

Héctor Fuertes Negro

Campylobacter en pollos de
engorde: contribución a su
epidemiología, control y profilaxis
mediante el uso de métodos de
biología molecular, análisis
antimicrobiano y evaluación de un
tratamiento preventivo

Departamento
Patología Animal

Director/es
Halaihel Kassab, Nabil
Pérez Sánchez, Tania

EXTRACTO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral [Extracto]

CAMPYLOBACTER EN POLLOS DE ENGORDE:
CONTRIBUCIÓN A SU EPIDEMIOLOGÍA, CONTROL
Y PROFILAXIS MEDIANTE EL USO DE MÉTODOS
DE BIOLOGÍA MOLECULAR, ANÁLISIS
ANTIMICROBIANO Y EVALUACIÓN DE UN
TRATAMIENTO PREVENTIVO

Autor

Héctor Fuertes Negro

Director/es

Halaihel Kassab, Nabil
Pérez Sánchez, Tania

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2017

TESIS DOCTORAL

***Campylobacter* en pollos de engorde: contribución a su epidemiología, control y profilaxis mediante el uso de métodos de biología molecular, análisis antimicrobiano y evaluación de un tratamiento preventivo**

Héctor Fuertes Negro
Zaragoza, octubre 2017



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Departamento de Patología Animal



**Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología Animal
Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología**



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**

Campylobacter en pollos de engorde: contribución a su epidemiología, control y profilaxis mediante el uso de métodos de biología molecular, análisis antimicrobiano y evaluación de un tratamiento preventivo

Memoria presentada por **Héctor Fuertes Negro**
Para optar al grado de Doctor
octubre 2017

D. Dr. NABIL HALAIHEL KASSAB, Profesor Asociado del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, y Dña. Dra. TANIA PÉREZ SÁNCHEZ, Profesora Asociada del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, como Directores,

C E R T I F I C A N:

Que D. HÉCTOR FUERTES NEGRO ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada *"Campylobacter en pollos de engorde: contribución a su epidemiología, control y profilaxis mediante el uso de métodos de biología molecular, análisis antimicrobiano y evaluación de un tratamiento preventivo"* que se ajusta con el Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado.

En Zaragoza, a 3 de octubre de 2017.

Dr. N. Halaihel Kassab

Dra. T. Pérez Sánchez

A mis padres, Hipólito y Trini

A mi hermana, Begoña

A Pili

Agradecimientos

Han pasado ya varios años desde que entré por primera vez en el Departamento de Patología Animal, Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología, de la Universidad de Zaragoza. Por aquel entonces, muy probablemente, todavía era alumno de la licenciatura en Veterinaria. Más tarde pasaría a realizar, en este mismo lugar, el Trabajo Fin de Máster en Investigación y a trabajar en la empresa AlquizVetek. Sin duda alguna, en este lugar he pasado una de las mejores etapas de mi vida, en la que se me ha permitido hacer y aprender muchas cosas, entre ellas, esta Tesis Doctoral. Durante este tiempo, son muchas las personas que, de una u otra manera, han ayudado a la elaboración de este Trabajo, y por ello, quisiera expresar mi agradecimiento a todas y cada una de ellas. Confío en no olvidarme de nadie y, si es así, ahí va mi disculpa de antemano.

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Nabil Halaihel Kassab y la Dra. Tania Pérez Sánchez, por su confianza, motivación y apoyo, siempre incondicional. Gracias por todos los conocimientos que me habéis transmitido, por vuestras críticas constructivas, vuestra paciencia para resolver mis dudas y principalmente porque siempre habéis hecho todo lo posible para que esta tesis saliera hacia adelante. Muchas gracias de corazón. Habéis sido mis directores de tesis pero hoy, sin duda, sois parte de aquellos amigos a los que considero importantes en mi vida.

Gracias al Catedrático Dr. José Luis Múzquiz por haberme abierto las puertas del Laboratorio de Ictiopatología y sobre todo por haberme animado a iniciarme en la investigación. Desde que nos conocimos en el Colegio Mayor Pedro Cerbuna jamás has dejado de preocuparte por mí, ayudarme y aconsejarme en muchas de las decisiones que tomaba, evidentemente con palabras siempre acertadas. ¡Gracias Pepe!

Gracias a la Universidad de Zaragoza, a la Facultad de Veterinaria y, en especial, al Departamento de Patología Animal, por permitirme formar parte de vuestro equipo docente durante varios años. Gracias a los equipos de dirección con los que he compartido este tiempo. ¡Seguid trabajando así!

Gracias a Urko Múzquiz por haber confiado en mí para el puesto de trabajo que he desempeñado durante 6 años en AlquizVetek. Gracias de corazón por darme la oportunidad de aprender y formar lo que ahora soy. ¡Hasta pronto!

Gracias a la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología: Dra. Olivia Gironés, Dra. M^a Carmen Simón, Dr. Carmelo Ortega, Dr. Jesús García, Dr. Ignacio

de Blas, Dr. Imanol Ruiz-Zarzuela, Dra. Ana Muniesa y Dr. Daniel Vendrel. También me gustaría mencionar a la Dra. Tamara Martín y a la reciente Dra. Marian Ramo. Gracias a todos por las vivencias compartidas, charlas, consejos y ayuda prestada durante estos 7 años, siempre de manera desinteresada, ha sido un verdadero placer. ¡Gracias por todo!

Gracias a la otra parte de la Unidad, por haber podido contar con vuestra ayuda siempre que lo he necesitado, por haberme enseñado conceptos de microbiología clásica y por compartir muy buenos momentos juntos: M^a Carmen Uriel (Mamen), Rafael Claver y Jesús Orós. ¡Gracias!

Gracias a todos los compañeros con los que he coincidido en el laboratorio, de manera directa o indirecta: Luisa, Patricia, Carlos (el portugués), Isabel, Willian, Brenda (tú serás la próxima) y Candela. También a los alumnos de prácticas que por aquí han pasado: Carmen, Jorge, Rus, Marta, Teresa y Silvia. Recordaré con cariño los conocimientos científicos compartidos, me llevo vuestra amistad. ¡Mucha suerte a todos!

Gracias al Dr. Byron Flores, por “echarme una mano” con el tema estadístico y por todos los momentos compartidos. Hermano latino, tenemos pendiente una excursión al Cerro Negro. ¡Que tengas mucha suerte en la vida!

Gracias a los compañeros del Departamento de Parasitología: Adriana y Charlie, Paula, y Sara, Nacho y Paz, ¡ánimo que sois los siguientes! Quisiera nombrar al Catedrático Dr. Juan Antonio Castillo por el apoyo recibido y su continua disponibilidad para ayudarme. Gracias a todos por estar siempre “al lado”, tanto físicamente como personalmente.

Gracias al personal de los departamentos y unidades de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Higiene, Producción Animal, Farmacología, Genética, Reproducción, Cirugía Animal, Médica, Parasitarias y Parasitología, Microbiología y Anatomía Patológica. En todas ellas, guardo cariño a varios miembros que la componen, que de una manera u otra, antes o después, han compartido vivencias y momentos en mi vida, de los cuales algunos no tenían nada que ver con lo estrictamente profesional.

Gracias a Laura y Paula por los momentos vividos en el laboratorio y las opiniones profesionales intercambiadas durante las extracciones realizadas. Gracias a la Dra. Ana Ramo por compartir buenos momentos desde nuestros comienzos.

Gracias al personal de la Facultad de Veterinaria: PAS (M^a Carmen y Carmelo) y alumnado en general, por el interés y preocupación mostrada a lo largo de este periodo doctoral.

Gracias a D. Ricardo Serrano, experto en el mundo de la avicultura, por encauzar el camino de esta tesis doctoral, por los viajes realizados y las charlas compartidas. Gracias a D. Alfredo Corujo, y a su equipo humano: Sara, Eva, Marga y Andrea. Me siento muy orgulloso de haber estado cerca de los mejores, así como de haber podido aprender de todos y cada uno de vosotros. Gracias al Departamento de Producciones Granaderas SADA (Nutreco) y al Poultry Research Center (PRC). Sin duda, esta tesis no hubiera sido posible sin vuestra ayuda.

Gracias a los responsables de las explotaciones ganaderas donde he realizado las investigaciones de este Trabajo (Montes del Palancia y Ángel Palacios-Cosuenda), y en especial, a la veterinaria responsable de la explotación Montes del Palancia, Paloma Bronchal, a la que nos une a gran amistad desde hace muchos años. Te deseo mucha suerte en esta nueva etapa.

Gracias a mis amigos y compañeros de facultad, los cerveceros Ángel Casanova y Sergio Carral. Gracias por estar ahí.

Gracias a mis amigos de Zaragoza y a los de Teruel (los de toda la vida), a todos y cada uno de vosotros, a los del Colegio Mayor Pedro Cerbuna, a los de Caspe y a los Veterinarios. Gracias a todos por aguantarme, que no es poco y, sobre todo, por quererme como soy. Gracias por las palabras, conversaciones en los viajes, paciencia, ánimos y confianza depositada en mí desde el principio. ¡Yo también os aprecio mucho!

Gracias a mis padres Hipólito y Trini, y a mi hermana Begoña y Hristo, por apoyarme siempre en cada decisión que tomaba, por haber hecho de mí lo que ahora soy, por no haber dudado nunca de mis decisiones, y por qué no decirlo, por ser la mejor familia del mundo. Me siento muy orgulloso de vosotros. Os quiero aunque no suela decíroslo muy a menudo. También al resto de mi familia, tíos, primos y abuelos Timoteo y Pilar. En especial a ti, Francisco, por toda esa ayuda recibida de manera incondicional para maquetar de la forma más bonita posible esta Memoria. Y a mi tía Isabel, por aguantarme estos dos últimos años en tu casa. ¡Os quiero!

Gracias a toda mi familia política, y en especial a mis suegros, Antonio y Pilar, porque en todo momento habéis creído en mí, gracias por las palabras de apoyo que de vosotros he recibido siempre. ¡Os quiero!

En especial gracias a ti cariño, por todo lo que me has ayudado en esta tesis, por el apoyo recibido y por aguantarme en los momentos más críticos. Siempre has estado ahí y sé que seguirás estándolo, gracias de corazón. ¡Te quiero!

Y...finalmente...y no por ser último menos especial... gracias a mis abuelos, Paco y Generosa, porque aunque no hayáis podido ver esto, sé que donde estéis, estaréis muy orgullosos de mí.

En general, MIL GRACIAS A TODOS. Y en especial, MIL GRACIAS A TODOS LOS QUE OS HABÉIS PREOCUPADO POR MÍ.

Este Trabajo también es vuestro.

Índice

Abreviaturas, acrónimos y símbolos	I
I. Resumen / <i>Summary</i>	1
II. Revisión bibliográfica	3
1. Antecedentes históricos	3
2. Clasificación taxonómica	4
2.1 <i>Género Campylobacter</i>	5
2.2 Especies del G ^o <i>Campylobacter</i>	7
3. Campilobacteriosis en los seres humanos	8
3.1 Zoonosis de gran importancia	8
3.2 Factores epidemiológicos de <i>Campylobacter</i>	12
3.2.1 Reservorios de la enfermedad	12
3.2.2 Fuentes de infección	12
3.3 Patogenia	13
3.4 Cuadro Clínico	15
3.5 Diagnóstico	15
3.6 Tratamiento	16
3.7 Prevención y control	17
4. <i>Campylobacter</i> en pollos de engorde	17
4.1 Prevalencia de <i>Campylobacter</i> en pollos	17
4.2 Ciclo productivo del pollo de engorde	20
4.3 Epidemiología de la infección en granjas avícolas de broilers	20
4.3.1 Fuentes de infección y factores de riesgo	20
4.3.2 Tipos de transmisión	23
4.4 Patogenia	24
4.4.1 Contagio e inmunidad	25
4.5 Técnicas diagnósticas para <i>Campylobacter</i>	26
4.5.1 Normativa internacional para <i>Campylobacter</i>	26
4.5.2 Métodos de confirmación bacteriana para <i>Campylobacter</i>	29
4.5.2.1 Aglutinación en látex	29
4.5.2.2 Pruebas bioquímicas	29
4.5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
4.5.3 Métodos serológicos para <i>Campylobacter</i>	29
4.5.4 Métodos de PCR para <i>Campylobacter</i>	30



4.5.5 Métodos de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) para <i>Campylobacter</i>	31
4.5.6 Técnicas de tipificación molecular	33
4.5.6.1. Métodos de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para <i>Campylobacter</i>	33
4.5.6.2 Métodos de PFGE para <i>Campylobacter</i>	34
4.5.6.3 Métodos de AFLP para <i>Campylobacter</i>	34
4.5.6.4 Métodos de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para <i>Campylobacter</i>	35
4.5.6.5 Métodos de MLST para <i>Campylobacter</i>	35
4.5.6.6. Secuenciación de nucleótidos	36
4.5.7 Requisitos para la validación de una prueba diagnóstica	36
4.6 Prevención y control	39
4.6.1 Etapa presacrificio (producción primaria)	39
4.6.2 Etapa post-sacrificio	44
5. Resistencia antimicrobiana frente a <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>)	45
5.1 Resistencia antibiótica frente a <i>Campylobacter</i> en pollos de engorde	50
5.2. Mecanismos de resistencia para <i>Campylobacter</i>	52
5.2.1 β -lactámicos	53
5.2.2 Quinolonas (fluoroquinolonas)	54
5.2.3 Macrólidos y lincosámidas	56
5.2.4 Tetraciclinas	57
III. Justificación	59
IV. Objetivos	61
V. Material y métodos	63
1. Estudio de <i>Campylobacter</i> a partir de calzas	63
1.1 Explotación ganadera	63
1.2 Toma de muestras	63
1.3 Laboratorio grupo SADA (Nutreco)	64
1.3.1 Análisis qPCR ¹	65
1.3.2 Análisis microbiológico	65
1.3.3 Análisis qPCR ²	66
1.3.4 Análisis de genotipado	66
1.3.5 Análisis por el método BDM	66
1.4 Laboratorio de Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.	68
1.4.1 Análisis qPCR	68



1.4.2 Análisis microbiológico	70
1.4.3 Análisis de genes de resistencia	70
1.4.4 Análisis de identificación mediante huellas digitales (Rep-PCR)	72
1.5 Análisis de datos	72
1.5.1 qPCR y microbiológicos	72
1.5.2 Análisis de genotipado	76
1.5.3 Análisis de genes de resistencia	73
1.5.4 Mapas geográficos	73
2. Estudio de la microbiota intestinal a partir de ciegos de pollos mediante secuenciación masiva	74
2.1 Explotación ganadera	74
2.2 Toma de muestras	74
2.3 Análisis de secuenciación masiva	75
2.4 Declaración ética responsable	75
VI. Resultados y discusión	77
1. Estudio de <i>Campylobacter</i> a partir de calzas	77
1.1 Validación de los métodos diagnósticos	77
1.2 Análisis de qPCR y microbiológicos (globales)	86
1.3 Análisis de qPCR	92
1.5 Análisis de los antibiogramas por la técnica BDM	101
1.6 Análisis de los genes de resistencia	105
1.7 Análisis de las cepas mediante huellas digitales (Rep-PCR)	114
2. Estudio de la microbiota intestinal a partir de ciegos de pollos	115
2.1 Análisis de secuenciación masiva	115
2.1.1 Diversidad microbiana observada	117
2.1.2 Principales grupos taxonómicos en los individuos control	119
2.1.3 Diferencias en la composición microbiana observada según tratamiento y sexo	121
VII. Conclusiones	125
VIII. Bibliografía	127
IX. Anexo	153



Índice de figuras

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de <i>Campylobacter jejuni</i> (de Wood, Pooley, Agricultural Research Service)	5
Figura 2. Número de zoonosis confirmadas en la UE en el año 2015 (EFSA, 2016b)	9
Figura 3. Número de zoonosis confirmadas en España durante el año 2015	10
Figura 4. Número casos confirmados en España durante los años 2005-2015: <i>Campylobacter</i> y <i>Salmonella</i>	10
Figura 5. Distribución por mes de los aislamientos de <i>Campylobacter</i> . España, 2015 (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017)	11
Figura 6. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> en ciegos de pollos (EFSA, 2010a)	18
Figura 7. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 16140-2:2016 para <i>Campylobacter</i>	28
Figura 8. Principio de la LAMP: unión de los cebadores FIP, BIP, <i>forward externo</i> (F3), reverse externo (B3) y la formación de horquillas en ambos extremos, a partir de la que se formarán horquillas de diferentes tamaños (Flores Somarriba, 2015)	32
Figura 9. Resultados de la prueba diagnóstica. Establecimiento del valor umbral para una técnica diagnóstica (de Blas et al., 2008)	38
Figura 10. Consumo (%) por grupo de antibióticos en España durante el año 2014 (AEMPS, 2014)	48
Figura 11. Porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos de <i>C. jejuni</i> obtenidas de pollos de engorde desde 2005 hasta el 2014 (PNRA, 2015)	52
Figura 12. Porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos de <i>C. coli</i> obtenidas de pollos de engorde desde 2005 hasta el 2014 (PNRA, 2015)	52
Figura 13. Diagrama de flujo sobre las actividades realizadas por el laboratorio del grupo SADA (Nutreco)	64
Figura 14. Diagrama de flujo sobre las actividades realizadas por el laboratorio de Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.	68
Figura 15. Coeficiente de correlación de Spearman entre las C_q de las pruebas iQ-Chek y qPCR <i>C. jejuni</i>	80
Figura 16. Representación gráfica en diagrama de cajas para la edad en semanas y las técnicas diagnósticas: CASA®/RAPID'/iQ-Chek	91
Figura 17. Representación gráfica en diagrama de cajas para la edad en semanas y las técnicas diagnósticas: qPCR <i>C. jejuni</i> y LAMP <i>C. jejuni</i>	92
Figura 18. Curva patrón para <i>C. jejuni</i> . En ella se plasma la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente	93
Figura 19. Curva patrón para <i>C. coli</i> . En ella se puede apreciar la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente	93



Figura 20. Explotación Montes del Palancia. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo a <i>Campylobacter</i> a lo largo de las crianzas consecutivas en que ha tenido lugar dicho estudio	96
Figura 21. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/16	96
Figura 22. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/22	97
Figura 23. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/29	97
Figura 24. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/09/28	98
Figura 25. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/06	98
Figura 26. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/13	99
Figura 27. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/18	99
Figura 28. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/27	100
Figura 29. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/27	100
Figura 30. Árbol filogenético para las secuencias de la región QRDR del gen <i>gyrA</i>	113
Figura 31. Patrón genético de los aislados de <i>C. jejuni</i>	114
Figura 32. Patrón genético de los aislados de <i>C. coli</i>	114
Figura 33. Dendrograma de agrupamiento jerárquico a nivel de género para las 20 muestras exploradas	116
Figura 34. Análisis de coordenadas principales (PCOA) a nivel de especie para los metagenomas de los 20 individuos muestreados	117
Figura 35. Curvas de rarefacción para los principales índices de diversidad alfa, incluyendo el índice de Shannon, PD y Chao	118
Figura 36. Distribución de taxones más abundantes a lo largo de las 20 muestras analizadas para los niveles taxonómicos <i>phylum</i> (figura superior) y clase (figura inferior)	120
Figura 37. Distribución de taxones más abundantes a lo largo de las 20 muestras analizadas para los niveles taxonómicos orden (figura superior) y familia (figura inferior)	121
Figura 38. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género bacteriano <i>Campylobacter</i>	123
Figura 39. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para la bacteria <i>C. coli</i>	123
Apartado Anexo	
Figura 1. Mapa mundial de casos de <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>) (Kaakoush et al., 2015)	151
Figura 2. <i>Campylobacter</i> en ciegos de broilers según la edad de los pollos (Grupo SADA, Nutreco, 2015)	151
Figura 3. Protocolo establecido por la FDA para <i>Campylobacter</i>	152
Figura 4. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 10272-1:2006 para <i>Campylobacter</i>	153
Figura 5. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 10272-2:2006 para <i>Campylobacter</i>	154



Figura 6. Lugares de acción de los antibióticos (Tafur et al., 2008)	154
Figura 7. Parcela Montes del Palancia (La Puebla de Valverde, Teruel)	155
Figura 8. Explotación de Cosuenda (Zaragoza)	156
Figura 9. Etiqueta composición Vitaid	157
Figura 10. Curva patrón para <i>C. jejuni</i> (canal ROX). En ella se aprecia la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente	157
Figura 11. Curva patrón para <i>C. coli</i> (canal Cy5). En ella se recoge la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente	158
Figura 12. Representa un modelo de gráfica de cuantificación procedente del termociclador CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	158
Figura 13. Representa un modelo de gráfica de cuantificación procedente del termociclador Mx3000P® QPCR System (Stratagene)	159
Figura 14. Resultados de PCR para el gen CmeB de los aislados de <i>Campylobacter</i>	159
Figura 15 Resultados de PCR para el gen TetO de los aislados de <i>Campylobacter</i>	160
Figura 16. Resultados de qPCR para el gen BLA OXA61 de los aislados de <i>Campylobacter</i>	160
Figura 17. Resultados de qPCR para el gen CmeB de los aislados de <i>Campylobacter</i>	160
Figura 18. Resultados de qPCR para el gen CmeB de los aislados de <i>Campylobacter</i>	161
Figura 19. Huellas digitales de los aislados de <i>Campylobacter</i>	161
Figura 20. Curvas de rarefacción para cada uno de los 20 metagenomas analizados	161
Figura 21. Diagramas de cajas en los que se muestra la distribución de medianas para los principales índices de diversidad (Shannon, Chao y PD) así como para el número de especies identificadas en cada metagenoma individual teniendo en cuenta su sexo (a la izquierda) y el tratamiento recibido (a la derecha)	162
Figura 22. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género <i>Megamonas</i>	163
Figura 23. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género <i>Oscillospira</i>	163



Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de crecimiento para <i>Campylobacter</i>	6
Tabla 2. Prevalencia en carne de pollo en países de la UE	18
Tabla 3. Promedio de <i>Campylobacter</i> en plantas de procesado	19
Tabla 4. Factores de riesgo de colonización de lotes de pollos de engorde por <i>Campylobacter</i> (Hermans et al., 2012, modificada por nosotros)	21
Tabla 5. Características fenotípicas de las especies termotolerantes de <i>Campylobacter</i>	29
Tabla 6. Niveles de concordancia según el valor del coeficiente kappa de Cohen (k)	37
Tabla 7. Resistencia frente a tetraciclinas en los años 2014 y 2015 en España	47
Tabla 8. Antibióticos estudiados según el kit AviPro® PLATE	49
Tabla 9. Porcentaje de resistencia para <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en pollos procedentes de España	51
Tabla 10. Mutaciones más frecuentes presentes en la región QRDR del gen <i>gyrA</i> en <i>Campylobacter</i>	55
Tabla 11. Características de la técnica qPCR iQ-Chek™ <i>Campylobacter</i> PCR detection kit	65
Tabla 12. Características de la qPCR Foodproof® <i>Campylobacter</i> Quantification Kit	66
Tabla 13. Placa del kit AviPro® PLATE para <i>Campylobacter</i>	67
Tabla 14. Tabla de contingencia para la evaluación de una prueba diagnóstica	69
Tabla 15. Características de las técnicas de qPCR realizada en el laboratorio Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.	69
Tabla 16. Características de las técnicas de qPCR/PCR realizadas en el laboratorio Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek S.L.	71
Tabla 17. Características de la técnica de Rep-PCR realizada en el laboratorio Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek S.L.	72
Tabla 18. Validación de los métodos iQ-Check Bio-Rad vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	77
Tabla 19. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos iQ-Check Bio-Rad vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	77
Tabla 20. Validación de los métodos qPCR <i>C. coli</i> vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	78
Tabla 21. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos qPCR <i>C. coli</i> vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	78
Tabla 22. Validación de los métodos qPCR <i>C. jejuni</i> vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	78
Tabla 23. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos qPCR <i>C. jejuni</i> vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad	79



Tabla 24. Validación de los métodos CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad e iQ-Check Bio-Rad vs qPCR <i>C. jejuni</i>	79
Tabla 25. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad e iQ-Check Bio-Rad vs qPCR <i>C. jejuni</i>	79
Tabla 26. Índice de kappa de Cohen y valor de <i>p</i> para todas las técnicas realizadas en referencia a la técnica CASA®	80
Tabla 27. Resultados de las semanas del 2016/07/26, 2016/08/01 y 2016/08/10 de Montes del Palancia	82
Tabla 28. Resultados de la semana del 2016/08/16 de Montes del Palancia	83
Tabla 29. Resultados de la semana del 2016/08/22 de Montes del Palancia	83
Tabla 30. Resultados de la semana del 2016/08/29 de Montes del Palancia	84
Tabla 31. Resultados de la semana del 2016/09/22 de Montes del Palancia	85
Tabla 32. Resultados de la semana del 2016/09/28 de Montes del Palancia	85
Tabla 33. Resultados de la semana del 2016/10/06 de Montes del Palancia	86
Tabla 34. Resultados de la semana del 2016/10/13 de Montes del Palancia	87
Tabla 35. Resultados de la semana del 2016/10/18 de Montes del Palancia	87
Tabla 36. Resultados de la semana del 2016/10/27 de Montes del Palancia	88
Tabla 37. Resultados de la semana del 2016/11/03 de Montes del Palancia	88
Tabla 38. Resumen resultados desde el 26/07/2016 hasta el 03/11/2017	89
Tabla 39. Interpretación de colonias según el kit Microgen®	90
Tabla 40. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar los medios de cultivo (CASA® y RAPID') con la variable categórica: clareo	90
Tabla 41. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar las técnicas de qPCR (iQ-Chek, qPCR <i>C. jejuni</i> y qPCR <i>C. coli</i>) con las variables categóricas: clareo	90
Tabla 42. Análisis descriptivo para las pruebas (CASA®, RAPID', iQ-Chek y qPCR <i>C. jejuni</i>) en relación a la edad de los pollos en semanas	91
Tabla 43. Temperaturas de fusión de los cebadores empleados en la detección de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> mediante el fluoróforo <i>SYBR Green I</i>	94
Tabla 44. Resultados de qPCR para <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> realizados en Zaragoza	95
Tabla 45. Interpretación de los resultados del kit AviPro® PLATE	101
Tabla 46. Fenotipos de los antibióticos detectados en los aislados de Montes del Palancia	102
Tabla 47. Porcentaje e intervalo de confianza según los fenotipos de los antibióticos detectados en los aislados de Montes del Palancia	103
Tabla 48. Resistencias a <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> frente a tetraciclinas y fluoroquinolonas en Francia durante los años 1999-2004 (Gallay et al., 2007)	104
Tabla 49. Punto de corte para el método de difusión en disco y el método BDM, según EUCAST, para <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en diferentes antibióticos	104
Tabla 50. Punto de corte para el método de difusión en disco y el método BDM, según CLSI, para <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en diferentes antibióticos	105



Tabla 51. Temperaturas de fusión de los diferentes amplicones de genes de resistencia mediante el fluoróforo <i>SYBR Green I</i>	105
Tabla 52. Resultados de los genes de resistencia más frecuente en pollos para los diferentes aislados	106
Tabla 53. Correlación sobre la resistencia entre el fenotipo y el genotipo en <i>Campylobacter</i>	107
Tabla 54. Mutaciones sobre la región QRDR del gen <i>gyrA</i> para los aislados de <i>C. jejuni</i>	110
Tabla 55. Estimación de las divergencias evolutivas entre la región QRDR del gen <i>gyrA</i> para los aislados de <i>Campylobacter</i>	112
Tabla 56. Distribución de muestras y diseño experimental teniendo en cuenta los dos factores de estudio: tratamiento con Vitaid y sexo	115
Apartado Anexo	
<hr/>	
Tabla 1. Especies del Gº <i>Campylobacter</i>	164
Tabla 2. Especies de <i>Campylobacter</i> con implicaciones en humanos	165
Tabla 3. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>Campylobacter</i> procedentes de explotaciones avícolas españolas durante los años 2014-2015 (VISAVET, 2015)	166
Tabla 4. Compuestos activos testados en el PRC	166
Tabla 5. Código de los aminoácidos	167
Tabla 6. Referencia material fungible y equipos empleados para este trabajo	168
Tabla 7. Referencia laboratorios	168
Tabla 8. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar los medios de cultivo (CASA® y RAPID') con las variables categóricas: tipo de cama y sexo	169
Tabla 9. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar las técnicas de qPCR (iQ-Chek, qPCR <i>C. jejuni</i> y qPCR <i>C. coli</i>) con las variables categóricas: tipo de cama y sexo	169



Abreviaturas, acrónimos y símbolos

∂→ AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	∂→ EM: Estados Miembros
∂→ AFNOR: Asociación Francesa de Normalización y Certificación	∂→ EN: norma europea adaptada
∂→ AMX: amoxicilina	∂→ ENR: enrofloxacin
∂→ AOAC: Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales	∂→ ERD: eritromicina que discierne <i>Salmonella</i> de campo frente a la empleada en las vacunas vivas de Lohmann
∂→ APPCC: análisis de peligros y puntos de control críticos	∂→ ERY: eritromicina
∂→ BAM: manual analítico bacteriológico	∂→ EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
∂→ bla: β-lactamasas	∂→ F ^a : familia
∂→ BPH: buenas prácticas de higiene	∂→ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
∂→ C+: control positivo	∂→ FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
∂→ CCAA: Comunidades Autónomas	∂→ FISH: hibridación <i>in situ</i>
∂→ CDC: comité director científico	∂→ G ^o : género
∂→ CET: ceftiofur	∂→ H: hembra
∂→ CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio	∂→ IC: intervalo de confianza
∂→ Clt: cultivo	∂→ Ig: inmunoglobulinas
∂→ CMB: concentración mínima bactericida	∂→ IJ: índice de Youden
∂→ CMI: concentración mínima inhibitoria	∂→ ISO: Organización Internacional de Normalización
∂→ CPP: cefpodoxima proxetil	∂→ IV: índice de validez
∂→ CST: colistina	∂→ kb: kilobase
∂→ CTX: cefotaxima	∂→ LAMP: amplificación isotérmica mediada por asa
∂→ DO: densidad óptica	∂→ LIN: lincomicina
∂→ DOX: doxiciclina	∂→ LIS: lincospectina/espectinomycin
∂→ E: especificidad	∂→ log: logaritmo(s)
∂→ ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades	∂→ LPSN: <i>The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature</i>
∂→ EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	∂→ MDR: multirresistencia
∂→ ELFA: ensayo de fluorescencia ligado a enzimas	∂→ mg/l: miligramo por litro

∂→ ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	∂→ QRDR: región determinante de resistencia a quinolonas
∂→ ml: mililitro	∂→ RAM: resistencia bacteriana a los antibióticos o resistencia a los antimicrobianos
∂→ MLST: técnica de secuenciación multilocus	∂→ RAM: rifampicina
∂→ Mx: mixto	∂→ RAPD: amplificación aleatoria de DNA polimórfico
∂→ NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica	∂→ RFLP: polimorfismo en longitud de fragmento amplificado
∂→ Neg: negativo	∂→ S: sensibilidad
∂→ NEO: neomicina	∂→ STRE: estreptomicina
∂→ NFW: agua libre de nucleasas	∂→ T/S: sulfametoxazol/trimetropima
∂→ NHSN: Red Nacional de Seguridad Sanitaria	∂→ T ^a : temperatura
∂→ nm: nanómetro	∂→ TET: tetraciclina
∂→ n°: número	∂→ TIA: tiamulina
∂→ NR: no recibido	∂→ TILM: tilmicosina
∂→ OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal	∂→ TLS: tilosina
∂→ OMS: Organización Mundial de la Salud	∂→ UE: unión europea
∂→ OR: odds ratio	∂→ UFC: unidades formadoras de colonias
∂→ OTU: unidades taxonómicas operacionales o especies	∂→ UNE: una norma española
∂→ OXA: oxacilina	∂→ VISAVET: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
∂→ pb: pares de bases	∂→ VPN: valor predictivo negativo
∂→ PCR: reacción en cadena de la polimerasa	∂→ VPP: valor predictivo positivo
∂→ PEN: penicilina G	∂→ WGS: secuenciaciones de genomas completos
∂→ PFGE: electroforesis en campo pulsátil	∂→ £: libras
∂→ PNRA: plan nacional de resistencia a los antibióticos	∂→ °C: grado centígrado
∂→ Pos: positivo	∂→ µl: microlitro
∂→ ppm: partes por millón	∂→ µm: micras
∂→ PPR: síntesis de proteínas de protección ribosomal	
∂→ PRC: Centro de Investigación de Aves de Corral	
∂→ MH: mueller hinton	
∂→ qPCR: PCR a tiempo real o PCR cuantitativa	

I. Resumen / *Summary*

Resumen

En la actualidad, y desde los últimos doce años, la bacteria conocida como *Campylobacter* continúa siendo la zoonosis con el mayor número de casos humanos notificados en la Unión Europea (229.213 en el año 2015). Es por ello que la mayoría de los Estados Miembros tiene la obligación de notificarlos, siendo *C. jejuni* la principal especie termofílica aislada en las personas, seguida en la distancia de *C. coli*. La principal fuente de infección humana es el consumo de carne de pollo contaminada por este patógeno.

Esta Tesis tiene como objetivo principal diseñar e implementar técnicas de diagnóstico rápido y fiables basadas en biología molecular con el fin de permitir su detección en explotaciones de pollos de engorde. Por otra parte, se ha realizado un estudio minucioso acerca de la resistencia antimicrobiana a partir de diferentes aislados procedentes de muestras de calzas. La metodología empleada consistió en la técnica de microdiluciones y la detección de genes de resistencia para los antibióticos que se administran con mayor frecuencia en avicultura de carne.

Otro de los enfoques de este Trabajo radica en el estudio de la microbiota intestinal de ciegos de pollos para observar el efecto de un pienso complementario líquido administrado en el agua de bebida (Vitaid) mediante análisis de secuenciación masiva.

Los resultados derivados de la puesta a punto de las diferentes técnicas diagnósticas revelaron excelentes valores de validez y fiabilidad (> 99%) en todas las pruebas diseñadas para la detección individual o conjunta de *Campylobacter* (*C. jejuni* o *C. coli*). Además, se aislaron 23 cepas de *Campylobacter* sobre un total de las 25 aves positivas, con tan solo un aislado correspondiente a *C. coli*.

El estudio antimicrobiano determinó una correlación del 100% entre el resistotipo (amoxicilina, doxiciclina, enrofloxacina, lincomicina y tilosina) y el genotipo resistente presente en todos los aislados bacterianos. Asimismo, se ha detectado la mutación Thr86Ile en la región QRDR del gen *gyrA* para todos los aislados de *C. jejuni*.

Para finalizar, el análisis de secuenciación masiva reflejó una mayor diversidad de especies microbianas en los individuos tratados en relación al grupo control. Además, se ha observado que las hembras poseían una microbiota más heterogénea en comparación a los machos. Sin embargo, este ensayo preventivo no resultó efectivo para *Campylobacter* ya que aumentó entre 2-4 veces su carga bacteriana.

Nowadays, and for the last twelve years, the bacteria known as *Campylobacter* continues to be the zoonosis with the highest number of cases reported in the European Union (229,213 in 2015). It is for this reason that the majority of Member States have the obligation to notify them, showing *C. jejuni* as the main thermophilic species isolated in people, followed in distance by *C. coli*. Chicken meat consumption is considered the main source of human campylobacteriosis.

This thesis main objective is to design and implement fast and reliable diagnostic techniques based on molecular biology to detect its presence on broilers farms. Later on a detailed study has been undertaken for evaluating antimicrobial resistance observed in the different isolates from litter samples. The methodology used consisted of microdilutions technique and detection of specific genes associated with resistance to antibiotics that are usually administered in broilers production.

Another part of the thesis deals with applying deep sequencing technique to study intestinal microbiota changes occurring at the ceacum in response to a liquid supplemental feed administered in drinking water (Vitaïd).

Results from development of different diagnostic techniques revealed excellent values of concordance, validity and reliability (> 99%) in all tests designed for individual or joint detection of *Campylobacter* (*C. jejuni* or *C. coli*). In addition, 23 strains of *Campylobacter* were isolated from a total of 25 positive units, with only one isolate corresponding to *C. coli*.

The antimicrobial study determined a 100% correlation between the resistotype (amoxicillin, doxycycline, enrofloxacin, lincomycin and tylosin) and the resistant genotype present in all bacterial isolates. Moreover, the Thr86Ile mutation in the QRDR region of the *gyrA* gene was detected for all *C. jejuni* isolates.

To conclude, the deep sequencing analysis reflected a greater diversity of microbial species in the treated individuals relative to the control group. In addition, it has been observed that females had a more heterogeneous microbiota than males. However, this preventive trial was not effective against *Campylobacter* since it increased 2-4 times the bacterial load.

II. Revisión bibliográfica

1. Antecedentes históricos

La primera descripción de los microorganismos que conocemos actualmente como *Campylobacter*, data del año 1886 gracias al investigador alemán Theodore Escherich, que observó al microscopio bacterias intestinales con morfología espiral en heces de niños nacidos muertos debido a una patología conocida como "*cholera infantum*" (Butzler, 2004).

Sin embargo, todos sus intentos por lograr cultivar estos vibrios en medios sólidos fueron infructuosos, llegando a pensar incluso que no jugaban ningún papel etiológico en la enfermedad. Probablemente, la primera descripción verdadera de *Campylobacter* proviene del año 1909 en un estudio realizado por los investigadores ingleses McFadyean y Stockman a partir de muestras de fetos abortados en ovejas. La mayoría de las investigaciones estaban relacionadas con la bacteria *Brucella abortus*, aunque también encontraban otras con morfología en espiral, aisladas del moco uterino de la oveja y del contenido estomacal de los propios fetos, que dieron lugar al proceso conocido como "aborto vibriónico" que causaba numerosas pérdidas económicas en el ganado vacuno y ovino.

