



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
I. Etiología	3
II. Epidemiología, casos y aspectos clínicos	4
III. Patogenia e inmunidad en humanos	6
IV. Patogenia e inmunidad en pollos	7
V. Prevalencia en pollos	8
VI. Transmisión de <i>Campylobacter</i>	9
VII. Diagnóstico de <i>Campylobacter</i>	13
3. Justificación y objetivos	16
4. Metodología	16
I. Explotación ganadera	16
II. Toma de muestras	18
III. Análisis qPCR	22
5. Resultados y discusión	24
I. Resultado de las calzas en las explotaciones de reproductoras pesadas	25
II. Resultado de las calzas en la explotación de broilers	25
III. Resultado de esponjas tomadas en los huevos	26
IV. Resultado de las muestras tomadas el primer día de vida de los pollitos	26
V. Resultado complementario de las muestras tomadas durante la crianza de los pollos	27
VI. Discusión	28
6. Conclusiones	29
7. Valoración personal	29
8. Bibliografía	30
9. Anexos	33

1. RESUMEN

La campilobacteriosis humana es la primera causa de gastroenteritis bacteriana en la Unión Europea transmitida a través de los alimentos, sobre todo a partir del consumo de la canal de pollo y derivados cárnicos. La transmisión horizontal es claramente una vía de infección de *Campylobacter* a nivel de granja, mientras que algunos estudios apoyan la existencia de transmisión desde las reproductoras pesadas a su progenie. Así, el presente Trabajo se ha realizado para comprobar la ausencia de transmisión vertical mediante el seguimiento periódico de una manada de broilers procedentes de unos progenitores infectados por este microorganismo.

Todas las muestras tomadas en este estudio fueron analizadas siguiendo la misma metodología, PCR a tiempo real con el fluoróforo *SYBR Green I*. Las muestras que se recogieron provenían de: reproductoras pesadas (calzas y esponjas de huevos), incubadora (meconio y esponjas de huevos), dos naves de broilers (calzas y cartones) y componentes presentes en las naves (*Alphitobius* y plásticos). Los resultados revelaron que a pesar de la presencia en dichas reproductoras, no se encontró *Campylobacter* en su descendencia hasta pasada la tercera semana de vida de los pollos (día 21), ni tampoco se detectó en el resto de muestras tomadas salvo en una muestra de huevos procedentes de la cinta transportadora de una de las explotaciones de reproductoras. Una vez infectada la primera nave de broilers, este género bacteriano se extendió rápidamente a la otra, aumentando notablemente en cuestión de una semana su carga. La única especie de *Campylobacter* detectada en la explotación de broilers fue *C. jejuni*. Estos resultados demuestran nuestra hipótesis y por tanto, las reproductoras pesadas no son el foco principal de actuación para controlar esta zoonosis.

ABSTRACT

Food-borne outbreaks of campylobacteriosis caused by poultry meat and products thereof are the main source of bacterial gastroenteritis in the European Union. The horizontal transmission is clearly a route of infection in broilers farms. Some authors support the presence of vertical transmission from broilers breeders hens to their progeny. The aim of the present study was to verify the absence of vertical transmission from infected broilers breeders hens to their progeny by periodically monitoring a flock for *Campylobacter*.

All samples taken in this study were analyzed using the same methodology, real-time PCR with SYBR Green I fluorophore. Samples collected from: broilers breeders hens (sterile device for microbiological surface testing and eggs by sponge-sticks), incubator (meconium

and eggs), two farms of broilers (sterile device for microbiological surface testing and cartons) and other components present in the farms (*Alphitobius* and plastics). Results showed absence of *Campylobacter* in broilers farms until the third week of production cycle (21 days), eventhough this bacteria was detected in the broilers breeders hens. Besides, the results from other types of samples were negative with the exception of an egg sample from one of the broiler breeder farm. Once a farm was infected, this bacterial genus spread quickly to other units, increasing remarkably its load in a matter of one week. The only species of *Campylobacter* detected in the broiler farm was *C. jejuni*. These results demonstrate our hypothesis and therefore, the broilers breeders hens are not to be considered as the main target for controlling this zoonoses.

2. INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis humana es la primera causa de gastroenteritis bacteriana en la Unión Europea (UE) transmitida a través de los alimentos, sobre todo a partir del consumo de la canal de pollo y derivados cárnicos (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), 2015). La prevalencia en granja es muy alta, alcanzando el 88% en España (EFSA, 2010) y todavía se desconoce parte de la epidemiología de esta enfermedad asintomática en pollos, lo que hace tan difícil el control de la misma (García et al., 2013). Numerosos autores están investigando acerca de las posibles fuentes de infección para intentar comprender las elevadas tasas de infección que genera. Una de las posibilidades que se plantean consiste en la existencia de una transmisión vertical, pero como se verá más adelante, se trata de un tema que genera mucha controversia en la actualidad.

I. Etiología

Estudios recientes basados en la hibridación de ADN y ARN ribosómico (ARNr) y secuenciaciones sobre el gen 16S ARNr indican que la familia (Fª) *Campylobacteraceae* representa a un grupo diverso pero filogenéticamente distinto dentro del grupo de bacterias Gram-negativas, conocido como épsilon-Proteobacteria. Dentro de la Fª *Campylobacteraceae* se encuentra el género (Gº) *Campylobacter*. Actualmente contiene 36 especies (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. showae*, *C. rectus*, *C. sputorum*, *C. gracilis*, *C. volucris*, *C. ureolyticus*, *C. subantarcticus*, *C. pylori*, *C. peloridis*, *C. nitrofigilis*, *C. mustelae*, *C. lanieae*, *C. insulaenigrae*, *C. iguaniorum*, *C. hyoilei*, *C. hominis*, *C. hepaticus*, *C. geocheilonis*, *C. fennelliae*, *C. cuniculorum*,

C. cryaerophilus, *C. corcagiensis*, *C. cinaedi*, *C. canadiensis*, *C. butzleri* y *C. avium*) y 14 subespecies (*The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*, 2017, <http://www.bacterio.net/>).

Las especies del G° *Campylobacter* pueden crecer a 37 °C en medios artificiales, pero las especies termofílicas poseen una temperatura óptima alrededor de 42 °C (Shane, 1992). Éstas son de crecimiento lento y exigente y requieren de condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (Prescott y Munroe, 1982). Este organismo tiene una morfología característica en forma de S (bacilos en espiral) de 0,2 a 0,8 micrómetros (µm) de ancho y de 0,5 a 6,0 µm de largo. Son especies Gram negativas, no forman esporos y poseen un flagelo polar que dota a los organismos de una movilidad característica en forma de sacacorchos (Shane, 1992). Además, mayoritariamente son incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos por lo que su energía proviene de la degradación de aminoácidos o intermediarios del ciclo de ácido tricarbóxico (Shane, 1992). Todas las especies se caracterizan por tener un bajo contenido cromosómico en G + C.

II. Epidemiología, casos y aspectos clínicos

Algunas especies del G° *Campylobacter* se asocian con numerosas enfermedades tanto en humanos como en animales, aunque también existen algunas que son consideradas especies comensales (On, 1996). Las especies termófilas (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*) son los agentes causantes dominantes de la campilobacteriosis humana y por ello, son conocidas como especies de significado clínico (Jacobs-Reitsma, 2000). *C. jejuni* es la especie de mayor prevalencia debido a que es más intoxicaciones alimentarias provoca, seguida de *C. coli* siendo la especie de mayor severidad y, en menor medida, de *C. lari* (Jacobs-Reitsma, 2000).

La principal vía de contagio al ser humano es el consumo de carne de pollo insuficientemente cocinada o cruda, consumo de productos cárnicos o contaminaciones cruzadas (50-80%). Otras posibles vías de contagio son el agua sin tratar, la leche cruda o carne de cerdo y ternera (Corry y Atabay, 2001; García et al., 2013).

La dosis infectante de *C. jejuni* para los seres humanos es baja, entre 500 y 800 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Campylobacter* (Black et al, 1988). El período de incubación habitual después de la ingestión de *C. jejuni* es aproximadamente entre 24-72 horas, pudiendo alargarse hasta una semana (Blaser, 1997). El principal síntoma clínico es diarrea aguda con cólicos abdominales severos. La diarrea inicialmente acuosa, se vuelve sanguinolenta a medida que la enfermedad progresa (Blaser, 1997). Otros síntomas que produce son dolor abdominal,

fiebre, náuseas, dolor de cabeza y vómitos (Alterkruse et al., 1999). Las muertes por *Campylobacter* son raras y ocurren principalmente en lactantes, pacientes inmunocomprometidos y ancianos. Se recogen algunos casos de complicaciones graves como osteomielitis, nefritis, miocarditis, cistitis, pancreatitis, aborto séptico, septicemia, síndrome de Guillain-Barré que cursa con desmielinización aguda de los nervios periféricos, compromiso respiratorio y muerte (Nachamkin et al., 1998) y síndrome de Reiter que cursa con artritis reactiva, pero estos casos en menor frecuencia (Skirrow y Blaser, 2000). La transmisión de la infección de persona a persona es poco frecuente (Schmid et al., 1987).

Durante las primeras 24-48 horas suelen producirse los peores síntomas, y la enfermedad se resuelve gradualmente en una semana sin tratamiento por su carácter autolimitante. Aproximadamente en el 20 % de los casos, los pacientes que no obtuvieron tratamiento, mostraron recidivas a *Campylobacter* pero fueron menos severas que el primer cuadro clínico (Blaser, 1997). A pesar de haber tomado antibiótico, un paciente infectado puede excretar *Campylobacter* en las heces durante semanas después de desaparecer sus síntomas.

Como se ha mencionado, la especie *C. jejuni* es la principal causa de enfermedades bacterianas transmitidas al ser humano a través de los alimentos registradas en Estados Unidos (EE. UU.) y otros países desarrollados (Adak et al., 2002). En estos países, las tasas de infección más elevadas se dan en lactantes (menores de un año de vida), debido a su inmunidad inmadura, y en adultos jóvenes (de los 15 a los 30 años de edad) se asocia con prácticas inadecuadas en la manipulación de alimentos (Blaser, 1997; Alterkruse et al., 1999).

