



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

***Campylobacter* spp. en granjas de pollos de
engorde: diversidad genética, resistencia
antimicrobiana y factores de virulencia**

Juan Guillermo Cantero Portillo

Tesis Doctoral

Bellaterra, 2017

***Campylobacter* spp. in broiler farms: genetic
diversity, antimicrobial resistance and
virulence factors**

Juan Guillermo Cantero Portillo

PhD Thesis

Bellaterra, 2017



Universitat Autònoma de Barcelona

***Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde:
diversidad genética, resistencia antimicrobiana y factores
de virulencia**

Tesis doctoral presentada por **Juan Guillermo Cantero Portillo** para optar al grado de Doctor dentro del programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animales del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, bajo la dirección de la Dra. **Marta Cerdà Cuéllar** y la tutoría del Dr. **Antonio Ramis Salvá**.

Bellaterra, 2017



La Dra. **Marta Cerdà Cuéllar**, investigadora del Centro de investigación de Sanidad Animal del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (CReSA-IRTA) como directora de esta tesis y el Dr. **Antonio Ramis Salvá**, profesor titular del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y tutor de esta tesis.

Certifican:

Que la memoria titulada «***Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: diversidad genética, resistencia antimicrobiana y factores de virulencia**» presentada por **Juan Guillermo Cantero Portillo** para la obtención del grado Doctor en Medicina y Sanidad Animal, se ha realizado bajo su dirección y supervisión.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra (Barcelona), el 08 de junio del 2017.

Dra. Marta Cerdà-Cuéllar

Dr. Antonio Ramis Salvá

Directora

Tutor

Juan Guillermo Cantero Portillo

Doctorando

Los estudios de doctorado presentados por Juan Guillermo Cantero Portillo fueron apoyados financieramente por el PROGRAMA DE BECAS DE POSTGRADO DE ITAIPU – Paraguay.

Dedicatoria

Agradecimiento

TABLA DE CONTENIDO.....	I
LISTA DE ABREVIACIONES.....	V
SUMMARY.....	VII
RESUMEN.....	X
RESUM.....	XIII
PUBLICACIONES.....	XVII

PARTE I: INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS

1. Introducción General.....	5
2. Taxonomía de <i>Campylobacter</i>.....	7
2.1 El género de <i>Campylobacter</i>	8
2.1.1 Características microbiológicas y de cultivo.....	10
2.1.2 Aislamiento e identificación.....	11
3. Signos clínicos de la campilobacteriosis.....	13
4. Aspectos Epidemiológicos del <i>Campylobacter</i>.....	14
4.1 Transmisión de <i>Campylobacter</i>	15
4.1.1 Fuentes y transmisión en humanos.....	15
4.1.2 Transmisión horizontal en aves.....	17
4.1.3 Transmisión vertical en aves.....	19
4.2 Estacionalidad de la campilobacteriosis.....	20
4.3 Campilobacteriosis: el papel de la carne de aves de corral.....	21
5. Patogénesis de la campylobacteriosis.....	22
5.1 Motilidad.....	23
5.2 Quimiotaxis.....	25
5.3 Adhesión.....	26
5.4 Invasión.....	27
5.5 Producción de toxinas.....	28

5.6	Resistencia a las sales biliares y a antimicrobianos.....	29
5.7	Respuesta al estrés y supervivencia.....	30
6.	Tratamiento.....	30
7.	Tipificación de <i>Campylobacter</i>	31
7.1	Métodos fenotípicos.....	31
7.2	Métodos genotípicos.....	32
7.2.1	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	33
7.2.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	36
7.2.3	<i>Whole genome Sequencing</i> (WGS).....	37
8.	Antimicrobianos.....	38
8.1	Resistencia antimicrobiana.....	39
8.2	Tipo de resistencia antimicrobiana.....	41
8.2.1	Natural o intrínseca.....	41
8.2.2	Adquirida.....	41
8.3	Genes de resistencia.....	41
8.4	Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	42
8.4.1	Modificación enzimática del antibiótico.....	42
8.4.2	Bombas de eflujo.....	42
8.4.3	Cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria.....	42
8.4.4	Alteraciones de las dianas del antibiótico.....	43
8.5	Mecanismo de Resistencia en <i>Campylobacter</i>	43
8.5.1	Resistencia a fluoroquinolonas.....	43
8.5.2	Resistencia a macrólidos.....	44
8.5.2.1	Resistencia a β -lactámicos.....	45
8.5.3	Resistencia a tetraciclinas.....	45
8.5.4	Resistencia a aminoglucósidos.....	46
8.5.5	Resistencia a cloranfenicol.....	46

9. Utilización de antimicrobianos en la industria avícola.....	47
Objetivos.....	51

PART II: STUDIES

Study I.....	55
Abstract.....	57
Introduction.....	58
Materials and methods.....	60
Results.....	63
Discussion.....	77
Study II.....	83
Abstract.....	85
Introduction.....	86
Materials and methods.....	88
Results.....	90
Discussion.....	98
Study III.....	103
Abstract.....	105
Introduction.....	106
Materials and methods.....	107
Results.....	111
Discussion.....	119

PARTE III: CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones.....	125
Referencias.....	129

LISTA DE ABREVIACIONES

CCDA	Charcoal cefoperazone deoxycholate agar
CDT	Cytolethal distending toxin
CFU	Colony form units
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EM*	Estados Miembros*
EU	European Union
ISO	International Organization for Standardization
Kb	Kilo base
Pb	Pares de bases
LPS o LOS	Lipopolisacharide o lipopolisácarido
MLST	Multilocus sequence typing
STs	Sequence type o secuencia tipo
CC	Clonal Complex o complejo clonal
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
WGS	Whole Genomic Sequence
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
SGB*	Síndrome de Guillain-Barré*
UFC*	Unidad Formadora de Colonias*
UE*	Unión Europea*
UV*	Ultravioleta*
WHO	World Health Organization
CGE	Center for Genomic Epidemiologic
NCBI	National Center for Biotechnology Information

SNPs Polimorfismo de nucleótido único*

*Del castellano

SUMMARY

Campylobacteriosis is the most commonly reported food-borne zoonosis in the European Union (EU) since 2005. The main source of infection is the consumption of chicken meat contaminated with *Campylobacter* (mainly *C. jejuni* and *C. coli*). The high prevalence of *Campylobacter* in broilers on farm represents a high risk of contamination of the final product and thereby the risk of infection for the consumer. Therefore, it is a priority for the EU to prevent and reduce the number of *Campylobacter* positive batches at slaughter age. For this, it is necessary to gain insight into the behaviour and epidemiology of this pathogen. Thus, within the framework of this PhD thesis we performed a number of studies: (i) we studied the diversity and dynamics of *Campylobacter* strains from broilers on farm; (ii) we characterized the isolates in terms of resistance against a panel of antimicrobials and the presence of virulence-associated genes; (iii) we characterized in depth a selection of isolates by whole genome sequencing, analysing the mechanisms for resistance, the distribution of virulence-associated genes, the genotypes and their phylogenetic relationship. The isolates of these studies came from a two-year longitudinal study, performed in five different farms from Catalonia. From the *Campylobacter*-positive crops, randomly selected isolates from different birds along the rearing cycles were preserved.

In order to study in depth the diversity, seasonality and dynamics of *Campylobacter* strains circulating in farms, molecular typing of the isolates was performed using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and *Multilocus Sequence Typing* (MLST). By PFGE and using two restriction enzymes, a total of 343 isolates were analysed (*C. jejuni* n = 254 and *C. coli* n = 89) and overall 92 macrorestriction profiles (between 12 and 24 profiles per farm) were identified. Overall, a large genotypic diversity was detected, identifying mostly between 1 and 2 different genotypes per crop, although not isolated from successive crops. On the other hand, it was observed persistent genotypes within the same crop along the rearing cycle. When comparing the isolates from different farms, common *C. jejuni*

genotypes among different farms were found. A total of 127 isolates were selected (93 *C. jejuni* and 34 *C. coli*) from the different PFGE genotypes, which were analysed by MLST, and high genetic diversity was observed as well. The *C. jejuni* isolates were grouped in 15 different clonal complexes (CC) distributed in 34 sequence types (ST), whereas the *C. coli* isolates were all grouped within the CC828, distributed in 12 STs. In addition, we identified five novel STs of *C. jejuni* and two of *C. coli*. Certain seasonality was observed for some CC. The CC21 and CC206 were found along the year, except during the coldest trimester, being more commonly found during the warmer months.

In the second study, we evaluated the susceptibility of the 344 isolates against a panel of 12 antimicrobials of different families using the disc diffusion method. Resistance to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) was the most frequent, followed by tetracyclines. This represents a major public health problem, given that these are the drugs of choice for treating human enteric infections. In contrast, resistance against erythromycin and gentamycin were the less prevalent. All the analysed isolates were sensitive to chloramphenicol, amoxicillin + clavulanate, imipenem and meropenem. A 62,2% of all the isolates were multidrug resistant, being nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, tetracycline, doxycycline and ampicillin, the most frequent profile. On the other hand, 14 virulence genes involved in colonization and infection were analysed, and a heterogeneous distribution in the analysed isolates was observed. It is worth noting the detection of the *wlaN* gene in 19% of the isolates; this gene is involved in the Guillain-Barré syndrome, a serious neurological syndrome that may develop after *Campylobacter* infection.

In the last study, whole genome sequencing using the Illumina platform was performed in 16 *C. jejuni* and *C. coli* isolates for their in-depth characterization. High throughput sequencing has become a powerful, fast and accessible tool for characterizing pathogens such as *Campylobacter* in epidemiological studies.

Data obtained in this PhD thesis confirms the genetic diversity of *Campylobacter* in broilers and the great complexity of strain dynamics on farm. This may be the main factor that hampers effective control strategies of this bacterium on farm. Likewise, the high frequency of resistant and multiresistant strains isolated from broilers highlight the importance of making the producers and/or managers of intensive poultry production aware about the prudent use of antimicrobials. Effective biosecurity measures to control *Campylobacter* in the farm, not only would reduce the high prevalence of positive batches at slaughter age, but indirectly would also improve the overall sanitary status of the farms. This would lower the need for the therapeutic use of antibiotics and would probably lead to a reduction in resistant strains.

RESUMEN

La campilobacteriosis es la zoonosis de transmisión alimentaria más comúnmente reportada en la Unión Europea (UE) desde 2005. La principal fuente de infección es el consumo o manipulación de carne de pollo contaminada con *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni* y *C. coli*). La alta prevalencia de *Campylobacter* en pollos de engorde en granja supone un elevado riesgo de contaminación del producto final y por ende el riesgo de infección para el consumidor. Es por ello que para la UE es prioritaria la prevención y reducción del número de lotes positivos a *Campylobacter* en edad de sacrificio. De ahí la importancia de conocer en profundidad el comportamiento y la epidemiología de este patógeno. De este modo, en el marco de esta tesis (i) se estudió la diversidad y dinámica de cepas de *Campylobacter* de pollos de engorde en granja; (ii) se caracterizaron los aislados desde el punto de vista de resistencia a un panel de antimicrobianos así como de genes de virulencia; (iii) se caracterizó en profundidad una selección de aislados mediante secuenciación masiva, analizando los mecanismos de resistencia, distribución de genes de virulencia, genotipo y relaciones filogenéticas. Los aislados objeto de estudio proceden de un estudio longitudinal previo, realizado durante dos años en cinco granjas de Cataluña. De aquellos lotes positivos a *Campylobacter* se conservaron una serie de aislados al azar de diferentes individuos a lo largo de cada crianza.

Para estudiar en profundidad la diversidad, estacionalidad y dinámica de cepas de *Campylobacter* circulantes en las granjas, se realizó la tipificación molecular de los aislados utilizando las técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y *multilocus sequence typing* (MLST). Mediante PFGE y utilizando dos enzimas de restricción, se analizaron un total de 343 aislados (254 de *C. jejuni* y 89 de *C. coli*) y se identificaron un total de 92 perfiles diferentes de macrorestricción (de 12 a 24 perfiles por granja). Globalmente, detectamos una gran diversidad genotípica, identificando mayoritariamente entre 1 y 2 genotipos diferentes por crianza, pero que no se aislaron en crianzas sucesivas. Por otro lado, observamos persistencia

de algunos genotipos dentro de un mismo lote a lo largo de la crianza. Al comparar los aislados de las diferentes granjas, encontramos genotipos comunes de *C. jejuni* entre diferentes granjas. De los diferentes genotipos obtenidos mediante PFGE, seleccionamos un total de 127 aislados (93 de *C. jejuni* y 34 de *C. coli*) que analizamos mediante MLST, encontrando igualmente una gran diversidad genética. Los aislados de *C. jejuni* se agruparon en 15 complejos clonales (CC) distribuidos en 34 secuencias tipo (ST), mientras que los aislados de *C. coli* se agruparon en su totalidad dentro del CC828 distribuidos en 12 STs. Además, identificamos cinco STs nuevos de *C. jejuni* y dos de *C. coli*. Se observó cierta estacionalidad en determinados CC. Los CC21 y CC206 se encontraban a lo largo del año, excepto durante el trimestre más frío, siendo más frecuentes en los meses más cálidos. Por otro lado el CC48 se observó únicamente en los meses más cálidos.

En el segundo estudio, evaluamos el perfil de susceptibilidad de 344 aislados frente a un panel de 12 antimicrobianos de diferentes familias, utilizando el método de difusión en disco. La resistencia a quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) fue la más prevalente, seguida de tetraciclinas. Esto representa un problema de salud pública importante puesto que éstos son los agentes más usados para tratar infecciones entéricas humanas. Por el contrario, las resistencias a eritromicina y gentamicina fueron las menos prevalentes. Todos los aislados analizados fueron sensibles a cloranfenicol, amoxicilina + clavulanato, imipenem y meropenem. Un 62,2% de los aislados fueron multiresistentes, siendo el perfil de resistencia más frecuente: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, enrofloxacin, tetraciclina, doxiciclina y ampicilina. Por otro lado, analizamos 14 genes de virulencia involucrados en la colonización e infección, donde observamos una distribución heterogénea de los mismos, en los aislados analizados. Cabe destacar la detección del gen *wlaN* en un 19% de aislados; este gen está relacionado con el síndrome de Guillain-Barré, un síndrome neurológico grave que puede desarrollarse tras una infección por *Campylobacter*.

En el último estudio se realizó la secuenciación del genoma completo, mediante la plataforma Illumina, de un total de 16 aislados de *C. jejuni* y *C. coli* para su caracterización en profundidad. La tecnología de secuenciación masiva se ha convertido en una herramienta potente, rápida y asequible para caracterizar patógenos de interés como *Campylobacter* en estudios epidemiológicos.

Los datos obtenidos en esta tesis confirman la diversidad genética de *Campylobacter* en los pollos de engorde y la gran complejidad de la dinámica de cepas circulantes en granja. Ello probablemente sea el principal factor que dificulta conseguir estrategias eficaces de control de la bacteria en granja. Por otro lado, la elevada proporción de cepas resistentes y multiresistentes a antibióticos, aisladas de pollos de engorde ponen de relieve la importancia de concienciar a los productores y/o encargados de la producción intensiva sobre el uso prudente de antimicrobianos. Unas medidas de bioseguridad efectivas para el control de *Campylobacter* en granja, no sólo conseguirían reducir la alta prevalencia de lotes positivos a edad de sacrificio, sino que indirectamente mejorarían el estatus sanitario general de la granja. Ello conllevaría una menor necesidad del uso terapéutico de antibióticos y probablemente una reducción de cepas resistentes.

RESUM

La campilobacteriosi és la zoonosi de transmissió alimentària més comunament reportada a la Unió Europea (UE) des de 2005. La principal font d'infecció és el consum o manipulació de carn de pollastre contaminada amb *Campylobacter* (principalment *C. jejuni* i *C. coli*). L'alta prevalença de *Campylobacter* en pollastres d'engreix a granja suposa un elevat risc de contaminació del producte final i per tant el risc d'infecció pel consumidor. És per això, que per a la UE és prioritària la prevenció i reducció del nombre de lots positius a *Campylobacter* en edat de sacrifici. D'aquí la importància de conèixer en profunditat el comportament i l'epidemiologia d'aquest patogen. Així, en el marc d'aquesta tesi, es va (i) estudiar la diversitat i dinàmica de soques de *Campylobacter* de pollastres d'engreix a granja; (ii) es van caracteritzar els aïllaments des del punt de vista de resistència a un ventall d'antimicrobians així com de gens de virulència; (iii) es va caracteritzar en profunditat una selecció d'aïllaments mitjançant seqüenciació massiva, analitzant els mecanismes de resistència, distribució de gens de virulència, genotip i relacions filogenètiques. Els aïllaments objecte d'estudi procedien d'un estudi longitudinal previ, realitzat durant dos anys en cinc granges de Catalunya. Del conjunt de lots positius a *Campylobacter* es van conservar una sèrie d'aïllaments a l'atzar de diferents individus al llarg de cada cria.

Per estudiar en profunditat la diversitat, estacionalitat i dinàmica de soques de *Campylobacter* circulants a les granges, es va realitzar la tipificació molecular dels aïllaments utilitzant les tècniques d'electroforesi en camp polsat (PFGE) i *multilocus sequence typing* (MLST). Mitjançant PFGE i utilitzant dos enzims de restricció, es van analitzar un total de 343 aïllaments (254 de *C. jejuni* i 89 de *C. coli*) i es van identificar un total de 92 perfils diferents de macrorestricció (de 12 a 24 perfils per granja). Globalment, vam detectar una gran diversitat genotípica, identificant majoritàriament entre 1 i 2 genotips diferents per cria, però que no es van aïllar en criances successives. D'altra banda, vam observar persistència d'alguns genotips dins d'un mateix lot al llarg de la cria. En comparar els

aïllaments de les diferents granges, vam trobar genotips comuns de *C. jejuni* entre granges. Dels diferents genotips obtinguts mitjançant PFGE, vam seleccionar un total de 127 aïllaments (93 de *C. jejuni* i 34 de *C. coli*) que vam analitzar mitjançant MLST, trobant igualment una gran diversitat genètica. Els aïllaments de *C. jejuni* es van agrupar en 15 complexes clonals (CC) distribuïts en 34 seqüències tipus (ST), mentre que els aïllaments de *C. coli* es van agrupar en la seva totalitat dins del CC828 distribuïts en 12 STs. A més, vam identificar cinc STs nous per a *C. jejuni* i dos per a *C. coli*. Es va observar certa estacionalitat en determinats CC. Els CC21 i CC206 es trobaven al llarg de l'any, excepte durant el trimestre més fred, sent més freqüents en els mesos més càlids. Per altra banda, el CC48 es va observar únicament en els mesos més càlids.

En el segon estudi, vam avaluar el perfil de susceptibilitat dels 344 aïllaments enfront un panell de 12 antimicrobians de diferents famílies, utilitzant el mètode de difusió en disc. La resistència a quinolones (àcid nalidíxic i ciprofloxacina) va ser la més prevalent, seguida de la resistència a les tetraciclins. Aquest fet representa un problema de salut pública important donat que aquests són els agents antimicrobians més utilitzats per tractar infeccions entèriques humanes. Per contra, les resistències a eritromicina i gentamicina van ser les menys prevalents. Tots els aïllaments analitzats van ser sensibles a cloramfenicol, amoxicil·lina + àcid clavulànic, imipenem i meropenem. Un 62,2% dels aïllaments van ser multiresistents, sent el perfil més freqüent: àcid nalidíxic, ciprofloxacina, enrofloxacina, tetraciclina, doxiciclina i ampil·lina. Per altra banda, vam analitzar 14 gens de virulència involucrats en la colonització i infecció, i vam observar una distribució heterogènia dels mateixos en els aïllaments analitzats. Cal destacar la detecció del gen *wlaN* en un 19% dels aïllaments analitzats; aquest gen està relacionat amb el síndrome de Guillain-Barré, una síndrome neurològica greu que es pot desenvolupar després d'una infecció per *Campylobacter*.

En l'últim estudi es va realitzar la seqüenciació del genoma complet, mitjançant la plataforma Illumina, d'un total de 16 aïllaments de *C. jejuni* i *C. coli* per a la seva

caracterització en profunditat. La tecnologia de seqüenciació massiva s'ha convertit en una eina potent, ràpida i assequible per caracteritzar patògens d'interès com *Campylobacter* en estudis epidemiològics.

Les dades obtingudes en aquesta tesi confirmen la diversitat genètica de *Campylobacter* en els pollastres d'engreix i la gran complexitat de la dinàmica de soques circulants a granja. Això probablement sigui el principal factor que dificulta aconseguir estratègies eficaces de control del bacteri a granja. Per altra banda, les elevades resistències i multiresistències a antibiòtics que presenten les soques de *Campylobacter* aïllades de pollastres d'engreix posen de manifest la importància de conscienciar als productors i/o encarregats de la producció intensiva sobre l'ús prudent dels antimicrobians. Unes mesures de bioseguretat efectives pel control de *Campylobacter* a granja, no només aconseguirien reduir l'alta prevalença de lots positius a edat de sacrifici, sinó que indirectament millorarien l'estatus sanitari general de la granja. Això comportaria una menor necessitat de l'ús d'antibiòtics i probablement una reducció de soques resistents.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta tesis se han enviado o están en preparación para sumisión a revistas científicas internacionales indexadas:

Guillermo Cantero, Florencia Correa-Fiz, Troels Ronco, Mikael Strube, Marta Cerdà-Cuéllar, Karl Pedersen. 2017. Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole genome sequencing. Foodborne Pathogens and Disease. Manuscrito submitido y bajo revisión.

Guillermo Cantero, Marta Cerdà-Cuéllar. Long term dynamics and diversity of *Campylobacter* strains in broiler farms. Manuscrito en preparación para su submisión.

Guillermo Cantero, Marta Cerdà-Cuéllar. Antimicrobial resistance and virulence factors of *C. jejuni* and *C. coli* isolated from broilers along a two-year period. Manuscrito en preparación para su submisión

PARTE I

Introducción general y Objetivos

Introducción general

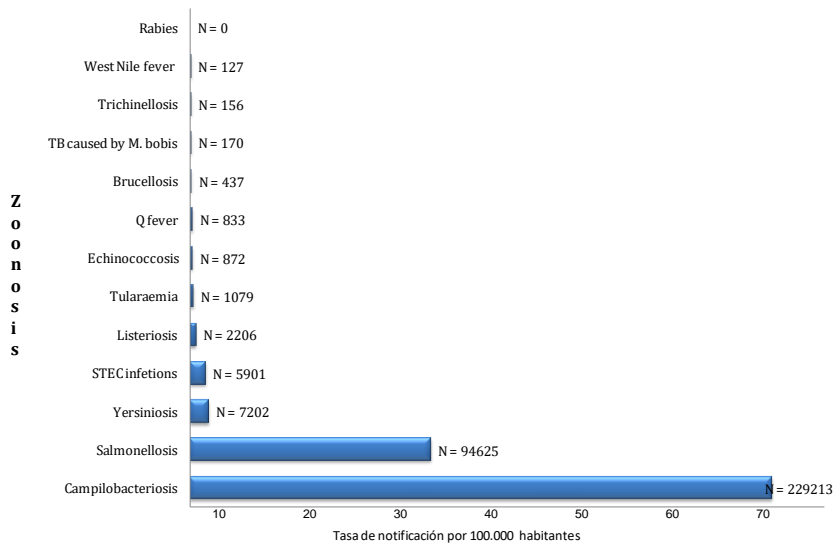
1. Introducción general

La campilobacteriosis (infección por *Campylobacter*) es la zoonosis de transmisión alimentaria más comúnmente reportada en la Unión Europea (UE) en la última década (EFSA, 2016), así como en la mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo (WHO, 2011). Sin embargo, en los últimos años los casos de salmonelosis han ido disminuyendo debido al efecto de los programas de control implementados, en contrapartida, los casos de campilobacteriosis siguen aumentando. Desde 2005, *Campylobacter* ha superado en número a *Salmonella* como la causa más comúnmente reportada de enfermedad diarreica bacteriana en humanos en la UE (EFSA, 2014).

El número de casos confirmados en la UE ha ido en ascenso desde 2005 alcanzando en 2014 un total de 236.851 casos, según últimos datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) (EFSA, 2016) (Fig. 1). Sin embargo, se estima que la incidencia real de la enfermedad es entre 7,6 a 100 veces mayor que la reportada (Mead et al., 1999; Samuel et al., 2004; Skirrow and Blaser, 1992). Dada la importancia de la campilobacteriosis, la EFSA ha hecho hincapié en la importancia de realizar una vigilancia activa de esta zoonosis en todos los estados miembros, intensificando los esfuerzos para determinar y comunicar todos los posibles casos de campilobacteriosis.

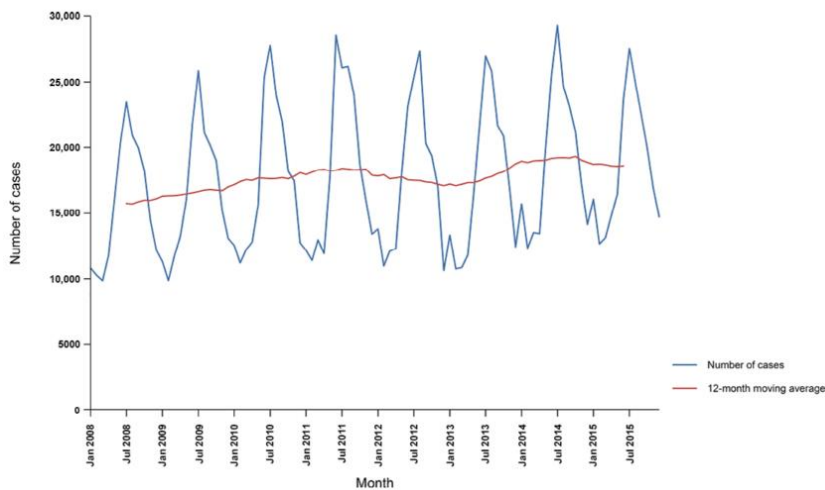
Introducción general

Figura 1. Tasa de notificación de zoonosis declaradas en casos humanos confirmados en la UE, 2015. EFSA Journal 2016; 14(12):4634.



Nota: Total de casos confirmados indicado en el extremo de cada barra.

Figura 2. Evolución de los casos humanos confirmados de campilobacteriosis en la UE/EEA, para el periodo 2008-2015. EFSA Journal 2016; 14(12):4634.



2. Taxonomía de *Campylobacter*

Campylobacter spp., se asoció durante mucho tiempo como causa de enfermedades veterinarias, como la diarrea en el ganado bovino y los abortos sépticos en bovinos y ovinos. En el año 1886, Theodor Escherich, observó unas bacterias no cultivables en forma de espiral en el contenido de colon de neonatos y gatitos que habían muerto a consecuencia del cólera infantum (Escherich, 1886).

En 1913, McFadyean y Stockman realizaron la primera identificación de *Campylobacter* en asociación con fetos abortados de ovinos (Crushell et al., 2004). En 1918 Smith descubrió unas bacterias en forma de espiral en fetos de bovinos abortados, llegando a la conclusión que estas cepas y los vibriones de McFadyean y Stockman pertenecían a la misma especie, por lo cual propuso el nombre de *Vibrio fetus* (Smith, T., Taylor, 1919).

En 1957, Elizabeth King propuso dos tipos diferentes de vibrios implicados en infecciones entéricas, denominando a uno de ellos como *Vibrio fetus* y destacando en el otro su característica de vibrio termófilo (*V. jejuni* y *V. coli*), (King, 1957). En 1963, basándose en características fenotípicas (composición de la base de ADN, requerimientos de microaerofilia y metabolismo no fermentativo), se propuso la creación del género *Campylobacter*, que deriva de dos palabras griegas que significan “bastón curvo” (Veron, 1963). Diez años más tarde, Véron y Chatelain esclarecieron la taxonomía del género reclasificándolo en cuatro especies distintas: *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter sputorum*. Desde entonces se desarrollaron diferentes métodos y medios de cultivos para su aislamiento (Chatelain, 1973).

La dificultad y el fracaso de cultivar y aislar *Campylobacter* de las heces se atribuían al recrecimiento de las bacterias coliformes y los requerimientos nutricionales de este microorganismo. Posteriormente esta dificultad fue superada implementando un método de filtración. Este método implicó el filtrado de heces

Introducción general

mediante filtros de 0,64 μm que dejaban pasar a las campilobacterias más pequeñas y móviles. Posteriormente el producto del filtrado se inoculaba en medios selectivos (Butzler, J et al., 1973). Este método demostró ser demasiado complicado y en 1977, Martin Skirrow describió una técnica de siembra directa de heces en agar sangre suplementada con vancomicina, polimixina B y trimetoprim, que facilitaba el examen de rutina de muestras fecales humanas (Skirrow, 1977).

Desde entonces, se han realizado varias modificaciones metodológicas, permitiendo así la adopción universal de tales métodos y sus variantes en los laboratorios de diagnóstico clínico microbiológico para el aislamiento e identificación de *Campylobacter* a partir de muestras fecales humanas. Los métodos mejorados de aislamiento llevaron a la publicación del primer informe sobre la frecuencia de la campilobacteriosis en asociación con los seres humanos, lo que condujo a una avalancha de investigaciones epidemiológicas, y por consiguiente, a la comprensión de que las campilobacterias eran un importante problema de salud pública para los países desarrollados y en vías de desarrollo (On, 2013).

Las metodologías de aislamiento desarrolladas permitieron el aislamiento de *Campylobacter* a partir de diversas fuentes (humanas, animales y ambientales), lo cual condujo a proponer nuevas especies. A consecuencia de este hecho, la taxonomía fue re-evaluada y se propuso una nueva familia bacteriana, denominada *Campylobacteraceae* (Vandamme and De ley, 1991). Actualmente esta familia está constituida por cuatro géneros diferentes: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Dehalospirillum*.

2.1 Género *Campylobacter*

Los miembros del género *Campylobacter* pertenecen a la Familia *Campylobacteraceae*, Orden *Campylobacterales*, Clase *Epsilonproteobacteria*, Phylum *Proteobacteria*. Aunque la estructura taxonómica del género

Campylobacter ha sufrido grandes cambios a lo largo del tiempo e incluso en la actualidad, la taxonomía del género es un tema bastante controvertido, que requiere un mayor estudio (Debruyne et al., 2005; On, 2001). Dentro del género de *Campylobacter* se han descrito 34 especies y 14 subespecies (<http://www.bacterio.net>) (Tabla 1). Algunas de estas bacterias son comensales, pero las especies termófilas, principalmente *C. jejuni* (sub-especie *jejuni*) y *C. coli*, son patógenos entéricos de humanos y animales domésticos (Notermans, 1994). Además, se han aislado otras especies termófilas como *C. lari* y *C. upsaliensis* en pacientes con enfermedades diarreicas, pero notificados con menor frecuencia (WHO, 2011).

Tabla 1. Especies descritas y validadas dentro del género *Campylobacter*.

Especies de <i>Campylobacter</i>	Fuente	Año
<i>C. avium</i>	Aves de corral	2009
<i>C. butzleri</i>	Humanos, cerdos, bovinos	1991
<i>C. canadensis</i>	Aves silvestres	2007
<i>C. cinaedi</i>	Humanos	1988
<i>C. coli</i>	Cerdos, ovejas, ganado vacuno, aves de corral, aves silvestres	1973
<i>C. concisus</i>	Humanos, mascotas	1981
<i>C. corcagiensis</i>	Primates	2014
<i>C. cryaerophilus</i>	Bovinos, porcinos, ovejas	1985
<i>C. cuniculorum</i>	Conejos	2009
<i>C. curvus</i>	Humanos	1991
<i>C. fennelliae</i>	Humanos	1988
<i>C. fetus</i>	Bovinos	1963
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Bovinos, ovejas y reptiles	1973
<i>C. fetus</i> subsp. <i>testudinum</i>	Reptiles	2014
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Bovinos, ovejas	1973
<i>C. gracilis</i>	Humanos	1995
<i>C. helveticus</i>	Perros, gatos	1993
<i>C. hominis</i>	Humanos	2001
<i>C. hyoilei</i>	Porcinos	1995
<i>C. hyointestinalis</i>	Porcinos	1985
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Bovinos, porcinos	1995
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Porcinos	1995
<i>C. iguaniorum</i>	Reptiles	2015
<i>C. insulaenigrae</i>	Mamíferos marinos	2004

Introducción general

Tabla 1. Continuación. Especies descritas y validadas dentro del género *Campylobacter*.