Smith observó en el año 1919 unos casos similares en el ganado bovino estadounidense. Después de que sus investigaciones confirmasen que se trataba de la misma bacteria aislada en 1909 por sus colegas ingleses, la denominaron *Vibrio fetus* (Smith, 1919). En el año 1959 se distinguieron por pruebas bioquímicas y patogenicidad dos subespecies de *V. fetus*: *V. fetus inestinalis* y *V. fetus veneralis* (ahora llamado *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*) (Florent, 1959).

Las investigaciones realizadas por Jones et al. (1931) demostraron la relación causal entre las alteraciones intestinales observadas en terneros y la detección de un grupo de bacterias con morfología vibrioide. Este tipo de bacterias recibió el nombre de *Vibrio jejuni*. Se observaron diferencias con *V. fetus* en cuanto a su longitud y número (nº) de vueltas de espira. En el año 1944, Doyle propuso el nombre de *Vibrio coli* a una bacteria similar a las anteriores, pero en esta ocasión se aisló de intestinos de cerdos con disentería.

La primera descripción sobre la infección humana por *Campylobacter* se realiza en 1938 y tuvo su origen en problemas gastrointestinales asociados al consumo de leche entre los reclusos de dos penitenciarías en Illinois (EE. UU.) (Levy 1946). Sin embargo, esta denominación de *Campylobacter* no fue efectiva hasta 1963 gracias a Sebald y Veron. *Campylobacter* proviene del griego *kampulos* que significa curvado y *bacter*, bastón.

En 1947, Vincent et al. aislaron *V. fetus* a partir de sangre entera procedente de tres mujeres embarazadas hospitalizadas debido a fiebre de origen desconocido.

La investigadora Elizabeth King acuña por primera vez, en el año 1957, el término "vibrios afines" (*related vibrios*) al relacionar estas bacterias con enfermedades

de tipo entérico en las personas. Estos vibrios tienen la característica diferencial respecto a los *V. fetus* de crecer a temperaturas (T^a) óptimas de 42 °C (termotolerantes), como una forma de adaptación a los animales de sangre caliente (por ejemplo, las aves).

El momento crucial para el avance en el conocimiento de estos microorganismos fue el empleo de una técnica de filtración especial (filtro de 0,65 (µm) de diámetro) en sangre y heces para conseguir el aislamiento de *C. jejuni* en un medio de cultivo selectivo, aunque no se publicó hasta 1972 (Dekeyser et al., 1972). En 1977 tuvo lugar el punto de partida del conocimiento actual sobre la infección por *Campylobacter* cuando Skirrow, a partir de un medio simple de cultivo en medio sólido y sin filtración pero adicionando vancomicina, polimixina y trimetropin, consiguió aislar *C. jejuni* en niños e individuos adultos con mejores resultados que Dekeyser et al. Finalmente y pese haber ignorado durante tanto tiempo la microbiología clínica, se estableció a mediados de los años 80 que *C. jejuni* era la principal causa de gastroenteritis bacteriana en los seres humanos.

En la actualidad diversos análisis de secuenciación masiva, a partir de muestras fecales, han revelado la convivencia estrecha de varias especies de *Campylobacter* simultáneamente, en las que con posterioridad ha resultado un fracaso su aislamiento en medios selectivos ya que estaban diseñados principalmente para *C. jejuni* y *C. coli* (Nakamura et al., 2008; estudios propios grupo SADA Nutreco, 2015).

Se recomienda aislar *Campylobacter* en medios de cultivo selectivo contando con el apoyo de técnicas de filtración (Lynch et al., 2010). También son útiles otros métodos de detección basado en técnicas inmunológicas (Granato et al., 2010; Bessède et al., 2011).

2. Clasificación taxonómica

El análisis de la secuencia ribosomal 16S ARNr revela que *Campylobacter* pertenece al reino *Procarionta*, dominio *Bacteria* y dentro del filo *Proteobacteria* se engloba dentro de las Epsilonbacterias (*ε-proteobacterias*). Su clasificación se produce por semejanza con los análisis de esta secuencia (Gupta, 2006).

Las epsilonbacterias poseen dos órdenes: *Campylobacterales* y *Nautiliales*. El orden *Campylobacterales* engloba a tres familias (F^a): *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* e *Hydrogenomonaceae*. Este orden se caracteriza porque la mayoría de sus bacterias presentan una morfología curvada o en espiral y con diferentes especies patógenas para los animales y el hombre.

Los géneros (G^o) que albergan a la familia *Campylobacteraceae* según el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) son: *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Candidatus Thioturbo* y *Sulfurospirillum* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=72294&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, último acceso 03-08-2017).

2.1 Género *Campylobacter*

Las bacterias pertenecientes al G^o *Campylobacter* son bacilos delgados, Gram negativos y normalmente presentan una morfología curvada o en espiral. Aunque existen especies con aspecto de bacilos rectos, en ningún caso, forman esporas ni presentan pigmentos.

Cuando se agrupan bacilos de cadena corta se observa una forma de S o alas de gaviota, y se caracterizan por ser móviles con un movimiento tipo sacacorchos, al visualizarse al microscopio en campo oscuro o contraste de fases. Este movimiento se debe a la existencia de un solo flagelo en posición polar no envainado en uno o ambos extremos de la célula, que pueden ser 2-3 veces la longitud de *Campylobacter*. También se han observado especies no móviles como *C. gracilis* o que tengan múltiples flagelos como *C. showae*. Ocasionalmente en la especie *C. hyointestinalis* se observan diferencias en cuanto al número de flagelos mostrados por células en cultivo

El tamaño normal oscila entre 0,2-0,8 µm de ancho por 0,5-5 µm de largo, pero algunos pueden llegar a medir hasta 8 µm de largo y tener una o más espirales. *Campylobacter* posee un bajo contenido de bases nitrogenadas G+C, entre 29-47 mol% (Silva et al., 2011; Yamamoto et al., 2013; Vandamme et al., 2015) (figura 1).

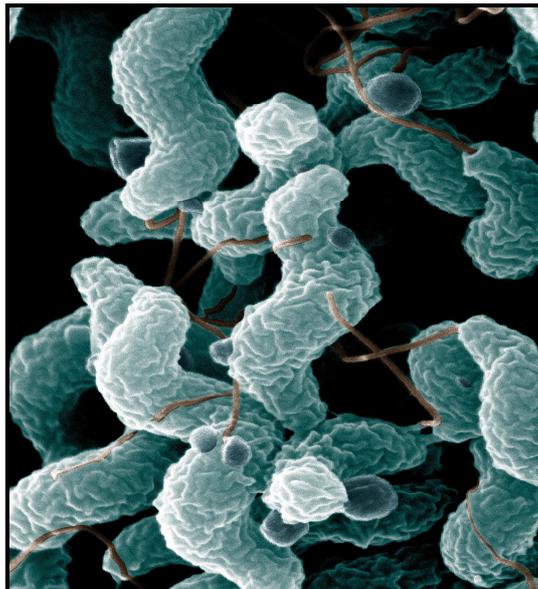


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido para *Campylobacter jejuni* (de Wood, Pooley, Agricultural Research Service)

El genoma aproximado de *C. jejuni* (1.641 kb, ref. Genbank: AL111168.1) o *C. coli* (1.683 kb, ref. Genbank: NZ_LQXL00000000.2) tiene un cromosoma relativamente pequeño comparado con otras enterobacterias, como *Escherichia coli* (4.668 kb, ref. Genbank: LRDE01000001.1) o *Salmonella* (4.812 kb, ref. Genbank: LAPF01000001.1). Se ha supuesto que la especie *C. jejuni* codifica un total de 1.654 proteínas y 54 especies de especies de RNA estables. Además, se ha descubierto la presencia de regiones hipervariables en los genes que codifican la biosíntesis y la modificación de estructuras superficiales, o en genes estrechamente

vinculados de función desconocida. La supervivencia de *C. jejuni* puede ser importante debida a la aparente tasa de variación de estas regiones homopoliméricas (Parkhill et al., 2000).

Las especies de este género son microaerófilas (5-10% de O₂ o 3-15% de CO₂), aunque la tolerancia al oxígeno puede variar incluso entre cepas de la misma especie (Hilbert et al., 2010). Sin una pequeña cantidad de oxígeno no son capaces de reproducirse. Este requerimiento se debe a que *C. jejuni* posee una enzima dependiente de oxígeno que se llama ribonucleótido reductasa (Sellars et al., 2002). Asimismo, este género se caracteriza por tener un metabolismo típicamente respiratorio.

Aunque *Campylobacter* posee ciertas enzimas antioxidantes (catalasa), se encuentran en menor cantidad que en otros patógenos entéricos, por lo que son más susceptibles al estrés oxidativo (Lee y Newell, 2006). Si los porcentajes de oxígeno fueran superiores al 15% se produciría la muerte de algunas de estas bacterias debido a los compuestos tóxicos generados.

También poseen diferentes enzimas (reductasas) que le ayudan a la respiración celular. Éstas le permiten utilizar una gran variedad de aceptores finales de electrones, además del oxígeno (Pittman et al., 2007). Como donante de electrones disponen de compuestos como lactato o hidrógeno, entre otros. En la mayoría de las ocasiones un medio enriquecido con hidrógeno favorecerá el crecimiento de *Campylobacter*.

La T^a óptima de crecimiento, para algunas especies, es de 37 °C pero para otras como *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* o *C. upsaliensis* se encuentra alrededor de 42 °C, otras en cambio solamente crecen a 25 °C (*C. fetus*). En general, la T^a de incubación influye en el tiempo generacional, por ejemplo en el caso de *C. jejuni* si se incuba a 42 °C la velocidad de crecimiento es de 1,29 horas pero si la incubamos a 37 °C es de 2,55 (Doyle y Roman, 1981). La refrigeración entre 0 y 10 °C detiene el crecimiento y la congelación puede llegar a destruir parte de la población bacteriana.

Las condiciones de crecimiento se puede observar en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento para *Campylobacter*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	30	37-43	45
pH	5	6,5-7,5	8,0
Actividad de agua	0,987	0,997	0,987

Algunas células son capaces de formar cuerpos esféricos o cocoides en cultivos antiguos o prolongados (Alonso et al., 2002). Por ello, se ha sugerido, aunque no aceptado por todos los autores, que podría tratarse de Formas Viables pero No Cultivables (VBNC). Según Hochman (1997) puede que estas formas no sean más que un reflejo de una población bacteriana moribunda, otros en cambio piensan que efectivamente existe una forma VBNC de *Campylobacter* (ACMSF, 2004). Debido a esta característica, otros las catalogan como especies con un riesgo añadido: más virulentas (Thomas et al., 1999; Lee y Newell, 2006).

Las bacterias VBNC presentan estas formas como una respuesta a las condiciones estresantes sufridas, tales como variaciones en la concentración de oxígeno atmosférico, ausencia de nutrientes o Tª extremas (Cappelier et al., 1999).

Por otra parte, *Campylobacter* tiene la característica de crear biofilms en este tipo de situaciones estresantes para ella. Así aumenta su capacidad de supervivencia bajo estas condiciones extremas (Murphy et al., 2006; Reuter et al., 2010).

Las bacterias del G^o *Campylobacter* son sensibles al calor (no sobreviven a > 60 °C), los desinfectantes, las radiaciones, la desecación (oreo), el cloruro sódico y los pH ácidos ó básicos (pH < 5 o pH > 9) (Park, 2002). Además, algunas especies de *Campylobacter* pueden permanecer viables 3 días en leche, entre 9 y 32 días en estiércol y hasta 120 días en agua (Whiley et al., 2013).

Por otra parte, tampoco son capaces de fermentar u oxidar los hidratos de carbono ya que carecen de la enzima fosfofructoquinasa (Fouts et al., 2005) pero si poseen las enzimas responsables de la oxidación de la glucosa y de las pentosas fosfato (Parkhill et al., 2000; Velayudhan y Kelly, 2002). La principal fuente de carbono para *Campylobacter* proviene de los aminoácidos fácilmente accesibles en el intestino de las aves (serina, aspartato, glutamato y prolina) y de los compuestos intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) (Stahl et al., 2011; Epps et al., 2013).

Solamente algunas cepas de *C. jejuni* son capaces de metabolizar el azúcar conocido como fucosa. Se trata de un componente de glicoproteínas como la mucina que actúa como quimioatrayente favoreciendo la colonización en el tapiz intestinal de las aves (Fernandez et al., 2000; Stahl et al., 2011).

2.2 Especies del G^o *Campylobacter*

Se trata de un género bacteriano que continuamente sufre actualizaciones debido a las reclasificaciones de los análisis microbiológicos, filogenéticos o proteicos, o bien a los nuevos hallazgos en hábitats poco explorados por la humanidad: *Campylobacter* posee la capacidad de adaptarse a una gran variedad de nichos ecológicos.

El G^o *Campylobacter* engloba actualmente en 37 especies y 14 subespecies, según la lista, *The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN) (<http://www.bacterio.net/>) (ver Anexo, tabla 1).

En la tabla 2 del apartado Anexo, se observan 17 especies y 6 subespecies de *Campylobacter* con su hospedador más habitual y referencia bibliográfica. Éstas destacan por encima del resto ya que son las que mayor relevancia presentan en el hombre al aislarse fundamentalmente de procesos gastrointestinales. De todas ellas, las más frecuentes son *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. coli* y, en menor medida, *C. lari* y *C. upsaliensis* (Kaakoush et al., 2015; OMS *Campylobacter*, 2016; Klein, 2017).

3. Campilobacteriosis en los seres humanos

3.1 Zoonosis de gran importancia

En el año 1959 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definieron el concepto de zoonosis como: “enfermedades que se transmiten de forma natural entre los animales vertebrados y el hombre, y viceversa”. Actualmente el concepto que suele emplearse es el descrito por Savey y Dufour en el año 2004: “enfermedades, infecciones o infestaciones provocadas por agentes transmisibles (virus, bacterias, parásitos, priones, etc), que se desarrollan en al menos dos especies de vertebrados, incluido entre ellos al hombre”. Otra definición similar se recoge en el artículo 2.2a del Real Decreto 1940/2004.

Hoy en día existen más de 200 enfermedades zoonóticas en todo el mundo que causan serios problemas sanitarios, económicos y sociales. Se cree que entre el 61-65%, de los más de 1.400 patógenos humanos conocidos en el mundo, son zoonóticos y tienen relación directa con las actividades de Salud Pública Veterinaria (Rodríguez, 2009). Entre ellas, se encuentran algunas especies de *Campylobacter*.

Es por ello que la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) destaca la contribución esencial de todos los profesionales sanitarios relacionados con el mundo de la Salud Pública que participan plenamente en el esfuerzo de la estrategia *One Health*. El trabajo de estos colectivos se realiza a escala local, nacional y mundial para responder a retos críticos y alcanzar una salud óptima para el hombre, los animales domésticos y salvajes, y el medioambiente (Ley 44/2003).

Basándonos en el informe anual, elaborado a partir de la información remitida por 32 países, de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y del Centro Europeo para la Prevención y Control de enfermedades (ECDC) sobre la situación de las zoonosis en Europa en el año 2017 y publicado el 17 de diciembre de 2015, se refleja que existen zoonosis que se presentan en mayor proporción que otras, pero no por ello más importantes, por ejemplo la campilobacteriosis en relación a la rabia (ECDC, 2016; EFSA, 2016b).

El problema que caracteriza a *Campylobacter*, a diferencia de lo que ocurre con otras zoonosis alimentarias, es el desconocimiento que se tiene por gran parte de nuestra sociedad. Algunos autores la denominan como la bacteria discreta (Orihuel et al., 2015). Resulta ser una de las bacterias más onerosas debido al elevado incremento de casos desde los años 90. En los países desarrollados encontramos altas tasas de morbilidad pero pocos casos de mortalidad, tan solo un 0,03%. En cambio, los países en vías de desarrollo presentan tasas de mortalidad mucho más elevadas, sobre todo en la población infantil (< 5 años). En el Reino Unido el coste medio empleado para hacer frente a la campilobacteriosis, durante los años 2008-2009, ascendió a 50 millones de libras (£), (95% CI: 33m£-75m£), (Tam y O'Brien, 2016).

Desde el año 2005 hasta la actualidad, *Campylobacter* continúa siendo la zoonosis con el mayor número de casos humanos notificados en la UE. Durante

el 2015, se han señalado 229.213 (tasa de 65,5 casos/100.000 habitantes), mientras que los de *Salmonella* ascienden a 94.625, tal y como se aprecia en la figura 2. Se ha observado una disminución del 5,8% de los casos con respecto al 2014 (EFSA, 2016a; EFSA, 2016b).

El número de infecciones en Australia, en el año 2010, fue de 179.000 (Kirk et al., 2010). En EE. UU., tan solo se observaron 30 casos/100.000 habitantes siendo *Salmonella enterica* la principal causa de gastroenteritis bacteria (Scallan et al., 2011).

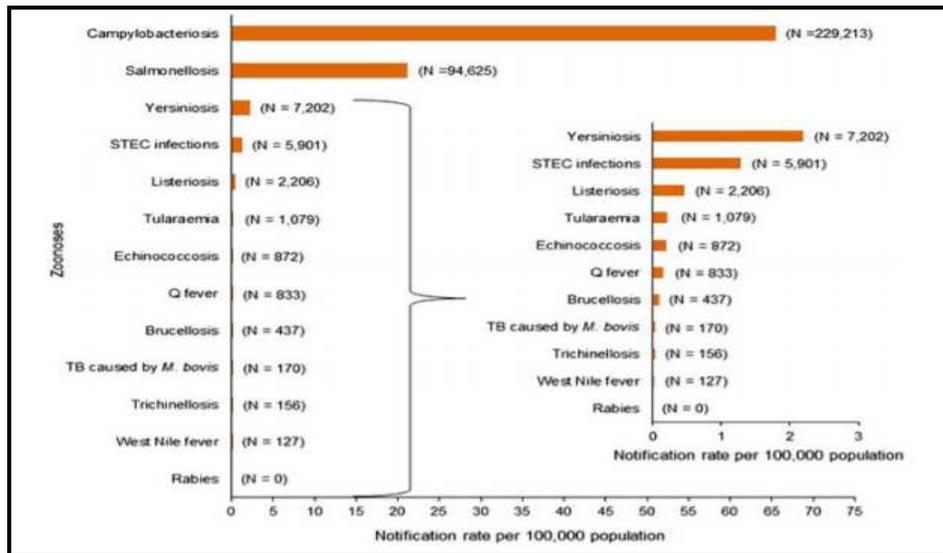


Figura 2. Número de zoonosis confirmadas en la UE en el año 2015 (EFSA, 2016b)

El aumento del número de casos de campilobacteriosis humana notificados en algunos países en los últimos años, no solo refleja cambios en la exposición sino también la introducción de mejoras en los sistemas de vigilancia de todos los Estados Miembros (EM) (Emborg et al., 2015). Por otra parte, un estudio serológico realizado en la población europea destaca una pequeña proporción de individuos con anticuerpos frente a *Campylobacter* relacionados con el número total de casos clínicos registrados para esta enfermedad (Gibbons et al., 2014).

En la figura 3 se reflejan los aislamientos (9.562) realizados en España durante el año 2015 procedentes de 69 laboratorios de 9 Comunidades Autónomas (CCAA), estratificados por especies. Como se puede comprobar, *C. jejuni* es la especie que recoge mayor número de casos, seguido en la distancia de *C. coli*. Gracias a la mejora de la cobertura del sistema de vigilancia para esta enfermedad se ha aumentado en un 15,3% los casos diagnosticados de campilobacteriosis con respecto al 2014 (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017).

La comunidad autónoma de Aragón destaca por ser la tercera con mayor número de casos confirmados sobre campilobacteriosis humana en el año 2015 (10,12%).

Comunidad Autónoma	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. spp</i>	Total
Aragón	716	109	1	0	0	142	968
Canarias	431	29	0	1	0	24	485
Castilla-La Mancha	170	1	0	0	0	36	207
Castilla y León	480	53	0	1	1	69	604
Cataluña	3.587	201	7	0	0	240	4.035
Extremadura	0	0	0	0	0	49	49
Navarra	608	72	0	0	0	33	713
País Vasco	1.552	113	6	0	3	290	1.964
La Rioja	454	0	0	0	0	83	537
Total	7.998	578	14	2	4	966	9.562

Figura 3. Número de zoonosis confirmadas en España durante el año 2015

La figura 4 recoge todos los casos registrados de *Campylobacter* y *Salmonella* en España desde el año 2005 hasta la actualidad. Durante el año 2012 no existe información sobre este aspecto en la OIE.

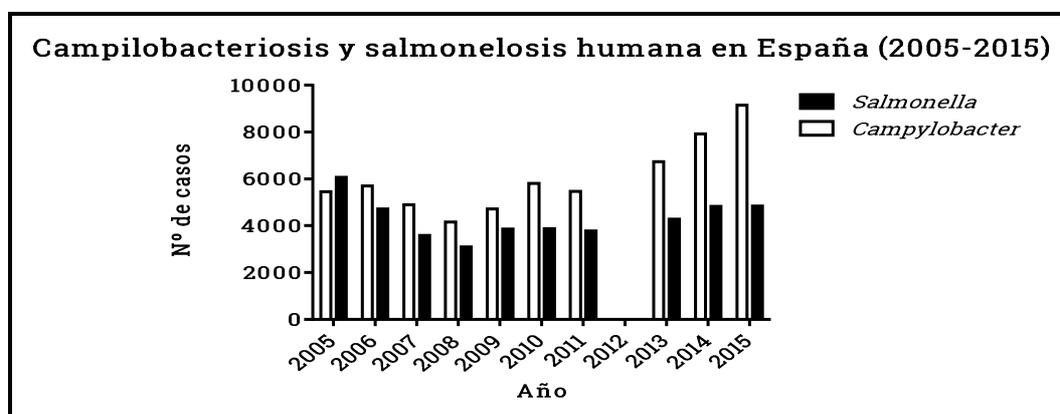


Figura 4. Número casos confirmados en España durante los años 2005-2015: *Campylobacter* y *Salmonella*

La notificación de los casos de campilobacteriosis es obligatoria en la mayoría de los EM, salvo en siete en los que se basa en un sistema voluntario (Bélgica, Francia, Italia, Luxemburgo y los Países Bajos) u otro sistema (España y Reino Unido). No existe vigilancia epidemiológica en Grecia y Portugal. Este último informó por primera vez en el 2015. Los sistemas de vigilancia tienen una cobertura nacional completa en todos los EM excepto cinco (Bélgica, Francia, Italia, Países Bajos y España). La cobertura en España se estima en un 45%.

Aunque se deben notificar los casos de *Campylobacter* en alimentos y animales, en la actualidad no existe una vigilancia armonizada en la UE, por lo que los datos de monitoreo epidemiológicos proporcionados por los 32 países pueden variar incluso de un año para otro. Las investigaciones no son necesariamente comparables debido a las diferencias metodológicas (EFSA, 2016b).

De la misma manera que está demostrado un aumento de la prevalencia entre los años 2008 a 2015, trece países correspondientes a los EM notificaron un aumento significativo de casos de campilobacteriosis humana ($p < 0,05$), España fue uno de ellos. Este hecho concuerda con los estudios de campo que afirman un

aumento de la prevalencia de *Campylobacter* en los lotes de pollos de engorde durante la época estival. Esta información se observa en la figura 5.

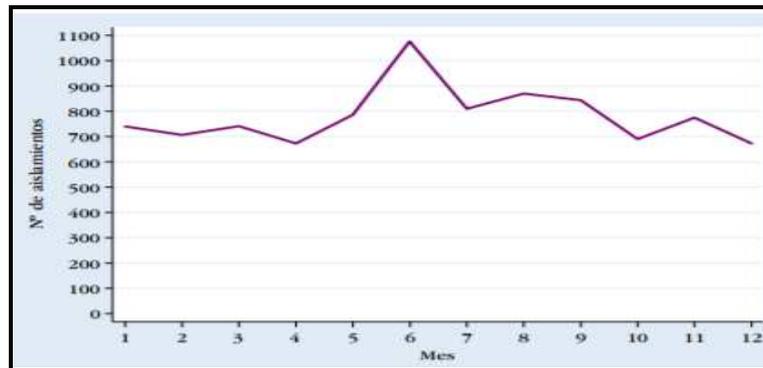


Figura 5. Distribución por mes de los aislamientos de *Campylobacter*. España, 2015 (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017)

Además, no debemos olvidarnos de la existencia de casos de campilobacteriosis de origen alimentario procedentes de los vehículos de transporte de alimentos, que en el año 2015 fue del 27,3% debido al consumo de leche, queso y productos lácteos fundamentalmente y, en menor medida, por carne de pollo y sus productos. En el año 2014 se asoció principalmente a la carne de pollo.

El número total de brotes de *Campylobacter* transmitidos por alimentos, exceptuando dos brotes por ingestión de agua, representa el 8,8% de todos los notificados en la UE. En comparación con el año 2014 ha habido un descenso en su número (385 vs 444 brotes). De todos ellos, solamente el 6,5% mostraron fuertes evidencias de *Campylobacter* (EFSA, 2016a; EFSA, 2016b).

En esta línea que señalamos y con el objetivo de valorar el conocimiento que los estudiantes de la rama de Ciencias de la Salud de la Universidad de Zaragoza (Grado en Medicina y Grado en Veterinaria) tienen sobre determinadas enfermedades vectoriales y/o zoonóticas, se llevó a cabo un estudio, que consistió en la realización de un formulario, y que fue contestado por los estudiantes durante el curso académico 2015-2016 (Fuertes, 2016).

Los resultados obtenidos demostraron que todos los alumnos del ámbito rural encuestados tuvieron una tasa de respuestas correctas mayor que aquellos cuyo hábitat era urbano, con independencia de la titulación y curso académico cursado.

Los alumnos de ambos grados universitarios, y desde el primer curso hasta el último, poseen al inicio pocos conocimientos relativos a la enfermedad pero al acabar su período de formación, se observa un aumento notable de los mismos. Es importante destacar que los alumnos del Grado de Veterinaria, debido a su plan de estudios y al número de horas docentes recibidas, adquieren mayor conocimiento de estos aspectos al finalizar sus estudios (Fuertes, 2016). Este hecho se une al manifiesto de la OIE al resaltar el papel de los veterinarios en la sociedad en su tarea de garantizar la sanidad y el bienestar de los animales, personas y ecosistemas (OIE, 2012).

3.2 Factores epidemiológicos de *Campylobacter*

La incidencia y prevalencia de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*) a nivel mundial y en los últimos años se recoge en la figura 1 del apartado anexo.

3.2.1. Reservorios de la enfermedad

Habitualmente, las bacterias del Gº *Campylobacter* habitan como comensales en el tracto intestinal de animales de sangre caliente como aves de corral (Di Giannatale et al., 2010), aves silvestres, rumiantes (García et al., 2010), porcinos (Payot et al., 2004), avestruces, mariscos, perros y gatos (Hald y Madsen, 1997; Carbonero et al., 2012), y se detectan con frecuencia en alimentos derivados de éstos (EFSA, 2012a). Estos reservorios se comportan como portadores asintomáticos de la enfermedad, presentándola en muy raras ocasiones.

No debemos olvidarnos de los vectores mecánicos como la *Musca domestica* (Choo et al., 2011; Royden et al., 2016), roedores (Meerburg et al., 2007), mamíferos salvajes (Lillehaug et al., 2005) o amebas (Snelling et al., 2005). Pero tampoco del agua subterránea, residual o agua procedente de los ríos o de lluvia (Jones, 2001; Rechenburg et al., 2009), debido a la contaminación fecal por animales de abasto o aves silvestres. Todos ellos pueden actuar como vehículos animados o inanimados de la enfermedad.

3.2.2. Fuente de infección

Este apartado se centrará en los procesos entéricos originados principalmente por *C. jejuni* y *C. coli* cuya transmisión se realiza de manera directa mediante el consumo de alimento o agua contaminado con *Campylobacter* (Wilson et al., 2008; Newell et al., 2011; Hermans et al., 2012).

La epidemiología de esta enfermedad resulta compleja debido a la baja incidencia que presenta entre los trabajadores de las explotaciones de pollos, a pesar de la alta prevalencia en ellas (Price et al., 2007).

El origen predominante de la infección por *Campylobacter* en varios EM durante el año 2015, fue el ámbito doméstico ($\geq 90\%$), seguido de los viajes realizados por todo el mundo ($\geq 40\%$). De los 16.529 casos relacionados con viajes, España (21,35%), Turquía (8,85%) o Tailandia (7,6%) son los países que cuentan con más probabilidades para que se produzca una infección EFSA, 2106b).

La canal de pollo se considera la principal fuente de campilobacteriosis humana. En el año 2015, el 46,7% de las 6.707 muestras analizadas de carne de pollo fresco resultaron tener un resultado positivo, mayor que en el 2014. La EFSA estima que si se reduce la carga microbiana de *Campylobacter* en las canales por debajo de 2 logaritmos (log), probablemente, se reduciría el riesgo atribuido a la carne de pollo en más del 90% (EFSA, 2011).

Según un estudio elaborado por la Universidad de Zaragoza sobre factores de riesgo en casos esporádicos de gastroenteritis por *Campylobacter* en niños, se demostró que un consumo de pollo mínimo de tres veces por semana (odds ratio (OR) de 6,1 con un intervalo de confianza (IC) entre 2,0-8,5) generaba mayor riesgo que el consumo de loncheados manipulados de manera no higiénica en

carnicerías o comercios minoristas (OR = 4,1 e IC: 1,2-13,2), o que el contacto con animales (OR de 2,8 e IC: 1,1-7,3) (Fajo-Pascual, 2009).

En la mayoría de los países se sabe que las infecciones por *Campylobacter* tienen un carácter estacional, con mayor prevalencia en verano y a principio de otoño, y con predominio en aves de corral (EFSA, 2010a). Se puede observar, en algunos países, un pequeño pico de casos durante el invierno debido a las características culinarias propias de cada región, por ejemplo en Suiza es tradición comer fondue de carne, en ocasiones elaborada con carne de pollo (Bless et al., 2014).

La etapa crítica en el matadero recae sobre el faenado donde la bacteria es capaz de sobrevivir en las grietas de la canal con pequeñas concentraciones de oxígeno (Iovine, 2013). Por ello se tiene que tener especial cuidado con el consumo de carne poco cocinada (sobre todo de cerdo y pollo), y además por la contaminación cruzada con otros alimentos que se vayan a comer en crudo (Jimenez et al., 2005).

Otras fuentes de infección de *Campylobacter* son:

- ~ Carne de cerdo. A pesar de aislarse con mayor frecuencia que en el ganado vacuno o en las aves de consumo, se estima que no supone una fuente de infección relevante para las personas. Hecho que se constata, según el informe de la EFSA en el 2015, al demostrar que todos los lotes de productos cárnicos analizados dieron un resultado negativo (111 lotes analizados). La principal especie de *Campylobacter* en el cerdo es *C. coli* (Epps et al., 2013). *Campylobacter* es un comensal habitual en el intestino de esta especie.
- ~ Productos lácteos sin o con escaso tratamiento térmico. A pesar de ser una fuente de infección, no se ha detectado *Campylobacter* en los análisis realizados a partir de leche de vaca cruda destinada al consumo humano directo o tras recibir un tratamiento térmico de pasteurización o a temperatura ultra-altas (UHT) a lo largo del año 2015.
- ~ Frutas y vegetales. Presenta un pequeño porcentaje (0,23%) (Verhoeff-Bakkenes et al., 2011). Hay que prestar una especial atención a la contaminación cruzada en los frigoríficos domésticos.
- ~ Reservorios anteriormente citados como los animales de compañía, perro y gato, aguas de consumo o de recreo, o insectos.

Otra fuente de infección, menos frecuente que las anteriores, son los patés elaborados a partir de hígado de pollo ya que el hígado puede ser colonizado por estas bacterias o bien se contamina en la evisceración y preparado del paté. Una vez ingerido por el hombre, el pH del estómago no degradaría la bacteria debido al contenido graso del alimento (Little et al., 2010).

3.3 Patogenia

Los mecanismos específicos de virulencia no son todavía claramente conocidos para *Campylobacter* debido probablemente a la falta de similitud entre esta bacteria y otros patógenos (Guerry, 2007).

Estos mecanismos se deben a componentes celulares como endotoxinas, flagelos (movilidad), adhesinas (adherencia a la mucosa) e invasinas, pero también pueden deberse a componentes extracelulares (enterotoxinas o toxinas citopáticas) (Dasti et al, 2010). Las cepas carentes de adhesinas, al igual que las inmóviles, son consideradas como avirulentas.

También se ha descrito un importante factor de virulencia que detiene la fase G2-M del ciclo celular eucariota ocasionando la muerte de las células (Asakura et al., 2008). Este hallazgo ha sido causado por una toxina citoletal de distensión (TCD) procedente de *C. jejuni*, que también se ha encontrado en *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus* (Johnson y Lior, 1988). Muy probablemente podría estar involucrada en la modulación de la respuesta inmune que ocasiona inflamación del intestino en el hombre pero no así en el de los pollos de engorde (Dasti et al, 2010). La toxina TCD induce solamente la producción de anticuerpos neutralizantes en los seres humanos.

El síndrome de Guillain-Barré se encuentra relacionado con el serotipo O:19 de *C. jejuni* (Chatzipanagiotou et al., 2003). En base a ello, se han propuesto dos esquemas de serotipificación para esta especie, uno basado en el antígeno somático termoestable de Penner (HS) y el otro en el antígeno flagelar termolábil de Lior (HL) (Penner y Hennessy, 1980; Lior et al., 1982).

La patogenia de *Campylobacter* la centraremos en *C. jejuni* ya que se trata de la especie mejor estudiada. El principal mecanismo de patogenicidad es la invasión de *C. jejuni* a las células epiteliales de la mucosa intestinal, tanto a nivel del intestino delgado como del colon, donde se multiplica y se desplaza a la lámina propia. Esta invasión daña el epitelio produciendo inflamación, edema y hemorragia observando una enterocolitis inespecífica con los siguientes hallazgos microscópicos: infiltración de neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos, degeneración y atrofia glandular, reducción en la secreción de mucus, abscesos de las criptas y ulceración de la mucosa epitelial (Ketley, 1997). También se observa una degeneración de las células epiteliales, presencia de fibrina y una reducción de la capacidad de absorción intestinal (van Deun et al., 2007). La motilidad y quimiotaxis de *C. jejuni* desempeñan un papel fundamental en la campylobacteriosis humana (Konkel et al., 2001; Dasti et al., 2010).

Posteriormente, una vez fijado *C. jejuni* a las células intestinales tiene lugar el paso hacia el interior de los enterocitos por la parte superior de las vellosidades gracias a la acción de la proteína CadF (proteína de unión a la fibronectina de la matriz celular que está presente en todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*). Una vez en el interior esta bacteria causa necrosis debido a la acción de toxinas, observándose concordancia entre el grado de invasividad bacteriana y la presentación de la forma diarreica. Song et al., (2004) plantearon que otra proteína homóloga de las flagelinas, conocida como FlaC, podría intervenir en este proceso.

La penetración de la barrera intestinal por *Campylobacter* no se conoce con exactitud, hay autores que creen que se produce gracias a unas moléculas que actúan como receptoras atravesando la barrera intestinal, otros creen que lo pueden realizar mediante una célula o el paso de esta bacteria entre varias

células (Harvey et al., 1999). En cualquier caso, una vez traspasada dicha barrera comienza un proceso de enteritis (Konkel et al., 2001).

Por todo ello, si el tropismo se observa en el aparato genital, se presentará un cuadro abortivo, pero si es intestinal será diarreico. *Campylobacter* se puede transmitir entre las personas (inusual), entre animales y de los animales al hombre.

El período de incubación es variable, oscilará entre 1-10 días aunque lo normal son entre 2-5 días tras la infección, todo ello dependerá de la patogenicidad de la cepa y de la dosis infectiva. Tras la infección, se eliminarán al cabo de los días, entre 10^6 - 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Campylobacter* por gramo de heces. Se han realizado infecciones experimentales en humanos para conocer la dosis infectante y se ha conseguido inducir con tan solo 500 UFC por mililitro (ml) (Robinson, 1981).

La probabilidad de enfermar se encuentra condicionada, como en la mayoría de los casos, a la dosis infecciosa y al estado inmunológico del paciente, sin olvidar la capacidad de resistencia a los jugos gástricos del estómago y a las sales biliares (van Deun et al., 2007).

3.4 Cuadro clínico

Los síntomas que se observan generalmente en los pacientes son inespecíficos y leves: dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas o vómitos junto a la aparición de diarreas, en ocasiones sanguinolentas (Bibserstein y Zee, 1994). Se requiere especial atención a las personas inmunodeprimidas, ancianos y niños (Whiley et al., 2013).

Estos síntomas no suelen durar más de una semana a diferencia de lo que ocurre con *Salmonella enterica* que presenta tasas de hospitalización de casi el doble. Esta es una de las razones por las que no se declaran tantos casos (Scallan et al., 2011). En ocasiones se puede observar hepatitis, endocarditis, pancreatitis y abortos (OMS, 2011), y posibles complicaciones posteriores a la infección entre las que figuran artritis reactiva, el síndrome Miller-Fisher o el de Guillain-Barré (Barton Behravesh et al., 2011). En la mayoría de las personas, se presentará de forma asintomática y se resolverá de manera autolimitante.

Además, también se conoce a *Campylobacter* como la diarrea del viajero por ser uno de los posibles agentes etiológicos bacterianos implicados en los procesos gastrointestinales. Las principales causas son debidas a las deficientes infraestructuras sanitarias y a las prácticas de higiene inadecuadas. En América Latina se ha estimado que entre el 1-5% de los casos de diarreas son provocados por *C. jejuni*, mientras que en Asia (9-39%) y África (1-38%) las proporciones son mayores (Al-Abri et al., 2005; Beraun-Villa y Valdez, 2013).