Los brotes de *Campylobacter* son raros, siendo más frecuentes los casos de naturaleza esporádica y ambos tienen características epidemiológicas diferentes (Alterkruse et al., 1999). La mayoría de los brotes se originan con el consumo de leche cruda y agua superficial contaminada, con incidencia en primavera y otoño, mientras que los casos esporádicos guardan relación con el consumo de carne cruda de aves de corral o contaminaciones cruzadas durante la preparación de los alimentos (Corry y Atabay, 2001). Ocasionalmente, estos casos esporádicos durante los meses de verano se asocian con una mayor población de vectores, lo que favorece la probabilidad de infección de los pollos, junto con un aumento en el consumo de carne de pollo así como el consumo de productos crudos susceptibles a contaminaciones cruzadas (ensaladas) (Alterkruse et al., 1999; Friedman et al., 2000).

III. Patogenia e inmunidad en humanos

La infección por *Campylobacter* depende del individuo y de factores específicos del patógeno (ninguno de ellos tiene un papel testado). La bacteria penetra en el organismo junto con el alimento o agua de bebida, sobrevive a la acidez estomacal y coloniza la porción distal del íleon y colon, donde se adhiere a la superficie de las células intestinales. Una vez ahí, la bacteria altera la capacidad de absorción de dichas células debido a la invasión celular, a la liberación de toxinas y/o a la inducción de reacciones inflamatorias (Ketley, 1997).

Los factores que determinan la virulencia de *Campylobacter* son la quimiotaxis, la motilidad, el flagelo, la invasión de células hospedadoras, la captación de hierro, la producción de toxinas, la inflamación, la producción de lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas de estrés. El flagelo es el factor más estudiado en esta bacteria, exhibe la fase y la variación antigénica, y es necesario para la invasión y colonización en animales y humanos (Ketley, 1997). Otro factor importante es la capacidad de adhesión e invasión de células intestinales para los cuales intervienen una serie de determinantes que incluyen los LPS, el flagelo, los filamentos fimbriales y algunas proteínas expuestas a la superficie (van Vliet y Ketley, 2001; Wassenaar y Blaser, 1999).

Investigaciones epidemiológicas y estudios experimentales con humanos y otros mamíferos revelan que como resultado de una infección previa de *Campylobacter* puede desarrollar una inmunidad protectora, ésta puede ser eficaz frente a las manifestaciones de la enfermedad pero no contra la colonización (Wassenaar y Blaser, 1999). Así pues, la exposición continuada frente a la bacteria en países en vías de desarrollo, está relacionada con la amplia difusión de infecciones asintomáticas que incrementan con la edad debido a un aumento de anticuerpos circulantes e intestinales (Martin et al., 1989). Mientras que en los países desarrollados, la exposición al agente es menor por lo que la inmunidad a la enteritis de *Campylobacter* ocurre frecuentemente en individuos expuestos profesionalmente a *Campylobacter* (veterinarios, agricultores, trabajadores de matadero), en éstos, los niveles de anticuerpos circulantes también se elevan (Cawthraw et al., 2000).

La mayoría de los pacientes con infección por *Campylobacter* desarrollan anticuerpos circulantes dirigidos contra varios antígenos de este género bacteriano. Los títulos de IgA e IgM alcanzan el pico temprano (alrededor del décimo día) y después de la infección, sus títulos disminuyen rápidamente. Por el contrario los niveles de IgG se alcanzan más tarde (hasta 3-4 semanas post-infección) y sus títulos específicos son de larga duración (hasta 1-2 años).

Además de esto, las infecciones con *Campylobacter* inducen inmunidad en sitios locales, debido a su tropismo entérico, es probable que los anticuerpos específicos en el intestino desempeñen un papel importante en la inmunidad protectora. Se han detectado anticuerpos de la mucosa específicos contra *Campylobacter*, (especialmente IgA) en heces, orina, leche y saliva.

Además de la respuesta inmune humoral, la inmunidad celular parece tener también un papel importante para limitar y eliminar la infección, ya que pacientes inmunodeprimidos con el virus de la inmunodeficiencia humana (Wassenaar y Blaser, 1999) tienen mayor incidencia, gravedad y recaída de las infecciones por *Campylobacter*.

IV. Patogenia e inmunidad en pollos

Cuando un pollo se infecta por *C. jejuni* se produce una colonización del intestino, principalmente de las criptas cecales y cloacales (Achen et al., 1998). Sin embargo, también puede alcanzar otras estructuras como intestino delgado, molleja, hígado, bazo y vesícula biliar (Young et al., 1999).

La infección de *C. jejuni* en pollos tiene varias características diferentes a la infección producida por éste en mamíferos (puede invadir las células epiteliales y producir cambios patológicos en la absorción). En las aves se localiza en la capa mucosa de las criptas sin adherirse directamente a las células epiteliales, no produce lesiones macroscópicas o microscópicas y normalmente no se produce una invasión del epitelio intestinal. Todo esto nos señala la perfecta adaptación de la bacteria al hospedador avícola, siendo a veces considerada como flora intestinal normal del pollo (Achen et al., 1998). Una vez infectado, el pollo tiene una alta cantidad de *C. jejuni* en el tracto intestinal y lo excreta en las heces durante un mínimo de 12 semanas con una concentración de hasta 10^8 UFC/gramo de heces, todo esto sin consecuencias clínicas aparentes (Stern et al., 1995). Sin embargo, si la bacteria coloniza el ciego, no tiene por qué desencadenar una excreción detectable en heces (Achen et al., 1998).

Un estudio que realizó la inoculación artificial de *C. jejuni* reveló una serie de factores relacionados con la colonización cecal de este organismo. La dosis de inóculo está relacionada con la tasa de colonización (Shain et al., 2001), y oscila alrededor de 35 UFC por ave tras la inoculación por vía oral (Stern et al., 1988), aunque la dosis infecciosa mínima varíe dependiendo de las cepas y de la edad de los pollos (Shain et al., 2001). Algunos estudios concluyeron que la dosis necesaria para infectar por vía oral es aproximadamente unas 100 veces mayor que la necesaria para la vía cloacal (Young et al., 1999). Aunque el hospedador

avícola detecta como comensal a *Campylobacter*, la colonización induce respuestas humorales sistémicas y mucosas (Rice et al., 1997). Después de la infección, los niveles de IgM e IgA específicos circulantes aumentan, alcanzando niveles significativos entre 1-2 días post-infección, pero el pico máximo lo adquieren a las 4-6 semanas post-infección, después estos niveles disminuyen gradualmente. Por el contrario, los niveles de IgG tardan más tiempo en aparecer pero son más duraderos adquiriendo su máximo en torno a las 8-9 semanas post-infección (Cawthraw et al., 1994).

La colonización de *Campylobacter* también provoca una respuesta inmune considerable en pollos colonizados de forma natural, donde los anticuerpos específicos se transfieren fácilmente a su progenie (Sahin et al., 2001). Una amplia variedad de antígenos son reconocidos por el suero de pollo, siendo la flagelina la más común, aunque los antígenos que inducen la inmunidad protectora todavía no han sido identificados (Rice et al., 1997).

V. Prevalencia en pollos

La prevalencia de *Campylobacter* en granja depende de muchos factores como la edad de los pollos, la estación, el manejo, la alimentación, etc. Pese a todas estas variantes la especie más frecuente es *C. jejuni*, siendo la de mayor importancia debido a su alta prevalencia, seguida de *C. coli* que resulta ser la especie de mayor severidad.

En el caso de los pollos de engorde se puede alcanzar una prevalencia del 100% a la edad de sacrificio, lo que lleva a una contaminación de las canales en la planta de procesado (García et al., 2013). En los lotes de pollos comerciales la prevalencia varía mucho en función de la edad, raramente se encuentra en pollos de engorde menores de 2-3 semanas de vida, aunque de manera experimental se pueden infectar pollos con *Campylobacter* al día uno de edad (Cawthraw et al., 1994).

A pesar de que *C. jejuni* es una especie muy prevalente en pollos de engorde, hay algunas manadas que permanecen libres de *Campylobacter* durante toda su vida. Pollos ecológicos y camperos (libre distribución) también tienen elevada prevalencia, lo que indica que los distintos métodos de cría son vulnerables a la invasión de este organismo. Además de la colonización de pollos también se produce en otras aves domésticas (patos, pavos, avestruces, gansos) (Ley et al., 2001; Aydin et al., 2001).

Para reducir al mínimo todas estas variables la UE desarrolló un estudio en 2008 basado en el análisis de una mezcla de 10 ciegos de pollos del mismo lote tomados en matadero y el análisis de una canal de ese mismo lote para la detección de *Campylobacter*, el resultado

mostró grandes diferencias entre países tanto en el análisis de ciegos como en el de canales (EFSA, 2010).

Por otro lado se observó que en condiciones de campo los pollos permanecían libres de esta bacteria hasta el día 10-14, se creía que este hecho guardaba relación con la inmunidad materna que le proporcionaba el vitelo. Por ello, García et al., (2013) idearon un estudio utilizando dos lotes de pollos, uno procedente de granja libre (sin anticuerpos) y otro de granja infectada de *Campylobacter* (con anticuerpos maternos), ambos lotes se dividieron en dos, a uno se le alimentó con pienso de cría y otro con pienso de producción. En el resultado se observó que ningún sublote se había infectado antes de los 10 días de edad. Los primeros sublotes en infectarse fueron los que habían consumido pienso de producción, por lo que concluyeron que el estado intestinal y la alimentación tenían mayor importancia que la presencia de anticuerpos maternos.

Aunque la bacteria colonice en primer lugar el intestino delgado y ciegos, también puede encontrarse en hígado, bazo y otras zonas del intestino (Achen et al., 1998). La infección se transmite rápidamente por el lote debido a la rápida multiplicación en el organismo infectado (llegando hasta 10^9 UFC/gramo de contenido cecal) que lo elimina fácilmente por las heces. También, esta rápida diseminación se ve favorecida por la coprofagia y la contaminación de alimento y agua en lotes jóvenes, llegando al 95% de infectados en tan solo una semana (García et al., 2013).

