

Campylobacter: desde la recría a la canal

S. INGRESA-CAPACCIONI^{1*}, S. GONZÁLEZ¹, P. CATALÁ-GREGORI², S. VEGA¹, F. MARCO-JIMÉNEZ³ y C. MARÍN¹

¹Facultad de Veterinaria. Instituto de Ciencias Biomédicas. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad CEU Cardenal Herrera, C/ Tirant Lo Blanch, 7, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, Spain; ²Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón); ³Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, C/Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

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

Con 214.268 casos confirmados, la campilobacteriosis es la principal causa de gastroenteritis humana en la Unión Europea, siendo la carne de ave la principal ruta de infección de la enfermedad humana. A pesar de los numerosos grupos de investigación que en la actualidad trabajan con *Campylobacter*, muy poco se sabe de la epidemiología de la bacteria a nivel de la producción primaria. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue conocer la dinámica de colonización por *Campylobacter* en los reproductores, así como en su descendencia (*broilers*), para evaluar también la influencia de la transmisión vertical. Para la realización de este trabajo se estudiaron todas las naves de las diferentes explotaciones de reproductores de la Comunidad Valenciana. Durante el periodo comprendido entre los meses de Enero 2012 hasta Agosto 2013, se tomaron muestras de cada nave de los lotes de recría desde el día uno de vida. Estos lotes, se siguieron hasta las naves de puesta donde se siguieron muestreando hasta la salida de los animales a matadero. Además, por cada lote de recría se estudiaron tres lotes de pollo de engorde desde el día uno de vida hasta la llegada a matadero. Cada uno de los lotes fue muestreado tanto en el ambiente de la explotación como en el individuo, en diferentes momentos del ciclo productivo. Todas las muestras recogidas fueron analizadas siguiendo la Norma ISO 10272:2006. Se analizaron un total de 2.150 muestras de reproductores (incluyendo la etapa de recría y la etapa de puesta) y un total de 1.470 muestras de *broilers*. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto, que independientemente de si el lote de recría permaneció negativo o positivo a *Campylobacter* durante los primeros 4 meses de vida, cuando los animales pasaron a puesta y alcanzaron el pico de puesta, el 100% de los lotes excretó la bacteria en heces. Posteriormente, ya en la fase de engorde de la descendencia, durante las primeras semanas de vida no se aisló la bacteria, pero entre la 5^a y 7^a semana de engorde, se detectó *Campylobacter* en 20 de los 21 lotes estudiados. Sin embargo, cabe destacar que en muy pocos casos se detectó la presencia de la bacteria en el ambiente. Como conclusión, los resultados de este trabajo ponen en evidencia la elevada prevalencia de *Campylobacter* a nivel de la producción primaria, y refuerzan la necesidad de homogeneizar los métodos de toma de muestras y aislamiento de la bacteria, para poder conocer en profundidad la ecología de la infección.

Palabras clave: *Campylobacter*; reproductoras; broilers; ISO 10272:2006

Campylobacter is the major cause of food-borne gastro-enteritis in humans in developed countries, being responsible for 214.268 cases of illnesses in the EU. Poultry and poultry products are considered the main source for human campylobacteriosis. In this context, the aim of the present study was to investigate the dynamics of *Campylobacter* spp colonization in breeders during productive life and throughout their progeny (broiler), and to evaluate the importance of vertical transmission. To this aim, all commercial broiler breeder flocks from the Valencian region, as well as from 21 flocks of their respective progeny (broilers), were tested. All samples were analysed according to ISO 10272-1:2006 (Annex E). The results of this study have demonstrated the high prevalence of *Campylobacter* at field level, and the complexity of studying

its ecology in the poultry production. From the epidemiologic point of view, both traditional and newer molecular biology techniques would need an extensive research effort in order to improve our understanding, and therefore permit to develop effective control measures.

