Skovgard, H., Bang, D. D., Pedersen, K., Dybdahl, J., Jespersen, J. B. and Madsen, M.** (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1490-1492.
- Han, M., Cheng, L. and Meng, H.** (2003). Application of four-layer neural network on information extraction. *Neural Networks* 16, 547-553.
- Hanninen, M. L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M. L., Sarkkinen, H., Miettinen, I. and Rautelin, H.** (2003). Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1391-1396.
- Hänninen, M. L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M. L., Sarkkinen, H., Miettinen, I. and Rautelin, H.** (2003). Detection and Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1391-1396.
- Hanninen, M. L., Hakkinen, M. and Rautelin, H.** (1999). Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2272-2275.
- Hänninen, M. L., Pajarre, S., Klossner, M. L. and Rautelin, H.** (1998). Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1787-1789.

- Hanninen, M. L., Perko-Makela, P., Pitkala, A. and Rautelin, H.** (2000). A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1998-2000.
- Hänninen, M. L., Perko-Mäkelä, P., Rautelin, H., Duim, B. and Wagenaar, J. A.** (2001). Genomic Relatedness within Five Common Finnish *Campylobacter jejuni* Pulsed-Field Gel Electrophoresis Genotypes Studied by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, Ribotyping, and Serotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1581-1586.
- Hansson, I., Ederoth, M., Andersson, L., Vagsholm, I. and Olsson, E. E.** (2005). Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1149-1157.
- Hansson, I., Engvall, E. O., Lindblad, J., Gunnarsson, A. and Vagsholm, I.** (2004). Surveillance programme for *Campylobacter* species in Swedish broilers, July 2001 to June 2002. *Vet. Rec.* 155, 193-196.
- Hansson, I., Forshell, L. P., Gustafsson, P., Boqvist, S., Lindblad, J., Engvall, E. O., Andersson, Y. and Vagsholm, I.** (2007a). Summary of the Swedish *Campylobacter* program in broilers, 2001 through 2005. *J. Food Prot.* 70, 2008-2014.
- Hansson, I., Vagsholm, I., Svensson, L. and Olsson, E. E.** (2007b). Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *J. Appl. Microbiol.* 103, 640-649.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E.** (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. London: Academic Press.
- Harrington, C. S., Moran, L., Ridley, A. M., Newell, D. G. and Madden, R. H.** (2003). Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1321-1333.
- Havelaar, A. H., Braunig, J., Christiansen, K., Cornu, M., Hald, T., Mangen, M. J., Molbak, K., Pielat, A., Snary, E., van Pelt, W. et al.** (2007). Towards an integrated approach in supporting microbiological food safety decisions. *Zoonoses. Public Health* 54, 103-117.
- Havelaar, A. H., de Wit, M. A., van, K. R. and van Kempen, E.** (2000). Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. *Epidemiol. Infect.* 125, 505-522.
- Haykin, S.** (1999). *Neural Networks. A Comprehensive Foundation*. London: Prentice Hall International.
- Hazeleger, W., Arkesteijn, C., Toorop, B. A. and Beumer, R.** (1994). Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 273-281.

- Hazeleger, W. C., Janse, J. D., Koenraad, P. J., Beumer, R. R., Rombouts, F. M. and Abee, T.** (1995). Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2713-2719.
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K.** (2003). Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *British Medical Journal* 326, 357.
- Hernandez, J., Alonso, J. L., Fayos, A., Amoros, I. and Owen, R. J.** (1995). Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS-Microbiol. Lett.* 127, 201-206.
- Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S. and Madsen, M.** (2001). Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 269-274.
- Hill, J. E., Paccagnella, A., Law, K., Melito, P. L., Woodward, D. L., Price, L., Leung, A. H., Ng, L. K., Hemmingsen, S. M. and Goh, S. H.** (2006). Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *J. Med. Microbiol.* 55, 393-399.
- Hofshagen, M. and Kruse, H.** (2005). Reduction in flock prevalence of *Campylobacter* spp. in broilers in Norway after implementation of an action plan. *J. Food Prot.* 68, 2220-2223.
- Hoge, C. W., Echeverria, P., Ramachandran, R., Jacobs, J., Malthouse, S., Chapman, E., Jimenez, L. M. and Shlim, D. R.** (1995). Prevalence of *Cyclospora* species and other enteric pathogens among children less than 5 years of age in Nepal. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3058-3060.
- Hong, J., Jung, W. K., Kim, J. M., Kim, S. H., Koo, H. C., Ser, J. and Park, Y. H.** (2007). Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *J. Food Prot.* 70, 2015-2022.
- Hood, A. M., Pearson, A. D. and Shahamat, M.** (1988). The extent of surface contamination of retailed chickens with *Campylobacter jejuni* serogroups. *Epidemiol. Infect.* 100, 17-25.
- Hook, H., Fattah, M. A., Ericsson, H., Vagsholm, I. and nielsson-Tham, M. L.** (2005). Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Vet. Microbiol.* 106, 109-117.
- Hopkins, K. L., Desai, M., Frost, J. A., Stanley, J. and Logan, J. M.** (2004). Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 42, 229-235.