En cuanto a la duración de la infección, teóricamente se produce un descenso de la prevalencia así como un descenso en la cantidad de bacterias excretadas a partir de la octava semana en casos experimentales, pero en el caso de los pollos de engorde normalmente permanece durante toda su vida ya que el ciclo completo dura 7 semanas aproximadamente (Berndtson et al., 1996).

La infección por este microorganismo tiene cierta estacionalidad, aumentando en épocas cálidas (estivales). Se desconoce la causa aunque hay algunas hipótesis que señalan un aumento de carga ambiental coincide con un aumento en población de vectores (insectos) y reservorios (animales salvajes o roedores), incrementando así la probabilidad de contacto entre la bacteria y los pollos (García et al., 2013).

VI. Transmisión de *Campylobacter*

Hace más de una década, la transmisión de *Campylobacter* ha sido y sigue siendo un gran debate entre si la transmisión vertical u horizontal es la responsable de la introducción del

microorganismo. Mientras la existencia de transmisión horizontal es evidente, la transmisión vertical sigue siendo un tema ambiguo (Cox et al., 2012; Agunos et al., 2014).

Transmisión horizontal:

Hay claras evidencias de transmisión horizontal desde el medio ambiente como fuente principal de infección avícola. Las posibles fuentes de transmisión son la cama vieja, el agua de bebida no tratada, otros animales domésticos, mascotas, aves silvestres, insectos y roedores, el equipo, vehículos y trabajadores agrícolas, aunque ninguna de ellas ha sido identificada de manera concluyente como fuente habitual de infección de esta bacteria para pollos de engorde. Además, se realizaron estudios en los que se tipificaron los aislamientos de las diversas fuentes posibles y se compararon con los aislamientos tipificados de los pollos que frecuentemente fueron distintos. Estos estudios se diseñaron para detectar ambas especies (*C. jejuni* y *C. coli*), determinando la presencia de *C. jejuni* en fuentes sospechosas después de que los pollos se infectasen, lo que sugiere que estos últimos son los responsables de la contaminación ambiental (Berndtson et al., 1996). En muchas ocasiones fue difícil de averiguar qué hecho fue primero (infección avícola o contaminación ambiental) y no se estableció ningún estudio para averiguarlo.

Debido a que *Campylobacter* es un organismo muy lábil, sensible al oxígeno y a la desecación, generalmente no puede crecer bien en pienso, cama y agua de bebida en condiciones normales, y no suele encontrarse en las muestras tomadas de estas fuentes antes de que los pollos se infecten (van de Giessen et al., 1998; Jacobs-Reitsma, 2000).

La cama puede contaminarse y jugar un papel en el mantenimiento de *C. jejuni* en el ambiente, pero dado que en los países europeos, las granjas se limpian y desinfectan habitualmente y la cama se cambia después de cada crianza, esta fuente es poco probable (Evans, 1992).

Es una práctica común en granjas avícolas utilizar el agua subterránea como agua de bebida para los pollos, y el agua sin clorar ha sido señalada como fuente de *C. jejuni* para ellos (Pearson et al., 1993). Dado que es una bacteria microaerófila y termófila, es poco probable que se propague en agua. Su presencia en aguas (potables, subterráneas, ríos, etc.) se asocia con contaminación a través de heces de ganado o aves silvestres y la presencia de *Campylobacter* en el agua de la granja generalmente se detecta después de infectarse la pollada. Además, en la UE todas las aguas sufren un tratamiento de potabilización, por lo que,

no puede ser una fuente original de contaminación sino una fuente pasiva (van de Giessen et al., 1998).

Los insectos (moscas domésticas, *Alphitobius*, escarabajos oscuros, cucarachas, gusanos de harina) pueden actuar como vectores mecánicos y transmitir *C. jejuni* de los animales reservorio a la manada de pollos (Jacobs-Reitsma, 1997). Los escarabajos de la cama de los pollos (*Alphitobius*) pueden producir plagas siendo capaces de actuar como vector y transmitir el microorganismo de una manada a otras. Se aislaron serotipos y genotipos iguales tanto en los pollos como en los insectos, pero generalmente los insectos de las naves eran positivos para *C. jejuni* cuando el microorganismo se aislaba en los pollos de engorde. Por lo tanto, la posibilidad de que los insectos sean una fuente original de infección es pequeña (Berndtson, 1996).

Los roedores y otros pequeños animales salvajes se consideran fuentes de introducción de *Campylobacter* en la granja, ya que varios estudios han demostrado que pueden portar el organismo en su intestino (Nesbit et al., 2001). En un estudio se encontraron clones de *C. jejuni* durante crianzas consecutivas, lo que sugirió que el organismo sobrevivía en los animales que actuaban como reservorios, éstos no se encontraban en la granja durante la limpieza y desinfección y regresaban después, produciendo la contaminación (Petersen y Wedderkopp, 2001). Teniendo en cuenta el acceso limitado de roedores a las naves y los programas eficaces de control de parásitos en la mayoría de las instalaciones comerciales de producción avícola, es cuestionable el papel de los roedores como fuente común de infección para los pollos.

Las aves silvestres pueden propagar *Campylobacter* a otros animales y seres humanos a través de la contaminación fecal de pastos, forraje y aguas superficiales, debido a su gran movilidad. Los aislamientos de las aves silvestres cercanas a la granja suelen ser diferentes de los del pollo (Nesbit et al., 2001). Dado que las aves silvestres tienen una alta tasa de *C. jejuni* en sus intestinos, deben considerarse un riesgo potencial para transmisión del organismo a la manada de pollos de engorde (Craven et al., 2000).

Otros animales de granja, como ovejas, caballos, otras aves de corral, gatos y perros pueden estar infectados con *C. jejuni* (Stern, 1992), sin embargo, no se ha establecido su posible papel como fuente de infección de pollos de engorde. Los cerdos (frecuentemente infectados con *C. coli*) y los bóvidos son portadores comunes de *Campylobacter*, por lo que la presencia de otros animales en las granjas de engorde se asocia con un mayor riesgo de infección para los pollos. Los estudios revelaron que normalmente los cerdos y los bóvidos

tenían distintas cepas del organismo y cuando eran idénticas no se supo en qué dirección se dio la infección. Todo esto cuestiona el papel del ganado como fuente de infección pero debe tenerse en cuenta que el ganado puede contaminar las praderas y aguas superficiales, lo que puede ser una fuente de infección para los pollos (Stern, 1992; van de Giessen, 1998).

Otra fuente de infección son los trabajadores que forman parte del equipo de carga de las aves para transportarlas al matadero, dado que pueden introducir la bacteria de un explotación a otra si no se cambian de ropa o limpian los jaulones, ya que se rompen las medidas de bioseguridad. *Campylobacter* se ha aislado del agua de los pies, de las botas del agricultor y de las cajas de transporte (Jacobs-Reitsma, 1997; van de Giessen, 1998). Por lo tanto, es razonable suponer que *C. jejuni* puede propagarse entre los lotes de pollos de engorde y las granjas por el movimiento del personal. A esta práctica de reducir la densidad a mitad del ciclo de producción se le conoce con el nombre de clareo o aclarado y se ha descrito como una principal vía de entrada de este género bacteriano en la manada (Koolman et al., 2014).

En general, estas observaciones indican que *C. jejuni* es ubicuitaria en el medio de producción avícola y está muy extendida en el tracto intestinal de muchos animales silvestres y domésticos, lo que hace probable la transmisión del medio ambiente a las granjas. Sin embargo, todavía no se comprende completamente la transmisión de la bacteria en pollos de engorde a partir de fuentes ambientales.

Transmisión vertical

La mayoría de investigadores sugieren la transmisión horizontal de fuentes ambientales como principal vía de transmisión de la infección, y la transmisión vertical como improbable. El poco apoyo en esta hipótesis se debe a varias observaciones: normalmente el pollo no tiene *C. jejuni* hasta que supera las 2-3 semanas de edad (aunque desciendan de manadas infectadas) (van de Giessen, 1998), no toda la descendencia de reproductores infectados presenta el organismo y a menudo tienen serotipos distintos mientras que los que proviene de incubadora pueden compartir los mismos clones (Petersen y Wedderkopp, 2001). La descendencia suele infectarse con cepas que difieren de las de los reproductores (van de Giessen, 1998), por lo que es difícil y raro el aislamiento de *Campylobacter* en huevos de reproductores infectados de manera natural o experimental y no se han detectado organismos vivos de *Campylobacter* en incubadoras o en pollos (Hiett et al., 2002; Jacobs-Reitsma et al., 1995).

A pesar de todo esto, el *Campylobacter* se ha detectado en los oviductos y el semen de los reproductores (Cox et al., 2005). Otra posible vía de entrada del organismo para los pollos incubados es a través de los huevos, ya que ha sido aislado dentro de la cáscara y en las membranas internas (Allen y Griffiths, 2001).

Otro estudio encontró el organismo dentro de los huevos después de desinfectar la cáscara externa y haber sometido los huevos a un enriquecimiento con medios selectivos para su aislamiento (Sahin et al., 2001). Tras infectar huevos con *C. jejuni* mediante inoculación por inyección directa a la albúmina o método diferencial de temperatura, se aisló el organismo de su interior y en los polluelos recién nacidos (Clark y Bueschkens, 1985). Marin et al. (2015), identificaron *Campylobacter* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativa, en pollitos de un día en un estudio que realizaron muestreando polladas descendientes de reproductores positivos.

Todos estos hechos parecen indicar una posible existencia de transmisión vertical, a los cuales se suma el hallazgo de que “Formas Viables Pero No Cultivables”(VBNC) de este organismo podrían reavivarse al inyectarse en el saco vitelino de huevos embrionados (Cappelier et al., 1999), lo que indica que *Campylobacter* entra dentro de los huevos y puede sobrevivir hasta ser potencialmente infectante para los polluelos, a pesar de tener anticuerpos específicos contra el organismo debido a la falta de complemento en el saco vitelino. En otro estudio por medio de PCR encontraron ADN de *Campylobacter* en contenido cecal en recién nacidos y en embriones de 18 días, pero no lo encontraron por medio de cultivo enriquecido (Hiett et al., 2002).

