

COM-06

***Campylobacter*: una bacteria difícil de identificar. ¿Puede la innovación servir para controlarla a nivel de campo?**

S. INGRESA CAPACCIONI^{1*}, P. CATALÁ GREGORI², S. MORAIS EZQUERRO³, A. MAQUIEIRA CATALÁ³, S. VEGA GARCÍA¹, F. MARCO JIMÉNEZ⁴, y C. MARÍN ORENGA¹

¹Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera. C/ Tirant lo Blanc 7. 46115 Alfara del Patriarca (Valencia, España), ²Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV), C/ Nules 16, 12539 Alquerías del Niño Perdido, Castellón, España, ³IDM, Departamento de Química, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46071 Valencia, España, ⁴Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46071.

*e-mail: sofia.ingresa@uchceu.es

Campylobacter continua siendo por décimo año consecutivo el patógeno de transmisión alimentaria responsable del mayor número de brotes de gastroenteritis en la Unión Europea, siendo la carne de pollo el alimento más frecuentemente implicado en la campilobacteriosis humana. Para reducir el riesgo de exposición en personas resulta imprescindible el desarrollo de medidas de control a nivel de producción primaria, y para ello debemos conocer la epidemiología de la bacteria “de la granja a la mesa”. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos que ha llevado a cabo el sector en este sentido hoy en día aún no se conoce con exactitud. Los métodos de referencia utilizados para el aislamiento de *Campylobacter* tienen ciertas limitaciones entre las que se incluyen que resultan muy laboriosos, requieren de entre 4 y 6 días para la confirmación de un resultado positivo, no son capaces de detectar la presencia de las formas viables pero no cultivables de la bacteria, ni la presencia de ésta cuando está en baja cantidad. La técnica de inmunofiltración permitiría por un lado la pre-concentración de las muestras (gracias a la filtración continua) y la detección de las formas viables no cultivables, lo que se traduciría en un aumento de la sensibilidad de detección y reducción del tiempo de trabajo a nivel del laboratorio. En este contexto, el objetivo de este estudio fue (i) investigar la dinámica de colonización de *Campylobacter* en la etapa de engorde del pollo broiler, y (ii) el desarrollo de un procedimiento alternativo de detección basado en la técnica de inmunofiltración. Para ello se muestrearon de manera intensiva 21 explotaciones de broilers de la Comunidad Valenciana, y las muestras se analizaron siguiendo la Norma ISO 10272:2006-1. De forma paralela se analizaron cultivos bacterianos puros de *Campylobacter*, a diferentes concentraciones (de 10¹ a 10⁴ UFC/ml) y volúmenes de muestra (100 y 400 µl) mediante la técnica de inmunofiltración, utilizando los dos modelos de ELISA directo e indirecto. Los resultados de este estudio destacan la elevada prevalencia de *Campylobacter* a nivel de campo, con un 95,2% de lotes positivos al final de la etapa de engorde. Cabe destacar que no se detectó la bacteria en ninguna muestra ambiental, ni en los pollitos de un día a su llegada a las explotaciones. Los resultados preliminares del ensayo de inmunofiltración mostraron que la

mínima concentración de células produciendo una señal positiva fue de aproximadamente 10^2 UFC/ml, utilizando el modelo de ELISA directo, aumentando la sensibilidad de *Campylobacter* spp. con el incremento del volumen de muestra. La implementación de programas de control eficaces para *Campylobacter* a nivel de campo no puede lograrse sin un conocimiento de la epidemiología de esta bacteria en cada una de las etapas de producción de la carne de pollo. En este contexto, la técnica del ELIFA podría ser una herramienta útil y sensible para la rápida detección de *Campylobacter*, especialmente en muestras con poca celularidad o en las que las células estén especialmente dañadas.