Keywords: *Campylobacter*; breeders; broilers; ISO 10272:2006

Introducción

Campylobacter es la principal causa de gastroenteritis humana en la mayoría de los países industrializados con 214.268 de casos confirmados en el 2012 (EFSA, 2014). La campylobacteriosis se considera uno de los problemas más importantes en salud pública asociado al consumo de alimentos (Friedman et al., 2000; Adak et al., 2002). Entre los síntomas típicos de esta zoonosis se incluyen la diarrea acuosa y/o sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre, náuseas, dolor de cabeza y vómitos (Blaser, 1997; Altekruze et al., 1999; Friedman et al., 2000). El curso de la enfermedad suele ser autolimitante, resolviéndose aproximadamente en 1 semana, aunque pueden producirse complicaciones en los casos más graves derivando en artritis, septicemia o el síndrome de Guillain-Barré, un trastorno desmielinizante que causa parálisis neuromuscular aguda, compromiso de los músculos respiratorios e incluso la muerte (Nachamkin et al., 1998; Wassenaar and Blaser, 1999).

Entre las fuentes de contaminación de *Campylobacter* cabe destacar como principales focos de infección el consumo de carne de pollo poco cocinada o la contaminación cruzada entre la carne de pollo contaminada y diferentes alimentos durante su elaboración (Jacobs-Reitsma, 2000; Corry and Atabay, 2001; Friedman et al., 2000; EFSA, 2014). En el caso concreto de los países miembros de la UE, el 20-30% de los casos de campylobacteriosis 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, 2014). Por lo tanto, debido a la implicación de la carne de pollo como principal reservorio de la campylobacteriosis humana, el control de *Campylobacter* a lo largo de la cadena productiva resulta una estrategia esencial para reducir los casos de campylobacteriosis humana (EFSA, 2014).

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). Desde hace más de una década se ha estado manteniendo un gran debate sobre el papel de la transmisión vertical u horizontal en la infección por *Campylobacter* 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 de la bacteria entre individuos infectados y susceptibles, y de estos al medio o viceversa, identificándose diferentes factores de riesgo para la infección (van de Giessen et al., 1996; Stern et al., 2002; Ramabu et al., 2004; Hald et al., 2008; Hazeleger et al., 2008; Zweifel et al., 2008; Ellis-Iversen et al., 2009; Pérez-Boto et al., 2010; Ridley et al., 2011). Sin embargo, en los últimos años la hipótesis de que la transmisión vertical no tiene importancia en la epidemiología de la bacteria está perdiendo fuerza (Cox et al., 2012). Diferentes estudios han recalcado la importancia de la transmisión vertical en referencia a la diseminación de *Campylobacter* en el sector avícola de carne (Hiatt et al., 2003; Idris et al., 2006), ya que se ha conseguido aislar la bacteria a partir de los oviductos de las gallinas ponedoras (Jacobs-Reitsma et al., 1997; Camarda et al., 2000; Buhr et al., 2002; Hiatt et al. 2002a, Cox et al., 2005), así como de muestras de semen de machos reproductores (Cox et al., 2002b; Hiatt et al. 2003b). Otra posible ruta de introducción de *Campylobacter* en los lotes de pollos sería la transmisión por parte de la gallina reproductora a su progenie a través del huevo (Newell and Fearnley, 2003). Por una parte, esta hipótesis se ha visto reforzada gracias al hallazgo de *Campylobacter* en la cubierta interna y las membranas de los huevos, lo que revelaría una posible vía de exposición de pollitos durante su incubación (Allen et al., 2007; Cox et al., 2012). Otro hallazgo que apoya esta hipótesis, es 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, otros autores han descrito la presencia de ADN amplificable 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 avalan la hipótesis de que los pollitos de un día podrían estar ya infectados por *Campylobacter* antes de llegar a las explotaciones (Hiatt et al., 2002:2003; Idris et al., 2006). No obstante, existen también algunos estudios que discuten la hipótesis del papel de la transmisión vertical en la diseminación de *Campylobacter* en las explotaciones avícolas (Callicott et al., 2006; O'Mahony et al., 2011).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue investigar la dinámica de colonización de *Campylobacter* en los reproductores durante su vida productiva (recría y puesta), así como en toda su progenie (broilers), para poder evaluar la importancia de la transmisión vertical.