Además, otro artículo indica que a pesar de llevar estrictas medidas de bioseguridad, incluso bajo un ambiente de protección en laboratorio, no se pudo evitar la infección de los pollos. Con estas medidas de seguridad estrictas se consiguió reducir el porcentaje de manadas positivas al organismo (van de Giessen et al., 1998). Del mismo modo, normas de higiene y medidas de bioseguridad seguidas estrictamente antes de la colocación de los pollos de engorde y durante todo el período de crecimiento por todo el personal, redujo la prevalencia de *Campylobacter*, pero no impidió la colonización (Gibbens et al, 2001). Así, aun controlando las fuentes probables de transmisión horizontal, los pollos se siguen infectado con *C. jejuni*, descubriendo la posibilidad de que pueda producirse una transmisión vertical de *C. jejuni*.

Sin embargo, otros muchos estudios no apoyan esta hipótesis, como el realizado por Kruger et al. (2014) en el que se muestrearon a los reproductores y a su descendencia, estandarizando

el manejo y otros hechos importantes para la introducción del organismo, a distintos niveles, sin obtener evidencia de dicha transmisión vertical.

VII. Diagnóstico de *Campylobacter*

Para comprender la epidemiología y la ecología del *Campylobacter* en los reservorios y poder plantear planes para el control de infecciones, los métodos de detección sensibles y seguros son imprescindibles.

El cultivo de *Campylobacter* requiere de medios de crecimiento selectivos, algunos de los más usados son Skirrow, Preston, Karmali, agar de cefoperazona desoxicolato de carbón vegetal modificado (mCCDA), agar de cefoperazona anfotericina teicoplanina (CAT), Campy-CVA (Cefoperazona vancomicina anfotericina), medio Campy-Cefex o CASA® (bioMèriux). Tanto a las placas sólidas de agar como a los medios de enriquecimiento líquidos se les añaden distintos antibióticos para que sólo crezca *Campylobacter*. Entre los antibióticos utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos presentes en las muestras fecales se encuentran los siguientes; polimixina, vancomicina, trimetoprim, rifampicina, cefoperazona, cefalotina, colistina, cicloheximida y nistatina (Corry et al., 1995). Todos los medios selectivos para este organismo contienen agentes que reducen la concentración de oxígeno a un máximo del 5%, neutralizando el efecto tóxico de los radicales de este elemento para el *Campylobacter* (Corry et al., 1995). Estos agentes incluyen varios tipos de sangre, carbón, hematina y una combinación de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio.

Según el tipo de muestra, los medios selectivos pueden usarse tanto en siembra directa como en un paso de enriquecimiento previo a la siembra de colonias de *Campylobacter*. Aunque el paso de enriquecimiento en medio líquido previo a la siembra en agar sólido es más efectivo para procesar alimentos con baja carga, para muestras de origen fecal suele ser más eficaz la siembra directa en el agar con medio selectivo (Jacobs-Reitsma, 2000), ya que las heces contienen una carga lo suficientemente elevada como para realizar una siembra directa (hasta 10^8 UFC/gramos de heces) (Stern, 1992). Cuando se aísla *Campylobacter* a partir de heces es importante considerar la especie y el lugar de recogida de las muestras. Por ejemplo, en el caso de bóvidos y ovejas se puede enriquecer antes de sembrar para aumentar las tasas de recuperación y, en el caso de pollos y cerdos, el enriquecimiento puede reducirlas según la zona intestinal de donde provengan las muestras (Musgrove et al., 2001).

Normalmente las colonias de este género bacteriano aparecen a las 48 horas, pero en el caso de cepas de crecimiento lento pueden tardar hasta 72-96 horas en aparecer (Nachamkin

et al., 2000). Usando *Campylobacter blood free médium agar* o mCCD (medio autorizado y validado por la normativa organización internacional de normalización-ISO), las colonias típicas suelen ser grises, planas, irregulares y delgadas pero pueden aparecer de manera diferente en función del medio utilizado y de la humedad o sequedad del agar (si son húmedas suelen tener la morfología típica, mientras que si el agar se encuentra seco suelen ser redondas, convexas y brillantes) (Corry et al., 1995), y utilizando medios cromogénicos las colonias suelen adquirir color. Una vez han crecido las colonias se realiza una identificación de las mismas para llegar a definir la especie, para ello se requiere realizar una serie de pruebas. La identificación presuntiva puede realizarse mediante un estudio de la morfología típica de las colonias (bacilos en espiral o curvos) y bien a través de la observación de su motilidad en el microscopio de contraste de fases.

Las pruebas basadas en el fenotipo para la identificación de la especie de *Campylobacter* más usadas incluyen pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, reducción de nitrato, hidrólisis de hipurato, hidrólisis de acetato de indoxilo), patrones de susceptibilidad a los antibióticos (ácido nalidíxico, cefalotina) y características de crecimiento a diferentes temperaturas (25 °C, 37 °C y 42 °C) (On, 1996).

Los métodos basados en la PCR permiten la detección específica de *Campylobacter* en muestras con poca carga y en un corto periodo de tiempo gracias a la amplificación exponencial de las secuencias específicas. Además, según los cebadores utilizados, esta técnica nos permite realizar una detección general del patógeno usando cebadores para la región conservada o diferenciar entre especies y cepas de *Campylobacter* usando cebadores diseñados a partir de las regiones variables. Se han desarrollado una variedad de ensayos de PCR dirigidos a secuencias específicas de género o especie para detectar e identificar *Campylobacter* en muestras de alimentos (Grennan et al., 2001), heces (Houng et al., 2001) y medioambientales (Studer et al., 1999).

Además, existe la qPCR su fundamento es el mismo que para la PCR convencional sólo que además de amplificar e identificar la especie, cuantifica la cantidad de ADN después de cada ciclo. Para poder llevar a cabo estas mediciones se necesita el uso de marcadores fluorescentes (como *SYBR Green I*) que se intercala entre las hebras de ADN del producto de la PCR. El incremento de la señal fluorescente es directamente proporcional al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generados en la fase exponencial de la reacción. En los primeros ciclos, la fluorescencia permanece a niveles indetectables, similares al ruido de fondo o *background* hasta un momento determinado en el que se alcanza un acúmulo

detectable de amplicones. La qPCR permite identificar los ciclos necesarios en los que se alcanza el ciclo de cuantificación (*Cycle Threshold*, ciclo umbral o CT). El valor se obtiene mediante una línea horizontal, que determina el programa por encima del *background* de los 8 primeros ciclos para todas las muestras. El valor de CT de cada muestra sirve para cuantificar, ya que mide en la fase exponencial de la reacción cuando los reactivos no están limitados, doblando el número de moléculas presentes con cada ciclo de amplificación. Esto es de gran utilidad en la detección de *Campylobacter*, ya que al mismo tiempo de identificar, cuantifica rápidamente la cantidad de microorganismos presentes en las distintas muestras. Existen kits comerciales de qPCR con certificación de distintos organismos para la detección de este género bacteriano como iQ-Chek™ *Campylobacter* PCR detection kit Bio-Rad y Foodproof® *Campylobacter* Quantification Kit (Bioteccon).

Las principales ventajas de la PCR son su sensibilidad, especificidad y rapidez. Sin embargo, la purificación de ADN de muestras fecales, alimentarias y ambientales es esencial para lograr resultados satisfactorios mediante esta técnica. Se han descrito varios métodos para la extracción de ADN de materiales fecales o alimenticios antes de la PCR. Los más utilizados incluyen la extracción de fenol-cloroformo seguida de precipitación con etanol (Konkel et al., 1999), kits comerciales de purificación de ADN (Collins et al., 2001), separación inmunomagnética (Nogva et al., 2000), extracción de dióxido de silicio (Houng et al., 2001), columna de cromatografía (Waegel y Nachamkin, 1996) y centrifugación diferencial (Wang et al., 1999). A pesar del uso de diversos métodos de purificación, los inhibidores de la PCR no se pueden eliminar completamente de la reacción, disminuyendo el rendimiento de la PCR para detectar muestras con un número bajo de *Campylobacter*. Generalmente se requiere un paso de enriquecimiento antes de la PCR (Grennan et al., 2001), que no sólo aumenta el número de *Campylobacter* en las muestras, sino que también diluye la concentración de inhibidores de la PCR. Las muestras fecales de animales y humanos que se desprenden de *Campylobacter* pueden contener un número suficientemente alto de organismos que se detectarán directamente sin necesidad de un paso de enriquecimiento (Houng et al., 2001).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Por todo lo explicado anteriormente y dada la importancia que supone *Campylobacter* para la Salud Pública, con la realización de este trabajo se pretende conseguir un mayor conocimiento de su epidemiología con la finalidad de establecer diferentes estrategias de control en la explotación.

El objetivo fundamental de este estudio se centra en comprobar la ausencia de transmisión vertical de *Campylobacter* en pollos de engorde.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

I. Explotaciones ganaderas

Los pollos de engorde en los que se realizó el estudio provenían de dos explotaciones de reproductoras pesadas sitas en Cabasés (Tarragona), una de las cuales estaba formada por cuatro naves (R07) y la otra por dos (R06). La explotación R07 estaba formada por 24.000 ejemplares, en cambio R06 por 11.000. El número de pollos nacidos vivos en la explotación R07 ascendió a un total de 33.900 y la R06 fue de 33.300 pollos (en ambas explotaciones anduvo alrededor del 88% de nacimientos viables). Todas las naves estaban dotadas con un dispositivo para fabricar dióxido de cloro en la entrada del suministro de agua, alcanzando un mínimo de 0,2 partes por millón (ppm) de cloro libre al final de línea. Estas reproductoras se alimentaban con un pienso granulado (a 80°C) con ácido butírico y aceites esenciales entre sus componentes para prevenir la colonización por *Salmonella*.