- Hudson, J. A., Nicol, C., Wright, J., Whyte, R. and Hasell, S. K.** (1999). Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. *J. Appl. Microbiol.* 87, 115-124.
- Hughes, L. A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T. R., Jones, R. C., Lahuerta-Marin, A., Leatherbarrow, A. H., McNiffe, K., Norman, D. et al.** (2009). Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3007-3015.
- Hulton, C. S. J., Higin, C. F. and Sharp, P. M.** (1991). ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5, 825-834.
- Humphrey, T.** (2001). The spread and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* in the domestic kitchen. *J. Infect.* 43, 50-53.
- Humphrey, T. J. and Beckett, P.** (1987). *Campylobacter jejuni* in dairy cows and raw milk. *Epidemiol. Infect.* 98, 263-269.
- Humphrey, T. J., Henley, A. and Lanning, D. G.** (1993). The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidem. Infect.* 110, 601-607.
- Huneau-Salaun, A., Denis, M., Balaine, L. and Salvat, G.** (2007). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. *Prev. Vet. Med.* 80, 34-48.
- Hurtado, A. and Owen, R. J.** (1997). A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2401-2404.
- Hutchinson, D. N. and Bolton, F. J.** (1983). Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J. Clin. Pathol.* 36, 1350-1352.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).** (1998). *Microorganismos de los Alimentos. Características de los patógenos microbianos.* Zaragoza.: Ed. Acribia.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).** (1998). *Campylobacter.* In *Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*, pp. 55-76. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Inglis, G. D., Kalischuk, L. D., Busz, H. W. and Kastelic, J. P.** (2005). Colonization of cattle intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5145-5153.
- Istre, G. R., Blaser, M. J., Shillam, P. and Hopkins, R. S.** (1984). *Campylobacter* enteritis associated with undercooked barbecued chicken. *Am. J. Public Health* 74, 1265-1267.

- Jackson, C. J., Fox, A. J., Wareing, D. R., Hutchinson, D. N. and Jones, D. M.** (1996). The application of genotyping techniques to the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiol. Infect.* 117, 233-244.
- Jackson, D. N., Davis, B., Tirado, S. M., Duggal, M., van Frankenhuyzen, J. K., Deaville, D., Wijesinghe, M. A., Tessaro, M. and Trevors, J. T.** (2009). Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 96, 377-394.
- Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R. and Nygard, K.** (2008). A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC. Infect. Dis.* 8, 128.
- Jeffrey, J. S., Tonooka, K. H. and Lozanot, J.** (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop, and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. *Poult. Sci.* 80, 1390-1392.
- Jenrich, R. I.** (1960). Stepwise discriminant analysis. In *Statistical methods for digital computers* (eds. K. Enslein, A. Ralston and H. S. Wilf), pp. 76-95. New York: John Wiley & Sons.
- Jimenez, M., Soler, P., Venanzi, J. D., Cante, P., Varela, C. and Martinez, N. F.** (2005). An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain. *Euro. Surveill* 10, 118-121.
- Johannessen, G. S., Johnsen, G., Okland, M., Cudjoe, K. S. and Hofshagen, M.** (2007). Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 92-97.
- Jones, F. T., Axtell, R. C., Rives, D. V., Scheideler, S. E., Tarver-FR, J., Walker, R. L. and Wineland, M. J.** (1991). A survey of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing systems. *J. Food Protect.* 54, 259-262.
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B. T., Borck, B., Ethelberg, S., Hakkinen, M., Kuusi, M., Reiersen, J., Hansson, I. et al.** (2010). Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev. Vet. Med.* 93, 33-41.
- Jørgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D. R. A., Bolton, F. J., Frost, J. A., Ward, L. and Humphrey, T. J.** (2002). Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology* 76, 151-164.
- Josefsen, M., Lübeck, H. P. S., Aalbaek, B. and Hoorfar, J.** (2003). Preston and Park-Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. *International Journal of Food Microbiology* 80, 177-183.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S. M. and Potter, M.** (1993a). Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111, 245-255.

- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S. M. and Potter, M.** (1993b). Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidem. Infect.* 111, 245-255.
- Keirse, J., Lahaye, E., Bouter, A., Dupont, V., Boussard-Pledel, C., Bureau, B., Adam, J. L., Monbet, V. and Sire, O.** (2006). Mapping bacterial surface population physiology in real-time: infrared spectroscopy of *Proteus mirabilis* swarm colonies. *Appl. Spectrosc.* 60, 584-591.
- Keller, J. and Perreten, V.** (2006). Genetic diversity in fluoroquinolone and macrolide-resistant *Campylobacter coli* from pigs. *Vet. Microbiol.* 113, 103-108.
- Khakhria, R. and Lior, H.** (1992). Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidem. Infect.* 108, 403-414.
- Kim, S. A., Lee, Y. M., Hwang, I. G., Kang, D. H., Woo, G. J. and Rhee, M. S.** (2009). Eight enrichment broths for the isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated suspensions and ground pork. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 620-626.
- King, E. O.** (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *Journal of Infectious Diseases* 101, 119-128.
- Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S. M. et al.** (2001). Classification and identification of enterococci: A comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1763-1770.
- Koblar, S. A., Gregson, N. A., Hughes, R. A., Doherty, P. and Walsh, F. S.** (1991). *Campylobacter* neuropathy. *Neurology* 41, 1327-1328.
- Koene, M. G., Houwers, D. J., Dijkstra, J. R., Duim, B. and Wagenaar, J. A.** (2009). Strain variation within *Campylobacter* species in fecal samples from dogs and cats. *Vet. Microbiol.* 133, 199-205.
- Koenraad, P. M., Jacobs-Reitsma, W. F., Van der, L. T., Beumer, R. R. and Rombouts, F. M.** (1995a). Antibiotic susceptibility of *Campylobacter* isolates from sewage and poultry abattoir drain water. *Epidemiol. Infect.* 115, 475-483.
- Koenraad, P. J., Ayling, R., Hazeleger, W. C., Rombouts, F. M. and Newell, D. G.** (1995b). The speciation and subtyping of *Campylobacter* isolates from sewage plants and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidem. Infect.* 115, 485-494.
- Koenraad, P. J., Hazeleger, W. C., Laan, T. v., Beumer, R. R. and Rombouts, F. M.** (1994). Survey of *Campylobacter* spp. in sewage plants in the Netherlands. *Food Microbiology* 11, 65-73.
- Kokotovic, B. and On, S. L.** (1999). High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 77-84.