Especies de <i>Campylobacter</i>	Fuente	Año
<i>C. jejuni</i>	Aves de corral, bovinos, ovejas, aves silvestres, cerdos	1973
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Bovinos, ovejas, cerdos, aves de corral, aves silvestres	1988
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Humanos	1988
<i>C. lari</i>	Aves de corral, gatos, aves silvestres, perros	1984
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Mariscos	2009
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	Perros, gatos, aves de corral, aves silvestres	2009
<i>C. lanienae</i>	Bovinos, porcinos	2000
<i>C. mucosalis</i>	Porcinos	1985
<i>C. mustelae</i>	Hurones	1989
<i>C. nitrofigilis</i>	Muestras de sedimentos asociadas a las raíces	1983
<i>C. peloridis</i>	Mariscos	2009
<i>C. pylori</i>	Humanos	1985
<i>C. pylori</i> subsp. <i>Mustelae</i>	Hurones	1988
<i>C. pylori</i> subsp. <i>Pylori</i>	Hurones	1988
<i>C. rectus</i>	Humanos	1991
<i>C. showae</i>	Humanos	1993
<i>C. sputorum</i>	Bovinos	1973
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	Bovinos	1973
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>mucosalis</i>	Bovinos	1981
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Bovinos	1973
<i>C. subantarcticus</i>	Aves silvestres	2010
<i>C. upsaliensis</i>	Perros, gatos	1991
<i>C. ureolyticus</i>	Humanos	2010
<i>C. volucris</i>	Aves silvestres	2010
<i>C. sputorum</i> biovar <i>faecalis</i>	Ovejas, toros	-
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	Bovinos	-
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	Bovinos, porcinos	-

2.1.1 Características microbiológicas y de cultivo

Campylobacter spp., son bacilos gram negativos, de aproximadamente 0,2 a 0,8 µm de ancho x 0,5 a 5 µm de largo, en su mayoría delgados, en forma de S o curvados

en espiral. Poseen un flagelo polar en uno (monotrico) o ambos extremos (anfotrico), que en conjunto con su forma helicoidal genera un movimiento característico similar a un sacacorchos o en forma de tirabuzón (Ferrero and Lee, 1988). Las únicas excepciones son *C. gracilis* que no es móvil y *C. showae* que posee múltiples flagelos (Debruyne et al., 2005). La relación de bases G y C del ADN oscila entre 27 y 47 %.

Las especies del género *Campylobacter* son no esporuladas y no sacarolíticas, para su crecimiento necesitan requerimientos nutricionales y ambientales únicos, esto se atribuye al tamaño relativamente pequeño de su genoma (Griffiths and Park, 1990). Crecen en una atmósfera microaeróbica (3-5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N). *Campylobacter* spp., poseen actividad oxidasa a excepción de *C. gracilis*; no fermentan ni oxidan los carbohidratos, en su lugar obtienen energía de aminoácidos o productos intermediarios del ciclo tricarboxílico (ciclo de Krebs) (Vandamme, 2000), además no metabolizan la glucosa debido a que carecen de la enzima glucolítica 6-fosfofructoquinasa (PFK) (Kelly, 2001; Velayudhan et al., 2004). *C. jejuni* hidroliza el hipurato, el acetato de indoxilo y reduce el nitrato.

Las campilobacterias crecen a una temperatura óptima de 30° C a 37° C. Las especies de *Campylobacter* termófilas: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. lanienae* y *C. upsaliensis*, son las responsables de ocasionar la campilobacteriosis en los humanos, tienen la capacidad de crecer entre 37° C y 42° C, pero son incapaces de crecer por debajo de 30° C, debido a la ausencia de los genes de proteínas de choque en frío, importantes en la adaptación a baja temperatura (Levin, 2007).

2.1.2 Aislamiento, detección, y confirmación

La sensibilidad al oxígeno y a los radicales oxidantes que presenta *Campylobacter* spp., condiciona la composición de los medios selectivos para su aislamiento. Estos medios selectivos generalmente contienen uno o más captadores de oxígeno y agentes selectivos, particularmente antibióticos. Para el aislamiento de

Introducción general

Campylobacter spp., la mayoría de los métodos incluyen un paso previo de pre-enriquecimiento en un medio líquido selectivo, en función del tipo de muestra, seguido de una siembra en agar selectivo. En la actualidad existen varios caldos selectivos, como el caldo Bolton, el caldo Preston y el caldo de enriquecimiento para *Campylobacter*, así como diversos agares selectivos, para aumentar la eficacia del aislamiento de *Campylobacter* de muestras clínicas y de alimentos. Entre los agares selectivos se encuentran el agar Preston, el agar carbón cefoperazona desoxicalato modificado (mCCDA), así como el agar Skirrow, Blaser, Butzler y Campy-BAP; son medios comerciales que contienen agar brucela, base de agar sangre principalmente sangre de ovinos, bovinos o equinos, además varios aditivos antibióticos como bacitracina, novobiocina, trimetoprin, actidiona, cicloheximida, cefalotina y colistina, que inhiben el crecimiento de los contaminantes y a su vez aumentan la eficacia de aislamiento. La utilización de mCCDA y la incubación a 42° C en lugar de 37° C generalmente es la metodología de elección (ISO Standard 10272-1:2006), ya que permite el aislamiento de más cepas de *Campylobacter* (Zanetti et al., 2009). El agar mCCDA, que contiene como suplemento antibiótico cefoperazona y amfotericina B, es una modificación del medio original CCDA, que contenía únicamente cefazolina.

Además, se han desarrollado unos métodos alternativos y rápidos para la detección y confirmación de *Campylobacter* spp., por ejemplo aquellos que incluyen hibridación *in situ* fluorescente (Lehtola MJ et al., 2006), aglutinación en látex y un método de enriquecimiento mediante filtración que permite la separación de *Campylobacter* de otros organismos presentes en la matriz del alimento (Baggerman and T, 1992).

Los métodos más eficaces de confirmación de *Campylobacter* son los basados en la técnica de la PCR, ya que las reacciones fenotípicas son a menudo atípicas y difíciles de interpretar, como en el caso de la prueba de la hidrólisis del hipurato (*hipO*) que se utiliza para diferenciar aislados de *C. jejuni* y *C. coli*. En la actualidad existen diversos protocolos de PCR que se utilizan para la detección y

confirmación de especies de *Campylobacter* termófilos. Además, recientemente se ha dado paso hacia plataformas moleculares más sofisticadas como la PCR en tiempo real, que demuestra el potencial de un límite de detección de 1 ufc en muestras de pollo en menos de dos horas (Debretsion et al., 2007).

3. Signos clínicos de la campilobacteriosis

Las especies de *Campylobacter* constituyen un grupo de organismos de gran diversidad biológica. En las infecciones humanas, las dos especies predominantes responsables de trastornos gastrointestinales son *C. jejuni* y *C. coli*. Las infecciones por lo general suelen ser leves, pero en ocasiones pueden llegar a ser mortales aunque muy poco frecuentes. La población de mayor riesgo en humanos la constituyen los niños menores de cinco años, los adolescentes y adultos jóvenes entre 20 y 40 años, pero también puede afectar a adultos mayores de 75 años de edad o individuos inmunosuprimidos (WHO, 2011). A nivel mundial, *C. jejuni* causa entre el 5% y el 10% de gastroenteritis en los adultos y ha sido responsable de epidemias de diarrea en países en vías de desarrollo (Coker et al., 2002).

Los síntomas de la campilobacteriosis son variables, pudiendo aparecer entre dos a cinco días post infección, sin embargo el periodo de incubación oscila entre uno a diez días (WHO, 2011). En general la dosis infectiva de *Campylobacter* es baja; en estudios experimentales en humanos, se han inducido infecciones con tan solo 500-800 bacterias (Skirrow and Blaser, 1992). La infección entérica causada por *Campylobacter* puede cursar con una diarrea leve, acuosa, no inflamatoria a una diarrea inflamatoria severa (Butzler and Skirrow, 1979; van Vliet and Ketley, 1991; Walker et al., 2011). Los síntomas clínicos más comunes de la infección, por lo general cursan con dolor abdominal, a menudo con fiebre, diarrea acuosa de leve a profusa, hematoquesia (puede aparecer sangre fresca en las heces al tercer día), dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos y malestar general. Este proceso suele ser autolimitante en el hombre (Humphrey et al., 2007). Las complicaciones graves son poco frecuentes pero pueden producirse infecciones extra intestinales con

Introducción general

bacteriemia, hemorragias intestinales, hepatitis, pancreatitis, megacolon tóxico y síndrome hemolítico urémico y en algunos casos adenitis mesentérica (Humphrey et al., 2007; Skirrow and Butzler, 2000). Así mismo, aunque con una frecuencia reducida, entre las secuelas de la infección figura la artritis reactiva y los síndromes de Guillain-Barré (SGB) y de Miller Fisher (Moore, 2005; Nachamkin et al., 1998). El SGB, es un trastorno autoinmune grave del sistema nervioso periférico que se ha descrito en el 0,1 % de las infecciones humanas producidas por *C. jejuni* (Nachamkin et al., 1998). El SGB, está asociado a un mimetismo molecular de los lipo-oligosacáridos (LOS) de *C. jejuni*, que inducen reactividad cruzada de anticuerpos en gangliósidos y tejido nervioso (Godschalk et al., 2004). Esta complicación está caracterizada por una forma de parálisis flácida semejante a la poliomielitis, que puede ocasionar disfunción respiratoria y neurológica grave, e incluso la muerte (Nachamkin et al., 1998). Las tasas de mortalidad de SGB se han reducido de 2 a 3% en los países desarrollados, pero sigue siendo mayor en países en vías de desarrollo (de Jager and Sluiter, 1991; Winer and Evans, 1993). El síndrome de Miller Fisher es una variante no paralítica del SGB.

4. Aspectos epidemiológicos del *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter* se consideran microorganismos ubicuos en el medio ambiente y tienen una distribución mundial. Las especies termófilas son las que se encuentran ampliamente distribuidas en la mayoría de los animales de sangre caliente y con una elevada prevalencia en los animales destinados al consumo como las aves de corral, bovino, porcino, ovino, avestruces y mariscos; los animales de compañía como perros y gatos también son considerados fuentes de infección (Humphrey et al., 2007; WHO, 2011).

Se considera que las especies termófilas de *Campylobacter* forman parte de la microbiota intestinal natural de mamíferos y aves (silvestres y domésticos), dado que aparentemente actúan como portadores asintomáticos. Así mismo, se

encuentran en fuentes ambientales, especialmente en el aguas superficiales (Gharst et al., 2013).

La campilobacteriosis ha sido la zoonosis más comúnmente notificada en los seres humanos en la UE desde el 2005 con una tendencia al alza, a lo largo de los años, aunque en los últimos cinco años, la tasa de notificación se ha mantenido bastante estable (EFSA, 2016). No obstante, un estudio basado en la serología en la población de la UE/EEA, demostró que el número de casos humanos notificados solo representa una pequeña proporción de todas las infecciones clínicas por *Campylobacter* spp. (Gibbons et al., 2014). A pesar de ello, el aumento de los casos notificados en algunos países en los últimos años puede no solo reflejar cambios en la exposición, si no también mejoras en los sistemas de vigilancia en los Estados Miembros (EM) (Emborg et al., 2015).

En la actualidad no existe una vigilancia armonizada de *Campylobacter* en la UE, al interpretar los datos sobre este patógeno en alimentos y animales debido a que existe una variación en los países que informan sobre los datos del monitoreo de *Campylobacter* cada año y por otro lado, debido a las diferencias en las estrategias de muestreo y los métodos de diagnóstico en cada país (EFSA, 2016).

4.1. Transmisión de *Campylobacter*

4.1.1 Fuentes y transmisión en humanos

La campilobacteriosis es una infección de origen alimentario. La principal fuente de transmisión de *Campylobacter* en las personas se atribuye a la manipulación y consumo de alimentos contaminados, principalmente carne cruda de pollo (Deckert et al., 2014; Friedman et al., 2004; Kang et al., 2006), y en menor medida, de otros productos alimenticios de origen animal (EFSA, 2016). Esto se debe a que a edad de sacrificio la mayoría de los lotes de pollos son positivos a *Campylobacter* y con una carga bacteriana elevada. Los niveles de *Campylobacter* en el intestino

Introducción general

de los pollos pueden alcanzar las 10^9 UFC/gr de contenido cecal. Si durante el procesado en el matadero se produce una rotura del paquete intestinal, toda la canal se contamina muy fácilmente, y con niveles elevados de la bacteria (Shanker et al., 1990).

Así pues, casi todas las partes de la canal de las aves de corral, ya sean frescas, refrigeradas o congeladas están frecuentemente contaminadas con *Campylobacter* (Butzler, 2004). No obstante, mediante la congelación se eliminan las bacterias viables y por tanto el riesgo de infección. Se ha estimado que la manipulación, preparación y consumo de carne de pollo es responsable del 20 al 30% de los casos de campilobacteriosis en la UE, mientras que el 50–80% del total de los casos se atribuyen al reservorio en conjunto (EFSA, 2010). Por otro lado, la contaminación cruzada de los alimentos supone un factor de riesgo importante para contraer la infección (EFSA, 2013).

Otras fuentes de infección para el humano, incluyen consumir agua no potable (Eberhart-Phillips et al., 1997; Schorr et al., 1994), el contacto frecuente con perros y/o gatos, derivados lácteos y leche no pasteurizada, marisco de aguas contaminadas con *Campylobacter*, contacto con aguas contaminadas durante actividades recreativas y viajes al extranjero (Figura 3) (Altekruse et al., 1999; Young et al., 2007).

La EFSA, describió algunos factores de riesgo que influyen en las infecciones por *Campylobacter*: la edad (mayores tasas de ocurrencia en niños menores de 5 años), la temporada (un mayor número de casos de campilobacteriosis se informa durante los meses de verano), la inmunidad del huésped, los viajes y los factores demográficos (situación socio-económica) (EFSA, 2007).

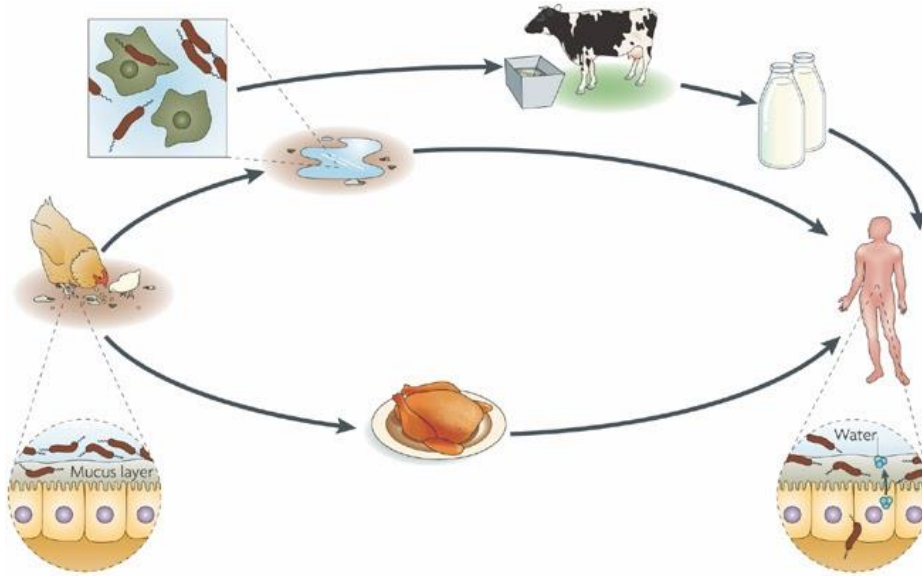


Figura 3. Fuentes y consecuencias de la infección por *C. jejuni*. Diferentes fuentes ambientales conducen a la infección por *C. jejuni*. Adaptado de Young, Davis, and Dirita (2007).

4.1.2 Transmisión horizontal en aves

Las especies termófilas de *Campylobacter* son consideradas microorganismos ubicuos en el medio ambiente, siendo la transmisión horizontal desde el medio ambiente la principal vía de colonización en pollos de engorde. Es por ello que los animales domésticos presentes en el entorno de las granjas, los animales silvestres y el ambiente externo de la granja juegan un papel relevante en la transmisión de la *Campylobacter* (Humphrey et al., 2007). En producción intensiva (naves cerradas), una vez introducido el patógeno dentro de las naves, se disemina rápidamente por todo el lote y la mayoría de las aves son colonizadas (Evans and Sayers, 2000; Gregory et al., 1997; Horrocks et al., 2009). Estudios recientes demuestran que dicha diseminación se puede producir en tan sólo 2-3 días (Urdaneta, 2016).

Introducción general

Por lo general, durante las 2–3 primeras semanas de vida los pollos de engorde se mantienen libres de *Campylobacter* (Evans and Sayers, 2000). A partir de esta edad, la resistencia a la colonización va disminuyendo, pero se desconocen los motivos de este periodo refractario. Está demostrado que los anticuerpos maternos protegen parcialmente de la infección en este periodo, pero estos anticuerpos maternos van disminuyendo progresivamente en el tiempo y desaparecen en la tercera semana de edad (S. Cawthraw and Newell 2010).

Entre los factores de riesgo de introducción, colonización y diseminación de *Campylobacter* dentro de las naves de pollos, incluyen la transferencia de la bacteria desde los lotes anteriores (Kapperud et al., 1993; Pearson et al., 1993), edad del lote, el vaciado parcial (aclorado), la presencia de múltiples naves de pollos en la misma granja, granjas vecinas alrededor (de aves u otros animales de producción), presencia de animales de compañía en el recinto de la granja, y charcos alrededor de la nave o granja (Bull et al., 2008; Johnsen et al., 2006), un gran tamaño del lote, el origen del agua y fuentes de agua en el medio ambiente de la granja, basuras, aves silvestres, roedores, transporte de equipos, personal de la granja (Horrocks et al., 2009), la yacija, el pienso (van de Giessen et al., 1996).

Además, la entrada de insectos, como moscas (Rosef and Kapperud, 1983; Shane et al., 1985; Urdaneta, 2016), el calzado contaminado con heces o yacija contaminada (Ridley et al., 2011), son considerados como factores de riesgo para la colonización por *Campylobacter* en pollos de engorde. Por otro lado, el transporte de las aves de la granja al matadero también supone un riesgo de contaminación de las mismas a través de las jaulas y módulos de transporte y otros equipamientos (Hansson et al., 2005).

4.1.3 Transmisión vertical en aves

La principal vía de transmisión de *Campylobacter* en las aves de corral es horizontal, mientras que hace más de una década que se debate sobre si existe transmisión vertical (Agunos et al., 2014; Cox et al., 2012). Se ha detectado *Campylobacter* en ambos oviductos de gallinas ponedoras (Buhr et al., 2002; Cox et al., 2012; Hiett et al., 2002; Jacobs-Reitsma, 1997) y en semen de pollos de engorde comerciales (Hiett et al., 2003). Newell and Fearnley (2003), demostraron otra posible vía de transmisión vertical de *Campylobacter*, desde la gallina a través de la cáscara del huevo. Otros estudios han demostrado la presencia de ADN de *Campylobacter* en las pelusas de la incubadora y tracto intestinal de embriones en desarrollo y pollitos recién nacidos, que apoyan la evidencia molecular de que el patógeno puede estar presente en pollitos antes de ser entregados a la granja (Chuma et al., 1997, 1994; Hiett et al., 2003; Idris et al., 2006). En cambio otros autores no han apoyado la hipótesis de que la transmisión vertical contribuya significativamente a la diseminación de la bacteria en las granjas avícolas (Bull et al., 2006; Callicott et al., 2006; On et al., 2003). En un estudio reciente realizado en España, detectaron ADN de *Campylobacter* en pollitos de un día de edad mediante la técnica de qPCR, demostrando de esta manera la posibilidad de una transmisión vertical, sin embargo por método de cultivo bacteriano convencional (ISO 10272-2) todos los pollitos muestreados resultaron negativos. Por otro lado, recientemente Battersby (2016) durante un estudio de evaluación de patrones de contaminación por *Campylobacter* spp., en granjas de pollos, no detectó transmisión vertical utilizando la técnica de qPCR. Además, otros estudios han demostrado la ausencia de *Campylobacter* en huevos fértiles de lotes de gallinas positivas, a pesar de haberse recuperado *C. jejuni* del intestino y de las heces. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de *Campylobacter* en la cáscara interna y las membranas del huevo, revelando de esta manera una posible vía de exposición para los pollos incubados (Doyle, 1984).

4.2 Estacionalidad de la campilobacteriosis

Campylobacter spp., presenta una estacionalidad característica, con un elevado aumento de la prevalencia de pollos colonizados por *C. jejuni* y/o *C. coli* en los meses de verano y principios de otoño. En muchos países europeos se ha observado esta misma estacionalidad en las infecciones por *Campylobacter*, con un pico de casos confirmados en los meses de verano (junio - agosto) (Jore et al., 2010; Nylen et al., 2002). Curiosamente, en un estudio de caso control realizado en Suiza detectaron picos de campilobacteriosis en invierno, estos casos se atribuyeron al consumo de una comida tradicional (fondue de carne, especialmente si se sirve con carne de pollo) (Bless et al., 2014).

Por otro lado, se cree que los cambios en el comportamiento recreativo humano, como hacer barbacoa y la participación en actividades al aire libre que resulten en la exposición ambiental contribuyen a una mayor incidencia durante el verano (Eberhart-Phillips et al., 1997; Nylen et al., 2002). Los picos estacionales de la campilobacteriosis en humanos, se observan comúnmente en los países occidentales con climas templados, mientras que esto es menos marcado en Australia, Nueva Zelanda y en los países tropicales.

Por otro lado, estudios de supervivencia de *C. jejuni* en carcasas de pollos expuesta para la venta en supermercados, donde se analizaba el efecto de la temperatura ambiental sobre el crecimiento de *C. jejuni* en diferentes épocas del año demostraron que *Campylobacter* spp. presentaba un pico de positividad principalmente durante los meses más cálidos (mayo a octubre) y la prevalencia más baja fue durante los meses más fríos (diciembre-enero) (Willis y Murray 1997).

4.3 Campilobacteriosis: el papel de la carne de aves de corral

La carne de pollo comprende una fuente sustancial de proteínas, vitaminas y minerales de alta calidad. El pollo magro contiene más proteínas que la carne asada magra y comparativamente el precio de la carne de pollo es más bajo que el de la carne de res o de cerdo. Además, los sub-productos de pollo requieren de un corto tiempo para su preparación. Por todo ello, tanto la carne de pollo como los subproductos del pollo se consumen ampliamente.

Sin embargo dichos productos cárnicos han estado implicados durante los últimos años en un gran número de brotes de campilobacteriosis aguda a nivel mundial, tanto en los países industrializados como en países en vías de desarrollo, especialmente en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos (Corry and Atabay, 2001; Skirrow and Blaser, 1992; Tauxe, 1992). La mayoría de los casos de campilobacteriosis humana se asocian con el consumo de carne insuficientemente cocida de aves de corral o por contaminación cruzada de alimentos crudos de origen animal con alimentos cocinados (Corry and Atabay, 2001; Jean-Paul and Johannes, 1991; Nadeau et al., 2002).

En un estudio realizado en Inglaterra y Gales, *C. jejuni* fue responsable de hasta más de 12 veces el número de casos de campilobacteriosis en comparación con *C. coli* (Friedman et al. 2000). Sin embargo, se sabe que *C. coli* es también responsable de campilobacteriosis en humanos, aunque los factores de riesgo asociados sean diferentes, revelando de esta manera la problemática social que tienen ambas especies de *Campylobacter* sobre la salud de la población.

Así pues, dada la asociación que existe entre la presencia de *Campylobacter* en las aves de corral y la campilobacteriosis, y el consiguiente problema que supone a nivel de salud pública, se hace necesario actuar a nivel de toda la cadena alimentaria, de la granja a la mesa, para conseguir reducir el riesgo de infección en las personas. Para ello, el primer paso es el control de *Campylobacter* en granjas de

Introducción general

pollos de engorde, debido a la alta prevalencia en los lotes a edad de sacrificio. Actualmente la única herramienta disponible es la implementación de unas estrictas medidas de bioseguridad, tanto a nivel de granja como a nivel de nave, a fin de evitar la transmisión de la bacteria del medio ambiente exterior de las granjas a las aves de la explotación que se encuentran confinadas en naves cerradas. Dichas medidas han demostrado ser efectivas tanto en países de clima más frío (Hald et al., 2008) como en países de clima cálido, como España (Cerdà-Cuéllar et al., 2015).

Algunos países que adoptaron estrategias específicas a nivel de producción primaria para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las aves de corral, han observado una reducción similar en los casos en humanos (Hald et al., 2008). Por otro lado, las estrategias que han tenido éxito en el control de la infección ocasionada por *Salmonella* en gallinas ponedoras y reproductoras, en el que las aves se mantienen durante meses a diferencia de la producción de pollos de engorde, que el periodo de vida es muy corto (máximo de seis semanas), estas estrategias son generalmente ineficaces contra *Campylobacter* (Newell and Wagenaar, 2000).

5. Patogénesis de la campilobacteriosis

La severidad de *Campylobacter* spp., depende principalmente de la virulencia de la cepa, así como del estado inmunitario del hospedador. Los mecanismos específicos de virulencia no están claramente definidos aún para esta bacteria, probablemente debido a la falta de similitud entre *Campylobacter* y otros patógenos entéricos (Dasti et al., 2010; Guerry, 2007). A pesar del conocimiento limitado sobre el *modus operandi* de *Campylobacter*, es bien sabido que los flagelos son necesarios para la colonización del intestino delgado, para luego moverse al colon (Poly and Guerry, 2008; van Vliet and Ketley, 2001). La invasión, que ocasiona inflamación celular, es probablemente el resultado de la producción de citotoxinas, seguida por la reducción de la capacidad de absorción del intestino. Se piensa que

Campylobacter posee una resistencia a los ácidos gástricos y a las sales biliares, y esto le confiere la capacidad para alcanzar el tracto intestinal (Van Deun et al., 2007).

En las aves el sitio de colonización primaria es el ciego, pudiendo alcanzar 10^6 a 10^9 UFC/gr de heces (Allen et al., 2007; Meade et al., 2009). Sin embargo, en los humanos, la colonización ocurre predominantemente en el intestino delgado. Varios estudios experimentales han reportado una mayor capacidad de colonización y virulencia de *Campylobacter* aislados en heces de humanos, una vez pasado a través de las aves de corral (Cawthraw et al., 1996). Se cree que los mecanismos de invasión en las líneas celulares de aves y humanos son similares pero no idénticos, como es el caso de *C. jejuni* que puede sobrevivir intracelularmente en las células epiteliales T84 en el humano, sin embargo no puede sobrevivir en enterocitos primarios de pollos (Van Deun et al., 2007). Para que se produzca la colonización a nivel intestinal se requiere que la bacteria tenga la capacidad de producir motilidad, adhesión, invasión y producción de toxinas (Bang et al., 2003).

5.1 Factores de virulencia

5.1.1 Motilidad

Campylobacter spp., se caracterizan por poseer una motilidad rápida y dinámica mediada por flagelos polares. La motilidad aumenta bajo condiciones altamente viscosas para poder producirse la colonización del intestino delgado (Guerry, 2007; Jagannathan, A. Penn, 2005). El rol de los flagelos bajo diferentes condiciones quimiotácticas es esencial para la supervivencia de la bacteria en los diversos nichos ecológicos con que se encuentra dentro del tracto gastrointestinal (Jagannathan, A. Penn, 2005).

Introducción general

C. jejuni y *C. coli* poseen flagelos que están compuestos de dos flagelinas que comparten un alto grado de homología, *flaA* considerada la más importante y *flaB* (Guerry, 2007). Tanto *flaA* como *flaB*, están codificadas por dos genes de flagelina dispuestos en tándem. El gen *flaA* está regulado por el promotor de la flagelina clásica σ^{28} , mientras que el gen *flaB* se encuentra regulado por el promotor dependiente σ^{54} (Jagannathan, A. Penn, 2005). En la Tabla 2 se muestran otros factores de virulencia asociados con la motilidad.

El gen *flaA* parece ser esencial para que se produzca la invasión de las células epiteliales. Algunos autores han reportado que una mutación del *flaA* en la región VC167 dio como resultado la síntesis de un filamento flagelar truncado y compuesto exclusivamente de *flaB*, provocando de esta manera una reducción severa en su motilidad, reduciendo notablemente la capacidad del organismo para colonizar el tracto gastrointestinal (Guerry, 2007; Wassenaar, 2000). Sin embargo, una mutación en el *flaB* en la misma región, dio como resultado un filamento flagelar que era indistinguible en longitud de la cepa de campo (*wild type*), aunque la motilidad se redujo ligeramente (Guerry, 2007).

Así, la expresión de ambas flagelinas parece ser necesaria para la máxima motilidad de *Campylobacter*. Además, el gen *flaA* es el responsable de la expresión de adherencia, colonización del tracto gastrointestinal e invasión de las células del hospedador (Jain et al., 2008). Por otro lado, se cree que los flagelos poseen la capacidad de segregar proteínas no flagelares que podrían estar asociadas a la virulencia (Poly and Guerry, 2008).

De esta manera se puede pensar que la actividad de los flagelos en la patogénesis de *Campylobacter* es multifuncional y compleja, considerando que están involucrados no solo en la motilidad y la quimiotaxis, sino también en la secreción de proteínas de virulencia, la autoaglutinación, la formación de micro-colonias y la inhibición de la respuesta innata.

Tabla 2. Factores de virulencia en *Campylobacter* asociados a la motilidad.

	Factores de Virulencia	Gen codificante	Referencias
Motilidad	<i>FlaA</i> , proteína mayor de la flagelina	<i>flaA</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	<i>FlaB</i> , proteína menor de la flagelina	<i>flaB</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	El promotor σ_{28} que regula la expresión del gen	<i>fliA</i>	Hendrixson, 2006
	El promotor que σ_{54} regula la expresión del gen	<i>rpoN</i>	Hendrixson, 2006
	<i>FliF</i> , proteína del codo del cuerpo basal	<i>fliF</i>	Carrillo et al., 2004
	<i>FliM</i> & <i>FliY</i> , proteínas motoras flagelares	<i>fliM</i> & <i>fliY</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	<i>FlgI</i> , P-anillo del peptidoglicano	<i>flgI</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	<i>FlgH</i> , anillo L de la membrana externa	<i>flgH</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	<i>FlgE</i> & <i>FliK</i> , componentes menores del codo	<i>flgE</i> & <i>fliK</i>	Nachamkim et al., 1993; Wassenaar et al., 1993; Sommerlad and Hendrixson, 2007;
	Proteínas implicadas en la O-glicosilación de la flagelina	<i>cj1321-cj1325/6</i>	Champion et al., 2005

5.1.2 Quimiotaxis

La quimiotaxis es un mecanismo por el cual las bacterias móviles detectan y se mueven hacia condiciones más favorables para invadir a su hospedador. Es sabido que *C. jejuni* es un comensal del intestino de las aves, colonizando específicamente las criptas del ciego, utilizando el mecanismo de la quimiotaxis para localizar estos sitios primarios de colonización (Chang and Miller, 2006). Durante este proceso, los quimioatrayentes primarios son las mucinas y las glicoproteínas, considerados componentes primarios del mucus (Hermans et al., 2012). La quimiotaxis ha sido ampliamente estudiada en *E. coli* y todas las pruebas realizadas hasta la fecha sugieren un mecanismo de funcionamiento similar en *Campylobacter* (Hendrixson and DiRita, 2004; Yao et al., 1997). En la Tabla 3 se detallan los diferentes genes relacionados con la quimiotaxis identificados en *Campylobacter*.

Tabla 3. Factores de virulencia en *Campylobacter* asociados a la quimiotaxis.

	Factores de Virulencia	Gen codificante	Referencias
Quimiotaxis	Proteínas de quimiotaxis; <i>CheA, B, R, V, W, & Z</i>	<i>cheA, cheB, cheR, cheV, cheW & cheZ</i>	Hamer et al., 2010
	Las proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo (MCP) también denominadas proteínas <i>CheY</i> , regulador de respuesta que controla la rotación flagelar	<i>tlp1, tlp4, tlp10</i>	Marchant et al., 2002
	Sistema de proteínas <i>CetA</i> (Tlp9) y <i>CetB</i> (Aer2) involucradas en el tactismo energético	<i>cheY</i>	Hermans et al., 2011
	Enzima de biosíntesis de AI-2	<i>cetA & cetB</i>	Golden and Acheson, 2002
	<i>AfcB</i> , la proteína MCP necesaria para la persistencia en el ciego	<i>luxS</i>	Quinones et al., 2009; Hermans et al., 2011
		<i>acfB</i>	Golden and Acheson, 2002

5.1.3 Adhesión

La adhesión de las bacterias del género *Campylobacter* a las células epiteliales del intestino del huésped es un requisito previo para la colonización que está mediada por varias adhesinas sobre la superficie bacteriana (Jin et al., 2001). Los genes asociados a la adhesión en *Campylobacter* se detallan en la Tabla 4. Se destacan la PEB1 (un homólogo del sistema de transporte ABC en bacterias Gram-negativas) (Pei and Blaser, 1993), *CadF* (proteína de membrana externa) (Konkel et al., 1997), y lipooligosacáridos (LPS) (Wassenaar et al., 2000). Sin embargo, parece que la adherencia de *C. jejuni* a las células del huésped es un proceso de varios pasos que implica tanto interacciones adhesina-receptor específicas como no específicas (Crushell et al., 2004).

Tabla 4. Factores de virulencia en *Campylobacter* asociados a la adhesión.