Tras la puesta, los huevos fueron trasladados a la incubadora de Sástago, propiedad del grupo SADA (Nutreco), que después de su eclosión, se transportaron a la explotación ganadera avícola ubicada en Fuentes de Ebro (Zaragoza). Esta explotación, integrada dentro de este mismo grupo, estaba formada por dos naves (A y B). La nave A contenía a la progenie del lote R07 (6.500 machos y 6.500 hembras) y la B a la del lote R06 (5.600 machos y 5.600 hembras). El agua de esta explotación se tomaba de la red municipal del pueblo y se le añadía ácido clorhídrico a la entrada hasta conseguir un pH aproximadamente de 7 alcanzado una concentración de 0,3 ppm de cloro libre al final de línea.

La genética de los pollos (*Gallus gallus*) empleados en este estudio, fue Cobb 500.



Imagen 1. Explotación formada por cuatro naves de reproductoras pesadas (R07) situadas en Cabasés.



Imagen 2. Foto de la izquierda corresponde a la nave R07 de la explotación de reproductoras pesadas; y la foto de la derecha corresponde a la nave R06 de la explotación de reproductoras pesadas.



Imagen 3. Exterior de la explotación formada por dos naves (R06) de reproductoras pesadas de Cabasés.



Imagen 3. Exterior de la explotación formada por dos naves (R06)



Imagen 4. Foto de la izquierda corresponde con una nave de la explotación de broilers de Fuentes de Ebro; y la foto de la derecha corresponde con la incubadora de Sástago.

II. Toma de muestras

En primer lugar se realizó la toma de muestras en la granja de reproductoras pesadas para confirmar la presencia de *Campylobacter*. En la semana 42 se tomaron calzas y muestras de la

superficie de los huevos recién puestos mediante esponjas, mientras que en la semana 44 solo calzas para ratificar su presencia. Las muestras de calzas se tomaron mediante un kit comercial de toma de muestras que contiene guantes, calzas de plástico y cinco pares de calzas embebidas con triptona, donde todos los componentes eran estériles (Imagen 5). El muestreo se realizó por todo el interior de la nave, retirándose los pares de calzas a medida que se avanzaba por ella.



Imagen 5. Integrantes de un kit de toma de muestras de calzas, todos sus componentes son estériles y dentro de una bolsa de plástico hermética.

Para las muestras de los huevos procedentes de estas explotaciones se tomaron esponjas estériles sobre su superficie, las cuales estaban impregnadas en una solución tamponada neutralizante (Imagen 6).



Imagen 6. La foto de la izquierda corresponde a los huevos muestreados en la granja, y en la derecha, se corresponde con el kit de esponja para la toma de muestras de los huevos.

Además, una vez trasladados los huevos a la incubadora, se realizó un muestreo aleatorio con esponjas el día de su llegada en la sala de estocaje. Posteriormente, tras su eclosión, se recogió meconio directamente de la cloaca aplicando una ligera presión en la zona abdominal.

Se recogió una muestra representativa de 450 pollitos a partir de una población de 24.200 pollos conforme se trasladaban por una cinta transportadora hasta la sala de sexado (aproximadamente se recogieron un total de 150 mililitros (ml) de meconio) (Imagen 7).



Imagen 7. Momento de toma de muestras de meconio en la incubadora.

También, se recogieron muestras en la explotación ganadera de Fuentes de Ebro de todos los cartones de fondos de caja correspondiente a 16 barquillas con 100 pollitos cada una, es decir, cada cartón representaba el meconio de 1.600 pollitos (Imagen 8).

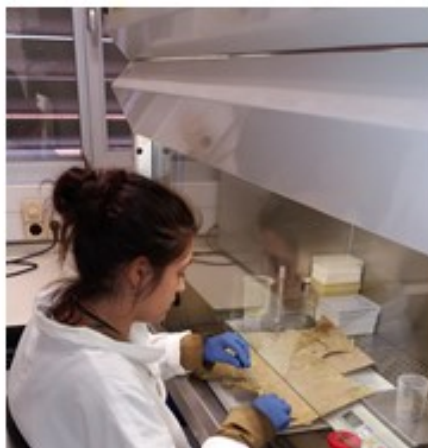


Imagen 8. Momento del procesado de los cartones muestreados del fondo de caja.

Asimismo, antes de la llegada de los pollos a esta explotación, se recogieron dos pares de calzas por nave y una muestra representativa de *Alphitobius* (aproximadamente 5 gramos) con el objetivo de comprobar la presencia de *Campylobacter* (Imagen 9).



Imagen 9. Muestra de *Alphitobius* tomada en la nave de los broilers antes de trasladar los pollitos.

Posteriormente, se tomaron dos pares de calzas por nave periódicamente cada semana durante la crianza de los pollos hasta obtener un resultado positivo por *Campylobacter* en dos semanas consecutivas (Imagen 10).



Imagen 10. Ambas fotos muestran el procedimiento de toma de muestras con calzas en las explotaciones de broilers

También se tomaron muestras en la nave A de unos plásticos protectores procedentes de unas trampillas de ventilación colocadas una vez había dado comienzo la crianza y que provenían de otra nave para averiguar si dicho elemento podría ser el fómite transmisor de *Campylobacter* a la manada (Imagen 11). Estos plásticos fueron introducidos dentro de una bolsa de stomacher dónde se llevó a cabo su posterior procesamiento.



Imagen 11. Plásticos protectores de las trampillas de ventilación muestreados en este Trabajo.

Todas las muestras se trasladaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria (Zaragoza), dentro de una caja de poliespan con enfriadores a 4 °C en bolsas cerradas independientes para evitar la proliferación de microorganismos alterantes, tras su llegada se procesaron inmediatamente.

A continuación se presenta una tabla resumen acerca de las muestras tomadas a lo largo de este Trabajo (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de muestra y zona de muestreo realizadas en este estudio, según el tipo de explotaciones en la que fueron tomadas.

TIPO DE EXPLOTACIÓN	MUESTRA	ZONA DE MUESTREO
Reproductoras pesadas	Calzas	Cama
	Esponjas	Huevos recién puestos
Incubadora	Esponjas	Huevos desinfectados
	Meconio	Cloaca
Broilers vacía	<i>Alphitobius</i>	Suelo/Cama
	Calzas	Cama
Broilers con pollos	Cartón	Fondos de caja
	Calzas	Cama
	Plásticos	Trampilla de ventilación

III. Análisis qPCR

El análisis de las muestras se llevó a cabo en este mismo laboratorio. Una vez recibidas, se llevaron a una cabina de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones. A cada muestra se le añadieron 225 ml de peptona bacteriológica al 1% (Oxoid) por cada par de calzas y se dejó actuar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para los cartones y esponjas se añadieron 225 ml peptona por cada 25 gramos, también se dejaron actuar el mismo tiempo que para las calzas. En el caso de las heces y de los escarabajos de la cama (*Alphitobius*) se añadió caldo *Bolton* doblemente suplementado en una proporción de 225 ml para 25 gramos de muestra. Para preparar este caldo, se necesitó, un caldo *Bolton* base (Oxoid), sangre de

caballo desfibrinada al 5%, un suplemento a base de antibióticos (cefoperazona 20 mg, vancomicina 20 mg, trimetoprim 20 mg, cicloheximida 50 mg o anfotericina B 10 mg), y otro a base de piruvato de sodio, metabisulfito de sodio y sulfato ferroso.

Seguidamente, se homogenizaron las muestras y se pipetearon 300 microlitros (μ l) para realizar la extracción de ADN total mediante el kit *Genomic ADN from blood* de la casa comercial Macherey Nagel (ver protocolo en *Anexo*). Por otra parte, se comprobó para cada muestra tanto la concentración de ADN a una densidad óptica (DO) de 260 nanómetros (nm), como su pureza según el ratio 260/280 mediante un espectrofotómetro BioDrop Ltd (Cambridge, UK) (Imagen 12).

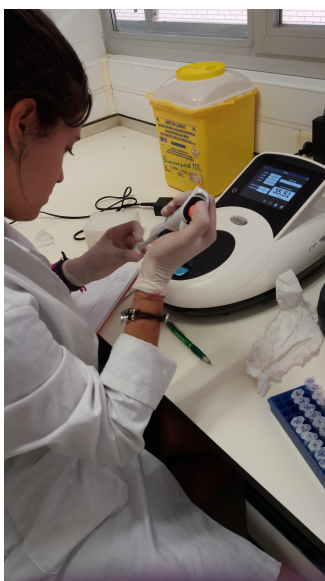


Imagen 12. Momento de medición de la pureza de ADN mediante el BioDrop.

Una vez obtenido el ADN total de las muestras se realizaron dos amplificaciones por qPCR por cada muestra (muestra directa y dilución) con el fin de evitar un resultado falso negativo por las inhibiciones que pudieran estar presentes en ellas, así como un control positivo procedente de una cepa de campo de *Campylobacter* y otro negativo adicionando agua libre de nucleasas. Este patrón se realizó para las especies de *Campylobacter*, *C. jejuni* y *C. coli* (Imagen 13).

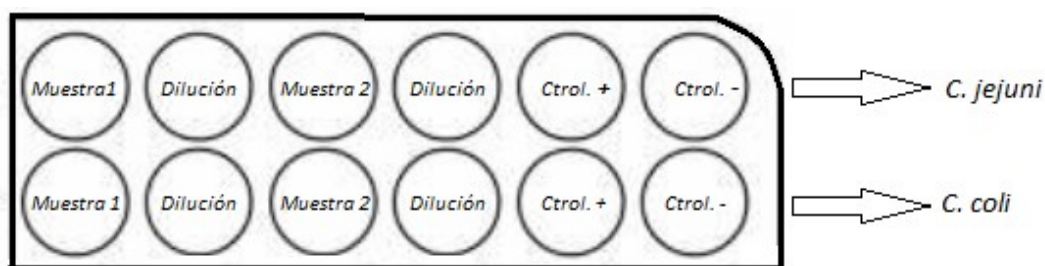


Imagen 13. Imagen esquemática de una placa de PCR que se utilizó para el análisis por duplicado de las muestras de calzas.