3.5 Diagnóstico

El diagnóstico de las personas afectadas abarcará un diagnóstico clínico basado en la aparición de síntomas, unido a una anamnesis adecuada en el centro de atención primaria (encuesta epidemiológica) con el fin de averiguar la causa del problema, que en el caso de tratarse de una campilobacteriosis normalmente será debido al consumo de carne de pollo.

Este diagnóstico será presuntivo y habrá que confirmarlo mediante el envío de muestras al laboratorio dada la sintomatología inespecífica de *Campylobacter* y el gran abanico de microorganismos que pueden causar procesos entéricos similares: *E. coli*, *Salmonella*, Rotavirus, *Shigella*, *Giardia*, etc. (OMS, 2009).

A pesar de los nuevos avances tecnológicos, el método de diagnóstico rutinario suele ser el aislamiento microbiológico de *Campylobacter* en medios selectivos a partir de muestras de heces (métodos autorizados por las normas de organización internacional de normalización-ISO) (Abubakar et al., 2007).

Hace unos años se describió una nueva herramienta para la detección de microorganismos que reducía el coste y el tiempo empleado en relación al cultivo bacteriano, ya que conseguía identificar organismos en cuestión de minutos a partir de sus proteínas ribosómicas, llegando incluso hasta la diferenciación de subespecies. Martiny et al. (2011), evaluaron su potencial llegando a detectar el 100% de los aislados testados para bacterias como *C. jejuni*, *C. coli* o *C. lari*. Esta nueva técnica se conoce con el nombre de MALDI-TOF MS (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo, espectrofotometría de masas) (Sauer y Kliem, 2010).

Las técnicas serológicas, en la especie humana, están indicadas solamente en caso de sospecha de *Campylobacter* y cuando se obtenga un cultivo negativo, es decir, no serán técnicas de primera elección.

El transporte de las muestras al laboratorio (heces o hisopos rectales) debe realizarse en condiciones de refrigeración y a la mayor brevedad posible, pero si se prevé posibles retrasos en su llegada, se recomienda enviarlas en un medio de transporte adecuado y refrigerado (medio Cary Blair), para su análisis en las siguientes 24-48 horas tras su recepción (Crushell et al., 2004).

3.6 Tratamiento

El tratamiento de la campilobacteriosis se centra principalmente en paliar los síntomas. La gran mayoría de los afectados se recuperan, como hemos citado, sin ningún tratamiento específico más allá de la reposición de electrolitos y la rehidratación (ingerir abundante líquido y si fuera necesario administrar sueroterapia).

Si las molestias propias de la campilobacteriosis perduran más de una semana o la fiebre es elevada, se recomienda instaurar un tratamiento basado en antibióticos como la eritromicina (primera elección), tetraciclina o quinolonas (Allos et al., 2001; Wiczorek y Osek, 2013). Otros antibióticos que se pueden administrar en infecciones sistémicas son: aminoglucósidos, cloranfenicol, imipenem, gentamicina, clindamicina o ampicilina (Aarestrup y Engberg, 2001). Cuando el paciente sea un niño menor de 8 años es recomendable tratar con amoxicilina/ácido clavulánico en lugar de tetraciclinas ya que están contraindicadas para este tipo de pacientes (Rodrigo, 2010).

Si la afección es grave, el pronóstico debería ser reservado hasta ver la respuesta que produce el organismo a la pauta antibiótica instaurada, debido a la elevada y creciente presencia, tanto en humanos como en animales, de cepas de *Campylobacter* resistentes a varios antibióticos (Orihuel et al., 2015).

Actualmente no disponemos de ninguna vacuna comercial ni para animales ni para humanos. En los últimos años, se han realizado estudios basados en proteínas flagelares de *C. jejuni*, antígeno interno de membrana o bacteria muerta entre otras pruebas, pero todos ellos no han conseguido conferir un grado de inmunidad esperado para hacer frente a esta zoonosis aunque sí que han mostrado cierta eficacia en la protección (Annamalai et al., 2013; Kaakoush et al., 2015).

Si fuera posible elaborar un vacuna para que el sector avícola combata contra *Campylobacter*, no solo se reducirían los niveles en el pollo sino que también se reduciría la transmisión al hombre (Saxena et al., 2013).

3.7 Prevención y control

A continuación se detallan, con carácter general, una serie de medidas necesarias que previenen la proliferación de *Campylobacter* (OMS, 2011):

- ~ La prevención debe basarse en medidas de control a lo largo de todas las etapas de la cadena alimentaria, empezando en la producción primaria y terminando en los comercios y hogares.
- ~ Desinfección del contenido fecal y de los utensilios contaminados por éstas antes de proceder a su eliminación, en aquellos países que no dispongan de un sistema adecuado de evacuación de agua.
- ~ Los métodos de prevención de la infección en las cocinas de los establecimientos que sirven comidas y en los hogares son similares a los recomendados respecto de otras enfermedades bacterianas de transmisión alimentaria. La formación sobre prácticas higiénicas resulta imprescindible como herramienta preventiva (Orihuel et al., 2008).
- ~ La aplicación de calor (cocinado o pasteurización) o la irradiación son los únicos métodos eficaces para eliminar *Campylobacter* en alimentos contaminados.

4. *Campylobacter* en pollos de engorde

El principal problema de la campilobacteriosis humana es debido al consumo de carne de pollo, por ello es necesario establecer un objetivo común en Salud Pública con el fin de obtener en el mercado canales de pollos libres frente a *Campylobacter*. No resulta una tarea sencilla dado que a menudo resulta difícil identificar las fuentes de infección para estos animales. Cuando se consiga este objetivo se podrá reducir este patógeno en la cadena alimentaria hasta niveles muy bajos (Cox et al., 2010).

4.1. Prevalencia de *Campylobacter* en pollos

La prevalencia en granjas de pollos es muy variable según los países, una parte importante se debe al clima de cada región, donde los países nórdicos poseen una prevalencia menor que los centro europeos (10-30% vs 30-90%) (Patrick et al., 2004). Además, hay que tener en cuenta aspectos como el año, la edad de los

animales, el tamaño y tipo de explotación, la metodología de muestreo utilizada y los métodos de aislamiento o detección.

Hace ya algunos años, entre enero y diciembre de 2008, la UE planteó la realización de un estudio de prevalencia en todos los EM, que consistió en detectar *Campylobacter* en una mezcla de 10 ciegos de pollos de un mismo lote recogidos en matadero. La prevalencia osciló entre el 2% obtenido en Estonia hasta el 100% de Luxemburgo, con un valor medio del 75,8%.

En España la prevalencia fue del 88%, como se puede apreciar en la figura 6. Pero estas prevalencias pueden variar según los estudios pudiendo llegar incluso hasta valores cercanos al 100% sobre todo en épocas estivales (Grupo SADA Nutreco, datos propios 2016).

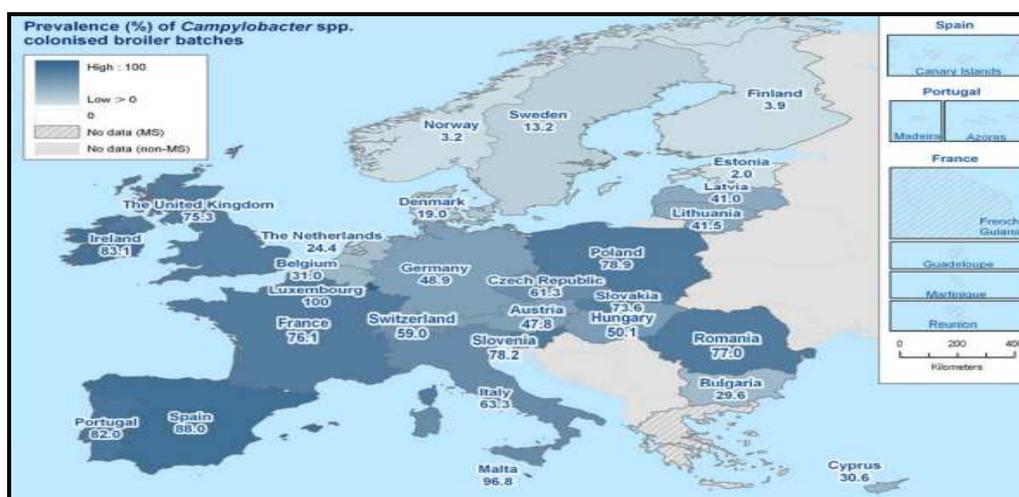


Figura 6. Prevalencia de *Campylobacter* en ciegos de pollos (EFSA, 2010a)

Respecto a la prevalencia en canales, se observaron grandes diferencias entre países, con un valor mínimo del 4,9% en Estonia y del 100% en Luxemburgo, en España fue del 92,6% (EFSA, 2010b).

Además de estas prevalencias, se pueden observar en la tabla 2 otras referentes a *Campylobacter* en la carne de pollo, según varios estudios realizados en diversas regiones europeas.

Tabla 2. Prevalencia en carne de pollo en países de la UE

País	Año estudio	Prevalencia	Referencia
Alemania	2013	12%	EFSA, 2015
Austria	2013	71%	EFSA, 2015
Eslovenia	2013	54%	EFSA, 2015
España	2013	70%	EFSA, 2015
Dinamarca	2013	12%	EFSA, 2015
Finlandia	2013	11%	EFSA, 2015
Francia	2009	76%	Guyard-Nicodème et al., 2015
Holanda	2013	32%	EFSA, 2015
Hungría	2013	24%	EFSA, 2015

Los programas de monitorización para esta bacteria se realizan sobre canales de pollos de engorde frescos (ciego, cuello, piel o muestras de carne) en matadero, plantas de procesado o carnicerías. Durante el año 2015 en España, los resultados fueron de un 52,6%, 50% y 59% respectivamente.

Según un estudio realizado por el grupo SADA (Nutreco) en plantas de procesado se observaron las siguientes cargas logarítmicas por el tipo de matriz (tabla 3), para ello se seleccionaron 10 lotes por cada planta.

Tabla 3. Promedio de *Campylobacter* en plantas de procesado

Matriz	Promedio logarítmico (UFC/gr)
Buche	4,06
Ciego	6,83
Colón	6,56
Plumas	4,75
Piel	3,16

Además durante ese mismo año se analizaron en Europa, carne de pavo fresco (15,57% de los lotes mostraron un resultado positivo a *Campylobacter*), lotes de cerdo y bovino fresco (0,4-3,4% de muestras positivas), y productos cárnicos a base de cerdo o vacuno que dieron un resultado negativo para este patógeno (EFSA, 2015).

Por todo ello, la Comisión Europea lanzó una propuesta de Reglamento que modifica el Reglamento 2073/2005, por el que se establece un criterio microbiológico de proceso como máximo de 1.000 UFC/gramo en piel de cuello sobre 50 muestras en los lotes de pollos sacrificados, con una tolerancia del 20% en 2017, 14% en 2018-2019 y 10% a partir de 2020. Todo ello se realizará según la normativa ISO/TS 102172-2 (se verá con detalle más adelante) sobre canales después del enfriamiento, aunque todavía sigue pendiente de su aprobación, porque de esta manera, se podría reducir el riesgo de campilobacteriosis humana.

Además de esta legislación resulta importante conocer otras directivas tales como:

- ~ Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria.
- ~ Directiva 2003/99/CE del Parlamento europeo y del consejo, de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia y los agentes zoonóticos (Anexo I: *Campylobacter*).
- ~ Reglamento (CE) nº 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- ~ Reglamento (CE) nº 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005.

En Reino Unido la prevalencia de aves infectadas durante los meses de julio a septiembre del año 2014 aumentó en un 7% con respecto al resto del año, detectándose niveles superiores a 1.000 UFC/gramo. Por ello, este país junto a los Países Bajos, intentaron reducir su prevalencia con el agravante de incrementar los costes de producción, pero los resultados no fueron los esperados (EFSA, 2016a).

4.2 Ciclo productivo del pollo de engorde

Los pollos destinados a la producción de carne se conocen también como broilers, su período productivo dura aproximadamente 45 días aunque dependerá de las condiciones de mercado. Por otra parte, dentro del territorio nacional, es típica la crianza de pollos para asar, en esta ocasión rondan entre 5-6 semanas de vida (Allen et al., 2008a).

En la selección de estos animales, se tiene que realizar una pauta de manejo conocida comúnmente como aclarado o clareo, cuyo objetivo es reducir la densidad de los pollos en la nave y evitar así muertes innecesarias. Esta práctica se suele realizar por la noche, en condiciones tenues de luz y por un equipo de carga ajeno a la explotación correspondiente acompañado de jaulones. Durante esta actividad se rompen las medidas de bioseguridad que posee la granja con el consiguiente estrés como consecuencia de la manipulación.

4.3 Epidemiología de la infección en granjas avícolas de broilers

En las aves *C. jejuni* ha sido aislado por Peckham (1958) que lo señala como el agente causante de la hepatitis vibriónica en pollos. Truscott et al. (1968) la citaron como el patógeno responsable de la enteritis transmisible del pavo, pero poco tiempo después se observó que estaba causado por un reovirus (Deshmukh et al., 1969). En España se describe por primera vez el aislamiento de *C. jejuni* a partir del ciego de pollos de engorde destinados al consumo humano (Torre, 1985).

Las especies de *Campylobacter* aisladas con mayor frecuencia en el pollo de engorde son *C. jejuni* y *C. coli* (Ansari-Lari et al., 2011) pero la más difundida de todas ellas es *C. jejuni* (Keller et al., 2007; EFSA, 2016b). En el cerdo es *C. coli* y en los rumiantes *C. fetus* (Pascal, 2017). También podemos encontrar *C. lari* en el tracto digestivo de las aves de corral aunque en porcentajes muy bajos (Johnsen et al., 2007).

El porcentaje encontrado de estas especies dependerá de la fuente de infección correspondiente. Según diversos estudios, para *C. jejuni* los valores oscilan entre un 57-94% y para *C. coli* oscilan entre el 6-38,6% (Perko-Markela et al., 2002; Patriarchi et al., 2009).

4.3.1 Fuentes de infección y factores de riesgo

El factor de riesgo más importante relacionado con el broiler es su edad, siendo esta magnitud directamente proporcional a la carga presente en el animal (ver Anexo, figura 2). Ansari-Lari et al., (2011) indicaron que existe un riesgo de infección cinco veces superior cuando la edad de los pollos es ≥ 45 días.

En la tabla 4 se observan las fuentes de infección y los factores de riesgo asociados a la colonización de los lotes de broilers que fueron descritos fundamentalmente por Hermans et al. (2012) con modificaciones realizadas por nosotros.

Tabla 4. Factores de riesgo de colonización de lotes de pollos de engorde por *Campylobacter* (Hermans et al., 2012, modificada por nosotros)

Momento de infección	Factores que influyen	Factores de riesgo
Colonización inicial	Fuente de infección y dosis infectiva	Clones persistentes en el ambiente, cepas con alta capacidad de colonización y dosis infectiva alta
	Edad de los animales y tamaño del lote	De 2 semanas en adelante Edad de sacrificio más alta Mayor tamaño del lote
	Estacionalidad	Meses de primavera/verano Precipitaciones
	Manejo de la crianza	Medidas o barreras higiénicas poco eficaces Otros animales colonizados en la granja Insectos y roedores portadores Agua superficial contaminada
	Fuentes de transmisión horizontal	Personal y equipamiento de la granja contaminado Aclarado Cama de las aves
Transmisión dentro del lote	Transmisión entre pollos por la ruta fecal-oral	Agua de bebida y alimento
Patrón de colonización	Carga bacteriana intestinal incrementada	No administración de sustancias anti- <i>Campylobacter</i> Dieta o tipo de pienso
Transporte	Carga bacteriana intestinal incrementada y grado de excreción	Estrés inducido por el transporte Jaulas de transporte contaminadas
Matadero	Contaminación cruzada de <i>Campylobacter</i> en el procesado (escaldado o desplumado)	Rotura accidental del contenido intestinal del pollo

Por otra parte, son pocos los autores que piensan que la raza y el sexo influyen en la infección de *Campylobacter*, tampoco se ha encontrado una asociación fuerte entre una patología previa del pollo y un aumento del riesgo de contraer *Campylobacter* (Adkin et al., 2006). Otros creen que seleccionando genéticamente pollos de engorde resistentes a *Campylobacter* se podría controlar su infección (Kaiser et al., 2009).

Las explotaciones avícolas que albergan un mayor número de naves tienen más probabilidad de infección a *Campylobacter* que el resto (Henry et al., 2011).

En los meses de primavera y verano aumenta la carga de *Campylobacter* en el ambiente debido a una mayor cantidad de insectos, ganado en el pasto, aves migratorias y una mayor ventilación en las granjas, por tanto se incrementan las probabilidades de contaminación con este patógeno (Hermans et al., 2012). Un aumento en la Tª media diaria o la presencia de lluvias torrenciales durante varios días pre-sacrificio se han descrito como otros factores de riesgo (Jonsson et al., 2012).

Otro de estos factores a tener en cuenta es la cercanía (< 1 km) de explotaciones agropecuarias tanto de vacas como de cerdos. En la mayoría de las especies se aplican programas de desratización para el control de roedores mediante la colocación de trampas alrededor de las naves, por lo que el riesgo potencial de estos animales como portadores de *Campylobacter* es bajo (Messens et al., 2009; Henry et al., 2011).

Cuando se detecta *Campylobacter* en el medio ambiente es consecuencia de residuos fecales de algún hospedador animal ya que necesita de uno para sobrevivir. Muchos de los estudios que detectan este patógeno en el exterior de las granjas lo encuentran en charcos o zonas húmedas cercanas (Johnsen et al., 2007; estudios propios grupo SADA, Nutreco, 2016). No debemos olvidar que esta bacteria en condiciones de estrés puede adquirir formas de VBNC en el medio ambiente.

Es conocido por todos que los insectos pueden ser vectores de distintos patógenos como *Salmonella enterica*, *Yersinia* spp., *E. coli* (Gupta et al., 2012). Además de las moscas, el escarabajo oscuro de la cama (*Alphitobius diaperinus*) y sus larvas juegan un papel importante en la transmisión de este microorganismo y su erradicación resulta complicada. Se ha demostrado que *C. jejuni* permanece solamente 12 horas en las heces de estos insectos (Hazeleger et al., 2008).

Un dato relevante sobre el papel de las moscas como posible fuente de infección vectorial principal en la explotación es que el porcentaje de infección que presentan estos insectos muestreados alrededor de las granjas resulta muy bajo (2,4-8%), y además, solamente persiste en su cuerpo y heces hasta 7 días. Un estudio realizado por Urdaneta et al., entre abril de 2011 y noviembre de 2012, revela una prevalencia de moscas positivas a *Campylobacter* del 1,7% por cultivo y del 10,2% por PCR (Urdaneta et al., 2013).

En cuanto al agua suministrada a los animales de la explotación, se ha demostrado que cuando se utilizan bebederos de tetina, el agua procedente de una fuente privada o el agua no tratada, entre otros factores, es un riesgo para la infección de los pollos (Näther et al., 2009; Haruna et al., 2012; Jonsson et al., 2012). La presencia de protozoos en las granjas de pollos es un hecho contrastado, incluso después del vacío sanitario y de los protocolos de limpieza y desinfección. *C. jejuni* puede resistir hasta 50 veces más a la cloración del agua si se encuentra en el interior de amebas (por ejemplo, *Acanthamoeba castellanii*) (Snelling et al., 2005).

La ventilación, ya sea horizontal o vertical, constituye un factor de riesgo al diseminar *Campylobacter* por toda la nave. Durante el ciclo productivo se debe controlar la acumulación de amoníaco en el ambiente (< 20 partes por millón (ppm) por metro cúbico) (RD 1084/2005). Por otra parte, es importante ventilar para eliminar la humedad de la cama (< 50% humedad mejora la calidad).

Existen numerosas investigaciones que han demostrado que la práctica del clareo es el principal factor de riesgo para la colonización de manadas de pollos por *Campylobacter* (Adkin et al., 2006; Hansson et al., 2007; Ellis-Iversen et al., 2011).

Los distintos tipos de cama utilizados en las aves pueden jugar un papel fundamental en la propagación de la infección, por lo que se recomienda su eliminación completa una vez llevado el lote a matadero. Posteriormente, se procederá a una adecuada limpieza y desinfección para cumplir así con el vacío sanitario marcado por la administración (Wassenaar, 2011).

También se debe prestar una especial atención a las labores de faenado de las aves ya que una gota de exudado procedente de un pollo infectado puede llegar a albergar hasta 10^6 UFC de *Campylobacter* (Corujo, 2013).

4.3.2 Tipos de transmisión

Algunos autores han descrito dos tipos diferentes de transmisión de *Campylobacter*.

- ~ Transmisión horizontal mediante la vía feco-oral, debido a la actividad coprofágica que posee esta especie al encontrarse contaminada la cama, además del pienso o el agua de bebida. Es la principal vía de transmisión de este patógeno en las explotaciones avícolas.
- ~ Fuente de transmisión vertical, existe un debate continuo sobre la contribución de este mecanismo de transmisión por *Campylobacter* en los lotes de reproductoras debido a que las cepas encontradas en ellas no coinciden con el genotipo de su descendencia. Este patógeno se ha aislado del tracto reproductivo de gallinas (Buhr et al., 2002) y del semen de gallos (Cox et al., 2001), de ahí que haya autores que defiendan una vía de transmisión venérea. Otros en cambio, piensan que *Campylobacter* se adquiere en el primer día de vida a una concentración muy baja o que simplemente la aceptan al demostrar que no se ha encontrado *Campylobacter* en el ambiente (Clark y Bueschkens, 1985; Hiatt et al., 2013; Marin et al., 2015).

Allen y Griffiths (2001) demostraron que la cáscara de huevo puede ser permeable a *Campylobacter* pero sin llegar a su interior. En este caso, se cree que la infección del huevo puede ser debida a la contaminación fecal de la superficie externa del huevo y su consiguiente entrada por las posibles grietas que pudiera poseer (Doyle, 1984). Por tanto, la prevalencia en el interior del mismo es prácticamente nula debido a las condiciones de explotación de nuestro país.

En cambio, la obtención de resultados negativos para este patógeno en otros estudios realizados a partir de 500 huevos de reproductoras donde se había detectado previamente *Campylobacter* y en 1.000 huevos de un criadero comercial, sugieren que este tipo de transmisión resulta poco probable (Sahin, 2003). Estas investigaciones coinciden con otras similares basadas en la detección de *Campylobacter* en reproductoras y pollos descendientes de ellas mediante técnicas de biología molecular (Callicott et al., 2006; Laboratorio infecciosas, estudios propios 2017).

4.4 Patogenia

Actualmente disponemos de un conocimiento limitado sobre la estrategia de colonización de *C. jejuni* en la mucosa del intestino delgado y del ciego de las aves, a pesar de ser la especie mejor estudiada. Según la OIE (2008) *Campylobacter* no actúa como un patógeno en el tránsito intestinal de los animales.

Generalmente esta bacteria se localiza en la capa mucosa de las criptas intestinales sin adherirse directamente a las células epiteliales y sin producir ningún tipo de lesión. Aunque a veces existen cepas que poseen la capacidad de invadir las células epiteliales pero no de proliferar dentro de las criptas cecales (van Deun et al., 2008b). Se ha observado que persiste en el intestino de las aves gracias a su temperatura corporal de 42 °C. Por otra parte, la presencia de *Campylobacter* en el intestino genera una ligera respuesta inflamatoria, al no controlar el organismo la infección, ya que ésta sobrevive en el interior de las células fagocitarias mononucleares (Dasti et al., 2010).

Los factores de colonización de *C. jejuni* en broilers, como en los humanos, abarcan a los flagelos, la quimiotaxis, adhesinas e invasinas.

La motilidad flagelar es determinante para su supervivencia y para el avance y abordaje por el tramo intestinal hasta los ciegos. El flagelo está formado por flagelina glicosilada O-ligada, el sensor FlgS y el regulador FlgR (Dasti et al., 2010). Además, posee dos flagelinas, FlaA y FlaB, codificadas por el gen flaA responsable de la invasión celular y por el gen FlaB que no parece ser relevante (Guerry, 2007). También intervienen proteínas esenciales (FlgP y FlgQ) y varios reguladores implicados como rpON (Hendrixson, 2006; Sommerlad y Hendrixson, 2007).

El movimiento químico que realiza *C. jejuni* a lo largo del tracto intestinal del pollo para colonizarlo es conocido como quimiotaxis. Se han descrito numerosos genes implicados en este movimiento, siendo el gen cheY crucial en la rotación flagelar (Yao et al., 1997).

Tras la migración de *C. jejuni* hacia el mucus intestinal (mucina), se desarrolla una respuesta adaptativa al ambiente sintetizando unas proteínas conocidas como adhesinas, que permiten su interacción con las células intestinales del ave. Se han identificado varios factores de adhesión: proteína CadF, CapA (autotransportador), proteína PEB1 (unión periplásmica) y la lipoproteína JlpA (expuesta en la superficie) (Konkel et al., 1997; Jin et al., 2001). Este mucus posee la propiedad de reducir la capacidad adhesiva e invasiva de esta bacteria en el epitelio intestinal impidiendo su paso hacia las criptas intestinales. Una vez en

el interior del ave se produce una respuesta inmune innata a base de macrófagos, citoquinas, quimiocinas y anticuerpos maternos.

Existen dos especies proteo y sacrolíticas, *Clostridium* y *Bacteroides*, que conviven estrechamente en el intestino de las aves con *Campylobacter* y que favorecen su crecimiento gracias a los metabolitos generados (aminoácidos intermediarios del ciclo de Krebs) y al hidrógeno producido. La fermentación de los polisacáridos de las bacterias comensales procedentes del intestino generan un metabolito, butirato, que protege a las células del colon de la invasión bacteriana (van Deun et al., 2008a).

García et al., (2013) realizaron un estudio donde se aislaron diferentes cepas de *Campylobacter* en una misma explotación y además demostró que habían sufrido modificaciones a lo largo de la vida productiva de los broilers. De la misma manera, otros estudios encontraron un 42,9% de genotipos diferentes (Messens et al., 2009). En la época estival es más frecuente que exista una mayor diversidad de cepas debido a un mayor número de factores de riesgo (Kudirkiene et al., 2010). Por estos motivos, es difícil pensar que existe inmunidad cruzada entre cepas, lo que explicaría las prevalencias mantenidas durante todo el ciclo, pero sin embargo, en algunos lotes solamente se detecta un genotipo y las prevalencias son similares a lo largo del tiempo (Ring et al., 2005).

El hecho de encontrar diferentes genotipos de *C. jejuni* en una misma explotación se debe a fenómenos de competitividad (como transformación o conjugación) en los que intervienen algunos fagos, al intercambio o a la recombinación genética, interponiéndose al final la cepa dominante. Pueden existir varios patrones fenotípicos en una misma explotación: cepas incapaces de colonizar el intestino de las aves que son eliminadas, cepas transitorias que colonizan rápidamente este hábitat o cepas permanentes (Pascal, 2017). La mayoría de los genotipos encontrados en las aves serían de carácter transitorio con una cepa predominante y algunos genotipos serían estacionales (Hansson et al., 2007; Messens et al., 2009). Las cepas aisladas de humanos tienen menos éxito a la hora de colonizar aves a nivel intestinal.

4.4.1 Contagio e inmunidad

La dosis infectiva de *Campylobacter* para un ave es muy baja, tan solo entre 5-50 UFC en función de la cepa. Transcurridas las primeras 24 horas después de un primer contacto con la bacteria, el individuo se convierte en portador asintomático e infecta rápidamente a otros individuos, en tan solo 72 horas podemos llegar a tener el 94% de la población infectada (Horrocks et al., 2009). Generalmente, se trata de un microorganismo similar a *Salmonella* debido a la ausencia de signos clínicos presentes en el animal y modificaciones en los parámetros productivos, pasando totalmente inadvertida para el ganadero.

Sin embargo, según un estudio realizado por Humphrey et al. (2014), se describe que *Campylobacter* puede originar sintomatología clínica, inflamación de la mucosa y diarrea, dependiendo de la estirpe del pollo. La necropsia realizada a un ejemplar de broiler reveló la presencia de hepatitis y el análisis posterior llevado a cabo por el laboratorio del grupo SADA (Nutreco) en el año 2016,

identificó a *Campylobacter* spp. y *E. coli* como los agentes responsables de este hallazgo.

Campylobacter se multiplica rápidamente y puede llegar a alcanzar recuentos en los ciegos desde 10^7 hasta 10^9 UFC/gramo de contenido, siendo entonces fácilmente detectable en heces (Newell y Fearnley, 2003; Wagenaar et al., 2006; OIE, 2008). Gracias a los modelos matemáticos, se ha establecido que la cinética de transmisión es de $2,37 \pm 0,295$ nuevos casos por cada pollito colonizado y por día a través de las heces, agua o pienso contaminado. Esto supone que en un lote de 20.000 pollos, estarían infectados el 95% solamente una semana después de que el primero se hubiera infectado (García y Abad, 2016).

Las manadas positivas a *Campylobacter* son más frecuentes en explotaciones al aire libre que las criadas de manera intensiva, probablemente debido a una mayor exposición ambiental que en los meses de verano con elevada pluviometría intensificaría este riesgo (Hendrixson y DiRita, 2004).

Además, el número de microorganismos decrece con la edad del pollo, es decir, los pollos de engorde de unas 7 semanas de edad tienen una carga de *Campylobacter* más elevada que los parentales a las 42 semanas de vida. En cualquier caso, la infección nunca llega a desaparecer de manera completa. Una vez infectado el lote de aves permanecerá así hasta el final de su vida productiva (Laboratorio Infecciosas, estudios propios 2017).

La mayor parte de las polladas de broilers que se infectan por transmisión horizontal permanecen libres hasta los 14-21 días de edad (van Gerwe et al., 2009), aunque en condiciones experimentales se ha conseguido infectar a pollitos de un día de vida. Durante esos primeros días se atribuye a la inmunidad maternal un papel protector frente a la infección por *Campylobacter* (Han et al., 2016).

La respuesta a esta bacteria se encuentra mediada en su mayor parte por inmunoglobulinas (Ig) de tipo IgG, aunque también por IgA. Los niveles circulantes de IgG son altos en la vía hemática pero hasta la primera semana de vida del pollo no se detectan en alta concentración en el tejido intestinal. En cambio, las IgA se secretan directamente en el tejido intestinal y son más elevadas hacia la cuarta semana de vida. A partir de esa fecha se produce un descenso en el número de anticuerpos que hacen más susceptible al pollo de contraer este patógeno (Sahin, 2003). Como consecuencia, en estos primeros días de vida, se produce una maduración de la inmunidad de la mucosa intestinal así como cambios en su microbiota influidos por el manejo y la nutrición.

Cawthraw y Newell (2010) encontraron una alta susceptibilidad a la infección durante los tres primeros días de vida que se explicaría tras el paso de las IgG maternas de la sangre al tejido intestinal, la inmadurez del sistema inmune del pollo y una dosis infectiva muy elevada en el ambiente.

4.5 Técnicas diagnósticas para *Campylobacter*

4.5.1 Normativa internacional para *Campylobacter*

A la hora de elegir una técnica diagnóstica para la detección o recuento de *Campylobacter*, nos encontramos con dos normas ISO estándar que se deben

cumplir en todo el territorio nacional. A través de ellas, se puede ver qué técnicas están autorizadas y validadas en función del enfoque de nuestro estudio y seleccionar la que más se adapte a nuestras necesidades.

Las muestras más comunes que se envían a los laboratorios para su posterior análisis son: hisopos cloacales/rectales con heces frescas, alimentos, calzas procedentes de las camas, ciegos y colgajos de piel procedentes de aves muertas. El éxito del aislamiento dependerá del estado de las muestras remitidas a los laboratorios.

Llegados a este punto, resulta importante indicar la existencia de un protocolo establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y que se encuentra recogido en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) para la mayoría de muestras (ver Anexo, figura 3).

La primera norma a tener en cuenta es la UNE-EN ISO 10272-1:2006, otra de ellas a destacar es la UNE-EN ISO 10272-2:2006. En la figura 4 del apartado Anexo se muestra un diagrama de flujo con las actividades a realizar para la detección de *Campylobacter* según las pautas de la norma UNE-EN ISO 10272-1:2006.

El enriquecimiento con caldo Bolton debería llevar una doble suplementación para favorecer el crecimiento casi exclusivo de las bacterias del G^o *Campylobacter*. Para ello, se necesita, un caldo Bolton base, sangre de caballo defibrinada, 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.

El color de las colonias de *Campylobacter* en el medio mCCD (carbón cefoperazona desoxicolato) es gris, a menudo con brillo metálico. Además, son planas y de aspecto "húmedo".

Los tests de confirmación se basan en estudiar su morfología (pequeños bacilos curvados, mediante caldo *Brucella*), la movilidad (positiva, mediante caldo *Brucella*), el crecimiento microaeróbico a 25 °C (negativo), crecimiento aeróbico a 41,5 °C (negativo) y la prueba de la oxidasa (positivo).

Por otra parte, existen métodos alternativos autorizados y validados para la detección de colonias de *Campylobacter* que se recogen en la norma UNE-EN ISO 16140-2:2016.

Para la enumeración de la colonias de *Campylobacter* según la norma UNE-EN ISO 10272-1:2006, no resulta necesario realizar las siembras por duplicado y cuando se sospeche de que la muestra pudiera tener niveles bajos, se inoculará 1 ml en 3 placas por duplicado. La siembra en placa y la preparación de las diluciones decimales se realizará de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 7218:2007. Se trata de una guía sobre buenas prácticas en el laboratorio, en la que resulta interesante resaltar que la observación de un número inferior a 5 colonias con morfología compatible con *Campylobacter*, podría llevar a una sobreestimación del resultado al considerarse éste positivo.

La figura 5 del apartado Anexo recoge un diagrama de flujo con las actividades a realizar para el recuento según las pautas de la norma UNE-EN ISO 10272-2:2006.

Las soluciones de referencia donde se deben realizar las diluciones decimales se citan en la UNE-EN ISO 6887-1:2000. Estos diluyentes pueden ser una solución tamponada de fosfato (PBS) o agua de triptona con sal.

La figura 7 muestra otro diagrama de flujo con los pasos que hay que realizar para el recuento de *Campylobacter* pero con los métodos alternativos autorizados y validados según la norma UNE-EN ISO 16140-2:2016.

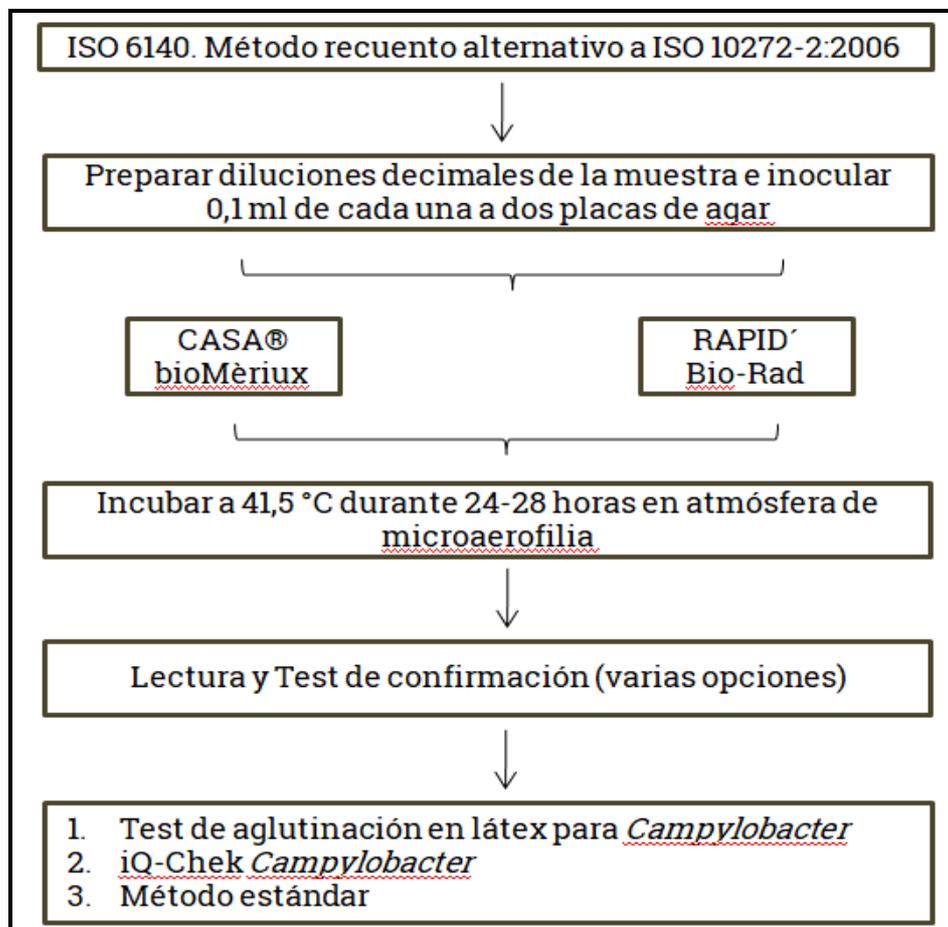


Figura 7. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 16140-2:2016 para *Campylobacter*

La Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) ha validado un kit para la detección por PCR a tiempo real de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* en muestras alimentarias como enjuague de canales de pollo, carne de ave lista para consumir e hisopos de pavos, cuyo número de licencia es 031209 (iQ-Check *Campylobacter* spp. real-time PCR Kit). También esta misma asociación ha validado otro kit, Foodproof® StarPrep One Kit, cuyo número de licencia es 120301. Además, se dispone de varios medios de cultivo autorizados como Skirrow, Karmali, Butzler, Preston, CampyFood ID o Campy Count entre otros. También existen dos medios cromogénicos, uno de la casa comercial bioMèriux (CASA®) y otro de Bio-Rad (RAPID' *Campylobacter* Agar). Todos ellos, poseen una certificación internacional (NF Validation EN ISO 16140 por Asociación Francesa de Normalización y Certificación-AFNOR) y se pueden emplear como alternativa al método de referencia que recoge la ISO/TS 10272-2:2006, para la detección de

Campylobacter en carne y productos cárnicos, aves y productos avícolas, además de muestras medioambientales.

