Evidencia del papel de la transmisión vertical en la infección de pollitos de un día por *Campylobacter* spp.

S. INGRESA-CAPACCIONI[1*], S. SEVILLA[1], L. MONTORO[1], E. GARCÍA[1], D. S. PEÑARANDA[2], S. VEGA[1], F. MARCO-JIMÉNEZ[2], C. MARÍN[1]

[1]Dpto. Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCH-CEU, Alfara del Patriarca, España, [2]Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. *email: sofia.ingresa@uchceu.es

---

***Campylobacter* está considerado como la principal causa de gastroenteritis en la Unión Europea y la mayoría de países industrializados, siendo la carne de pollo la principal fuente de la infección en personas. Desde hace más de una década, existe una controversia respecto a las vías de entrada de la bacteria en los lotes de pollo de engorde, ya que a menudo la transmisión horizontal se cita como la única vía de entrada, mientras que la transmisión vertical se considera un hecho poco probable. La principal razón de esta falta de consenso es que hasta la fecha ha sido extremadamente difícil demostrar la presencia de *Campylobacter* en pollitos de un día mediante los métodos de cultivo oficiales (ISO 10272:2006). Sin embargo, el desarrollo de técnicas de diagnóstico más rápidas y sensibles, nos están permitiendo conocer un poco más acerca de la compleja ecología de esta bacteria. En este contexto, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de *Campylobacter* en pollitos de un día mediante técnicas moleculares, para evaluar el papel de la transmisión vertical en la infección de los lotes de broilers. Para ello, se evaluaron un total de 12 lotes de broilers a su llegada a las explotaciones de engorde (día 1 de vida). Todas las muestras se analizaron según la norma ISO 10272:2006, y mediante PCR cuantitativa a tiempo real con transcriptasa inversa. Los resultados revelan que mediante la norma oficial (ISO 10272:2006) no se aisló la bacteria en ninguna muestra de pollitos de un día. Sin embargo, mediante la técnica de PCR a tiempo real 4 de los 12 lotes de pollitos de un día fueron positivos a *Campylobacter*. Las dos principales especies asociadas con la infección en personas, *C. coli* y *C. jejuni*, se identificaron en 4 y 3 de los lotes estudiados, respectivamente. Estos resultados resultan especialmente relevantes, ya que se ha demostrado que la presencia de un solo pollito infectado en un lote es suficiente para infectar al 100% de las aves en pocos días. Por ese motivo, resulta imprescindible el desarrollo de un método de detección sensible y eficaz para conocer con exactitud la ecología de la bacteria, y poder así implementar medidas de control eficaces para reducir o incluso eliminar su paso a la cadena alimentaria.**

Palabras clave: *Campylobacter*; PCR a tiempo real; ISO 10272:2006.

***Campylobacter* is considered the leading cause of gastroenteritis in the European Union and most industrialized countries, with chicken meat the main source of infection in people. For over a decade, there is controversy regarding the entryways of the bacterium in batches of broilers, as they often horizontal transmission is cited as the only gateway, while vertical transmission is considered a fact unlikely. The main reason for this lack of consensus is that to date has been extremely difficult to demonstrate the presence of *Campylobacter* in day-old chicks by the official culture methods (ISO 10272: 2006). However, the development of techniques more rapid and sensitive diagnosis, are allowing us to know a little more about the complex ecology of this bacterium. In this context, the aim of this study was to investigate the presence of *Campylobacter* in day-old chicks by molecular techniques to evaluate the role of vertical transmission of**

infection in batches of broilers. For this, a total of 12 batches of broilers on arrival at the fattening farms (day 1 of life) were evaluated. All samples were analyzed according to ISO 10272: 2006 standard, and PCR real-time quantitative reverse transcriptase. The results show that by the official standard (ISO 10272: 2006) not the bacterium was isolated in any sample of day-old chicks. However, by the technique of real time PCR 4 of the 12 lots of day-old chicks were positive for *Campylobacter*. The two main species associated with infection in humans, *C. jejuni* and *C. coli* were identified in 4 and 3 lots studied, respectively. These results are particularly relevant, since it has been shown that the presence of a single chick infected in a batch is enough to infect 100% of the birds in a few days. For this reason, it is essential to develop a sensitive and effective method for accurate information about the ecology of the bacteria detection, and thus implement effective measures to reduce or even eliminate its way into the food chain control.