Material y métodos

Durante el periodo comprendido entre enero de 2012 y agosto de 2013, se realizó un estudio longitudinal en el sector avícola de engorde de la Comunidad Valenciana (ASAV) de 5 lotes de reproductoras, desde la entrada de los pollitos y pollitas a día uno de vida en recría, continuando por la puesta y, posteriormente estudiando a su descendencia durante el engorde y hasta el procesado de las canales en matadero. Para ello se han analizado un total de 5 explotaciones de recría (14 naves), 7 explotaciones de puesta (27 naves) y 21 explotaciones de broilers (3 explotaciones por lote de reproductoras).

Antes de la entrada y a salida de las aves en cada explotación, se determinó el estatus de las naves frente a *Campylobacter*. Con esta finalidad se analizaron muestras ambientales de agua del inicio y final de la línea de bebederos, pienso, superficies y polvo y de las botas de los pecuarios. Por otro lado, para determinar el estatus de los pollitos de cada explotación para *Campylobacter* en su primer día de vida se analizaron muestras de 10 pares de ciegos por nave.

Posteriormente se recogieron 10 muestras de hisopos cloacales (Cary Blair sterile transport swabs, DELTALAB®) por nave en cada explotación coincidiendo con diferentes momentos del ciclo productivo. Durante la etapa de recría la toma de muestras se llevó a cabo mensualmente, desde la llegada de los animales hasta su traslado a las naves de puestas a los 5 meses de vida. Coincidiendo con el traslado de los animales, se tomaron muestras de las plataformas y de los jaulones de los camiones para evaluar la influencia del transporte en la excreción de *Campylobacter* spp. En la etapa de puesta, las muestras de hisopos cloacales se tomaron coincidiendo con los principales momentos más estresantes para los animales en esta etapa, es decir: la entrada (21 semanas), el inicio de la puesta (26 semanas), el pico de puesta (31 semanas), el spiking (48 semanas) y la salida a matadero (60 semanas). En la etapa de engorde 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). Por último y tras el procesado de las canales en matadero, se recogieron tres canales de cada uno de los lotes de pollos objeto de estudio.

Todas las muestras se analizaron según la Norma ISO10272-1:2006 (Anexo E) (Anonymous, 2006). Para ello, primero 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.

Resultados y Discusión

El presente estudio se llevó a cabo para investigar la dinámica de colonización de *Campylobacter* en los reproductores durante su vida productiva (recria y puesta), así como en toda su progenie (broilers), para poder evaluar la importancia de la transmisión vertical. Los resultados revelan una prevalencia de *Campylobacter* de entorno al 70% a nivel de campo y 82,5% en las canales, siendo *C. jejuni*, 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, 2014). Estos resultados, junto con los del informe de la Comisión de Peligros Biológicos de la EFSA (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). Sin embargo, la dinámica de colonización y excreción de la bacteria por parte de las aves de corral no se conoce con exactitud (Newell and Fearnley, 2003). En este sentido, se han descrito numerosas vías de entrada de *Campylobacter* en los lotes comerciales de pollo de engorde (incluyendo la transmisión a partir del huevo), aunque la contaminación a partir del ambiente de la explotación es a menudo citada como la única fuente (Cox et al., 2012).

El inicio de la colonización por *Campylobacter* en los lotes de reproductores no se detectó hasta las 16 semanas de vida, un mes antes del traslado de los animales a las explotaciones de puesta. Tal y como se observa en la Tabla 1, coincidiendo con el cuarto mes de recria el 62,5% de las aves muestreadas (n=100) resultaron positivas a la bacteria y este porcentaje disminuyó significativamente en el quinto mes hasta un 53,1% (n=85), siendo *C. jejuni* la especie más frecuentemente aislada (72,4%). Entre las diferentes hipótesis que podrían explicar este hecho, estarían las elevadas medidas de bioseguridad que encontramos en las explotaciones de recria en comparación con cualquier otra etapa del ciclo productivo (Pérez-Boto et al., 2012).

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

T.m/P.	Total positivas		Dinámica de excreción de <i>Campylobacter</i> durante la recria (meses)									
	n	%	1		2		3		4		5	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
H.C	185	23,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	100		85	53,1 ^b
62,5 ^a												

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}: los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

Sin embargo tal y como revelan los resultados de este estudio, al pasar a la etapa de puesta la bioseguridad disminuye y el estrés de los animales aumenta considerablemente, con el consiguiente aumento de la excreción de la bacteria y su rápida detección en heces, con un pico máximo de prevalencia a las 26 semanas (93,2%), coincidiendo con el inicio de la puesta (Callicott et al., 2006; Newell et al., 2011; Pérez-Boto et al., 2012). Tras este pico, la prevalencia disminuyó levemente hasta el 86,0% al final del ciclo productivo (60 semanas) (Tabla 2).