- Korczak, B. M., Stieber, R., Emler, S., Burnens, A. P., Frey, J. and Kuhnert, P.** (2006). Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 937-945.
- Kornblatt, A. N., Barrett, T., Morris, G. K. and Tosh, F. E.** (1985). Epidemiologic and laboratory investigation of an outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with raw milk. *Am. J. Epidemiol.* 122, 884-889.
- Korovina, N. A., Levitskaia, S. V., Bokser, G. V., Spirina, T. S., Taranenko, L. A. and Safonova, T. B.** (1991). [Comparative evaluation of the effectiveness of the treatment of gastroduodenal *Campylobacter* infection in children]. *Antibiot. Khimioter.* 36, 46-48.
- Kotula, K. L. and Pandya, Y.** (1995). Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *J. Food Protect.* 58, 1326-1329.
- Kovats, R. S., Edwards, S. J., Charron, D., Cowden, J., D'Souza, R. M., Ebi, K. L., Gauci, C., Gerner-Smidt, P., Hajat, S., Hales, S. et al.** (2005). Climate variability and *Campylobacter* infection: an international study. *Int. J. Biometeorol.* 49, 207-214.
- Kullmann, Y. and Häger, O.** (2002). Untersuchungen zum Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 53, 73-96.
- Kummerle, M., Scherer, S. and Seiler, H.** (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2207-2214.
- Kuschner, R. A., Trofa, A. F., Thomas, R. J., Hoge, C. W., Pitarangsi, C., Amato, S., Olafson, R. P., Echeverria, P., Sadoff, J. C. and Taylor, D. N.** (1995). Use of azithromycin for the treatment of *Campylobacter* enteritis in travelers to Thailand, an area where ciprofloxacin resistance is prevalent. *Clin. Infect. Dis.* 21, 536-541.
- Kwiatek, K., Wojton, B. and Stern, N. J.** (1990). Prevalence and distribution of *Campylobacter* spp. on poultry and selected red meat carcasses in Poland. *J. Food Protect.* 53, 127-130.
- LaGier, M. J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A. and Cirino, N. M.** (2004). A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell Probes* 18, 275-282.
- Lai, S., Goodacre, R. and Manchester, L. N.** (2004). Whole-organism Fingerprinting of the Genus *Carnobacterium* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 186-191.
- Lawson, A. J., Linton, D. and Stanley, J.** (1998). 16S rRNA gene sequences of 'Candidatus *Campylobacter hominis*', a novel uncultivated species, are found in the gastrointestinal tract of healthy humans. *Microbiology* 144 ( Pt 8), 2063-2071.
- Lawson, A. J., Linton, D., Stanley, J. and Owen, R. J.** (1997). Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 83, 375-380.

- Lawson, A. J., On, S. L., Logan, J. M. and Stanley, J.** (2001). *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 651-660.
- Lee, A., Smith, S. C. and Coloe, P. J.** (1998). Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *J. Food Protect.* 61, 1609-1614.
- Levy, A. J.** (1946). A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale Journal of Biological Medicine* 18, 243-258.
- Ley, E. C., Morishita, T. Y., Brisker, T. and Harr, B. S.** (2001). Prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* on ostrich carcasses and the susceptibility of ostrich-origin *E. coli* isolates to various antibiotics. *Avian Dis.* 45, 696-700.
- Lin, J., Yan, M., Sahin, O., Pereira, S., Chang, Y. J. and Zhang, Q.** (2007). Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1678-1686.
- Lind, L., Sjogren, E., Melby, K. and Kaijser, B.** (1996). DNA fingerprinting and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from epidemic outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 34, 892-896.
- Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. and Stanley, J.** (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2568-2572.
- Lior, H.** (1984). New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter lariidis*". *J. Clin. Microbiol.* 20, 636-640.
- Lior, H.** (1994). *Campylobacters* - epidemiological markers. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 14, 317-324.
- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J. and Gill, P.** (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15, 761-768.
- Logan, J. M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A. J. and Stanley, J.** (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 2, 865-872.
- Logue, C. M., Sherwood, J. S., Elijah, L. M., Olah, P. A. and Dockter, M. R.** (2003). The incidence of *Campylobacter* spp. on processed turkey from processing plants in the midwestern United States. *J. Appl. Microbiol.* 95, 234-241.
- Louis, V. R., Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Russek-Cohen, E., Pearson, A. D. and Colwell, R. R.** (2005). Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 85-92.
- Lovett, J., Francis, D. W. and Hunt, J. M.** (1983). Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 459-462.