4.5.2 Métodos de confirmación bacteriana para *Campylobacter*

4.5.2.1 Aglutinación en látex

Posteriormente al crecimiento bacteriano, se puede realizar una confirmación sencilla y rápida mediante un test de aglutinación en látex a partir de una colonia sospechosa. Se recomienda realizar el test a partir de colonias procedentes de agar sangre. Estos kits poseen partículas de látex recubiertas con inmunoglobulinas de conejo que podrían reaccionar contra antígenos de *Campylobacter* (Dediste et al., 2003). La intensidad de la reacción puede variar desde la granularidad fina, pero fácilmente discernible contra un fondo lechoso, hasta grumos grandes de partículas alrededor de la periferia del óvalo de prueba, contra un fondo claro. En el mercado podemos encontrar varios de estos: *Campylobacter* Confirm Latex (Bio-Rad) o Microgen® *Campylobacter* (Microgen Bioproducts Ltd), entre otros.

4.5.2.2 Pruebas bioquímicas

Se pueden realizar pruebas bioquímicas para diferenciar entre las distintas especies de *Campylobacter*. Se recomienda realizar el test a partir de colonias procedentes de agar sangre. En la tabla 5 se muestran varias pruebas a realizar donde todos los aislados de *Campylobacter* se caracterizan por tener una reacción oxidasa positiva. Como se comprueba en la misma tabla, la única especie que tiene una reacción positiva para la prueba, hidrólisis de hipurato, es *C. jejuni* (Bolton, 2001).

Tabla 5. Características fenotípicas de las especies termotolerantes de *Campylobacter*

Características	Bacterias G° <i>Campylobacter</i>			
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalasa	+	+	+	-
Hidrólisis de hipurato	+	-	-	-
Hidrólisis de acetato de indoxil	+	+	-	+

4.5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Además de las técnicas anteriormente mencionadas, se puede utilizar la PCR para la confirmación bacteriana de una colonia sospechosa, directamente del medio cromogénico o a partir de una colonia procedente del agar sangre.

4.5.3 Métodos serológicos para *Campylobacter*

Otra alternativa al uso de técnicas de detección directa es el empleo de métodos serológicos, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) sobre muestras de heces o alimentos (Abubakar et al., 2007).

Una metodología serológica diferente que podemos utilizar es el ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA) conocida como VIDAS® CAM para la detección de *Campylobacter*. Esta técnica posee validación internacional tipo ISO 16140 (para productos cárnicos muestras ambientales de producción), y validación AOAC (para agua de lavado de canales de pollo, esponjas de canales de pavo, carne de cerdo cruda, pechuga de pollo cruda, *nuggets* de carne de pollo procesada). Además, posee la cualidad de ser una técnica rápida (< 48 horas), fiable, sencilla (solamente requiere un paso de enriquecimiento con caldo CampyFood), y la incubación está estandarizada para asegurar una atmósfera de microaerofilia según la bolsa de enriquecimiento Combibag. Chon et al. (2011) obtuvieron altas tasas de respuesta para el método VIDAS sobre muestras positivas en comparación con varios métodos de cultivo.

Granato et al. (2010) realizaron un estudio con tres inmunoensayos comerciales y observaron unos altos índices de sensibilidad y especificidad (superiores al 98%) en todos los casos, mientras que la sensibilidad para el cultivo fue del 94%.

4.5.4 Métodos de PCR para *Campylobacter*

La PCR es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico rápido de *Campylobacter* ya que se trata de una técnica rápida que reduce considerablemente el tiempo de espera en comparación con los métodos de cultivo clásico (Abubakar et al., 2007). Entre todas las técnicas de PCR que se conocen, la PCR a tiempo real (qPCR o PCR cuantitativa) es la más avanzada en la detección de patógenos, tanto para la industria alimentaria como para las explotaciones ganaderas debido a sus características innatas: sensibilidad y especificidad muy elevadas, así como precisión, rapidez y ausencia de realización de una amplificación posterior del producto obtenido evitando así contaminaciones cruzadas (Barletta et al., 2013).

La qPCR nos ofrece varias posibilidades según el fluorocromo empleado, desde *SYBR Green I* hasta sondas de hidrólisis tipo *TaqMan* o sondas *Molecular Beacons*. El primer fluorocromo nos aporta más sensibilidad a la reacción mientras que las sondas aportan más especificidad, aunque si se optimiza adecuadamente el método basado en *SYBR Green I* su rendimiento y calidad podrían ser comparables a los otros (Tajadini et al., 2014). En función del número de cebadores y sondas a utilizar, se deberá seleccionar un termociclador capaz de albergar todos los canales necesarios para su amplificación.

Estas técnicas poseen la ventaja de cuantificar las cargas bacterianas de una manera absoluta, comparándolas con una curva patrón, o relativa mediante la comparación con un gen *housekeeping* presente en todos los tejidos, y todo ello gracias a la observación del ciclo umbral (*cycle threshold*, C_q) (Livak y Schmittgen, 2001). Además, si se emplea el fluoróforo *SYBR Green I* se tendrá que introducir un paso adicional en la qPCR para observar el producto del amplicón obtenido mediante una curva de fusión (*melting curve*) y así conocer su especificidad en comparación con la del control positivo. Estas técnicas también poseen un pequeño inconveniente a la hora del recuento bacteriano, ya que puede haber una sobreestimación en el conteo del ADN al no distinguir entre cepas vivas y muertas (Soejima et al., 2008).

A diferencia de lo que creen algunos autores acerca del coste de la qPCR (Butzler, 2004), no resulta ser una técnica cara. El material fungible para la realización de una reacción mediante el fluoróforo *SYBR Green I* asciende a tan solo \$3,00 (Ivanova et al., 2014).

Además, permite su detección en condiciones estresantes para la bacteria, formas VBNC, donde el cultivo microbiológico no llega. En contrapartida, si se desea aislar *Campylobacter* para la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, esta técnica molecular no sirve, pero sí resulta una técnica eficaz cuando se quiere confirmar bacterias sospechosas procedentes de un cultivo ya que la lectura de las pruebas fenotípicas no resulta clara (Silva et al., 2011).

Otro aspecto importante es el diseño de los cebadores y sondas, para ello existen en el mercado numerosos programas bioinformáticos que pueden servirnos de ayuda. Pero antes de ello, se debe tener claro el objetivo del estudio que se pretende realizar ya que se dispone de múltiples genes que detectan esta bacteria. Si se quiere realizar una reacción de PCR para el G^o *Campylobacter* nuestro diseño se podría centrar en los genes 16S rRNA, 23S rRNA o ITS (Maher et al, 2003) pero si se desea una prueba específica para la detección de especies muy relacionadas como *C. jejuni*, *C. coli* o *C. lari* se deberían seleccionar otros genes (On, 2001).

Disponemos de una variante de PCR conocida como hibridación *in situ* (FISH) basado en el empleo de sondas de fluorescencia para los genes 16S rRNA o 23S rRNA del G^o *Campylobacter*. Se trata de un método rápido y sensible que solamente detecta la presencia de células viables. Se puede realizar sobre muestras de agua, fango o cultivo, entre otras matrices (Poppert et al., 2008).

4.5.5 Métodos de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) para Campylobacter

La técnica diagnóstica LAMP se diseñó por Notomi et al., (2000) con el fin de amplificar hasta 10⁹ copias de ADN en no más de 1 hora bajo condiciones isotérmicas (60-65 °C) gracias a la utilización de la enzima *Bst* polimerasa de ADN. Esta prueba posee la ventaja de no desnaturalizar la doble hélice de nucleótidos necesaria para que se inserten en ella los cebadores, así como tampoco es necesario el empleo de un termociclador para su amplificación. Inicialmente, para su realización era necesario diseñar cuatro cebadores que reconocieran diversas regiones del ADN a estudiar, aunque posteriormente se pueden incorporar dos cebadores más que aceleren su reacción (Mori y Notomi, 2009; Torres et al., 2011).

El nombre de los cebadores empleados en este tipo de reacciones se conoce como: cebador directo interno (FIP), cebador inverso interno (BIP), cebador directo externo (F3), cebador inverso externo (B3), cebador directo de horquilla (LF) y cebador inverso de horquilla (LB).

El fundamento de la técnica se centra en que los cebadores FIP y BIP están formados por dos secuencias con sentidos diferentes, una en sentido 5'-3' (sentido F2 o B2) y otra en el sentido contrario 3'-5' (sentido F1 o B1), de tal forma

que la región F2 del cebador FIP se une a la secuencia complementaria del ADN molde (F2C) y la enzima sintetiza el resto de la cadena complementaria, incluyendo la región complementaria a F1 (F1C). Posteriormente, el cebador F3 se une al ADN molde en la zona externa al FIP, liberando el producto de amplificación y permitiendo que F1 se una a F1C, sintetizado previamente. De igual forma ocurre con el cebador BIP y B3 en el otro extremo (figura 8). El número de ciclos sucesivos dará lugar a la formación de horquillas de diferentes tamaños (Notomi et al., 2000).

Al igual que ocurre con la qPCR, existen kits diseñados para realizar reacciones de LAMP según el objetivo que se persiga. Se pueden encontrar kits de LAMP para el G^o *Campylobacter* o LAMPs específicas para cada especie, como por ejemplo para *C. jejuni* o *C. coli*. Por otra parte, el diseño de los cebadores se debe realizar con el PrimerExplorer V4 (<https://primerexplorer.jp/e/>).

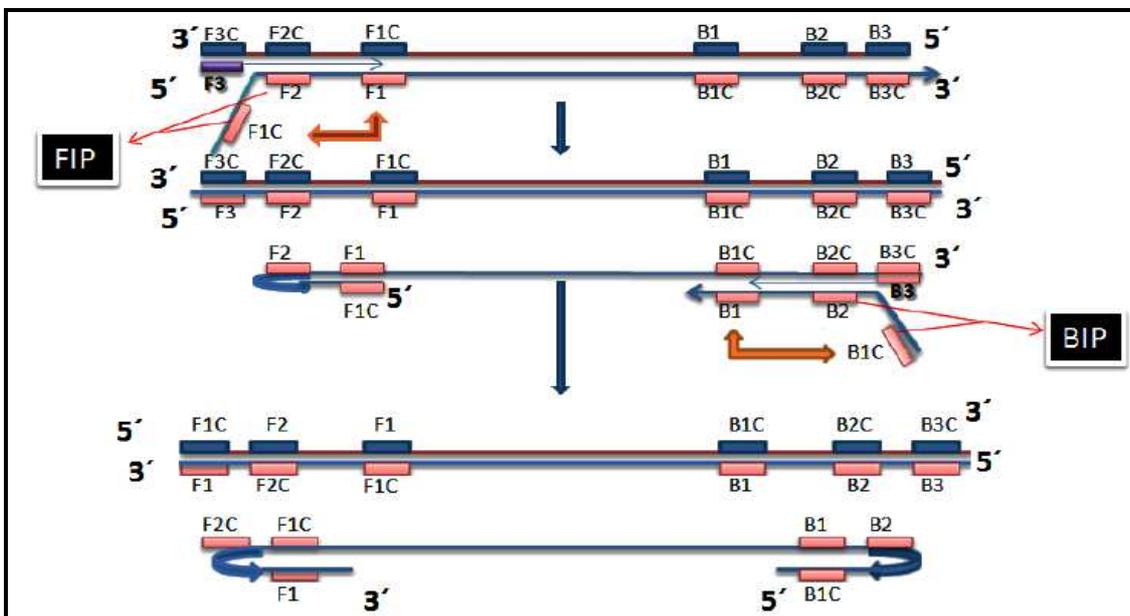


Figura 8. Principio de la LAMP: unión de los cebadores FIP, BIP, *forward externo* (F3), *reverse externo* (B3) y la formación de horquillas en ambos extremos, a partir de la que se formarán horquillas de diferentes tamaños (Flores Somarriba, 2015)

Una vez realizada la amplificación de la LAMP se tiene que revelar el producto obtenido, para lo que se dispone de varias opciones:

- ~ Geles de agarosa al 3% con el fin de observar los productos.
- ~ Reactivos que muestren un revelado colorimétrico visual al actuar como indicadores de pH. Por ejemplo disponemos de varios reactivos como son *SYBR Green I*, azul de hidroxinaftol, berberina o calceína/manganeso (Goto et al., 2009; Almasi et al., 2013). También se puede observar un precipitado gracias a la adición de sulfato de magnesio (MgSO₄) a la muestra que reacciona con el pirofosfato liberado por los dNTPs en el proceso de polimerización del ADN (Mori et al., 2001).

Existe otra opción que permite observar a tiempo real si la muestra es positiva a una reacción de LAMP. Esta visualización se realiza mediante un turbidímetro especial que mide la absorbancia de la muestra a 650 nanómetros (nm). Se considera una reacción positiva cuando la turbidez alcanza el valor de 0,1 dentro

de los 60 minutos que dura la prueba de amplificación o cuando se puede observar la turbidez a simple vista (Ushijima et al., 2014).

4.5.6 Técnicas de tipificación molecular

Todas las técnicas que existen sobre la tipificación de aislados persiguen un mismo enfoque basado en la vigilancia y el control de brotes epidemiológicos. Se conocen dos tipos de tipificación, uno basado en técnicas fenotípicas y otro en moleculares. Estas últimas poseen la ventaja de poder aplicarse a un mayor número de especies, poseer un poder de discriminación mayor y ser más reproducibles por cualquier laboratorio.

Las técnicas de tipificación molecular nos ayudan a evaluar el estado actual del riesgo gracias a la investigación de las fuentes de infección o reservorios implicados en cada caso, a la observación de la relación genética existente entre los diferentes aislados (*Campylobacter*, en nuestro caso), comparándolas con otras a nivel mundial, o al conocimiento sobre las vías de transmisión responsables en cada caso (Fernández et al., 2013). Estas técnicas descritas nos pueden ayudar en investigaciones epidemiológicas realizadas a corto (brotes) y a largo plazo (cepas que causan enfermedad en regiones geográficas determinadas). A continuación se describen las más importantes.

4.5.6.1 Métodos de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para *Campylobacter*

La técnica PCR-RFLP se utiliza para tipificar brotes producidos por distintas cepas de *Campylobacter*. Se basa en la detección de ADN cromosómico a partir de una secuencia genética (16S rRNA o 23S rRNA), mediante PCR y enzimas de restricción, generando un número variable de fragmentos de diferente tamaño. Estos patrones genéticos se pueden observar en geles de agarosa por electroforesis convencional o electroforesis en campo pulsátil (PFGE), en función del número de fragmentos generados por estas enzimas, según si son de corte frecuente o poco frecuente (Nebola y Steinhäuserová, 2006; Tsai et al., 2006). Ha demostrado ser una técnica muy útil para la tipificación de cepas de *C. jejuni*, *C. lari*, *C. helveticus* y *C. jejuni* subsp. *doylei* (Wassenaar y Newell, 2000).

Otra propuesta es realizar la amplificación del locus FlaA, ya que éste posee dos regiones altamente conservadas y una región variable. Esta prueba fue diseñada para *C. jejuni* por Nachamkin et al. (1993) gracias al empleo de la enzima de restricción DdeI, seleccionada por su capacidad de discriminación en relación a las cepas de origen animal, aunque se recomienda combinar con otras como HinfI o AluI para aumentar su poder discriminatorio. Se considera una técnica rápida, barata, poco compleja, de fácil implementación en laboratorios que realicen pocas tipificaciones y que se puede realizar sobre bacterias no cultivables (Moore et al., 2002).

Pero además sobre la región variable del gen FlaA (fla-SVR), de tan solo 321 pares de bases (pb), se puede realizar una amplificación obteniendo una mejor discriminación que con el gen completo (Meinersmann et al., 2005). Esta nueva técnica ha sido utilizada dentro de poblaciones avícolas con el objetivo de

diferenciar entre aislamientos procedentes de los animales y el medio ambiente (Hiett et al., 2007). A menos que se combine con otro método que identifique estos intercambios de ADN, no resulta útil en estudios epidemiológicos globales debido a su inestabilidad genética por las recombinaciones intragenómicas. Por tanto, la combinación de esta prueba con la de secuenciación multilocular (MLST) tendría un poder de discriminación mayor.

Otra variante de RFLP basada en el análisis genético del ARN ribosomal es el ribotipado. Se trata de una técnica con un poder discriminativo limitado debido a que la mayoría de especies del G^o *Campylobacter* poseen solamente tres copias de los genes ribosómicos, no pudiendo diferenciar cepas a nivel de subespecies (Owen y Hernández, 1993).

4.5.6.2 Métodos de PFGE para *Campylobacter*

La técnica PFGE consiste en la separación electroforética en campo pulsado de fragmentos de ADN cromosómico de elevado peso molecular, tras el corte con enzimas de restricción (SmaI, BamHI, Sall o KpnI), con la consiguiente ventaja de poder estudiar el material genético completo de las cepas de *Campylobacter*. Por tanto, su poder discriminatorio es elevado y similar al polimorfismo en longitud de fragmento amplificado (AFLP). A pesar de estas ventajas, en algunos casos las muestras de ADN pueden ser degradadas por las DNasas produciendo cambios en los perfiles obtenidos del PFGE (Ribot et al., 2001; Nebola et al., 2006). Por estos motivos, esta técnica se considera de elección en investigaciones epidemiológicas (brotes).

4.5.6.3 Métodos de AFLP para *Campylobacter*

La técnica AFLP consiste en digerir completamente el ADN cromosómico mediante el empleo de dos enzimas de restricción, seguido de una fase de amplificación específica de algunos de los fragmentos generados. Además, es necesaria la presencia de iniciadores de la reacción, que se encuentran normalmente marcados con radioactividad o fluorocromos, que se unirán a las regiones de corte de las enzimas y a un adaptador de secuencia conocida. A continuación, los productos amplificados se observan en un gel de poliacrilamida. Existe un variante en la que solo se necesita una enzima de restricción y no resulta necesario el uso de iniciadores marcados ni geles de agarosa (Gibson et al., 1998).

Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar cepas de *C. jejuni* (Siemer et al., 2004) y también para genotipar cepas suizas de *Campylobacter* procedentes de varias especies animales, incluido los seres humanos. Cabe destacar que la AFLP permite una mejor discriminación en el análisis de cepas específicas dentro de la misma especie, en comparación con las técnicas PFGE y PCR-RFLP. Por tanto, se trata de una herramienta eficaz en el rastreo de futuras infecciones debidas a este patógeno (Keller et al., 2007). Asimismo, posee la ventaja de analizar todo el genoma bacteriano, no requiere un conocimiento previo de la secuencia genómica y además se trata de una técnica muy reproducible, siempre y cuando las condiciones de digestión, ligado y amplificación no varíen.

4.5.6.4 Métodos de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para *Campylobacter*

La RAPD es una técnica basada en la búsqueda de polimorfismos al azar y puede realizarse mediante amplificación por PCR con un único cebador de pocos pares de bases (alrededor de 10 pb). Éstos se fijan aleatoriamente sobre el ADN y la amplificación por PCR permite obtener productos de secuencias desconocidas en condiciones de baja T^a (36-45 °C). Esta técnica permite obtener fragmentos variados de ADN que pueden analizarse posteriormente. Las condiciones de preparación de las muestras y los ciclos de PCR deben optimizarse en cada caso para permitir que el ensayo sea reproducible. Este método se utiliza para la identificación y tipificación de las especies albergadas dentro del G^o *Campylobacter* (Adzitey et al., 2012).

Además, presenta dos ventajas respecto al método PCR-RFLP: no necesita de un conocimiento previo de la secuencia genómica y tan solo se requiere de pequeñas cantidades de ADN. Como inconveniente, se encuentran su falta de estandarización y reproducibilidad. Asimismo, el proceso de amplificación es muy sensible a variaciones en la T^a de unión, lo que puede modificar el patrón de bandas de cara a la interpretación de manera visual, aunque para ello se pueda disponer de un sistema computerizado (Olive y Bean, 1999).

Existe una variante muy sencilla de realizar, rápida y más reproducible que la RAPD, y que es conocida como Rep-PCR. Se basa en la amplificación de secuencias repetidas a partir del ADN cromosómico de cepas procedentes de brotes epidemiológicos. El cebador (GTG)₅ se ha empleado en nuestro laboratorio para la caracterización de cepas de *Streptococcus iniae* y cepas ácido lácticas, en otros estudios, para la caracterización de *Mycobacterium tuberculosis* (Cilliers et al. 1997), *Salmonella enterica* (Rasschaert et al., 2005) y *Campylobacter concisus* (Matsheka et al., 2006). Según estos estudios algunos autores lo relacionan indistintamente con la técnica RAPD o Rep-PCR. La variabilidad en los perfiles de bandas generados por la Rep-PCR viene dada por el número de secuencias repetitivas así como por la distancia existente entre ellas. El número de bandas es inferior al PFGE.

4.5.6.5 Métodos de MLST para *Campylobacter*

La técnica MLST se basa en el análisis de las variaciones de los genes conservados gracias a la amplificación de secuencias parciales que permiten diferenciar con seguridad cepas de la misma especie. Su enfoque se centra en estudios epidemiológicos globales para indagar el antecesor común de todos ellos (Manning et al., 2003).

Dingle et al. (2001) fueron los primeros en desarrollar un protocolo MLST específico para *C. jejuni* basado en la secuenciación de siete genes. A cada una de las secuencias se le asignó un número según una base de datos común (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Posteriormente, se generó un perfil alélico con todos ellos denominado secuenciotipo (ST). Los resultados demostraron que *C. jejuni* era una bacteria con gran diversidad genética. Esta técnica resulta de utilidad en estudios epidemiológicos a largo plazo.

4.5.6.6 Secuenciación de nucleótidos

La creciente disponibilidad de tecnologías de secuenciación automática está permitiendo realizar secuenciaciones de genomas completos (WGS) con mayor poder de diferenciación que otras técnicas. Estos genomas, completos o parciales, se pueden observar en la base de datos NCBI que cuenta con más de un centenar de secuencias de *Campylobacter* (Whiley et al., 2013).

Una de las principales ventajas reside en que la secuenciación se puede realizar a partir de células muertas o ADN purificado, sin la necesidad de cultivar las bacterias previamente. Además, los datos son fácilmente comparables con otros laboratorios.

4.5.7 Requisitos para la validación de una prueba diagnóstica

Uno de los fines de la Epidemiología es analizar las pruebas diagnósticas que permitan diferenciar entre individuos sanos y enfermos. Para ello, se pueden emplear técnicas de detección directa (agente causal) como el cultivo o la PCR, o técnicas indirectas (detección de anticuerpos) como el ELISA o la inmunofluorescencia (Salman, 2003).

En cualquier caso, una prueba diagnóstica debería reunir las siguientes propiedades básicas: validez (exactitud y precisión), repetibilidad (reproducibilidad), aplicabilidad (eficiencia y eficacia) y seguridad (si el resultado se corresponde con el valor real) (Contreras et al., 2001).

Está claro que es inevitable la utilización de pruebas diagnósticas en una investigación epidemiológica, sin embargo nos encontramos que presentan un grave problema ya que son imperfectas y su fiabilidad no es absoluta. De lo señalado puede deducirse que la capacidad de una prueba diagnóstica, en minimizar el número de resultados incorrectos, es la medida de su calidad.

Por lo tanto, para evaluar la calidad de una prueba se debe tener una de referencia con la que compararla, que se denomina prueba o test de oro (*gold estándar*). Es el método disponible que teóricamente se aproxima a la fiabilidad absoluta (es decir a los resultados verdaderos) y que suele ser difícil de realizar por motivos técnicos y/o económicos. En el caso del diagnóstico de infección, la prueba de oro es, desde la última década del siglo XX, la PCR. La prueba de oro muestra de manera infalible que un resultado positivo indica que el individuo está infectado o enfermo, y que los resultados negativos se corresponden con individuos sanos (de Blas et al., 2008; Donis, 2012).

Actualmente nos encontramos con una amplia variedad de pruebas diagnósticas de las cuales se tiene que seleccionar la más acorde a nuestros objetivos. En nuestro caso concreto, si queremos emitir resultados válidos en el territorio nacional tendremos que seleccionar la prueba diagnóstica que nos marquen las normativas españolas, pero si queremos implementar una técnica para un análisis preliminar en nuestro laboratorio, se deberá seleccionar la prueba más eficaz (capacidad de diagnosticar correctamente) y más eficiente (capacidad de funcionar de forma óptima). A su vez, la elección estará influenciada por la rapidez del diagnóstico, sencillez del proceso, coste económico y ausencia de

efectos secundarios. Estas características resultan fundamentales en la evaluación de pruebas diagnósticas.

Los dos parámetros, tradicionales y más importantes, son la sensibilidad (S) y especificidad (E), indicadores que determinan el valor diagnóstico de una prueba en comparación a una de referencia. La sensibilidad es la probabilidad de detectar correctamente a un individuo enfermo. Otra forma de expresar lo mismo, es la probabilidad de obtener un diagnóstico positivo cuando la enfermedad está presente. Además, también se utiliza este concepto actualmente para hacer referencia a los límites de detección de las pruebas empleadas, diagnósticas o analíticas, como un indicador de precisión. En cambio, la especificidad es la probabilidad de detectar correctamente a un individuo sano o la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando la enfermedad esté ausente (Martin et al, 1997).

También se debe tener en cuenta el valor predictivo positivo (VPP) que consiste en la probabilidad de que un individuo positivo esté realmente enfermo. En cambio, el valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que un individuo negativo esté realmente sano.

Estos cuatro valores pueden considerarse los índices fundamentales en la evaluación de la bondad de un test, pero no son los únicos conocidos. Pueden tenerse en cuenta, también, el índice de validez (IV) o proporción correcta de aciertos (cuanto se aproxima una medida al valor real que se pretende medir), la proporción correcta de aciertos, que se define como la proporción de individuos clasificados correctamente, o el índice de Youden o versión 2 de la probabilidad corregida de detectar enfermedad (IJ). Este último se trata de una medida propuesta por Youden en 1950 que refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos. También es importante mencionar el coeficiente de kappa de Cohen (k), que será el parámetro que nos determinará la concordancia entre los resultados de las diferentes pruebas utilizadas. Este corresponde a la proporción observada de concordancia descontado el azar con respecto a la máxima proporción de concordancia no debida al azar (Cohen J, 1960). Para ello, se seguirá la escala propuesta por Landis y Koch y Thrusfield tal y como se muestra en la tabla 6 (Landis y Koch. 1977; Thrusfield, 1995).

Tabla 6. Niveles de concordancia según el valor del coeficiente kappa de Cohen (k)

Valor de kappa	Grado de concordancia
$(-\infty-0,0)$	Desacuerdo
$[0,0-0,2]$	Escaso
$(0,2-0,4]$	Débil
$(0,4-0,6]$	Moderado
$(0,6-0,8]$	Adecuado
$(0,8-1,0]$	Excelente

Si queremos incrementar la fiabilidad del diagnóstico podemos utilizar una combinación de dos o más pruebas, así como la optimización en la puesta a punto de una prueba. La realización de un diagnóstico clínico y su posterior confirmación en el laboratorio resulta ser una práctica habitual. El objetivo radica en incrementar la fiabilidad del resultado final (Contreras et al., 2001).

La optimización de la puesta a punto de una técnica diagnóstica viene determinada por la minimización del número de falsos negativos y positivos. En todas ellas, es preciso establecer un *cut-off* (valor umbral) para discriminar los valores positivos de los negativos. En la figura 9 se observan estas apreciaciones.

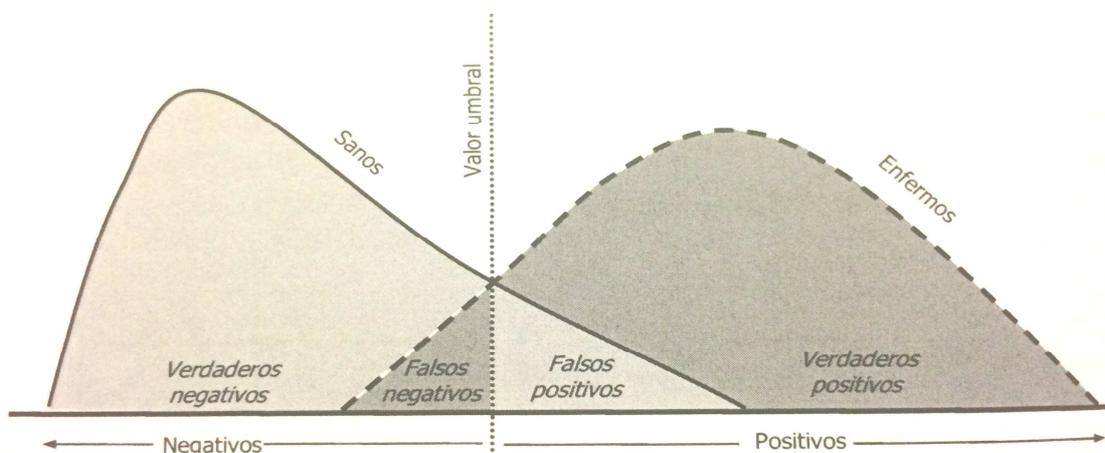


Figura 9. Resultados de la prueba diagnóstica. Establecimiento del valor umbral para una técnica diagnóstica (de Blas et al., 2008)

Si se desplaza el valor umbral hacia la izquierda se reducirán los resultados falsos negativos, aunque a costa de aumentar los falsos positivos. Si se desplaza el punto de corte hacia la derecha ocurre el efecto contrario. En el primer caso, aumentará la sensibilidad y disminuirá la especificidad y, en el segundo, ocurrirá lo contrario.

El Reglamento (CE) Nº 882/2004 establece que los laboratorios oficiales deben estar acreditados según la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. La validación de los métodos diagnósticos se basa en una validación interna en el laboratorio de todos los parámetros para posteriormente realizar un ensayo a pequeña escala y colaborativo con otros laboratorios con el fin de evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de dicho método. De esta manera, se observa la robustez general de esta nueva técnica antes de ser aceptada como norma internacional (Horwitz, 1995).

Para implementar una técnica de biología molecular basada en el método de qPCR resulta necesario tener en cuenta que los parámetros que se detallan a continuación deben estar comprendidos entre los intervalos detallados con el fin de garantizar una excelente fiabilidad en la emisión de los resultados (Applied Biosystems, 2004; European Network of GMO Laboratories -ENGL, 2011 y 2015):

- ~ Eficiencia de la reacción: 90-110%. Se emplea para medir el rendimiento de un ensayo en qPCR. La presencia de valores anómalos puede ser debido a problemas de inhibición en la muestra, dificultades en la homogeneidad o con la cantidad de ADN.
- ~ Coeficiente de determinación en la regresión lineal (R^2): $\geq 0,98$. Se calcula como el cuadrado del coeficiente de correlación (entre el C_q medido y el logaritmo de la concentración) de una curva patrón. Nos indica el grado de ajuste en la recta de regresión a los valores de la muestra, por tanto,

cuanto mayor sea la fuerza de asociación entre las variables a evaluar más cercana será la R^2 a la unidad.

- ~ Pendiente de la curva (*slope*): los valores deben estar comprendidos entre -3,6 y -3,1, que se corresponden con las eficiencias anteriormente descritas (90-110%). La pendiente de la curva perfecta es -3,33 ($\log_2 10 = 3,33$) que significa una eficiencia de la reacción del 100%, es decir, la eficiencia de la reacción y la pendiente de la curva son parámetros mutuamente dependientes. Si la pendiente de la curva refleja un valor más negativo (por ejemplo -3,9) indica que la reacción es menos eficiente. En cambio, si la *slope* es más positiva (por ejemplo -2.5) puede deberse a problemas en la calidad de la muestra o durante el pipeteo.

4.6 Prevención y control

A pesar de ser considerado *Campylobacter* como un microorganismo sensible, se ha demostrado que es más resistente de lo que se creía (Humphrey et al., 2007). Como hemos visto anteriormente, diferentes estudios han demostrado que hay una correlación entre la incidencia de campilobacteriosis en humanos y la prevalencia de *Campylobacter* en pollos de engorde. Los modelos de evaluación cuantitativa del riesgo han determinado que si se pudiese reducir en 100 veces la carga de *Campylobacter* en la canal de pollo, se reduciría la incidencia de campilobacteriosis en humanos aproximadamente 30 veces (EFSA, 2011).

Por ello, existen dos formas de lucha para combatir la campilobacteriosis, una se centra en la política de presacrificio de los lotes de pollo de engorde y la otra en la etapa postsacrificio. El control de la contaminación por *Campylobacter* en la granja es el aspecto más importante a tener en cuenta, dado que es el único punto donde se produce una amplificación de la contaminación a lo largo de la cadena alimentaria (Rosenquist et al., 2003). Por ello, se recomienda que la carga de *Campylobacter* en mataderos sea inferior a ≤ 4 logaritmos (UFC/gramo de piel de cuello) después del oreo.

4.6.1 Etapa presacrificio (producción primaria)

A día de hoy no se comercializa ninguna vacuna para el control de *Campylobacter* pero sí existen varias líneas de investigación trabajando en vacunas atenuadas, vacunas *in ovo* o intraperitoneales y vacunas múltiples (vacunas de *Salmonella* modificadas genéticamente que incorporan antígenos de *C. jejuni*) (Pascal, 2017). Clark et al. (2012) elaboraron una vacuna para *Campylobacter* con el vector *Eimeria* pero los resultados no fueron muy satisfactorios debido a que la inmunidad desarrollada en los broilers no redujo la infección bacteriana.

Entre las medidas encaminadas a reducir la prevalencia de *Campylobacter* en aves de corral, figura la mejora de la bioseguridad con el fin de evitar la transmisión de la bacteria desde el medioambiente hasta las aves de la explotación. Para ello, se tiene que formar adecuadamente al personal responsable encargado de las labores diarias de la explotación. Cada uno de ellos debería emplear una vestimenta limpia, incluido el calzado, y específica para cada nave de producción. Del mismo modo, sería recomendable aplicar medidas

específicas de higiene durante el proceso de cría de las aves: lavado de manos, limpieza y desinfección de vehículos y equipos de trabajo, retirada diaria de cadáveres y un uso apropiado de pediluvios y desinfectantes. Por lo tanto, es necesario establecer zonas limpias y restringir el número de visitas en la explotación (Evans y Sayers, 2000; Cardinale et al., 2004). Este tipo de control solamente es viable cuando los animales se críen en naves cerradas.

También, se tiene que evitar la entrada de insectos (mosquiteras), pájaros (telas pajareras), animales silvestres y domésticos y roedores. Para el control de estos últimos se deben colocar cebos perimetrales en un sitio cubierto al lado de las paredes de las naves y protegidos por un portacebos (debe existir un mapa de su localización). También se deberían eliminar las malas hierbas presentes en los alrededores de las naves (Henry et al., 2011).

Otras de las medidas encaminadas a la reducción de *Campylobacter* en la producción primaria son el control del agua de bebida y de las camas. El tratamiento del agua de bebida puede realizarse mediante la adición de hipoclorito sódico (2-3 ppm de cloro libre), mezcla de ácidos orgánicos (ácido láctico al 2%) y un control diario del pH, cloro residual (ppm) y del potencial de óxido reducción. Actualmente, se está utilizando el dióxido de cloro en granjas de mayor bioseguridad. Además, se deben limpiar los bebederos y las instalaciones de agua (Evans y Sayers, 2000; Lyngstad et al., 2008). Para el control de la yacija se pueden adicionar sustancias ácidas o básicas que disminuyan la concentración de microorganismos patógenos, aunque es necesario realizar más estudios para demostrarlo (Corujo, 2016).

Una práctica habitual llevada a cabo en las explotaciones de pollos de engorde consiste en que la alimentación no podrá retirarse más de doce horas antes de la hora prevista para el sacrificio (Directiva 2007/43/CE del Consejo de 28 de junio de 2007 por la que se establecen las disposiciones mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne). La finalidad de esta práctica radica en la reducción del contenido en el interior del intestino de las aves, disminuyendo así los posibles riesgos derivados en el faenado (EFSA, 2011).

Otro aspecto a tener en cuenta es la limpieza y desinfección adecuadas de los camiones, cajas y materiales que se utilizan para el transporte de los pollos desde la explotación hasta el matadero, con el objetivo de minimizar la presencia de *Campylobacter* (Allen et al., 2008b). Los transportistas no deberían entrar en las naves, pero sí recibir formación en materia de buenas prácticas higiénicas (BPH).