El diseño e implementación de los cebadores para la determinación individual de *C. jejuni* y *C. coli*, se realizó mediante la utilización de diversos programas bioinformáticos como el Primer 3, tal y como se recoge en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las técnicas de qPCR realizada en el laboratorio Enfermedades Infecciosas. Leyenda: Pares de bases (pb).

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
qPCR <i>C. jejuni</i>	ATGCAGGACATGCTTTAAT ATCCACAGCTTCATCGTTAT	hipo	205	Diseño propio
qPCR <i>C. coli</i>	CACACATGGAAAAAGCATT GCAGCGTTGGTTTAGTTAC	ceuE	148	Diseño propio

La realización de las reacciones de PCR a tiempo real llevadas a cabo en este estudio se realizaron según los protocolos normalizados de trabajo establecidos en este laboratorio. La concentración de los cebadores (directo y reverso) fue de 0,25 $\mu\text{mol l}^{-1}$. El volumen de las reacciones fue de 20 μl + 5 μl de muestra de ADN. Para esta técnica se utilizó el fluoróforo SYBR Green I 2X (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega). Las determinaciones se llevaron a cabo en el termociclador de Bio-Rad, CFX96TM Deep Well Real-Time PCR Detection System.

El protocolo de qPCR consistió en una serie de pasos establecidos para todas las muestras de la misma manera. El primer paso consistió en 7 minutos a 95 °C, seguido de 44 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Por último, se realizó un paso adicional que osciló desde los 60 °C hasta los 95 °C con un ratio de 0,5 °C para observar la especificidad del amplicón obtenido (curva de fusión).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, el análisis de los resultados de la calidad y pureza de las muestra de ADN obtenidos indicaron que la concentración media de ADN de las muestras fue de $43,27 \pm 34,47$

microgramos (μg)/ml y el valor medio del ratio de la pureza ascendió a $1,72 \pm 0,5$. Se trata de valores que se encuentran dentro de los parámetros normales.

I. Resultados de las calzas en las explotaciones de reproductoras pesadas

El resultado obtenido en las reproductoras pesadas (42 semanas de vida) mediante qPCR fue positivo en ambos lotes, tanto para *C. jejuni* como para *C. coli*, excepto en la nave C del lote R07, siendo esta negativa a *C. coli*. Se realizó un segundo muestreo de confirmación en dichas reproductoras (44 semanas de vida), obteniendo resultados con cargas similares (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos a lo largo del proyecto respecto a las muestras tomadas en reproductoras. (CT: ciclo umbral; Log: logaritmo). La carga microbiana es inversamente proporcional al valor CT y directamente proporcional al valor de la escala logarítmica.

Referencia	Edad Semanas	Resultados_qPCR					
		<i>C. jejuni</i> _CT	<i>C. jejuni</i> _Log	<i>C.coli</i> _CT	<i>C.coli</i> _Log	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
R06 A	42	31,18	2,68	33,44	2,33	Positivo	Positivo
R06 B	42	31,18	2,68	28,34	3,87	Positivo	Positivo
R07 A	42	31,42	2,60	34,35	2,06	Positivo	Positivo
R07 B	42	27,89	3,66	35,12	1,83	Positivo	Positivo
R07 C	42	31,18	2,68	0,00	0,00	Positivo	Negativo
R07 D	42	31,18	2,68	33,50	2,32	Positivo	Positivo
R06 A	44	31,48	2,59	31,08	3,04	Positivo	Positivo
R06 B	44	34,27	1,75	35,07	1,84	Positivo	Positivo
R07 A	44	31,40	2,61	34,02	2,16	Positivo	Positivo
R07 B	44	33,39	2,01	36,01	1,56	Positivo	Positivo
R07 C	44	34,89	1,56	0,00	0,00	Positivo	Negativo
R07 D	44	36,12	1,19	36,54	1,40	Positivo	Positivo

II. Resultados de las calzas en la explotación de broilers

Las calzas tomadas periódicamente en las naves de broilers, A y B, resultaron negativas durante las tres primeras semanas (Tabla 4). En el día 21 de edad de los pollos, la nave A (R07) se infectó únicamente con *C. jejuni*. Como se indica en la tabla 4, la carga microbiana en la nave R07 aumenta de una semana para otra (24,47 a 23,41), y en la nave B ocurre lo mismo pero se infecta en el día 28 (34,45 a 27,15).

Tabla 4. Resultados obtenidos a lo largo del proyecto respecto a las calzas tomadas periódicamente en las naves de los broilers. (CT: ciclo umbral; Log: logaritmo). La carga microbiana es inversamente proporcional al valor CT y directamente proporcional al valor de la escala logarítmica.

Referencia	Edad Días	Resultados_qPCR					
		<i>C. jejuni</i> _CT	<i>C. jejuni</i> _Log	<i>C.coli</i> _CT	<i>C.coli</i> _Log	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
Calzas R06	8	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Calzas R07	8	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Calzas R06	15	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Calzas R07	15	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Calzas R06	21	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo

Calzas R07	21	24,47	4,69	0,00	0,00	Positivo	Negativo
Calzas R06	28	34,45	1,69	0,00	0,00	Positivo	Negativo
Calzas R07	28	23,41	5,01	0,00	0,00	Positivo	Negativo
Calzas R06	35	27,15	3,89	0,00	0,00	Positivo	Negativo

III. Resultados de las esponjas tomadas de los huevos

Las esponjas de los huevos recién puestos en las cintas transportadoras procedentes del lote R06 mostraron un resultado positivo a *C. jejuni*, mientras que los del R07 fueron negativos. Los resultados de los huevos desinfectados en la incubadora resultaron ser negativos para *Campylobacter* en ambas naves de reproductoras pesadas (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados obtenidos a lo largo del proyecto respecto a las muestras suplementarias tomadas en huevos. (CT: ciclo umbral; Log: logaritmo). La carga microbiana es inversamente proporcional al valor CT y directamente proporcional al valor de la escala logarítmica.

Referencia	Resultados_qPCR					
	<i>C. jejuni</i> _CT	<i>C. jejuni</i> _Log	<i>C.coli</i> _CT	<i>C.coli</i> _Log	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
2_esponjas_cinta_granja_R06	35,17	1,48	0,00	0,00	Positivo	Negativo
4_esponjas_cinta_granja_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
2_esponjas_desinfectados_R06	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
2_esponjas_desinfectados_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo

IV. Resultados de las muestras tomadas el primer día de vida de los pollitos

El primer muestreo realizado a partir de calzas en la nave de pollos justo antes de su entrada en la explotación de Fuentes de Ebro reveló un resultado negativo a *Campylobacter*. También se obtuvo un resultado negativo en las muestras procedentes de meconio recogidas en la incubadora, para el cartón procedente de los fondos de caja que transportaban a los pollitos y, por último, para la muestra procedente de *Alphitobius* (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados obtenidos a lo largo del proyecto respecto a las muestras tomadas en la nave antes de trasladar los broilers. (CT: ciclo umbral; Log: logaritmo). La carga microbiana es inversamente proporcional al valor CT y directamente proporcional al valor de la escala logarítmica.

Referencia	Resultados_qPCR					
	<i>C. jejuni</i> _CT	<i>C. jejuni</i> _Log	<i>C.coli</i> _CT	<i>C.coli</i> _Log	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
Alphitobius_R06	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Alphitobius_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Meconio_R06	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Meconio_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Cartón_R06	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
Cartón_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
CalzasPre_R06	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo
CalzasPre_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo

V. Resultado complementario de las muestras tomadas durante la crianza de los pollos

Debido al resultado positivo a *C. jejuni* obtenido en la nave A (R07) se investigó la posible vía de entrada de este microorganismo a la nave. Por ello, se decidió muestrear unos plásticos de protección que colocó el granjero en el sistema de ventilación, los cuales procedían de otra de sus explotaciones avícolas, ya que fue una de las modificaciones que realizó durante la crianza. El resultado de este análisis mostró un resultado negativo para *Campylobacter*, con lo que se descarta esta vía de infección. Se cree que el factor humano ha sido el causante de introducir este germen en dicha nave (Tabla 7).

Tabla 7: Resultados obtenidos a lo largo del proyecto respecto a las muestras tomadas de los plásticos de ventilación. (CT: ciclo umbral; Log: logaritmo). La carga microbiana es inversamente proporcional al valor CT y directamente proporcional al valor de la escala logarítmica.

Referencia	Resultados_qPCR					
	<i>C. jejuni</i> _CT	<i>C. jejuni</i> _Log	<i>C.coli</i> _CT	<i>C.coli</i> _Log	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
Plásticos_Ventilación_R07	0,00	0,00	0,00	0,00	Negativo	Negativo

A continuación se presenta un ejemplo de gráfica obtenida tras la realización de una qPCR (Imagen 14).

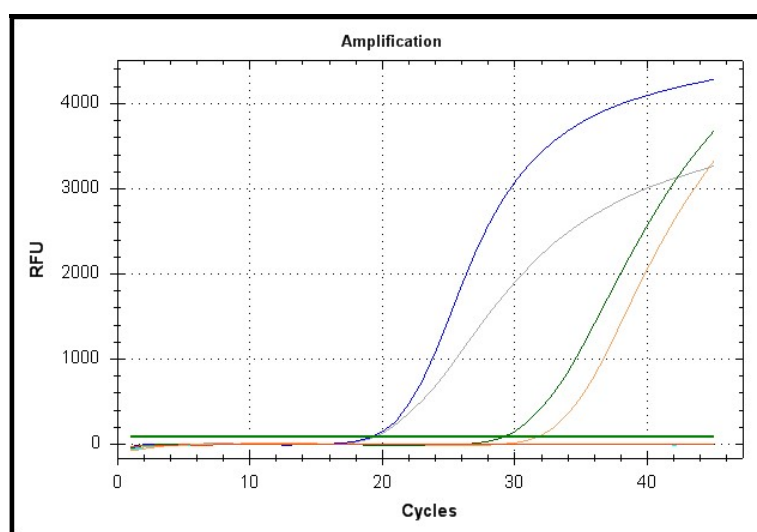


Imagen 14. Gráfica obtenida tras la realización de una qPCR. Se observa en azul el control positivo para *C. jejuni*, en gris el control positivo para *C. coli*, además de dos muestras que han resultado positivas (siguiendo el patrón de los controles positivos) y dos muestras negativas (líneas horizontales).