Tabla 2. Número de muestras positivas de *Campylobacter* aisladas durante el periodo de puesta.

T.m/P.	Total		Dinámica de excreción de <i>Campylobacter</i> durante la puesta									
	positivas		Entrada		Comienzo de puesta		Pico de Puesta		“Spiking”		Salida	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	928	80,7										
H.C			106	46,1 ^a	215	93,5 ^b	203	88,3 ^b	199	83,5 ^b	205	89,1 ^b

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}: los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

La alta prevalencia observada en este estudio es consistente con los resultados de estudios anteriores (van Gerwe et al., 2009; Pérez-Boto et al., 2012). Además al contrario de lo que ocurre con otras bacterias gastrointestinales, se observó que el transporte no influyó en la excreción de *Campylobacter*. Además, ese observó que en aquellos casos en los que se realizó “spiking”, no aumentó significativamente la excreción de la bacteria.

Aunque la transmisión vertical de la bacteria se considera a menudo como un hecho poco probable (Callicott et al., 2006; O’Mahony et al., 2011), algunos autores han sugerido que *Campylobacter* podría pasar de la reproductora al huevo, vía transovárica (Cox et al., 2005) o a través de la cloaca (Buhr et al., 2002), y sobrevivir en las membranas del huevo durante la incubación. De esta manera cuando los pollitos eclosionan en la nacedora ingieren la bacteria, transmitiendo en pocas horas el microorganismo al resto del lote susceptible (100% de aves afectadas en pocas horas), incluso antes de llegar a la granja de destino (Nauta et al., 2008). Sin embargo, si la transmisión vertical de *Campylobacter* por parte de las reproductoras a su progenie hubiese ocurrido, hubiésemos esperado encontrar pollitos de un día positivos a la bacteria. No obstante, ninguno de los pollitos analizados en este estudio fueron positivos a *Campylobacter* a día 1 de vida. Por lo tanto, este hallazgo sugiere que la transmisión vertical no jugó papel relevante en la infección de los broilers, tal y como han sugerido con anterioridad otros autores (Callicott et al., 2006; Cox et al., 2012). A pesar de que todos los lotes de broilers analizados durante este estudio resultaron negativos a *Campylobacter* al inicio del periodo de engorde, 20 de los 21 totales fueron positivos a la bacteria al final de este periodo. Si las naves de engorde se limpian y desinfectan de manera adecuada antes de la llegada de los nuevos, los lotes suelen permanecer libres de *Campylobacter* durante las primeras semanas del ciclo (Wagenaar et al., 2013). Cabe destacar que en este estudio, únicamente se aisló *Campylobacter* a partir de 5 muestras de agua tomada directamente del depósito y coincidiendo con el final de la etapa de puesta, cuando la tasa de excreción de la bacteria era superior al 85,0% (Pérez-Boto et al., 2010:2012). En la etapa de engorde todas las muestras ambientales fueron negativas a *Campylobacter* al inicio del ciclo, y la bacteria se aisló por primera vez a los 14 días de edad. A partir de este momento la excreción aumentó significativamente a lo largo de toda la crianza (del 4,8% al 61,9% a los 42 días) (van Gerwe et al., 2009) (Tabla 3).

Tabla 3. Número de muestras positivas de *Campylobacter* aisladas durante el periodo de engorde.

T.m/P.	Total		Dinámica de excreción de <i>Campylobacter</i> durante el engorde (días)											
	positivas		7		14		21		28		35		42	
	n	%	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).