Desde que la Unión Europea (UE) prohibiera el empleo de todo tipo de antibióticos promotores del crecimiento en el sector agroalimentario, han sido muchos los esfuerzos dedicados a la búsqueda de sustancias alternativas (Nascimento et al., 2000). La gran mayoría de soluciones pasan por el manejo de la alimentación de los animales de crianza con el objetivo de mejorar su balance microbiano intestinal y la integridad del intestino, controlar la proliferación de patógenos intestinales causantes de zoonosis, favorecer el desarrollo de la microbiota beneficiosa e incrementar la capacidad inmunitaria del tracto gastrointestinal (Pan et al., 2014). Entre las posibles alternativas se encuentra el uso de las siguientes sustancias aditivas:

- ~ Aceites esenciales: son rápidamente absorbidos en el duodeno, reducen el potencial de membrana, el pH interno o producen cierta sinergia con los ácidos orgánicos, siendo así más efectivos contra los microorganismos patógenos. Los terpenos (limoneno, pineno o camomilla) y los compuestos oxigenados (fenoles-timol-, aldehídos-cimaldehído- u óxidos-eucaliptol-) son considerados aceites esenciales.
- ~ Ácidos grasos de cadena media: por ejemplo se dispone de ácido caproico (c6), caprílico (c8), cáprico (c10) para inhibir enzimas o interferir en la absorción de nutrientes (de los Santos et al., 2009). Actúan produciendo un desequilibrio en el transporte de electrones en la membrana celular y en la fosforilación oxidativa, interfieren en la producción de ATP o impiden la absorción de nutrientes, entre otras funciones. La adición de los ácidos de cadena corta y media en el alimento no ha disminuido la carga *Campylobacter* en la explotación (van Deun et al., 2008a; Hermans et al., 2010).
- ~ Ácidos orgánicos: como el ácido láctico que retrasa en días la colonización por *Campylobacter* (Thormar et al., 2006). Según Skanseng et al., (2010) el pienso suplementado con ácido fórmico y combinado con sorbato de potasio también puede reducir la colonización de este patógeno. Estos ácidos se disocian rápidamente en la primera parte del tramo gastrointestinal.
- ~ Bacteriocinas: son péptidos antimicrobianos sintetizados y excretados por microorganismos con función antimicrobiana. Por ejemplo, pediocina producida por *Paenibacillus polymixa*, L-1077, E760 o E 50-52. Se trata de agentes con altas expectativas para el control de *Campylobacter* en los pollos de engorde ya que estudios previos demuestran disminuciones de hasta 4 log de *C. jejuni* en los ciegos de las aves (Svetoch y Stern, 2010). La combinación de varias bacteriocinas administradas simultáneamente reduce de forma dramática la carga bacteriana de este patógeno (Hoang et al., 2011).
- ~ Bacteriofagos: podría ser una estrategia potencialmente útil para reducir la carga microbiana de este microorganismo en la cadena alimentaria. Los fagos sintetizan sustancias como proteínas antimicrobianas, tanto enzimáticas (lisozimas o nucleasas), como no enzimáticas (muy efectivas para bacterias pero probablemente no sean útiles para las toxinas). Varios estudios han demostrado una reducción de *Campylobacter* en el intestino de pollos gracias al empleo de bacteriofagos desde 0,5 hasta 5,0 log (UFC/gramo de contenido cecal) (Carrillo et al., 2005; Wagenaar et al., 2005; Carvalho et al., 2010).

La administración de un fago para disminuir la presencia de *Campylobacter*, además de su aplicación durante largos períodos de tiempo, puede dar lugar a la aparición de resistencias. Por este motivo, se recomienda realizar una terapia basada en un cóctel de fagos y administrada unos 4-5 días antes del sacrificio para observar el potencial de este tratamiento (Carvalho et al., 2010; Hermans et al., 2011; Fischer et al., 2013; Firlieyanti et al., 2016).

- ~ Prebióticos (fructooligosacáridos y mananoligosacáridos) y extractos vegetales (fitobiótico): estos últimos suponen una novedosa línea de trabajo con productos naturales con capacidad antibacteriana (van Dijk et al., 1999; Nascimiento et al., 2000; Garcés et al., 2015).
- ~ Probióticos: se utilizan cepas bacterianas que entrarían en competencia metabólica con otras a nivel intestinal por nutrientes, oligoelementos, etc. por el mecanismo de exclusión competitiva. Estos aditivos microbianos pueden adherirse y sobrevivir en el tracto gastrointestinal de los animales donde actúan sobre la estabilidad y protección de este ecosistema. También contribuyen en la digestión y procesos metabólicos y modulan la respuesta inmune local y sistémica (García-Hernández et al., 2016). Algunos estudios han demostrado que son valiosos para inhibir la colonización de *C. jejuni* (Ghareeb et al., 2012), aunque no todos poseen este potencial. Por ejemplo, el *Lactobacillus plantarum* PCS 20 no mostró ningún efecto, pero el *Bifidobacterium longum* PCB 133 dio buenos resultados con *Campylobacter* (Santini et al., 2010).

A continuación se presentan en la tabla 4 del apartado Anexo las pruebas destinadas a la evaluación de algunas de las alternativas previamente descritas por el laboratorio del grupo SADA (Nutreco), más conocido como PRC, en su granja experimental y en condiciones reales de producción de broilers, desde el año 2009 hasta la actualidad (ver Anexo).

El objetivo de estos estudios radica en comprobar la eficacia de varios compuestos que pueden reducir, según la literatura, las cargas microbianas de *Campylobacter* en la explotación. Estos compuestos se han aplicado de manera individual o combinada, en el agua de bebida o en el pienso (Corujo, 2016)

El butirato ha sido uno de los aditivos que ha demostrado su eficacia reduciendo la carga de *Campylobacter* en las heces de las aves (van Deun et al., 2008a). Aunque se han visto reducciones importantes en la colonización con alguno de ellos, se necesitan más estudios para poder evaluar la eficacia de los mismos. Por otra parte, se puede realizar un tratamiento combinado que promueva la exclusión competitiva en las partes bajas del intestino y así retrasar la colonización de *Campylobacter* (Corujo, 2016).

Durante la monitorización del efecto de los grandes grupos de tratamientos mencionados, los principales estudios publicados han tomado muestras fisicoquímicas del producto empleado, peso del animal para el cálculo de tasas de conversión, datos de mortandad e ingesta de agua y pienso, análisis de sangre, y presencia de patógenos ambientales (Garcés et al., 2015). En concreto, y hasta hace muy pocos años, el efecto de dichos tratamientos sobre la microbiota del intestino se ha llevado a cabo mediante aproximaciones tradicionales, la mayoría de ellas realizadas en cultivo en placa, con los consiguientes sesgos derivados de la anomalía de recuento en ellas (Ercolini 2013; Mayo et al., 2014; Shaufi et al., 2015).

En los últimos años el avance de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ha potenciado la irrupción e integración de las mismas dentro del sector agroalimentario general, permitiendo la monitorización de la

elaboración de diversos productos, materias primas, evaluación de medidas fitosanitarias y de aquellos procesos microbianos que influyen tanto en la calidad como en las propiedades organolépticas del mismo (Ercolini 2013; Mayo et al., 2014). La industria aviar, principal sector cárnico nacional y fuente proteica mundial, es una de las que está experimentando una mayor revolución en este sentido (Sergeant et al., 2014). La secuenciación masiva microbiana intestinal es una de las aproximaciones que está revolucionando el sector. Aunque todavía son escasos los conocimientos científicos y experimentales en este ámbito, estudios muy recientes están permitiendo conocer la microbiota intestinal más abundante en pollos de engorde (Pedroso y Lee 2014; Sergeant et al., 2014; Shaufi et al., 2015; Waite et al., 2014 y 2015), estableciendo estándares para las diferentes regiones del sistema digestivo y su evolución durante las fases de engorde.

Dentro de la secuenciación masiva intestinal, la composición microbiana de los ciegos suscita especial interés al estar involucrados de manera determinante en la degradación de polisacáridos y ácidos grasos de cadena corta y contener una elevada diversidad microbiana (Oakley et al., 2014; Choi et al., 2015). Estos conocimientos favorecen la evaluación, de un modo más preciso, del efecto de tratamientos probióticos, prebióticos y aquellos basados en sustancias derivadas de extractos de plantas sobre ciertos organismos diana y la comunidad en conjunto, comprendiendo de una manera holística su mecanismo de acción junto a otros elementos simultáneos como pueden ser factores abióticos ambientales.

Este tipo de estudios además sientan las bases a la hora de afrontar en el futuro crisis como brotes o afecciones que afecten al balance microbiano normal de una población, permitiendo tomar medidas correctoras durante el proceso de crianza, así como identificar y reconocer dentro del microbioma, elementos o especies bioindicadoras del buen estado de salud del animal (Pedroso y Lee 2014; Choi et al., 2015).

Entre la microbiota intestinal se identifican tanto especies perjudiciales para el ser humano como para el desarrollo del animal, entre ellas las más estudiadas son el G^o *Clostridium*, G^o *Salmonella*, G^o *Escherichia* y G^o *Campylobacter*. Su regulación está más controlada legalmente (Pedroso y Lee 2014; Shaufi et al., 2015; Choi et al., 2015), que otras que afectan a la conservación del producto una vez envasado, principalmente bacterias de los G^o *Lactobacillus*, G^o *Bochatrix*, G^o *Carnobacterium*, G^o *Leuconostoc* o G^o *Pseudomonas* (Borch et al., 1996; Nieminen et al., 2012a y 2012b) y cuyo control durante la cría y engorde del animal podría incrementar la viabilidad de las mismas.

La ecología microbiana estudia la diversidad de microorganismos para caracterizar comunidades bacterianas en diferentes ambientes y determinar factores que impulsan la diversidad entre estas comunidades (Atlas y Bartha, 1998). Whittaker (1960 y 1972) definió diferentes tipos de medida de la diversidad: alfa, beta y gamma. La diversidad alfa la catalogó como la diversidad de organismos presentes en una muestra o ambiente, la beta como la diferencia entre muestras y ambientes, y la diversidad gamma mide la diversidad a una escala más amplia, provincia o región.

Diferentes estimadores métricos acerca de la diversidad alfa y beta se recogen en el *software* Qiime, que implementa decenas de los índices de diversidad más

ampliamente utilizados, incluyendo tanto los índices filogenéticos como los no filogenéticos. Los estimadores filogenéticos han sido especialmente útiles ya que proporcionan poder adicional a los grados de divergencia filogenética entre secuencias dentro de cada muestra (Navas-Molina et al., 2013).

Uno de los índices recomendados para estudiar la diversidad alfa (intra-grupo) es el índice de la distancia filogenética (PD_Whole tree) (Faith, 1992), que se trata de un estimador métrico sobre las unidades taxonómicas operacionales o especies (OTU). Sin embargo, la elección de los estimadores dependerá de nuestro enfoque en el estudio. Si se quiere estimar puramente la riqueza que presenta una comunidad, se tienen que emplear estimadores no paramétricos como el número observado de especies presentes en una muestra o el estimador Chao1 sobre el n° total de especies que se observaría con un muestreo infinito (Chao, 1984). En estimaciones puras de uniformidad o en medidas que combinen riqueza y uniformidad, se puede utilizar el estimador no paramétrico, índice de Shannon (Shannon-Weaver o Shannon-Wiener), que caracteriza la diversidad de especies y explica la abundancia y uniformidad de especies por individuo (Shannon y Weaver, 1949). La riqueza no tiene en cuenta la abundancia de los distintos tipos bacterianos, por lo tanto, no es lo mismo que la diversidad.

La diversidad beta se puede estudiar mediante el análisis de coordenadas principales el cual se utiliza para estudiar la diversidad genética entre dos grupos de tratamiento, analizar comunidades, observar variaciones morfológicas entre especies o la estructura espacial entre distintas comunidades (Dray et al., 2006; Ude et al, 2006; Hülse de Souza et al., 2008).

4.6.2 Etapa postsacrificio

El sacrificio de los animales en buenas condiciones higiénicas reduce la contaminación fecal, pero no garantiza la ausencia de *Campylobacter* en la carne y los productos cárnicos. Por ello, se debe formar a los trabajadores de los mataderos y productores de carne cruda, en materia de seguridad alimentaria y manipulación higiénica de los alimentos para mantener la contaminación en niveles mínimos. Se ha demostrado que resulta muy útil el uso de manuales específicos para la impartición de dicha formación (EFSA 2011; Orihuel et al., 2011).

Una estrategia de sacrificio que utilizan los países nórdicos consiste en la identificación de lotes positivos en la explotación con el fin de someter las canales de pollo a un tratamiento de congelación (EFSA, 2011). Otra estrategia realizada por Havelaar et al. (2007) se centró en un sacrificio logístico programado, sacrificando en primer lugar los lotes negativos y después los positivos. Se pudo observar que esta medida no repercutía en el número de casos humanos debido a *Campylobacter*. Para ello se recomendó realizar un muestreo como máximo 7 días antes del sacrificio de las aves y con unas cargas de *Campylobacter* $\leq 7 \log$ (UFC/gramo de contenido cecal) para poder aplicar medidas adicionales.

Por otra parte, si se modifican algunas acciones durante el procesado de las canales en el matadero se podría reducir la presencia de *Campylobacter* en ellas, en concreto, si se realiza la evisceración antes del escaldado (Berrang et al., 2011).

Algunas recomendaciones para el escaldado son por ejemplo, el uso de flujos de agua en contra de la corriente, mantener el pH por encima de 7,5 o aplicar un enjuague posterior al escaldado para eliminar la materia orgánica adherida a la pluma. Para el desplumado se debería aplicar altas velocidades de flujo con agitación con la finalidad de diluir la materia orgánica y la carga bacteriana, así como aplicar un enjuague posterior al escaldado para eliminar la materia orgánica adherida a la pluma (entre otras pautas) En el eviscerado se deberían duchar las canales y ajustar los equipos al tamaño de las mismas (Rosenquist et al., 2006; Corujo, 2013).

Aunque la EFSA (2011) no autorice el empleo de productos químicos para reducir *Campylobacter* de las canales de pollos, se puede encontrar a diversos autores que han estudiado la adición de productos como el ácido láctico (Riedel et al., 2009) o clorito de sodio acidificado, entre otros (Corry et al., 2008). La inmersión por pulverización según Ellebroek et al. (2007) solamente puede lograr reducciones máximas entre 1,0-1,5 logaritmos.

En contrapartida, la EFSA (2011) sí autoriza la descontaminación física de las canales, con excepción de la irradiación. Por tanto, se puede congelar durante varios días la canal (Georgsson et al., 2006; Sandberg et al., 2006), sumergirla en agua caliente (Corry et al., 2006), combinar el vapor con ultrasonidos (Boysen y Rosenquist, 2009), aplicar un marinado (salmuera compuesta por agua, sal, especias, aditivos y ácidos) sobre los filetes de pollo (Birk et al., 2010), aplicar calor (75 °C) en el centro de la pieza y emplear atmósferas modificadas, aunque existan cepas de *Campylobacter* con diferentes tolerancias al oxígeno (Kaakoush et al., 2007; Rajkovic et al., 2010).

Otra actuación que se debe llevar a cabo es la adecuada limpieza y desinfección del matadero, ya que se puede llegar a obtener un 21% de muestras positivas si no se realiza correctamente. Hay estudios que afirman que a pesar de haber desinfectado las instalaciones y el instrumental de un matadero de aves tras el paso de un lote contaminado por *Campylobacter*, se puede seguir detectando este patógeno en una de cada cinco muestras ambientales (Johnsen et al, 2007).

Por último, se espera que se aplique en el matadero el protocolo de BPH y Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) con el objetivo de reducir el nivel de infección de *Campylobacter* en los broilers (White et al., 1997; EFSA, 2011). Además, se debe informar a consumidores y cocineros sobre las mejores maneras de manejar el pollo en ambientes domésticos y de restauración colectiva para minimizar los riesgos (Humphrey et al., 2007).

5. Resistencia antimicrobiana frente a *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*)

A partir de los años 70 las autoridades sanitarias comenzaron a ser conscientes del amplio y extendido uso de los antibióticos empleados como promotores de crecimiento en la alimentación animal desde la década de 1950. Es por ello que a partir de entonces se empezó a prohibir la administración de algunos (tetraciclinas o penicilinas, entre otros), aunque no fue hasta el año 2006 cuando

la UE decidió finalizar con su actividad, siendo los últimos utilizados, la avilamicina y el flavofosfolipol (Parlamento Europeo y Consejo, 2003; Castanon, 2007).

Los antibióticos empleados en el ámbito veterinario perseguían los siguientes objetivos: promover el crecimiento, implementar profilaxis médica, llevar a cabo metafilaxis contra las enfermedades y, por último, realizar acciones terapéuticas para combatir los patógenos. Un antibiótico puede tener la característica de impedir la multiplicación bacteriana para dejar actuar al sistema inmune y que sea él, el encargado de eliminar a estas bacterias del organismo (bacteriostático), o puede eliminar las bacterias generalmente por lisis celular (bactericida). En función de la prescripción médica planteada pueden existir antibióticos que generen ambos efectos (según la dosis administrada o combinando varios de ellos).

La resistencia bacteriana a los antibióticos (RAM) es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la capacidad que poseen las bacterias de transferir horizontalmente el material genético a su descendencia. Es por ello que en el año 1999, el Comité Director Científico (CDC) de la Comisión Europea se mostró preocupado por la elevada resistencia existente y recomendó que se redujese cuanto antes el uso inadecuado de los antimicrobianos tanto en medicina humana, medicina veterinaria, cría de animales y productos fitosanitarios. Además, en el año 2001 la OMS publicó una serie de directrices para su control en los animales destinados a la producción de alimentos con el fin de preservar la salud humana a través de la cadena alimentaria. En el año 2003, se elaboró el Reglamento 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal, que prohibió los antibióticos como aditivos con excepción de los coccidiostáticos, que se pueden utilizar de manera preventiva para el control de la coccidiosis (Parlamento Europeo y Consejo, 2003; Sammarco et al., 2010).

La RAM, sobre todo en los patógenos zoonóticos procedentes de los alimentos, puede ocasionar una disminución en la efectividad del tratamiento indicado en caso de infección en el hombre, debido a su uso inadecuado de los últimos años (Goldman, 2004). Por otra parte, existe un número limitado de antimicrobianos capaces de hacer frente a estas infecciones. Esta resistencia posee una tendencia inversamente proporcional en relación a la comercialización de nuevos productos, por lo que se recomienda revisar las pautas instauradas en los animales y ser prudentes en la elección del antibiótico en las personas (Moore et al., 2006).

Existen varios organismos a nivel europeo que trabajan conjuntamente con el objetivo de atenuar y controlar el riesgo de aparición de resistencias. Se ha creado una red de sistemas de vigilancia (EARS-Net) (<https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>) coordinada y financiada por el ECDC, la cual proporciona datos de referencia e información acerca de la RAM. El ECDC advierte en su informe epidemiológico anual sobre las diferencias existentes entre países de la UE, con independencia del patógeno, antibiótico y región. Se detecta una mayor resistencia en cepas procedentes del sur y sudeste de los EM,

por lo que se insiste en la idea de aunar esfuerzos para promover un uso responsable de los agentes antimicrobianos y establecer las medidas oportunas (ECDC, 2013). La EFSA también preocupada por este tema, publicó en el año 2012 varios informes relativos a la vigilancia realizada en alimentos según las resistencias detectadas en los microorganismos: *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y *Enterococcus* spp. (EFSA, 2012b). Otro de sus informes reflejó la existencia de proporciones extremadamente resistentes a ciprofloxacino y tetraciclinas, procedentes de aislados de *C. coli* en seres humanos y cerdos de engorde. Además, un tercio de estos aislados en el hombre mostraban también resistencia frente a la eritromicina (EFSA, 2015).

Según el informe anual de la EFSA (2017), durante el 2015, solamente 17 EM junto con Islandia y Noruega, informaron sobre datos de RAM en humanos a través del Laboratorio Nacional de Referencia de Salud Pública de cada país. La monitorización de los antimicrobianos recogida en este informe ha sido establecida por protocolos europeos a partir de aislados humanos de *Salmonella* y *Campylobacter* (ECDC, 2014). El panel de antibióticos para *Campylobacter* incluye ciprofloxacino, eritromicina, tetraciclinas, gentamicina y amoxicilina-ácido clavulánico (ECDC, 2016).

Actualmente, *C. jejuni* sigue siendo la especie más identificada en la UE con un total de 83.350 casos durante el 2015, seguida de la especie *C. coli*. El porcentaje de resistencia a tetraciclinas a partir de aislados humanos españoles en los años 2014 y 2015 se puede observar en la tabla 7.

Tabla 7. Resistencia frente a tetraciclinas en los años 2014 y 2015 en España

Año	Especie <i>Campylobacter</i>	Nº muestras	Porcentaje de resistencia (%)
2014	<i>C. jejuni</i>	246	81,30
	<i>C.coli</i>	67	92,50
2015	<i>C. jejuni</i>	228	78,50
	<i>C.coli</i>	55	92,70

Uno de los principales hallazgos ha sido el alto nivel de resistencia detectado para las fluoroquinolonas, hecho que ha llevado a algunos de estos EM a optar por terapias alternativas rutinarias para el tratamiento de la campilobacteriosis humana. Además, se ha encontrado multirresistencia (MDR) en el 14% de las cepas humanas de *C. coli* para ciprofloxacino, eritromicina y tetraciclina (cabe destacar el caso de Portugal que detectó más de un 50%) (EFSA, 2017).

Por otra parte, desde el año 2014 existe un Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos (PNRA), creado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Fitosanitarios (AEMPS). Este plan desarrolla, de igual manera que los organismos europeos, diversas estrategias de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de los RAM, tanto en personas como animales, mediante la movilización de todos los profesionales sanitarios involucrados. Además, este plan impulsa e identifica medidas alternativas y complementarias de prevención y tratamiento. Todos estos organismos tienen una estrategia común que consiste en mitigar la diseminación de bacterias multirresistentes ya que se trata de un tema de especial repercusión presente y futura sobre la Salud

Pública. El término multirresistente incluye una cepa bacteriana que presenta resistencia en, al menos, tres o más familias de antimicrobianos de uso habitual (PNRA, 2014).

En la figura 10 se puede observar el consumo de antibióticos durante el año 2014 en España.

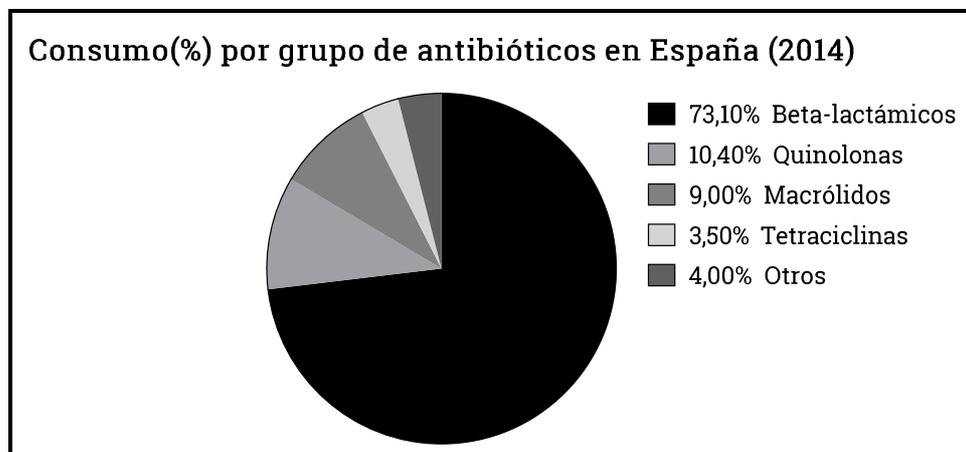


Figura 10. Consumo (%) por grupo de antibióticos en España durante el año 2014 (AEMPS, 2014)

Se dispone de dos métodos de supervisión bacteriana para evaluar la RAM, uno *in vivo* (pruebas terapéuticas de ensayo-error) y otro *in vitro* (estudios en el laboratorio con diferentes técnicas).

Las técnicas *in vitro* nos permiten visualizar la sensibilidad antibiótica generada por las bacterias a estudiar, para así observar el fenotipo que presentan (resistotipo). Para ello, se deben evaluar dos parámetros: la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB (concentración mínima bactericida). La CMI hace referencia a la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un determinado inóculo bacteriano de concentración conocida. La CMB es aquella concentración mínima de antibiótico capaz de inducir un efecto letal sobre el 99,9% de la población bacteriana inoculada. Generalmente se acepta que la CMI de una bacteria determina su sensibilidad o resistencia hacia un determinado antibiótico.

Los métodos que se encuentran para evaluar la sensibilidad frente a las cepas de *Campylobacter* se clasifican en:

- ~ La dilución de un antibiótico en un medio de cultivo líquido o sólido. Por ejemplo, el método macro y microdilución en caldo (BDM) o dilución en agar (ADM).
- ~ La difusión de un antibiótico sobre la superficie de un medio de cultivo (método de difusión en disco o método de Kirby-Bauer (DDM) y el Epsilon-test).

Se puede encontrar en el mercado un kit comercial denominado AviPro® PLATE enfocado al diagnóstico en placa de ELISA para determinar el valor de la CMI que presentan las cepas de *Salmonella* y así poder diferenciar si se trata de una cepa de campo o vacunal. Además de este kit, se ha desarrollado una variante para

poder estudiar las cepas de *Campylobacter* siguiendo el mismo esquema. En la tabla 8 se recogen todos los antibióticos objeto de estudio.

Tabla 8. Antibióticos estudiados según el kit AviPro® PLATE

Nº	Grupo Antibiótico	Antibiótico
1		Amoxicilina
2		Oxacilina
3	β-Lactámicos	Penicilina G
4		Ceftiofur
5		Cefpodoxima proxetil
6		Cefotaxima
7	Polipéptidos	Colistina
8	Fluoroquinolonas	Enrofloxacino
9		Eritromocina
10	Macrólidos	Eritromicina (vacuna marcada)
11		Tilmicosina
12		Tilosina
13	Lincosamidas	Lincomicina
14	Aminoglucósidos	Neomicina
15		Estreptomocina
16	Ansamicina	Rifampicina
17	Lincosamidas/Aminociclitolos	Lincospectina/Espectinomocina
18	Tetraciclinas	Tetraciclinas*
19		Doxiciclina
20	Pleuromutilinas	Tiamulina
21	Inhibidores de la síntesis de folato	Sulfametoxazol/trimetropima

Leyenda: Tetraciclinas* (incluye a la clortetraciclina, oxitetraciclina)

La organización internacional encargada de desarrollar y estandarizar diferentes métodos en medicina clínica humana es el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, <http://www.clsi.org>). Dentro de este, se desarrollan métodos estándares de referencia, controles de calidad o criterios de interpretación sobre los resultados obtenidos con el fin de proporcionar guías que recomienden los mejores tratamientos antibióticos a los pacientes. También trabajan en el estudio de los métodos de sensibilidad mencionados anteriormente, destacando que no todos ellos se encuentran estandarizados actualmente para *Campylobacter*. Tampoco se dispone de valores de CMI admitidos para todos los antibióticos que se utilizan con este patógeno. Además de este organismo, existe en Europa otra organización conocida como Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, <http://www.eucast.org>), el cual posee unos valores de corte en el diámetro del halo para determinar la posible resistencia de la cepa testada en aquellos casos en los que no se refleje su CMI. Según el CLSI el ADM se

considera un método estándar para *C. jejuni* (Halbert et al., 2005) y el método BDM se encuentra estandarizado por el EUCAST y CLSI (Ge et al., 2013).

5.1 Resistencia antibiótica frente a *Campylobacter* en pollos de engorde

Como hemos visto en otras ocasiones, también *C. jejuni* es la especie que más estudios de resistencia presenta, al ser la principal especie aislada en pollos. La gran mayoría de ellos se centran en observar el comportamiento de las quinolonas, macrólidos y, en menor medida, tetraciclinas en los casos de campilobacteriosis humana debido a la aparición de cepas resistentes aisladas de los reservorios animales (Moore et al., 2006).

Los antimicrobianos que se utilizan más frecuentemente en las explotaciones de broilers son: amoxicilina, doxiciclina, enrofloxacino, lincomicina y tilosina. Por consiguiente, se esperarán mayores tasas de resistencia sobre estos antibióticos en bacterias zoonóticas, como *Campylobacter* o *Salmonella*.

Los programas de monitoreo de RAM en *Campylobacter* de animales de abasto suelen cubrir solamente las especies *C. jejuni* y *C. coli* (Decisión 2013/652/UE). El informe de la EFSA (2016a) detectó, en las muestras analizadas, un 87,50% de especies de *C. jejuni* y un 97,80% de *C. coli* durante el año 2014 para pollos de engorde. Los antimicrobianos estudiados, en este caso, fueron ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, ácido nalidíxico, estreptomina y tetraciclinas. Los resultados mostraron que, en general para *C. jejuni*, los niveles de resistencias frente a tetraciclinas (54,40%), ácido nalidíxico (65,10%) y ciprofloxacino (69,80%) fueron de alto a muy alto, mientras que los valores para la estreptomina (6,90%) y eritromicina (5,90%) fueron de bajo a moderado. Los resultados en los aislamientos de *C. coli* para pollos de engorde fueron similares en los países europeos. Por otra parte, se detectó un 4,60% de multirresistencia en los aislados de *C. jejuni* mientras que en *C. coli* se obtuvo un valor superior (18,30%). España y Alemania reflejaron valores superiores al 20% de aislados con multirresistencia para la especie *C. coli* en broilers.

De la misma manera que los sistemas de vigilancia sobre *Campylobacter* difieren entre los EM, las tasas de resistencia antimicrobiana también resultan muy variables ya que no todos se rigen por los mismos métodos diagnósticos (Chen et al., 2010; Giacomelli et al., 2014; Ngulukun et al., 2015).

Los antibióticos del grupo de los β -lactámicos como la penicilina, ampicilina o amoxicilina no son agentes antimicrobianos que se utilicen de primera elección para el tratamiento de la campilobacteriosis humana. Por este motivo, en España son escasos los estudios realizados sobre cepas de *Campylobacter* aisladas en aves de consumo.

El uso de ciertos macrólidos (tilosina) a dosis bajas como promotores de crecimiento no ha provocado años después una resistencia mantenida en el tiempo, dado que las poblaciones resistentes desaparecen pronto. La especie *C. coli* aislada del cerdo posee mayor resistencia a los macrólidos que la aislada de pollos, debido a su mayor uso en la especie porcina (Moore et al., 2006). Por otra parte, se desconoce por qué *C. jejuni* es más sensible a los macrólidos que

C. coli (Luangtongkum et al., 2009). En España, los datos de resistencia a macrólidos sobre cepas aviarias indican un 24,1% para *C. coli* (de Jong et al., 2012) y un porcentaje casi nulo para *C. jejuni* (Melero et al., 2012). La resistencia a eritromicina se divide en dos grupos en función de los valores de CMI, aquellas cepas que poseen una CMI entre 8-16 miligramos por litro (mg/l) son de resistencia baja, pero serán de resistencia elevada si su CMI es superior a 256 mg/l (Payot et al., 2004).

En la tabla 9 se recogen los porcentajes de resistencia encontrados en los pollos de engorde englobados dentro de España en relación a estos grupos de antimicrobianos.

Tabla 9. Porcentaje de resistencia para *C. jejuni* y *C. coli* en pollos procedentes de España

Grupo Antibiótico	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>	Referencia
β-lactámicos	47,90%	90,00%	Sáenz et al., 2000
Macrólidos	0,00%	24,10%	Melero et al., 2012; de Jong et al., 2012
Fluoroquinolonas	95,40%	89,70%	Sáenz et al., 2000; Melero et al., 2012; de Jong et al., 2012
Tetraciclinas	81,20%	96,70%	Melero et al., 2012; de Jong et al., 2012
Lincosamidas	-	-	Ningún estudio realizado

Uno de los principales factores en la aparición de resistencias a fluoroquinolonas es su uso en las aves de corral para el tratamiento de la colibacilosis. Por este motivo, la resistencia a este grupo antimicrobiano ha aumentando considerablemente con el paso de los años llegando a cifras de hasta el 40% de cepas resistentes. Los EE. UU. prohibieron tratar a los pollos de engorde con ciprofloxacino/enrofloxacino desde el año 2005 (Medalla et al., 2007) con la finalidad de reducir estas elevadas resistencias. Sin embargo, en Australia no se encuentra autorizado el uso de fluoroquinolonas en explotaciones avícolas por lo que no se ha llegado a detectar cepas de *Campylobacter* resistente a ellas. Un estudio realizado durante los años 2002-2003 en 8 países de la UE sobre la sensibilidad antimicrobiana, comprobó que España era el país con mayor porcentaje de cepas resistentes de *C. jejuni* al antibiótico ciprofloxacino (85%) (Simjee et al., 2007).

La RAM para las tetraciclinas va a depender de varios factores, entre ellos, el tipo de producción o la especie aislada, siendo *C. coli* la que suele mostrar mayor resistencia (Moore et al., 2006). Al igual que sucede con los macrólidos, en los tratamientos terapéuticos realizados con tetraciclinas no aparecen poblaciones bacterianas resistentes durante largos periodos de tiempo (Pidcock et al., 2008). En nuestro país los datos de resistencia para este grupo antimicrobiano son variables y muchas cepas poseen resistencia frente a otros grupos de antibióticos (Melero et al., 2012).

Las resistencias obtenidas en los aislados de pollos de engorde españoles para las cepas de *C. jejuni* continúan siendo altas para antibióticos como el ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclinas (figura 11).

Asimismo, las cepas de *C. coli* aisladas de pollos, procedentes de explotaciones españolas, también reflejan altos niveles de resistencia a ciprofloxacino, ácido

nalidíxico y tetraciclinas (figura 12). Mientras que aproximadamente el 33% de estas cepas fueron multirresistentes, ninguna cepa de *C. jejuni* presentó multirresistencia y alrededor del 85% fueron resistentes a dos familias de antimicrobianos (PNRA, 2014).

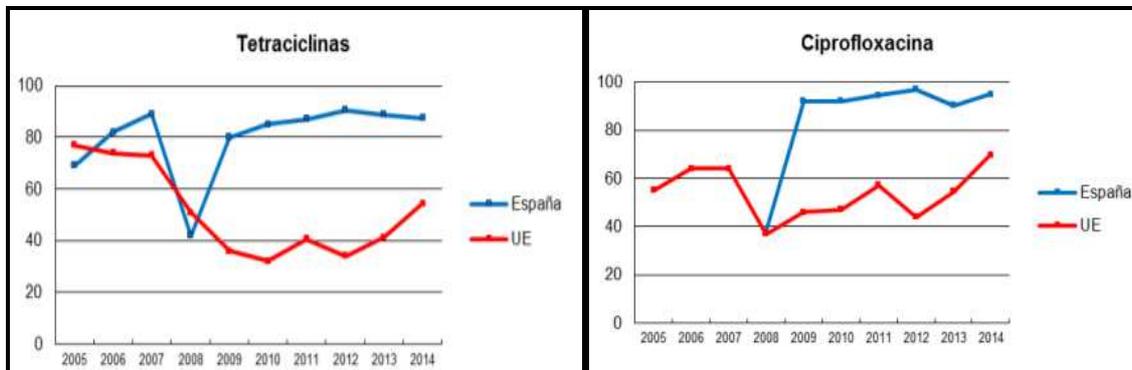


Figura 11. Porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos de *C. jejuni* obtenidas de pollos de engorde desde 2005 hasta el 2014 (PNRA, 2014)

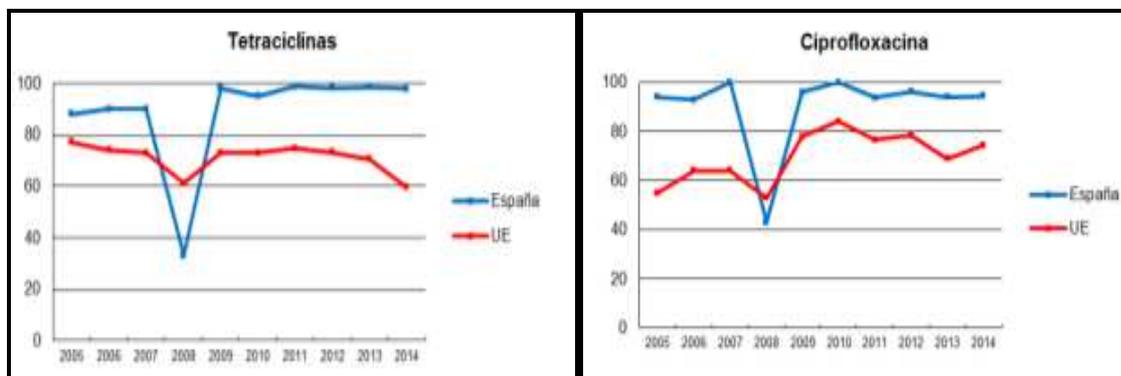


Figura 12. Porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos de *C. coli* obtenidas de pollos de engorde desde 2005 hasta el 2014 (PNRA, 2014)

Por otro lado, España llevo a cabo un programa de vigilancia de zoonosis y resistencia frente a antimicrobianos realizado en pollos de engorde frente a varios microorganismos, incluido *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*). El número de análisis realizado durante los años 2014-2015 ascendió a un total de 500, donde la frecuencia de detección para *C. jejuni* fue de 25,40% (IC_{95%}: 21,64-29,45) y para *C. coli*, de 28,00% (IC_{95%}: 24,10-32,16). En la tabla 3 del apartado Anexo se observa la resistencia mostrada a todas las cepas aisladas de *Campylobacter* durante ese período de tiempo y para los antibióticos eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina, gentamicina, ácido nalidíxico y estreptomina (panel EUCAMP2) (VISAVET, 2015).

5.2 Mecanismos de resistencia para *Campylobacter*

Un número, cada vez mayor, de aislados de *Campylobacter* ha desarrollado resistencias frente a los grupos de antimicrobianos que acabamos de señalar. Además este género bacteriano posee una resistencia intrínseca para penicilinas, la mayoría de cefalosporinas, trimetropina, sulfametoxazol, rifampicina y vancomicina (Fitzgerald et al., 2008).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia de manera simultánea y un antibiótico puede inactivarse por distintos elementos bacterianos. Por ello, es de vital importancia conocer los mecanismos moleculares de resistencia (codificados en el cromosoma o en elementos móviles) y la resistencia natural o intrínseca de las bacterias patógenas, con el objetivo de instaurar pautas antibióticas prudentes y evitar así que estas cepas adquieran una nueva, frente a otro grupo antimicrobiano. En caso contrario, la consecuencia sería el fracaso al no conseguir un tratamiento efectivo, por falta de disponibilidad de agentes terapéuticos, que consiga eliminar el microorganismo bacteriano.