Campylobacter is the most commonly reported gastrointestinal bacterial pathogen in humans in the European Union since 2005. Poultry and poultry products are considered the main source of human campylobacteriosis and the majority of infections result from consumption of undercooked poultry or other food products cross-contaminated with raw poultry meat during food preparation. The control of *Campylobacter* in primary broiler production is therefore a key element in public health strategies to reduce the number of human campylobacteriosis cases. However, the epidemiology of *Campylobacter* in poultry production is still not completely understood. Current methods for the identification of campylobacters have several limitations; such as being unable to detect viable but non-culturable cells (VBNC), and being labor-intensive and time-consuming (4–6 days to produce a confirmed positive result). The enzyme immunofiltration assays based on porous filter-membranes offers a number of advantages over the standardized reference culture methods including higher sensitivity, by allowing the detection of non-culturable organisms together with the rapid concentration of cells (thanks to the continuous filtration of samples), that will speed up detection of the bacteria. The aim of this work was (i) to investigate the dynamics of *Campylobacter* spp colonization in broilers during productive life and (ii) to set up immunofiltration approaches based on direct and capture ELIFA (“sandwich”) procedures that will allow the preconcentration and determination of *Campylobacter* spp. To this aim, samples from 21 broiler farms of the Valencian region were collected and analysed according to ISO 10272-1:2006 (Annex E) for *Campylobacter* isolation. In addition, different concentrations of pure *Campylobacter* bacterial cultures, ranging from 10^1 to 10^4 CFU/ml and sample volumes (100 and 400 μ l) were tested by immunofiltration. The results of this study have demonstrated the high prevalence of *Campylobacter* at field level, with 95.2% of positive flocks at the end of the rearing period. However, none of the environmental samples and none of the day-old chicks were found positive for the bacteria. Preliminary results of the immunofiltration assay show that the minimum cell concentration yielding a positive assay signal using the direct assay was approximately 10^2 CFU per ml, when using the direct ELISA approach. In addition, we noted that the sensitivity of *Campylobacter* spp. detection improved when increased volume of sample was filtered. The assessment of control strategies at farm level requires first a deep knowledge of *Campylobacter* ecology at farm level. In this context, immunofiltration assays may be an alternative method for the detection of *Campylobacter* spp., especially in samples containing damaged or low number of cells.

Palabras claves: *Campylobacter* spp; inmunofiltración; broiler

Keywords: *Campylobacter* spp; immunofiltration; broiler

Introducción

La campilobacteriosis es desde 2005 la zoonosis más importante de la UE, con 214.779 casos reportados en 2013 (EFSA, 2015). El consumo de carne de pollo poco cocinada o la contaminación cruzada entre la carne de pollo contaminada y diferentes alimentos durante su elaboración, son las principales fuentes de infección humana (Friedman et al., 2000; Jacobs-Reitsma, 2000; Corry and Atabay, 2001; EFSA, 2015). En el caso concreto de los países miembros de la UE, el 20-30% de los casos de campilobacteriosis humana se producen por el consumo de carne de pollo contaminada, mientras que 50-80% se atribuyen al pollo en general como reservorio (Janssen et al., 2008; EFSA, 2011). *C. jejuni* y *C. coli* son las especies más comúnmente aisladas en los pollos y se corresponden con las principales especies causantes de infecciones humanas, siendo responsable de más del 80% y el 10% de los casos en humanos, respectivamente (Janssen et al., 2008; EFSA, 2015). Por lo tanto, debido a la implicación de la carne de pollo como principal reservorio de la campilobacteriosis humana, el control de *Campylobacter* a lo largo de la cadena productiva resulta una estrategia esencial para reducir los casos de campilobacteriosis humana (EFSA, 2015). Sin embargo, pese a ser una bacteria objeto de estudio de numerosos trabajos de investigación aún hoy en día se desconoce su epidemiología (Cox et al., 2012).