De acuerdo con Cox et al. (2012), los resultados de este estudio sugieren que existe un desconocimiento de los aspectos epidemiológicos de la transmisión de *Campylobacter* en el sector avícola de engorde. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en lotes comerciales de pollo de engorde han concluido que los pollitos de un día parecen estar libres de *Campylobacter* (Newell and Fearnley, 2000). Este estatus negativo persiste hasta por lo menos los 10 días de edad (la llamada fase lag), y la mayoría de los lotes infectados pasan a ser positivos en sólo 2 a 3 semanas tras la llegada de los pollitos a las explotaciones (Jacobs-Reitsma, 1997; Evans and Sayers, 2000; Newell and Fearnley, 2000; Sahin et al., 2002; Cox et al., 2012). Sin embargo, puede resultar extraño que no se aísle la bacteria en ningún estudio hasta por lo menos los 10 días de edad de las aves. Este hecho vendría explicado por el efecto protector de la inmunidad maternal sobre la colonización por *Campylobacter* de los pollitos, acompañado por el uso de métodos de toma de muestras poco sensibles (Jacobs-Reitsma, 1997; Evans and Sayers, 2000; Sahin et al., 2002; Cox et al., 2012). Otras observaciones que apoyan esta hipótesis son los resultados obtenidos en el análisis de las muestras ambientales. 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). Tal vez, el difícil aislamiento de *Campylobacter* a partir de los huevos y los pollitos de un día, junto con la existencia de formas viables pero no cultivables del microorganismo, refuerzan la necesidad de llevar a cabo otras investigaciones para conseguir comprender la ecología de *Campylobacter* dentro de las granjas avícolas.

En este estudio tomamos muestras de reproductores (padres) y de lotes de pollos de engorde (su progenie), para evaluar la importancia de la transmisión vertical y horizontal de *Campylobacter*. No se encontraron evidencias de la colonización de la bacteria en ninguno de los pollitos de un día ni de las muestras ambientales analizadas, a pesar de la elevada prevalencia detectada. En conclusión, este estudio ha puesto en evidencia la falta de conocimiento de la ecología de *Campylobacter* en el sector avícola de engorde, y la complejidad del estudio de la colonización de esta bacterias en las aves. Desde el punto de vista epidemiológico, es necesario estudiar con mayor profundidad las técnicas diagnósticas para detectar *Campylobacter* spp., con el fin de mejorar nuestro conocimiento, y por lo tanto permitir el desarrollo de medidas de control eficaces para combatir este patógeno.

Agradecimientos

Por último, me gustaría dar las gracias 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.

Referencias

- ADAK, G.K., LONG, S.M. y O'BRIEN, S.J.** (2002) Trends in indigenous foodborne disease and deaths: England and Wales 1992 to 2000. *Gut*. **51**, 832-841.
- ALLEN, V.M., BULL, S.A., CORRY, J.E., DOMINGUE, G., JØRGENSEN, 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. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 54-61.
- ALTEKRUSE, S.F., STERN, N.J., FIELDS, P.I., AND SWERDLOW, D.L.** (1999) *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* **5**, 28-35.
- ANONYMOUS.** (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

- BLASER, M.J.** (1997) Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Infectious Diseases* **176**, S103-5.
- 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.
- CALLICOTT, K. A., V. FRIETHRIKSDÓTTIR, J. REIERSEN, R. LOWMAN, J. R. BISAILLON, E. GUNNARSSON, E. BERNDTSON, K. L. HIETT, D. S. NEEDLEMAN, AND N. J. STERN.** (2006) Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp in chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5794-5798.
- 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.
- 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., 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 Diseases* **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**, 1896-902.
- 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. *Preventive Veterinary Medicine* **89**, 178–184.
- 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.** (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* **12**, 3547.
- EVANS, S.J. AND SAYERS, A.R.** (2000) A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine* **46**, 209– 223.
- FAKRUDDIN, M., MANNAN, K.S., ANDREWS, S.** (2013) Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiol.* **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.
- HALD, B., SKOVGARD, H., PEDERSEN, K., AND BUNKENBORG, H.** (2008) Influxed insects as Vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poultry Science* **87**, 1428-1434.
- HAZELEGER, W., BOLDER, N., BEUMER, R., AND JACOBS-REITSMA, W.** (2008) Darkling Beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter*