- Lucey, B., Crowley, D., Moloney, P., Cryan, B., Daly, M., O'Halloran, F., Threlfall, E. J. and Fanning, S.** (2000a). Integronlike structures in *Campylobacter* spp. of human and animal origin. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 50-55.
- Lucey, B., Feurer, C., Greer, P., Moloney, P., Cryan, B. and Fanning, S.** (2000b). Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification Fingerprinting (DAF) of thermophilic *Campylobacter* spp. in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. *J. Appl. Microbiol.* 89, 727-734.
- Magee, J.** (1993). Whole-organism fingerprinting. In *Handbook of new bacterial systematics* (eds. M. Goodfellow and A. G. O'Donnell), pp. 383-427. London: Academic Press.
- Mangen, M. J., Havelaar, A. H., Bernsen, R. A. J. M., van Koningsveld, R. and de Wit, G. A.** (2005). The costs of human *Campylobacter* infections and sequelae in the Netherlands: a DALY and cost-of-illness approach. *Acta Agriculturae Scandinavica C - Food Economics* 2, 35-51.
- Manzano, M., Pipan, C., Bota, G. and Comi, G.** (1995). Comparison of three culture media for recovering *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry skin, liver and meat. *Sciences des Aliments* 15, 615-624.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D. and Puppels, G. J.** (2003). Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 41, 324-329.
- Maradona, M. P.** (1996). Software for microbial fingerprinting by means of the Infrared spectra. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 353-356.
- Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C. and Travert, J.** (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* 26, 151-159.
- Martin, K. W., Mattick, K. L., Harrison, M. and Humphrey, T. J.** (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 124-129.
- Martin, S., Penttinen, P., Hedin, G., Ljungstrom, M., Allestam, G., Andersson, Y. and Giesecke, J.** (2006). A case-cohort study to investigate concomitant waterborne outbreaks of *Campylobacter* and gastroenteritis in Soderhamn, Sweden, 2002-3. *J. Water Health* 4, 417-424.
- Mazick, A., Ethelberg, S., Nielsen, E. M., Molbak, K. and Lisby, M.** (2006). An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. *Euro. Surveill* 11, 137-139.
- McFadyean, J. and Stockman, S.** (1909). Report of the departmental committee appointed by the board of the Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. *Vol. 3 Abstract.*

- McNaughton, R. D., Leyland, R. and Mueller, L.** (1982). Outbreak of *Campylobacter* enteritis due to consumption of raw milk. *Can. Med. Assoc. J.* 126, 657-658.
- Medema, G. J., Teunis, P. M., Havelaar, A. J. and Haas, C. N.** (1996). Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 101-111.
- Mentzing, L. O.** (1981). Waterborne outbreaks of *Campylobacter* enteritis in central Sweden. *Lancet* 2, 352-354.
- Michaud, S., Menard, S., Gaudreau, C. and Arbeit, R. D.** (2001). Comparison of Smal-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by KpnI: a population-based study. *J. Med. Microbiol.* 50, 1075-1081.
- Miguel Gomez, M. A., Bratos Perez, M. A., Martin Gil, F. J., Duenas Diez, A., Martin Rodriguez, J. F., Gutierrez Rodriguez, P., Orduna Domingo, A. and Rodriguez Torres, A.** (2003). Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Meth.* 55, 121-131.
- Miller, W. G., On, S. L., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A. J. and Mandrell, R. E.** (2005). Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2315-2329.
- Moen, B., Janbu, A. O., Langsrud, S., Langsrud, O., Hobman, J. L., Constantinidou, C., Kohler, A. and Rudi, K.** (2009). Global responses of *Escherichia coli* to adverse conditions determined by microarrays and FT-IR spectroscopy. *Can. J. Microbiol.* 55, 714-728.
- Molbak, K. and Havelaar, A. H.** (2008). Burden of illness of campylobacteriosis and sequelae. In *Campylobacter* (eds. I. Nachamkin, G. Szymanski and M. J. Blaser), pp. 151-162. Washington, D.C.: ASM Press.
- Molnar, G. K., Mertsola, J. and Erko, M.** (1982). Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* infection. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)* 285, 652.
- Moore, J. E.** (2001). An optimised recovery method for thermophilic *Campylobacter* from liver. *BMC Microbiology* 1, 32.
- Moore, J. E. and Madden, R. H.** (2003). Comparison of eight phenotypic methods for subspecies characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from pig liver. *J. Food Protect.* 66, 1079-1084.
- Moran, A. P. and Upton, M. E.** (1986). A comparative study of the rod and coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 103-110.
- Moran, A. P. and Upton, M. E.** (1987). Effect of medium supplements, illumination and superoxide dismutase on the production of coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 43-51.

- Moreno, M. A., Domínguez, L., Teshager, T. and Herrero, I. A.** (2000). Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 290.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. and Parente, E.** (2001). Comparison of Statistical Methods for Identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2156-2166.
- Mouwen, D. J. M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto-Gomez, J. and Prieto, M.** (2006). Artificial neural network based identification of *Campylobacter* species by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* 67, 131-140.
- Mouwen, D. J. M., Weijters, M. J. B. M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. and Prieto, M.** (2005). Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 131-140.
- Münch, S. and Grillenberger, G.** (1996). *Mikrobiologie für Milchwirtschaftler*. Gelsenkirchen-Buer.: Verlag Th. Mann.
- Munroe, D. L., Prescott, J. F. and Penner, J. L.** (1983). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle, and pigs. *J. Clin. Microbiol.* 18, 877-881.
- Nadeau, E., Messier, S. and Quesy, S.** (2002). Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J. Food Prot.* 65, 73-78.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF).** (2007). Analytical utility of *Campylobacter* methodologies. *J. Food Prot.* 70, 241-250.
- Naumann, D.** (2000). Infrared Spectroscopy in Microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (ed. R. A. Meyers), pp. 1-29. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Naumann, D., Fijala, V. and Labischinski, H.** (1988). The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis. *Mikrochimika Acta* 1, 373-378.
- Naumann, D., Helm, D. and Labischinski, H.** (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81-82.
- Newell, D. G. and Fearnley, C.** (2003). Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343-4351.
- Nichols, G. L.** (2005). Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 361-364.
- Nielsen, E. M. and Nielsen, N. L.** (1999). Serotypes and typability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry products. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 199-205.