Los métodos convencionales de cultivo para la identificación de *Campylobacter* se basan en el crecimiento de la bacteria en un medio selectivo tras su incubación a 42°C en atmósfera microaerófila, con o sin preenriquecimiento previo de las muestras, seguidos de pruebas para su caracterización bioquímica (Oyarzabal and C. Battie, 2012). La especiación de las cepas aisladas requiere además pruebas adicionales, por lo que estos métodos resultan muy lentos y tediosos siendo necesario de entre 4 a 6 días para confirmar un resultado positivo (Oyarzabal and C. Battie, 2012). Otra de las principales limitaciones de las técnicas microbiológicas es que no son capaces de detectar la presencia de formas viables no cultivables o de bacterias dañadas que no crecen correctamente pero que siguen siendo infecciosas (Oyarzabal and C. Battie, 2012).

En contraposición a los métodos de cultivo tradicionales existen métodos más rápidos para la detección de *Campylobacter* entre los que se incluyen los inmunoensayos enzimáticos (EIA) y los sistemas de flujo lateral, que sólo precisan de 1 a 2 horas para la obtención de resultados (Granato et al., 2010). Sin embargo, los ensayos de EIA tienen una sensibilidad de $\geq 10^4$ UFC por ml⁻¹ o g⁻¹, por lo que es imprescindible incrementar el número de los microorganismos presentes en las muestras antes de llevar a cabo el ensayo (Oyarzabal and C. Battie, 2012). El preenriquecimiento de la muestra en caldo de cultivo es el método más comúnmente utilizado para aumentar el número de células bacterianas. No obstante, esta metodología requiere la incubación de la muestra durante al menos 48 h en caldo de enriquecimiento antes de la identificación de cultivos positivos mediante inmunoensayo (Liu et al., 2009). En este contexto, el desarrollo de una técnica rápida, que no necesite de cultivo previo para la detección de *Campylobacter* sería de enorme interés para el estudio de la epidemiología de la bacteria. En los últimos años se han desarrollado diversos ensayos enzimáticos como alternativa al método ELISA como el enzimo-inmunoanálisis en fase sólida por filtración en una membrana porosa que actúa de filtro (ELIFA) (Morais et al., 1999). Esta técnica combina las características del ELISA y del Western blotting. La técnica ELIFA permite la filtración al vacío de grandes volúmenes de muestra, de modo que el analito es concentrado en una pequeña superficie de la membrana (equivalente a un pocillo de placa ELISA). Ello permite concentrar tanto reactivos como analitos y ayuda también a reducir el tiempo de análisis en el laboratorio (Valkirs and Barton, 1985). Otras de las ventajas que ofrecen este inmunoensayo en comparación con la técnica del ELISA son una mayor capacidad de unión de antígeno-anticuerpo, mayor sensibilidad, así como la discriminación más fácil entre señales específicas y no específicas (Abdel-Hamid et al., 1999), así como la detección de las

formas viables no cultivables de *Campylobacter*, lo que se traduciría en un aumento de la sensibilidad de detección de la bacteria.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue (i) investigar la dinámica de colonización de *Campylobacter* en la etapa de engorde del pollo broiler, y (ii) el desarrollo de un procedimiento alternativo de detección basado en la técnica de inmunofiltración.

Material y métodos

Muestreo en la etapa de engorde

Se muestrearon un total de 21 explotaciones de pollo de engorde, y las muestras se tomaron de una única nave por explotación. Las muestras se recogieron semanalmente desde el inicio hasta el final de la crianza, coincidiendo con la entrada de los animales, primera semana (7 días), segunda semana (14 días), tercera semana (21 días), cuarta semana (28 días), quinta semana (35 días) y sexta semana de crianza (42 días).

Antes de la llegada de los pollitos, se tomaron muestras ambientales de las naves para determinar su estatus frente a *Campylobacter*. Para ello, se recogieron muestras de agua del depósito, de agua del final de la línea de bebederos, de pienso, de superficies de la nave y de las botas de trabajo de los pecuarios. Por último, a la entrada de los pollitos, se tomaron muestras de 10 pares de ciegos, tomaron además de las muestras semanales, muestras ambientales (superficies, agua, pienso y botas) para evaluar el estatus de la nave para *Campylobacter* spp. al final de la crianza. Posteriormente, se realizaron visitas semanales a cada explotación durante las seis semanas de crianza. En cada sesión de muestreo se tomaron 10 hisopos cloacales por nave.