Key words: *Campylobacter*; Real-time PCR; ISO 10272:2006

Introducción

La campilobacteriosis es la zoonosis más importante de la Unión Europea, siendo su principal fuente de infección el consumo de carne de pollo poco cocinada, o la contaminación cruzada entre la carne de pollo y los diferentes alimentos durante su elaboración (EFSA, 2015). Durante el año 2014 la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reportó un total de 214.268 casos de campylobacteriosis humana, y una media de 71 casos por 100.000 habitantes (EFSA, 2015). Sin embargo, la incidencia real de la enfermedad en la UE-27 es mucho mayor, y se estima que al año se producen 9 millones de casos, lo que supone un coste total de 2.400 millones de euros. Por ese motivo, que en los últimos años las autoridades europeas han priorizado el desarrollo de medidas de control para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en los pollos de engorde. Sin embargo, dada la elevada prevalencia de la bacteria a nivel de campo, con 88% de lotes positivos al final del ciclo de engorde, conseguir alcanzar este objetivo supone todo un reto (EFSA, 2011).

La principal dificultad a la que nos enfrentamos radica en que hoy en día todavía no se conoce con exactitud la epidemiología de la bacteria, lo que dificulta enormemente su control a nivel de producción primaria (Cox et al., 2012). Desde hace más de una década existe un gran debate sobre las vías de transmisión de la bacteria en el sector avícola de engorde (Sahin et al., 2002; Cox et al., 2012). Tradicionalmente, el peso de la infección por *Campylobacter* ha recaído sobre la transmisión horizontal entre individuos infectados y susceptibles, y de estos al medio o viceversa, identificándose diferentes factores de riesgo para la infección (Cox et al., 2012). Por el contrario, el papel de la transmisión vertical se considera a menudo como un acontecimiento raro o incluso inexistente. Sin embargo, gracias a la utilización de técnicas de biología molecular, diversos autores han conseguido aislar *Campylobacter* a partir de los oviductos de las gallinas ponedoras (Jacobs-Reitsma et al., 1997; Camarda et al., 2000; Buhr et al., 2002; Hiett et al. 2002a, Cox et al., 2005), así como de muestras de semen de machos reproductores (Cox et al., 2002b; Hiett et al 2003). Otro importante hallazgo que apoyaría la hipótesis de la transmisión vertical, ha sido la identificación de ribotipos y regiones cortas variables-flaA (SVR) idénticos, entre un lote de reproductoras de pollos de engorde comercial y su progenie (broilers) (Cox et al., 2002a). Además, se ha descrito la presencia de ADN de *Campylobacter* en muestras de polvo de la planta de incubación, tractos intestinales de embriones de pollitos en desarrollo y en pollitos de un día, resultados que de nuevo respaldan la hipótesis de que los pollitos de un día podrían estar ya infectados por *Campylobacter* antes de llegar a las explotaciones (Hiett et al., 2002b, 2013; Idris et al., 2006). Otro importante hallazgo que ha contribuido a apoyar esta hipótesis ha sido la detección de la bacteria en la cubierta interna y las membranas de los huevos, lo que revelaría una posible vía de transmisión de la bacteria por parte de la gallina reproductora a su progenie a través del huevo (Newell and Fearnley, 2003; Cox et al., 2012).