Estos mecanismos moleculares de resistencia se centran fundamentalmente en la inactivación del antibiótico por enzimas, alteraciones en el punto diana o modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana (Tenover et al., 2006). Gracias a la presencia de éstos se puede conocer el fenotipo de la RAM. En la figura 6 del apartado Anexo se puede observar los distintos sitios de acción de diferentes antibióticos.

5.2.1 β -lactámicos

El grupo de los antibióticos β -lactámicos interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano (componente necesario en la formación de la pared bacteriana). Uno de los principales mecanismos de resistencia es la presencia de enzimas, β -lactamasas (bla), que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo β -lactámico en el espacio periplásmico, inactivando así a los antibióticos y evitando que se produzca cualquier efecto. Estas enzimas se clasifican en β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) o de espectro extendido (BLEE). Atendiendo a la posición genómica dentro del organismo pueden ser cromosómicas o plasmídicas.

Se pueden encontrar principalmente dos sistemas de clasificación para las enzimas β -lactamasas:

- ~ Ambler (1980) desarrolló un sistema basado en la estructura molecular de las β -lactamasas y su secuencia de aminoácidos. La clasificación molecular reconoce cuatro tipos: A, B, C y D. Todos menos el grupo B, incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa.
- ~ Bush et al. (1995) describieron un sistema que hacía referencia a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición, para ello definieron cuatro grupos (1, 2, 3 y 4). El grupo 2 incluye 6 subgrupos que se definen de acuerdo a la hidrólisis generada de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producida por las penicilinasas.

El número de β -lactamasas actualmente descrito es muy elevado y sigue incrementándose de manera continua (Lahey et al., 2011). Las familias más comunes de enterobacterias que codifican estas enzimas son: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{GES} (Mosquito et al., 2011). Se ha descrito una creciente importancia clínica en la F^a *Enterobacteriaceae* de *bla*_{TEM} que afecta a las cefalosporinas de 3^a y 4^a generación. Además, las β -lactamasas plasmídicas de

las bacterias Gram negativas producen un alto nivel de resistencias y se encuentran muy extendidas entre esta familia dada la capacidad de transferirse entre bacterias de la misma especie o entre de distintas especies y géneros.

Entre todas ellas destaca la *bla*_{OXA}, más concretamente *bla*_{OXA61}, que según diferentes estudios es la más representativa para las cepas de *Campylobacter* (Alfredson y Korolik, 2005; Obeng et al., 2012), además de encontrarse también en *Pseudomonas aeruginosa*. Según la clasificación descrita por Ambler, el grupo OXA (BLEE) pertenece al grupo D (oxacilinasas). Este grupo se encuentra poco inhibido por el ácido clavulánico (Bush et al., 1995) y generalmente tiene preferencia por la oxacilina (Ledent et al., 1993). Las oxacilinasas pueden estar en el cromosoma aunque la mayoría de ellas se observan en plásmidos o integrones para facilitar su diseminación (Helfand y Bonomo, 2003). Según Bush et al. (1995) le corresponde el grupo funcional 2d diferenciándose así de las enzimas *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}. Diversos autores han demostrado que la producción de β-lactamasas en *C. jejuni* está asociada a la resistencia frente a oxacilina, cloxacilina, meticilina, ureido, aminopenicilina, ampicilina y amoxicilina (Fleming et al., 1982; Philippon et al., 1997). Lachance et al. (1991) ratificaron que la producción de esta enzima en *C. jejuni* estaba relacionada con la resistencia aunque no conocían su mecanismo para *Campylobacter*. Otros estudios describieron a *bla*_{OXA61} como responsable de producir resistencia frente a ampicilina, penicilina y carbenicilina (Alfredson et al., 2005).

5.2. 2 Quinolonas (fluoroquinolonas)

Las quinolonas se clasifican, según su estructura y espectro de actividad, en cuatro generaciones. La primera quinolona descrita fue el ácido nalidíxico. Una modificación en la posición 6 de la molécula por la adición de un átomo de flúor dio lugar a las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas (norfloxacin). Más tarde, se descubrieron los fármacos ciprofloxacino y enrofloxacin que poseían la ventaja de ser más activos frente a las bacterias Gram positivas (Dougherty et al., 2001). Además, se dispone de otras quinolonas de generaciones posteriores como el moxifloxacino, gemifloxacino o el gatifloxacino.

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la acción de las enzimas ADN topoisomerasa tipo II (ADN girasa) y ADN topoisomerasa tipo IV, impidiendo la replicación del ADN. Estas dos enzimas actúan conjuntamente en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN.

La ADN girasa (principal blanco de las bacterias Gram negativas) es una enzima dependiente de ATP, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*, y cuya finalidad es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN. En cambio, la ADN topoisomerasa IV (blanco de las Gram positivas) se encuentra codificada por los genes *parC* y *parE*, y participa activamente en la separación de los dos cromosomas originados en la mitosis bacteriana (Levine et al., 1998; Jacoby, 2005; Alfredson y Korolik, 2007) El G^o *Campylobacter* carece de esta última enzima, siendo sus funciones realizadas por la ADN girasa (Piddock et al., 2003).

En el interior de la secuencia de aminoácidos de las girasas o topoisomerasas existe una región denominada QRDR (Región Determinante de Resistencia a

Quinolonas) localizada entre los aminoácidos 67-106 en bacterias Gram negativas (zona aminoterminal). Es en esta región donde se produce el efecto de las quinolonas provocando la muerte celular. El tamaño de la misma en la especie *C. jejuni* es variable y según algunos autores oscila desde los codones 38-126 (Piddock et al., 2003) o entre los codones 54-126 (Larkin et al., 2006).

El principal mecanismo molecular de resistencia frente a las quinolonas para *Campylobacter* son las mutaciones presentes en las regiones QRDR del gen *gyrA*, dado que no existen mutaciones en la DNA *gyrB* de esta bacteria (Payot et al., 2002). Una única mutación en esta región es suficiente para conferir un fenotipo resistente frente a las fluoroquinolonas en *C. jejuni* y *C. coli* (Payot et al., 2006; Luangtongkum et al., 2009; Wiczorek y Osek, 2013). La mutación más frecuente y que proporciona mayores valores de CMI, para quinolonas y fluoroquinolonas, es la detectada en este gen en la posición C257T, que conduce a la sustitución en el aminoácido 86 de una treonina por una isoleucina (Wang et al., 1993; Payot et al., 2006; Kinana et al., 2007) (ver Anexo, código de los aminoácidos, tabla 5). Se han detectado mutaciones fuera de la región QRDR, en cepas sensibles a *Campylobacter*, cuya resistencia a quinolonas ha sido difícil de evaluar (Jesse et al., 2006). En la tabla 10 se reflejan las mutaciones encontradas en esta región y fuera de ella.

Tabla 10. Mutaciones más frecuentes presentes en la región QRDR del gen *gyrA* en *Campylobacter*

Possible mutación	Referencia bibliográfica
Ser22Gly	Ge et al., 2003
Ala70Thr	Wang et al., 1993
Thr86Ile	Wang et al., 1993
Thr86Ala	Wang et al., 1993
Thr86Lys	Wang et al., 1993
Thr86Val	Piddock et al., 2003
Ala87Pro	Bachoual et al., 2001
Asp90His	Bachoual et al., 2001
Asp90Tyr	Bachoual et al., 2001
Asp90Asn	Ge et al., 2003
Pro104Ser	Ge et al., 2005
Val106Ile	Piddock et al., 2003
Val149Ile	Ge et al., 2003
Asn203Ser	Ge et al., 2003
Ala206Thr	Ge et al., 2003
Arg285Lys	Tang et al., 2017

Además de las mutaciones presentes en el gen *gyrA*, se ha descrito la bomba de expulsión activa multidroga (CmeABC) como el principal mecanismo de eflujo que causa resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos (Pumbwe y Piddock, 2002; Pumbwe et al., 2004). La bomba CmeABC está codificada por un operón que

engloba a tres genes (*cmeA*, *cmeB* y *cmeC*), los cuales a su vez codifican para una proteína de fusión periplásmica, un fármaco transportador interno de membrana y una proteína de membrana externa, respectivamente (Lin et al., 2002).

Se conocen dos bombas de eflujo, CmeABC y CmeDEF, en *C. jejuni* y *C. coli* (Ge et al., 2005). La bomba CmeABC es la más común y trabaja sinérgicamente con el gen *gyrA* para medir la resistencia frente a las fluoroquinolonas (Luo et al., 2003). La sobreexpresión de esta bomba aumenta la frecuencia de aparición de cepas resistentes a estos fármacos debido a un aumento observado en su CMI por la expulsión de las quinolonas. Se ha llegado a esta conclusión ya que la inactivación de la bomba de eflujo CmeABC, mediante la inactivación del gen *CmeB*, conduce a una mayor susceptibilidad frente a diferentes antibióticos, demostrando que ésta desempeña un papel importante en la resistencia adquirida en *Campylobacter* (Lin et al., 2002; Akiba et al., 2005). Cabe mencionar que todos los determinantes de resistencia a fluoroquinolonas conocidos en *Campylobacter* se codifican en el cromosoma. La resistencia mediada por plásmidos, como las proteínas *qnr*, no se han descrito hasta la fecha en esta bacteria (Payot et al., 2006; Luangtongkum et al., 2009).

5.2.3 Macrólidos y lincosamidas

Generalmente suele englobarse a los macrólidos junto a otros antibióticos como lincosamidas, ketólidos, streptogramina u oxazolidinona. Esta combinación hace que a este grupo se le denomine como MLKSO, ya que todos ellos actúan de manera similar, uniéndose a sitios comunes en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Roberts, 2008). Los macrólidos son compuestos que se caracterizan por tener un anillo lactónico macrocíclico al que se unen diversos deoxiazúcares. Las diferentes sustituciones de este anillo han dado lugar a varios macrólidos de 14 (eritromicina), 15 (azitromicina) y 16 átomos (tilosina) (Almaraz et al., 1995). Del grupo de las lincosamidas, se destaca a la lincomicina por su relevancia en el sector avícola, la cual difiere de la clindamicina por disponer de un grupo hidroxilo en lugar de un átomo de cloro.

En la subunidad 50S existe una estructura en forma de túnel constituida por zonas del RNA (regiones V) y hélices beta de dos proteínas ribosómicas llamadas L4 y L22. Esta subunidad permite el paso de los péptidos sintetizados hacia fuera del ribosoma y es en este punto donde actúan dichos fármacos, provocando un cambio conformacional que termina con la elongación de la cadena polipeptídica, inhibiendo la traslocación del ribosoma bacteriano o separando el complejo peptidil-ARNt del ribosoma. Generalmente se trata de fármacos bacteriostáticos aunque dependiendo de su dosis pueden tener un efecto bactericida (Tenson et al., 2003; Poehlsgaard y Douthwaite, 2005).

El principal mecanismo de resistencia a macrólidos se debe a mutaciones presentes en el gen *rnm* que codifica para el 23S rRNA. Se trata del mecanismo que genera valores mayores de CMI, por lo general superiores a 128 mg/l. La mutación más frecuente en cepas de *C. jejuni* o *C. coli* tiene lugar en el nucleótido 2075 del dominio V de este gen (A2075G), también ha sido descrita en otras especies bacterianas como *Helicobacter pylori* o *Staphylococcus aureus*. Se puede observar otra mutación en el nucleótido 2074 del dominio V (A2074C o

A2074G), o en genes que codifican para las proteínas ribosomales L4 y L22, con una detección que estaría relacionada con pequeñas resistencias frente a estos antibióticos (Gibreel y Taylor, 2006; Pérez-Boto et al., 2010). Ambas especies bacterianas de *Campylobacter* poseen tres copias del gen 23S rRNA, por lo que una mutación presente en este gen, asociada a una resistencia frente a macrólidos, estará presente como mínimo en dos de las tres copias. Algunas mutaciones menos frecuentes, como A2074T, no presentan mutaciones en todas ellas (Vacher et al., 2005).

Por otra parte, la activación de bombas de eflujo, como la CmABC, es otro mecanismo a tener en cuenta debido a las resistencias que genera frente a *Campylobacter*. Aunque esta bomba actúa de manera inespecífica, parece tener un mayor efecto sobre la resistencia a macrólidos frente a quinolonas (Payot et al., 2005). Además, puede generar resistencia por sí sola o combinada de manera sinérgica con los otros tipos de resistencia que acabamos de mencionar. Wieczorek y Osek (2013) encontraron cepas con resistencia a *Campylobacter* con mutaciones en las posiciones 2074 y 2075 del dominio V del gen 23S rRNA en las que, tras la inactivación de la bomba de eflujo CmABC, se redujo entre 2 y 4 veces la resistencia al macrólido eritromicina. También se han descrito bombas de eflujo tanto selectivas como inespecíficas para el grupo MLSKO (Roberts, 2008).

A pesar de encontrar numerosas formas de resistencias para el grupo de los macrólidos, éstos poseen una frecuencia de aparición 1000 veces menor que para las quinolonas (Luangtongkum et al., 2009).

Además, de los mecanismos de resistencia anteriormente nombrados para el antibiótico lincomicina, existen otros genes ligados a enzimas ribosómicas (nucleotidiltransferasas) tales como *Inu* (C), el cual se detectó por primera vez en la especie bacteriana *Streptococcus agalactiae* o en *Campylobacter* (Achard et al., 2005; Zhao et al., 2015), y el gen *Inu* (B), encontrado en un aislado clínico procedente de la enterobacteria *Enterococcus faecium* (Bozdogan et al., 1999).

5.2.4 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son una familia de antibióticos de amplio espectro y sin la necesidad de modificaciones secundarias. Poseen una estructura química tetracíclica básica formada por cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes. La primera tetraciclina fue descubierta en el año 1948.

El mecanismo de acción consisten en la unión al sitio A de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, evitando así la unión del aminoacil-tRNA en esta posición (Chopra y Roberts, 2001). Son moléculas de tipo bacteriostático debido a que impiden la síntesis de proteínas y para actuar necesitan atravesar porinas de la bacteria unidas a un ión Mg^{2+} .

Una vez conocido el mecanismo de acción de esta familia, se detallarán los mecanismos de resistencia. Éstos constan mayoritariamente de bombas eflujo (fundamentalmente en el cromosoma), síntesis de proteínas de protección ribosomal (PPR) y acción enzimática sobre las tetraciclinas (Roberts, 2005). Las PPR más relevantes son *tet* (M) y *tet* (O), estos genes están presentes en múltiples géneros bacterianos (Thaker et al., 2010), aunque también se pueden encontrar *tet*

(S), *tet* (Q), *tet* (T), *tet* (P), *otrA* (oxitetraciclina) (Taylor y Chau, 1996; Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

El gen *tet* (O) que codifica para dicha PPR, *tet* (O), es el mecanismo responsable de la resistencia a tetraciclinas para *Campylobacter*. Originalmente se describió en *C. jejuni* (Taylor et al., 1987) y en *C. coli* (Sougakoff et al., 1987). Este gen se puede localizar en elementos móviles (plásmidos conjugativos y plásmidos no conjugativos) o integrado en el cromosoma (menos frecuente) (Avrain et al., 2004). Cabe mencionar que no se han encontrado otros genes de resistencia *tet* en *Campylobacter* (Luangtongkum et al., 2009). Además, Brown y Roberts (1991) encontraron el gen *tet* (O) en especies estreptocócicas. Por otra parte, no parece existir una relación entre la presencia y la localización del gen y el valor de CMI frente a las tetraciclinas.

El gen *tet* (O) localizado en plásmidos le confiere una alta capacidad de expansión (Pratt y Korolik, 2005). Además, la transferencia de este elemento móvil se realiza muy rápidamente, obteniéndose altas frecuencias en cepas de *Campylobacter*, aunque siempre dependerán de la especie bacteriana y del origen de la misma (Lee et al., 1994). El tamaño (30-58 Kb) y el contenido génico de todos los plásmidos son muy homogéneos. El más estudiado en *C. jejuni* es pTet, en cambio en *C. coli* es pCC31, ambos poseen tan solo un 6% de variabilidad en las secuencias de ADN (Batchelor et al., 2004). La presencia de este gen en dicho patógeno suele correlacionarse con altos valores de CMI para tetraciclinas.

Al igual que ocurre para macrólidos y quinolonas, la bomba de eflujo no selectiva para tetraciclinas (CmeABC) parece estar relacionada con los valores de CMI. Una sobreexpresión de esta bomba puede inducir resistencia en aquellas cepas que no tengan presente el gen *tet* (O) ni en el cromosoma ni en plásmidos, observándose valores de CMI más bajos que si estuviera presente dicho gen (Pidcock et al., 2008).

III. Justificación

La protección de la salud humana frente a las zoonosis presentes en nuestro planeta es un reto de gran importancia para todos los organismos de Salud Pública encargados del control de la seguridad alimentaria.

Actualmente, *Campylobacter* continúa siendo una de las principales preocupaciones a nivel mundial debido al elevado número de casos en el hombre y al alto impacto económico en personal sanitario y gastos de hospitalización. Se debe intentar reducir la cifra de los 24 billones de euros anuales que estimó la EFSA en el 2011.

El objetivo que nos marcó hace unos años el Reglamento (CE) No 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos, se centró en reducir la prevalencia de los microorganismos causantes, como *Campylobacter*, de la mayor parte de los casos de zoonosis en humanos. Sin embargo, las medidas aplicadas para el control de *Salmonella* se han mostrado poco eficaces para *Campylobacter* debido a las diferencias que presentan ambos géneros.

La principal fuente de infección para el hombre es el consumo de carne de pollo contaminada con *Campylobacter*. Pero ¿cómo podemos combatir a este patógeno emergente?. Diferentes estudios han demostrado que la eliminación de *Campylobacter* en mataderos y plantas de procesado es una estrategia de control poco eficiente, por lo que se tiene que remontar a eslabones anteriores de la cadena productiva.

La EFSA emitió un informe científico en el que se constataba que disminuyendo la contaminación en la explotación se conseguiría una reducción notable del riesgo para la Salud Pública. Se tiene que reducir la alta prevalencia, sobre todo en época estival, de los lotes de pollos infectados principalmente por *C. jejuni* y, en menor medida, por *C. coli*. Por esta razón, es primordial conocer aspectos de colonización, comportamiento, resistencia en el ambiente o procesos de interacción entre esta bacteria con la flora intestinal de las aves.

Nuestro enfoque se centra en el desarrollo de metodologías rápidas y fiables basadas en la biología molecular, con el fin de permitir el control de la campilobacteriosis en diversos tipos de muestras para las que, hasta el momento, no se dispone de métodos normalizados, bien porque son emergentes o porque no hay estudios exhaustivos para las mismas (organismos sensibles a las condiciones ambientales o de difícil cultivo).

Además, no existe todavía en Europa una obligatoriedad en la comunicación de casos de campilobacteriosis humana, ni unas directrices comunes en cuanto a la metodología a emplear. Tampoco disponemos de datos epidemiológicos suficientes para proporcionar una evaluación precisa de *Campylobacter* en África, Asia, América Central y del Sur.

Gracias al descubrimiento de los antibióticos a principios del siglo XX se ha podido hacer frente a las infecciones bacterianas implicadas en la salud humana y animal. En las últimas décadas, debido al uso excesivo o inadecuado de los mismos, se ha observado un aumento progresivo en el número de bacterias resistentes a la acción de estos fármacos como ya se ha mencionado.

Desde la Decisión de la Ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (Decisión 652/2013), en sintonía con la Directiva 2003/99/CE, los EM han de cerciorarse de que la vigilancia arroje datos comparables sobre la aparición de resistencia a los antibióticos de los agentes zoonóticos. El desarrollo de estas resistencias se presenta como uno de los mayores problemas especialmente por la escasez de tratamientos alternativos y la aparición de bacterias multirresistentes.

Si las bacterias patógenas, tales como *C. jejuni* o *C. coli*, adquieren en su genoma genes de resistencia a los antibióticos más frecuentemente empleados en las explotaciones avícolas de carne, podrían transmitirlos a su descendencia mediante transferencia genética horizontal, con el consiguiente problema que ello conllevaría.

Para concluir con la justificación de este Trabajo, con todos estos antecedentes, la infección producida por *Campylobacter* seguirá siendo, muy probablemente, una enfermedad infecciosa importante que desafiará la Salud Pública en los próximos años.

IV. Objetivos

1. Realizar un estudio epidemiológico longitudinal retrospectivo para observar el momento de infección por *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*) y poder establecer cuáles han sido los factores de riesgo presentes en crianzas consecutivas de pollos de engorde.
 - ~ Puesta a punto y comparación de técnicas de PCR a tiempo real mediante kits comerciales basados en sondas *Molecular Beacons* y otros desarrollados *in house* con el fluoróforo *SYBR Green I* para la detección de *Campylobacter*.
 - ~ Comparación de métodos de cultivo comerciales para este género bacteriano.
 - ~ Implementación de una técnica novedosa de diagnóstico rápido y fiable, para la detección conjunta e individual de *C. jejuni* y *C. coli* mediante la amplificación isotérmica mediada por asa o LAMP.

Desarrollo de un sistema revelador colorimétrico capaz de observar a simple vista la reacción producida sin necesidad de utilizar un termociclador y aparato de electroforesis.
2. Realizar un estudio antimicrobiano basado en:
 - ~ El análisis de la sensibilidad bacteriana de todas las cepas aisladas de *C. jejuni* y *C. coli* mediante la técnica de microdiluciones (BDM).
 - ~ La determinación de genes de resistencia, por técnicas de PCR y secuenciación, de los grupos de antibióticos más frecuentes en pollos, realizando además un análisis comparativo entre resultados de ambas técnicas.
3. Realizar un estudio de secuenciación masiva microbiano experimental de un tratamiento preventivo mediante la adición de un pienso complementario líquido en el agua de bebida, con el objetivo de evaluar la variabilidad poblacional dentro de los individuos, estudiar los posibles patógenos causantes de zoonosis potenciales y evaluar el efecto del Vitaid sobre ellos.

V. Material y métodos

*1. Estudio de *Campylobacter* a partir de calzas*

1.1 Explotación ganadera

El estudio se realizó en la explotación ganadera avícola, integrada dentro del grupo SADA (Nutreco), que se encuentra ubicada en el sur de Aragón, provincia de Teruel, y dentro del municipio de La Puebla de Valverde (ver Anexo, figura 7).

Se trata de una explotación autorizada para la cría y engorde de pollos según Resolución de 18 de octubre de 2011, del Instituto Aragonés de Gestión Ambiental por la que se formula declaración de impacto ambiental y se otorga autorización ambiental integrada para la instalación de una explotación avícola con capacidad para 550.800 pollos de engorde, a ubicar en el polígono 41 parcela 92 y polígono 42 parcela 34 del término municipal de La Puebla de Valverde (Teruel), y promovida por la sociedad Montes del Palancia, S.L. (N.º Expte. INAGA 500301/02/2011/00807) recogido en el BOA n° 223. La localización geográfica de la explotación se puede observar en el apartado Anexo y su código de explotación es el ES 441920000807.

Esta explotación consta de 17 naves, distribuidas en tres núcleos con 5, 7 y 5 naves respectivamente. Las dimensiones de cada una son de 120 metros de largo por 15 metros de ancho, pudiendo albergar cada nave a unos 32.400 pollos aproximadamente. La gran mayoría de las naves son mixtas pero en función de la pollada podemos encontrar alguna exclusivamente de hembras. Cada núcleo se encuentra separado del resto por campos de cultivo de carrasacas micorrizadas.

En cada núcleo están instauradas numerosas y estrictas normas de bioseguridad que intentan evitar la entrada de agentes biológicos nocivos para la salud de los animales, entre las que se destacan: una zona de vestuarios, ropa de trabajo de uso exclusivo para cada núcleo, pediluvios a la entrada de cada nave, vallado perimetral y arco de desinfección.

La genética de las aves presentes en la explotación ganadera fue *Gallus gallus*, mayoritariamente individuos Ross 308, aunque también había tipo Cobb 500.

1.2 Toma de muestras

La realización de los muestreos se llevó a cabo durante crianzas consecutivas de broilers a lo largo del año 2016. Aproximadamente, al décimo día de vida de los pollos, se realizó un muestreo homogéneo y representativo en cada una de las naves, con un equipo completo de bioseguridad y dos pares de calzas en cada pie. Los muestreos se realizaron todas las semanas hasta que las naves mostraron un resultado positivo frente a *Campylobacter* o se completó el ciclo productivo de los pollos (menos de 50 días).

Cada pareja de calzas se encontraba humedecida con agua de triptona o suero salino estéril, dentro de una bolsa esterilizada, con una pareja de guantes y unas calzas de plástico. Estas últimas calzas, se colocaron en el interior de cada nave para evitar introducir *Campylobacter* de fuera de ellas, y sobre éstas, se pusieron las calzas absorbentes para intentar recoger los posibles *Campylobacter* patógenos que hubiera en la cama de los pollos. El muestreo se realizó de manera representativa en el interior de cada nave (se dividió en 4 sectores) retirándose una calza de cada pie a medida que se avanzaba por ella. Este material, empleado en nuestro estudio, cumple con la normativa ISO 9001, y fue suministrado por el laboratorio SodiBox (Nevez, Francia) (ver Anexo, tabla 6).

Las muestras se tomaron por duplicado con la finalidad de comparar los resultados obtenidos por dos laboratorios distintos. Para ello, se transportaron 2 pares de calzas en una caja de poliestireno expandido con bloques de hielo enfriadores que mantenían, en todo momento, las muestras a 4 °C para evitar la proliferación de microorganismos.

Un lote se remitió al laboratorio del grupo SADA (Nutreco) y el otro se transportó al laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (ver Anexo, tabla 7).

Las naves que no se muestrearon se definieron con la abreviatura NR (no recibido). Las causas por las cuales no se tomaron calzas y por tanto no se procesaron fueron las siguientes:

- ❖ Nave con pollos de edad temprana (inferior a 12 días).
- ❖ Nave en período de supresión. Se denomina así a aquella nave que tiene un problema infeccioso, normalmente a causa de una onfalitis en los primeros días de vida de los pollitos y puntualmente por alguna disbiosis intestinal. En el momento del muestreo, los pollos estaban recibiendo tratamiento antibiótico por estos motivos o se encontraban en un período de retirada.
- ❖ Nave con un resultado positivo en la semana anterior.
- ❖ Nave cuyos animales han sido enviados a matadero.

1.3 Laboratorio grupo SADA (Nutreco)

Este laboratorio se encargó de realizar los siguientes pasos, después de la recepción de la calzas, tal y como se observa en el diagrama de flujo que se presenta:

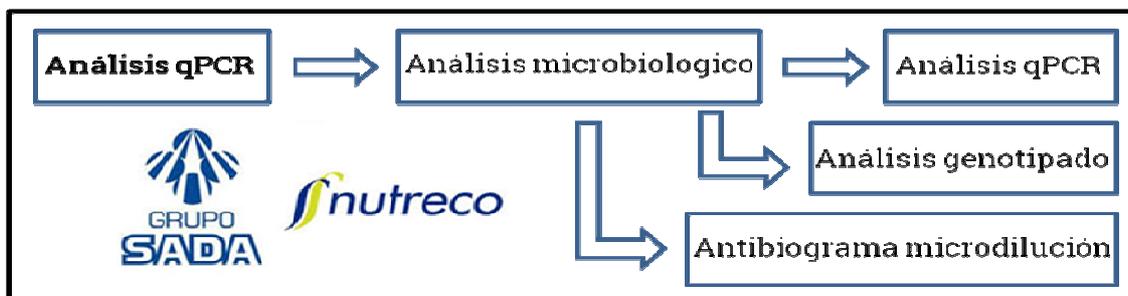


Figura 13. Diagrama de flujo sobre las actividades realizadas por el laboratorio del grupo SADA (Nutreco)

1.3.1 Análisis qPCR¹

Tras la recepción de las calzas estas se pre-enriquecieron con peptona comercial de Bio-Rad (Madrid, España), se adicionó 225 ml por cada pareja de calzas durante 45 minutos a T^a ambiente.

A continuación, se realizó la extracción del DNA y posterior realización del análisis de qPCR para *Campylobacter*, siguiendo las indicaciones del fabricante de la casa comercial Bio-Rad cuyo kit fue iQ-Check® *Campylobacter* PCR detection kit (ver Anexo, protocolos).

La realización de esta PCR requirió de un termociclador capaz de leer en 2 canales de manera simultánea, para ello se empleó el aparato Mx3000P® QPCR System (Stratagene). El canal FAM detectó la presencia de *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*), y el canal VIC/HEX se reservó para el control interno. El fluoróforo empleado estaba constituido por un par de sondas de *molecular beacons*.

El protocolo de esta PCR a tiempo real consistió en un primer paso a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. El volumen final de la reacción fue de 50 µl, de los cuales 45 µl, correspondieron a la solución de amplificación y a las sondas fluorescentes. Los otros 5 µl restantes procedieron del DNA, control negativo o control positivo según el pocillo que conformaba la placa de qPCR (tabla 11).

Tabla 11. Características de la técnica qPCR iQ-Chek™ *Campylobacter* PCR detection kit

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
iQ-Chek™ <i>Campylobacter</i> PCR detection kit				
		Política de privacidad		357-8135

Leyenda: Pares de bases (pb)

1.3.2 Análisis microbiológico

El siguiente paso a realizar consistió en sembrar directamente aquellas muestras que dieron un resultado positivo por la técnica de qPCR de Bio-Rad. Previamente, se homogeneizaron las calzas con la peptona, y se sembraron 300 y 100 µl en dos placas de medio de cultivo CASA® de la casa comercial *bioMérieux* (Marcy-l'Étoile, Francia), se trata de un medio selectivo, cromogénico, para el crecimiento de bacterias del género *Campylobacter*. Ambas placas por muestra se incubaron en condiciones de microaerofilia a 41,5 °C durante 48 horas.

Por otra parte, las bolsas de plástico unido a los clips, así como los generadores de la atmósfera de microaerofilia, procedían de la casa comercial *bioMérieux*.

Posteriormente, se realizó una confirmación sobre las colonias de color rojo presentes en este agar, que aparecieron a las 24-48 horas, mediante el test de aglutinación en látex, Microgen® *Campylobacter* de la casa comercial Microgen Bioproducts Ltd (Camberley, UK). En caso de presentar un resultado positivo a *Campylobacter*, se resembraron por agotamiento en agar sangre Columbia + 5%

de sangre de cordero de la casa comercial *bioMérieux* y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, en condiciones de microaerofilia.

1.3.3 Análisis qPCR²

Una vez establecida la presencia de este patógeno en las calzas tomadas en la explotación, se procedió a realizar otra extracción del DNA procedente de estas mismas muestras para conocer la especie de *Campylobacter* presente en ellas. Para ello, se empleó el kit Foodproof®*Campylobacter* Quantification Kit-5'Nuclease- de la casa comercial Biotecon Diagnostics (Potsdam, Alemania).

Este protocolo de PCR a tiempo real consistió en una pre-incubación a 37 °C durante 4 minutos seguida de otro paso a 95 °C durante 5 minutos. Después, tuvo lugar una amplificación de 50 ciclos con el siguiente protocolo, 95 °C durante 5 segundos y 1 minuto a 60 °C.

El volumen final de la reacción fue de 25 µl, de los cuales 20 µl fueron de la mezcla de PCR y 5 µl corresponden al DNA. La mezcla estaba compuesta por 18 µl de *master mix*, 1 µl de enzima y 1 µl de control interno. Para el control negativo se añadieron 5 µl de agua libre de nucleasas (NFW) y para el control positivo 5 µl.

Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador capaz de leer en 4 canales de manera simultánea. El canal FAM se empleó para los *Campylobacter* spp. termotolerantes (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*), el canal ROX sirvió para detectar específicamente *C. jejuni*, el canal Cy5 se utilizó para detectar solamente *C. coli* y el canal VIC/HEX se reservó para el control interno. El termociclador que se utilizó en esta ocasión también fue el Mx3000P® QPCR System (Stratagene) (tabla 12).

Tabla 12. Características de la qPCR Foodproof®*Campylobacter* Quantification Kit

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
Foodproof® <i>Campylobacter</i> Quantification Kit		Política de privacidad		R30205

Leyenda: Pares de bases (pb)

1.3.4 Análisis de genotipado

Transcurridas las 24 horas de incubación, se enviaron las placas de agar sangre con crecimiento positivo a *Campylobacter*, al laboratorio Ainia, centro tecnológico. La metodología empleada se puede observar en el apartado Anexo.

Este análisis se realizó para identificar individualmente y caracterizar genéticamente todos los aislados obtenidos durante el estudio (*C. jejuni* o *C. coli*), mediante la técnica Rep-PCR establecida según las directrices del laboratorio.

1.3.5 Antibiograma por el método BDM

A partir de una placa de agar sangre con crecimiento bacteriano positivo frente a *Campylobacter* (*C. jejuni* o *C. coli*), se llevó a cabo un estudio para calcular la sensibilidad que presentaba cada aislado, mediante la técnica de microdiluciones y para 21 antibióticos distintos, todos ellos presentes en una

placa de 96 pocillos de tipo plano, suministrada por el kit comercial AviPro® PLATE de Lohman Animal Health (Cuxhaven, Alemania).

La preparación previa a la realización del antibiograma en placa consistió en adicionar sangre de caballo desfibrinada al 2% a 10 ml de caldo Mueller Hinton (MH) II, ajustado con cationes, de la casa comercial Sigma-Aldrich (Misuri, EE. UU.). Por otra parte, se preparó una solución de 5 ml de NaCl al 0,9% para inocular *Campylobacter*, directamente de la placa de agar sangre, hasta conseguir una densidad óptica de escala Mc Farland 1,5. Después, se pipetearon 50 µl de esta solución al caldo MH con la sangre y de esta solución previamente homogeneizada, se añadieron 100 µl a cada uno de los pocillos de la placa de este kit. Cada placa se introdujo en una bolsa de plástico con su correspondiente clip así como su generador de las condiciones de microaerofilia y se incubaron durante 30 horas a 41,5 °C.

La gran mayoría de los antibióticos disponibles en este kit se pueden encontrar en diferentes concentraciones en cada uno de los pocillos. También hallamos algunos antibióticos con concentración única tal y como se plasma en la tabla 13. Cabe destacar que con estas placas, solamente se pueden realizar dos antibiogramas simultáneos y que en cada una de ellas se reserva un pocillo para un control positivo a *C. jejuni* (ATCC 33560).

Tabla 13. Placa del kit AviPro® PLATE para *Campylobacter*

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	A	PEN 2	AMX 16	ENR 2	CET 2	TET 8	TILM 16	LIS 8/32	OXA 2	ERY 4	DOX 2	DOX 4	DOX 8
	B	PEN 0,5	AMX 4	ENR 1	CPP 4	TET 4	TILM 8	T/S 2/38	OXA 0,25	ERY 1	TIA 16	ERD 30	STRE 200
	C	PEN 0,25	AMX 4	ENR 0,5	CTX 1	TET 2	NEO 16	T/S 1/19	COL 4	ERY 0,5	TIA 8	ERD 20	RAM 50
	D	PEN 0,125	AMX 2	ENR 0,25	TLS 0,5	TLS 1,0	NEO 8	T/S 0,5/9,5	COL 2	ERY 0,25	LIN 4	ERD 10	C+
2	E	PEN 2	AMX 16	ENR 2	CET 2	TET 8	TILM 16	LIS 8/32	OXA 2	ERY 4	DOX 2	DOX 4	DOX 8
	F	PEN 0,5	AMX 4	ENR 1	CPP 4	TET 4	TILM 8	T/S 2/38	OXA 0,25	ERY 1	TIA 16	ERD 30	STRE 200
	G	PEN 0,25	AMX 4	ENR 0,5	CTX 1	TET 2	NEO 16	T/S 1/19	COL 4	ERY 0,5	TIA 8	ERD 20	RAM 50
	H	PEN 0,125	AMX 2	ENR 0,25	TLS 0,5	TLS 1,0	NEO 8	T/S 0,5/9,5	COL 2	ERY 0,25	LIN 4	ERD 10	C+

Leyenda: AMX (amoxicilina), CET (ceftiofur), CPP (cefepodoxima proxetil), CTX (cefotaxima), CST (colistina), ENR (enrofloxacino), ERY (eritromicina), ERD (eritromicina que discierne Salmonella de campo frente a la empleada en las vacunas vivas de Lohmann), LIN (lincomicina), LIS (lincospectina/espectinomicina), NEO (neomicina), OXA (oxacilina), PEN (penicilina G), RAM (rifampicina), DOX (doxiciclina), STRE (estreptomina), TET (tetraciclina), TIA (tiamulina), TILM (tilmicosina), T/S (sulfametoxazol/trimetropima), TLS (tilosina), C+ (cultivo puro *C. jejuni* ATCC 33560)

1.4 Laboratorio de Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.

El laboratorio de Enfermedades Infecciosas con la colaboración de Alquizvetek S.L. realizaron los siguientes pasos, después de la recepción de la calzas, tal y como se plasma en el diagrama de flujo que se presenta a continuación:

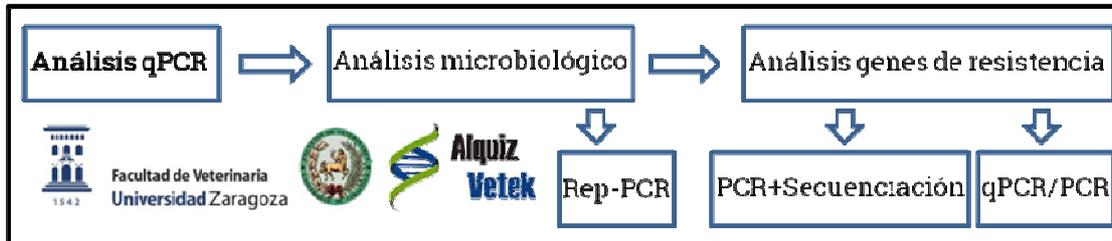


Figura 14. Diagrama de flujo sobre las actividades realizadas por el laboratorio de Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.