Todas las muestras se analizaron según la Norma ISO10272-1:2006 (Anexo E) (Anonymous, 2006) para el aislamiento de *Campylobacter*. Para ello se preenriquecieron en caldo Bolton (OXOID, Dardilly, France) (dilución 1:10), y seguidamente se incubaron durante 5+/-1h a 37°C y posteriormente a 44h+/-4h a 41,5°C en atmósfera microaerofílica (5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂), (CampyGen, Oxoid). Tras la incubación, se sembraron 100 µl del caldo preenriquecido en una placa de agar mCCDA y en una placa de agar Preston. Las placas se incubaron durante 44h+/-4h a 41,5°C en atmósfera microaerofílica. Para la confirmación de *Campylobacter*, se realizó la prueba de movilidad con microscopio de campo oscuro, oxidasa, catalasa y siembras a diferentes temperaturas y atmósferas en agar Columbia sangre (AES laboratories ®, Bruz Cedex, France). Por último, para la especiación de la bacteria se utilizó el test de hidrólisis de hipurato. En el caso de los hisopos cloacales, únicamente se realizó cultivo directo en placas de agar mCCDA y agar Preston. La confirmación y especiación se realizó de la misma manera que para el resto de las muestras.

El análisis estadístico de este estudio se realizó utilizando el software SPSS 16.0 software package; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002.

Enzimoimmunoanálisis en fase sólida por filtración en membrana (ELIFA)

Para la preparación de los cultivos puros se sembraron las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* en agar Columbia sangre (AES laboratories ®, Bruz Cedex, France), y se incubaron a 41,5 °C durante 48 h en atmósfera microaerofílica (5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂), (CampyGen®, Oxoid). Posteriormente se transfirieron las colonias aisladas a un caldo de cultivo cerebro corazón infusión (BHI, Oxoid, Barcelona, Spain) y se incubaron en atmósfera microaerofílica bajo las condiciones que se indican anteriormente, para incrementar el recuento de bacterias. Tras el periodo de incubación se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (OD₆₀₀) mediante espectrofotometría (UV-1, Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). Los cultivos bacterianos se diluyeron utilizando caldos de

cultivo LB y BHI, hasta alcanzar una OD_{600} final de 0,2 (6 log₁₀ UFC ml⁻¹). A continuación se prepararon diluciones seriadas desde 10¹ hasta 10⁴ UFC/ml.

El ensayo de flujo continuo se llevó a cabo utilizando el dispositivo Pierce Easy-Titer (Rockford, IL, EE.UU.) a temperatura ambiente (Clark et al., 1993). Básicamente, el ELIFA está compuesto de una placa de aplicación de muestra, un conjunto de 96 cánulas de transferencia y una cámara colectora. Las piezas están selladas con juntas de silicona para proporcionar flujos constantes en todos los pocillos.

Formato directo

Se utilizó una membrana de difluoruro de polivinilideno como superficie de filtración en la que se inmovilizaron previamente células bacterianas de *Campylobacter*. Con el fin de evitar las uniones inespecíficas de los inmunoreactivos, se añadieron 100 µl de una solución de BSA al 0.1% en cada pocillo y se filtraron a través de la membrana a una velocidad de 0,2 mL/min. A continuación se añadieron 100 µl de anticuerpo detector marcado con HRP (utilizado como anticuerpo de captura) y se realizaron tres etapas de lavados con 200 µl de PBST (PBS con 0.05% Tween 20). Por último, la interacción bacteria-anticuerpo se detectó enzimáticamente utilizando TMB como sustrato colorimétrico.