No obstante, la principal razón por la que la transmisión vertical se ha descartado como posible vía de infección de los las aves, es porque ha sido extremadamente difícil demostrar la presencia de *Campylobacter* en pollitos de un día mediante los métodos de cultivo oficiales basados en la norma ISO 10272:2006 (Anonymous, 2006). El desarrollo de técnicas de moleculares como la qPCR proporciona una serie de ventajas respecto a otros métodos de diagnóstico. En primer lugar, esta metodología es más rápida y sensible que la PCR convencional, y además evita la manipulación de productos de PCR después de la amplificación, por lo que reduce el riesgo de contaminación cruzada (Melero et al., 2011). La mayor limitación de la qPCR es que no permite diferenciar entre bacterias vivas y muertas (Flekna et al., 2007). Como consecuencia, se han desarrollado diversos protocolos basados en el análisis del ARN mensajero (mRNA) en lugar del ADN (Maurer, 2006). Dado que la presencia de mRNA de origen bacteriano está estrechamente correlacionada con la viabilidad celular, está metodología se presenta como una alternativa muy atractiva para la detección cuantitativa rápida de *Campylobacter*, sobre todo en muestras con poca celularidad o en las que la bacteria este en forma viable no cultivable.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de *Campylobacter* en pollitos de un día PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para evaluar el papel de la transmisión vertical en la infección por *Campylobacter* en producción avícola.

Material y métodos

Recogida de muestras.
Se estudiaron 12 lotes de broilers correspondientes a la progenie de granjas de reproductores positivos a *Campylobacter*. Para evaluar la ocurrencia de la transmisión vertical de *Campylobacter*, se tomaron muestras de pollitos de un día a su llegada a las explotaciones de engorde (día 1). Para ello, se seleccionaron y sacrificaron 10 aves por lote, y a continuación se realizó una necropsia en la que se extrajeron de manera aséptica los dos ciegos. Por último se recogieron muestras ambientales de agua del inicio y final de la línea de bebederos, piensos, polvo, y botas de los ganaderos para evaluar el estatus de las naves al inicio del ciclo de engorde.
Para cada lote se analizó un pool de muestras compuesto por 0,02 gr de contenido cecal de cada individuo, diluido en 2 ml de PBS (0,1 mol/l, pH 7,2). Todas las muestras se transportaron en condiciones de refrigeración hasta su llegada al laboratorio.

Detección de *Campylobacter* spp.
Todas las muestras se analizaron según la Norma ISO10272-1:2006 (Anexo E) (Anonymous, 2006) y mediante cultivo directo (Vidal et al., 2013) para el aislamiento de *Campylobacter*. Para ello, en primer lugar se realizó una siembra directa en placas de agar mCCDA y Preston de cada pool de ciegos, y se incubaron durante 44h+/-4h a 41,5ºC en atmósfera microaerofílica (5%O2, 85% N2, 10% CO2), (CampyGen, Oxoid). De forma paralela, las muestras cecales se preenriquecieron en caldo Bolton (OXOID, Dardilly, France) (dilución 1:10), y se incubaron durante 5+/-1h a 37ºC y posteriormente a 44h+/-4h a 41,5ºC en atmósfera microaerofílica. Tras la incubación, se sembraron 100 µl del caldo preenriquecido en una placa de agar mCCDA y en una placa de agar Preston, y se incubaron según las condiciones citadas anteriormente. 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.

Tras el procesado de las muestras se almacenaron a -18ºC para la realización de los estudios moleculares.