	Factores de Virulencia	Gen codificante	Referencias
	<i>CadF</i> , proteína de membrana externa	<i>cadF</i>	Konkel et al., 1997
	<i>CapA</i> , proteína A de adhesión de <i>Campylobacter</i>	<i>capA</i>	Jin et al., 2001
	Fosfolipasa A	<i>pldA</i>	Ziprin et al., 2001; Dekker, 2000
	Lipoproteína	<i>jlpA</i>	Jin et al., 2001
	<i>Peb1</i> , proteína de unión periplasmática	<i>peb1A</i>	Pei and Blaser, 1993
	<i>Peb3</i> , proteína de transporte	<i>peb3</i>	Min et al., 2009
Adhesión	<i>Peb4</i> , chaperona que desempeña un papel importante en la exportación de proteínas a la membrana externa	<i>peb4</i>	kale et al., 2011
	<i>FlpA</i> , proteína A de la fibronectina	<i>flpA</i>	Flanagan et al., 2009
	Sistema de secreción de tipo IV posiblemente implicada en la adhesión	<i>virB11</i>	Bacon et al., 2000; Dasti et al., 2010
	<i>JlpA</i> , lipoproteína de 42-kDa implicada en la adhesión a células hep-2	<i>jlpA</i>	Jin et al., 2001

5.1.4 Invasión

Además de la motilidad que confieren los flagelos a la bacteria, se cree que éstos tienen una segunda función, actuando como un aparato transportador (T3SS) en la secreción de proteínas no flagelares durante la invasión del huésped (Poly and Guerry, 2008). Algunos autores han sugerido que *Campylobacter* no puede penetrar eficientemente en la célula huésped a través de la membrana apical (Monteville and Konkel, 2002). Una evidencia reciente apoya esta afirmación de que *C. jejuni* preferentemente penetra en las células epiteliales a través de la membrana baso lateral (Monteville and Konkel, 2002). En la Tabla 5 se detallan los diferentes genes implicados en la invasión identificados en *Campylobacter*. Muchos patógenos invasivos alteran las estructuras citoesqueléticas del huésped para

Introducción general

producir la invasión de las células epiteliales intestinales. En el caso de *C. jejuni* se ha descrito que la invasión de las células en ocasiones depende de los microtúbulos y microfilamentos (Crushell et al., 2004).

Tabla 5. Factores de virulencia en *Campylobacter* asociados a la invasión.

	Factores de Virulencia	Gen codificante	Referencias
	<i>FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ & FliR</i> , componentes del T3SS flagelar	<i>flhA, flhB, fliQ, fliP, fliO & fliR</i>	Carrillo et al., 2004
	<i>FlaC</i> proteína secretada en las células huésped y esenciales para la colonización y la invasión	<i>flaC</i>	Carrillo et al., 2004; Konkel et al., 2004
	<i>CiaB</i> , proteína de 73 kDa implicada en la adhesión	<i>ciaB</i>	Konkel et al., 2004
	<i>CiaC</i> , proteína necesaria para la invasión completa de las células INT-407	<i>ciaC</i>	Christensen et al., 2009; Euker and Kpnkel, 2012
Invasión	<i>Cial</i> , descrita en la supervivencia intracelular	<i>cial</i>	Buelow et al., 2011
	<i>IamA</i> , proteína asociada a la invasión	<i>iamA</i>	Carvalho et al., 2001; Rivera-Amill et al., 2001
	<i>HtrA</i> , chaperona implicada en el correcto plegado de adhesinas	<i>htrA</i>	Baek et al., 2011
	<i>VirK</i> , puede tener un papel en la protección contra las proteínas antimicrobianas	<i>virK</i>	Novik et al., 2009
	<i>FspA</i> , proteína con un papel en la apoptosis	<i>fspA</i>	Poly et al., 2007

5.1.5 Producción de toxinas

Campylobacter produce una gran variedad de citotoxinas (McFarland and Neill, 1992; Schulze et al., 1998), de las cuales solo se ha estudiado con profundidad la citotoxina de distensión (CDT, *cytolethal distending toxin*) (Pickett and Whitehouse, 1999). Muchas bacterias Gram-negativas tienen la capacidad de producir CDT (Ge et al., 2008), una toxina tripartita compuesta de tres

subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, que en conjunto son necesarios para que la toxina sea funcionalmente activa (Asakura et al., 2008).

CdtA y *cdtC* son subunidades heterodiméricas, responsables de la unión de la toxina a la membrana celular y del transporte del producto del gen *cdtB*, que es la subunidad enzimáticamente activa. Esta proteína ingresa al núcleo de la célula del huésped y actúa como una enzima desoxirribonucleasa, bloqueando la proteína CDC2 (*cell division control protein 2*), una proteína clave en la regulación del ciclo celular. Ello provoca en las células eucariotas la detención en fase G2 (periodo de rápido crecimiento celular antes de la mitosis) del ciclo celular, evitando que éstas entren en mitosis, lo cual conduce a la muerte celular (Bang et al., 2001; Pickett and Whitehouse, 1999).

Los lipooligosacaridos (LOS), además de jugar un papel en la adhesión presentan una actividad endotóxica, como otras bacterias. Por otro lado, son responsables de desencadenar la respuesta inmune en la que se basa las neuropatías de los síndromes de Guillain-Barré (SGB) y de Miller Fisher, después de la infección por *C. jejuni*. La estructura del antígeno "O" del LOS contiene ácido siálico, semejante a la que se observa en los gangliósidos humanos. La mayoría de los pacientes que desarrollan el SGB después de una enteritis por *C. jejuni* lo desarrollan debido a la producción de anticuerpos IgG que reaccionan con los gangliósidos GM1, GD1a y GQ1b (Janssen et al., 2008; Willison, 2005). En la Tabla 6 se describen los genes que se encuentran asociados a la producción de toxina, además del gen *wlaN* que está implicado en el desarrollo del SGB.

Tabla 6. Factores de virulencia en *Campylobacter* asociados a la producción de toxinas.

	Factores de Virulencia	Gen codificante	Referencias
Producción de toxinas	Subunidades de citotoxina (CDT)	<i>cdtA, cdtB & cdtC</i>	Asakura et al., 2008
	1,3 galactosiltransferasas implicadas en la producción de lipopolisacáridos	<i>cgtB & wlaN</i>	Gilbert et al., 2000; Linton et al., 2000

5.1.6 Resistencia a sales biliares y a antimicrobianos

La resistencia a los agentes antimicrobianos, a las sales biliares y a los metales pesados en *Campylobacter*, está mediada por la bomba de eflujo de múltiples fármacos (CME), codificada por el operón *cmeABC* y cuya expresión está modulada por un represor transcripcional (CmeR). El CME está compuesto de una proteína periplasmática (CmeA), un transportador de eflujo de membrana interna (CmeB) y una proteína de membrana externa (CmeC) (Lin et al., 2002). Se ha descrito que una mutación en el CmeR podría alterar la capacidad de *C. jejuni* para colonizar los pollos de engorde (Guo et al., 2008).

5.1.7 Respuesta al estrés y supervivencia

Es sabido que *Campylobacter* spp., carece de muchas respuestas adaptativas a diferencia de otras bacterias (Parkhill et al., 2000). Además, presenta una diversidad genética inusual y una alta frecuencia de recombinación intragenómica. Ello podría alterar el fenotipo y el genotipo, aumentando su capacidad de supervivencia y virulencia en un rango de condiciones adversas (Ridley et al., 2008). Por lo general las campilobacterias son muy sensibles a la desecación y estrés oxidativo, exposición al oxígeno, temperaturas elevadas, pH ácido y también pueden experimentar estrés por falta de nutrientes, observándose una disminución de la actividad metabólica, aumentando la producción de enzimas degradativas (Chaveerach et al., 2003; Humphrey et al., 1995).

6. Tratamiento

Generalmente la enteritis causada por *Campylobacter* tiene un pronóstico muy bueno, la mayoría de los pacientes infectados por esta bacteria se recuperan sin ningún tratamiento específico, pero en pacientes deshidratados (recién nacidos y niños) a causa de *C. jejuni* es necesario la reposición de líquidos. El uso de antibióticos es controvertido y solo tiene un beneficio marginal durante el curso de la infección y no debe ser utilizado de forma rutinaria (Ternhag et al., 2007). Sin embargo, el tratamiento antimicrobiano está recomendado para suprimir la condición de portador y en casos invasivos (cuando las bacterias invaden las células de la mucosa intestinal y dañan los tejidos; en pacientes que cursan con fiebre persistente, diarrea sanguinolenta y pacientes inmunodeprimidos) (Crushell et al., 2004; WHO, 2011). Por lo tanto, el uso de antibióticos dependerá de la gravedad de los síntomas.

En los casos más graves, el tratamiento de elección generalmente son macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y cefalosporinas. Sin embargo, la resistencia creciente a fluoroquinolonas, tetraciclina y a la eritromicina de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, podría comprometer la eficacia de estos antimicrobianos (Aarestrup and Engberg, 2001; Alfredson and Korolik, 2007; Gibreel and Taylor, 2006). Por otro lado, la gentamicina podría ser una buena alternativa para tratar las infecciones sistémicas causadas por *Campylobacter* spp. (Aarestrup and Engberg, 2001). Otros autores recomiendan el uso del cloramfenicol y kanamicina, debido a que las campilobacterias han mostrado bajos porcentajes de resistencia frente a estos fármacos.

La resistencia a los antibióticos en *Campylobacter* está emergiendo a nivel mundial y es reconocida por la OMS como un problema de importancia para la salud pública a nivel mundial (Greig, 2003; Moore et al., 2006; WHO, 1996).

7. Tipificación de *Campylobacter*

En la actualidad existe una amplia variedad de sistemas de tipificación bacteriana que difieren entre sí en la capacidad de discriminar entre las cepas bacterianas, en su fiabilidad, en el esfuerzo requerido y en el coste. La técnica elegida para determinado estudio dependerá del diseño y de los objetivos de la investigación, considerando que ninguna técnica es óptima para todas las formas de investigación. Los métodos de tipificación se dividen en dos grandes categorías, métodos fenotípicos y genotípicos.

7.1 Métodos fenotípicos

Existen diferentes métodos de tipificación para las campilobacterias, basados fundamentalmente en el fenotipo tales como serotipo, biotipo, fagotipo o perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Estos métodos permiten discriminar entre bacterias de una misma especie, ya que implican la expresión de genes. Las propiedades fenotípicas tienen una tendencia a variar, en función de los cambios en las condiciones de crecimiento, fase crecimiento y mutación espontánea (Pfaller, 1999).

7.2 Métodos genotípicos

En los últimos años los métodos de tipificación molecular han contribuido a mejorar los estudios epidemiológicos que buscan identificar y rastrear las fuentes de infecciones ocasionadas por *Campylobacter* spp., proporcionando los subtipos genéticos que se encuentran en circulación. Los métodos genotípicos proporcionan una diferenciación más sensible y niveles más altos de estandarización, reproducibilidad, capacidad de tipificación y poder discriminatorio en comparación con los métodos de tipificación fenotípica (Wassenaar, 2000). Las técnicas más utilizadas para la tipificación molecular de

Campylobacter son flaA-RFLP, PFGE y MLST. Mientras que la secuenciación masiva está tomando cada vez más fuerza (Eberle and Kiess, 2012).

La tipificación y caracterización de los agentes microbianos es importante desde el punto de vista del diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, en la vigilancia epidemiológica de las infecciones y en estudios de la dinámica de las poblaciones bacterianas. Por otro lado, los nuevos métodos y herramientas moleculares cumplen un papel muy importante para determinar la diversidad bacteriana y obtener una gran cantidad de información en menor tiempo, obteniendo de este modo una visión amplia de los diferentes procesos y cambios de las poblaciones microbianas. En la Tabla 8 se resume una breve comparación de las técnicas comunes de tipificación más utilizadas en la actualidad.

7.2.1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), es un método basado en patrón de bandas de ADN, que clasifican a las bacterias de acuerdo con el tamaño de los fragmentos generados por la digestión enzimática del ADN genómico, embebido en una matriz de gel de agarosa aplicando un campo eléctrico que periódicamente va cambiando de dirección (Schwartz and Charles R, 1984). Fue desarrollado en el año 1984 y desde entonces se ha convertido en el método de referencia o *gold standard* de los métodos de caracterización molecular, y ha sido ampliamente utilizado para tipificar patógenos transmitidos por los alimentos. Fue la base para la implementación de PulseNet en los Estados Unidos para ayudar en la detección rápida de brotes (Ribot et al., 2001).

PFGE fue uno de los primeros métodos basados en ADN ideado para la tipificación para *Campylobacter* spp. (Foley et al., 2009; Ribot et al., 2001). Aunque la sensibilidad del PFGE depende de la elección de enzima de restricción, generalmente es considerado como uno de los métodos de tipificación genotípica de alto poder discriminatorio (On et al., 1998). El procedimiento consiste en la

Introducción general

incorporación de una suspensión bacteriana mezclada con una proteasa y un detergente (SDS) en agarosa fundida y haciendo bloques (*plugs*) de agarosa en moldes reutilizables. La mezcla de proteasa-SDS desnaturaliza las proteínas de la membrana celular formando los poros en la célula que permiten la liberación del ADN cromosómico.

Posteriormente, se realizan varios lavados del *plug* para eliminar restos celulares y proteasas. Una parte del *plug* se utiliza para la digestión enzimática, se añade a una mezcla de endonucleasa de restricción que corta el ADN en dianas específicas, generando en el caso de *Campylobacter* spp., entre 10 a 30 fragmentos de ADN de 0,5 a 100 kb. Las enzimas utilizadas son *SmaI* y *KpnI*. Los fragmentos de ADN se separan electroforéticamente en función al tamaño, los más pequeños se mueven más rápido a través de la agarosa que los fragmentos más grandes (Ribot et al., 2001).

El patrón de PFGE obtenido de los aislados se compara con un patrón de referencia cuyo peso molecular es conocido. Este patrón es el DNA de *Salmonella* Braenderup. Los geles se tiñen con un colorante fluorescente como el bromuro de etidio, los patrones electroforéticos se visualizan bajo la iluminación UV y se fotografían para posteriormente ser analizados con un software comercial (Olive and Bean, 1999; Tenover et al., 1995).

El PFGE ha sido aplicado con éxito en la producción avícola para el seguimiento de *Campylobacter* spp. (Melero et al., 2012; Miller et al., 2010; Oyarzabal et al., 2013). Además, esta técnica permitió la detección de un clon altamente virulento de *C. jejuni* en humanos en los Estados Unidos (Sahin et al., 2012). No obstante, esta técnica es costosa y laboriosa, especialmente por el equipo necesario, lo cual puede suponer una limitación importante para la implementación de la técnica en muchos laboratorios (Matushek et al., 1996).

Tabla 8. Comparación de las técnicas de tipificación molecular más utilizadas en la actualidad. Adaptada por Foxman (2005).

Técnica de tipificación	Poder relativo de tipificación	Repetibilidad relativa	Reproducibilidad relativa	Parte dispersa o focal del genoma	Días requeridos post cultivo	Costo relativo
<i>Whole genomic sequencing</i> (WGS)	Elevado	Elevado	Elevado	Genoma entero	Meses o años	Muy elevado
<i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	Moderado o elevado (depende del gen de elección)	Elevado	Elevado	Dispersa	3+	Equipo: medio a elevado. Trabajo y suministro: Elevado
<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE)	Moderado a elevado (depende el numero de bandas observadas)	Medio =>elevado (en función de las especies)	Medio =>elevado	Dispersa	3	Equipo: elevado Trabajo y suministro: Elevado
<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (RFLP)	Moderado a elevado (depende el numero de bandas observadas)	Medio =>elevado	Medio	Dispersa	1- 3	Medio

7.2.2 *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

En los últimos años el MLST se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente utilizado para la tipificación molecular de cepas de *Campylobacter* spp. (Miller et al., 2012; Müllner et al., 2010). Dentro de las especies de *Campylobacter* spp., el primer esquema del MLST fue desarrollado para *C. jejuni* y *C. coli*. La técnica consiste en la secuenciación de fragmentos cortos de siete genes conservados (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* y *uncA*) (Dingle et al., 2001a). Una vez secuenciados los productos de PCR para cada locus, se le asigna un número de alelo basado en una coincidencia completa con un alelo en la base de datos PubMLST. A esta combinación de siete alelos diferentes (perfil alélico) se le asigna un tipo de secuencia (ST) único de acuerdo con la base de datos. Los ST que comparten como mínimo cuatro o más alelos pertenecen al mismo complejo clonal (CC) (Dingle et al., 2001a). Debido a la transferencia horizontal y la recombinación intramolecular, *Campylobacter* spp., tiene una población débilmente clonal (Dingle et al., 2005, 2001a).

El MLST posee un elevado poder discriminatorio, altamente reproducible y se ha convertido en la técnica *gold standard* de genotipado, permitiendo la comparación mundial de forma precisa y sencilla entre diferentes cepas (Dingle et al., 2001a). Sin embargo a pesar de las ventajas, la técnica sigue siendo costosa y laboriosa, por lo cual no es factible para una prueba de rutina. MLST por sí sola proporciona información excelente sobre la epidemiología global y la estructura poblacional de *Campylobacter*, pero parece ser menos discriminatoria en estudios epidemiológicos a corto plazo (Sails et al., 2003), aunque Dingle (2002 y 2008), recomiendan el uso de la técnica para estudios epidemiológicos de corto y largo plazo. En el momento de la escritura de esta tesis se han descrito 8859 STs de *C. jejuni* y *C. coli* en la base de datos de PubMLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

El MLST proporciona una valiosa información y comprensión sobre la ecología, la estructura de la población y la evolución de *Campylobacter* a través de la transferencia genética y vías evolutivas (Sheppard et al., 2011). Además, mide las variaciones que ocurren de forma relativamente lenta y sin presión selectiva, por lo que pueden ser apropiadas para estudios filogenéticos (Sails et al., 2003), pudiendo determinar también la transferencia horizontal de genes (McCarthy et al., 2007). El MLST se utiliza principalmente como herramienta para describir la dinámica de las poblaciones en varias regiones geográficas y en diferentes tiempos.

7.2.3 Whole genomic sequencing (WGS)

Hace poco más de 20 años, la publicación de la primera secuencia del genoma bacteriano de *Haemophilus influenzae* sacudió el mundo de la bacteriología. Durante este periodo, la poderosa combinación de la secuenciación del genoma y el análisis bioinformático de la secuencia de datos, ha hecho que podamos comprender claramente cómo funcionan las bacterias, cómo evolucionan e interactúan entre sí, con sus hospedadores y con su entorno. Los análisis basados en las secuencias han aportado información inesperada sobre la diversidad microbiana y la oportunidad de explorar las diferentes comunidades microbianas, además estos enfoques han permitido rastrear la propagación de la infección y han ayudado a diseñar nuevos fármacos y vacunas (Loman and Pallen, 2015).

El proceso de secuenciación ha experimentado una notable innovación en la investigación, por lo que los trabajos de investigación que solían llevar años y un alto coste, en la actualidad con esta herramienta se puede reducir el tiempo y el coste del proyecto (Loman and Pallen, 2015). El WGS mediante plataformas de *next-generation sequencing* (NGS) como la plataforma Illumina ha reducido notablemente el coste de secuenciación masiva siendo actualmente de 0,10 \$ por cada 1Mpb.

Introducción general

Los datos obtenidos a partir del WGS, pueden en principio definir los aislamientos bacterianos que difieren en un solo par de bases, proporcionando de esta manera el nivel más alto de poder discriminatorio para el genotipado. Los datos de WGS de alta calidad proporcionan informaciones más completa que otras técnicas de tipificación molecular para inferir las relaciones genéticas y filogenéticas (Laing et al., 2011). La reducción del coste y facilidad de obtención de secuencias de un elevado número de aislados ha dado lugar a aumento de los estudios epidemiológicos que aprovechan la potencia de esta tecnología. Es de prever que en un futuro cercano el WGS será la herramienta más común de tipificación molecular.

Además, *Campylobacter* spp., fue una de las primeras bacterias a ser analizada con esta tecnología NGS (Hofreuter et al., 2006; Pearson et al., 2007). Se han realizado y publicado varios estudios con el objeto de examinar la estructura de la población de *C. jejuni* y *C. coli*, utilizando NGS como herramienta de trabajo (Gripp et al., 2011; Lefébure et al., 2010; Sheppard et al., 2013). Sin embargo, los conocimientos, la experiencia y las herramientas necesarias para un rápido análisis bioinformático de los datos obtenidos a partir del WGS siguen siendo un desafío, lo cual es probable que impida el uso de datos de WGS para el genotipado rutinario de *Campylobacter* spp. (Pendleton et al., 2013).

8. Antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen como medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo. Los antimicrobianos se dividen en diferentes grupos, antibacterianos o antibióticos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales (Whalter Iván, 2008). Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes microorganismos o derivados sintéticos, que actúan inhibiendo el crecimiento de las bacterias (bacteriostático), y/o eventualmente destruirlas (bactericida). Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y

farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Martinez et al., 2015).

Normalmente los antibióticos presentan "*toxicidad selectiva*" (actividad selectiva frente a microorganismo, pero no frente a células humanas, animal o plantas), siendo la toxicidad muy superior para los organismos invasores que para los hospedadores, aunque ocasionalmente puede producirse un efecto secundario, no deseado o una reacción adversa medicamentosa (Manrique, 2012). Los antibióticos se utilizan para el tratamiento, control y prevención de las enfermedades infecciosas en humanos y animales, ocasionadas por bacterias. Además, ayudan a las defensas del sistema inmune del individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección (Martinez et al., 2015).

Desde la década de 1950, los antibióticos también se utilizaban en animales como promotor de crecimiento, especialmente en aves y cerdos de engorde, aunque este uso está totalmente prohibido en toda la Unión Europea desde el año 2006. Sin embargo, todavía se sigue utilizando con este fin en otros continentes (Manrique, 2012).

8.1 Resistencia antimicrobiana

El alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es sin duda, uno de los mayores problemas actuales de la salud pública ya que estos compuestos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en veterinaria. La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha ido de una forma paralela a la incorporación de los mismos al arsenal terapéutico. Sin embargo, la industria farmacéutica fue modificando la estructura química de las moléculas de antibióticos ya conocidos y buscó nuevos antibióticos que fuesen capaces de

Introducción general

esquivar los mecanismos de resistencias adquiridas por las bacterias (Manrique, 2012).

La resistencia a los antimicrobianos es un problema emergente a nivel mundial. En muchas bacterias de interés clínico se han producido cambios importantes en los fenotipos de resistencia a los antibióticos y este fenómeno ha sido especialmente relevante en los últimos años para algunas asociaciones bacteria-antibiótico.

Desde el punto de vista práctico, se considera que una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando ésta es capaz de inhibir su crecimiento y ayuda a eliminar y controlar la infección, por el contrario, una bacteria es resistente cuando su crecimiento solo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (García de Lomas and Gimeno, 1997).

Una de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana cualitativa más utilizada en la práctica es el test de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma (difusión en disco), cuyo objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos y traducir en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. Este método clasifica directamente al microorganismo como sensible o resistente frente al antibiótico (Cantón, 2010; Taroco R and Vignoli, 2008).

Por otro lado, existe un método cuantitativo, la concentración mínima inhibitoria (MIC), que permite medir la mínima concentración de antibiótico que en un periodo de tiempo determinado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. Esta técnica se puede realizar por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o en test comercial (Taroco R and Vignoli, 2008).

El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en Estados Unidos, así como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), en Europa, han establecido puntos de corte, bien en valores o en halos de inhibición (antibiograma) o de MIC, para separar estas categorías en: sensible, intermedio y resistente (Rafael Cantón, 2010). Para la interpretación de los resultados de las pruebas de sensibilidad, algunos países utilizan puntos de corte clínicos, conforme a lo dispuesto por CLSI o una combinación de puntos clínicos de CLSI y EUCAST, dependiendo del antimicrobiano. Algunos países utilizan otros criterios como valores de corte epidemiológicos (ECOFFs) proporcionados por EUCAST (EFSA, 2013).

8.2 Tipos de resistencia antimicrobiana

8.2.1 Natural o intrínseca: se produce cuando la bacteria carece de diana siendo propia de cada familia, especie o grupo bacteriano (Daza-Perez, 1998).

8.2.2 Adquirida: es variable y obtenida "a posteriori" por una cepa de una especie bacteriana. Es la resistencia más importante desde el punto de vista clínico, se produce por una modificación de la carga genética de la bacteria, por mutación cromosómica o por mecanismo de transferencia genética (transmisión vertical) (Daza-Perez, 1998), pero la **resistencia transmisible**, es la más importante, esta mediado por plásmidos, trasposones, o integrones que pueden pasar de una bacteria a otra (transmisión horizontal) (García de Lomas, 1998).

8.3 Mecanismo de resistencia

Durante mucho tiempo, el principal objetivo en investigación en el área de la resistencia a los antibióticos estaba relacionado con la emergencia de patógenos humanos y su epidemiología. Sin embargo, en la actualidad la presencia de genes de resistencia en las bacterias patógenas se ha convertido en el foco principal en la investigación, considerando que un número cada vez mayor de microorganismos

Introducción general

presentan resistencia a los diferentes tipos de antimicrobianos. El origen de los genes de resistencia está en los propios microorganismos productores de antibióticos que los poseen como mecanismo de defensa frente a estos compuestos que ellos mismos sintetizan. Dichos genes fueron posteriormente transferidos a las bacterias patógenas (Manrique, 2012).

Diversos estudios han demostrado que las bacterias ambientales (especialmente las que provienen del suelo), contienen una gran diversidad de genes de resistencia, algunos similares a los detectados en las bacterias patógenas y otros nuevas (Cantón, 2009; D'Costa et al., 2007; Forsberg et al., 2012).

Por otro lado, se han observado grandes semejanzas estructurales entre algunos antibióticos y otras moléculas que participan en el metabolismo microbiano, por ello es posible que algunos genes de resistencia tengan una doble función: inactivar a los antibióticos y actuar en procesos celulares (Martínez et al., 2011; Wright, 2007).

8.4 Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana

8.4.1 Modificación enzimática del antibiótico: las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. (Tafur, 2008).

8.4.2 Bombas de eflujo: operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas. Figura 3 (Vila, J. 2007).

8.4.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria: las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque de permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente por las porinas (proteínas), forman canales de agua embebidos en la membrana externa que

regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila, J. 2007; Tafur, 2008).

8.4.4 Alteraciones de las dianas del antibiótico: las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gran positivas (Cavaco et al., 2008). En la figura tres se detalla los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter*.

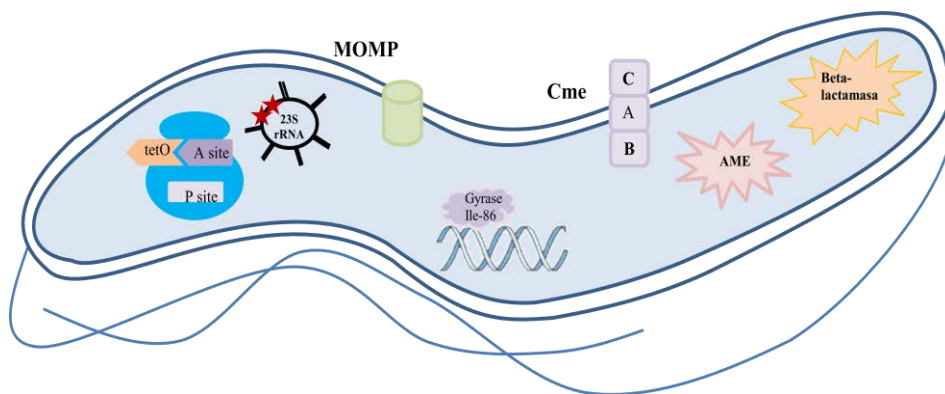


Figura 3. Resumen de los principales mecanismos de resistencia a las diferentes familias de antibióticos en *Campylobacter*. Adaptado de Iovine (2013).

8.5. Mecanismos de Resistencia en *Campylobacter*

8.5.1 Resistencia a fluoroquinolonas (FQ)

En *Campylobacter* existen dos mecanismos de resistencia bien descritos: la inactivación de la diana de las FQ y el sistema de bombas de eflujo. Las dos dianas enzimáticas intracelulares de las FQ son la ADN girasa, codificada por *gyrA* y *gyrB*; y la topoisomerasa IV, codificada por *parC* y *parE* (Drlica and Zhao, 1997). Estas enzimas actúan en la replicación del ADN bacteriano, la transcripción, la recombinación y la reparación del ADN (Jacoby, 2005). Sin embargo, varios

Introducción general

estudios han demostrado que *C. jejuni* y *C. coli* carecen de los genes *parC* y *parE* por lo tanto no pueden ser fuente de resistencia a las FQ (Iovine, 2013; Parkhill et al., 2000).

La resistencia a FQ en *C. jejuni* y *C. coli* ocurre a través de mutaciones puntuales específicas en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*, siendo la mutación Thr-86-Ile la más común. Esta mutación en *gyrA* conduce a una elevada resistencia al ácido nalidixico y FQ (Iovine, 2013; Wiczorek et al., 2013). Además de esta mutación, se han descrito varias otras mutaciones puntuales en *gyrA* en el mismo codón-Thr86Val (Pidcock et al., 2003), Thr86Lys y Thr86Ala (Wang et., 1993), así como otros codones: Ala87Pro, Asp90His y Asp90Tyr. Estas otras mutaciones confieren resistencia a quinolonas con diferentes valores de MICs. Los polimorfismos en el gen *gyrB* han sido descartados como causa de resistencia a quinolonas en *Campylobacter* spp. (Payot et al., 2006)

El segundo mecanismo de resistencia, caracterizado por la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, es mediado por un sistema de eflujo de múltiples fármacos, la bomba de eflujo CmeABC, codificada cromosómicamente y que reduce la concentración de FQ y otros antibióticos (Lin et al., 2002; Pumbwe and Pidcock, 2002).

8.5.2 Resistencia a macrólidos

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas uniéndose reversiblemente al sitio P en la sub-unidad 50S de ribosomas bacterianos. *Campylobacter* utiliza diferentes mecanismos de resistencia frente a los macrólidos: 1) modificación de la diana; 2) mecanismo de eflujo y 3) alteración de la permeabilidad de la membrana, codificada cromosómicamente por *porA*. Los dos primeros actúan sinérgicamente para conferir un nivel alto de resistencia a macrólidos (Cagliero et al., 2006; Iovine, 2013; Lin et al., 2007).

Al igual que otras bacterias, mutaciones puntuales en el dominio V de la región que codifica para el péptido del gen 23S rRNA, en las posiciones 2074 y 2075, confieren resistencia de alto nivel, siendo la sustitución 2075 la más frecuente (Iovine, 2013). *C. jejuni* y *C. coli* llevan tres copias del gen 23S rRNA, de las cuales dos o tres están mutadas en cepas resistentes a macrólidos (Fouts et al., 2005; Iovine, 2013; Parkhill et al., 2000; Pérez-Boto et al., 2014a). Otros mecanismos de resistencia menos frecuentes son debidos a mutaciones en los genes *rplD* y *rplV*, que codifican para las proteínas ribosómicas L4 y L22, respectivamente (Caldwell et al., 2008).

La bomba de eflujo CmeABC, también contribuye a la resistencia frente a macrólidos y funciona de forma sinérgica con las mutaciones del 23S rRNA para producir una resistencia elevada a los macrólidos (Cagliero et al., 2006; Kurinčić et al., 2007).

8.5.3 Resistencia a β -lactámicos

Existen tres mecanismos que median la resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Campylobacter* spp. 1) Inactivación enzimática por β -lactamasas codificadas cromosómicamente; 2) reducción de la absorción debido a alteraciones en los poros de la membrana externa y 3) bomba de eflujo. No obstante, algunos mecanismos de resistencia frente a algunos β -lactámicos aún no están muy bien definidos (Iovine, 2013). Generalmente, con la excepción de algunos carbapenem, la mayoría de las cepas de *Campylobacter* se consideran resistentes a los agentes antimicrobianos β -lactámicos, especialmente las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido. No obstante, presentan susceptibilidad a la amoxicilina y la ampicilina.

8.5.4 Resistencia a tetraciclinas

En *Campylobacter* spp., la resistencia a las tetraciclinas es conferida por el gen TetO, que se encuentra presente en *C. jejuni* y *C. coli* (Connell et al., 2003; Taylor et al., 1983). Las tetraciclinas se unen a los cationes Mg⁺ para pasar a través de las

Introducción general

porinas de la membrana externa y luego, en el espacio periplásmico, se disocia del Mg⁺ y se mueve pasivamente hacia el citoplasma para unirse a los sitios discretos en la subunidad 30S ribosomal (Chopra and Roberts, 2001). Se ha demostrado que el gen TetO confiere niveles extremadamente altos de resistencia a la tetraciclina (Gibreel et al., 2004). TetO puede estar codificada en el cromosoma o más comúnmente en el plásmido pTet en *C. jejuni* y pCC31 en *C. coli* (Iovine, 2013).

8.5.5 Resistencia a aminoglucósidos

El principal mecanismo de la resistencia a los aminoglucósidos en *Campylobacter* es a través de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que suelen ser transmitidos por plásmidos. La resistencia a los aminoglucósidos se detectó por primera vez en cepas de *C. coli* y fue mediada por una 3'-aminoglycoside phosphotransferase, codificada por el gen *aphA-3*. Este gen sigue siendo la fuente más común de resistencia a los aminoglucósidos en *Campylobacter* (Gibreel et al., 2004).

La contribución de la bomba de eflujo a la resistencia frente a los aminoglucósidos en *Campylobacter* no está completamente clara, pero es probable que sea menos importante que las enzimas modificadoras de fármacos presentes en plásmidos (Iovine, 2013).

8.5.6 Resistencia a cloranfenicol

El cloranfenicol actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas al impedir la elongación de la cadena peptídica; se une de forma reversible a la subunidad 50S del ribosoma. El principal mecanismo de resistencia bacteriana al cloranfenicol es mediante la inactivación enzimática por acetilación vía diferentes tipos de acetiltransferasas (CAT, *chloramphenicol acetyltransferases*). Estos enzimas están codificados por el gen *cat* que puede tener una localización cromosómica o plasmídica (Schlünzen et al., 2001; Schwarz et al., 2004). Aunque la resistencia al cloranfenicol es infrecuente en *Campylobacter*, se ha descrito un gen plasmídico de resistencia al cloranfenicol en cepas de *C. coli* (Ying and Diane E, 1990).