Formato indirecto

Para este ensayo se utilizó también una membrana de difluoruro de polivinilideno como superficie de filtración en la que se inmovilizó previamente un anticuerpo policlonal anti-*Campylobacter* spp. Con el fin de evitar las uniones inespecíficas de los inmunoreactivos, se añadieron 100 µl de una solución de BSA al 0.1% en cada pocillo y se filtraron a través de la membrana a una velocidad de 0,2 ml/min. A continuación se filtraron los cultivos bacterianos (0,2 ml / min) y se realizaron tres etapas de lavados con 200 µl de PBST. Después, se añadieron 100 µl de anticuerpo detector marcado con HRP, seguido por tres etapas de lavado con 200 µl de PBST. Por último, la interacción bacteria-anticuerpo se detectó enzimáticamente utilizando TMB como sustrato colorimétrico.

Resultados y Discusión

La primera parte del presente estudio se llevó a cabo para investigar la dinámica de colonización de *Campylobacter* en los broilers durante su vida productiva. Los resultados de este estudio destacan la elevada prevalencia de *Campylobacter* a nivel de campo, con 20 de los 21 lotes de broilers positivos al final de la etapa de engorde (95,2%), aunque no se aisló la bacteria a partir de ninguna muestra de pollitos de un día. Otros estudios epidemiológicos llevados a cabo en lotes comerciales de pollo de engorde han concluido también que los pollitos de un día parecen estar libres de *Campylobacter* (Newell and Fearnley, 2003). En cuanto a la dinámica de excreción de la bacteria, y coincidiendo con los resultados de otros autores, observamos que este estatus negativo persiste hasta las dos semanas de edad de los pollitos (la llamada fase lag) (Jacobs-Reitsma, 1997; Evans and Sayers, 2000; Sahin et al., 2002; Newell and Fearnley, 2003; Cox et al., 2012). A partir de este momento, la excreción aumenta hasta el final del ciclo de engorde.

Tabla 1. Número de muestras positivas de *Campylobacter* aisladas durante el periodo de engorde.

T.m/P.	Total positivas		Dinámica de excreción de <i>Campylobacter</i> durante el engorde (días)											
	n	%	7		14		21		28		35		42	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
H.C			0	0,0 ^a	10	4,8 ^b	32	15,2 ^c	65	30,9 ^d	92	43,8 ^e	130	61,9 ^f

T.m/P: Tipo de muestra positiva. H.C: Hisopo cloacal. n: número de hisopos positivos a *Campylobacter*. %: Porcentaje de hisopos positivos a *Campylobacter*. ^{a,b,c,d,e,f}: los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

Por otro lado, *C. jejuni*, fue la especie aislada con mayor frecuencia en más del 84,0% de los individuos analizados, y coincidiendo con la principal especie implicada en los brotes de gastroenteritis en humana (EFSA, 2015). Estos resultados, junto con los del informe de la Comisión de Peligros Biológicos de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011), subrayan por un lado la importancia de la carne de pollo como principal fuente de infección de *Campylobacter* en humanos, al mismo tiempo que destacan la complejidad del estudio de la ecología de este microorganismo, acentuando su importancia como riesgo para la salud pública. Por este motivo, la reducción o eliminación de *Campylobacter* del reservorio de las aves de corral resulta esencial para poder controlar este problema de seguridad alimentaria (Lin et al., 2009).

En el resultado del análisis de las muestras ambientales cabe destacar que ninguna de ellas resultó positiva a la bacteria. Diferentes autores han demostrado que *Campylobacter* no resiste en el ambiente de la explotación entre dos lotes consecutivos debido a la baja resistencia a la deshidratación que tienen estas bacterias (Pérez-Boto et al., 2010, 2012). Sin embargo, se ha descrito que la bacteria puede transformarse en una forma viable pero no cultivable, bajo condiciones desfavorables o estresantes (Cox et al., 2001). Estas formas bacterianas pueden sobrevivir y volver al estado de cultivables cuando se les proporciona condiciones apropiadas para su crecimiento (Fakruddin et al., 2013). Una de las principales limitaciones de los métodos convencionales de cultivo para la identificación de *Campylobacter* es que no son capaces de detectar a este microorganismo cuando se encuentra bajo estas formas o en muy baja cantidad (Gharst et al., 2013). Por este motivo resulta imprescindible el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico más sensibles y rápidos, que permitan tener un mayor conocimiento de los factores de riesgo que intervienen en la colonización de los pollos de engorde por *Campylobacter* spp para poder desarrollar medidas efectivas para su control. Aunque en las últimas décadas se han hecho progresos considerables en el desarrollo de nuevos métodos para la identificación de *Campylobacter* spp., sigue siendo necesario realizar mejoras en los mismos (On et al., 1996). Los métodos convencionales se basan en el diagnóstico microbiológico de la bacteria, y resultan demasiado lentos para ser utilizados en estudios a gran escala. Por el contrario, las técnicas basadas en los métodos ELISA resultan rápidas, sencillas, sensibles y específicas, por lo que serían una alternativa de fácil aplicación en el diagnóstico de este patógeno. En este apartado, la inmunofiltración es un formato de ensayo atractivo, más simple y rápido que el efectuado en placa ELISA, y una buena alternativa para la realización de inmunoensayos.