VI. Discusión

Las cargas logarítmicas obtenidas en las reproductoras pesadas de este estudio a las 42 semanas de vida en los dos lotes analizados (Tabla 3) fueron similares a las encontradas por Sahin et al. (2003) en animales de 42 y 43 semanas de vida. Por otra parte, los reproductores

analizados fueron positivos a ambas especies (*C. coli* y *C. jejuni*) y su descendencia solo se infectó con *C. jejuni*, hecho que coincide al ser la especie más detectada (EFSA, 2016).

La gran mayoría de los autores han demostrado que los pollos nacen libres de *Campylobacter* y permanecen con ese estado hasta las dos o tres semanas de vida (Cox et al., 2012; Agunos et al., 2014; van de Giessen, 1998; Hiett et al., 2002). De acuerdo con esta premisa, en este Trabajo se muestreó un total de 35.000 reproductoras, asumiendo que cada una de ellas genera una progenie de 150 pollitos, en el caso de que existiese transmisión vertical habría 5.250.000 pollitos infectados desde el primer día hasta el último de su vida productiva, lo que supondría una diseminación masiva de *Campylobacter*. Dado que se trata de la principal zoonosis bacteriana a nivel europeo desde el 2005 hasta la actualidad (EFSA, 2016), debido a la alta tasa de propagación solamente por transmisión horizontal, en caso de que existiera transmisión vertical encontraríamos una prevalencia de campilobacteriosis humana mucho mayor a la observada en los últimos años.

Además de ello, al utilizar una técnica con una elevada sensibilidad y especificidad demostrada para este género bacteriano, PCR a tiempo real (García et al., 2015), se tendría que haber detectado alguna especie en las muestras analizadas. Por ello, se cree que no existe transmisión vertical de *Campylobacter* en este estudio.

Marin et al. (2015) realizaron un estudio en el que consiguieron detectar *Campylobacter* en pollos de un día de vida mediante qPCR, señalando la existencia de transmisión vertical. Sin embargo, otro estudio similar realizado por Ingesa-Capaccioni et al., (2016) consiguieron demostrar la ausencia de transmisión vertical según el método contemplado en la norma ISO.

Allen y Griffiths (2001) afirmaron encontrar *Campylobacter* en la cáscara y membranas internas del huevo, pero en este ensayo al analizar muestras procedentes de cáscara de huevo desinfectado parece lógico que fuesen negativas. Asimismo, las muestras tomadas de los huevos del lote R06 directamente de la cinta transportadora (sin desinfección), dieron un resultado positivo para *C. jejuni* con una carga baja (Tabla 5).

En estas explotaciones no había roedores ni moscas dentro de la nave ya que contaba con un plan de desratización y desinsectación (trampas para roedores, cintas adhesivas atrapamoscas y medietas para evitar el acceso de otros animales o aves silvestres). La introducción de *Campylobacter* a través de vectores mecánicos (Jacobs-Reitsma, 1997) y animales reservorios (Nesbit et al., 2001; Cox et al., 2012) quedan descartadas como posibles

fuentes de infección en este estudio y además el análisis de las muestras de *Alphitobius* mostró ausencia de este microorganismo.

Según Evans (1992), la cama podría ser una fuente de infección de este género bacteriano para los pollos, aunque en este estudio, los resultados del muestreo previo de este factor antes de trasladar la pollada fueron negativos, lo que hace descartar esta fuente, que ya de inicio era poco probable, al tratarse de una cama nueva introducida tras un vacío sanitario.

El clareo se señala como una de las principales vías de entrada de este patógeno a la nave (Koolman et al., 2014), pero los pollos muestreados en este Trabajo se infectaron antes de esta práctica, por lo que, en este caso, no es posible asociarla a la introducción de *Campylobacter* en la explotación.

6. CONCLUSIONES

No hay evidencia de transmisión vertical en *Campylobacter*, siendo la transmisión horizontal la única vía de infección.

Las reproductoras pesadas no son el eslabón principal sobre el cual se debe incidir para evitar el contagio de esta zoonosis.

El seguimiento de medidas rigurosas de bioseguridad es esencial para reducir la introducción de este género bacteriano en la explotación.

CONCLUSIONS

There is no evidence of vertical transmission of *Campylobacter*, where the horizontal transmission is the only route of infection.

Broiler breeder hens are not the main source to considerer as target for controlling the transmission of this zoonoses.

The following of strict biosecurity measures is essential to minimize the introduction of this bacterial genus in a production unit.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La elección de este proyecto como trabajo de fin de grado, responde al deseo personal de conocer tanto el trabajo de campo en el sector de producción avícola de la mano de Ricardo Serrano, como adentrarme un poco en el mundo de la investigación en laboratorio con el

Departamento de Infecciosas, acompañada de Héctor Fuertes y Tania Pérez, consiguiendo así aunar en este trabajo dos de las ramas que más me gustan.

Con este Trabajo he adquirido diversos conocimientos, tanto en el ámbito de campo como de laboratorio. Ahora conozco el funcionamiento y las tareas requeridas en una incubadora, el trabajo que se lleva a cabo en una explotación de broilers en el día a día, así como la toma de diferentes muestras de manera correcta en las distintas etapas y zonas de un ciclo de producción completo, además del trato con los granjeros y otros componentes de este mundo. En el laboratorio he ganado soltura con el instrumental y he aprendido protocolos de extracción de ADN, el funcionamiento y realización de PCR a tiempo real así como la interpretación de resultados. Además, he descubierto los numerosos problemas que se plantean en la práctica rutinaria en estas ramas, y la planificación estratégica para abordarlos y solucionarlos; y que ciencias como la microbiología que parecen abstractas y lejanas en realidad son cercanas y cotidianas.

Estoy muy agradecida con todas las personas que me han acompañado y apoyado durante toda la carrera, sobre todo familia y amigos, que son con los que más he compartido mi ilusión. A mis tutores de este proyecto les agradezco la paciencia que han tenido con mis despistes y mis errores, toda la ayuda y apoyo que me han brindado y los conocimientos que me han enseñado y han compartido conmigo. El cariño y amabilidad con el que me habéis guiado a lo largo de este proyecto, ha hecho de esta experiencia un placer, me llevo un recuerdo de vosotros inmejorable. Gracias también a ti, Pau. De todo corazón, muchas gracias a todos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Achen, M., T. Y. Morishita, and E. C. Ley.** 1998. Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day- of-hatch to slaughter age. *Avian Dis.* **42**:732-737.
2. **Adak, G. K., S. M. Long, and S. J. O'Brien.** 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* **51**:832-841.
3. **Agunos, A., L. Waddell, D. Léger, and E. Taboada.** 2014. A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. For a broiler chickens. *PLoS One.* **9**:e1014905.
4. **Allen, K. J., and M. W. Griffiths.** 2001. Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. *J. Food Prot.* **64**:2058-62.
5. **Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:28-35.
6. **Aydin, F., H. I. Atabay, and M. Akan.** 2001. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). *J Appl Microbiol.* **90**:637-642.
7. **Berndtson, E., M. L. Danielsson-Tham, and A. Engvall.** 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int J Food Microbiol.* **32**:35-47.

8. **Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes, and M. J. Blaser.** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect Dis.* **157**:472-479.
9. **Blaser, M. J.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect Dis.* **176 Suppl 2**:S103-S105.
10. **Cappelier, J. M., J. Minet, C. Magras, R. R. Colwell, and M. Federighi.** 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol.* **65**:5154-5157.
11. **Cawthraw, S. A., L. Lind, B. Kaijser, and D. G. Newell.** 2000. Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clin Exp Immunol.* **122**:55-60.
12. **Cawthraw, S., R. Ayling, P. Nuijten, T. Wassenaar, and D. G. Newell.** 1994. Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chickens. *Avian Dis.* **38**:341-349.
13. **Clark, A. G. and D. H. Bueschgens.** 1985. Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. *Appl Environ Microbiol.* **49**:1467-1471.
14. **Collins, E., M. Glennon, S. Hanley, A. M. Murray, M. Cormican, T. Smith, and M. Maher.** 2001. Evaluation of a PCR/ADN Probe Colorimetric Membrane Assay for Identification of *Campylobacter* spp. in Human Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* **39**:4163-4165.
15. **Corry, J. E. and H. I. Atabay.** 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J Appl Microbiol.* **90**:96S-114S.
16. **Corry, J. E., D. E. Post, P. Colin, and M. J. Laisney.** 1995. Culture media for the isolation of *Campylobacter*s. *Int J Food Microbiol.* **26**:43-76.
17. **Cox, N. A., J. S. Bailey, L. J. Richardson, R. J. Buhr, D. E. Cosby, J. L. Wilson, K. L. Hiatt, G. R. Siregusa, and D. V. Bourassa.** 2005. Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of a late-life broiler breeder hens. *Avian Dis.* **49**: 285-287.
18. **Cox, N. A., L. J. Richardson, J. J. Maurer, M. E. Berrang, P. J. Fedorka-Cray, R. J. Buhr, J. A. Byrd, M. D. Lee, C. L. Hofacre, P. M. O'Kane, A. M. Lammerding, A. G. Clark, S. G. Thayer, and M. P. Doyle.** 2012. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *J Food Prot.* **75**: 1896-1902.
19. **Craven, S. E., N. J. Stern, E. Line, J. S. Bailey, N. A. Cox, and P. Fedorka-Cray.** 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* **44**: 715-720.
20. **EFSA.** 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *EFSA Journal.* **8**(03): 1503.
21. **EFSA.** 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal.* **13**: 51-58.
22. **EFSA.** 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal.* **14**(12): 4634.
23. **Evans, S. J.** 1992. Introduction and spread of thermophilic *Campylobacter*s in broiler flocks. *Vet Rec.* **131**: 574-576.
24. **Friedman, C. R., J. Neimann, and H.C. Wegener and R.V. Tauxe.** 2000. Epidemiology of *C. jejuni* infections in the United States and other industrialized nations., p. 121-138. In I Nachamkin and M.J. Blaser (eds.), *Campylobacter*. MBio, Washington D.C.
25. **Garcia, A. B., H. Vigre and M. H. Josefsen.** 2015. Towards the production of reliable quantitative microbiological data for risk assessment: Direct quantification of *Campylobacter* in naturally infected chicken fecal samples using selective culture and real-time PCR. *Food Cont.* **55**: 133-140.
26. **García, F. J., J. C. Abad, T. Serrano, N. Frías, M. Castro, and S. Lorente.** 2013. Epidemiología de *Campylobacter* en avicultura. Disponible en: <https://avicultura.info/la-epidemiologia-de-campylobacter/>.
27. **Gibbens, J. C., S. J. Pascoe, S. J. Evans, R. H. Davies, and A. R. Sayers.** 2001. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Prev Vet Med.* **48**:85-99.
28. **Grennan, B., N. A. O'Sullivan, R. Fallon, C. Carroll, T. Smith, M. Glennon, and M. Maher.** 2001. PCR-ELISAs for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry samples. *Bio Techniques.* **30**:602-610.
29. **Hiatt, K. L., N. A. Cox, and N. J. Stern.** 2002. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples. *Avian Dis.* **46**:219-223.