9. Utilización de antimicrobianos en la industria avícola

En los últimos años la comunidad científica ha manifestado una gran preocupación por el alarmante incremento de la resistencia a antibióticos debido al problema que esto supone en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Históricamente los antimicrobianos han sido utilizados en la ganadería tanto para el tratamiento de infecciones como promotores del crecimiento. La utilización de antimicrobianos en la industria avícola se utiliza principalmente como tratamiento metafiláctico y terapéutico. Por otro lado, la práctica de administrar promotores del crecimiento que contienen antimicrobianos análogos a los utilizados en medicina humana fue prohibida en los países de la UE en 2003 y en 2006 se prohibió el uso de todos los promotores de crecimiento antimicrobianos en la UE. Sin embargo, en aves de corral, algunos antimicrobianos específicos están autorizados para uso terapéutico (Wimalarathna et al., 2013). Actualmente en la UE está prohibido el uso de antibióticos que producen fotosensibilización, cloranfenicol, quinolonas de segunda generación (Olaquinox), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (excepto ceftiofur) y tilosina a dosis de promotores de crecimiento. En España, la red española de vigilancia de la resistencia a antibióticos en animales, tendría un importante papel en el seguimiento de las tasas de resistencia que pudiesen indicar desvíos en los patrones de uso de los antibióticos. Este hecho, hizo que se buscara nuevas alternativas al uso de los antibióticos en la alimentación animal, en este contexto, está el uso de probióticos (bacterias que compiten con los patógenos y mantienen el equilibrio de la flora intestinal), enzimas que mejoran la digestión de los alimentos o la adición de ciertos ácidos orgánicos, entre otras.

Objetivos

El control de *Campylobacter* en el primer eslabón de la cadena alimentaria (granjas de pollos de engorde) es fundamental para reducir la incidencia de la campilobacteriosis. Profundizar en el conocimiento de *Campylobacter* en avicultura de carne tanto desde el aspecto de la diversidad genética, como de la circulación de cepas resistentes a antimicrobianos o de la potencial virulencia de las mismas, contribuirá a establecer o mejorar mecanismos de control del patógeno, para minimizar el riesgo de infección en humanos. De este modo los objetivos planteados en esta tesis son:

1. Estudiar la diversidad genética y la dinámica de circulación de cepas de *Campylobacter* en granjas de pollos de engorde.
2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *Campylobacter* circulantes en granja a lo largo del tiempo.
3. Identificar la presencia de genes asociados a la virulencia en dichos aislados.
4. Caracterizar en profundidad una selección de aislados de *Campylobacter* mediante secuenciación masiva.

PART II

Studies

Study I

Long-term dynamics and diversity of *Campylobacter* strains in broiler farms

ABSTRACT

A long-term longitudinal study was performed in five conventional broiler farms during a two-year period, with the aim of determining the *Campylobacter* strain dynamics, diversity and seasonality. In total 343 isolates (254 *C. jejuni* and 89 *C. coli*) were first analysed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), using *Sma*I and *Kpn*I restriction enzymes. A great genotypic diversity was observed with an overall 92 macrorestriction profiles (12 to 24 profiles per farm). A succession of genotypes was observed along the rearing cycles, with usually one or two genotypes per crop in all farms. Additionally, we detected some persistent genotypes within the same crop, but not between consecutive rearing cycles. A low proportion of common *C. jejuni* genotypes were observed among farms. Multilocus sequence typing (MLST) was performed in a selection of isolates (93 *C. jejuni* and 34 *C. coli*), from the different macrorestriction profiles obtained by PFGE. Sixteen clonal complexes (CC) distributed in 34 sequence types (STs) were detected in total in *C. jejuni* isolates, whereas *C. coli* isolates were all grouped within the CC828 distributed in 12 STs. Overall seven novel STs were isolated. *C. jejuni* CC21 and CC206 were observed throughout the year and more frequently during the warmer months, while absent during the coldest trimester; CC48 was only observed during the warmest months. The large diversity of genotypes with no or little common genotypes between consecutive crops, points to a diversity of sources of *Campylobacter* in the external environment of the farms, and an efficient downtime that eliminates *Campylobacter* present in the broiler houses by the end of the rearing cycles.

INTRODUCTION

Campylobacteriosis is a major food-borne zoonosis in developed countries (WHO, 2011) and in the European Union (EU) it has outnumbered the cases of *Salmonella* infections since 2005 (EFSA, 2014). The majority of *Campylobacter* infections are caused by *C. jejuni* and to a lesser extent *C. coli* (Gillespie et al., 2002), producing a self-limiting gastroenteritis (Butzler, 2004). However, in rare cases (1 in 1000), campylobacteriosis can lead to a number of severe immunoreactive neuropathies such as Guillain-Barré and Miller–Fisher syndromes (Skirrow and Butzler, 2000). The main source of infection in humans is associated with the handling and consumption of contaminated raw or under cooked poultry products, mainly chicken meat and its by products (Friedman et al., 2004; Humphrey et al., 2007). An Expert Opinion Assessment by the European Food Safety Authority has estimated that chicken meat consumption accounts for 20%–30% of campylobacteriosis in the EU, whereas 50%–80% may be attributed to the chicken reservoir as a whole (EFSA, 2011). In most EU countries, the majority of broiler batches are *Campylobacter*-positive at slaughter. The lowest *Campylobacter* flock prevalence is seen in Nordic countries (Denmark, Finland, Norway and Sweden) which range from 0.6% to 13.1%, whilst in the rest of the EU the prevalence is rather high (up to 74.2%–80%) (EFSA, 2015).

Campylobacter are excreted into the environment in large numbers and are efficient colonizers of poultry (Newell and Fearnley, 2003). However, this pathogen is not usually detected in broilers until 2-3 weeks of life, when birds became more susceptible to colonization (Evans and Sayers, 2000). This seems to be due to a steady decrease of maternal antibodies, that disappear completely by the third week and which provide partial protection at an early age (Cawthraw and Newell, 2010). Despite over 30 years of research, the origin of the infection remains unclear. Nevertheless, since *Campylobacter* are ubiquitous in most environments, the colonization of intensively grown broilers is likely the result of a combination of factors for horizontal transmission from the environment. In this

context, domestic and wild animals, vectors and the external environment have a fundamental role to play in the bacterial transmission (Humphrey et al., 2007). There have been multiple risk factors described for the introduction, colonization and dissemination of the pathogen into broiler farms. The most important include the maintenance of bacteria from previous flocks which can infect new ones (Pearson et al., 1993), the age of the flock, the practice of partial depopulation on the same or neighbouring farms, the presence of multiple broiler houses, farm workers and other livestock on the farm (Bull et al. 2008; Johnsen, Kruse and Hofshagen 2006), water sources, rodents, fomites, transportation of equipment and farm personnel (Horrocks et al., 2009). In contrast, vertical transmission of *Campylobacter* spp. remains unclear and questionable (Agunos et al., 2014; Battersby et al., 2016).

Campylobacter spp. shows a high degree of genetic diversity, which makes it difficult to trace the source of infections. The lack of adequate and easily available methods for identification, typification, tracing and following up of *Campylobacter* strains that cause disease in humans has further aggravated this difficulty (Wassenaar, 2000). Different methods of molecular typing have been developed in order to elucidate the possible infection sources of *Campylobacter*. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is currently one of the most discriminatory methods of molecular typing for outbreak investigation, especially when two restriction enzymes are used (Rivoal et al. 2005). Multilocus Sequence Typing (MLST), displays a high discriminatory power and is considered the gold standard technique for genotyping during long term epidemiological studies (Dingle et al., 2001a), providing information about global epidemiology and population structure of *Campylobacter* spp. These two methods have also proven valuable in on farm studies.

The aim of this study was to determine the dynamics, temporal trends and diversity of *Campylobacter* isolates in Spanish broiler farms, by molecular typing

Study I

of those isolates recovered from all flocks raised during a two year-period in five farms.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A total of 343 isolates (254 of *C. jejuni* and 89 of *C. coli*) from a longitudinal 2-year study in five farms were analyzed (Urdaneta, 2016). These farms (identified as farm A, B, C, D and E), each located and belonging to one of the main broiler companies in Catalonia (northeastern Spain), had a breed integrated system with an “all in, all out” management system. The downtime between flocks lasted 10 days on average. All farms had one or two broiler houses and distances from farm to farm ranged from 15km to 200 km. Characteristics of each farm are shown on Figure 1 and Table 1. Six to seven flocks per farm were monitored each year, with a weekly sampling (visits to farms each 2 to 5 days).

From each *Campylobacter*-positive sampling, five isolates from five different birds randomly selected among up to 30 positive birds per sampling were preserved at -80°C in brain heart infusion broth with 20% glycerol. Two to three samplings per flock were performed. Isolates were identified at species level by PCR (Urdaneta, 2016). For the molecular typing of the isolates, fresh cultures were prepared from the -80 °C frozen stocks by plating each isolate onto blood agar plates (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France), and incubated at 37 °C for 48 h under microaerobic conditions, using a microaerobic atmosphere generator (Anaerocult® C, Merck, Darmstadt, Germany).



Figure 1. Location of sampled farms in Catalonia (northeastern Spain).

Table 1. Characteristics of the broiler farms included in the study.

Farm	Num House	House age (Year)	Size ^a	Capacity ^b		Ventilation ^c	Bed type
				Max.	Min.		
A	2	>15	1.120 m ²	15.500	12.900	natural	Straw / Shaving
B	1	10-15	940 m ²	15.000	13.000	forced	Straw / Shaving (pine)
C	1	6-10	1.428 m ²	25.596	20.200	forced	Shaving (rec)
D	2	5-5	2.900 m ²	46.200	40.000	forced	Shaving (graim)
E	2	>15	2.190 m ²	28.500	24.052	natural	Rice husks

a) Size of each broiler house; b) capacity of each broiler house; c) forced = transversal forced ventilation.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Campylobacter isolates were typed by PFGE according to the standard operating procedure of PulseNet (www.pulsenetinternational.org). Genomic DNA was digested with *Sma*I and *Kpn*I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). *Salmonella* enterica serovar Braenderup H9812 was used as size marker. Restriction fragments were separated by electrophoresis in a CHEF-DR III System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the resulting PFGE patterns were analyzed using Fingerprinting II Informatix software (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). Similarity matrices were calculated using the Dice coefficient (1% optimization and 1% tolerance) and cluster analysis was performed by the

Study I

unweighted-pair group method with arithmetic average. A cut-off of 90% was used for the determination of the different macrorestriction profiles.

Multilocus sequence typing (MLST)

Genomic DNA extraction was performed from a bacterial suspension in PBS using InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the manufacturer instructions. MLST was performed as described previously by Miller et al. (2005). Briefly, internal fragments of seven housekeeping genes: *aspA* (aspartate ammonia-lyase), *glnA* (glutamine synthetase), *gltA* (citrate synthase), *glyA* (serine hydroxy methyl transferase), *uncA* (or *atpA*, ATP synthase alpha subunit), *glmM* (or *pgm*, phosphoglucosamine mutase) and *tkt* (transketolase), were PCR amplified and sequenced. When no amplification product was obtained (this happened for *pgm* and *tkt* genes only), the reaction was repeated by using the primers described by Korczak et al. (2009) instead. The oligonucleotide primers set are described in Table 2. The sequence types (ST) and clonal complexes (CC) were determined according to the scheme provided on the MLST data base (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Novel alleles and STs were submitted to the *C. jejuni* and *C. coli* pubMLST data bases.

Table 2. *Campylobacter* MLST primer sets.

Gene	Primer	Sequence 5'- 3'	Amplicon Size (bp)	Reference
<i>aspA</i>	aspAF1	GAGAGAAAAGCWGAAGAATTTAAAGAT	676	Miller et al., 2005
	aspAR1	TTTTTTCATTWGCRSTAATACCATC		
<i>glnA</i>	glnAF	TGATAGGMACTTGGCAYCATATYAC	751	Miller et al., 2005
	glnAR	ARRCTCATATGMACATGCATACCA		
<i>gltA</i>	gltAF	GARTGGCTTGCKGAAAAYAARCTTT	706	Miller et al., 2005
	gltAR	TATAAACCCATATGYCCAAAGCCCAT		
<i>glyA</i>	glyAF	ATTCAAGTTCTCAAGCTAATCAAGG	716	Miller et al., 2005
	glyAR	GCTAAATCYGCATCTTTKCCRCTAAA		
<i>pgm</i>	pgm F1	CATTGCGTGDGTTTTAGATGTVGC	720	Miller et al., 2005
	pgm R1	AATTTTCHGTBCCAGAATAGCGAAA		
<i>tkt</i>	tkt_Cjc-L	GCAAAYTCAGGMCAAYCCAGGTGC	730	Miller et al., 2005
	tkt_Cjc-R	TTTTAATHAVHTCTTCRCCCAAAGGT		
<i>atpA</i>	atpAF	GWCAAGDGTATYTGATWTATGTTGC	700	Miller et al., 2005
	atpAR	TTTAADAVYTCAACCACTTTTGTC		
<i>pgm</i>	glmM_Cjc-L	GCTTATAAGGTAGCWCKACTG	685	Korczak et al., 2009
	glmM_Cjc-R	AATTTTCHGTTCCAGAATAGCG		
<i>tkt</i>	tkt_Cjc-L	AAAYCCMACTTGGCTAAACCG	606	Korczak et al., 2009
	tkt_Cjc-R	TGACTKCCTTCAAGCTCTCC		

RESULTS

A 0,87% (3/343) of isolates were not typeable with *KpnI*, and thus were not included in the analyses. Ninety-two different profiles were obtained from the 340 isolates analysed by PFGE after digestion with the two restriction enzymes. The number of fragments generated per isolate with each enzyme ranged from 5 to 13 and their sizes varied from 33.3 to 1135 kb. Overall, 12 to 24 macrorestriction profiles were identified per farm and between one to six genotypes per crop (Table 3).

On farm A, with an overall *Campylobacter* prevalence of 53,85% (7 positive crops/13 crops), 55 isolates were analyzed (27 *C. jejuni* and 28 *C. coli*). Overall 18 different macrorestriction profiles (genotypes) were obtained, two of them (P8, P16) were predominant (with 9 and 8 isolates, respectively) and were found in two crops (Figure 2). The same genotype was found within the same crop in consecutive weekly samplings (crops L1, L12) and in non-consecutive reared

Study I

crops (L1, L7). Two isolates, one *C. jejuni* and one *C. coli* from the same (L7) or different (L1 and L7) crops showed >90% similarity (Figure 2).

On farm B, with an overall *Campylobacter* prevalence of 69,23% (9 positive crops/13 crops), 76 isolates were analyzed (53 *C. jejuni* and 23 *C. coli*). Altogether 24 different genotypes were obtained, three of them (P28, P33, P34) were predominant (with 9 to 11 isolates each) and were found in four flocks (Figure 3). The same genotype was found within the same crop in consecutive weekly samplings (crops L1, L6, L9, L11 and L12) and in non-consecutive reared crops (L2-L13 and L5-L6).

On farm C, with an overall *Campylobacter* prevalence of 66,66% (8 positive crops/12 crops), 73 isolates were analyzed (53 *C. jejuni* and 20 *C. coli*). In total 12 different genotypes were obtained, three of them (P43, P46, P50) were predominant (with 10 to 18 isolates each) and were found in three crops. The same genotype was found within the same crop in consecutive weekly samplings (crops L5, L7, L9) and in non-consecutive reared crops (L10, L12) (Figure 4).

On farm D, with an overall *Campylobacter* prevalence of 38,46% (5 positive crops/13 total crops), 55 isolates were analyzed (49 *C. jejuni* and 6 *C. coli*). This farm showed the lowest prevalence among the five farms studied. In total 14 different genotypes were obtained, three of them (P55, P62 and P63) were predominant (with 8 to 11 isolates each) and were found in five crops. The same genotype was found within the same crop in consecutive weekly samplings (crops L1 and L12) and in non-consecutive reared crops (L2-L8 and L5-L8) (Figure 6).

Finally, farm E was the one with the highest *Campylobacter* prevalence, 83% (10 positive crops/12 crops), and a total of 81 isolates were analyzed (69 *C. jejuni* and 12 *C. coli*). Overall, 24 different genotypes were identified and only two of them (P69 and P89) were predominant, with 21 and 9 isolates, respectively and were found in five crops (Figure 6). Despite this high genetic diversity, the same

genotype was found in consecutive samplings from three crops (L1, L9 and L10). The same genotype was also isolated in two occasions from different non-consecutive positive crops (L2, L4, L7 and L9).

Globally, among the five farms studied we have detected a great genotypic diversity. Mostly, one or two different genotypes were identified per crop; in this way, a succession of genotypes per crop was observed. A great genotypic diversity was observed in four of the five farms (A, B, D and E), with up to five or six different genotypes per crop in up to two crops per farm. The lowest genotypic diversity per crop was observed in farm C, with a maximum of one or two genotypes. On the other hand, we usually found one or two persistent genotypes per crop with the exception of L4 from farm E in which three different genotypes were observed. No persistent genotype that originated in a previous crop was identified. However, when comparing all isolates, same *C. jejuni* genotypes were found among different farms, specifically between farms A and B, B and D, and C and D (Table 3 and Figure 7).

Study I

Table 3. Total number of genotypes identified per crop and farm.

Farm A			Farm B			Farm C		
Flocks num	Nº of genotypes	Profiles per age ^b	Flocks num	Nº of genotypes	Profiles per age	Flocks num	Nº of genotypes	Profiles per age
L1	2	34d (P15,P16)/37d (P15,P16)	L1	4	27d (P23)/34d (P23,P42)	L1	–	–
L2	4	26d (P1,P2,P4)/30d (P3,P4)	L2	5	14d (P20,P33)/20d (P19,P40)/34d (P24)	L2	2	21d (P47)/25d (P47,P54)
L3	1	35d	L3	–	–	L3	1	21d
L4	1	14d	L4	–	–	L4	–	–
L5	– ^a	–	L5	2	39d	L5	1	14d (P50)/17d (P50)
L6	2	30d	L6	6	28d (P21,P37,P38)/33d (P22,P27,P31,P38)	L6	–	–
L7	6	28d (Cj:P5,P7,P17,P18; Cc:P5) 32d (Cj:P6; Cc:P14)	L7	2	21d	L7	2	29d (P34)/34d (P34)/37d (P34)
L8	–	–	L8	–	–	L8	1	31d
L9	–	–	L9	2	18d (P34)/22d (P34,P36)	L9	1	14d (P53)/17d (P53)
L10	–	–	L10	–	–	L10	2	13d
L11	–	–	L11	2	36d (P25,P26)/39d (P26)	L11	–	–
L12	2	19d (P8,P9)/22d (P8)	L12	2	22d (P28, P35)/24d (P28)	L12	2	21d (P46)/27(P46)/30d (P46)/33d (P46,P51,P52)
L13	–	–	L13	1	21d (P33)/26d (P33)			

Table 3. Continued.

Farm D			Farm E		
Flocks num	Nº of genotypes	Profiles per age	Flocks num	Nº of genotypes	Profiles per age
L1	1	29d (P62)/31d (P62)	L1	5	23d (P84,P86)/27d (P73,P84,P85,P92)
L2	4	14d (P63,P64)/21d (P56,P61)	L2	4	28d
L3	–	–	L3	2	33d
L4	–	–	L4	4	22d
L5	1	14d (P55)/20d (P55)	L5	2	(P69,P78,P81)/28d (P69,P78,P79,P81)
L6	–	–	L6	–	21d
L7	–	–	L7	1	20d (P69)/25d (P69)/29d (P69)
L8	3	27d (P57)/30d (P55,P63)	L8	–	–
L9	–	–	L9	4	23d (P77)/28d (P69,P77,P90,P91)
L10	–	–	L10	2	21d (P89)/25d (P74,P89)
L11	–	–	L11	1	31d
L12	6	10d (P65,P67)/14d (P58,P60,P66)/18d (P59,P60,P68)	L12	3	25d (P80,P82,P83)/29d (P80)
L13	–	–			

- a) Negative flocks
b) Age per day

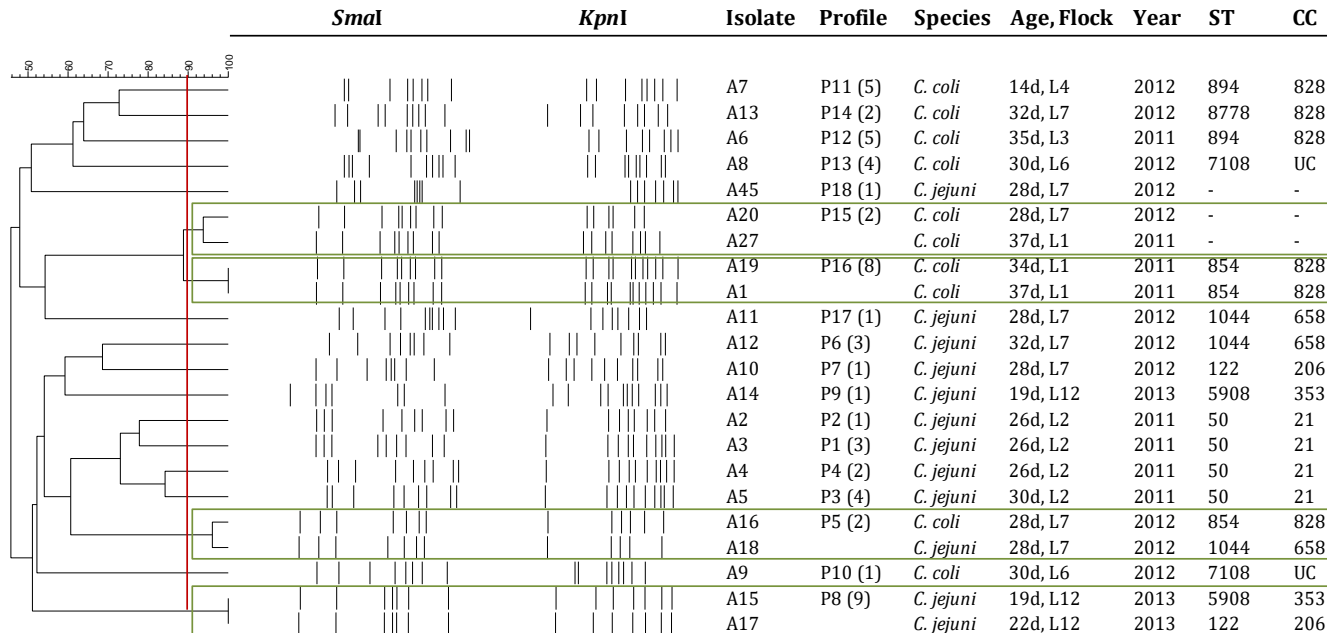


Figure 2. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns of *Campylobacter* isolates from farm A. Profiles = P1 to P18, with total number of isolates per profile in brackets. Profiles with a similarity > 90% were considered the same genotype. Isolates from the same crop clustering to a similarity > 90% are highlighted with green boxes and those from different crops, with blue boxes. ST, MLST sequence type; CC, MLST clonal complex. *Campylobacter*-negative crops: L5, L8, L9, L10, L11.

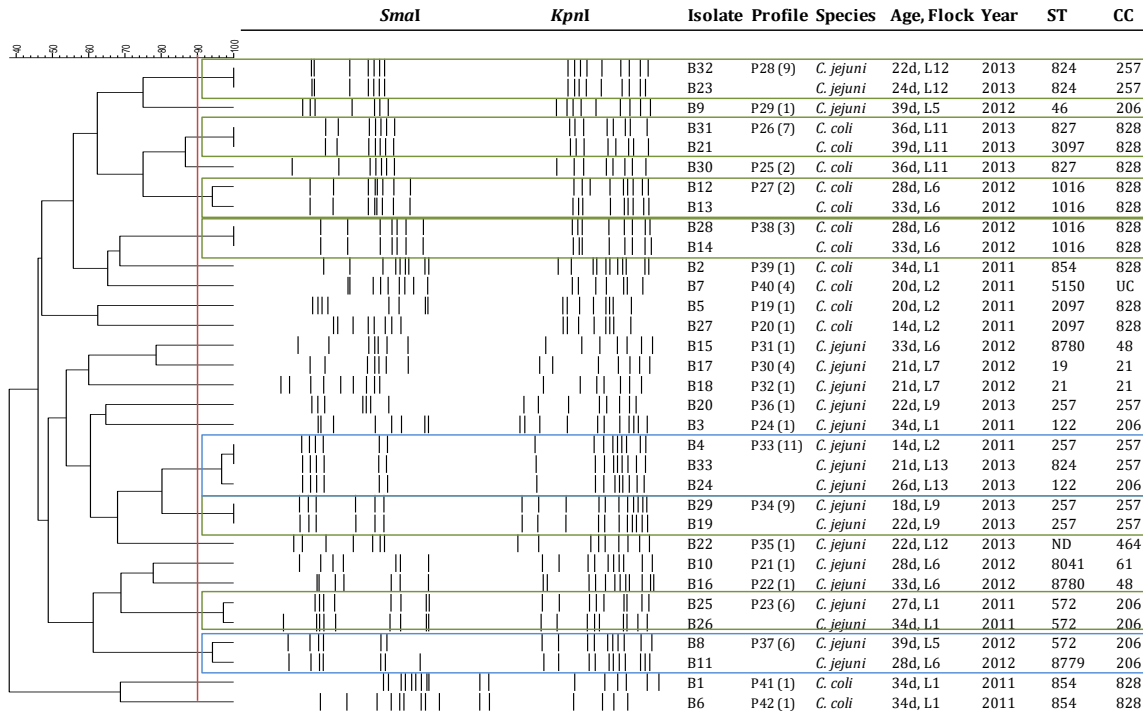


Figure 3. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns of *Campylobacter* isolates from farm B. Profiles = P19 to P42, with total number of isolates per profile in brackets. Profiles with a similarity > 90% were considered the same genotype. Isolates from the same crop clustering to a similarity > 90% are highlighted with green boxes and those from different crops, with blue boxes. ST, MLST sequence type; CC, MLST clonal complex. *Campylobacter*-negative crops: L3, L4, L8, L10.

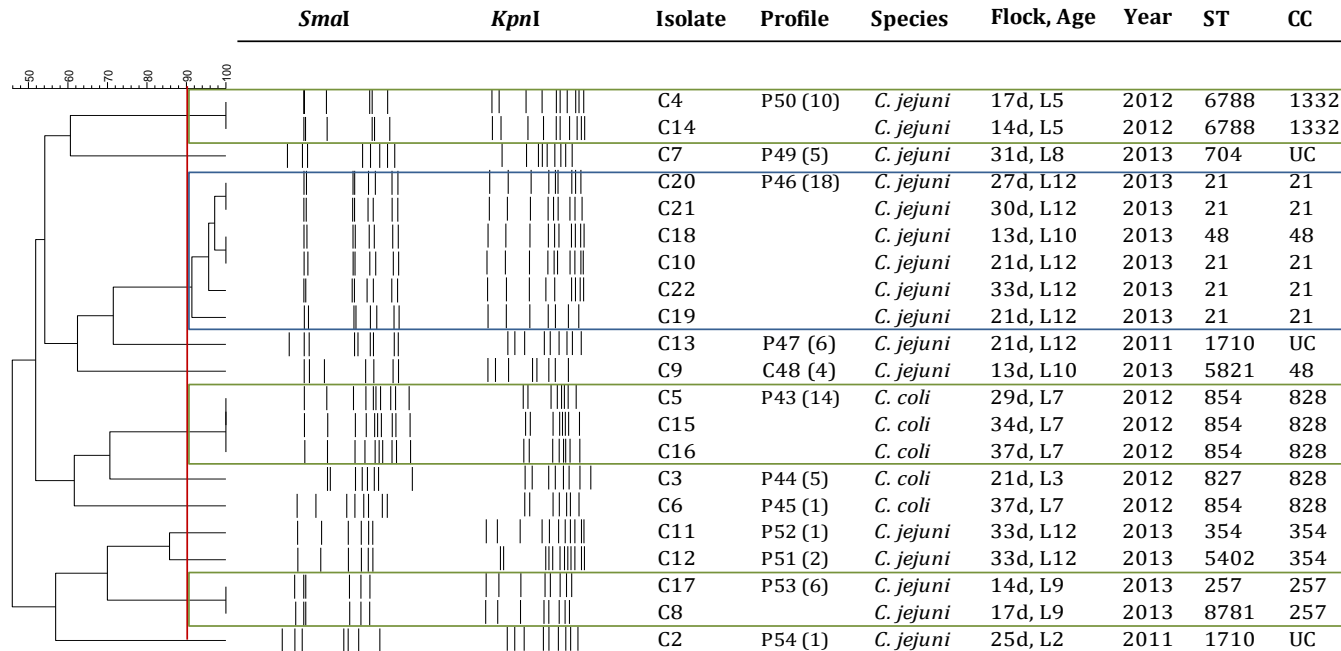


Figure 4. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns of *Campylobacter* isolates from farm C. Profiles = P43 to P54, with total number of isolates per profile in brackets. Profiles with a similarity > 90% were considered the same genotype. Isolates from the same crop clustering to a similarity > 90% are highlighted with green boxes and those from different crops, with blue boxes. ST, MLST sequence type; CC, MLST clonal complex. *Campylobacter*-negative crops: L1, L4, L6, L11.

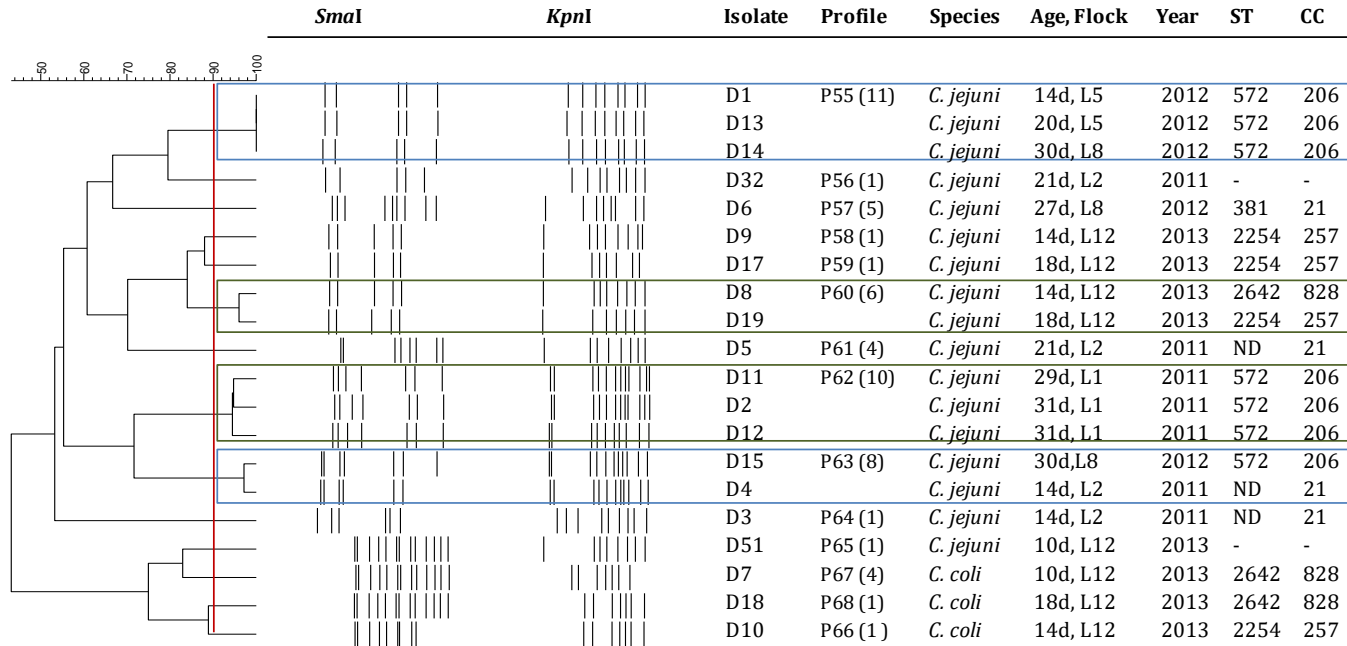


Figure 5. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns of *Campylobacter* isolates from farm D. Profiles = P55 to P68, with total number of isolates per profile in brackets. Profiles with a similarity > 90% were considered the same genotype. Isolates from the same crop clustering to a similarity > 90% are highlighted with green boxes and those from different crops, with blue boxes. ST, MLST sequence type; CC, MLST clonal complex. *Campylobacter*-negative crops: L3, L4, L6, L7, L9, L10, L11, L13.