Hasta donde hemos sido capaces de saber, esta es la primera vez que se ha llevado a cabo un enzimoanálisis en fase sólida por filtración en membrana para la detección de *Campylobacter* spp. Sin embargo, esta técnica ya se ha utilizado para la detección de otros patógenos alimentarios como *E. coli* (Abdel-Hamid et al., 1999). Abdel-Hamid et al. (1999) lograron alcanzar un límite de detección de 10² células/ml con volúmenes de muestra entre 0.1 to 1.0 ml utilizando la técnica del ELIFA. Resultados similares se han obtenido en este estudio, con un límite de detección de 10² UFC/mL, utilizando ambos formatos de ensayo, directo e indirecto (Figura 1 y 2). También se ha

observado que existe una correlación directa entre el incremento del volumen de muestra y la intensidad de la señal de detección, permitiendo la detección de hasta 10^1 UFC/ml con un volumen de muestra de 400 μ l (Figura 1). De la misma manera se observa que la concentración de anticuerpo secundario también influye en la intensidad de la señal incrementándose al utilizar mayores concentraciones para un mismo volumen de muestra (Figura 2). Comparando los resultados obtenidos en ambos ensayos, observamos que la sensibilidad del ensayo indirecto es ligeramente superior a la del directo por lo que permitiría obtener mejores resultados para la detección de *Campylobacter* spp.

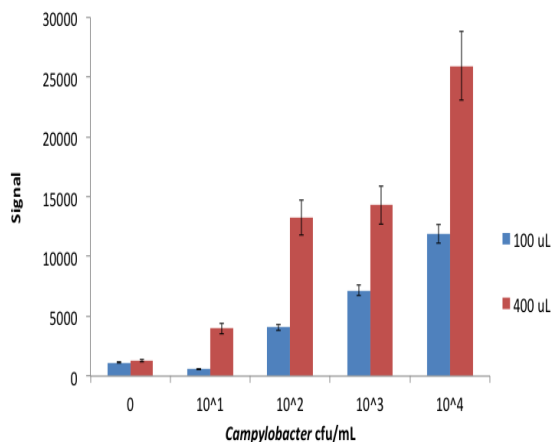


Figura 1 – Efecto del volumen de muestra en la intensidad de la señal (Ensayo directo).

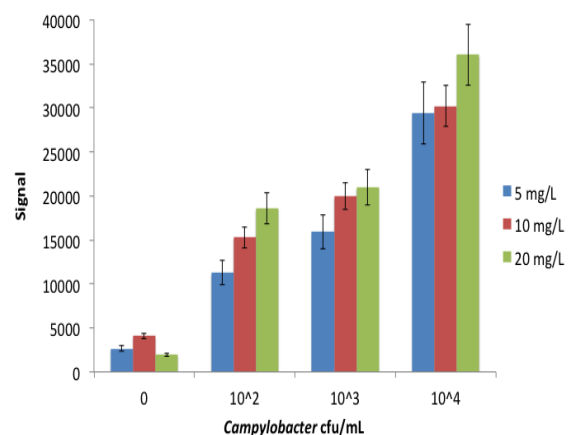


Figura 2 - Efecto de la concentración de anticuerpo secundario en la intensidad de la señal (Ensayo indirecto).