- Noble, P. A., Almeida, J. S. and Lovell, C. R.** (2000). Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 694-699.
- Noble, P. A., Bidle, K. D. and Fletcher, M.** (1997). Natural Microbial Community Compositions Compared by a Back-Propagating Neural Network and Cluster Analysis of 5S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1762-1770.
- Norinaga, M., Terai, K., Kato, H., Takeuchi, T. and Takegahara, Y.** (2003). *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology* 84, 105-109.
- Nylen, G., Dunstan, F., Palmer, S. R., Andersson, Y., Bager, F., Cowden, J., Feierl, G., Galloway, Y., Kapperud, G., Megraud, F. et al.** (2002). The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol. Infect.* 128, 383-390.
- O'Reilly, L. C., Inglis, T. J. and Unicomb, L.** (2006). Australian multicentre comparison of subtyping methods for the investigation of *Campylobacter* infection. *Epidemiol. Infect.* 134, 768-779.
- Oberreuter, H., Seiler, H. and Scherer, S.** (2002). Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 91-100.
- On, S. L.** (1994). Confirmation of human *Campylobacter concisus* isolates misidentified as *Campylobacter mucosalis* and suggestions for improved differentiation between the two species. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2305-2306.
- On, S. L.** (2001). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 1S-15S.
- On, S. L., Atabay, H. I., Corry, J. E., Harrington, C. S. and Vandamme, P.** (1998a). Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar *paraureolyticus*, a urease-producing variant from cattle and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 1, 195-206.
- On, S. L. W. and Holmes, B.** (1995). Classification and identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa by numerical analysis of phenotypic characters. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 374-390.
- Oosterom, J., De Wilde, G. J. A., De Boer, E., De Blaauw, L. H. and Karman, H.** (1983). Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. *J. Food Protect.* 46, 339-344.
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A. and Kohler, A.** (2004a). Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiology Letters* 239, 111-116.

- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A. and Kohler, A.** (2004b). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J. Microbiol. Meth.* 59, 149-162.
- Oyarzabal, O. A., Conner, D. E. and Hoerr, F. J.** (1995). Incidence of campylobacters in the intestine of avian species in Alabama. *Avian Dis.* 39, 147-151.
- Oyofa, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavlovskis, O. R. and Guerry, P.** (1992). Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2613-2619.
- Padungtod, P., Kaneene, J. B., Wilson, D. L., Bell, J. and Linz, J. E.** (2003). Determination of ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter jejuni* with a fluorogenic polymerase chain reaction assay. *J. Food Protect.* 66, 319-323.
- Palmer, S. R., Gully, P. R., White, J. M., Pearson, A. D., Suckling, W. G., Jones, D. M., Rawes, J. C. and Penner, J. L.** (1983). Water-borne outbreak of *Campylobacter* gastroenteritis. *Lancet* 1, 287-290.
- Papadimitriou, K., Boutou, E., Zoumpopoulou, G., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., Vorgias, C. E. and Tsakalidou, E.** (2008). RNA arbitrarily primed PCR and fourier transform infrared spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6068-6076.
- Park, C. E. and Sanders, G. W.** (1992). Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 313-316.
- Pedersen, K. and Wedderkopp, A.** (2003). Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *J. Appl. Microbiol.* 94, 111-119.
- Penner, J. L., Hennessy, J. N. and Congi, R. V.** (1983). Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2, 378-383.
- Petersen, L. and Newell, D. G.** (2001). The ability of Fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 217-224.
- Petersen, L., Nielsen, E. M., Engberg, J., On, S. L. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3115-3121.
- Peterz, M.** (1991). Comparison of Preston agar and a blood-free selective medium for detection of *Campylobacter jejuni* in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 74, 651-654.
- Pezzotti, G., Serafín, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M. and Perin, R.** (2003). Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals

and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 82, 281-287.