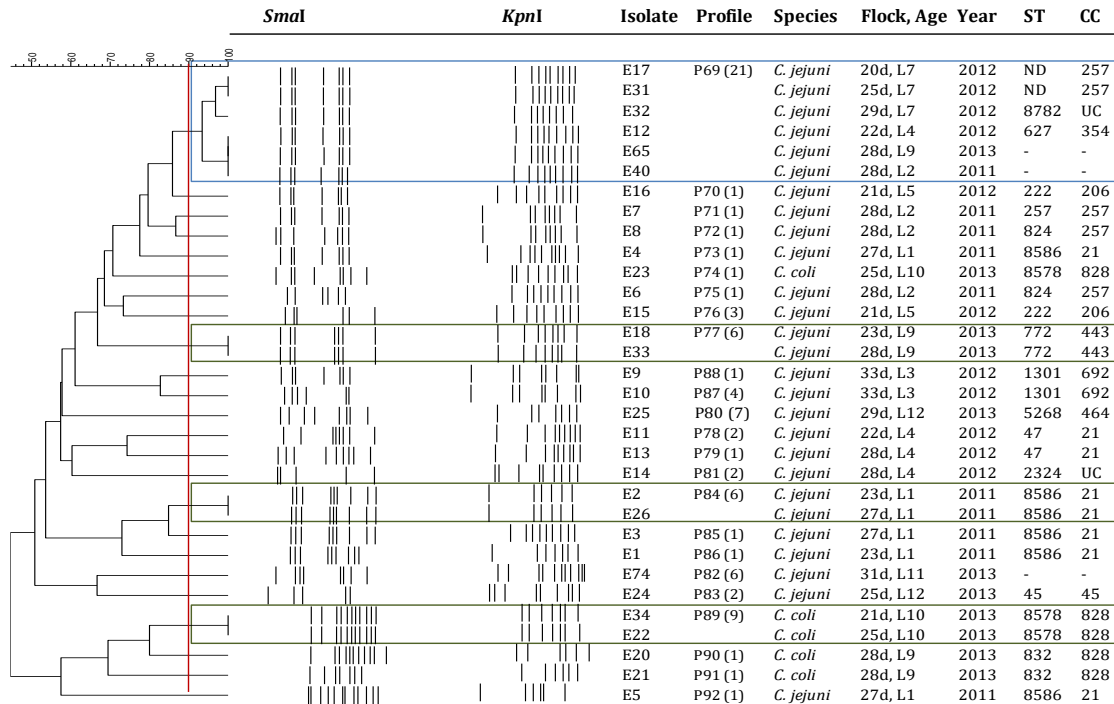


Figure 6. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns of *Campylobacter* isolates from farm E. Profiles = P69 to P92, with total number of isolates per profile in brackets. Profiles with a similarity > 90% were considered the same genotype. Isolates from the same crop clustering to a similarity > 90% are highlighted with green boxes and those from different crops, with blue boxes. ST, MLST sequence type; CC, MLST clonal complex. *Campylobacter*-negative crops: L6, L8.

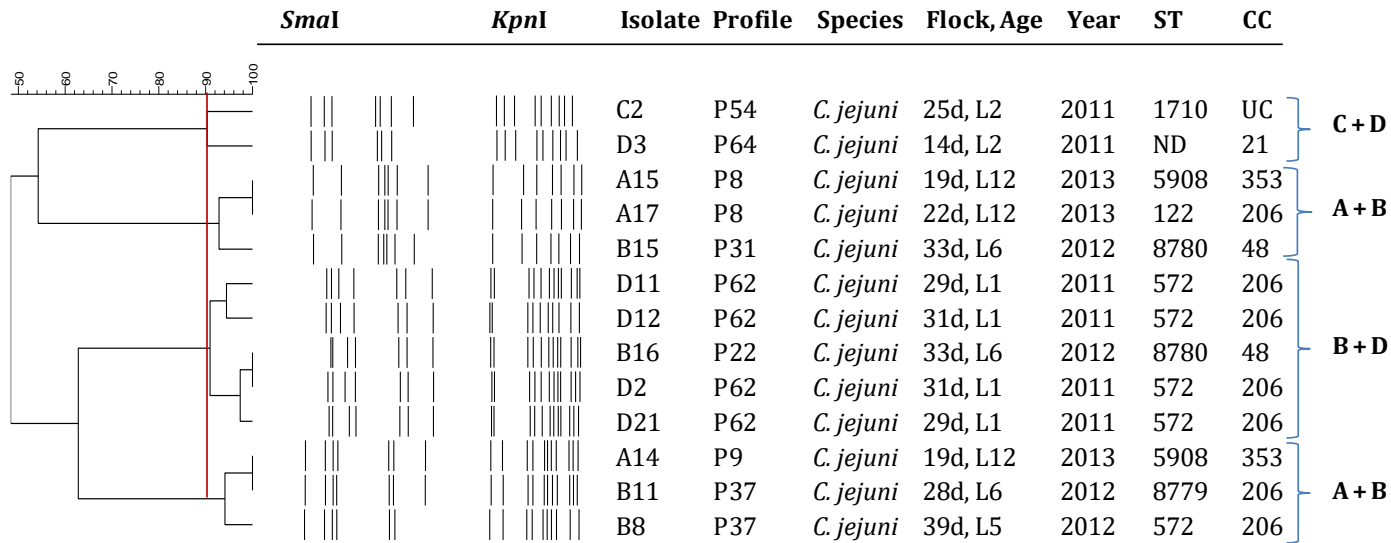


Figure 7. PFGE combined dendrogram of *SmaI* and *KpnI* patterns common to different farms (similarity $\geq 90\%$).

Same PFGE profile of isolates from different farms have different profile code (e.g. P54 = P64).

Study I

MLST

A total of 127 isolates (93 of *C. jejuni* and 34 of *C. coli*), were selected for the MLST analysis from the 92 different PFGE profiles, according to different bird age and crop per farm. Complete MLST profile was obtained for 121 of them. For the remaining six (all *C. jejuni* isolates), the STs could not be determined, since one or two genes in each of them could not be PCR-amplified and sequenced (Table 4).

A high diversity of CC among the *C. jejuni* isolates (n=93) was found with 16 CC in total and CC21, CC206, CC257 being the most frequent. CC 21 comprised 23 isolates (24,7%) distributed in seven STs and two undetermined STs with ST 21 and ST 8586 being the most frequent. CC 206 included 18 isolates (19,3%) distributed in five different STs including the most abundant ST 572. Finally, CC 257 with 17 isolates (20,4%) was distributed in four STs (Table 3). By contrast, all but three *C. coli* isolates (n=34), belonged to the same clonal complex (CC 828). These four CC predominated and represent 74% of all the studied isolates.

In total, 46 different STs were found out of which 34 corresponded to *C. jejuni* isolates and 12 to *C. coli* isolates (Tables 5 and 6). Nineteen unique STs heterogeneously distributed among the five farms were identified (16 *C. jejuni*, 3 *C. coli*); the remaining STs were detected in more than one occasion, being the most frequent with 10 isolates each, ST572 (*C. jejuni*, 10,7%) and ST854 (*C. coli*, 29,4%) and were found in two and three farms, respectively. Overall, 41 ST out of the 46 STs identified were assigned to 16 previously described clonal complexes (CC) while the remaining five STs belonged to undefined CC (Tables 5 and 6).

Table 4. Allele profiles of *C. jejuni* isolates that could not be assigned to a ST.

Isolate	Species	Age	Flock	Seven housekeeping genes							ST	CC
				<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>uncA</i>		
B22	<i>C. jejuni</i>	22d	12	24	2	2	2	10	3	ND	-	464
D4	<i>C. jejuni</i>	14d	2	2	1	ND	3	ND	1	5	-	21
D5	<i>C. jejuni</i>	21d	2	2	1	12	3	ND	1	5	-	21
E17	<i>C. jejuni</i>	20d	7	9	2	2	2	ND	5	102	-	257
E31	<i>C. jejuni</i>	25d	7	9	2	2	2	ND	5	6	-	257
E35	<i>C. jejuni</i>	25d	12	24	2	2	2	132	3	ND	-	464

a) ND, not determined

Additionally, several novel STs were identified: five novel STs in 11 *C. jejuni* isolates and two novel STs in four *C. coli* isolates, all of them belonging to previously described CC (CC 21, CC 48, CC 52, CC 206 and CC 257 for *C. jejuni*; CC 828 for *C. coli*). Those new STs were found in all farms but not farm D, and were most frequent in farm E, with three novel ST and one of them (ST 8586 with six isolates) being the third most common *C. jejuni* ST together with the widespread ST 21. These novel STs were due mostly to new allele combinations (six ST) or to a new allele sequence for the *pgm* (865) loci that corresponded to the above mentioned ST8586.

The overall high diversity of genotypes encountered in the five farms is also reflected by the few ST found in more than one farm (2-3 farms): six *C. jejuni* ST (ST21, ST50, ST122 ST257, ST572, ST824) and two *C. coli* ST (ST827, ST854).

Study I

Table 5. Allele profiles, sequence types (ST), and clonal complexes (CC) of *C. jejuni* isolates (n= 93).

CC	ST ^a	Alleles							No. of isolates	Farm ^b
		<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>atpA</i>		
CC 21	19	2	1	5	3	2	1	5	1	B
	21	2	1	1	3	2	1	5	6	B (1), C (5)
	47	2	1	1	5	2	1	5	2	E
	50	2	1	12	3	2	1	5	5	A (4), D (1)
	381	2	1	1	3	11	1	5	1	D
	8586	2	1	12	3	865	1	5	6	E
CC 45	45	4	7	10	4	1	7	1	1	E
CC 48	48	2	4	1	2	7	1	5	1	C
	5821	2	4	1	2	11	1	5	1	C
	8780	62	4	5	2	22	1	5	2	B
CC 52	8782	9	2	2	2	113	3	6	1	E
CC 61	8041	33	4	2	301	10	3	5	1	B
CC 206	122	6	4	5	2	2	1	5	4	A (3), B (1)
	222	2	21	5	2	59	1	5	2	E
	46	2	21	5	3	2	1	5	1	B
	572	62	4	5	2	2	1	5	10	B (3), D (7)
	8779	62	4	5	2	118	1	5	1	B
CC 257	257	9	2	4	62	4	5	6	7	B (5), C (1), E (1)
	8781	9	2	4	62	7	5	6	1	C
	824	9	2	2	2	11	5	6	5	B (3), E (2)
	2254	8	2	4	62	4	5	6	4	D
CC 353	5908	7	2	5	2	104	3	6	2	A
CC 354	5402	8	10	2	2	2	12	6	1	C
	354	8	10	2	2	11	12	6	1	C
	627	2	2	2	2	11	5	6	1	E
CC 443	772	7	17	2	15	132	3	12	3	E
CC 464	5268	24	2	2	2	23	3	1	1	E
CC 607	904	24	2	5	53	23	3	1	3	E
CC 658	1044	2	10	2	4	19	3	6	3	A
CC 692	1301	2	115	57	26	127	29	35	2	E
CC 1332	6788	2	1	4	28	58	29	58	2	C
UC	704	2	29	4	27	7	25	57	1	C
UC	1710	2	71	5	62	22	67	6	3	C
UC	2224	7	112	5	62	11	67	6	1	E

a) Novel STs are indicated in bold. UC, undefined CC.

b) In brackets, number of isolates per farm.

Table 6. Allele profiles, sequence types (ST), and clonal complexes (CC) of *C. coli* isolates (n= 34).

CC	ST ^a	Alleles							No. of isolates	Farm ^b
		<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>atpA</i>		
CC828	827	33	39	30	82	104	56	17	3	B (2), C (1)
	832	33	39	30	79	113	43	17	2	E
	854	33	38	30	82	104	43	17	10	A (3), B (3), C (4)
	894	33	39	65	82	113	47	17	2	A
	1016	33	38	30	82	118	43	17	4	B
	2097	33	38	30	238	104	43	36	2	B
	2642	33	38	30	79	104	35	17	3	D
	3097	33	39	30	2	104	56	1	1	B
	8578	33	39	418	82	113	85	17	3	E
	8778	2	39	30	82	188	43	5	1	A
UC	5150	292	179	30	82	113	206	17	1	B
UC	7108	33	157	30	557	113	117	68	2	A

a) Novel STs are indicated in bold. UC, undefined CC.

b) In brackets, number of isolates per farm.

DISCUSSION

In order to study in depth the diversity and population dynamics of *Campylobacter* genotypes colonizing broiler flocks, molecular typing was conducted of isolates recovered along all *Campylobacter*-positive crops reared during an extended period in five farms. The genetic instability reported for *Campylobacter* spp. makes it difficult to interpret its molecular epidemiology (Dingle et al., 2008). For this reason, it is recommended to use more than one typing method. Here, for the typing of *C. jejuni* and *C. coli* isolates, PFGE and MLST were used.

Campylobacter isolates were first characterized by PFGE using two restriction enzymes, which allows for a higher discrimination among genotypes (Hänninen et al., 2003; Ribot et al., 2001). Next, subsets of isolates from all farms, representing different PFGE genotypes from the different crops, were further typed by MLST. The PFGE and MLST analysis showed the high genetic diversity of *Campylobacter* isolates that can be found in broilers, demonstrating the genetic instability of *Campylobacter* within a crop and between crops from the same farm. This genetic

Study I

instability may be explained by the fact that *Campylobacter* and other small-genome bacteria are in constant need of genetic rearrangements in order to increment their potential and adapt to the environment (Manning et al., 2001; Wassenaar, 2000). Also, the high diversity of genotypes might be due to the existence of different sources of *Campylobacter* in the external environment of the farms that during the rearing cycles end up colonizing broiler flocks (Kaakoush et al., 2015).

While PFGE is widely used for food-borne pathogen typing in short epidemiological studies (rapid detection of outbreaks) (Swaminathan et al., 2001), MLST has been valuable for the identification of the main sources of human disease and it is an important tool in both short and long-term epidemiological studies (Dingle et al., 2002, 2008).

Genotyping of the isolates has demonstrated that *C. jejuni* and *C. coli* are genetically diverse, regardless of the method used for typing. We have detected a broader genetic diversity by PFGE (92 macrorestriction profiles compared to 46 STs among the 127 isolates typed with MLST). Also, some isolates showing identical PFGE profile presented different STs and CCs by MLST. These apparently differences between typing methods might be attributed to the fact that the *Campylobacter* genome presents a genetic instability that negatively affects the PFGE profiles (Hänninen et al., 1999; Wassenaar et al., 1998). In highly clonal lineages of *C. jejuni*, PFGE may not be sufficiently discriminatory for epidemiologic investigations (Taboada et al., 2013). In addition, it appears that integration of mobile genetic elements such as bacteriophage can alter PFGE profiles, even in closely related strains (Barton et al., 2007). Additionally, *Campylobacter* has a weakly clonal population due to extensive horizontal gene transfer and intra-molecular recombination (Dingle et al., 2005, 2001b).

The reduced number of analysed isolates per sampling in each crop may have limited our ability to assess the succession of genotypes in the different crops. These isolates come from a longitudinal study where the sampling ended when the

30 cloacal swabs from 30 different birds were positive but only 5 isolates per bird age were preserved for further studies. Despite of this, we could observe a high genetic diversity in *C. jejuni* and *C. coli* isolates. Persistent genotypes were detected as well in different age groups within the same crop in the same farm.

We did not identify in any farm the same persistent genotype in consecutive crops. This points to efficient cleaning and disinfection practices in all farms during downtime. However, we have identified four genotypes common to different farms during the same sampling period, but no common source of *Campylobacter* could be identified; it should be taken into account that the five farms belonged to different “integrators” and that there is no relation between them. Distances between those farms were 15 to 20 km and it seems unlikely a direct transmission between farms.

MLST analysis showed four predominant CC (CC21, CC257, CC206 for *C. jejuni*; CC828 for *C. coli*), all of them associated both with human infections and with poultry, other farm animals and water sources (Colles et al., 2003; Dingle et al., 2001a). CC61 is predominantly found in bovine and ovine (Colles et al., 2003; Dingle et al., 2001a) and only found in farm B, this finding might be related to the fact that this farm had in its proximity a bovine farm.

On the other hand, the CC828 has been mainly found in isolates from pigs (Manning et al., 2003), since this CC is from *C. coli* and swine is the main animal host for this *Campylobacter* species. However, other authors have reported isolates within the CC828 that originated from humans or bovine from different parts of the world (Dingle et al., 2005, Miller et al., 2006). Also, despite this CC has been associated primarily to *C. coli* isolates, it has been reported once in *C. jejuni* isolates from turkeys (Kashoma et al., 2014). In this study, all isolates from CC828 were exclusively *C. coli* and mostly from farm B. This farm had low level of biosecurity and the farmers also managed a second farm which had both broiler houses and swine houses. The CC206 has been found on a variety of hosts; in human infections, it has been associated with sporadic cases of Guillain-Barré

Study I

syndrome, as reported in the Pubmlst database (www.pubmlst.org/campylobacter).

Curiously, within the CC21, ST47 that was isolated in one of the farms has been associated mostly with beach sand (www.pubmlst.org/campylobacter). It is noteworthy that the farm where this ST was detected is located in the Ebro Delta, nearby sand beaches, although it is not possible to establish any direct relation between the isolation of ST47 in that farm and its geographical location. It is worth noting that ST45, the central ST of CC45, which has a worldwide distribution and is frequently found in isolates from broilers, was found only once. In a broad study performed in Spanish broilers, a low frequency for this ST was observed (our group unpublished data). According to data from the Pubmlst, this ST is broadly distributed in northern Europe and other countries, such as USA, Canada and Australia.

Furthermore, we have observed certain seasonal behaviour of some CC during the two-year study. CC21 and CC206 were found throughout the year, increasing in frequency during the warmer months and being absent during the coldest trimester (December-February). On the other hand, CC48 was much less frequent, and was only observed during the warmer months (June-July). The detection of novel STs in farms occurred sporadically and it coincided mainly with the warmest months of the year (June-October). These findings are opposite to those reported by Colles et al. (2015), where new STs were detected during the winter-spring months. Sproston et al. (2011), suggests that the population dynamics of *Campylobacter* colonization is not dependent on meteorological variables, and instead it might be linked to other environmental factors related to the source of infection.

In conclusion, PFGE and MLST have demonstrated their usefulness in order to study the population dynamics of *Campylobacter* strains in Spanish broiler farms, providing insight into the variety of genotypes that are currently circulating. Also, MLST remains highly discriminatory and more portable and reproducible than

PFGE. However, high-throughput sequencing is revolutionizing research in the field of microbiology, among others. With the drop of costs of bacterial genome sequencing, this technology will become a rapid and cost-effective tool in molecular epidemiology studies replacing typing methods such as PFGE and MLST used here.

Study II

Antimicrobial resistance and virulence factors of *C. jejuni* and *C. coli* isolated from broilers along a two-year period

ABSTRACT

With the aim to investigate the occurrence and patterns of antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from broilers during a broad period, we studied those isolates recovered during a two-year longitudinal study in five broiler farms. Farms belonged to different poultry integrators. Overall, 344 *Campylobacter* isolates (*C. jejuni* n = 261; *C. coli* n = 83) were tested using the disk-diffusion method. Resistance to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) was the most prevalent, followed by tetracyclines (tetracycline and doxycycline), whereas the resistance rates to erythromycin and gentamicin were low. Only five isolates of *C. jejuni* and one *C. coli* isolate from different farms were pansusceptible. Besides, all the analyzed isolates were susceptible to chloramphenicol, amoxicillin plus clavulanic acid, imipenem and meropenem. No isolate was resistant to all of the antimicrobials tested, but 62,2% of the isolates were multidrug-resistant (MDR) with some isolates resistant to up to five different classes of antimicrobials. However, resistance to three classes of antimicrobials with the profile nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, tetracycline, doxycycline, ampicillin was the most common (13,6%). A different trend of drug resistance between *C. jejuni* and *C. coli* was observed along the two-year follow up, with an important increase of resistant isolates observed for tetracycline and doxycycline in *C. jejuni* and for enrofloxacin in *C. coli*. On the contrary, a great drop in erythromycin resistance occurred in *C. coli* isolates. On the other hand, we analyzed the occurrence of 14 virulence genes involved in colonization and infection (*flaA*, *flaB*, *cadF*, *dnaJ*, *pilA*, *virB11*, *racR*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *ciaB*, *ceuE*, *hcp*) and all of them were widely distributed in all farms. Interestingly, we detected the *wlaN* gene, involved in the Guillain-Barré syndrome, in 19% of *C. jejuni* and *C. coli* isolates. Also, the *hcp* gene that encodes a putative type 6 secretion system (T6SS) was detected both in *C. jejuni* and *C. coli* isolates, with an overall prevalence of 18,2%. MDR, fluoroquinolone, tetracycline and macrolide resistance in *Campylobacter*

Study II

populations are of public health concern, as well as the carriage of certain virulence genes, such as *wlaN*.

INTRODUCTION

Campylobacteriosis is the leading cause of food-borne disease in the European Union (EU) with an steady increase of confirmed cases in the last years (EFSA, 2016). The main source of infection to humans is the handling and/or consumption of poorly cooked chicken meat (Friedman et al., 2004). During 2015, the notification rate of campylobacteriosis in Spain was 63,3 for every 100.000 inhabitants, with a total of 13.227 confirmed cases, which represents an increase of 15,3% with respect to the previous year (EFSA, 2016). However, due to under-reporting, this figure underestimates the true impact of the disease.

The great majority of infections in humans are caused by *Campylobacter jejuni*, followed by *Campylobacter coli* with most infections being sporadic and self-limiting (Butzler, 2004). Due to this self-limiting nature of campylobacteriosis, antimicrobials are only recommended for treatment when there is a prolonged or systemic infection. Antimicrobials of preference are fluoroquinolones (ciprofloxacin) and macrolides (erythromycin), followed by tetracyclines as an alternative drug (Butzler, 2004; Iovine, 2013; Yates, 2005).

The alarming increase of antimicrobial drug resistance in human and veterinary medicine is of concern, as it compromises the effectiveness of treatment. Since the EU banned in 2006 the use of antimicrobials in feed as growth promoters, only certain compounds are allowed for the treatment of animal diseases. In poultry production, the uses of chloramphenicol, olaquindex (second generation quinolones) and third and fourth generation of cephalosporin are prohibited.

Considering the main cause of human campylobacteriosis, it is relevant the assessment of the antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from poultry.

Several studies have reported the antimicrobial resistance rates of avian *Campylobacter* spp. isolates in different countries and a diversity of resistance rates among countries is frequently found (Skaup et al., 2016). Widespread *Campylobacter* resistance to quinolones has been reported in poultry isolates (Duarte et al., 2014; Messad et al., 2014; Nobile et al., 2013; Wimalarathna et al., 2013). Also, multidrug resistant *C. jejuni* and *C. coli* have been reported in isolates from consumption animals, particularly poultry and pigs (Datta et al., 2003; Thakur et al., 2006; Thakur and Gebreyes, 2005; Zhao et al., 2001). Some studies in Spain have reported *C. jejuni* and *C. coli* resistance rates in poultry, although a limited number of isolates were tested (Melero et al., 2012; Oporto et al., 2009; Sáenz et al., 2000). In most of them, high resistance rates to fluoroquinolones and tetracyclines were found.

On the other hand, the severity of *Campylobacter* spp. infections depends mainly on the virulence of the strain and the immunological state of the host. In spite of *Campylobacter* importance as a pathogen transmitted by food, exact mechanisms through which infection is produced are still unknown. In fact, the specific virulence factors are still not clear for this bacterium, probably due to the lack of similarity between *Campylobacter* spp. and other enteric pathogens (Dasti et al., 2010; Guerry, 2007). Several virulence factors involved in motility (*flaA* and *flaB*), intestinal adhesion (*cadF*, *dnaJ*, *pdlA*, *virB11* and *racR*), toxin production (*cdtA*, *cdtB* and *cdtC*), invasion (*ciaB* and *ceuE*), or the gene involved in the Guillain-Barré syndrome (*wlaN*), among others, have been identified.

The aim of this study was to monitor the resistance to a panel of 12 antimicrobials and to assess the virulence-associated genes of *Campylobacter* strains isolated from broilers along the rearing cycles of those flocks raised during two years in five farms in Spain.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

Three hundred and forty four *Campylobacter* isolates (*C. jejuni* n = 261, *C. coli* n = 83) from broilers from five farms from different poultry integrators were tested for their susceptibility to a panel of antimicrobials. Determination of virulence-associated genes was performed on a selection of 126 isolates (93 of *C. jejuni* and 33 of *C. coli*) according to their different genotype (according to study I). Those isolates were obtained from a two-year longitudinal study carried out in five broiler farms (Urdaneta, 2016). All farms were located in Catalonia region (Northeastern Spain). Six to seven flocks per farm were raised each year, and weekly visits were performed (each 2 to 5 days). From each *Campylobacter*-positive sampling per crop, five isolates from five different birds randomly selected among up to 30 *Campylobacter* positive birds per sampling, were speciated and preserved at -80°C in brain heart infusion broth with 20% glycerol. Fresh cultures of the isolates were prepared on Columbia blood agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Plates were incubated at 37°C for 48 h under microaerobic conditions using a microaerobic atmosphere generator (Anaerocult® C, Merck, Darmstadt, Germany).

Determination of antimicrobial resistance

Antimicrobial susceptibility testing was performed according to the Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI) disk diffusion method (M100-S18; CLSI, 2008) using Neo-Sensitabs™ (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark) with CLSI potencies according to the manufacturer's instructions. Mueller-Hinton II agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) was streaked to form a bacterial lawn of *Campylobacter* and incubated with antimicrobial discs at 37°C for 48 h under microaerobic conditions. *C. jejuni* ATCC35560 reference strain was used as a quality control. All *Campylobacter*

isolates were tested for susceptibility against 12 antimicrobial agents which included four β -lactams: ampicillin (AMP; 10 μ g), amoxicillin + clavulanate (AMC; 20+10 μ g), imipenem (IMI; 10 μ g), meropenem (MER; 10 μ g); three quinolones: nalidixic acid (NAL; 30 μ g), ciprofloxacin (CIP; 5 μ g), enrofloxacin (ENR; 10 μ g); two tetracyclines: tetracycline (TET; 30 μ g) and doxycycline (DOX; 30 μ g); and three other miscellaneous antimicrobials: gentamicin (GEN; 10 μ g); erythromycin (ERY; 15 μ g), and chloramphenicol (CHL; 30 μ g). The diameter of the bacterial growth inhibition was measured and designated as resistant, intermediate, or susceptible on the basis of Clinical Laboratory Standards (Neo-sensitabs Potency according to CLSI 2013). An isolate was considered as multidrug resistant (MDR) when it was resistant to three or more classes of antimicrobials (Schwarz et al., 2010).

Detection of virulence-associated genes

The presence of 14 different virulence genes involved in motility (*flaA*, *flaB*), adhesion (*cadF*, *dnaJ*, *pdlA* and *racR*), invasion (*ciaB* and *ceuE*), cytotoxicity (*cdtA*, *cdtB*, *virB11* and *cdtC*), the gene involved in the Guillain-Barré syndrome (*wlaN*) and type 6 secretion system (T6SS - *hcp*) were determined by PCR. Details of the studied genes, primers used, size of the amplicon and temperature of annealing are presented in Table 1. All the PCR amplifications were performed using the protocol standardized by (Koolman et al., 2015), with some modifications in the annealing temperature detailed in Table 1.

Statistical analysis of results

The prevalence of each antimicrobial resistance between *Campylobacter* species was compared using Chi-squared test analyses. Statistical significance was defined at the $p \leq 0.05$.

Study II

Table 1. PCR primers used for virulence gene detection.

Gene	Primer	Sequence 5'- 3'	Amplicon size (bp)	Annealing temperature	Reference
<i>flaA</i>	flaA 664	AATAAAAATGCTGATAAAAACAGGTG	855	55°C	Datta et al., 2003
	flaA 1494	TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT			
<i>flaB</i>	flaB-F	AAGGATTTAAAATGGGTTTTAGAATAAACACC	260	55°C	Goon et al., 2003
	flaB-R	GCTCATCCATAGCTTTATCTGC			
<i>cadF</i>	cadF-F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	400	55°C	Datta et al., 2003
	cadF-R1B	CTAATACCTAAAAGTTGAAAC			
<i>dnaj</i>	dnaj-299	AAGGCTTTGGCTCATC	720	40°C	Datta et al., 2003
	dnaj-1003	CTTTTTGTTTCATCGTT			
<i>racR</i>	racR-25	GATGATCCTGACTTTG	584	40°C	Datta et al., 2003
	racR-593	TCTCCTATTTTTACCC			
<i>virB11</i>	virB-232	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	494	45°C	Datta et al., 2003
	virB-701	CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC			
<i>pldA</i>	pldA-84	AAGCTTAGCGGTTTTT	913	45°C	Datta et al., 2003
	Pld-981	TATAAGGCTTTCTCCA			
<i>ceuE (Cj)</i>	JEJ1	CCTGCTCGGTGAAAGTTTTG	794	50°C	Bang et al., 2003
	JEJ2	GATCTTTTTGTTTTGTGCTGC			
<i>ceuE (Cc)</i>	COL1	ATGAAAAAATATTTAGTTTTTTGCA	894	55°C	Bang et al., 2003
	COL2	ATTTTATTATTTGTAGCAGCG			
<i>ciaB</i>	ciaB-403	TTTTTATCAGTCCTTA	986	45°C	Datta et al., 2003
	ciaB-1373	TTTCGGTATCATTAGC			
<i>cdtA</i>	DS-18	CCTTGATGTGCAAGCAATC	370	55°C	Hickey et al., 2000
	DS-15	ACACTCCATTTGCTTTCTG			
<i>cdtB</i>	cdtB-113	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	620	55°C	Datta et al., 2003
	cdtB-713	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT			
<i>cdtC</i>	cdtC-351	CGATGAGTTAAAAACAAAAGATA	182	55°C	Datta et al., 2003
	cdtC-351	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT			
<i>wlaN</i>	wlaN-DL-39	TTAAGAGCAAAGATATGAAGGTG	672	45°C	Linton et al., 2003
	wlaN-DL-41	CCATTTGAATTTGATATTTTTG			
<i>hcp</i>	hcp-F	CAAGCGGTGCATCTACTGAA	463	56°C	Corcionivoschi et al., 2015
	hcp-R	TAAGCTTTGCCCTCTCTCCA			

RESULTS

Antimicrobial resistance

Overall, 344 isolates (*C. jejuni*=261 and *C. coli*=83) from five different broiler farms were evaluated for their antimicrobial susceptibilities to 12 antimicrobials. Resistance against the quinolones NAL and CIP, was the most prevalent, with over 90% of the isolates being resistant, followed by resistance to tetracyclines (72,9% TET and 61,3% DOX) and AMP (61,3%) (Table 2). On the other hand, resistance to ERY (18,6%) and GEN (9,3%) were the less prevalent. All the analysed isolates were susceptible to CHL, AMC, IMI and MER. Certain differences in drug resistance rates were detected among farms, such as lower resistance to ENR in farms C and D, whilst higher rate of resistance was found in farm E; lower frequency of TET

resistance in farm E compared to the other farms; or for ERY and GEN in farm C and E, where no resistant isolates or with a very low proportion were detected (Table 2). When comparing among *Campylobacter* species, some differences were also found. A higher rate of resistance to TET, ERY and GEN was found in *C. coli* compared to *C. jejuni* (Table 3). On the contrary, AMP resistance was higher in *C. jejuni* isolates in three farms (B, C, and E). Also, whilst ENR resistance was moderately low in most farms, it was considerably higher in *C. coli* in farm B and in *C. jejuni* in farm E.

Only six isolates were pansusceptible, out of which five were *C. jejuni* isolates from the same crop from farm C and one *C. coli* isolate from farm B (Table 4). On the contrary, 62,20% of the isolates were MDR (55,1% *C. jejuni* and 84,3% *C. coli*). No isolates were resistant to all of the antimicrobials tested. The MDR resistance profile “NAL, CIP, TET, DOX” was identified at least once in all the farms (5,8%). No MDR profile common to all farms was found. However, “NAL, CIP, ENR, TET, DOX, AMP” profile was the most common (13,9%) in four farms. In farms A and B, MDR against up to five different families of antibiotics was detected all in *C. coli* isolates (Table 4).

Table 2. Frequency of resistance of *Campylobacter* spp. isolates per farm.

Antimicrobials	Farm A (n=55)	Farm B (n=76)	Farm C (n=73)	Farm D (n=55)	Farm E (n=85)	Total (%) (n=344)
Nalidíxic acid 30 µg	55 (100) ^a	75 (98,6)	58 (79,4)	55 (100)	80 (94,1)	323 (93,8)
Ciprofloxacin 5 µg	46 (83,6)	69 (90,7)	58 (79,4)	55 (100)	79 (92,9)	307 (89,2)
Enrofloxacin 10 µg	18 (32,7)	35 (46)	13 (17,8)	9 (16,3)	54 (63,5)	129 (37,5)
Tetracycline 30 µg	45 (81,8)	63 (82,8)	68 (93,1)	45 (81,8)	30 (35,2)	251 (72,9)
Doxycycline 30 µg	32 (58,1)	48 (63,1)	46 (63)	23 (41,8)	62 (72,9)	211 (61,3)
Erytromycin 15 µg	27 (49,1)	25 (32,8)	0 (0,00)	7 (12,7)	5 (5,8)	64 (18,6)
Gentamicin 10 µg	16 (29)	7 (9,2)	0 (0,00)	7 (12,7)	2 (2,3)	32 (9,3)
Ampicillin 10 µg	28 (50,9)	56 (73,6)	33 (45,2)	34 (61,8)	60 (70,5)	211 (61,3)

a) Number of antimicrobial resistant isolates (%).

b) All isolates were susceptible to: chloramphenicol 30µg; amoxicillin + clavulanate (20+10µg), imipenem 10 µg. and meropenem 10 µg.

Table 3. Frequency of antimicrobial resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolates per farm.