Este sistema de inmunofiltración es capaz de procesar muestras de gran volumen mediante recirculación, lo que aumenta la posibilidad de capturar las células cuando estén en bajos números. De esta manera se consigue una pre-concentración de las muestras evitando su incubación previa en caldo de cultivo. Además, permite la detección de las formas viables no cultivables, por lo que elimina las desventajas principales de los métodos de identificación microbiológica, aumentando la sensibilidad de detección y reduciendo el tiempo de trabajo a nivel del laboratorio. Por este motivo, la técnica del ELIFA una vez optimizada, puede ser fácilmente adaptada para la detección de otros microorganismos, o incluso para varios microorganismos simultáneamente, y puede servir de base para el desarrollo de una nueva clase de herramientas bioanalíticas, altamente sensibles para la rápida detección cuantitativa de patógenos. Por este motivo los enzimo-inmunoanálisis en fase sólida por filtración en membrana podrían utilizarse como método alternativo para la detección de *Campylobacter* spp., especialmente en muestras que contengan bajo número de bacterias o que estas estén dañadas.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a la Asociación Avícola Valenciana (ASAV) por la financiación de este proyecto, al Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) por cedernos sus instalaciones, y a todo su personal por su colaboración y dedicación.

La segunda parte de este proyecto fue subvencionada por el Ministerio español de Economía y Competitividad, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (número del programa de investigación

CTQ2013-45875-R y CTQ2013-42914-R), y la Generalitat Valenciana (número del programa de investigación GVA-PROMETEO/2010/008).

Sofia Ingesa fue respaldada por una beca de investigación del Ministerio español de Educación (número de programa FPU13/03306).

Referencias

ABDEL-HAMID, I., IVNITSKI, D., ATANASOV, P., WILKINS, E. (1999) Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 309–316.

ANONYMOUS. (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

CLARK, C.R., HINES, K.K. AND MALLIA, A.K. (1993) 96.Well apparatus and method for use in enzyme-linked immunofiltration assay (ELIFA). *Biotechnology Techniques* **7**, 461–466.

CORRY, J.E. AND ATABAY, H.I. (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 96S–114S.

COX, N.A., BERRANG, M.E., STERN, N.J. AND MUSGROVE, M.T. (2001) Difficulty in recovering inoculated *Campylobacter jejuni* from dry poultry-associated samples. *Journal of Food Protection* **64**, 252–254.

COX, N.A., RICHARDSON, L.J., MAURER, J.J., BERRANG, M.E., FEDORKA-CRAY, P.J., BUHR, R.J., BYRD, J.A., LEE, M.D., HOFACRE, C.L., O'KANE, P.M., LAMMERDING, A.M., CLARK, A.G., THAYER, S.G., DOYLE, M.P. (2012) Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *Journal of Food Protection* **75**, 1896–902.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2011) Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* **9**, 2105.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2015) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* **13**, 3991.

EVANS, S. J., AND A. R. SAYERS. (2000) A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine* **46**: 209–223.

FAKRUDDIN, M., MANNAN, K.S., ANDREWS, S. (2013) Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology*. **26**, 2013:703813. eCollection 2013.

FRIEDMAN, C.R., NEIMANN, J., WEGENER, H.C., TAUXE, R.V. (2000) Epidemiology of *C. jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, in: *Campylobacter* (I. Nachamin and M.J. Blaser eds), pp 121–138, Washington, DC: ASM Press.

GHARST, G., OYARZABAL, O.A., AND HUSSAIN, S.K. (2013) Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods* **95**, 84–92.

GRANATO, P., CHEN, L., HOLIDAY, I., RAWLING, R., NOVAK-WEEKLEY, S., QUINLAN, T., MUSSER, K. (2010) Comparison of premier CAMPY enzyme immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY tests with culture for laboratory diagnosis of *Campylobacter* enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 4022–7.