Detección y cuantificación de *Campylobacter* spp por el Método qPCR

El primer paso del protocolo de detección y cuantificación de *Campylobacter* por qPCR consistió en la preparación de la muestras para la extracción del ADN. Para ello se pesaron 0,1 g de contenido cecal y se homogeneizó en 1 mL de PBS. A continuación, se centrifugó la mezcla 10 min a 10.000 g. Tras la centrifugación se elimino el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió con 300 µL de tampón de lisis. La extracción del ADN se llevó a cabo con el kit comercial de Macherey-Nagel. La concentración, calidad, e integridad del ADN se evaluaron mediante espectrofotometría (2000C NanoDrop, Fisher Scientific SL, España). El ADN extraído se diluyó con agua libre de nucleasas (Ambion, EE.UU.) hasta una concentración de 100 ng de ADN/µL, y se utilizó como molde. Los resultados se expresaron como copias por mg de ADN. La cuantificación y expresión de *Campylobacter* se estimó mediante ensayos de qPCR, utilizando Maxima SYBR Green/ROX qpcr Master Mix (Fermentas, Corp., Glen Burnie, MD, USA) en un termociclador modelo 7500 (Applied Biosystems). Para ello, se utilizaron los cebadores descritos por Bui et al. (2011) y (2012) para cuantificar *C. jejuni* (número de acceso: NC_002163) y *C. coli* (número de acceso: X88849.1), respectivamente. Las secuencias diana de oligonucleótidos para la amplificación fueron las siguientes: 16S rRNA (Forward 5 ' GCGTAGGCGGATTATCAAGT-3 ' y 5'-Rev CGGATTTTACCCCTACACCA-3') de *C. jejuni,* y ceuE (Forward 5'-AAATTTCCGCTTTTGGACCT-3 'y 5'-Rev *C. coli* CCTTGTGCGCGTTCTTTATT-3'). La especificidad fue confirmada por análisis de la curva de fusión, electroforesis en gel y secuenciación de los productos de qPCR. Las condiciones de PCR usadas para la amplificación y cuantificación fueron: una etapa previa de 50°C durante 2 min, seguido por 1 ciclo de 95°C durante 10 min, a continuación 40 ciclos que se componen de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo, seguido por una etapa de alineamiento a 56°C durante 20 segundos, y por último una etapa de extensión a 72ºC durante 15 segundos. Finalmente, para evaluar la especificidad del ensayo se realizó el análisis de la curva de fusión, mediante un programa de incremento progresivo y continuo de la temperatura del termociclador desde 68ºC hasta 95ºC, lo que permitió registrar los cambios en la intensidad de emisión de la fluorescencia.

Para establecer la curva patrón para la cuantificación de *Campylobacter* spp. en las muestras cecales, se utilizaron diferentes extractos de ADN con diluciones decimales desde10^8 a 10^1 número de copias de plásmido/µL. El volumen total para cada reacción de PCR fue de 20 µL, realizado a partir de una dilución (1:10) de ADN molde (5 µl), cebadores directo y reverso (250 nM cada uno), y SYBR Green/ROX Master Mix (12 µl). Cada ensayo se realizó por duplicado, y se incluyó una curva patrón así como un control negativo en el que se sustituyó el ADN molde por agua.

Clonación molecular de *C. jejuni* y *C. coli* por PCR

Para la amplificación por PCR de *C. jejuni* y *C. coli* se utilizó un termociclador ABI GeneAmpTM 2700. La mezcla de reacción estaba compuesta por 1 µl de ADN molde, tampón de PCR 1X (Invitrogen), 200 mM dNTPs (Invitrogen), 0,1 UI de Taq polimerasa (Invitrogen), 500 nM de cada cebador, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones utilizadas en la primera PCR fueron: una primera etapa a 94ºC durante 3 min, seguido de 40 ciclos compuestos por una etapa a 94 °C durante 30 s, una a 56 ºC durante 20 s, y una a 72 °C durante 30 s, y finalmente una etapa adicional de extensión a 72ºC durante 10 min. Los productos resultantes de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, y las bandas del tamaño esperado se purificaron usando un kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen), y se ligaron en el vector pGEM easy-T (Promega, WI, EE.UU.). La clonación se efectuó en células *E. coli* JM109 competentes (Promega). Las colonias positivas se aislaron y se extrajeron los plásmidos con el kit de Qiagen plasmid Mini (Qiagen). Los plásmidos eficazmente clonados se secuenciaron usando un secuenciador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems, Universidad Politécnica de Valencia servicio de secuenciación, Valencia, España).