Antimicrobials	Farm A		Farm B		Farm C		Farm D		Farm E		Total		Total (%) (n=344)
	<i>C. jejuni</i> (n=31)	<i>C. coli</i> (n=24)	<i>C. jejuni</i> (n=55)	<i>C. coli</i> (n=21)	<i>C. jejuni</i> (n=53)	<i>C. coli</i> (n=20)	<i>C. jejuni</i> (n=49)	<i>C. coli</i> (n=6)	<i>C. jejuni</i> (n=73)	<i>C. coli</i> (n=12)	<i>C. jejuni</i> (n=261)	<i>C. coli</i> (n=83)	
Nalidixic acid 30 µg	31 (100) ^a	24 (100)	55 (100)	20 (95,2)	38 (71,7)	20 (100)	49 (100)	6 (100)	68 (93,2)	12 (100)	241 (92,3)	82 (98,7)	323 (93,8)
Ciprofloxacin 5 µg	22 (71)	24 (100)	51(92,7)	18 (85,7)	38 (71,7)	20 (100)	49 (100)	6 (100)	67 (91,8)	12 (100)	227 (86,9)	80 (96,3)	307 (89,2)
Enrofloxacin 10 µg	11 (35,4)	7 (29,2)	20 (36,4)	15 (71,4)	12 (22,6)	1 (5)	8 (16,3)	1 (16,7)	45 (61,6)	9 (75)	96 (36,7)	33 (39,7)	129 (37,5)
Tetracycline 30 µg	22 (71)	23 (95,8)	43 (78,2)	20 (95,2)	48 (90,6)	20 (100)	39 (79,6)	6 (100)	18 (24,7)	12 (100)	170 (65,1)	81 (97,5)	251 (72,9)
Doxycycline 30 µg	9 (29)	23 (95,8)	31 (56,4)	17 (81)	29 (54,8)	17 (85)	17 (34,7)	6 (100)	50 (68,5)	12 (100)	136 (52,1)	75 (90,3)	211 (61,3)
Erytromycin 15 µg	4 (12,9)	23 (95,8)	5 (9,1)	20 (95,2)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2)	6 (100)	5 (6,8)	0 (0,00)	15 (5,74)	49 (59,0)	64 (18,6)
Gentamicin 10 µg	0 (0,00)	16 (66,6)	0 (0,00)	7 (33,3)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2)	6 (100)	2 (2,7)	0 (0,00)	3 (1,14)	29 (34,9)	32 (9,3)
Ampicillin 10 µg	13 (42)	15 (62,5)	40 (72,8)	16 (46,2)	33 (62,3)	0 (0)	33 (67,3)	1 (83,3)	59 (80,8)	1 (8,3)	178 (68,1)	33 (39,7)	211 (61,3)

a) Number of antimicrobial resistant isolates (%).

b) All isolates susceptible to: chloramphenicol 30 µg; amoxicillin + clavulanate (20+10 µg); imipenem 10 µg. and meropenem 10 µg.

Study II

A different trend of resistance to different antimicrobials was observed in *C. jejuni* and *C. coli* along the two-year follow up (Figure 1, 2 and 3). Whilst resistances to certain antimicrobials remained stable throughout the two-year follow up, such as those to nalidixic acid and ciprofloxacin, others varied greatly. This was the case for enrofloxacin in *C. coli* isolates, or for tetracycline and doxycycline in *C. jejuni* isolates, where an important increase of resistant isolates was observed. On the contrary, a great drop in erythromycin resistance occurred in *C. coli* isolates. These differences between *C. jejuni* and *C. coli* highlight the importance of monitoring. These differences between *C. jejuni* and *C. coli* and in the temporal trend of antimicrobial resistance highlight the importance of resistance monitoring and to differentiate between *Campylobacter* species to have an accurate picture to have and actual scenario.

Virulence determinants

The 14 virulence-associated genes tested were in general widely distributed in all farms, although three of them with low frequency (*dnaJ*, *wlaN*, *hcp*) (Table 5). The genes implicated in motility (flagellin genes *flaA* and *flaB*) were evidenced more frequently in *C. coli* isolates. Conversely, the genes associated with adhesion (*cadF*, *dnaJ*, *racR*, *VirB11* and *pdlA*), showed a heterogeneous distribution between the two *Campylobacter* species, although it was observed more frequently in *C. jejuni*. The genes implicated in invasion were more frequent in *C. jejuni* isolates in most of the farms. On the other hand, the *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* toxin genes were detected in all the studied farms, but more frequently in *C. jejuni* isolates. The *wlaN* gene, associated with Guillain-Barré syndrome, was detected in all farms, mostly in *C. jejuni* isolates but it was also detected in 4 *C. coli* isolates from two farms. Finally, the recently described type 6 secretion system (T6SS) was detected in all but one farm.

Table 4. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* isolates according to farm origin.

Antimicrobial resistance profile ^a	Antimicrobial class ^b	Farm A		Farm B		Farm C		Farm D		Farm E		Total	
		<i>C. jejuni</i> (n=31)	<i>C. coli</i> (n=24)	<i>C. jejuni</i> (n=55)	<i>C. coli</i> (n=21)	<i>C. jejuni</i> (n=53)	<i>C. coli</i> (n=20)	<i>C. jejuni</i> (n=49)	<i>C. coli</i> (n=6)	<i>C. jejuni</i> (n=73)	<i>C. coli</i> (n=12)	<i>C. jejuni</i> (n=261)	<i>C. coli</i> (n=83)
TET	1	0	0	0	0	10	0	4	0	1	0	15	0
NAL, CIP	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0
NAL, TET	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
NAL, AMP	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NAL, CIP, ENR	1	1	0	8	0	0	0	1	0	1	0	11	0
NAL, CIP, TET	2	4	0	1	0	0	0	9	0	0	0	14	0
NAL, CIP, AMP	2	1	0	2	0	0	0	5	0	7	0	15	0
NAL, TET, AMP	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NAL, TET, ERY	3	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	2
NAL, TET, DOX	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TET, DOX, AMP	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0
NAL, CIP, ENR, TET	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NAL, CIP, ENR, AMP	2	5	1	0	0	0	0	0	0	6	0	11	1
NAL, CIP, ENR, DOX	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
NAL, CIP, TET, AMP	3	0	0	8	0	2	0	11	0	4	0	25	0
NAL, CIP, TET, DOX	2	4	0	5	0	1	0	1	0	6	3	17	3
NAL, CIP, TET, ERY	3	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	4
NAL, TET, DOX, AMP	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0
NAL, CIP, ENR, TET, AMP	3	0	0	0	0	8	0	1	0	1	0	10	0
NAL, CIP, ENR, TET, DOX	2	0	0	0	0	3	0	0	0	2	8	5	8
NAL, CIP, ENR, DOX, ERY	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
NAL, CIP, ENR, GEN, AMP	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
NAL, CIP, TET, DOX, ERY	3	0	0	7	0	0	16	0	0	0	0	7	16
NAL, CIP, TET, DOX, AMP	3	0	0	5	0	23	0	11	0	4	0	43	0
NAL, TET, DOX, ERY, AMP	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0

Table 4. Continued

Antimicrobial resistance profile ^a	Antimicrobial class ^b	Farm A		Farm B		Farm C		Farm D		Farm E		Total	
		<i>C. jejuni</i> (n=31)	<i>C. coli</i> (n=24)	<i>C. jejuni</i> (n=55)	<i>C. coli</i> (n=21)	<i>C. jejuni</i> (n=53)	<i>C. coli</i> (n=20)	<i>C. jejuni</i> (n=49)	<i>C. coli</i> (n=6)	<i>C. jejuni</i> (n=73)	<i>C. coli</i> (n=12)	<i>C. jejuni</i> (n=261)	<i>C. coli</i> (n=83)
NAL, CIP, ENR, TET, DOX, ERY	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
NAL, CIP, ENR, DOX, ERY, GEN	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
NAL, CIP, ENR, TET, DOX, AMP	3	0	0	11	0	1	0	5	0	30	1	47	1
NAL, CIP, TET, DOX, ERY, GEN	4	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
NAL, CIP, TET, DOX, ERY, AMP	4	0	3	2	2	0	0	0	1	0	0	2	6
NAL, CIP, ENR, TET, DOX, ERY, GEN	4	0	1	0	6	0	0	1	5	0	0	1	12
NAL, CIP, ENR, TET, DOX, ERY, AMP	4	4	4	0	3	0	0	0	0	0	0	4	7
NAL, CIP, TET, DOX, ERY, GEN, AMP	5	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
NAL, CIP, ENR, TET, DOX, ERY, GEN, AMP	5	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	7
Pan-susceptible		0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	1

a) NAL: nalidixic acid (30 µg), CIP: ciprofloxacin (5 µg), ENR: enrofloxacin (10 µg), TET: tetracycline (30 µg), DOX: doxycycline (30 µg), ERY: erythromycin (15 µg), GEN: gentamicin (10 µg), AMP: ampicillin (10 µg).

b) Number of different antimicrobial classes per resistance profile; resistance to ≥ 3 antimicrobial classes is a multiresistant phenotype.

Table 5. Prevalence of virulence genes among *C. jejuni* and *C. coli* isolates.

Gene	Farm A		Farm B		Farm C		Farm D		Farm E		Total		Total (n=126)
	<i>C. jejuni</i> (n=12)	<i>C. coli</i> (n=7)	<i>C. jejuni</i> (n=20)	<i>C. coli</i> (n=13)	<i>C. jejuni</i> (n=17)	<i>C. coli</i> (n=5)	<i>C. jejuni</i> (n=15)	<i>C. coli</i> (n=3)	<i>C. jejuni</i> (n=29)	<i>C. coli</i> (n=5)	<i>C. jejuni</i> (n=93)	<i>C. coli</i> (n=33)	
Motility													
<i>flaA</i>	8 (66,6) ^a	5 (71,4)	9 (45)	12 (92,3)	11 (64,7)	5 (100)	7 (46,6)	2 (66,6)	19 (65,5)	5 (100)	54 (58)	29 (88)	83 (65,8)
<i>flaB</i>	11 (91,6)	7 (100)	17 (85)	13 (100)	14 (82,3)	5 (100)	13 (86,6)	3 (100)	25 (86,2)	5 (100)	80 (86)	33 (100)	113 (89,6)
Adhesion													
<i>cadF</i>	7 (58,3)	3 (42,8)	13 (65)	2 (15,3)	12 (70,5)	3 (60)	5 (33,3)	1 (33,3)	17 (58,6)	1 (20)	54 (58)	10 (30)	64 (50,8)
<i>dnaJ</i>	1 (8,3)	1 (14,2)	7 (35)	0 (0)	2 (11,7)	2 (40)	2 (13,3)	0 (0)	4 (13,7)	1 (20)	16 (17)	4 (12)	20 (15,8)
<i>racR</i>	6 (50)	1 (14,2)	12 (60)	0 (0)	4 (23,5)	2 (40)	2 (13,3)	0 (0)	8 (27,5)	1 (20)	31 (33)	4 (12)	35 (27,7)
<i>virB11</i>	6 (50)	0 (0)	12 (60)	1 (7,6)	7 (41,1)	4 (80)	1 (6,6)	2 (66,6)	5 (17,2)	2 (40)	31 (33)	9 (27)	40 (31,7)
<i>pdlA</i>	11 (91,6)	5 (71,4)	15 (75)	5 (38,4)	12 (70,5)	3 (60)	4 (26,6)	0 (0)	18 (62)	2 (40)	60 (65)	15 (45)	75 (59,5)
Invasion													
<i>ceuE</i>	7 (58,3)	1 (14,2)	10 (50)	2 (15,3)	9 (52,9)	2 (40)	5 (33,3)	0 (0)	21 (72,4)	1 (20)	52 (56)	6 (18)	58 (46)
<i>ciaB</i>	11 (91,6)	4 (57,1)	16 (80)	8 (61,5)	6 (35,2)	2 (40)	2 (13,3)	0 (0)	10 (34,4)	1 (20)	45 (48)	15 (45)	60 (47,6)
Toxin production													
<i>cdtA</i>	8 (66,6)	3 (42,8)	18 (90)	1 (7,6)	12 (70,5)	3 (60)	14 (93,3)	3 (100)	25 (86,2)	1 (20)	77 (83)	11 (33)	88 (69,8)
<i>cdtB</i>	9 (75)	3 (42,8)	17 (85)	5 (38,5)	13 (76,4)	3 (60)	11 (73,3)	3 (100)	23 (79,3)	1 (20)	73 (78)	15 (45)	88 (69,8)
<i>cdtC</i>	12 (100)	4 (57,1)	19 (95)	5 (38,5)	13 (76,4)	4 (80)	14 (93,3)	3 (100)	27 (93,1)	1 (20)	85 (91)	17 (52)	102 (80,9)
GBS													
<i>wlaN</i>	7 (58,3)	1 (14,2)	8 (40)	3 (23)	2 (11,7)	0 (0)	1 (6,6)	0 (0)	3 (10,3)	0 (0)	21 (23)	4 (12)	25 (19,8)
T6SS													
<i>hcp</i>	1 (8,3)	2 (28,5)	3 (15)	2 (15,3)	4 (23,5)	4 (80)	0 (0)	0 (0)	6 (20,6)	1 (20)	14 (15)	9 (27)	23 (18,2)

a) Number of isolates positive (%).

DISCUSSION

With the aim to determine the presence and pattern of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolates on farm, and to study their pathogenic potential, the isolates recovered along a long term monitoring in five poultry farms in Catalonia (north-eastern Spain) were analyzed. *Campylobacter* infections caused by resistant strains may cause treatment failure and since poultry handling or consumption is the main risk factor of acquiring campylobacteriosis, assessment of the resistance of *Campylobacter* in poultry farms is of relevance.

The disc diffusion method has been described in several studies as an adequate screening method to assess antimicrobial resistance for a large number of isolates (Lehtopolku et al., 2010), and was the method of choice in this study. Also, it is accepted by the CLSI and other organizations (i.e., EUCAST) for the discrimination between resistant and susceptible strains

A high resistance to quinolones (NAL and CIP), tetracyclines and ampicillin was found throughout the study period. This is of concern, since quinolones are used as the first choice to treat serious human *Campylobacter* infections, whereas tetracyclines are used as an alternative therapy (Butzler, 2004; Moore et al., 2006).

Our findings of high quinolone resistance are in line with studies performed in Spain and other EU countries, that have demonstrated that poultry isolates present a high resistance against this class of antimicrobials (Luber et al., 2003; Melero et al., 2012; Pérez-Boto et al., 2013a). Among the different quinolones tested, the lowest resistance rate was detected for ENR. This is surprising given that this antimicrobial was frequently administered in all of the studied farms when required. Higher rate of quinolone resistance was found among *C. coli* isolates, similarly to what has commonly been reported for poultry isolates (Desmonts et al., 2004). Nonetheless, opposite findings have been recently reported from isolates from avian origin in Spain (Pérez-Boto et al., 2013a). The

use of quinolones, mainly ENR, in veterinary praxis, has been related with the increase of resistance to CIP in *Campylobacter* strains from EU countries (Pidcock, 1995), including Spain (Velázquez et al., 1995). However, it has been shown that in the absence of antibiotic selection pressure, fluoroquinolone resistance did not decrease. This may be explained by the fact that fluoroquinolone resistance seems to provide certain advantage in the colonization of birds without loss of their biological fitness (Luo et al., 2005).

Resistance to tetracyclines (TET and DOX) was the second most frequent, with an overall resistance rate to TET (72,9%) higher than what has been reported in avian isolates in Spain (Pérez-Boto et al., 2013a). However, the extremely high proportion of TET resistance in *C. coli* isolates (97,5%) was similar to that reported previously in poultry in Spain (Duarte et al., 2016; Melero et al., 2012; Pérez-Boto et al., 2013a). A high proportion of resistant isolates from farm A were detected, despite that this was the only farm where this antimicrobial had not been used during the two-year follow up. The high percentage of resistance against tetracyclines in *C. coli* isolates has been linked with the regular use of these antibiotics in porcine husbandry (Payot et al., 2004). Swine is the main host for *C. coli*, but it also appears frequently in poultry (Horrocks et al., 2009).

Among β -lactams tested, resistance was only observed against AMP (61,3%), with a higher resistance in *C. jejuni* compared to *C. coli*. These results are higher than the 55% reported by Sáenz et al. (2000), in broilers in Spain. Remarkably, β -lactams (especially ampicillin and amoxicillin) were frequently used in all five study farms. It should be noted that the European Food Safety Authority (EFSA) considers the surveillance of β -lactams as a low priority (EFSA, 2008), since they are not used in human campylobacteriosis treatment.

Macrolides are considered as the treatment of choice for severe cases of campylobacteriosis and resistance rates are generally low among avian isolates (0,3% - 20%) (Gyles, 2008). In this study, resistance against these antimicrobials

Study II

was 18,6% of all the studied isolates, and was more frequent in *C. coli* than in *C. jejuni* isolates. This rate is higher than that described by others in avian isolates from Spain (2,3%) (Pérez-Boto et al., 2014b) or in other European countries (UK, 2%) (Gyles, 2008). As for tetracyclines, resistance against macrolides has been usually linked with *C. coli*, and it is believed that it is due to the use of macrolide derivatives (tylosin) as a growth promoter for pigs for many years (Gibreel and Taylor, 2006).

Overall, the lowest resistance was reported to GEN (9,3%) and it was more frequently found in *C. coli* isolates. Gentamycin used to be an effective agent in the treatment of *Campylobacter*-caused enteritis in humans (Aarestrup et al., 1997; Velázquez et al., 1995). Resistance against GEN in isolates from animals may be related to the use of apramycin (an aminoglycoside, structurally related to GEN) in veterinary therapy (Sáenz et al., 2000).

No antimicrobial resistance was found against AMC, IMI, MER and CHL. Additionally, in our study, 1,74% of the isolates were pan-susceptible, despite sharing the same environmental niche as the rest of the resistant isolates (Table 4). MDR was lower in *C. jejuni* (55,1%) than in *C. coli* (84,33%), according to what has been reported in other studies where avian isolates were analysed (D'Lima et al., 2007; Desmonts et al., 2004; Pérez-Boto et al., 2013). This high prevalence of MDR is worrisome and is notably higher than that reported in other studies of avian isolates using the same screening method (Pérez-Boto et al., 2013).

On the other hand, the present study provides information about 14 virulotypes in *C. jejuni* and *C. coli* isolates. It is known that, for colonization to take place in the intestine, it is required that the bacteria have the capacity to produce motility, adhesion, invasion and production of toxins (Bang et al., 2003). Among the flagellar genes, the *flab* was present in all *C. coli* isolates, while it was present in a high proportion of *C. jejuni* isolates, similarly to what has been previously described by Datta et al. (2003) and Müller et al. (2006). Flagellum-based motility

is a very important factor for *Campylobacter* colonization (Velayudhan et al., 2004) and it is essential to survive the intestinal peristalsis (Hendrixson and DiRita, 2004). Additionally, it is believed that the flagellum possesses the ability to secrete non-flagellar proteins that might be associated with virulence (Poly and Guerry, 2008).

The presence of genes involved in adhesion and invasion (*cadF*, *dnaJ*, *racR*, *virB11*, *pdlA*, *ceuE* and *ciaB*), presented a rather heterogeneous distribution among *C. jejuni* isolates and to a lesser degree in *C. coli* isolates. This data suggests that the adhesion and invasion genes are not very conserved between *Campylobacter* isolates, as previously reported by Datta (2003). The *hcp* gene encodes a putative T6SS, a mutation of which can cause a six fold reduction in adherence compared to the wild-type strain (Bacon et al., 2000).

Cytolethal distending toxin genes (*cdtABC*) had a high prevalence among isolates from different farms. However, we detected a lower prevalence of the *cdtA* gene and a higher prevalence for the *cdtC* gene. These data is similar to that reported by Koolman et al.(2015), while it differs from that reported by Bang et al. (2003). It is known that both *cdtA* and *cdtC* are necessary for the binding with the host cell, whereas the *cdtB* is the active residue that penetrates the cell in order to provoke cellular death (Dasti et al., 2010). Furthermore, the *wlaN* gene, responsible for the appearance of Guillain-Barré syndrome, was detected in 19% of the total analysed isolates, mostly in *C. jejuni*. This frequency similar to that previously reported by Koolman et al. (2015), but notably higher than what was reported by Datta et al. (2003).

Additionally, the T6SS has been recently reported in *Campylobacter*. This secretion system has been related with *C. jejuni* isolates and associated with severe forms of campilobacteriosis (Bleumink-Pluym et al., 2013). A significant component of the T6SS is the product of the *hcp* gene and its presence has been described as an indicative of a functional T6SS in *C. jejuni* (Bleumink-Pluym et al., 2013). It has

Study II

been reported that the incidence of the *hcp* gene is relatively higher in *C. jejuni* isolates from Asia, whereas in the United Kingdom, the proportion of poultry positive for T6SS is low (Harrison et al., 2014). However, in the present study we have found *C. jejuni* isolates positive for the *hcp* gene on four out of the five studied farms, in addition, we also detected *C. coli* isolates positive for the presence of *hcp* which coincides with the findings of Moran (2009), while differing from studies performed by Corcionivoschi (2015), where the higher incidence of the *hcp* gene was found on *C. coli* isolates and therefore those strains could potentially be more virulent.

In summary, our study provides new data on the antimicrobial resistance among *C. jejuni* and *C. coli*. Differences in the prevalence and patterns of resistances were found between the two species. The high prevalence of resistance against fluoroquinolones and tetracyclines, in broilers is of the highest concern, since they are the drugs of choice to treat human *Campylobacter* infections. Nevertheless, the percentage of resistance obtained are higher than studies previously performed in Spain years ago and are comparable with other EU countries. *C. coli* showed higher levels of MDR and *C. jejuni* a higher prevalence of virulence-associated genes, which could be associated to the fact that the majority of cases of human campylobacteriosis are caused by *C. jejuni*. Enhanced biosecurity measures on farm would improve the general sanitary status of the farms, and consequently, the need to use antimicrobials in animal therapeutics. In addition, the maintenance of a prudent use and correct dosage of antimicrobials in broiler production is required. All together would reduce the antimicrobial pressure that would limit the populations of resistant bacteria.

Study III

Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
broiler isolates by whole genome sequencing

ABSTRACT

Campylobacter has been the most commonly reported cause of bacterial diarrhoeal disease in humans in the EU since 2005 (EFSA, 2016). Most broiler batches at slaughter are colonized with *Campylobacter* and the major source of infection is contaminated poultry meat. The aim of this study was to characterize a selection of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from broilers through whole genome sequencing (WGS). A total of 16 isolates (*C. jejuni* = 12 and *C. coli* = 4) from five broiler farms from Catalonia (northeastern Spain) were analyzed. A phylogenetic analysis based on 8420 SNPs showed two main clusters grouping strains by species. Phenotypic resistances to quinolones (100%), tetracycline (81%), streptomycin (75%), erythromycin (56%) and gentamicin (13%) were found. All the isolates carried the C257T point mutation in the subunit A of the DNA gyrase gene (Thr86Ile) conferring resistance to quinolones, whilst all the isolates showing resistance to tetracycline carried the tet(O) gene. The genes *aph(3')-III* and *aadE* conferring resistance to aminoglycosides were identified in the two isolates (one *C. jejuni* and one *C. coli*) resistant to streptomycin and gentamicin. The point mutation A2075G on the 23S rDNA conferring high resistance to macrolides was detected in three *C. coli* isolates. The CmeABC multidrug efflux pump was also detected, both in *C. jejuni* and *C. coli* isolates. All *C. jejuni* and *C. coli* isolates were positive for most of the 34 virulence-associated genes studied related to motility, chemotaxis, adhesion and invasion. Interestingly, the *wlaN* gene involved in the Guillain-Barré syndrome, was found in two isolates. The results underline the power of WGS for investigation of virulence, clonality and antimicrobial resistance in *Campylobacter*.

INTRODUCTION

While cases of salmonellosis are steadily decreasing due to the effect of control programmes, the cases of campylobacteriosis are still increasing. Since 2005, *Campylobacter* has outnumbered *Salmonella* as the most commonly reported cause of bacterial diarrhoeal disease in humans in the EU (EFSA, 2014). The two species responsible for the vast majority of infections are *C. jejuni* and *C. coli* (Eberle and Kiess, 2012). In some cases, this infection can subsequently lead to serious neuromuscular disorders such as Guillain-Barré syndrome (Crushell et al., 2004). In the majority of the EU countries (Scandinavia is the exception), most of the broiler batches are colonized with *Campylobacter* at slaughter and the main source of campylobacteriosis in humans is chicken meat, which can account for up to 70% of cases (Boysen et al., 2013). The prevention of broiler flock colonization has therefore become a food safety priority in the EU.

Campylobacteriosis follows a seasonal trend, with a peak of cases during summer (EFSA, 2014). However, the majority of *Campylobacter* infections in humans are sporadic and self-limiting which complicates the determination of the true incidence rate (Hänninen et al., 2000). Due to the self-limiting behavior of the disease the use of antimicrobials is not usually prescribed for treatment, except in severe cases where fluoroquinolones and macrolides are the drugs of choice (Butzler, 2004; Moore et al., 2006). Tetracyclines have also been suggested as an alternative choice, but in practice they are rarely used.

The pathogenicity of *Campylobacter* strains have been linked to multiple factors including host susceptibility and, more importantly, the expression of different virulence factors and resistance to antimicrobials. Several putative virulence factors have been identified in *Campylobacter* species that contribute to motility, intestinal adhesion, colonization, toxin production and tissue invasion (Bolton, 2015; Dasti et al., 2010). Also, multidrug-resistant *C. jejuni* and *C. coli* have been

reported worldwide from farm animals and retail meats, including poultry and swine (Datta et al., 2003; Zhao et al., 2010).

Phenotypic methods have been widely used to characterize *C. jejuni* and *C. coli* strains at the species and subspecies level. However, these methods have mostly been replaced by genotypic methods that are more accurate and have higher discrimination power, such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) (Pfaller, 1999). While PFGE has a high discriminatory power and has been successfully used in focused short-term epidemiological studies (Baqar et al., 2010; Ribot et al., 2001), MLST is especially well adapted to long-term epidemiological investigation and source attribution (Sabat et al., 2013). Nowadays, with the advent of next-generation sequencing, the possibility of generating high-resolution full genome data is being increasingly used to differentially characterize strains. This technology allows for a rapid identification of a broad range of genotypic traits of the isolates, such as their pool of virulence and antimicrobial resistance determinants. Hence, the aim of this study was to use whole genome sequencing (WGS) to characterize a selection of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from broilers obtained from a longitudinal study performed in different farms. The characterization included the determination of the MLST genotype, the identification of virulence and antimicrobial determinants as well as a phylogenetic study of the isolates through the discovery of single nucleotide polymorphisms (SNPs) between the different strains analysed.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A total of 16 poultry isolates (*C. jejuni* =12 and *C. coli*= 4) from five broiler farms were included in the study. The isolates were selected from *Campylobacter* positive flocks of a broad two-year longitudinal study, where six to seven flocks were studied each year by cloacal swab sampling a subset of birds. Selection of the

Study III

isolates was performed according to their PFGE patterns and an antimicrobial multidrug-resistant profile by disc diffusion (unpublished data). The five different farms (A, B, C, D and E) were located in Catalonia (northeastern Spain). Poultry houses had a capacity of 12,000 to 46,000 birds. Details concerning the strains included in the study are shown on Table 1. *Campylobacter* isolation and identification was performed as previously described (Urdaneta et al., 2015). Isolates were preserved in brain heart infusion broth (BHI, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), with 20% glycerol at -80°C until used and fresh cultures of the isolates were prepared on Columbia blood agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Plates were incubated at 37 °C for 48 h under microaerobic conditions using a microaerobic atmosphere generator (Anaerocult® C, Merck, Darmstadt, Germany).

Antimicrobial susceptibility testing

Isolates were tested for antimicrobial susceptibility using a minimum inhibitory concentration (MIC) based broth microdilution (VetMIC GN-mo; National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) for the following antimicrobial agents: nalidixic acid (1 to 64 mg/L), ciprofloxacin (0.06 to 8 mg/L), tetracycline (0.12 to 16 mg/L), streptomycin (0.5 to 64 mg/L), gentamicin (0.12 to 16 mg/L), and erythromycin (0.5 to 64 mg/L). *C. jejuni* ATCC 33560 and *C. coli* ATCC 33559 were used as control strains. An isolate was considered multidrug-resistant when showing resistance to three or more non-related antimicrobials. Isolates were considered to be susceptible or resistant based on epidemiological cutoff values according to EUCAST guidelines (www.eucast.org). When reporting data using EUCAST epidemiological cut-off values, bacteria should be reported as 'wild-type' (WT) or 'non-wild-type' (non-WT) (Schwarz et al., 2010). For simplicity of the terms, susceptible and resistant has been used here.

Table 1. Identification and origin of the poultry *Campylobacter* isolates used in this study.

Farm	Isolates	Species	Age (days)	Flock n ^o	Year
A	A1	<i>C. coli</i>	37d	1	2011
A	A2	<i>C. jejuni</i>	28d	7	2012
B	B3	<i>C. jejuni</i>	34d	1	2011
B	B4	<i>C. jejuni</i>	39d	5	2011
B	B5	<i>C. jejuni</i>	21d	7	2012
B	B6	<i>C. jejuni</i>	18d	9	2013
C	C7	<i>C. coli</i>	21d	3	2012
C	C8	<i>C. coli</i>	29d	7	2012
C	C9	<i>C. jejuni</i>	21d	12	2013
C	C10	<i>C. jejuni</i>	14d	9	2013
D	D11	<i>C. jejuni</i>	14d	2	2011
D	D12	<i>C. jejuni</i>	29d	1	2011
E	E13	<i>C. jejuni</i>	27d	1	2011
E	E14	<i>C. jejuni</i>	28d	2	2011
E	E15	<i>C. jejuni</i>	25d	12	2013
E	E16	<i>C. coli</i>	21d	10	2013

Whole genome sequencing (WGS) and assembly

Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The libraries were prepared with Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, cat. no. FC-131-1024) followed by multiplexed paired-end sequencing with a read length of 2×251 bp, using Illumina's MiSeq platform (Illumina). The raw reads were trimmed and cleaned for adapters, and assembling was performed using the online tool Assembler v1.2 with default parameters. All these steps are integrated in a pipeline available at the Center for Genomic Epidemiology (CGE) (www.genomicepidemiology.org). Contiguous assemblies were analyzed using the CLCbio's Genomics Workbench v6.5 (CLCbio's, Aarhus, Denmark). The raw sequence dataset is available in the NCBI database. SRA Accession number SUB2617930.

Analysis of resistance and virulence-associated genes

ResFinder v2.1 and MyDbFinder v1.1, both available at the CGE (www.genomicepidemiology.org), were used for identification of resistance and virulence genes, respectively. All strains were subjected to analysis of the presence of resistance determinants to quinolones, tetracyclines, aminoglycosides and β -lactams. *C. jejuni* and *C. coli* strains were tested for 34 virulence-associated genes. Genes including motility (six), chemotaxis (five), adhesion (four), invasion (three), cytolethal distending toxin (three), multidrug and bile resistance (three), stress response and survival (two), iron uptake (two), capsule (two), Guillian-Barré syndrome (one) and hippuricase (one), were selected as previously described (Koolman et al., 2015). All genes were identified with a selected identity threshold of 80%, corresponding to the percentage of nucleotides that are identical between best-matching resistance gene in the database and the corresponding query (Zankari et al., 2012), and a minimum coverage of 20% of the query sequence length.

In order to analyze the presence/absence of specific mutations related to antibiotic resistances, the raw fastq files for each of the isolates were aligned with bwa mem algorithm (Li and Durbin, 2009) with the corresponding reference genome (AL111168 for *C. jejuni* and CP011015 for *C. coli*). The alignment files and the corresponding annotated reference genome, were inspected manually using Tablet (Milne et al., 2013) as the visualizing tool. If the mutation appeared with less frequency than 0.5% of the total reads in that position, it was considered absent.

Identification of SNPs

The SNP discovery was done using the CSI Phylogeny v1.4 pipeline CGE (Kaas et al., 2014). Briefly, the paired-end reads from each of the isolates were reference-aligned using strain 12 for *C. jejuni* and 4 for *C. coli* with BWA v.0.7.2 software (Li

and Durbin, 2009). SNP calling was done with SAMtools v.0.1.18 ('mpileup' method, Li & Durbin 2009) and filtering was done with BEDTools (Quinlan and Hall, 2010). To select the valid SNPs the same criteria previously described was followed (Kaas et al., 2014). SNPs were filtered out if the mapping quality was below 25 or the SNP quality was below 30, and if they were called within the vicinity of 10 bp of another SNP (pruning). To perform the phylogenetic analysis, concatenation of the sequences and subsequent aligning with MUSCLE was done (Edgar, 2004). Maximum likelihood trees were created using CSI Phylogeny 1.4, a web server tool available at www.genomicepidemiology.org (based on FastTree algorithm) (Price et al., 2010), that calls the SNPs, filter and validate them in order to infer phylogeny based on the concatenated alignment of the high quality SNPs. The analysis was run considering the following parameters, i.e. minimum depth at SNP position was set at 10x, the minimum SNP quality accepted was 30 and the minimum read mapping quality allowed was 25. The reference genome used was *C. coli* (Accession CP011015).

Multilocus sequence typing (MLST)

The *de novo* assembled contigs were used to identify the multilocus sequence types (ST) and clonal complexes (CC) using the web server MLST v1.8 available at the CGE website (www.genomicepidemiology.org).

RESULTS

Whole genome sequencing

The isolates were sequenced to an average coverage that varied from 49,73 to 127,2 x. From the assembled contigs of the sixteen isolates, nine previously-described sequence types (ST) were recognized (Figure 1). Besides, two novel STs not previously reported in the PubMLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) were identified, ST8586 (E13, *C. jejuni*

Study III

isolate) and ST8578 (E16, *C. coli* isolate). All the STs found belong to five different CC. The most frequent CC in *C. jejuni* were CC257 and CC21 followed by CC206, whilst the less prevalent was CC45 with only one *C. jejuni* isolate from ST45 belonging to this group. All of the *C. coli* isolates belonged to the same clonal complex (CC828), which included three different STs (ST854, ST854 and ST8578).