- Piddock, L. J.** (1995). Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 36, 891-898.
- Piraino, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Zotta, T. and Parente, E.** (2006). Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of SDS-PAGE patterns of whole cell proteins. *J. Microbiol. Methods* 66, 336-346.
- Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Muñoz, C., Miró, E. and Navarro, F.** (2000). Antibiotic Resistance Trends in Enteropathogenic Bacteria Isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1140-1145.
- Priest, F. G. and Williams, S. T.** (1993). Computer-assisted identification. In *Handbook of new Bacterial Systematics*, pp. 361-381. London: Academic Press.
- Quinn, T., Bolla, J. M., Pages, J. M. and Fanning, S.** (2007). Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1230-1236.
- Rees, J. H., Gregson, N. A., Griffiths, P. L. and Hughes, R. A.** (1993). *Campylobacter jejuni* and Guillain-Barre syndrome. *Q. J. Med.* 86, 623-634.
- Regula, G., Lo Fo Wong, D. M., Ledergerber, U., Stephan, R., Danuser, J., Bissig-Choisat, B. and Stark, K. D.** (2005). Evaluation of an antimicrobial resistance monitoring program for *Campylobacter* in poultry by simulation. *Prev. Vet. Med.* 70, 29-43.
- Reina, J., Ros, M. J. and Serra, A.** (1994). Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1,220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2917-2920.
- Ribeiro, C., Gray, S. and Price, T.** (1984). Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J. Clin. Pathol.* 37, 479.
- Riddle, J. W., Kabler, P. W., Kenner, B. A., Bordner, R. H., Rockwood, S. M. and Stevenson, H. J. R.** (1956). Bacterial identification by infrared spectrophotometry. *J. Bacteriol.* 72, 593-603.
- Robinson, D. A.** (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)* 282, 1584.
- Robinson, D. A., Edgar, W. J., Gibson, G. L., Matchett, A. A. and Robertson, L.** (1979). *Campylobacter* enteritis associated with consumption of unpasteurised milk. *Br. Med. J.* 1, 1171-1173.
- Robinson, D. A. and Jones, D. M.** (1981). Milk-borne *Campylobacter* infection. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)* 282, 1374-1376.

- Rollins, D. M. and Colwell, R. R.** (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 531-538.
- Rotariu, O., Dallas, J. F., Ogden, I. D., MacRae, M., Sheppard, S. K., Maiden, M. C., Gormley, F. J., Forbes, K. J. and Strachan, N. J.** (2009). Spatiotemporal homogeneity of *Campylobacter* subtypes from cattle and sheep across northeastern and southwestern Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6275-6281.
- Rumelhart, D. E., Hinton, G. E. and Williams, R. J.** (1986). Learning internal representation by error back propagation. In *Parallel Distributed Processing* (eds. D. E. Rumelhart and J. L. McClelland), pp. 318-362. Cambridge, Massachusetts: M.I.T. Press.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M. J., Baquero, F. and Torres, C.** (2000). Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 267-271.
- Sahin, O., Kobalka, P. and Zhang, Q.** (2003). Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1070-1079.
- Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R. and Greenway, D. L.** (2003a). A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1383-1390.
- Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R., Greenway, D. L. and Borrow, R.** (2001). Development of a PCR ELISA assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell Probes* 15, 291-300.
- Sails, A. D., Swaminathan, B. and Fields, P. I.** (2003b). Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4058-4067.
- Sails, A. D., Swaminathan, B. and Fields, P. I.** (2003c). Utility of Multilocus Sequence Typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4733-4739.
- Salazar-Lindo, E., Sack, R. B., Chea-Woo, E., Kay, B. A., Piscocoy, Z. A., Leon-Barua, R. and Yi, A.** (1986). Early treatment with erythromycin of *Campylobacter jejuni*-associated dysentery in children. *J. Pediatr.* 109, 355-360.
- Samuel, M. C., Vugia, D. J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., Kassenborg, H., Reilly, K., Kennedy, M., Angulo, F. et al.** (2004). Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. *Clin. Infect. Dis.* 38 Suppl 3, S165-S174.
- Sánchez, M. X., Fluckey, W. M., Brashears, M. M. and McKee, R.** (2002). Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *J. Food Protect.* 65, 948-956.

- Sandt, C., Sockalingum, G. D., Aubert, D., Lapan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Leon, A., Pinon, J. M., Manfait, M. and Toubas, D.** (2003). Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Typing of *Candida albicans* Strains Isolated in Intensive Care Units. *J. Clin. Microbiol.* 41, 954-959.
- Sasaki, Y., Fujisawa, T., Ogikubo, K., Ohzono, T., Ishihara, K. and Takahashi, T.** (2003). Characterization of *Campylobacter lanienae* from pig feces. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 129-131.
- Sato, K., Bartlett, P. C., Kaneene, J. B. and Downes, F. P.** (2004). Comparison of prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* spp. isolates from organic and conventional dairy herds in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1442-1447.
- Schouls, L. M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J. A., Willems, R. J., Dingle, K. E., Colles, F. M. and Van Embden, J. D.** (2003). Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J. Clin. Microbiol.* 41, 15-26.
- Scotter, S. L., Humphrey, T. J. and Henley, A.** (1993). Methods for the detection of thermotolerant campylobacters in foods: results of an inter-laboratory study. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 155-163.
- Sebald, M. and Veron, M.** (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 105, 897-901.
- Shane, S. M., Montrose, M. S. and Harrington, K. S.** (1985). Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis.* 29, 384-391.
- Siemer, B. L., Harrington, C. S., Nielsen, E. M., Borck, B., Nielsen, N. L., Engberg, J. and On, S. L.** (2004). Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *J. Appl. Microbiol.* 96, 795-802.
- Siemer, B. L., Nielsen, E. M. and On, S. L.** (2005). Identification and molecular epidemiology of *Campylobacter coli* isolates from human gastroenteritis, food, and animal sources by amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1953-1958.
- Siqueira, J. F., Jr. and Rocas, I. N.** (2003). *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int. Endod. J.* 36, 174-180.
- Sjogren, E., Kaijser, B. and Werner, M.** (1992). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Sweden: a 10-year follow-up report. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2847-2849.
- Sjogren, E., Lindblom, G. B. and Kaijser, B.** (1997). Norfloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Swedish patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 257-261.