Resultados y Discusión

Debido a la implicación de la carne de pollo como principal fuente de infección de la campylobacteriosis humana, el control de *Campylobacter* en producción avícola es un elemento clave de las estrategias de salud pública para reducir el número de casos de campilobacteriosis humanas (EFSA, 2015). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estima que implementación de medidas de control a nivel de granja supondría un mayor beneficio para la salud pública que actuando en otros puntos de la cadena alimentaria (EFSA, 2011). No obstante, para establecer medidas de control eficaces es primero necesario conocer en profundidad la epidemiologia de la bacteria. Hoy en día la transmisión horizontal a partir del ambiente se considera la principal ruta de infección de los pollos por *Campylobacter*, y la transmisión vertical del patógeno se considera un hecho poco probable (Sahin et al., 2002, 2003; Cox et al., 2012). Sin embargo, gracias al desarrollo de técnicas moleculares para la detección e identificación de microorganismos, existen cada vez más evidencias que apuntan que la transmisión vertical si que estaría involucrada en la infección de las aves (Cox et al., 2012). Por este motivo, se llevó a cabo este estudio para investigar el posible papel de la transmisión vertical en la infección de los lotes de broilers por *Campylobacter*.

La gran mayoría de los autores coinciden en que los pollitos nacen libres de *Campylobacter* y permanecen con ese estatus hasta las dos o tres semanas de vida (Newell and Fearnley, 2003; Cox et al., 2012). Se han identificado diversos reservorios que pueden contribuir a la infección de las aves, aunque existen resultados muy contradictorios respecto a la importancia relativa de cada uno de ellos (Cox et al., 2012). En cuanto a la dinámica de la infección, se ha descrito que tras la colonización de las aves la infección se extiende rápidamente al resto del lote, alcanzándose un pico a final del periodo de engorde (Newell and Fearnley, 2003; Cox et al., 2012). A parte de la transmisión horizontal, diversos estudios han investigado el papel de la transmisión vertical como factor de riesgo de la infección en las aves. Sin embargo, ninguno de ellos consiguió aislar la bacteria mediante métodos de cultivo microbiológico, por lo que concluyeron que la transmisión vertical no parecía ser un factor de riesgo para la infección de las aves (Chuma et al., 1997). En este estudio tampoco se aisló la bacteria en ninguna muestra de pollitos de un día ni en el ambiente mediante la norma oficial (ISO 10272:2006). Sin embargo, mediante qPCR se consiguió demostrar con éxito la presencia de *C. coli* y *C. jejuni* en 4 y 3 de los lotes estudiados, respectivamente. Los datos cuantitativos sobre *C. coli* se establecieron en un rango de $1{,}3 \times 10^{2}$ a $4{,}9 \times 10^{3}$ ufc/mL, mientras que los datos sobre *C. jejuni* estaban en un rango de $7{,}7 \times 10^{4}$ a $3{,}4 \times 10^{5}$ ufc/mL (*Tabla 1*). La presencia de *Campylobacter* en el contenido cecal de los pollitos de un día demuestra que la transmisión vertical sí que podría estar involucrada en la colonización de las aves por este patógeno. Otros autores también han hallado indicios que apoyan el papel de esta vía de transmisión gracias a la utilización de técnicas moleculares, aunque la han descartado como vía de infección de los lotes de pollos, debido a que la prevalencia de la misma sería muy baja (Chuma et al., 1997).

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos para la detección de *Campylobacter* spp mediante la norma ISO 10272:2006 y qPCR.

nº lote	Resultado ISO 10272:2006	Resultado qPCR	Concentración (ufc/mL)	Especie
1	negativo	negativo	-	-
2	negativo	negativo	-	-
3	negativo	**positivo**	$1{,}3x10^{2}$; $7{,}7x10^{4}$	*C. coli, C. jejuni*
4	negativo	negativo	-	-
5	negativo	**positivo**	$4{,}9x10^{3}$;	*C. coli*
6	negativo	negativo	-	-
7	negativo	**positivo**	$2{,}6x10^{2}$; $3{,}4x10^{5}$	*C. coli, C. jejuni*
8	negativo	negativo	-	-
9	negativo	negativo	-	-
10	negativo	negativo	-	-
11	negativo	negativo	-	-
12	negativo	**positivo**	$3{,}9x10^{3}$; $1{,}7x10^{5}$	*C. coli, C. jejuni*