1.4.1 Análisis qPCR

Tras la recepción de las muestras semanales en el laboratorio, se procedió a adicionar 225 ml de peptona bacteriológica al 1% de la casa comercial Oxoid (Madrid, España) por cada par de calzas, durante 45 minutos a T^a ambiente y en una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

A continuación, se homogenizaron las muestras y se pipeteó un volumen de 300 µl para proceder a la realización de la extracción del DNA total según las instrucciones del fabricante del kit *Genomic DNA from blood* de la casa Macherey Nagel (Düren, Alemania, ver Anexo). Se utilizó este kit diagnóstico por las experiencias previas que habíamos tenido con él. Posteriormente, se comprobó la calidad de la extracción midiendo su pureza, según el ratio A260/A280, y también la concentración a una densidad óptica (DO) de A260 nm, para cada muestra. Estas mediciones se realizaron con un aparato BioDrop Ltd (Cambridge, UK).

Una vez obtenido el DNA total de las calzas se realizaron dos reacciones de 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.

Es imprescindible realizar comprobaciones *in vitro* para observar la eficiencia de los cebadores, comprobando su sensibilidad y especificidad mediante el empleo de cepas procedentes de *Campylobacter*, tanto de *C. jejuni* como de *C. coli*. Estos análisis se realizaron previamente a la realización de las qPCR sobre las muestras tomadas en la explotación.

Para ello, a partir de un cultivo puro de agar sangre de Oxoid, se tomó un inóculo bacteriano de estas dos bacterias, con una DO de 0,100 aproximadamente, medida a 600 nm en el espectrofotómetro de Bio-Rad SmartSpecTMPlus Spectrophotometer (Madrid, España), y equivalente a una escala de *McFarland* alrededor de 0,5.

Se realizaron diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷. A partir de cada una de estas diluciones se pipeteó un volumen de 100 µl y se realizó la extracción del

material genético según el kit, *Genomic DNA from blood*. Paralelamente, a partir de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron otros 100 μ l en agar sangre con el fin de poder asignar un número de UFC reales y acordes con las C_q obtenidas en el termociclador al realizar la curva patrón y para cada uno de los cebadores diseñados. Posteriormente, este dato servirá para extrapolar un valor real de UFC/ml, a cada análisis de campo realizado según su C_q mostrada. Las placas de agar sangre se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones especiales de microaerofilia.

Para validar o evaluar estas pruebas diagnósticas se construyó una tabla de contingencia donde se resumieron los resultados obtenidos al aplicar simultáneamente sobre un grupo de N muestras la prueba de oro y la prueba a evaluar. N fue igual a la suma total de las muestras analizadas (a+b+c+d) (tabla, 14).

Tabla 14. Tabla de contingencia para la evaluación de una prueba diagnóstica

		Método de referencia		
		Positivos	Negativos	Total
Método a evaluar	Positivos	Verdaderos positivos (a)	Falsos Positivos (b)	a+b
	Negativos	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

El diseño e implementación de los cebadores fue exclusivo para la realización de este trabajo, mediante la utilización de diversos programas bioinformáticos como el Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (tabla, 15).

Tabla 15. Características de las técnicas de qPCR realizada en el laboratorio Enfermedades Infecciosas en colaboración con Alquizvetek S.L.

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
qPCR <i>C. jejuni</i>	ATGCAGGACATGCTTTTAAT	hipO	205	Este estudio
	ATCCACAGCTTCATCGTTAT			
qPCR <i>C. coli</i>	CACACATGGAAAAGCATTAA	ceuE	148	Este estudio
	GCAGCGTTGGTTTTAGTTAC			

Leyenda: Pares de bases (pb)

La concentración de los cebadores, *forward* y *reverse*, fue de 0,25 μ mol l⁻¹. El volumen total de las reacciones fue de 20 μ l y el volumen de ADN de 5 μ l. El fluoróforo empleado en estas técnicas fue *SYBR Green I 2X* (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en dos termocicladores de la casa comercial Bio-Rad, uno de ellos fue el termociclador CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System, y el otro fue el MiniOpticon™ RealTime PCR Detection System.

El protocolo de qPCR establecido en ambos casos consistió en un primer paso a 95 °C durante 7 minutos, 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 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). Con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los resultados, se realizó una reacción adicional en cada una de las muestras utilizando como control interno endógeno el gen

housekeeping Actina, además de un control positivo procedente de una cepa de *Campylobacter* y otro negativo mediante NFW.

La realización de las qPCR sobre el DNA extraído de las diluciones seriadas, en el laboratorio de Zaragoza, también se llevó a cabo en el laboratorio del grupo SADA (Nutreco) según el Foodproof® *Campylobacter* Quantification Kit -5'Nuclease- de la casa comercial Bioteccon Diagnostics, siguiendo las instrucciones fijadas en él, cuya finalidad fue observar la eficiencia, sensibilidad y especificidad de otro kit comercial, además de valorar la calidad de la extracción por un kit autorizado por la autoridad competente.

1.4.2 Análisis microbiológico

Cuando las calzas tomadas en las naves mostraron un resultado positivo mediante PCR a tiempo real, se sembraron 300 y 100 µl en dos placas de RAPID' *Campylobacter* Agar + suplemento liofilizado 10 viales QSP (ver Anexo), y se incubaron a 41,5 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. La extensión del líquido se realizó por toda la superficie con el asa de *drigalsky* estéril y de plástico de la casa Deltalab® (Barcelona, España). Para cada par de placas se empleó una bolsa y un sobre generador de microaerofilia, además de un clip de plástico para cada bolsa de la casa comercial de Oxoid.

Transcurrido ese tiempo, en aquellas placas que se observó un crecimiento positivo, con colonias de color rojo ladrillo compatibles con *Campylobacter*, se resebró un colonia por agotamiento en agar sangre durante 24 horas de incubación, a 37 °C y en atmósfera microaerofílica.

A partir de una colonia pura procedente de este agar, se realizó un estudio individual, de alguno de los aislados, a través del empleo de pruebas bioquímicas básicas tales como la oxidasa, catalasa, tinción de Gram, movilidad o hidrólisis del hipurato.

1.4.3 Análisis de genes de resistencia

A partir de una placa de agar sangre con colonias de aspecto similar a *Campylobacter*, se seleccionó una con el asa de siembra estéril y se mezcló en un vial estéril con 500 µl de NFW, después se introdujo en el termobloque durante 10 minutos a 96 °C. Una vez finalizado este tiempo, se homogeneizó el tubo en un vortex y se centrifugó 2 segundos a 400 × *g*. De esta manera se realizó la extracción del DNA bacteriano.

Se realizó una qPCR dúplex individual para averiguar la especie de *Campylobacter* (*C. jejuni* o *C. coli*), siguiendo el protocolo anteriormente descrito en nuestro laboratorio. Tras su confirmación, la cepa se almacenó congelada en una criobola a -80 °C. Con el DNA restante se realizó toda una batería de pruebas para estudiar qué genes de resistencia estaban presentes en estos aislados.

Concretamente, se realizaron dos técnicas simultáneas de biología molecular, qPCR y PCR convencional, para los siguientes grupos antibióticos: β_lactámicos (amoxicilina), tetraciclinas, macrólidos (tilosina) y lincosamidas (lincomicina).

Los reactivos empleados en la reacción, el volumen final de la misma, las concentraciones de los cebadores, el DNA incluido en la reacción y el protocolo de la qPCR/PCR fueron los mismos que los detallados al describir el análisis individual de qPCR para *C. jejuni* y para *C. coli*.

Para el grupo antibiótico de las fluoroquinolonas (enrofloxacino) se realizó la PCR descrita por Luo et al., (2005), incluyendo una pequeña modificación: en lugar de utilizar una master mix con *SYBR Green I*, se utilizó una master mix de sonda 2X de la casa Biotools (Valencia, España). El volumen final de la reacción fue de 25 µl incluyendo 0,8 µl de cada cebador y 3 µl de DNA.

Una vez finalizada todas las amplificaciones isotérmicas se prepararon geles de agarosa al 1,5% (Pronadisa), y se añadieron 5 µl de Gel Red (Biotium), como tinte de los ácidos nucleicos, por cada 100 ml de gel.

Además, se pipeteó 1 µl del marcador de talla de 100 pb de Biotools. El tampón de carga (6X) que se utilizó fue azul de bromofenol con glicerol y se añadieron 3,5 µl de esta mezcla por cada 8 µl de DNA amplificado. Las muestras se dejaron correr durante 1,5 horas a 60 voltios, realizando cada media hora una foto del gel para observar el desarrollo del proceso en el aparato G:Box HR Syngene (Cambridge, UK).

Se remitieron 15 µl de producto de PCR amplificado para el gen *gyrA*, junto con la pareja de cebadores a una concentración de 10 µM, al laboratorio portugués STAB VIDA (ver Anexo), para realizar una purificación del producto, así como un análisis de secuenciación tipo Sanger (sistemas ABI PRISM 3130 y 3730).

En la tabla 16 se indican las características de los cebadores empleados en este estudio, diseñados exclusivamente para el mismo.

Tabla 16. Características de las técnicas de qPCR/PCR realizadas en el laboratorio Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek S.L.

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
qPCR β_lactámicos	AATTTAGTGTTTGGGCAAGA CGCCCAAGAAGATAAAAATA	bla Oxa61	252	Este estudio
qPCR tetraciclinas	ACGGARAGTTTATTGTATACC TGGCGTATCTATAATGTTGAC	tetO	241	Este estudio
qPCR fluoroquinolonas/macrólidos	AATCTTCAATCAGGAGCAAA CCTAGCAATGAAACAGGAAC	cmeB	260	Este estudio
PCR fluoroquinolonas	CAACTGGTTCTAGCCTTTTG AATTTCACTCATAGCCTCACG	gyrA	1081	Luo et al., 2005
qPCR macrólidos	TATGTGAATCTGCTCAGACG CGAACTCCTCCAGGACAC	trlB	217	Este estudio
qPCR macrólidos	CCCAGATCTCTATCGTCTC GCTACGTCCTGTCGAAGAT	trlD	190	Este estudio
qPCR lincomicina	ATCCCTCGTTTAAAGATTC TTAGAACGTTGATCCCATC	linB	190	Este estudio
qPCR lincomicina	GGTGTAGATGCTCTTCTTGG GAAAACAATCCCCATCATAA	linC	241	Este estudio

Leyenda: Pares de bases (pb)

1.4.4 Análisis de identificación mediante huellas digitales (Rep-PCR)

En este mismo laboratorio también se llevó a cabo una caracterización molecular de los aislados procedentes de la explotación estudiada en base al cebador (GTG)₅. En la tabla 17 se pueden observar sus características.

Tabla 17. Características de la técnica de Rep-PCR realizada en el laboratorio Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek S.L.

Prueba	Secuencia cebador	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
Rep-PCR	GTGGTGGTGGTGGTG	microsatélite	Fragmentos de diferente tamaño	Cilliers et al. 1997

Leyenda: Pares de bases (pb)

El protocolo de la técnica de Rep-PCR se fundamentó en un primer paso a 94 °C durante 7 minutos, seguida de 45 ciclos a 93 °C durante 20 segundos, 45 °C durante 25 segundos y 72 °C durante 4 minutos. Además, se realizó una extensión adicional de 6 minutos a 72 °C.

Se realizó un gel de Agarosa al 2% tal y como se ha indicado con anterioridad. El marcador de talla, el tinte, el tampón de carga y el protocolo instaurado en el aparato de electroforesis fue el mismo que se empleó para los otros análisis.

1.5 Análisis de datos

1.5.1 qPCR y microbiológicos

El análisis de estos resultados obtenidos se realizó con el *software* Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (*SPSS*) versión 24.0, apto para Windows. Además, se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados, Epidat versión 3.1.

El análisis descriptivo se centró en las frecuencias relativas unido a los respectivos intervalos de confianza del 95% (IC_{95%}).

Para determinar la normalidad de los datos numéricos se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk en función del número de muestras a analizar (>50 o <50 respectivamente). Las variables numéricas sin distribución normal fueron analizadas con la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos grupos.

En la estadística inferencial se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson para comparar variables categóricas en grupos independientes. Esta prueba se realizó cuando se encontró menos de un 20% de celdas en las tablas de contingencias, con frecuencia esperadas menores de 5. El nivel de significancia fijado en las pruebas estadísticas fue de $p < 0,05$.

El índice kappa de Cohen se calculó para determinar la concordancia entre los resultados en las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas. Mientras que los valores de C_q entre las qPCR y la edad de los pollos, fueron comparados mediante la prueba de correlación de Spearman, ρ (rho).

Para la evaluación de todas las pruebas diagnósticas se calculó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, los índices de validez y de Youden.

La S y E se calcularon como:

$$S = \frac{a}{a + c} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{enfermos}} ; E = \frac{d}{b + d} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{sanos}}$$

El VPP y el VPN de la siguiente manera:

$$VPP = \frac{a}{a + b} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{positivos}} ; VPN = \frac{d}{c + d} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{negativos}}$$

El IV y el IJ se calcularon de esta otra:

$$IV = \frac{a + d}{N} ; IJ = S + E - 1 = S - (1 - E)$$

Todas las gráficas sobre estos resultados se han realizado bien con el programa *SPSS* o con *GraphPad Prism* versión 6.0.

1.5.2 Análisis de genotipado

El análisis de los datos sobre la caracterización genética realizada en el laboratorio Ainia, se procesó mediante el *software* Diversilab versión 3.4. En cambio el análisis de las técnicas, PCR y Rep-PCR, llevadas a cabo en el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza se realizaron mediante el *software* Gene Tools versión 3.8 (E) Batch 081107.

1.5.3 Análisis de genes de resistencia

El estudio sobre la detección de las mutaciones para el grupo antibiótico de las fluoroquinolonas en los diferentes aislados, así como la estimación de las distancias evolutivas por el método de Máxima Verosimilitud, se realizó con la ayuda del *software* Análisis Molecular de Genética Evolutiva (MEGA6) (Tamura et al., 2013). Para identificar las relaciones evolutivas entre las cepas de *C. jejuni* se construyó un árbol filogenético mediante el método de *Neighbor-joining* con 1.000 replicaciones tipo *Bootstrap* en MEGA 6 basada en la región QRDR del gen *gyrA*.

1.5.4 Mapas geográficos

Las parcelas donde se encuentran las explotaciones se han georeferenciado con el visor nacional SigPac versión 3.1 (ver Anexo).

2. Estudio de la microbiota intestinal a partir de ciegos de pollos mediante secuenciación masiva

2.1 Explotación ganadera

La realización de los procedimientos de secuenciación masiva tuvo lugar en la explotación ganadera de Cosuenda (Zaragoza) (ver anexo, figura 8). Se emplearon dos de las cuatro naves disponibles, una de ellas se utilizó como nave control y la otra como nave tratamiento. En esta ocasión, la genética de los pollos también fue *Gallus gallus*, Ross 308, y las dos naves contenían individuos de ambos sexos (nave mixta).

Esta segunda explotación también se encuentra autorizada según la Resolución de 2 de marzo de 2006, de la Dirección General de Calidad Ambiental, por la que se formula la Declaración de Impacto Ambiental y se otorga la Autorización Ambiental Integrada para una explotación avícola de pollos de engorde con una capacidad total de 65.000 plazas, ubicadas en las parcelas nº 117 y 109 del polígono 22 y parcelas nº 2 y 3 del polígono 15 del término municipal de Cosuenda (Zaragoza) (BOA nº 33).

Las dimensiones de estas naves albergan una longitud de 50 metros de largo por 10 metros de ancho y son de construcción más antigua. Cada una de las naves puede alojar como máximo hasta 15.000 ejemplares y las medidas de bioseguridad también son muy estrictas en ellas.

Para el estudio, se introdujeron el mismo número de ejemplares en cada nave, aproximadamente el límite de su capacidad. La localización geográfica de la explotación se puede observar en el apartado Anexo y el código de explotación es ES 500880000801.

2.2 Toma de muestras

El diseño experimental planteado supuso el ensayo de un extracto vegetal, en su mayoría de ajo y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), aceites esenciales como el eugenol, compuesto fenólico con reconocido efecto bacteriostático y antifúngico (Cowan et al., 1999; Nascimiento et al., 2000) y vitamina E (alfa-tocofenol). Este producto se conoce comercialmente con el nombre de Vitaid (ver Anexo, figura 9) y, se administró a lo largo de todo el proceso de engorde de los pollos en el agua de bebida, a una concentración marcada por el fabricante de 400 ml/1000 L durante los primeros 21 días y, luego a una concentración de 300ml/1000 L del a partir del día 22 al 43.

Como se trataba de una explotación ganadera y se desconocía el estatus sobre *Campylobacter*, se realizaron los muestreos semanales, mediante la toma de calzas, hasta la obtención de un resultado positivo. Posteriormente, estas muestras se trataron según el protocolo establecido conforme a las directrices del laboratorio del grupo SADA (Nutreco).

La toma de muestras para la determinación individual de la microbiota intestinal, a partir de los ciegos de 10 animales en cada nave, se realizó en el día

40, sacrificándose 5 individuos machos y 5 individuos hembras por nave. La mitad de cada uno de ellos recibió tratamiento con Vitaid y la otra mitad actuó como control.

Se realizó la necropsia del ave para localizar el ciego, se diseccionó esta parte y se colocó de manera individual cada ciego en duquesas estériles sin ningún medio. Todas estas muestras se remitieron al laboratorio valenciano Imegenagro para su posterior análisis individual.

2.3 Análisis de secuenciación masiva

Tras la recepción de la muestra en el laboratorio Imegenagro, se realizó la extracción del DNA total y se comprobó su calidad y concentración mediante un espectrofotómetro a las longitudes de onda, A260/A280 y A260/A230, así como se comprobó una intensidad de banda específica óptima para la construcción de las librerías de secuenciación.

El análisis de identificación genómica bacteriana se realizó mediante la amplificación por PCR de las regiones variables V3 y V4 del gen ribosómico 16S RNAr. Tras la amplificación de estas regiones, se prepararon librerías mediante la unión de adaptadores específicos de la casa comercial Illumina (California, EE. UU.). Estas librerías Nextera se secuenciaron empleando una plataforma modelo MiSeq (Illumina) con un tamaño de lecturas de 2x300 pares de bases. Las secuencias obtenidas se compararon frente a las secuencias genómicas disponibles en la base de datos internacional empleando el *software* 16S Metagenomics de Illumina y se validaron y completaron posteriormente con los *software* Kraken Metagenomics (De Wood et al., 2014) y Qiime (Gregory et al., 2010).

El control de calidad inicial durante el proceso de secuenciación confirmó que los valores de calidad Phred (Ewing y Green, 1998) q30 fueron del 71,45%, superando el umbral del 70% garantizado por Illumina para el tipo de secuenciación empleada (Nextera M00476 ARNr, 16S Metagenomic Sequencing Library, PCR-Primers Kit). Por medio de la herramienta FastQ Toolkit se filtraron las secuencias de las 20 muestras empleando un umbral de calidad Phred q10 y se eliminaron las 16 primeras bases de todas las secuencias retirando la secuencia homóloga de los cebadores de secuenciación descritos en el protocolo de Illumina.

La diversidad microbiana tipo alfa (intra-grupo) se estudio mediante el empleo de los siguientes índices: índice de Shannon, índice de Chao e índice de la distancia filogenética. Para la diversidad beta se empleó el análisis de coordenadas principales.

2.4 Declaración ética responsable

Al tratarse de una explotación de índole agropecuario tiene la obligación de cumplir con la normativa comunitaria, nacional y autonómica con el fin de garantizar las exigencias en materia de bienestar animal como seres sensibles, respetando al mismo tiempo las disposiciones legales o administrativas y las costumbres de los Estados miembros relativas, en particular, a ritos religiosos,

tradiciones culturales y patrimonio regional. El conjunto de normas y leyes que les afectan a este de explotaciones son las siguientes:

- ~ Ley 11/2003, de 19 de marzo, de Protección Animal en la Comunidad Autónoma de Aragón.
- ~ Ley 8/2003, de 24 de abril, Sanidad Animal.
- ~ Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Además de la modificación de esta Ley, por la Ley 6/2013, de 11 de junio.
- ~ RD 348/2000, de 10 de marzo, por el que se incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 98/58/CE, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas. Este RD se encuentra modificado por el RD 441/2001, de 27 de abril.
- ~ RD 1084/2005, de 16 de septiembre, de ordenación de la avicultura de carne.
- ~ RD 692/2010, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne y se modifica el RD 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros.

Por otra parte, la normativa que ampara los métodos de sacrificio se encuentran recogidos en el Reglamento (CE) n.º 1099/2009, del Consejo, de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.

El sacrificio de los pollos de engorde que formaban parte de esta experiencia procedentes de la explotación de Cosuenda, se llevó a cabo según las directrices marcadas en el Anexo I (lista de métodos de aturdimiento y especificaciones correspondientes) de este reglamento, es decir, se realizó mediante dislocación cervical, estiramiento y torsión manuales o mecánicos del cuello que causaron isquemia cerebral. Se trata de un método autorizado para aves de corral de hasta 5 kg. Los animales fueron supervisados, en todo momento, por el veterinario responsable de la explotación que velaba por evitar cualquier dolor o sufrimiento innecesario.

VI. Resultados y discusión

1. Estudio de *Camylobacter* a partir de calzas

El trabajo realizado en la explotación Montes del Palancia se trata de un estudio longitudinal retrospectivo y descriptivo.

Un estudio longitudinal permite examinar a los sujetos en varios momentos a lo largo del tiempo, lo cual facilita al investigador determinar la secuencia de los acontecimientos. El término retrospectivo se usa para referirse a la relación temporal existente entre el inicio del estudio por el investigador y la aparición del desenlace. Por último, se trata de un estudio descriptivo observacional porque su función principal es estimar semanalmente la frecuencia de la variable "efecto": momento de infección de cada nave.

1.1 Validación de los métodos diagnósticos

Los resultados referentes a la validación de las pruebas diagnósticas iQ-Check Bio-Rad, reflejando como método de referencia al medio de cultivo microbiológico CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad, se pueden observar en la tabla 18.

Tabla 18. Validación de los métodos iQ-Check Bio-Rad vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

		CASA® bioMérieux / RAPID' Bio-Rad (Método de referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
iQ-Check Bio-Rad / (Método a evaluar)	Positivos	23	0	23
	Negativos	0	115	115
	Total	23	115	138

La tabla 19 recoge los parámetros de validez y fiabilidad tras la comparación de resultados entre las pruebas diagnósticas iQ-Check Bio-Rad con el patrón de referencia CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad. En ella, se puede comprobar el valor real de cada parámetro analizado con su intervalo de confianza al 95%.

Tabla 19. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos iQ-Check Bio-Rad vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

	Valor	IC 95% Límite inferior	IC 95% Límite superior
S	100,00	97,83	100,00
E	100,00	99,57	100,00
IV	100,00	99,64	100,00
VPP	100,00	97,83	100,00
VPN	100,00	99,57	100,00
IJ	1,00	1,00	1,00

Los resultados referentes a la validación de las pruebas diagnósticas qPCR *C. coli* poniendo como método de referencia al medio de cultivo microbiológico CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad, se observan en la tabla 20.

Tabla 20. Validación de los métodos qPCR *C. coli* vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

		CASA® bioMérieux / RAPID' Bio-Rad (Método de referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR <i>C. coli</i> (Método a evaluar)	Positivos	1	0	1
	Negativos	0	137	137
	Total	1	137	138

La tabla 21 plasma los parámetros de validez y fiabilidad tras la comparación de resultados entre las pruebas diagnósticas qPCR *C. coli* con el patrón de referencia CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad. En ella, se visualiza el valor real de cada parámetro analizado con su intervalo de confianza al 95%.

Tabla 21. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos qPCR *C. coli* vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

	Valor	IC 95% Límite inferior	IC 95% Límite superior
S	100,00	50,00	100,00
E	100,00	99,64	100,00
IV	100,00	99,64	100,00
VPP	100,00	50,00	100,00
VPN	100,00	99,64	100,00
IJ	1,00	1,00	1,00

Los resultados referentes a la validación de las pruebas diagnósticas qPCR *C. jejuni* y LAMP *C. jejuni*, colocando como método de referencia al medio de cultivo microbiológico CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad, se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Validación de los métodos qPCR *C. jejuni* vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

		CASA® bioMérieux / RAPID' Bio-Rad (Método de referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR <i>C. jejuni</i> (Método a evaluar)	Positivos	23	1	24
	Negativos	0	114	114
	Total	23	115	138

La tabla 23 refleja los parámetros de validez y fiabilidad tras la comparación de resultados entre las pruebas diagnósticas qPCR *C. jejuni* con el patrón de referencia CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad. En ella, se pueden observar los valores reales de cada parámetro analizado con su intervalo de confianza al 95%.

Tabla 23. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos qPCR *C. jejuni* vs CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad

	Valor	IC 95% Límite inferior	IC 95% Límite superior
S	100,00	97,83	100,00
E	99,13	97,00	100,00
IV	99,28	97,50	100,00
VPP	95,83	85,76	100,00
VPN	100,00	99,56	100,00
IJ	0,99	0,97	1,01

Los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de Youden son del 100% para los métodos iQ-Check Bio-Rad y qPCR *C. coli*. En cambio, la sensibilidad para la qPCR *C. jejuni* es del 100%, la especificidad del 99,13% y la eficiencia del 99,28%.

Los valores de validez y fiabilidad analizados, en todas las pruebas diseñadas o empleadas en este estudio, han revelado unos excelentes resultados.

La tabla 24 presenta los nuevos parámetros establecidos al cambiar la prueba *gold* estándar al método de qPCR para *C. jejuni* en relación a los diferentes métodos a evaluar: CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad e iQ-Check Bio-Rad.

Tabla 24. Validación de los métodos CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad, iQ-Check Bio-Rad vs qPCR *C. jejuni*

		qPCR <i>C. jejuni</i> (Método de referencia)		
		Positivos	Negativos	Total
CASA® bioMérieux / RAPID' Bio-Rad / iQ-Check Bio-Rad / (Método a evaluar)	Positivos	23	0	23
	Negativos	1	114	115
	Total	24	114	138

La tabla 25 refleja los parámetros de validez y fiabilidad tras la comparación de resultados entre las pruebas diagnósticas CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad e iQ-Check Bio-Rad, con el patrón de referencia qPCR *C. jejuni*. En ella, se plasman los valores analizados con su intervalo de confianza al 95%.

Tabla 25. Parámetros de validez y fiabilidad para los métodos CASA® bioMérieux, RAPID' Bio-Rad e iQ-Check Bio-Rad vs qPCR *C. jejuni*

	Valor	IC 95% Límite superior	IC 95% Límite inferior
S	95,83	85,76	100,00
E	100,00	99,56	100,00
IV	99,28	97,50	100,00
VPP	100,00	97,83	100,00
VPN	99,13	97,00	100,00
IJ	0,96	0,88	1,04

El valor de kappa de Cohen y el grado de significación estadística de todas las técnicas de este estudio, en comparación con la técnica de referencia CASA®, se recoge en la tabla 26.

Tabla 26. Índice de kappa de Cohen y valor de p para todas las técnicas realizadas en referencia a la técnica CASA®

	Valor de kappa	Valor p
RAPID'	1	$p < 0,001$
iQ-Chek	1	$p < 0,001$
qPCR <i>C. jejuni</i>	0,926	$p < 0,001$
qPCR <i>C. coli</i>	1	$p < 0,001$

Es interesante averiguar si existe concordancia entre las C_q de las pruebas cuantitativas iQ-Chek y qPCR para *C. jejuni*. Los datos analizados para estas variables reflejan que existe una distribución que no se aproxima a la normal ($p < 0,05$). Por ello, se realizó la prueba del coeficiente de correlación de Spearman dando un valor de $R^2=0,860$ (correlación positiva fuerte) con un valor de significancia mayor del 99% ($p < 0,001$) (figura 15).

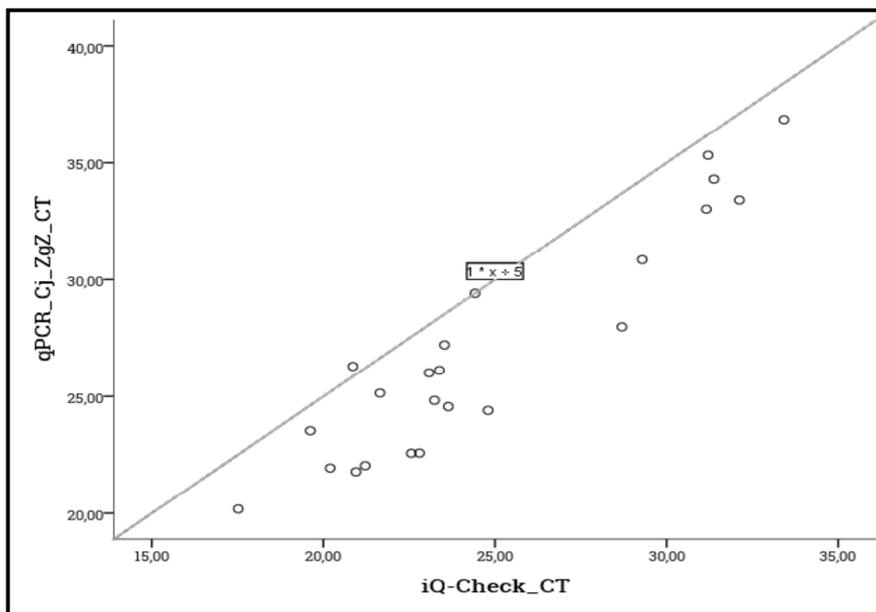


Figura 15. Coeficiente de correlación de Sperman entre las C_q de las pruebas iQ-Chek y qPCR *C. jejuni*. En ella se plasma la ecuación lineal de la recta ($y=1*x+5$), por tanto, si se conoce un valor de x para la técnica iQ-Chek se puede conocer el valor de C_q de la técnica de qPCR *C. jejuni*. También el valor de ρ (rho) nos indica que si una muestra analizada con la prueba iQ-Chek aumenta un ciclo, la técnica qPCR *C. jejuni* lo hará en 0,86 ciclos.

En una tabla de contingencia se observa que existen coincidencias en el diagnóstico (verdaderos positivos y verdaderos negativos), pero también pueden existir discrepancias (falsos positivos y falsos negativos) que pueden deberse a errores tanto en la elección y aplicación de la prueba diagnóstica, como en el método de obtención, selección y conservación de la muestra analizada (sobre todo en el caso de los falsos negativos (de Blas et al., 2008).

En los diagnósticos serológicos se puede atribuir la aparición de falsos positivos a la existencia de reacciones serológicas cruzadas específicas o inespecíficas, a

individuos que se encuentren todavía en fase de latencia o a la ausencia o reducción natural inducida de la respuesta inmune (Thrusfield, 1995). La aparición de falsos positivos en el caso de técnicas directas basadas en PCR se debe al límite de detección de la técnica, al empleo de moléculas fluorescentes para las reacciones, como el *SYBR Green I*, o a una simple contaminación de los pocillos (Higuchi et al., 1992).

En nuestro caso, si se compara la técnica directa de qPCR *C. jejuni* con el patrón de referencia CASA® bioMérieux/RAPID' Bio-Rad, se observa una sensibilidad del 100%, aunque no ocurre lo mismo con la especificidad, que resulta del 99,13%. Si se toma la qPCR *C. jejuni* como técnica de referencia, en comparación con el resto, se observa lo contrario: aumenta la especificidad al 100% y disminuye la sensibilidad al 95,83%. Se deduce entonces que siempre que se mejore uno de estos dos parámetros el otro disminuye, de modo que nunca podrán mejorarse ambos aspectos simultáneamente.

Una prueba diagnóstica muy sensible mostrará pocos resultados falsos negativos, por tanto, tendrá mucha utilidad para descartar la presencia de enfermedad (Gordis, 2005). Todas las técnicas de PCR, basadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, están catalogadas como técnicas sensibles (Yang y Rothman, 2004).

La técnica diagnóstica desarrollada de alta sensibilidad se utilizará cuando se desee detectar la enfermedad en sus fases iniciales, es decir, cuando interese eliminar los resultados falsos positivos (por ejemplo en zoonosis como esta) o cuando la probabilidad de enfermedad *a priori* sea baja. En esta ocasión, esto no ocurre dada la alta probabilidad de encontrar *Campylobacter* en lotes de canales de pollos en el matadero.

En contrapartida, una técnica diagnóstica muy específica recogerá pocos resultados falsos positivos y servirá para confirmar la presencia de enfermedad. Por tanto, se seleccionarán este tipo de técnicas cuando interese la confirmación de resultados negativos (Gordis, 2005).

En función de estas premisas, junto con las directrices que nos marcan las normas ISO, se seleccionará la prueba diagnóstica que se considere más conveniente según las necesidades de cada estudio. Por ejemplo, si se busca realizar diagnósticos con validez en Salud Pública se llevarán a cabo técnicas autorizadas y estandarizadas para ello, pero si se quiere realizar diagnósticos presuntivos en la explotación, se utilizarán técnicas como las diseñadas e implementadas en este estudio. Por otra parte, también se puede obtener una validación internacional (por ejemplo, tipo AOAC) para los métodos de qPCR bien para *Campylobacter* solamente o para cada una de sus dos especies (*C. jejuni* y *C. coli*) y sobre diferentes matrices.

1.2 Análisis de qPCR y microbiológicos (globales)

A continuación, en las tablas 28-31, se presentan los resultados del primer muestreo realizado en la explotación Montes de Palancia, a partir de las calzas tomadas en cada una de las naves, distribuidos por semanas y siguiendo los protocolos de las distintas técnicas diagnósticas empleadas.

Los resultados de qPCR recogidos corresponden a valores de C_q obtenidos directamente del termociclador. Por tanto, un valor de C_q en la tabla será indicativo de que la nave ha resultado positiva. Más adelante, se podrá observar la correspondencia entre este valor y su carga bacteriana expresada en logaritmo de base 10 (UFC/ml).

A continuación se presentan en la tabla 27 los resultados correspondientes a tres semanas consecutivas.

Tabla 27. Resultados de las semanas del 2016/07/26, 2016/08/01 y 2016/08/10 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	33	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
B	12	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
C	15	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
D	15	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
E	15	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
F	19	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
G	19	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
H	19	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
I	18	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
J	18	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
K	18	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
L	12	Yeso	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
M	12	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	12	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
O	8	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
P	8	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	8	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt1 (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR1 (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt2 (Cultivo RAPID® Campylobacter Bio-Rad), qPCR2 (diseño propio), Neg (Negativo)

En la primera manada, el primer resultado positivo fue en la cuarta semana del muestreo, es decir, a los 40 días de edad. Este dato se corresponde con lo descrito por otros autores al no observarse una presencia de *Campylobacter* anterior a los 21 días (van Gerwe et al., 2009). Además, esta infección coincide en tiempo con la realización de la práctica del clareo, llevada a cabo las semanas anteriores a dicho muestreo. Es probable que en el momento de esta práctica la carga bacteriana que infectó al lote fuese baja, y por ello no detectable en el muestreo del día 10 de agosto. El aclarado pone de manifiesto que puede ser una de las fuentes de infección de *Campylobacter* en el lote de producción al romper las medidas de bioseguridad de la nave (Adkin et al., 2006; Hanson et al., 2010; Ellis-Iversen et al., 2011). La nave afectada correspondía al núcleo de producción 2 (tabla 28).

Tabla 28. Resultados de la semana del 2016/08/16 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio	Enfermedades Infecciosas
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	33	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
B	33	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	36	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
E	36	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
F	40	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
G	40	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
H	40	Viruta	Mx	Si	Pos	25,00	Pos	31,90
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	39	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
K	39	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
L	39	Yeso	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
M	33	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	33	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
O	29	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
P	29	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	29	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt¹ (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt² (Cultivo RAPID[®] *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Tabla 29. Resultados de la semana del 2016/08/22 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio	Enfermedades Infecciosas
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	39	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
B	39	Viruta	Mx	No	Pos	22,56	Pos	22,57
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	42	Viruta	Mx	Si	Pos	21,22	Pos	22,04
E	42	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	35,69
F	46	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
G	46	Viruta	Mx	Si	Pos	31,21	Pos	35,32
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	45	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
K	45	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	35,30
L	45	Yeso	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
M	39	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
N	39	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
O	35	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
P	35	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	35	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt¹ (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt² (Cultivo RAPID[®] *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), NR (no recibido), Neg (Negativo)

En esta ocasión, estaban infectadas parte de las naves de dos núcleos de producción, núcleo 1 y núcleo 2. A las correspondientes al núcleo 1 (D y E) pudo ocurrirles lo mismo que a la nave H de la semana anterior, dado que estaban ya clareadas hacía una semana. En cambio, la nave B de este mismo núcleo podría haberse infectado debido a otra fuente distinta al clareo (ya que no se había realizado todavía), bien por no cumplir con las estrictas medidas de bioseguridad

entre las naves o porque estuviera presente otra fuente distinta. Las naves del núcleo de producción 2 (G y K) pudieron infectarse, de nuevo, por el mismo motivo (el clareo) (tabla 30).

Cabe mencionar que solamente las naves E y K fueron positivas a *Campylobacter* por el laboratorio de Zaragoza, probablemente debido a la sensibilidad de la técnica empleada qPCR *C. jejuni* con el fluoróforo *SYBR Green I* (Yang et al., 2004; Balamurugan et al., 2012).