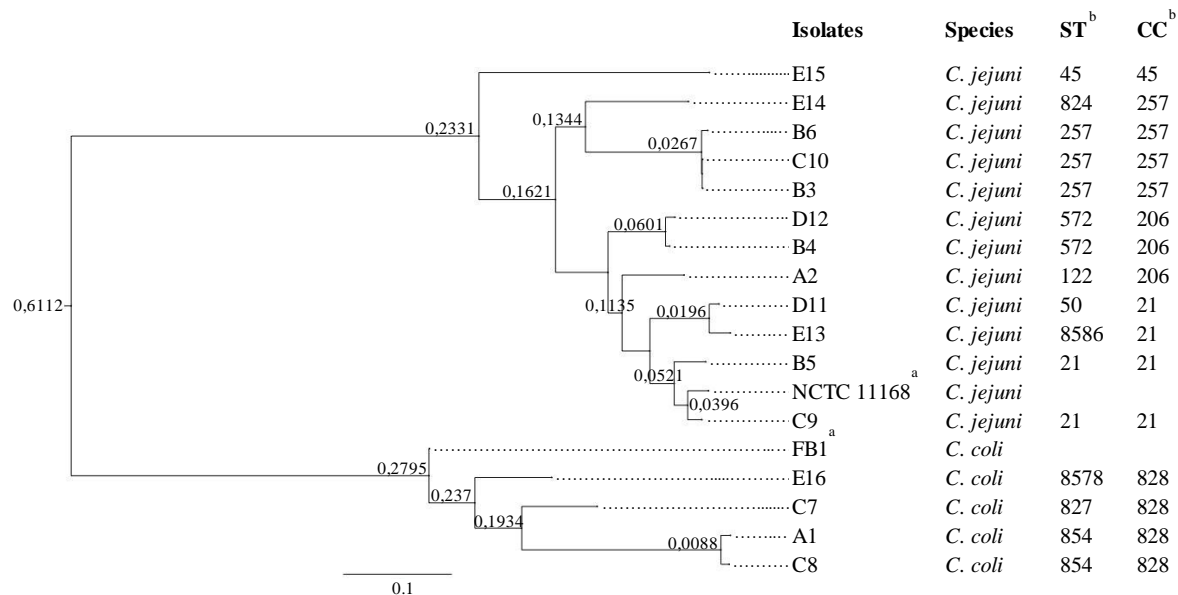
Comparison of the sequences obtained from the sixteen isolates allowed the identification of a total of 8420 SNPs, which were used to perform the phylogenetic analysis. The representation of the SNP tree is depicted in Figure 1 and a heatmap representing the SNP counts between the genomes is shown in Figure 2. None of the isolates analyzed were identical. The isolates showed distribution in two main clusters, with all strains grouped by species.

Antimicrobial susceptibility

The phenotypic antimicrobial susceptibility patterns determined for the sixteen strains analysed is shown in Table 2. All the strains showed a multidrug resistant profile, with resistance to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) being common to all of them. The resistance to tetracycline was the second most commonly observed (81%) with only three strains being sensitive to this antibiotic. Seventy-five % of the isolates were resistant to streptomycin, with at least one resistant strain per farm, whilst 56% were resistant to erythromycin. Among the latter, one third of *C. jejuni* isolates were resistant, whilst all *C. coli* isolates showed resistance to this antimicrobial. Gentamicin resistance was the less prevalent, detected only in two isolates from farms A and B (13%).

In order to study the potential mechanisms of antimicrobial resistance, the assembled genomes of each of the strains under study were investigated for particular patterns known to be associated to resistance. Phenotypic antimicrobial resistances obtained with the MIC analysis corresponded well for most of the isolates with the identification of specific antimicrobial resistance genes detected by WGS (Table 2).

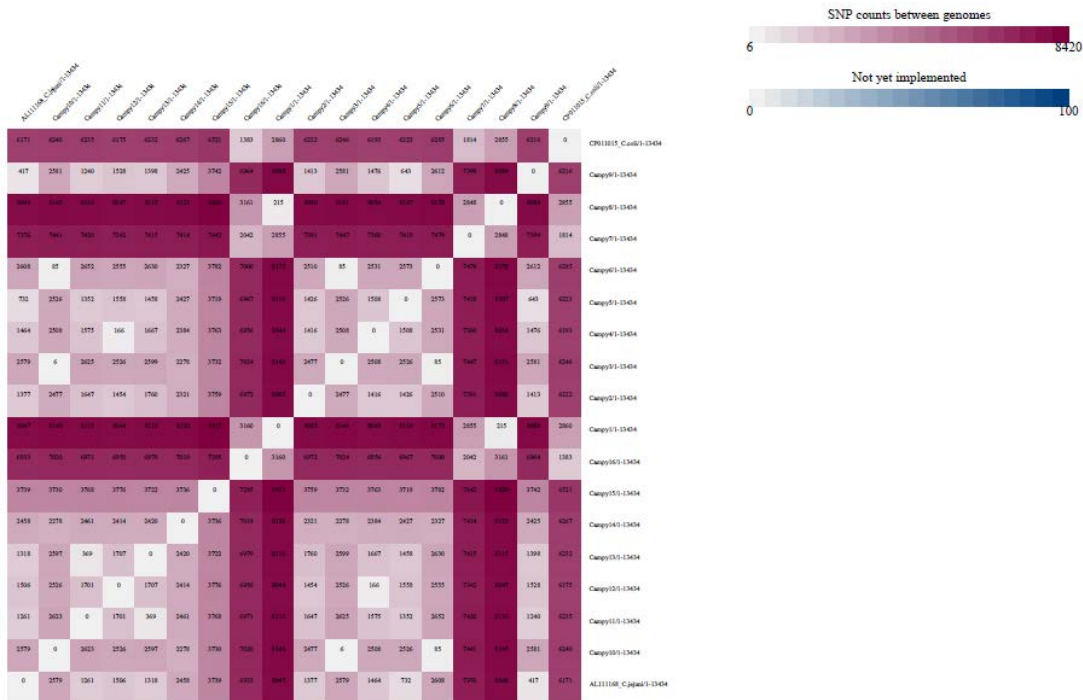
Figure 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree based on SNPs from the assembled genomes and genotypic MLST types of the *Campylobacter* isolates. The tree was drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.



^a Reference genomes for *C. jejuni* NCTC 11168 (Accession number: AL111168) and for *C. coli* FB1 (Accession number: CP011015) were included in the analysis. The tree was drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

^b ST, sequence type; CC, clonal complex.

Figure 2. Heatmap representing the SNPs between the genomes.



All the isolates carried the C257T point mutation in the subunit A of the DNA gyrase gene (Thr86Ile) conferring resistance to quinolones. Other less common mutations in *gyrA* (Asp-90-Asn and Ala-70-Thr) were not detected in any of the isolates. All the isolates showing resistance to tetracycline carried the tet(O) gene. Within the two isolates resistant to streptomycin and gentamicin, the genes *aph(3')-III* and *aadE* conferring resistance to aminoglycosides were identified. Three *C. coli* isolates were found to show a mutation in the A2075G position of the 23S rDNA region, which confers a high level of resistance to macrolides. The CmeABC multidrug efflux pump has been described as the major efflux pump mechanism conferring resistance to a wide range of antimicrobials, and it was identified in 15 out of the 16 isolates analyzed.

Virulence determinants

All isolates of *C. jejuni* and *C. coli* were positive for almost all of the 34 virulence-associated genes studied, including motility, chemotaxis, adhesion and invasion genes, with few exceptions (Table 3). Among the genes coding for the flagellin, only half of the *C. jejuni* isolates carried the *flaA* gene, while *flaB* was only detected in two isolates. Interestingly, one *C. jejuni* isolate from farm E was negative for *cmeB* (component of the CmeABC efflux pump) and another *C. jejuni* isolate from the same farm was the only one found to be negative for *cfrA* (gene involved in iron uptake). Remarkably, the *wlaN* gene, involved in the Guillain-Barré syndrome, was detected in two *C. jejuni* isolates from different farms. It is interesting to mention that the *hipO* and *wlaN* genes were not detected in any strain of *C. coli*.

Table 2. Antimicrobial susceptibilities (MIC) and resistance mechanisms of *C. jejuni* and *C. coli* isolates.

Isolates	Species	Quinolones			Tetracycline		Aminoglycosides				Macrolide		Efflux pump CmeA,B,C	
		Nal ^a	Ci	R-mech ^c Thr86Ile	Tc	R-mech tet(O)	Sm	R-mech aphA(3')	R-mech aadE	Gm	R-mech aphA(3')	Ery		R-mech 23S rDNA
A1	<i>C. coli</i>	R (> 64) ^b	R (> 8)	+	S (0,5)	–	R (32)	+	–	R (2)	+	R (32)	+	+++
A2	<i>C. jejuni</i>	R (32)	R (> 8)	+	S (0,5)	–	S (0,5)	–	–	S (0,12)	–	R (32)	–	+++
B3	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (32)	–	–	S (0,12)	–	R (> 64)	–	+++
B4	<i>C. jejuni</i>	R (32)	R (0,5)	+	R (> 16)	+	R (8)	–	–	S (0,12)	–	S (1)	–	+++
B5	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	+	+	R (2)	+	S (0,5)	–	+++
B6	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	–	–	S (1)	–	S (1)	–	+++
C7	<i>C. coli</i>	R (> 64)	R (4)	+	R (2)	+	R (32)	–	–	S (0,12)	–	R (> 64)	+	+++
C8	<i>C. coli</i>	R (> 64)	R (4)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	–	–	S (0,25)	–	R (> 64)	+	+++
C9	<i>C. jejuni</i>	R (32)	R (4)	+	R (> 16)	+	S (0,5)	–	–	S (0,12)	–	S (1)	–	+++
C10	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	–	–	S (0,12)	–	R (> 64)	–	+++
D11	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	S (0,5)	–	–	S (0,12)	–	S (1)	–	+++
D12	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	–	–	S (1)	–	R (> 64)	–	+++
E13	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (4)	+	R (> 16)	+	S (0,5)	–	–	S (0,12)	–	S (1)	–	+++
E14	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (> 64)	–	–	S (0,12)	–	R (8)	–	++
E15	<i>C. jejuni</i>	R (> 64)	R (> 8)	+	S (0,5)	–	R (16)	–	–	S (0,25)	–	S (1)	–	+++
E16	<i>C. coli</i>	R (16)	R (> 8)	+	R (> 16)	+	R (4)	–	–	S (0,12)	–	R (> 64)	–	+++
Total		100%	100%		81%		75%			13%		56%		

^a Nal: Nalidixic acid, Ci: Ciprofloxacin, Tc: Tetracycline, Sm: Streptomycin, Gm: Gentamicin and Ery: Erythromycin.

^b Interpretation of MIC values for *C. jejuni* epidemiological cut-off values: Nal (R, ≤ 16 mg/L); Ci (R, ≤ 0,5 mg/L); Tc (R, ≤ 1 mg/L); Sm (R, ≤ 4 mg/L); Gm (R, ≤ 2 mg/L) and Ery (R, ≤ 4 mg/L). Interpretation for *C. coli* epidemiological cut-off values: Nal (R, ≤ 16 mg/L); Ci (R, ≤ 0,5 mg/L); Tc (R, ≤ 2 mg/L); Sm (R, ≤ 4 mg/L); Gm (R, ≤ 2 mg/L) and Ery (R, ≤ 8 mg/L).

^c R-mech: resistance mechanism. Thr86Ile: point mutations in the subunit A of the DNA gyrase gene; tet(O), aphA(3') and aadE: presence of these genes; 23S rDNA: point mutation on this region of the genome.

Table 3. Distribution of virulence genes in *C. jejuni* and *C. coli* isolates.

Isolates ^a	Species	Motility							Chemotaxis					Adhesion				Capsule		Invasion			
		<i>flaA</i>	<i>flaB</i>	<i>flhA</i>	<i>flhB</i>	<i>flgB</i>	<i>flgE</i>	<i>fliM</i>	<i>fliY</i>	<i>cheA</i>	<i>cheB</i>	<i>cheR</i>	<i>cheW</i>	<i>cheY</i>	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>pldA</i>	<i>racR</i>	<i>kpsM</i>	<i>waaf</i>	<i>iamA</i>	<i>ciaB</i>	<i>ceuE</i>
A1	<i>C. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A2	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B4	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B5	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B6	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	<i>C. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	<i>C. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D11	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D12	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E13	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E14	<i>C. jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E15	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E16	<i>C. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Total		10	6	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Table 3. Continued.

Isolates ^a	Species	Cytotoxic distending toxin			GBS	Multidrug and bile resistance			Stress response and survival		Iron uptake		Hip. ^b gene
		<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	<i>wlaN</i>	<i>cmeA</i>	<i>cmeB</i>	<i>cmeC</i>	<i>katA</i>	<i>sodB</i>	<i>cfrA</i>	<i>fur</i>	<i>hipO</i>
A1	<i>C. coli</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
A2	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
B4	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
B5	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
B6	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	<i>C. coli</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
C8	<i>C. coli</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
C9	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
D11	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
D12	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
E13	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E14	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+
E15	<i>C. jejuni</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+
E16	<i>C. coli</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
Total		16	16	16	2	16	15	16	16	16	15	16	12

^aA: isolates from farm A; B: isolates from farm B; C: isolates from farm C; D: isolates from farm D and E: isolates from farm E.

^b

Hippuricase

gene.

DISCUSSION

The whole-genome sequence data revealed that the *C. jejuni* and *C. coli* isolates belonged to five different CC, all of them associated both with poultry and human campylobacteriosis in many countries (*Campylobacter* PubMLST; <http://PubMLST.org>). The two positive isolates to *wlaN* gene, related to the Guillain Barré Syndrome, belonged to ST21 and to the novel ST8586, both from CC21. In the *Campylobacter* PubMLST database, there are only seven isolates within CC21 associated with the Guillain-Barré syndrome and none of them belong to the widespread ST21.

The comparison of the assembled genomes revealed a large number of nucleotide changes (SNPs), among the isolates and the reference genomes. The identified variations were used to study the phylogeny to infer the relationship among the isolates, which were in concordance to the species they belong (Fig. 1). Not surprisingly, isolates of identical ST were more closely related compared to isolates of different STs.

The antimicrobial resistances found are of relevance in a public health context, particularly those to fluoroquinolones, macrolides (mainly ciprofloxacin and erythromycin, respectively) and tetracyclines. Quinolones and macrolides are the antibiotic of choice to treat severe human *Campylobacter* infections, whilst tetracyclines are used as an alternative treatment (Butzler, 2004; Moore et al., 2006). Aminoglycosides are also recommended for the treatment of bacteraemia caused by *Campylobacter* (Kassa et al., 2007), and a significant number of resistances to this group of antimicrobials was detected as well. Resistance to fluoroquinolones and macrolides is quite common in poultry (Thakur, 2010). High quinolone resistance in poultry has previously been reported in Spain (Melero et al., 2012; Pérez-Boto et al., 2013b), as well as in other EU countries (Luber et al. 2003; Nobile et al. 2013). The high MIC values detected here may be related to the presence of Thr86Ile in all of the isolates, which in itself provides high resistance

Study III

to quinolones (MIC >16 mg/L) (Ruiz et al., 1998). This mutation is the most prevalent in clinical and veterinary isolates (Butzler, 2004; Hormeño et al., 2016). The high prevalence of isolates resistant to tetracyclines is similar to that previously reported in poultry in Spain (Duarte et al., 2016; Melero et al., 2012; Pérez-Boto et al., 2013b). This resistance is mediated by the tet(O) gene which was detected in all isolates showing tetracycline resistance. Besides the chromosomal location of this gene, it has also been reported in plasmids (Avrain et al., 2004; Iovine, 2013). In contrast, resistance to aminoglycosides was diverse, with a considerably high resistance to streptomycin (75%) and a much lower resistance to gentamicin (13%), in agreement with Duarte et al. (2016) and Pérez-Boto et al. (2013). The *aph(3')-III* and *aadE* genes involved in aminoglycoside resistance were identified in some strains. However, a high resistance to streptomycin was observed in some strains in the absence of those genes. This could be attributed to antimicrobial resistance associated with plasmids or undiscovered genes (Iovine, 2013). Gentamicin resistance in *Campylobacter* spp. is a rare event all over European countries (Carreira et al. 2012; De Jong et al. 2009; Pérez-Boto et al. 2013). Over 50% of isolates were resistant to erythromycin and was more common among *C. coli* than *C. jejuni*, similarly to what has been previously reported in poultry in the EU (Duarte et al., 2016; Wimalarathna et al., 2013). Erythromycin resistance is acquired through point mutations in domain V of the 23S rDNA at positions 2074 and 2075 (positions 2058 and 2059 in *E. coli* numbering) (Iovine, 2013); the point mutation A2075G which is the most prevalent in *Campylobacter* spp. and confers high-level resistance to macrolides, was identified in three *C. coli* isolates. The overall resistances detected here are those also common in food-producing animals in the UE, as reported by EFSA (2015). Particularly, the pattern of resistance among *Campylobacter* isolates was predominantly quinolones (ciprofloxacin and nalidixic acid) and tetracyclines, whilst resistance to erythromycin and gentamicin was comparatively low.

Several virulence factors have been identified in *Campylobacter*, which include flagella-mediated motility, bacterial adherence to intestinal mucosa, invasive capability and the ability to produce toxins. *C. jejuni* isolates were positive for the presence of most of the virulence genes analyzed related to these virulence factors. However, differences were found for the *flaA* and *flaB* genes. Those adjacent genes encode for the protein flagellin which compose the flagellar filament, an important colonization factor (Koolman et al., 2015; Silva et al., 2011). Therefore, the negative results for the *flaA* gene (80% coverage) in half of the isolates, and lack of *flaB* gene (80% coverage) in all but two isolates, with only two isolates positive for both genes is surprising. Despite it has been suggested that the *flaB* gene might not be essential for motility (Koolman et al. 2015), the lack of these genes might lead to a reduced motility and colonization ability of the isolates (Neal-McKinney et al. 2010). The gene *wlaN*, responsible for the expression of Guillain-Barré syndrome, was detected with a low frequency, in agreement with other reports (Datta et al., 2003; Koolman et al., 2015; Talukder et al., 2008). In contrast, the multidrug CmeABC efflux system responsible for antimicrobial resistance was present in all but one isolate, which lacked the CmeB gene. The efflux system is common in *Campylobacter* and consists of an external membrane protein (CmeC), a drug transporter in the internal membrane (CmeB) and an external membrane protein (CmeA). They all form a membrane channel that expels toxic substances from the cell (Lin et al. 2002). The HipO gene, which is specific for *C. jejuni*, was not present in any of the *C. coli* isolates. Besides this gene, and the *wlaN* gene, which is relatively rare, all virulence genes analyzed were present in all *C. coli* strains. It is noteworthy to highlight that the *sodB* gene involved in stress defense, and that was first reported in *C. coli* isolates by Koolman et al. (2015), it has also been found in all *C. coli* isolates in this study.

The use of WGS technology has allowed us an in-depth characterization of *Campylobacter* field isolates. Despite this potent tool does not provide information about e.g. gene expression levels or synergistic effects among different resistance

Study III

mechanisms, it has an enormous potential. WGS technology has become a fast and affordable tool and may become a rapid and cost-effective approach to characterize *Campylobacter* isolates from epidemiological studies.

Conclusiones

1. La gran diversidad de cepas circulantes en las diferentes granjas, con una sucesión de genotipos de una crianza a la siguiente y un reducido número de cepas persistentes, sugiere orígenes diversos desde multitud de reservorios diferentes de *Campylobacter* en el medio ambiente exterior de las granjas, que se introducen fácilmente en las naves por diferentes vías durante la crianza, colonizando rápidamente a las aves.
2. La ausencia de un mismo genotipo en lotes sucesivos indica una correcta limpieza y desinfección durante el vacío sanitario, en el cual se elimina cualquier *Campylobacter* presente dentro de las naves.
3. La elevada proporción de cepas resistentes a quinolonas y tetraciclinas en pollos de engorde es preocupante, dado que estos antimicrobianos son los de elección para tratar los casos graves de campilobacteriosis. Si estas cepas o los genes de resistencia llegan a introducirse en la cadena alimentaria, ello supone un riesgo para la salud pública. Más preocupante aún es la elevada proporción de cepas multiresistentes (84,33% en *C. jejuni* y 57,47% en *C. coli*) a hasta a 5 clases diferentes de antimicrobianos.
4. La elevada proporción de cepas de *Campylobacter* resistentes o multiresistentes puede estar asociada a la presión antibiótica, dada la frecuente utilización de diversas familias de estos fármacos en los programas de medicina preventiva.
5. La amplia distribución de la mayoría de genes asociados a virulencia en los aislados analizados son similares a las descritas en cepas aisladas en humanos. Es destacable la relativa frecuencia del gen *wlaN*, relacionado con el síndrome de Guillain-Barré, así como del sistema de secreción tipo 6 (T6SS) asociado con formas graves de campilobacteriosis, en aislados de pollos de engorde, lo que apunta a un riesgo potencial para el consumidor final.
6. La secuenciación masiva es una herramienta que nos permitió la caracterización en profundidad de los aislados de *Campylobacter*, desde la determinación del genotipo, a la identificación de determinantes de virulencia y de resistencia

Conclusiones

antimicrobiana, así como establecer su relación filogenética. Presenta un enorme potencial aunque no proporciona información sobre niveles de expresión génica o sobre el efecto sinérgico entre diferentes mecanismos de resistencia

Bn Referencias

- Aarestrup, F.M., Engberg, J., 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res.* 32, 311–321. doi:10.1051/vetres:2001127
- Aarestrup, F.M., Nielsen, E.M., Madsen, M., Engberg, J., 1997. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2244–2250.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0104905
- Alfredson, D.A., Korolik, V., 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 123–132. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x
- Allen, V.M., Bull, S.A., Corry, J.E.L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Whyte, R., Gonzalez, A., Elviss, N., Humphrey, T.J., 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 54–61. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L., 1999. *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28–35. doi:10.3201/eid0501.990104
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., Yamasaki, S., 2008. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 260–266. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00369.x
- Avrain, L., Vernozy-Rozand, C., Kempf, I., 2004. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J. Appl. Microbiol.* 97, 134–140. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02306.x
- Bacon, D.J., Alm, R., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P., 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* 68, 4384–4390. doi:10.1128/IAI.68.8.4384-4390.2000
- Baggerman, W.I., T, K., 1992. A comparison of enrichment and membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh and frozen foods. *Food Microbiology* 9, 87–94.
- Bang, D., Scheutz, F., Ahrens, P., Pedersen, K., Blom, J., Madsen, M., 2001. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in

Referencia

- Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. J. Med. Microbiol. 50, 1087–1094. doi:10.1099/0022-1317-50-12-1087
- Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., Madsen, M., 2003. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. J. Appl. Microbiol. 94, 1003–1014. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x
- Baqar, S., Tribble, D.R., Carmolli, M., Sadigh, K., Poly, F., Porter, C., Larsson, C.J., Pierce, K.K., Guerry, P., Ventrone, C., Dill, E., Daunais, P., Cummings, G., Lyon, C., Fingar, A., Gilliland, T., Jones, E., Ewing, C.P., Dadouk, S., Sincock, S., Lee, L., Buchwaldt, C., Puel, P., Miller, R., Mattiesen, D., Darsley, M., Kirkpatrick, B., 2010. Recrudescence of *Campylobacter jejuni* infection in an immunocompetent adult following experimental infection with a well-characterized organism. Clin. Vaccine Immunol. 17, 80–86. doi:10.1128/CVI.00252-09
- Barton, C., Ng, L.K., Tyler, S.D., Clark, C.G., 2007. Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 45, 386–391. doi:10.1128/JCM.01513-06
- Battersby, T., Whyte, P., Bolton, D.J., 2016. The pattern of *Campylobacter* contamination on broiler farms; external and internal sources. J. Appl. Microbiol. 120, 1108–1118. doi:10.1111/jam.13066
- Bless, P.J., Schmutz, C., Suter, K., Jost, M., Hattendorf, J., Mäusezahl-Feuz, M., Mäusezahl, D., 2014. A tradition and an epidemic: Determinants of the campylobacteriosis winter peak in Switzerland. Eur. J. Epidemiol. 29, 527–537. doi:10.1007/s10654-014-9917-0
- Bleumink-Pluym, N.M.C., van Alphen, L.B., Bouwman, L.I., Wösten, M.M.S.M., van Putten, J.P.M., 2013. Identification of a Functional Type VI Secretion System in *Campylobacter jejuni* Conferring Capsule Polysaccharide Sensitive Cytotoxicity. PLoS Pathog. 9, 16–18. doi:10.1371/journal.ppat.1003393
- Bolton, D.J., 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiol. 48, 99–108. doi:10.1016/j.fm.2014.11.017
- Boysen, L., Rosenquist, H., Larsson, J.T., Nielsen, E.M., Sørensen, G., Nordentoft, S., Hald, T., 2013. Source attribution of human campylobacteriosis in Denmark. Epidemiol. Infect. 1–10. doi:10.1017/S0950268813002719
- Buhr, R., Cox, N., Stern, N., Musgrove, M., Wilson, J., Hiatt, K., 2002. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. Avian Dis. 46(4);, 919–24.
- Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R.,

- Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J., Humphrey, T.J., 2006. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 645–652. doi:10.1128/AEM.72.1.645-652.2006
- Bull, S.A., Thomas, A., Humphrey, T., Ellis-Iversen, J., Cook, A.J., Lovell, R., Jorgensen, F., 2008. Flock health indicators and *Campylobacter* spp. in commercial housed broilers reared in Great Britain. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5408–5413. doi:10.1128/AEM.00462-08
- Butzler, J. P., P, D., M, D., F, D., 1973. Related vibrio in stools. *J. Pediatr.* 82, 82, 493–495.
- Butzler, J.P., 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 868–876. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x
- Butzler, J.P., Skirrow, M.B., 1979. *Campylobacter* enteritis. *J. Clin. Gastroenterol.* 82:, 737–765.
- Cagliero, C., Mouline, C., Cloeckaert, A., Payot, S., 2006. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3893–3896. doi:10.1128/AAC.00616-06
- Caldwell, D.B., Wang, Y., Lin, J., 2008. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3947–3954. doi:10.1128/AAC.00450-08
- Callicott, K.A., Frioriksdóttir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J.R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hielt, K.L., Needleman, D.S., Stern, N.J., 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5794–5798. doi:10.1128/AEM.02991-05
- Cantón, R., 2010. Interpretive reading of the antibiogram: A clinical necessity. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28, 375–385.
- Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: A perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 20–25. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x
- Carreira, A., Clemente, L., Rocha, T., Tavares, A., Geralde, M., Barahona, M., Botelho, A., Cunha, M., 2012. Comparative Genotypic and Antimicrobial Susceptibility Analysis of Zoonotic *Campylobacter* Species Isolated from Broilers in a Nationwide Survey, Portugal. *J. Food Prot.* 75, 2100–2109. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-183

Referencia

- Cawthraw, S., Newell, D., 2010. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.* 54(1):
- Cawthraw, S., Wassenaar, T., Ayling, R., & Newell, D., 1996. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. *Epidemiol. Infect.* 117(1); 213–215.
- Cerdà-Cuéllar, M., Laureano, L., Ayats, T., Corujo, A., Hald, B., Dolz, R., 2015. Efficacy of biosecurity measures in Spanish broiler farms to prevent thermophilic *Campylobacter* colonization. 18th Int. Work. *Campylobacter*, *Helicobacter* Relat. Org.
- Chang, C., Miller, J.F., 2006. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect. Immun.* 74, 5261–5271. doi:10.1128/IAI.01094-05
- Chatelain, R.V.M., 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter*. Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor), Sebald and Véron. . *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23; 122–134.
- Chaveerach, P., Chaveerach, P., Huurne, a a H.M., Huurne, a a H.M., Lipman, L.J. a, Lipman, L.J. a, Knapen, F. Van, Knapen, F. Van, 2003. Survival and Resuscitation of Ten Strains of. *Society* 69, 711–714. doi:10.1128/AEM.69.1.711
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232
- Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K., Yugi, H., 1997. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 1011–1015. doi:10.1292/jvms.59.1011
- Chuma, T., Yamada, T., Yano, K., K, O., Yugi, H., 1994. A survey of *Campylobacter jejuni* in broilers from assignment to slaughter using DNA-DNA hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 56(4); 697–700.
- Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O., Larry Obi, C., 2002. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 237–243. doi:10.3201/eid0803.010233
- Colles, F.M., Jones, K., Harding, R.M., Maiden, M.C.J., 2003. Genetic Diversity of

- Campylobacter jejuni* Isolates from Farm Animals and the Farm Environment
Genetic Diversity of *Campylobacter jejuni* Isolates from Farm Animals and the Farm Environment. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7409–7413. doi:10.1128/AEM.69.12.7409
- Colles, F.M., Mccarthy, N.D., Bliss, C.M., Layton, R., Maiden, M.C.J., 2015. The long-term dynamics of *Campylobacter* colonizing a free-range broiler breeder flock: An observational study. Environ. Microbiol. 17, 938–946. doi:10.1111/1462-2920.12415
- Connell, S.R., Trieber, C.A., Dinos, G.P., Einfeldt, E., Taylor, D.E., Nierhaus, K.H., 2003. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. EMBO J. 22, 945–953. doi:10.1093/emboj/cdg093
- Corcionivoschi, N., Gundogdu, O., Moran, L., Kelly, C., Scates, P., Stef, L., Cean, A., Wren, B., Dorrell, N., Madden, R.H., 2015. Virulence characteristics of hcp (+) *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail chicken. Gut Pathog. 7, 20. doi:10.1186/s13099-015-0067-z
- Corry, J., Atabay, H., 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. (30):, 96–114.
- Cox, N., LJ, R., JJ, M., ME, B., PJ, F.-C., Buhr RJ, B.J., MD, L., CL, H., PM, O., AM, L., AG, C., SG, T., MP., D., 2012. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. J. Food Prot. 75(10):, 1896–902.
- Crushell, E., Harty, S., Sharif, F., Bourke, B., 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging Its Secrets? Pediatr. Res. 55, 3–12. doi:10.1203/01.PDR.0000099794.06260.71
- D’Costa, V.M., Griffiths, E., Wright, G.D., 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. Curr. Opin. Microbiol. 10, 481–489. doi:10.1016/j.mib.2007.08.009
- D’Lima, C.B., Miller, W.G., Mandrell, R.E., Wright, S.L., Siletzky, R.M., Carver, D.K., Kathariou, S., 2007. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from Turkeys. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2156–2164. doi:10.1128/AEM.02346-06
- Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E., Groß, U., 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. Int. J. Med. Microbiol. 300, 205–211. doi:10.1016/j.ijmm.2009.07.002
- Datta, S., Niwa, H., Itoh, K., 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat

Referencia

- and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 52, 345–348. doi:10.1099/jmm.0.05056-0
- de Jager, A.E., Sluiter, H.J., 1991. Clinical signs in severe Guillain-Barré syndrome: analysis of 63 patients. *J. Neurol Sci.* 104(2); 143–50.
- De Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Vall??, M., Wheadon, A., 2009. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 733–744. doi:10.1093/jac/dkp012
- Debretsion, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Nganwa, D., Yehualaeshet, T., 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes* 21, 177–181. doi:10.1016/j.mcp.2006.10.006
- Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P., 2005. Taxonomy of the family Campylobacteraceae, in *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Press. Washington, DC.
- Deckert, A.E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R.J., Tamblyn, S., Morrell, L., Deckert, P.S.E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R.J., Tamblyn, S., Morrell, L., Seliske, P., Jamieson, F.B., Irwin, R., Dewey, C.E., Boerlin, P., and Scott A. McEwen1, 2014. Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Human and Chicken Isolates from Two Health Units. *Foodborne Pathog. Dis.* 11.
- Desmonts, M.H., Dufour-Gesbert, F., Avrain, L., Kempf, I., 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1025–1030. doi:10.1093/jac/dkh473
- Dingle, K., Colles, F., Ure, R., Al., E., 2002. Molecular Characterization of *Campylobacter jejuni* Clones: A Basis for Epidemiologic Investigation. *Emerg. Infect. Dis.* 8(9); 949–955.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., Maiden, C.J., Maiden, M.C.J., 2005. Sequence Typing and Comparison of Population Biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Society* 43, 340–347. doi:10.1128/JCM.43.1.340
- Dingle, K.E., McCarthy, N.D., Cody, A.J., Peto, T.E.A., Maiden, M.C.J., 2008. Extended sequence typing of *Campylobacter* spp., United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*