- jejuni* and *Salmonella enterica* Serovar Partyphi B Variant Java between successive broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6887-6891.
- 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., COX, N.A., AND PHILLIPS, K.M.** (2003) PCR detection of naturally occurring *Campylobacter* spp. in commercial chicken embryos. *International Journal of Medical Microbiology* **293**, 137.
- IDRIS, U., LU, J., MAIER, M., SÁNCHEZ, S., HOFACRE, C.L., HARMON, B.G., MAURER, J.J., AND 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. *Veterinary Quarterly* **19**, 113-117.
- JACOBS-REITSMA, W.** (2000) *Campylobacter* in the food supply, in: *Campylobacter* (I. Nachamkin and M.J. Blaser eds), pp 467-481, Washington, DC: ASM Press.
- JANSSEN, R., KROGFELT, K.A., CAWTHRAW, S.A., VAN PELT, W., WAGENAAR, J.A. AND OWEN, R.J.** (2008) Host pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 505-518.
- LIN, J.** (2009). Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*. **6**, 755-65.
- NEWELL, D.G. AND FEARNLEY, C.** (2003) Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4343-51.
- NACHAMKIN, I., ALLOS, B.M., AND HO, T.** (1998) *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*. **11**, 555-67.
- NAUTA, M.J., AND HAVELAAR, H.A.** (2008) Risk-based standards for *Campylobacter* in the broiler meat chain. *Food Control* **19**, 372-381.
- NEWELL, D.G., ELVERS, K.T., DOPFER, D., HANSSON, I., JONES, P., JAMES, S., GITTINS, J., STERN, N.J., DAVIES, R., CONNERTON, I., PEARSON, D., SALVAT, G., AND ALLEN, V.M.** (2011) Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Applied Environmental Microbiology* **77**, 8605-8614.
- O'MAHONY, E., BUCKLEY, J.F., BOLTON, D., WHYTE, P., AND FANNING, S.** (2011) Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from poultry production units in southern Ireland. *PLoS One* **6**, e28490.
- PÉREZ-BOTO, D., GARCÍA-PENA, F.J., ABAD-MORENO, J.C., HURTADO-PIZARRO, M.D., PÉREZ-COBO, I., ECHEITA, M.A.** (2010) Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathology* **39**, 483-7.
- PÉREZ-BOTO, D., GARCIA-PEÑA, F.J., ABAD-MORENO, J.C., ECHEITA, M.A.** (2012) Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: persistent vs. transient strains. *Veterinary Microbiology* **159**, 204-11.
- RAMABU, S.S., BOXALL, N.S., MADIE, P., FENWICK, S.G.** (2004) Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. *Letter in Applied Microbiology* **39**, 252-25.
- RIDLEY, A., MORRIS, V., GITTINS, J., CAWTHRAW, S., HARRIS, J., EDGE, S., ALLEN, V.** (2011). Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *Journal of Applied Microbiology*. **111**, 233-244.
- SAHIN, O., MORISHITA, T.Y., AND ZHANG, Q.** (2002) *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. *Animal Health Research Reviews*. **3**, 95-105.
- SAHIN, O., LUO, N., HUANG, S. AND ZHANG, Q.** (2003) Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5372-9.
- SOMMER, H.M., HEUER, O.E., SØRENSEN, A.I., MADSEN, M.** (2013). Analysis of factors important for the occurrence of *Campylobacter* in Danish broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine* **111**, 100-11.

STERN, N.J., ROBACH, M.C., COX, N.A., MUSGROVE, M.T. (2002) Effect on drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Diseases* **46**, 401-4.

VAN DE GIESSEN, A.W., BLOEMBERG, B.P., RITMEESTER, W.S. AND TILBURG, J.J. (1996) Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiology & Infections* **117**, 245-50.

VAN GERWE, T., MIFLIN, J.K., TEMPLETON, J.M., BOUMA, A., WAGENAAR, J.A., JACOBS-REITSMA, W.F., STEGEMAN, A., AND KLINKENBERG, D. (2009) Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 625–628.

WAGENAAR, J.A., FRENCH, N.P., AND HAVELAAR, A.H. (2013) Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clinical Infectious Diseases*. **57**, 600-6.

WASSENAAR, T. M. AND M. J. BLASER. (1999) Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infections* **1**,1023–1033.

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. *International Journal of Food Microbiology* **125**, 182-7.