Una de las principales vías de infección que se ha sugerido sería de la gallina al pollito a través del huevo. La superficie de la cáscara del huevo puede contaminarse fácilmente con restos de heces en el momento de la puesta, quedando acantonada la bacteria en los poros durante la incubación de manera que cuando el huevo eclosionara y saliera el pollito, éste ingeriría la bacteria quedando infectado. Sin embargo, a pesar de que la prevalencia de la transmisión fuera muy baja, no sería motivo suficiente para descartarla por completo como fuente de infección de los lotes de broilers, puesto que *Campylobacter* posee una elevada tasa de colonización, estimada de media en 2.37 ± 0.295 infecciones por ave colonizada y día (Van Gerwe et al., 2009). Esto supondría que la presencia de un solo pollito positivo sería suficiente para infectar a la totalidad de un lote de 20.000 pollos, entre 8 y 10 días tras la colonización del primer broiler. Muchos autores coinciden en que el primer paso para el control de *Campylobacter* en granjas de broilers sería establecer unas estrictas medidas de bioseguridad. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos estas medidas no resultarán eficaces si los pollitos de un día que entran en las naves están infectados por la bacteria

De acuerdo con Agunos et al. (2014), la incapacidad de aislamiento de *Campylobacter* en pollitos de un día mediante el método de diagnóstico oficial, supone una importante limitación a la hora de conocer la ecología de la bacteria, y por lo tanto las rutas exactas de transmisión. En este estudio, todas las muestras de pollito de un día analizadas según la norma oficial ISO 10272-1:2006 resultaron negativas para *Campylobacter*, aunque la bacteria si que se detectó en 4 de los 12 lotes mediante qPCR. Estos resultados sugieren que la metodología de la norma oficial no es suficientemente sensible para la detección de la bacteria. En un estudio anterior, Melero et al. (2011) compararon la sensibilidad de detección de *Campylobacter* mediante la norma ISO 10272-1:2006 frente a la qPCR. Coincidiendo con los resultados de este estudio, los autores aislaron la bacteria únicamente en 6 de las 48 muestras de carne pollo analizadas (12.50%) mediante el método de cultivo convencional, mientras que el análisis por qPCR permitió la confirmación de 43 muestras positivas a la bacteria (89.53%). La qPCR presenta una serie de ventajas respecto a los métodos de cultivo oficiales, ya que por un lado permite obtener resultados de manera más rápida, y con un límite de detección inferior (Ugarte-Ruiz et al., 2012).

Este estudio pone en evidencia el papel de la transmisión vertical en la infección de pollitos de un día por *Campylobacter* spp utilizando técnicas de diagnostico molecular, y sugiere que el uso de métodos moleculares como la qPCR proporcionaría una visión mas realista de la prevalencia y epidemiologia de la bacteria en el sector avícola. Por lo tanto, sería una herramienta muy útil para establecer nuevas medidas de control, con el fin de aumentar la seguridad de los alimentos en este tipo de productos.

Bibliografía

AGUNOS, A., WADDELL, L., LÉGER, D., TABOADA, E. (2014) A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. *PLoS One* 9: e104905

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

BUHR, R.J., COX, N.A., STERN, N.J., MUSGROVE, M.T., WILSON, J.L. AND HIETT, K.L. (2002) Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. *Avian Diseases* **46**, 919–924.

BUI, X.T., WOLFF, A., MADSEN, M., BANG, D.D. (2011) Fate and Survival of *Campylobacter coli* in Swine Manure at Various Temperatures. *Frontiers in Microbiology* **2**: 262.

BUI, X.T., WOLFF, A., MADSEN, M., BANG, D.D. (2012) Reverse transcriptase real-time PCR for detection and quantification of viable *Campylobacter jejuni* directly from poultry faecal samples. *Research in Microbiology* **163**: 64-72.

CAMARDA, A., NEWELL, D.G., NASTI, R. AND DI MODUGNOA, G. (2000) Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. *Avian Diseases* **44**, 907–912.