- Skirrow, M. B.** (1977). *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *British Medical Journal* 2, 9-11.
- Skirrow, M. B.** (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J. Comp Pathol.* 111, 113-149.
- Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R. J., Bolton, F. J. and Humphrey, T. J.** (2002). Impact of Transport Crate Reuse and of Catching and Processing on *Campylobacter* and *Salmonella* Contamination of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 713-719.
- Smith, J. L. and Bayles, D.** (2007). Postinfectious irritable bowel syndrome: a long-term consequence of bacterial gastroenteritis. *J. Food Prot.* 70, 1762-1769.
- Smith, K. E., Besser, J. M., Hedberg, C. W., Leano, F. T., Bender, J. B., Wicklund, J. H., Johnson, B. P., Moore, K. A. and Osterholm, M. T.** (1999). Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *New England Journal of Medicine* 340, 1525-1532.
- Smith, T. and Taylor, M. S.** (1919). Some morphological and biochemical characters of the spirilla (*Vibrio fetus* n.sp.). *J. Exp. Med.* 30, 299-312.
- Soncini, G., Valnegri, V. L., Vercellotti, L., Colombo, F., Valle, D., Franzoni, M. and Bersanii, C.** (2006). Investigation of *Campylobacter* in reared game birds. *J. Food Prot.* 69, 3021-3024.
- Specht, D. F.** (1990). Probabilistic neural networks. *Neural Networks* 3, 109-118.
- Stanley, J., Burnens, A. P., Linton, D., On, S. L., Costas, M. and Owen, R. J.** (1992). *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2293-2303.
- Stanley, K. and Jones, K.** (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 94, 104S-113S.
- Stephens, C. P., On, S. L. W. and Gibson, J. A.** (1998). An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology* 61, 183-190.
- Stern, N. J. and Robach, M. C.** (2003). Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. *J. Food Protect.* 66, 1557-1563.
- Stern, N. J., Wojton, B. and Kwiatek, K.** (1992). A differential-selective medium and dry ice-generated atmosphere for recovery of *Campylobacter jejuni*. *J. Food Protect.* 55, 514-517.
- Stucki, U., Frey, J., Nicolet, J. and Burnens, A. P.** (1995). Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J. Clin. Microbiol.* 33, 855-859.

- Sulonen, J., Karenlampi, R., Holma, U. and Hanninen, M. L.** (2007). *Campylobacter* in Finnish organic laying hens in autumn 2003 and spring 2004. *Poult. Sci.* 86, 1223-1228.
- Swann, M. M., Baxter, K. L. and Field, H. L.** (1969). Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Her Majesty's Stationery Office.
- Szalanski, A. L., Owens, C. B., McKay, T. and Steelman, C. D.** (2004). Detection of *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 from filth flies by polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* 18, 241-246.
- Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M. W.** (2006). Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *J. Food Prot.* 69, 2747-2753.
- Teunis, P., Van den, B. W., Nauta, M., Wagenaar, J., Van den, K. H. and van, P. W.** (2005). A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol. Infect.* 133, 583-592.
- Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G. and Federighi, M.** (1999). Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1110-1116.
- Thomas, L. C. and Greenstreet, J. E. S.** (1954). The identification of micro-organisms by infrared spectrophotometry. *Spectrochimica Acta* 6, 302-319.
- Thomas, L. M., Long, K. A., Good, R. T., Panaccio, M. and Widders, P. R.** (1997). Genotypic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates in a commercial broiler flock. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1874-1877.
- Threlfall, E. J., Ward, L. R., Frost, J. A. and Willshaw, G. A.** (2000). The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 62, 1-5.
- Thwaites, R. T. and Frost, J. A.** (1999). Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolated from humans in north west England and Wales, 1997. *J. Clin. Pathol.* 52, 812-814.
- Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T. and Naumann, D.** (2000). Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1599-1608.
- Tolcin, R., LaSalvia, M. M., Kirkley, B. A., Vetter, E. A., Cockerill, F. R., III and Procop, G. W.** (2000). Evaluation of the Alexon-trend ProSpect *Campylobacter* microplate assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3853-3855.
- Totten, P. A., Patton, C. M., Tenover, F. C., Barrett, T. J., Stamm, W. E., Steigerwalt, A. G., Lin, J. Y., Holmes, K. K. and Brenner, D. J.** (1987). Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1747-1752.

- Trachoo, N. and Frank, J. F.** (2002). Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. *J. Food Prot.* 65, 1117-1121.
- Trachoo, N., Frank, J. F. and Stern, N. J.** (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *J. Food Prot.* 65, 1110-1116.
- Tuang, F. N., Rademaker, J. L. W., Alociljia, E. C., Louws, F. J. and deBruin, F. J.** (1999). Identification of bacterial rep-PCR genomic fingerprints using a backpropagation neural network. *FEMS-Microbiol. Lett.* 177, 249-256.
- Udelhoven, T., Naumann, D. and Schmitt, J.** (2000). Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Applied Spectroscopy* 54, 1471-1479.
- Uyttendaele, M. and Debevere, J.** (1996). Evaluation of Preston medium for detection of *Campylobacter jejuni* in vitro and in artificially and naturally contaminated poultry products. *Food Microbiology* 13, 115-122.
- van de Giessen, A. W., Bouwknecht, M., Dam-Deisz, W. D., van Pelt, W., Wannet, W. J. and Visser, G.** (2006). Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 134, 1266-1275.
- van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E.** (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 327-335.
- Van Doorn, L. J., van Verschuuren, H. A., van Belkum, A., Endtz, H. P., Vliegthart, J. S., Vandamme, P. and Quint, W. G. V.** (1998). Rapid identification of diverse *Campylobacter lari* strains isolated from mussels and oysters using a reverse hybridization line probe assay. *J. Appl. Microbiol.* 84, 545-550.
- Van Looveren, M., Daube, G., De, Z. L., Dumont, J. M., Lammens, C., Wijdooghe, M., Vandamme, P., Jouret, M., Cornelis, M. and Goossens, H.** (2001). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 235-240.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and Ley, J. d.** (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 88-103.
- Vandamme, P. and On, S. L. W.** (2001). Recommendations of the Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 719-721.
- Velazquez, J. B., Jimenez, A., Chomon, B. and Villa, T. G.** (1995). Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 173-178.