30. **Houng, H. S., O. Sethabutr, W. Nirdnoy, D. E. Katz, and L. W. Pang.** 2001. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **40**:11-19.
31. **Ingesa-Capaccioni, S., E. Jiménez-Trigos, F. Marco-Jiménez, P. Catalá, S. Vega, and C. Marin.** 2016. *Campylobacter* epidemiology from breeders to their progeny in Eastern Spain. *Poult Sci.* **95**: 676-683.
32. **Jacobs-Reitsma, W. F.** 1997. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q.* **19**:113-117
33. **Jacobs-Reitsma, W. F.** 2000. *Campylobacter* in the Food Supply, p. 467-481. In .I Nachamkin and M.J.Blaser (eds.), *Campylobacter*. MBio, Washington D.C.
34. **Jacobs-Reitsma, W. F., A. W. van de Giessen, N. M. Bolder, and R. W. Mulder.** 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol Infect.* **114**:413-421.
35. **Ketley, J. M.** 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Clin Microbiol.* **143 (Pt 1)**:5-21.
36. **Konkel, M. E., S. A. Gray, B. J. Kim, S. G. Garvis, and J. Yoon.** 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin Microbiol.* **37**:510-517.
37. **Koolman, L., P. Whyte, and D. j. Bolton.** 2014. An investigation of broiler caecal *Campylobacter* counts at first and second thinning. *J Appl Microbiol.* **117 (3)**: 876-881.
38. **Kruger, N. J., C. Buhler, A. N. Iwobi, I. Huber, L. Ellerbroek, B. Appel, and K. Stingl.** 2014. "Limits of control"—crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by realtime PCR. *PLoS One* **9**:e88108.
39. **Ley, E. C., T. Y. Morishita, T. Brisker, and B. S. Harr.** 2001. Prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* on ostrich carcasses and the susceptibility of ostrich-origin *E. coli* isolates to various antibiotics. *Avian Dis.* **45**:696-700.
40. **Marin, C., D. S. Peñarda, S. Ingesa-Capaccioni, S. Vega and F. Marco-Jimenez.** 2015. Molecular Detection of *Campylobacter* spp in Day-Old Chick Demonstrate Vertical Transmission in Poultry Production. *J Anim Vet Sci.* **2(4)**: 32-36.
41. **Martin, P. M., J. Mathiot, J. Ipero, M. Kirimati, A. J. Georges, and M. C. Georges-Courbot.** 1989. Immune response to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a cohort of children from birth to 2 years of age. *Infect Immun.* **57**:2542-2546.
42. **Musgrove, M. T., M. E. Berrang, J. A. Byrd, N. J. Stern, and N. A. Cox.** 2001. Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment. *Poult Sci.* **80**:825-828.
43. **Nachamkin, I., B. M. Allos, and T. Ho.** 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol. Rev.* **11**:555-567.
44. **Nachamkin, I., J. Engberg, and F. M. Aarestrup.** 2000. Diagnosis and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* Species, p. 45-66. In I. Nachamkin and M. Blaser (eds.), *Campylobacter*. MBio, Washington D.C.
45. **Nesbit, E. G., P. Gibbs, D. W. Dreesen, and M. D. Lee.** 2001. Epidemiologic features of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry broiler houses and surrounding environments as determined by use of molecular strain typing. *Am J Vet Res.* **62**:190-194.
46. **Nogva, H. K., A. Bergh, A. Holck, and K. Rudi.** 2000. Application of the 5'nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* **66**:4029-4036.
47. **On, S. L.** 1996. Identification methods for *Campylobacters*, *helicobacters*, and related organisms. *Clin Microbiol. Rev.* **9**:405-422.
48. **Pearson, A. D., M. Greenwood, T. D. Healing, D. Rollins, M. Shahamat, J. Donaldson, and R. R. Colwell.** 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* **59**:987-996.
49. **Petersen, L. and A. Wedderkopp.** 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl Environ Microbiol.* **67**:2739-2745.
50. **Prescott, J. F. and D. L. Munroe.** 1982. *Campylobacter jejuni* enteritis in man and domestic animals. *J Am Vet Med Assoc.* **181**:1524-1530.
51. **Rice, B. E., D. M. Rollins, E. T. Mallinson, L. Carr, and S. W. Joseph.** 1997. *Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. *Vaccine* **15**:1922-1932.

52. **Sahin, O., Q. Zhang, and J.C. Meitzler.** 2001. Effects of anti-*Campylobacter* maternal antibody on the colonization of *Campylobacter jejuni* in Poultry. In abstracts of the 101st General Meeting of the American Society for Microbiology, Orlando, Florida, USA, pp. 742-743.
53. **Sahin, O., Q. Zhang, J. C. Meitzler, B. S. Harr, T. Y. Morishita, and R. Mohan.** 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Appl Environ Microbiol.* **67**:3951-3957.
54. **Schmid, G. P., R. E. Schaefer, B. D. Plikaytis, J. R. Schaefer, J. H. Bryner, L. A. Wintermeyer, and A. F. Kaufmann.** 1987. A one-year study of endemic *Campylobacteriosis* in a midwestern city: association with consumption of raw milk. *J Infect Dis.* **156**:218-222.
55. **Shane, S. M.** 1992. The significance of *C. jejuni* infection in poultry: a review. *Avian Pathol.* **21**:189-213.
56. **Skirrow, M. B. and M. J. Blaser.** 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection, p. 69-88. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (eds.), *Campylobacter*. MBio, Washington D.C.
57. **Stern, N. J.** 1992. Reservoirs for *C. jejuni* and approaches for intervention in poultry., p. 49-60. In I. Nachamkin, M.J.Blaser, and and L.S.Tompkins (eds.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. MBio, Washington D.C.
58. **Stern, N. J., J. S. Bailey, L. C. Blankenship, N. A. Cox, and F. McHan.** 1988. Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Dis.* **32**:330-334.
59. **Stern, N. J., M. R. Clavero, J. S. Bailey, N. A. Cox, and M. C. Robach.** 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poult Sci.* **74**:937941.
60. **Studer, E., J. Luthy, and P. Hubner.** 1999. Study of the presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in sand samples from four Swiss chicken farms. *Res Microbiol.* **150**:213-219.
61. **van de Giessen, A. W., J. J. Tilburg, W. S. Ritmeester, and P. J. Van der.** 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol Infect.* **121**:57-66.
62. **van Vliet, A. H. M. and J. M. Ketley.** 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J Appl Microbiol.* **90**:45S-56S.
63. **Waegel, A. and I. Nachamkin.** 1996. Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. *Mol CellProbes***10**:75-80.
64. **Wang, H., J. M. Farber, N. Malik, and G. Sanders.** 1999. Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure. *Int J Food Microbiol.* **52**:39-45.
65. **Wassenaar, T. M. and M. J. Blaser.** 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect.* **1**:1023-1033.
66. **Young, C. R., R. L. Ziprin, M. E. Hume, and L. H. Stanker.** 1999. Dose response and organ invasion of day-of-hatch Leghorn chicks by different isolates of *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis.* **43**:763-767.

9. ANEXO

Protocolo: Genomic ADN from Blood. Nucleospin®Blood (ref. 740951.250), con modificaciones. Casa comercial: Macherey-Nagel

Pasos:

1. Lisado de la muestra: añadir 300 µl de muestra en un vial de 1,5 ml, pipetear 200 µl de la solución B3 y 25 µl de proteinasa K. Mezclar vigorosamente con el vortex e incubar a 70 °C durante 1 hora.
2. Establecimiento de las condiciones para el ADN a la columna: añadir 250 µl de etanol (96-100%) y mezclar bien empleando el vortex. Dejar reposar el lisado a Tª ambiente.

3. Unión del ADN: por cada muestra utilizar una columna de sílica provista por el kit comercial. Cargar todo el lisado y centrifugar a $11.000 \times g$ durante 1 minuto. Descartar el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
4. Lavado de la membrana de sílica: se deben realizar 2 lavados centrifugando 1 minuto a $11.000 \times g$, primero añadir 500 μl del reactivo tamponado BW y luego 600 μl del B5. Después de cada centrifugación, descartar el filtrado y colocar nuevamente la columna en el tubo colector.
5. Secado de la membrana de sílica: añadir 100 μl de la solución tamponada B5 y centrifugar 3 minutos a $11.000 \times g$ con el fin de eliminar el etanol residual.
6. Elución de ADN puro: transferir a la columna a un microtubo de 1,5 ml y añadir 100 μl de la solución BBE (70 °C). Incubar 5 minutos a 70 °C y luego centrifugar $11.000 \times g$ durante 1 minuto. El filtrado contiene el ADN puro extraído de la muestra.