- 14, 1620–1622. doi:10.3201/eid1410.071109
- Dingle, K.E., Van den Braak, N., Colles, F.M., Price, L.J., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., Endtz, H.P., Van Belkum, A., Maiden, M.C.J., 2001a. Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3346–3349. doi:10.1128/JCM.39.9.3346-3349.2001
- Dingle, K.E., Van den Braak, N., Colles, F.M., Price, L.J., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., Endtz, H.P., Van Belkum, A., Maiden, M.C.J., 2001b. Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3346–3349. doi:10.1128/JCM.39.9.3346-3349.2001
- Doyle, M.P., 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 533–536.
- Drlica, K., Zhao, X., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 377–392. doi:10.1128/1098-5547.1997.09.18.MHDA-1997.09.18.00:01.CRDT-1997.09.18.00:00.PST-ppublish
- Duarte, A., Santos, A., Manageiro, V., Martins, A., Fraqueza, M.J., Caniça, M., Domingues, F.C., Oleastro, M., 2014. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 306–313. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.06.012
- Duarte, A., Seliwiorstow, T., Miller, W.G., De Zutter, L., Uyttendaele, M., Dierick, K., Botteldoorn, N., 2016. Discriminative power of *Campylobacter* phenotypic and genotypic typing methods. *J. Microbiol. Methods* 125, 33–39. doi:10.1016/j.mimet.2016.03.004
- Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainger, W., Bates, M., Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainger, W., Bates, M., 1997. Campylobacteriosis in New Zealand: Results of a case-control study. *J. Epidemiol. Community Health* 51, 686–691.
- Eberle, K.N., Kiess, A.S., 2012. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poult. Sci.* 91, 255–64. doi:10.3382/ps.2011-01414
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340

Referencia

- EFSA, 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA J. 13, 1–178. doi:10.2903/j.efsa.2015.4036
- EFSA, 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA J. 13. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- EFSA, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published. EFSA J. 18, 20449. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA J. 9, 1–141. doi:10.2903/j.efsa.2011.2105.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU 1. EFSA J. 8, 1–89. doi:10.2903/j.efsa.2010.1437.Available
- EFSA, 2008. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. Clin. Microbiol. Infect. 14, 522–533. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02000.x
- EFSA, 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006, Science.
- EFSA, E., 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 13. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- EFSA, E., 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 13. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- Emborg, H., Teunis, P., Simonsen, J., Krogfelt, K., Jørgensen, C., Takkinen, J., Mølbak, K., 2015. WAS THE INCREASE IN CULTURE-CONFIRMED *CAMPYLOBACTER* INFECTIONS IN DENMARK DURING THE 1990S A SURVEILLANCE ARTEFACT? Eurosurveillance 20.
- Escherich, T., 1886. Articles adding to the knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies. Münchener medizinische Wochenschrift 33:, 815–817, 833–835.
- Evans, S.J., Sayers, A.R., 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of

- broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 46, 209–223. doi:10.1016/S0167-5877(00)00143-4
- Ferrero, R.L., Lee, A., 1988. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 53–59.
- Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9, 430–440. doi:10.1016/j.meegid.2009.03.004
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Morten, O.A., 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens 337, 1107–1111. doi:10.1126/science.1220761.The
- Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Mandrell, R.E., Miller, W.G., Rasko, D.A., Ravel, J., Brinkac, L.M., Deboy, R.T., Parker, C.T., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Scott Durkin, A., Madupu, R., Sullivan, S.A., Shetty, J.U., Ayodeji, M.A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M.C., Badger, J.H., Fraser, C.M., Nelson, K.E., 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol.* 3. doi:10.1371/journal.pbio.0030015
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2, 10. doi:10.1186/1742-5573-2-10
- Friedman, C., Neimann, J., Wegener, H., Tauxe, R., 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. ASM Press. Washingt. 121–139.
- Friedman, C., Hoekstra, R., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., Reddy, S., Ahuja, S.D., Helfrick, D.L., Hardnett, F., Carter, M., Anderson, B., Tauxe, R., 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis.* 38 Suppl 3, S285–S296. doi:10.1086/381598
- García de Lomas, J., Gimeno, C., 1997. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Trat. Antimicrob. Inf. Ter. del Sist. Nac. Salud.* 22–Nº 3.
- Ge, Z., Schauer, D.B., Fox, J.G., 2008. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* 10, 1599–1607. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01173.x
- Gharst, G., Oyarzabal, O.A., Hussain, S.K., 2013. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *J. Microbiol. Methods* 95,

Referencia

84–92. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.014

- Gibbons, C.L., Mangen, M.-J.J., Plass, D., Havelaar, A.H., Brooke, R.J., Kramarz, P., Peterson, K.L., Stuurman, A.L., Cassini, A., Fevre, E.M., Kretzschmar, M.E.E., consortium, B. of C. diseases in E. (BCoDE), 2014. Measuring underreporting and under-ascertainment in infectious disease datasets: a comparison of methods. *BMC Public Health* 14, 147. doi:10.1186/1471-2458-14-147
- Gibreel, A., Dobryan M, T., Nonaka, Lisa, et al, 2004. Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta , Canada , from 1999 to 2002 , with Special Reference to tet (O) -Mediated Tetracycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3442–3450. doi:10.1128/AAC.48.9.3442
- Gibreel, A., Taylor, D.E., 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 243–255. doi:10.1093/jac/dkl210
- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Frost, J.A., Adak, G.K., Horby, P., Swan, A. V., Painter, M.J., Neal, K.R., 2002. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A tool for generating hypotheses. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 937–942. doi:10.3201/eid0809.010187
- Godschalk, P.C.R., Heikema, A.P., Gilbert, M., Komagamine, T., Wim Ang, C., Glerum, J., Brochu, D., Li, J., Yuki, N., Jacobs, B.C., Van Belkum, A., Endtz, H.P., 2004. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1659–1665. doi:10.1172/JCI200415707
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J., Corn., J.L., 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. In broilers: Source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis.* 41, 890–898.
- Greig, J., 2003. Quinolone resistance in *Campylobacter*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(3):, 740–2.
- Griffiths, P.L., Park, R.W., 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* 69:, 281–301.
- Gripp, E., Hlahla, D., Didelot, X., Kops, F., Maurischat, S., Tedin, K., Alter, T., Ellerbroek, L., Schreiber, K., Schomburg, D., Janssen, T., Bartholomäus, P., Hofreuter, D., Woltemate, S., Uhr, M., Brenneke, B., Grüning, P., Gerlach, G., Wieler, L., Suerbaum, S., Josenhans, C., 2011. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics* 12, 584. doi:10.1186/1471-2164-12-584
- Guerry, P., 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 15, 456–461. doi:10.1016/j.tim.2007.09.006

- Guo, B., Wang, Y., Shi, F., Barton, Y.W., Plummer, P., Reynolds, D.L., Nettleton, D., Grinnage-Pulley, T., Lin, J., Zhang, Q., 2008. CmeR functions as a pleiotropic regulator and is required for optimal colonization of *Campylobacter jejuni* in vivo. *J. Bacteriol.* 190, 1879–1890. doi:10.1128/JB.01796-07
- Gyles, C., 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Heal. Res. Rev.* 9, 149–158.
- Hald, B., Skovgård, H., Pedersen, K., Bunkenborg, H., 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poult. Sci.* 87, 1428–1434. doi:10.3382/ps.2007-00301
- Hänninen, M., Haajanen, H., Pummi, T., Katila, M., Sarkkinen, H., Miettinen, I., 2003. Detection and Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1391–1396. doi:10.1128/AEM.69.3.1391
- Hänninen, M.L., Hakkinen, M., Rautelin, H., 1999. Stability of related human and chicken *Campylobacter jejuni* genotypes after passage through chick intestine studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2272–2275.
- Hänninen, M.L., Perko-Mäkelä, P., Pitkälä, A., Rautelin, H., 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1998–2000.
- Hansson, I., Ederoth, M., Andersson, L., V?gsholm, I., Engvall, E.O., 2005. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1149–1157. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02689.x
- Harrison, J.W., Dung, T.T.N., Siddiqui, F., Korbricate, S., Bukhari, H., Vu Tra, M.P., Van Minh Hoang, N., Carrique-Mas, J., Bryant, J., Campbell, J.I., Studholme, D.J., Wren, B.W., Baker, S., Titball, R.W., Champion, O.L., 2014. Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1026–1029. doi:10.3201/eid2006.130635
- Hendrixson, D.R., DiRita, V.J., 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* 52, 471–484. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K., Haesebrouck, F., 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 89–

Referencia

98. doi:10.1089/vbz.2011.0676

- Hiatt, K., GR, S., NA, C., RJ, B., MT, M., NJ, S., JL, W., 2003. Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from the gastrointestinal tracts and the reproductive tracts of broiler breeder roosters. *Avian Dis.* 47(2):, 406–14.
- Hiatt, K.L., Cox, N.A., Buhr, R.J., Stern, N.J., 2002. Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Curr. Microbiol.* 45, 400–404. doi:10.1007/s00284-002-3771-0
- Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R.O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., Clark, C., Perbost, C., Jarvie, T., Du, L., Galán, J.E., 2006. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect. Immun.* 74, 4694–4707. doi:10.1128/IAI.00210-06
- Hormeño, L., Palomo, G., Ugarte-Ruiz, M., Porrero, M.C., Borge, C., Vadillo, S., Píriz, S., Domínguez, L., Campos, M.J., Quesada, A., 2016. Identification of the main quinolone resistance determinant in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by MAMA-DEG PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 84, 236–239. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.002
- Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C., 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe* 15, 18–25. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.09.001
- Humphrey, T., Mason, M., Martin, K., 1995. The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 295–303. doi:10.1016/0168-1605(94)00135-S
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M., 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 237–257. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006
- 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 Dissemination of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* spp . within an Integrated Commercial Poultry Production System 72, 3441–3447. doi:10.1128/AEM.72.5.3441
- Iovine, N.M., 2013. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* 4, 230–40. doi:10.4161/viru.23753
- Jacobs-Reitsma, W.F., 1997. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet. Q.* 19(3):, 113–7.

- Jacoby, G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2, S120-6. doi:10.1086/428052
- Jagannathan, A. Penn, C., 2005. "Motility", in *Campylobacter*. Mol. Cell. Biol. Norfolk: H, 331-347.
- Jain, D., Prasad, K.N., Sinha, S., Husain, N., 2008. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J. Med. Microbiol.* 57, 267-272. doi:10.1099/jmm.0.47317-0
- Janssen, R., Krogfelt, K.A., Cawthraw, S.A., Van Pelt, W., Wagenaar, J.A., Owen, R.J., 2008. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: The host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 505-518. doi:10.1128/CMR.00055-07
- Jean-Paul, B., Johannes, O., 1991. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *J. Food Microbiol.* 12, 1-8.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., Chan, V.L., 2001. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 39, 1225-1236. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02294.x
- Johnsen, G., Kruse, H., Hofshagen, M., 2006. Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1130-1139. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02995.x
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B.T., Borck, B., Ethelberg, S., Hakkinen, M., Kuusi, M., Reiersen, J., Hansson, I., Olsson Engvall, E., Løfdahl, M., Wagenaar, J.A., van Pelt, W., Hofshagen, M., 2010. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev. Vet. Med.* 93, 33-41. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.09.015
- Kaakoush, N.O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H.M., Man, S.M., 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 687-720. doi:10.1128/CMR.00006-15
- Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 9, 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0104984
- Kang, Y.-S., Cho, Y.-S., Yoon, S.-K., Yu, M.-A., Kim, C.-M., Lee, J.-O., Pyun, Y.-R., 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken meat and human stools in Korea. *J. Food Prot.* 69, 2915-2923.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, a, Aalmen, I., Ostroff, S.M.,

Referencia

- Potter, M., 1993. Epidemiological investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 111, 245–255. doi:10.1017/S0950268800056958
- Kassa, T., Gebre-Selassie, S., Asrat, D., 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from food animals in Ethiopia. *Vet. Microbiol.* 119, 82–87. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.011
- Kelly, D.J., 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 90:, 16S–24S.
- King, E.O., 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio* isolated from cases of human vibriosis. *J. Infect. Dis.* 101:, 119–128.
- Konkel, M., Garvis, S., Tipton, S., Jr., A., D.E, Cieplak Jr, W., 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin- binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24, 953–963.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D., 2015. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 424–32. doi:10.1089/fpd.2014.1883
- Korczak, B.M., Zurfluh, M., Emler, S., Kuhn-Oertli, J., Kuhnert, P., 2009. Multiplex strategy for multilocus sequence typing, fla typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates collected in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1996–2007. doi:10.1128/JCM.00237-09
- Kurinčič, M., Botteldoorn, N., Herman, L., Smole Možina, S., 2007. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 186–190. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.012
- Laing, C.R., Zhang, Y., Thomas, J.E., Gannon, V.P.J., 2011. Everything at once: Comparative analysis of the genomes of bacterial pathogens. *Vet. Microbiol.* 153, 13–26. doi:10.1016/j.vetmic.2011.06.014
- Lefébure, T., Bitar, P.D.P., Suzuki, H., Stanhope, M.J., 2010. Evolutionary dynamics of complete *Campylobacter* pan-genomes and the bacterial species concept. *Genome Biol. Evol.* 2, 646–655. doi:10.1093/gbe/evq048
- Lehtola MJ, T, P., MiebachL, L., I.T, M., 2006. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci. Technol. a J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54:, 57–61.
- Lehtopolku, M., Nakari, U.M., Kotilainen, P., Huovinen, P., Siitonen, A., Hakanen, A.J., 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter*

- jejuni* and *C. coli* strains: In vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1232–1236. doi:10.1128/AAC.00898-09
- Levin, R.E., 2007. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnol.* 21; 271–347.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Lin, J., Michel, L.O., Zhang, Q., 2002. CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni* CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*. *Society* 46, 2124–2131. doi:10.1128/AAC.46.7.2124
- Lin, J., Yan, M., Sahin, O., Pereira, S., Chang, Y.J., Zhang, Q., 2007. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1678–1686. doi:10.1128/AAC.01411-06
- Loman, N.J., Pallen, M.J., 2015. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 1–9. doi:10.1038/nrmicro3565
- Luber, P., Wagner, J., Hahn, H., Bartelt, E., 2003. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated in 1991 and 2001–2002 from Poultry and Humans in Berlin, Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3825–3830. doi:10.1128/AAC.47.12.3825
- Luo, N., Pereira, S., Sahin, O., Lin, J., Huang, S., Michel, L., Zhang, Q., 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 102, 541–546. doi:10.1073/pnas.0408966102
- Manning, G., Dowson, C.G., Mary, C., Ahmed, I.H., West, M., Newell, D.G., Bagnall, M.C., 2003. Multilocus Sequence Typing for Comparison of Veterinary and Human Isolates of *Campylobacter jejuni* Multilocus Sequence Typing for Comparison of Veterinary and Human Isolates of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11), 6370–6379. doi:10.1128/AEM.69.11.6370
- Manning, G., Duim, B., Wassenaar, T., Wagenaar, J.A., Ridley, A., Newell, D.G., 2001. Evidence for a Genetically Stable Strain of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1185–1189. doi:10.1128/AEM.67.3.1185-1189.2001
- Manrique, C.T., 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming 1–48.

Referencia

- Martínez, J.L., Baquero, F., Andersson, D.I., 2011. Beyond serial passages: New methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 439–445. doi:10.1016/j.coph.2011.07.005
- Martinez, J.L., Coque, T.M., Baquero, F., 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 116–123. doi:10.1038/nrmicro3399
- Matushek, M.G., Bonten, M.J., Hayden, M.K., 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2598–2600.
- McCarthy, N.D., Colles, F.M., Dingle, K.E., Bagnall, M.C., Manning, G., Maiden, M.C.J., Falush, D., 2007. Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 267–272. doi:10.3201/eid1302.060620
- McFarland, B.A., Neill, S.D., 1992. Profiles of toxin production by thermophilic *Campylobacter* of animal origin. *El sevier* 30, 257–266.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R. V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607–625. doi:10.3201/eid0505.990502
- Meade, K.G., Narciandi, F., Cahalane, S., Reiman, C., Allan, B., O'Farrelly, C., 2009. Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. *Immunogenetics* 61, 101–110. doi:10.1007/s00251-008-0346-7
- Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M.L., Jaime, I., Rovira, J., 2012. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol.* 32, 124–128. doi:10.1016/j.fm.2012.04.020
- Messad, S., Hamdi, T.M., Bouhamed, R., Ramdani-Bouguessa, N., Tazir, M., 2014. Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. *Food Control* 40, 324328. doi:10.1016/j.foodcont.2013.12.016
- Michaud, S., Menard, S., Gaudreau, C., Arbeit, R.D., 2001. Comparison of Small-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *KpnI*: A population-based study. *J. Med. Microbiol.* 50, 1075–1081.
- Miller, R.S., Miller, W.G., Behringer, M., Hariharan, H., Matthew, V., Oyarzabal, O.A., 2010. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1041–1049. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04507.x

- Miller, W.G., Chapman, M.H., Yee, E., On, S.L.W., McNulty, D.K., Lastovica, A.J., Carroll, A.M., McNamara, E.B., Duffy, G., Mandrell, R.E., 2012. Multilocus sequence typing methods for the emerging *Campylobacter* Species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 45. doi:10.3389/fcimb.2012.00045
- Miller, W.G., On, S.L.W., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A.J., Mandrell, R.E., Town, C., Africa, S., *Icrobiol, J.C.L.I.N.M.*, 2005. Extended Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2315–2329. doi:10.1128/JCM.43.5.2315
- Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P.J.A., Pritchard, L., Cardle, L., Shawand, P.D., Marshall, D., 2013. Using tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief. Bioinform.* 14, 193–202. doi:10.1093/bib/bbs012
- Monteville, M.R., Konkel, M.E., 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infect. Immun.* 70, 6665–6671. doi:10.1128/IAI.70.12.6665-6671.2002
- Moore, J.E., 2005. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36:, 351–382. doi:10.1051/vetres
- Moore, J.E., Barton, M.D., Blair, I.S., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A.J., Lowery, C.J., Matsuda, M., McDowell, D.A., McMahon, A., Millar, B.C., Rao, J.R., Rooney, P.J., Seal, B.S., Snelling, W.J., Tolba, O., 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* 8, 1955–1966. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.030
- Moran, L., Scates, P., Madden, R., 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *J Food Prot.* 72, 1830–5.
- Müller, J., Schulze, F., Müller, W., Hänel, I., 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet. Microbiol.* 113, 123–129. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.029
- Müllner, P., Collins-Emerson, J.M., Midwinter, A.C., Carter, P., Spencer, S.E.F., Van Der Logt, P., Hathaway, S., French, N.P., 2010. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in a geographically isolated country with a uniquely structured poultry industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2145–2154. doi:10.1128/AEM.00862-09
- Nachamkin, I., Allos, B.M., Ho, T., 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev* 11, 555–567.
- Nadeau, E., Messier, S., Quessy, S., 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of

Referencia

- campylobacteriosis in humans. *J. Food Prot.* 65(1); 73–8.
- Neal-McKinney, J., 2010. NIH Public Access. Computer (Long. Beach. Calif). 144, 724–732. doi:10.1038/jid.2014.371
- Newell, D.G., Fearnley, C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343–4351. doi:10.1128/AEM.69.8.4343
- Newell, D.G., Wagenaar, J.A., 2000. Poultry infections and their control. *Campylobacter*, 2nded. I. Nachamkin, ed. J.J. Blaser ASM Press, 497–510.
- Nobile, C.G.A., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C., Pavia, M., 2013. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control* 32, 715–718. doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.011
- Notermans, S., 1994. Epidemiology and surveillance of *Campylobacter* infections. *World Heal. Organ. Geneva, Switz.* 35–44. In Report on a WHO consultation on epidemio.
- Nylen, G., Dunstan, F., Palmer, S.R., Andersson, Y., Bager, F., Cowden, J., Feierl, G., Galloway, Y., Kapperud, G., Megraud, F., Molbak, K., Petersen, L.R., Ruutu, P., 2002. The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol. Infect.* 128, 383–90. doi:10.1017/S0950268802006830
- O, S., O, L., S, H., Q, Z., 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69; 5372–5379.
- Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and applications of ligation mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 1661–1669. doi:10.18388/abp.2015_1192
- On, S.L., 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.* 90; 1S–15S.
- On, S.L., Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M., 1998. Validity of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by Sall, KpnI, and BamHI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect* 120, 231–237. doi:10.1017/S0950268898008668
- On, S.L.W., 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *J. Microbiol. Methods* 95, 3–7. doi:10.1016/j.mimet.2013.06.011

- Oporto, B., Juste, R.A., Hurtado, A., 2009. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from cattle, sheep, and free-range poultry faeces. *Int. J. Microbiol.* 2009. doi:10.1155/2009/456573
- Oyarzabal, O.A., Williams, A., Zhou, P., Samadpour, M., 2013. Improved protocol for isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat and use of pulsed field gel electrophoresis for the typing of isolates. *J. Microbiol. Methods* 95, 76–83. doi:10.1016/j.mimet.2013.03.008
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., 2000. First genome sequence paper 665–668. doi:10.1038/35001088
- Payot, S., Bolla, J.M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F., Zhang, Q., 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 8, 1967–1971. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.032
- Payot, S., Dridi, S., Laroche, M., Federighi, M., Magras, C., 2004. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet. Microbiol.* 101, 91–99. doi:10.1016/j.vetmic.2004.03.014
- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., Colwell, R.R., 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 987–996.
- Pearson, B.M., Gaskin, D.J.H., Segers, R.P.A.M., Wells, J.M., Nuijten, P.J.M., Van Vliet, A.H.M., 2007. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *J. Bacteriol.* 189, 8402–8403. doi:10.1128/JB.01404-07
- Pei, Z., Blaser, M.J., 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J. Biol. Chem.* 268, 18717–18725.
- Pendleton, S., Hanning, I., Biswas, D., Ricke, S.C., 2013. Evaluation of whole-genome sequencing as a genotyping tool for *Campylobacter jejuni* in comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *flaA* typing. *Poult. Sci.* 92, 573–80. doi:10.3382/ps.2012-02695
- Pérez-Boto, D., García-Peña, F.J., Abad-Moreno, J.C., Echeita, M.A., 2013. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from two early stages of poultry production. *Microb. Drug Resist.* 19, 323–30. doi:10.1089/mdr.2012.0160
- Pérez-Boto, D., Herrera-León, S., García-Peña, F.J., Abad-Moreno, J.C., Echeita, M. a, 2014. Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol.* 43, 176–82. doi:10.1080/03079457.2014.898245

Referencia

- Pfaller, M.A., 1999. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123, 1007–1010.
- Pickett, C.L., Whitehouse, C.A., 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* 7, 292–297. doi:10.1016/S0966-842X(99)01537-1
- Piddock, L.J. V., 1995. Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 36, 891–898.
- Piddock, L.J. V, Ricci, V., Pumbwe, L., Everett, M.J., Griggs, D.J., 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 19–26. doi:12493783
- Poly, F., Guerry, P., 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24(1);, 27–31.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0009490
- Pumbwe, L., Piddock, L.J., 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* 206, 185–189.
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. doi:10.1093/bioinformatics/btq033
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2001. Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1889–1894. doi:10.1128/JCM.39.5.1889
- Ridley, A.M., Morris, V.K., Cawthraw, S.A., Ellis-Iversen, J., Harris, J.A., Kennedy, E.M., Newell, D.G., Allen, V.M., 2011. Longitudinal molecular epidemiological study of thermophilic campylobacters on one conventional broiler chicken farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 98–107. doi:10.1128/AEM.01388-10
- Ridley, A.M., Toszeghy, M.J., Cawthraw, S.A., Wassenaar, T.M., Newell, D.G., 2008. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. *J. Appl. Microbiol.* 105, 95–104. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03759.x
- Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G., 2005. Isolates Recovered from Free-Range Broiler Farms and Comparison with Isolates of Various Origins † 71, 6216–6227. doi:10.1128/AEM.71.10.6216
- Rosef, O., Kapperud, G., 1983. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of

- Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 381–383.
- Ruiz, J., Goñi, P., Marco, F., Gallardo, F., Mirelis, B., Jimenez De Anta, T., Vila, J., 1998. Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. Microbiol. Immunol. 42, 223–226.
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM), 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull. 18, 20380. doi:20380 [pii]
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., José, M., Baquero, F., Torres, C., Jose, M., Sa, Y., 2000. Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals , Foods , and Humans in Spain in 1997 – 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 267–271. doi:10.1128/AAC.44.2.267-271.2000.Updated
- Sahin, O., Fitzgerald, C., Stroika, S., Zhao, S., Sippy, R.J., Kwan, P., Plummer, P.J., Han, J., Yaeger, M.J., Zhang, Q., 2012. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. J. Clin. Microbiol. 50, 680–687. doi:10.1128/JCM.06167-11
- Sails, A.D., Swaminathan, B., Fields, P.I., 2003. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41, 4058–4067. doi:10.1128/JCM.41.9.4058-4067.2003
- Samuel, M.C., Vugia, D.J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., Kassenborg, H., Reilly, K., Kennedy, M., Angulo, F., Tauxe, R. V, 2004. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. Clin. Infect. Dis. 38 Suppl 3, S165–S174. doi:10.1086/381583
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, a, Tocilj, a, Albrecht, R., Yonath, a, Franceschi, F., 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature 413, 814–821. doi:10.1038/35101544
- Schorr, D., Schmid, H., Rieder, H., Baumgartner, A., Vorkauf, H., Burnens, A., 1994. Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland. 196(4):, 327–37.
- Schulze, F., Hänel, I., Borrmann, E., 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. ELSEVIER 288, 225–236.
- Schwartz, D.C., Charles R, C., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. 37, 67–75.

Referencia

- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 601–604. doi:10.1093/jac/dkq037
- Shane, S., Montrose, M., Harrington, K., 1985. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis.* 29 (2); 384–91.
- Shanker, S., Lee, A., Sorrell, T.C., 1990. Horizontal transmission of *Campylobacter jejuni* amongst broiler chicks: experimental studies. *Epidemiol. Infect.* 104, 101–10. doi:10.1017/S0950268800054571
- Sheppard, S.K., Didelot, X., Meric, G., Torralbo, A., Jolley, K. a, Kelly, D.J., Bentley, S.D., Maiden, M.C.J., Parkhill, J., Falush, D., 2013. Genome-wide association study identifies vitamin B5 biosynthesis as a host specificity factor in *Campylobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1–5. doi:10.5061/dryad.28n35.
- Sheppard, S.K., McCarthy, N.D., Jolley, K.A., Maiden, M.C.J., 2011. Introgression in the genus *Campylobacter*: Generation and spread of mosaic alleles. *Microbiology* 157, 1066–1074. doi:10.1099/mic.0.045153-0
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., Teixeira, P., 2011. *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. *Front. Microbiol.* 2, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2011.00200
- Skarp, C.P.A., Hänninen, M.L., Rautelin, H.I.K., 2016. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 103–109. doi:10.1016/j.cmi.2015.11.019
- Skirrow, M., Butzler, J., 2000. In *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M.J., (Eds.). Am. Soc. Microbiol. Press. Washington, DC. 89–120.
- Skirrow, M.B., 1977. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *Br. Med. J.* 2, 9–11. doi:10.1136/bmj.2.6078.9
- Skirrow, M.B., Blaser, M.J., 1992. Clinical and epidemiologic considerations. In *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Nachamkin, I., Blaser, M.J., Tompkins, L.S., (Eds.). Washington, DC. 3–8.
- Smith, T., Taylor, M.S. 1919., 1919. Morphological characters 1993.
- Sproston, E.L., Ogden, I.D., MacRae, M., Dallas, J.F., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Colles, F.M., Wilson, M.J., Forbes, K.J., Strachan, N.J.C., 2011. Temporal variation and

- host association in the *Campylobacter* population in a longitudinal ruminant farm study. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6579–6586. doi:10.1128/AEM.00428-11
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R. V., 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 382–389. doi:10.3201/eid0703.017303
- Taboada, E.N., Clark, C.G., Sproston, E.L., Carrillo, C.D., 2013. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J. Microbiol. Methods* 95, 24–31. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.007
- Talukder, K.A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I.J., Dutta, D.K., Hossain, S., Nur-E-Kamal, A., Nair, G.B., Cravioto, A., Sack, D.A., Endtz, H.P., 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1485–1488. doi:10.1128/JCM.01912-07
- Taroco R, S.V., Vignoli, R., 2008. Temas de bacteriología y virología médica. Métodos de estudios de la sensibilidad antibiótica.
- Tauxe, R.V., 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends* ed. Washingt. Am. Soc. Microbiol. 9–19.
- Taylor, D.E., Garner, R.S., Allan, B.J., 1983. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24, 930–935. doi:10.1128/AAC.24.6.930
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239. doi:0095-1137/
- Ternhag, A., Asikainen, T., Giesecke, J., Ekdahl, K., 2007. A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 44, 696–700. doi:10.1086/509924
- Thakur, S., 2010. Genotypic Profile Comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Humans and Retail Meats 7. doi:10.1089/fpd.2009.0487
- Thakur, S., Gebreyes, W. a, 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J. Food Prot.* 68, 2402–10. doi:10.1128/JCM.43.11.5705

Referencia

- Thakur, S., Morrow, W.E.M., Funk, J.A., Bahnson, P.B., Gebreyes, W.A., 2006. Molecular epidemiologic investigation of *Campylobacter coli* in swine production systems, using multilocus sequence typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5666–5669. doi:10.1128/AEM.00658-06
- Urdaneta, S., 2016. Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granas de pollos de engorde: prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección. Universitat Autònoma de Barcelona.
- van de Giessen, a W., Bloemberg, B.P., Ritmeester, W.S., Tilburg, J.J., 1996. Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 117, 245–250. doi:10.1017/S0950268800001412
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2007. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56, 1284–1289. doi:10.1099/jmm.0.47342-0
- van Vliet, A., Ketley, J.M., 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30, 45S–56S.
- van Vliet, A.H., Ketley, J.M., 1991. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 41:, 88–103.
- Vandamme, P., 2000. Microbiology of *Campylobacter* infections: taxonomy of the family Campylobacteracea. Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Eds.), *Campylobacter*. ASM Press. Washingt. DC 3–26.
- Vandamme, P., De ley, J., 1991. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *Int. J. od Syst. Bacteriol.* 41:, 451–455.
- Velayudhan, J., Jones, M. a, Barrow, P. a, Kelly, D.J., 2004. L -Serine Catabolism via an Oxygen-Labile L -Serine Dehydratase Is Essential for Colonization of the Avian Gut by *Campylobacter jejuni* L -Serine Catabolism via an Oxygen-Labile L -Serine Dehydratase Is Essential for Colonization of the Avian Gut by Campyl. *Infect. Immun.* 72, 260–268. doi:10.1128/IAI.72.1.260
- Velázquez, J., Jiménez, A., Chomón, B., Villa, T., 1995. Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 35, 173–8.
- Veron, M.S.M., 1963. Base DNA content and classification of Vibrios. *Ann. l'Institut Pasteur* 105:, 897–910.
- Walker, R.I., Schmauder-Chock, E.A. Parker, J.L., Burr, D., 2011. Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M cells of rabbit

- Peyer's patches. *Can. J. Microbiol.* 34:, 1142–1147.
- Wassenaar, T.M., 2000. MINIREVIEW Genotyping of *Campylobacter* spp . *Appl. Environ. Microbiol* 66, 1–9. doi:10.1128/aem.66.1.1-9.2000
- Wassenaar, T.M., Fry, B.N., Lastovica, A.J., Wagenaar, J.A., Coloe, P.J., Duim, B., 2000. Genetic characterization of *Campylobacter jejuni* O:41 isolates in relation with Guillain-Barre syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 38, 874–876.
- Wassenaar, T.M., Geilhausen, B., Newell, D.G., 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1816–1821.
- WHO, 2011. Colistin inhibits E. coli O157:H7 Shiga-like toxin release, binds endotoxins and protects Vero cells. *New Microbiol.* 39, 119–123. doi:10.1371/journal.pmed.1001923
- WHO, 1996. Guidelines for Drinking-Water Quality - Second Edition - Volume 2 - Health Criteria and Other Supporting Information. Who 1996 2, 15.
- Wieczorek, K., Kania, I., Osek, J., 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *J. Food Prot.* 76, 1451–5. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-035
- Willis, W., Murray, C., 1997. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult. Sci.* 76(2):, 314–7.
- Willison, H.J., 2005. The immunobiology of Guillain-Barré syndromes. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 10, 94–112. doi:10.1111/j.1085-9489.2005.0010202.x
- Wimalarathna, H.M.L., Richardson, J.F., Lawson, A.J., Elson, R., Meldrum, R., Little, C.L., Maiden, M.C.J., McCarthy, N.D., Sheppard, S.K., 2013. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. *BMC Microbiol.* 13, 160. doi:10.1186/1471-2180-13-160
- Winer, S., Evans, J.G., 1993. Guillain-Barré syndrome in Oxfordshire: clinical features in relation to age. *22(3):*, 164–70.
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186.
- Yao, R., Burr, D.H., Guerry, P., 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol. Microbiol.* 23, 1021–1031. doi:DOI 10.1046/j.1365-2958.1997.2861650.x
- Yates, J., 2005. Traveler's diarrhea. *Am. Fam. Physician* 71.

Referencia

- Ying, W., Diane E, T., 1990. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. 94, 23–28.
- Young, K.T., Davis, L.M., Dirita, V.J., 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol. 5, 665–679. doi:10.1038/nrmicro1718
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S., De Luca, G., 2009. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 33:, 315–321.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V., 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2640–2644. doi:10.1093/jac/dks261
- Zhao, C., Ge, B., Villena, J. De, Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., 2001. *Escherichia coli* and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken , Turkey , Pork , and Beef from the Greater Washington , DC. Area. Appl Microbiol 67, 5431–5436. doi:10.1128/AEM.67.12.5431
- Zhao, S., Young, S.R., Tong, E., Abbott, J.W., Womack, N., Friedman, S.L., McDermott, P.F., 2010. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7949–56. doi:10.1128/AEM.01297-10