- Vellinga, A. and Van Loock, F.** (2002). The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 19-22.
- Véron, M. and Chatelain, R.** (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23, 122-134.
- Verwoerd, D. J.** (2000). Ostrich diseases. *Rev. Sci. Tech* 19, 638-661.
- Vincent, R., Dumas, J. and Picard, N.** (1947). Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibron: avortement consécutif. *Bull. Acad. Natl. Med (Paris)* 131, 90-92.
- Vogt, R. L., Sours, H. E., Barrett, T., Feldman, R. A., Dickinson, R. J. and Witherell, L.** (1982). *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann. Intern. Med.* 96, 292-296.
- Waldenstrom, J., On, S. L., Ottvall, R., Hasselquist, D. and Olsen, B.** (2007). Species diversity of campylobacteria in a wild bird community in Sweden. *J. Appl. Microbiol.* 102, 424-432.
- Wassenaar, T. M. and Newell, D. G.** (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1-9.
- Wedderkopp, A., Gradel, K. O., Joergensen, J. C. and Madsen, M.** (2001). Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 53-59.
- Wedderkopp, A., Rattenborg, E. and Madsen, M.** (2000). National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis.* 44, 993-999.
- Weijtens, M. J., Reinders, R. D., Urlings, H. A. and van der Plas, J.** (1999). *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 86, 63-70.
- Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R. H., Moran, L., Scates, P., Carroll, C., O'Leary, A., Fanning, S., Collins, J. D. et al.** (2004). Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 111-118.
- Wieland, B., Wittwer, M., Regula, G., Wassenaar, T. M., Burnens, A. P., Keller, J. and Stark, K. D.** (2006). Phenon cluster analysis as a method to investigate epidemiological relatedness between sources of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 100, 316-324.
- Wilkes, J. G., Rushing, L., Nayak, R., Buzatu, D. A. and Sutherland, J. B.** (2005). Rapid phenotypic characterization of *Salmonella enterica* strains by pyrolysis metastable atom bombardment mass spectrometry with multivariate statistical and artificial neural network pattern recognition. *J. Microbiol. Methods* 61, 321-334.

- Willis, W. L. and Murray, C.** (1997). *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult. Sci.* 76, 314-317.
- Wilson, D. L., Abner, S. R., Newman, T. C., Mansfield, L. S. and Linz, J. E.** (2000). Identification of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter jejuni* by use of a Fluorogenic PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3971-3978.
- Wilson, I. G. and Moore, J. E.** (1996). Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. *Epidemiol. Infect.* 116, 147-153.
- Winder, C. L., Carr, E., Goodacre, R. and Seviour, R.** (2004). The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Appl. Microbiol.* 96, 328-339.
- Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T. M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G. and Bissig-Choisat, B.** (2005). Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2840-2847.
- Wray, C. and Gnanou, J. C.** (2000). Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 291-294.
- Xu, M., Voorhees, K. J. and Hadfield, T. L.** (2003). Repeatability and pattern recognition of bacterial fatty acid profiles generated by direct mass spectrometric analysis of in situ thermal hydrolysis/methylation of whole cells. *Talanta* 59, 577-589.
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., Yin, Y., Gong, J. H. and Yu, H.** (2004). A real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale J. Biol. Med.* 77, 125-132.
- Yang, H., Li, Y. and 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. *J. Food Prot.* 64, 770-776.
- Yusufu, H. I., Genigeorgis, C., Farver, T. B. and wempe, J. M.** (1983). Prevalence of *Campylobacter jejuni* at different sampling sites in two California turkey processing plants. *J. Food Protect.* 46, 868-872.
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S. and Luca, G. d.** (1996). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 315-321.
- Zhang, X. S. and Roy, R. J.** (2006). Predicting movement during anaesthesia by complexity analysis of electroencephalograms. *Medical & Biological Engineering & Computing* 37, 327-334.
- Zhao, C., Ge, B., De, V. J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. and Meng, J.** (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars

in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5431-5436.

**Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D. B. and Goodacre, R.** (2004). Differentiation of *Micromonospora* Isolates from a Coastal Sediment in Wales on the Basis of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, 16S rRNA Sequence Analysis, and the Amplified Fragment Length Polymorphism Technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6619-6627.

**Zirnstein, G., Yu, L., Swaminathan, B. and Angulo, F.** (1999). Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of gyrA resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3276-3280.

**Zorman, T. and Mozina, S. S.** (2002). Classical and Molecular Identification of Thermotolerant *Campylobacter* from Poultry Meat. *Food Technol. Biotechnol* 40, 177-184.

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