CHUMA, T., YANO, K., OMORI, H., OKAMOTO, K., YUGI, H. (1997) Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR. *Journal of Veterinary Medical Science* **59**: 85-87.

COX, N.A., STERN, N.J., MUSGROVE, M.T., BAILEY, J.S., CRAVEN, S.E., CRAY, P.F., BUHR, R.J. AND HIETT, K.L. (2002a) Prevalence and level of *Campylobacter* in commercial broiler breeders (Parents) and broilers. *Journal of Applied Poultry Research* **11**, 187-190.

COX, N.A., STERN, N.J., WILSON, J.L., MUSGROVE, M.T., BUHR, R.J. AND HIETT, K.L. (2002b) Isolation of *Campylobacter* spp. from semen samples of commercial broiler breeder roosters. *Avian Diseases* **46**, 717-720.

COX, N.A., BAILEY, J.S., RICHARDSON, L.J., BUHR, R.J., COSBY, D.E., WILSON, J.L., HIETT, K.L., SIRAGUSA, G.R., AND BOURASSA, D.V. (2005). Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late-life broiler breeder hens. *Avian Dis*eases **49**, 285–287.

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**: 1896-1902.

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 2014. *EFSA Journal* **12**: 3547.

FLEKNA, G., SCHNEEWEISS, W., SMULDERS, F.J., WAGNER, M., HEIN, I. (2007) Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes* **21**: 282-287.

HIETT, K.L., COX, N.A., BUHR, R.J., AND STERN, N.J. (2002a) Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Current Microbiology* **45**, 400-4.

HIETT, K.L., COX, N.A., STERN, N.J. (2002b) Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples. *Avian Diseases* **46**, 219-23.

HIETT, K.L., SIRAGUSA, G.R., COX, N.A., BUHR, R.J., MUSGROVE, M.T., STERN, N.J., WILSON, J.L. (2003) Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from the gastrointestinal tracts and the reproductive tracts of broiler breeder roosters. *Avian Diseases* **47**(2):406-14.

HIETT, K.L., COX, N.A., ROTHROCK, M.J.JR. (2013) Polymerase chain reaction detection of naturally occurring *Campylobacter* in commercial broiler chicken embryos. *Poultry Science* **92**: 1134-1137

IDRIS, U., LU, J., MAIER, M., SANCHEZ, S., HOFACRE, C.L., HARMON, B.G., MAURER, J.J., LEE, M.D. (2006) Dissemination of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* spp. within an integrated commercial poultry production system. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3441-3447.

JACOBS-REITSMA, W.F. (1997) Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *The Veterinary quarterly*. **19**: 113-7.

MAURER J.J. (2006). The mythology of PCR: a warning to the wise, in *PCR Methods in Foods*, (J. Maurer ed.), pp 27-40, New York, NY: Springer.

MELERO, B., COCOLIN, L., RANTSIOU, K., JAIME, I., ROVIRA, J. (2011) Comparison between conventional and qPCR methods for enumerating *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. *Food Microbiology*. **28**: 1353-8.

NEWELL, D.G., FEARNLEY, C. (2003) Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4343-51.

SAHIN, O., MORISHITA, T.Y., ZHANG, Q. (2002) *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Animal Health Research Reviews* **3**: 95-105.

SAHIN, O., KOBALKA, P., ZHANG, Q. (2003) Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 1070-1079.

UGARTE-RUIZ, M., GÓMEZ-BARRERO, S., PORRERO, M.C., ALVAREZ, J., GARCÍA, M., COMERÓN, M.C., WASSENAAR, T.M., DOMÍNGUEZ, L. (2012) Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *Journal of Applied Microbiology*. **113**: 200-8.

VAN GERWE, T., MIFLIN, J.K., TEMPLETON, J.M., BOUMA, A., WAGENAAR, J.A., JACOBS-REITSMA, W.F., STEGEMAN, A., KLINKENBERG, D. (2009) Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology* **753**: 625-8.

VIDAL, A.B., RODGERS, J., ARNOLD, M., CLIFTON-HADLEY, F. (2013) Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses Public Health* **60**:412-25.