Tabla 30. Resultados de la semana del 2016/08/29 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Laboratorio Enfermedades Infecciosas			
					Nutreco Clt ¹	qPCR ¹	Clt ²	qPCR ²
A	46	Viruta	H	No	Pos	17,52	Pos	20,18
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
K	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
L	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M	46	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
N	46	Viruta	Mx	Si	Pos	21,65	Pos	25,14
O	42	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
P	42	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	42	Viruta	Mx	Si	Pos	31,16	Pos	33,02

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt1 (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR1 (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt2 (Cultivo RAPID Campylobacter Bio-Rad), qPCR2 (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Con respecto a los análisis del núcleo de producción 3, es posible que la fuente de infección por *Campylobacter* se debiese a la práctica del clareo. Además, en el núcleo 1 (nave A) ocurrió lo mismo que con la nave B en la semana anterior, es decir, no se conoció cuál era la fuente de infección. Conviene resaltar que en todos los casos de infección por *Campylobacter* durante este primer muestreo, la edad de las aves era superior a 39 días, detectándose tan solo una especie de *C. coli* (el resto eran aislados de *C. jejuni*) (tabla 30).

Especialmente importante es la realización de un vacío sanitario en todas las naves que conforman esta explotación, respetándose el período mínimo de entrada de un nuevo lote que asciende a un mínimo de 12 días tras la limpieza, desinfección, desratización y, en su caso, desinsectación. Asimismo, y durante ese tiempo de espera, se llevaron a cabo las analíticas necesarias de comprobación sobre la eficacia de dichas operaciones que incluyó, como mínimo, el control sobre *Salmonella*, realizada por laboratorios autorizados por la autoridad competente, según lo previsto en el Reglamento (CE) 2160/2003.

No obstante, en aquellas explotaciones que dispongan de resultados analíticos que demuestren la eficacia de las actuaciones realizadas para la limpieza y desinfección de las naves, el vacío sanitario se podrá reducir a un mínimo de 7

días. Un resultado analítico favorable es aquel que refleja ausencia de *Salmonella enterica* y *Salmonella typhimurium* (Reglamento (CE) 2160/2003).

Seguidamente, se detallan los resultados correspondientes al segundo muestreo, que también se han llevado a cabo en la misma explotación turolense y que se plasman en las tablas 31-37.

Tabla 31. Resultados de la semana del 2016/09/22 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ^{t1}	qPCR ¹	Cl ^{t2}	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	14	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
G	14	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
H	14	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
I	14	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
J	13	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
K	13	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
L	13	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
M	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
P	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Q	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Cl^{t1} (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl^{t2} (Cultivo RAPID[®] *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Tabla 32. Resultados de la semana del 2016/09/28 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ^{t1}	qPCR ¹	Cl ^{t2}	qPCR ²
A	16	Viruta	Mx	No	Pos	22,80	Pos	22,58
B	15	Viruta	Mx	No	Pos	31,38	Pos	34,30
C	15	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
D	15	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
E	13	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
F	21	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
G	21	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	21	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
J	20	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
K	20	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
L	20	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
M	13	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
P	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Q	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Cl^{t1} (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl^{t2} (Cultivo RAPID[®] *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Estos resultados reflejan la presencia temprana (15-16 días) de *Campylobacter* en las naves del núcleo 1 (A y B). En esta ocasión, la fuente infección difiere de la del primer muestreo, ya que los pollos eran muy jóvenes y no se había realizado todavía la práctica del clareo para reducir su densidad, por lo que, se penso en la existencia de que un elemento común, entre ambas naves, fuese el desencadenante de la presencia de esta bacteria. Por esta razón, se muestreó una removedora presente en la explotación que se emplea para remover y aplastar la cama de los pollos. Los resultados obtenidos por qPCR revelaron la presencia de *Campylobacter* en ella (datos no mostrados).

Tabla 33. Resultados de la semana del 2016/10/06 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	23	Viruta	Mx	No	Pos	23,64	Pos	24,56
D	23	Viruta	Mx	No	Pos	23,24	Pos	24,83
E	21	Viruta	Mx	No	Pos	33,42	Pos	36,86
F	28	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
H	22	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
I	28	Viruta	H	No	Neg	Neg	Neg	Neg
J	27	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
K	27	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
L	27	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
M	21	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	17	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
P	17	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Cl¹ (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl² (Cultivo RAPID *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Los resultados de esta semana muestran como el factor humano, a través de la removedora, ha ocasionado la infección accidental del resto de naves que conforman el primer núcleo.

La tabla 34 nos muestra la presencia de *Campylobacter* tras el clareo de las naves del núcleo 2 (F, G, H, I, J y L). En esta ocasión, tal y como acabamos de observar, sucede lo mismo que ocurrió durante el primer muestreo. Cabe destacar que esta tendencia se lleva observando en diversos estudios realizados por el grupo SADA (Nutreco) (datos no mostrados, 2016).

Tabla 34. Resultados de la semana del 2016/10/13 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	35	Viruta	Mx	Si	Pos	23,38	Pos	26,12
G	35	Viruta	Mx	Si	Pos	23,08	Pos	26,01
H	35	Viruta	Mx	Si	Pos	20,86	Pos	26,29
I	35	Viruta	H	Si	Pos	23,53	Pos	27,21
J	34	Viruta	Mx	Si	Pos	24,42	Pos	29,41
K	34	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
L	34	Viruta	Mx	Si	Pos	32,12	Pos	33,41
M	28	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	24	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
O	24	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
P	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Q	24	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt1 (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR1 (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt2 (Cultivo RAPID´Campylobacter Bio-Rad), qPCR2 (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Tabla 35. Resultados de la semana del 2016/10/18 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
K	39	Viruta	Mx	Si	Pos	28,70	Pos	27,98
L	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M	33	Viruta	Mx	No	Neg	Neg	Neg	Neg
N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
P	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Q	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Clt1 (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR1 (iQ-Chek® Bio-Rad), Clt2 (Cultivo RAPID´Campylobacter Bio-Rad), qPCR2 (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Tabla 36. Resultados de la semana del 2016/10/27 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ^{t1}	qPCR ¹	Cl ^{t2}	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
K	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
L	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M	41	Viruta	Mx	Si	Pos	24,80	Pos	24,40
N	38	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
O	38	Viruta	Mx	Si	Pos	29,29	Pos	30,85
P	38	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg
Q	38	Viruta	Mx	Si	Neg	Neg	Neg	Neg

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Cl^{t1} (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl^{t2} (Cultivo RAPID´*Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

Tabla 37. Resultados de la semana del 2016/11/03 de Montes del Palancia

Nave	Edad (d)	Cama	Sexo	Clareo	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
					Cl ^{t1}	qPCR ¹	Cl ^{t2}	qPCR ²
A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
H	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
I	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
J	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
K	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
L	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
N	38	Viruta	Mx	Si	Pos	20,20	Pos	21,94
O	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
P	38	Viruta	Mx	Si	Pos	19,62	Pos	23,53
Q	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: Edad (días), H (Hembra), Mx (Mixto), Cl^{t1} (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl^{t2} (Cultivo RAPID´*Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), NR (no recibido), Neg (Negativo)

A partir del 13 de octubre de 2016, todos los análisis realizados sobre muestras de calzas procedentes de las diferentes naves muestreadas reflejaron un resultado positivo, siempre después del aclarado de las mismas. Se puede comprobar que en este segundo muestreo casi la totalidad de las naves, 16 de las 17, han sido positivas para *C. jejuni*, a diferencia de lo que ocurrió en el primer muestreo en el

que solo se obtuvieron 9 naves positivas para *Campylobacter*. Por todo lo anterior, el porcentaje de *C. jejuni* aislado en la explotación Montes del Palancia durante los dos muestreos realizados en el año 2016 fue de un 96,00% (24 naves positivas para este agente de un total de 25 positivas frente a *Campylobacter*).

Asimismo, todas aquellas naves que dieron un resultado positivo en ambos muestreos en una semana concreta, se volvieron a muestrear la semana siguiente con el objetivo de comprobar la presencia de dicho germen, habitualmente con una carga bacteriana superior (datos no mostrados). Este hecho revela que cuando un lote presenta un resultado positivo a *Campylobacter* va a permanecer infectado durante todo el ciclo de producción, al convivir estrechamente con los pollos, sin causarles generalmente ninguna patología.

Para facilitar la lectura de los resultados positivos se presenta en la tabla 38 un resumen de todos ellos. En ella se puede apreciar que aunque el número de resultados positivos globales pueda ser el mismo por las técnicas empleadas, no siempre se amplifican las muestras con la misma referencia. Este hecho está íntimamente ligado a la cantidad de carga bacteriana presente en las muestras, así como a las características de validación de cada una de ellas, sobre todo en temas de especificidad y sensibilidad.

Tabla 38. Resumen resultados desde el 26/07/2016 hasta el 03/11/2017

Nave	Nutreco		Laboratorio Enfermedades Infecciosas	
	Cl ¹	qPCR ¹	Cl ²	qPCR ²
2016/08/16 (Nave H)	Pos	25,00	Pos	31,90
2016/08/22 (Nave B)	Pos	22,56	Pos	22,57
2016/08/22 (Nave D)	Pos	21,22	Pos	22,04
2016/08/22 (Nave E)	Neg	0,00	Neg	35,69
2016/08/22 (Nave G)	Pos	31,21	Pos	35,32
2016/08/22 (Nave K)	Neg	0,00	Neg	35,30
2016/08/29 (Nave A)	Pos	17,52	Pos	20,18
2016/08/29 (Nave N)	Pos	21,65	Pos	25,14
2016/08/29 (Nave Q)	Pos	31,16	Pos	33,02
2016/09/28 (Nave A)	Pos	22,80	Pos	22,58
2016/09/28 (Nave B)	Pos	31,38	Pos	34,30
2016/10/06 (Nave C)	Pos	23,64	Pos	24,56
2016/10/06 (Nave D)	Pos	23,24	Pos	24,83
2016/10/06 (Nave E)	Pos	33,42	Pos	36,86
2016/10/13 (Nave F)	Pos	23,38	Pos	26,12
2016/10/13 (Nave G)	Pos	23,08	Pos	26,01
2016/10/13 (Nave H)	Pos	20,86	Pos	26,29
2016/10/13 (Nave I)	Pos	23,53	Pos	27,21
2016/10/13 (Nave J)	Pos	24,42	Pos	29,41
2016/10/13 (Nave L)	Pos	32,12	Pos	33,41
2016/10/18 (Nave K)	Pos	28,70	Pos	27,98
2016/10/27 (Nave M)	Pos	24,80	Pos	24,40
2016/10/27 (Nave O)	Pos	29,29	Pos	30,85
2016/11/03 (Nave N)	Pos	20,20	Pos	21,94
2016/11/03 (Nave P)	Pos	19,62	Pos	23,53

Leyenda: Cl¹ (Cultivo CASA® bioMérieux), qPCR¹ (iQ-Chek® Bio-Rad), Cl² (Cultivo RAPID® *Campylobacter* Bio-Rad), qPCR² (diseño propio), Neg (Negativo), Pos (Positivo)

Transcurridas las 24-48 horas de incubación de las muestras presentes en los diferentes medios empleados, selectivos o agar sangre Columbia, se debe realizar una comprobación de las colonias sospechas para poder continuar con el protocolo establecido por el laboratorio del grupo SADA (Nutreco). La interpretación de los resultados se realizó tal y como se indica en la tabla 39.

Tabla 39. Interpretación de colonias según el kit Microgen®

Reacción con látex de prueba	Reacción con látex de control	Interpretación
+	-	<i>Campylobacter</i> presente
-	-	<i>Campylobacter</i> no presente en cantidad suficiente para ser detectado por la prueba
+	+	Aglutinación no específica. Resultado no concluyente

A continuación, se detallan los resultados obtenidos tras el análisis estadístico según las variables categóricas: tipo de cama (viruta/yeso), sexo (hembras/mixto) y clareo (sí/no).

Los datos analizados reflejan que no existe una asociación estadísticamente significativa para el tipo de cama y el sexo, ya que se dispone de poca información para estas variables, pero sí para el clareo, tal y como se puede comprobar en las tablas 40-42. La información recogida para el tipo de cama y el sexo se plasma en las tablas 8-10 del apartado Anexo. A modo de recordatorio, el nivel de significancia fijado en las pruebas estadísticas fue de $p < 0,05$.

Tabla 40. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar los medios de cultivo (CASA® y RAPID') con la variable categórica: clareo

		CASA® bioMèriux			RAPID' Bio-Rad		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Valor p	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor p
Clareo	No	94,68	5,32	<0,001	94,68	5,32	<0,001
	Si	56,82	43,18		59,09	40,91	

Tabla 41. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar las técnicas de qPCR (iQ-Chek, qPCR *C. jejuni* y qPCR *C. coli*) con las variables categóricas: clareo

		iQ-Chek			qPCR <i>C. jejuni</i>			qPCR <i>C. coli</i>		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Valor p	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor p	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor p
Clareo	No	94,68	5,32	<0,001	94,68	5,32	<0,001	100,00	0,00	0,142
	Si	56,82	43,18		54,55	45,45		97,73	2,27	

De estos análisis se deduce que existe una asociación estadísticamente significativa entre la variable categórica, clareo, y la gran mayoría de técnicas de diagnóstico detalladas en este Trabajo. Esta asociación solamente existe desde un punto de vista cualitativo y no cuantitativo (C_q).

Otro parámetro analizado fue la edad de los pollos en semanas, en relación a la carga bacteriana detectada por las siguientes pruebas: CASA®, RAPID', iQ-Chek, qPCR *C. jejuni*, LAMP *Campylobacter* y LAMP *C. jejuni*. Estos datos tampoco siguen una distribución normal ($p < 0,05$), y por este motivo se realizó un análisis estadístico para la prueba U de Mann-Whitney que reflejó una significación estadística en todos los casos de $p < 0,001$. Este valor significa que a mayor edad

de los animales se observa una mayor carga bacteriana de *Campylobacter*. El análisis descriptivo (mediana y percentiles) se detalla en la tabla 42.

Tabla 42. Análisis descriptivo para las pruebas (CASA®, RAPID', iQ-Chek y qPCR *C. jejuni*) en relación a la edad de los pollos en semanas

Parámetros descriptivos	Pruebas 1		Pruebas 2	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Mediana	3,07	5,50	3,00	5,57
Percentil 25	2,43	4,86	2,43	4,86
Percentil 50	3,07	5,50	3,00	5,57
Percentil 75	4,71	6,32	4,71	6,43

Leyenda: Pruebas 1 (CASA®/RAPID'/iQ-Chek) y pruebas 2 (qPCR *C. jejuni*)

Además, en las figuras 16 y 17 se visualizan diagramas de cajas para las muestras positivas y negativas en relación a las técnicas anteriormente mencionadas con la edad de los pollos. También se reflejan la presencia de los casos aislados (*outliers*) detectados.

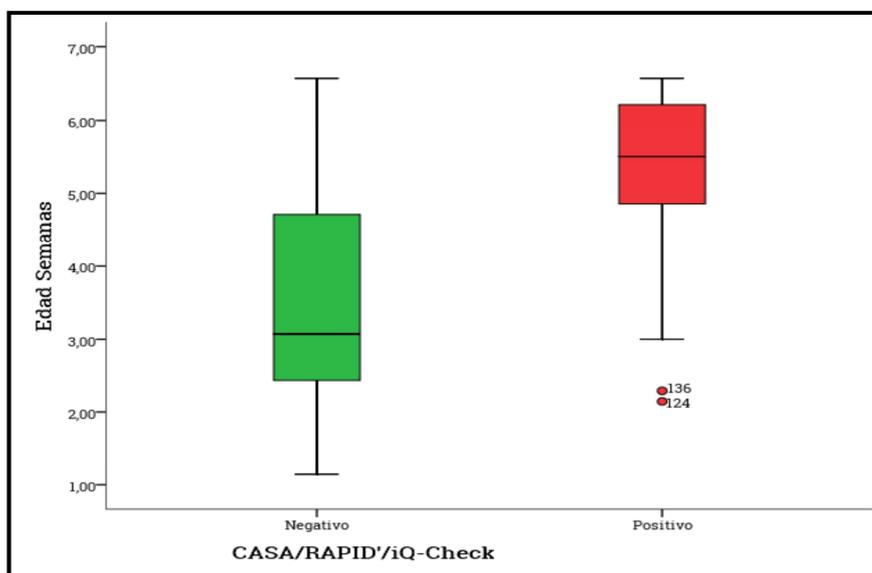


Figura 16. Representación gráfica en diagrama de cajas para la edad en semanas y las técnicas diagnósticas: CASA®/RAPID'/iQ-Chek. Los casos aislados (*outliers*) corresponden a las naves A y B del segundo muestreo que tienen 2,3 y 2,1 semanas de edad. Por este motivo, estos valores se consideran casos atípicos ya que la mediana para el grupo de los positivos oscila en torno a 5,5 semanas. El percentil 75, en el caso de los positivos, llega a 6,32 semanas.

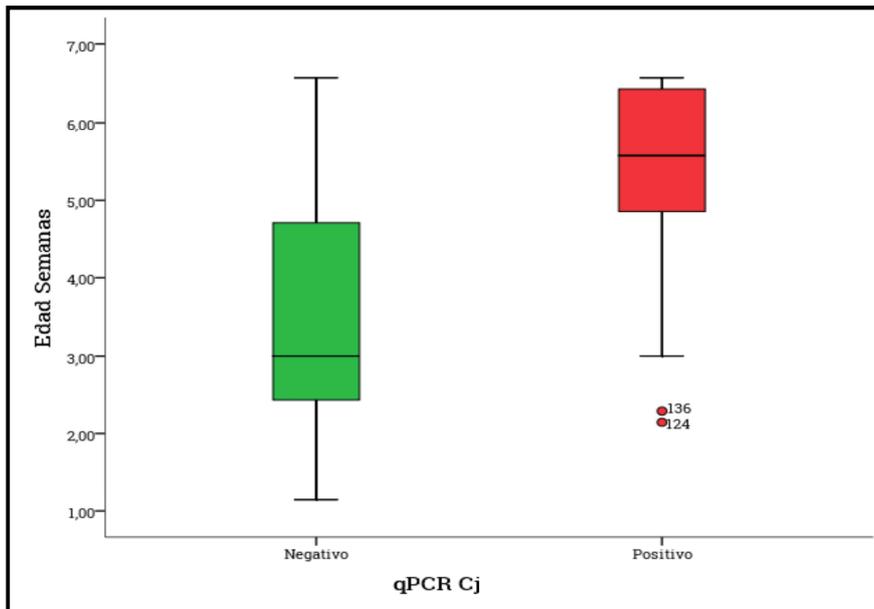


Figura 17. Representación gráfica en diagrama de cajas para la edad en semanas y la técnica diagnóstica qPCR *C. jejuni*. Los casos aislados (*outliers*) corresponden a las naves A y B del segundo muestreo que tienen 2,3 y 2,1 semanas de edad. Por este motivo, estos valores se consideran casos atípicos ya que la mediana para el grupo de los positivos oscila en torno a 5,5 semanas. El percentil 75, en el caso de los positivos, llega a 6,43 semanas.

1.3 Análisis de qPCR

La concentración media de ADN de las calzas mostró un valor medio de $19,24 \pm 11,91 \mu\text{g/ml}$ y la pureza reflejó valores de $1,83 \pm 0,16$. Sin embargo, la concentración del ADN extraído de las bacterias presentó un valor medio de $10,77 \pm 3,73 \mu\text{g/ml}$ y la pureza de $1,35 \pm 0,18$.

Los parámetros óptimos de pureza que garantizan una buena calidad del ADN oscilan entre 1,6-1,9. Si el ratio A260/A280 es inferior puede ser debido a una contaminación significativa de proteínas (Wilfinger et al., 1997).

Los resultados de las diluciones seriadas realizadas experimentalmente para la cepa control *C. jejuni* mostraron una concentración inicial de 4×10^7 UFC/ml. En cambio para la cepa *C. coli*, la concentración fue de $4,4 \times 10^7$ UFC/ml.

La figura 10 del apartado Anexo contemplan la curva patrón realizada en el laboratorio SADA (Nutreco) según el kit comercial qPCR Foodproof® *Campylobacter* Quantification Kit -5'Nuclease, para *C. jejuni* (canal ROX).

En la figura 11 también recogida en el apartado Anexo, alberga la curva patrón realizada en el mismo laboratorio para el kit comercial qPCR Foodproof® *Campylobacter* Quantification Kit -5'Nuclease en el caso de *C. coli* (canal Cy5).

Por otra parte, la curva patrón realizada *in vitro* para la puesta a punto de la técnica de qPCR *C. jejuni*, a partir de una cepa de referencia, en el laboratorio de

Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek, se detalla en la figura 18 que se presenta a continuación.

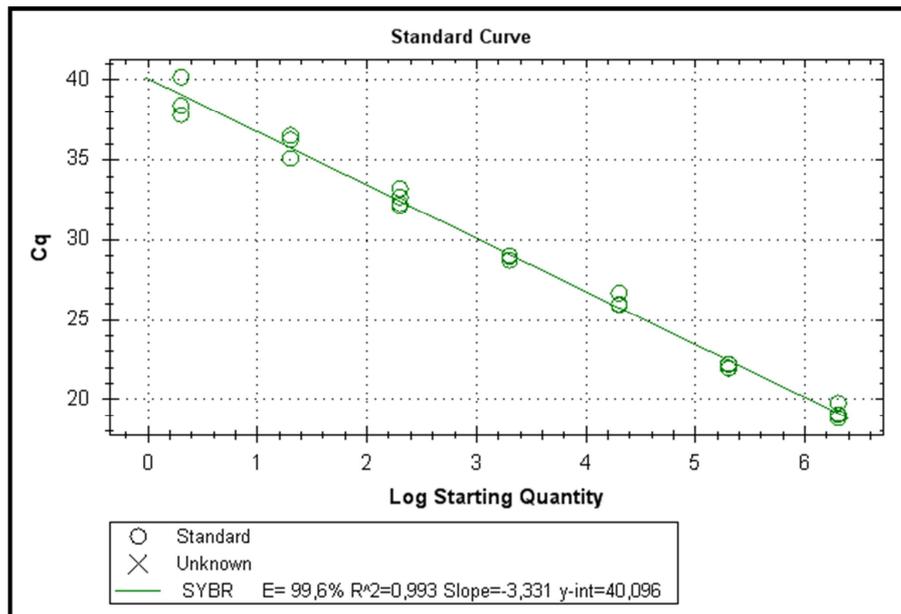


Figura 18. Curva patrón para *C.jejuni*. En ella se plasma la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente

La figura 19 recoge la curva patrón realizada *in vitro* para la puesta a punto de la técnica de qPCR *C. coli* a partir de una cepa de referencia, en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek.

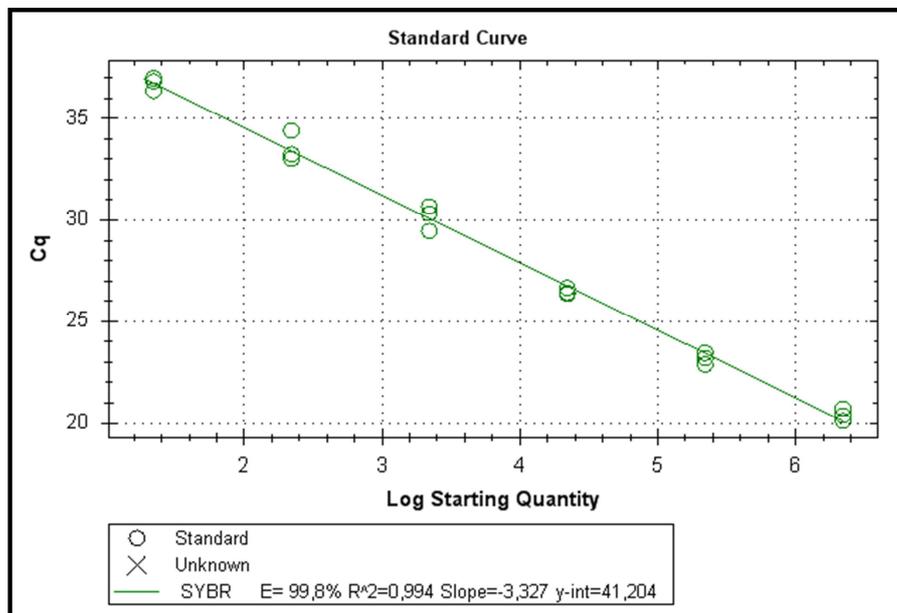


Figura 19. Curva patrón para *C.coli*. En ella se puede apreciar la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente

Todos los parámetros evaluados en esta Memoria sobre la puesta a punto de técnicas diagnósticas de qPCR concuerdan con el rango de valores de las mismas (eficiencia, R^2 , intersección y pendiente de la recta) (Applied Biosystems, 2004; European Network of GMO Laboratories -ENGL, 2011 y 2015).

La optimización de las técnicas de qPCR, diseñadas por el laboratorio de Zaragoza, se elaboró previamente a la realización de los análisis a partir de muestras de campo. Asimismo, se trata de técnicas perfectamente validadas para *C. jejuni* y *C. coli*. Por otra parte, no se realizó una optimización previa a partir de los diferentes kits comerciales dado que estas casas ya se han encargado de ello con anterioridad.

En el apartado Anexo, se observan dos gráficas modelos para las curvas de cuantificación procedentes de los termocicladores empleados en este estudio (Bio-Rad vs Stratagene, figura 12 y 13).

La interpretación de los resultados se lleva a cabo de la siguiente manera:

- ~ Kit comercial qPCR iQ-Chek™ *Campylobacter*. Para aceptar un resultado positivo procedente del termociclador se tiene que observar una línea basal para el control negativo en el canal FAM, un valor de C_q 26-36 para el control positivo y unos valores de $C_q \geq 28$ y ≤ 40 para el control interno.
- ~ Kit comercial qPCR Foodproof® *Campylobacter* Quantification Kit - 5'Nuclease. Las muestras con pequeñas cantidades de ADN de *Campylobacter* ($C_q > 33$ en el canal FAM), revelan, con alta probabilidad, un resultado negativo en los canales ROX y Cy5.
- ~ Kit qPCR *C. jejuni* y *C. coli*, LAMP *Campylobacter*, LAMP *C. jejuni* y LAMP *C. coli*. Para aceptar un resultado de todas estas técnicas, el control negativo no debería amplificarse o mostrar ninguna banda, el control positivo tendría que tener una curva logarítmica u observarse una banda con un tamaño de pares de bases (pb) específico y el control interno debería amplificarse. Por último, para observar la especificidad del producto se tiene que prestar especial atención a la curva de fusión de la reacción, la cual debe coincidir aproximadamente con la curva del control positivo de referencia ($\pm 0,5$ °C, según experiencia propia).

La tabla 43 muestra la temperatura de fusión específica de cada pareja de cebadores gracias a la utilización de la molécula fluorescente *SYBR Green I*. Este valor nos servirá para determinar la especificidad del amplicón obtenido en la qPCR y nos ayudará en la lectura e interpretación de los resultados.

Tabla 43. Temperaturas de fusión de los cebadores empleados en la detección de *C. jejuni* y *C. coli* mediante el fluoróforo *SYBR Green I*

Pareja de cebadores	T_m
<i>C. jejuni</i>	77
<i>C. coli</i>	77,50

La tabla 44 recoge los valores de C_q y carga logarítmica para las pruebas diseñadas en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas junto con Alquizvetek y que abarcan a los análisis de *C. jejuni* y *C. coli*.

Tabla 44. Resultados de qPCR para *C. jejuni* y *C. coli* realizados en Zaragoza

Referencia	Valor C_q <i>C. jejuni</i>	Carga logarítmica <i>C. jejuni</i>	Valor C_q <i>C. coli</i>	Carga logarítmica <i>C. coli</i>
2016/08/16 (Nave H)	-	-	31,90	2,80
2016/08/22 (Nave B)	22,57	5,26	-	-
2016/08/22 (Nave D)	22,04	5,42	-	-
2016/08/22 (Nave E)	35,69	1,32	-	-
2016/08/22 (Nave G)	35,32	1,43	-	-
2016/08/22 (Nave K)	35,30	1,44	-	-
2016/08/29 (Nave A)	20,18	5,98	-	-
2016/08/29 (Nave N)	25,14	4,49	-	-
2016/08/29 (Nave Q)	33,02	2,12	-	-
2016/09/28 (Nave A)	22,58	5,26	-	-
2016/09/28 (Nave B)	34,30	1,74	-	-
2016/10/06 (Nave C)	24,56	4,66	-	-
2016/10/06 (Nave D)	24,83	4,58	-	-
2016/10/06 (Nave E)	36,86	0,97	-	-
2016/10/13 (Nave F)	26,12	4,20	-	-
2016/10/13 (Nave G)	26,01	4,23	-	-
2016/10/13 (Nave H)	26,29	4,14	-	-
2016/10/13 (Nave I)	27,21	3,87	-	-
2016/10/13 (Nave J)	29,41	3,21	-	-
2016/10/13 (Nave L)	33,41	2,01	-	-
2016/10/18 (Nave K)	27,98	3,64	-	-
2016/10/27 (Nave M)	24,40	4,71	-	-
2016/10/27 (Nave O)	30,85	2,78	-	-
2016/11/03 (Nave N)	21,94	5,45	-	-
2016/11/03 (Nave P)	23,53	4,97	-	-

Para facilitar la comprensión del lector de cara a entender qué naves de esta explotación se han infectado por *Campylobacter* y en qué momento de la crianza del pollo lo han hecho, se han elaborado diferentes figuras (20-29) con el perímetro geográfico de las parcelas que conforman dicha explotación. Estas gráficas se han desarrollado teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante las técnicas de PCR a tiempo real realizadas en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

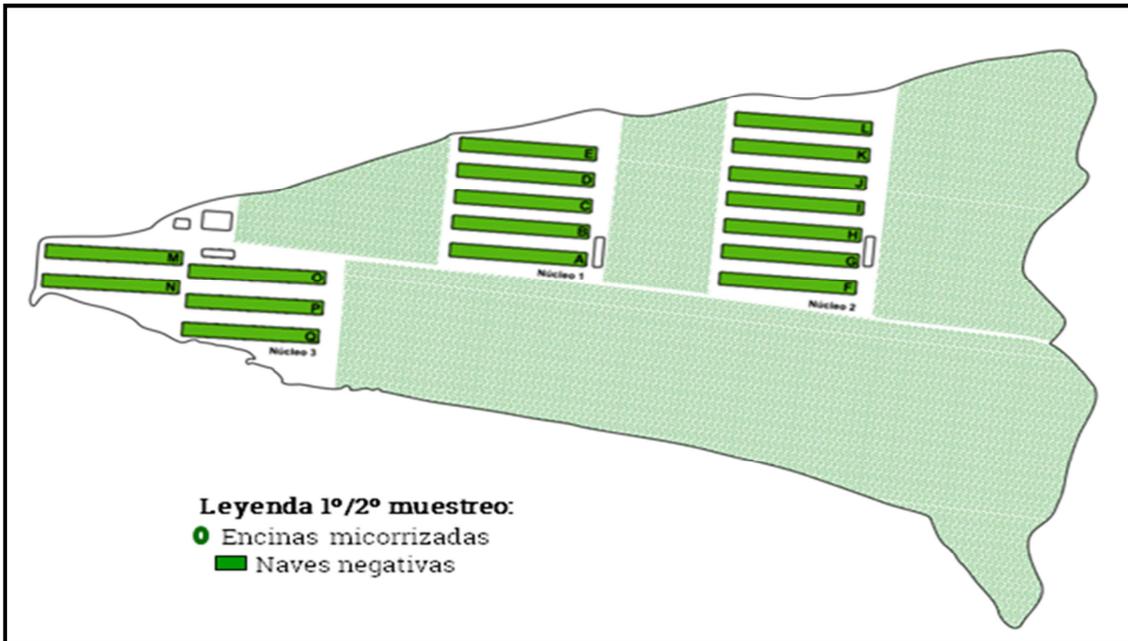


Figura 20. Explotación Montes del Palancia. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo a *Campylobacter* a lo largo de las crianzas consecutivas en que ha tenido lugar dicho estudio. El color verde de las naves indica una nave libre a este patógeno. Entre los tres núcleos de esta explotación se encuentran parcelas con encinas micorrizadas

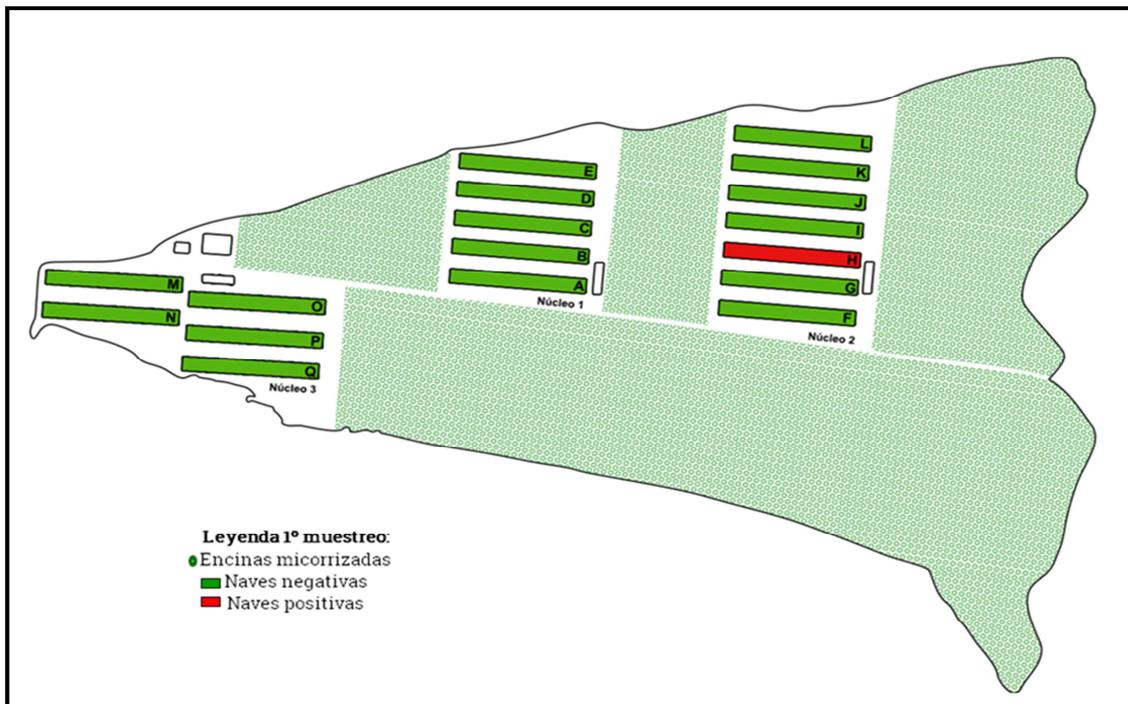


Figura 21. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/16. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Como se puede apreciar solamente resultó positiva la nave H correspondiente al núcleo 2

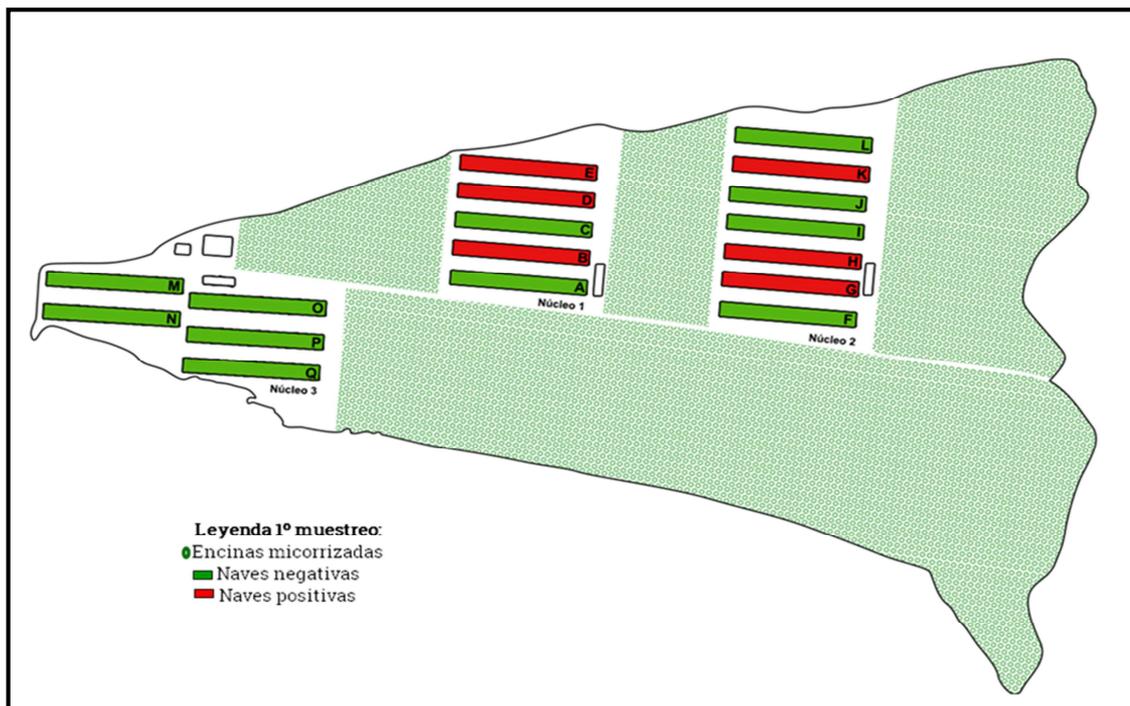


Figura 22. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/22. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Las naves del núcleo 2 positivas a esta bacteria son las naves G y K. Además de estas, son positivas también las naves B, D y E procedentes del núcleo 1

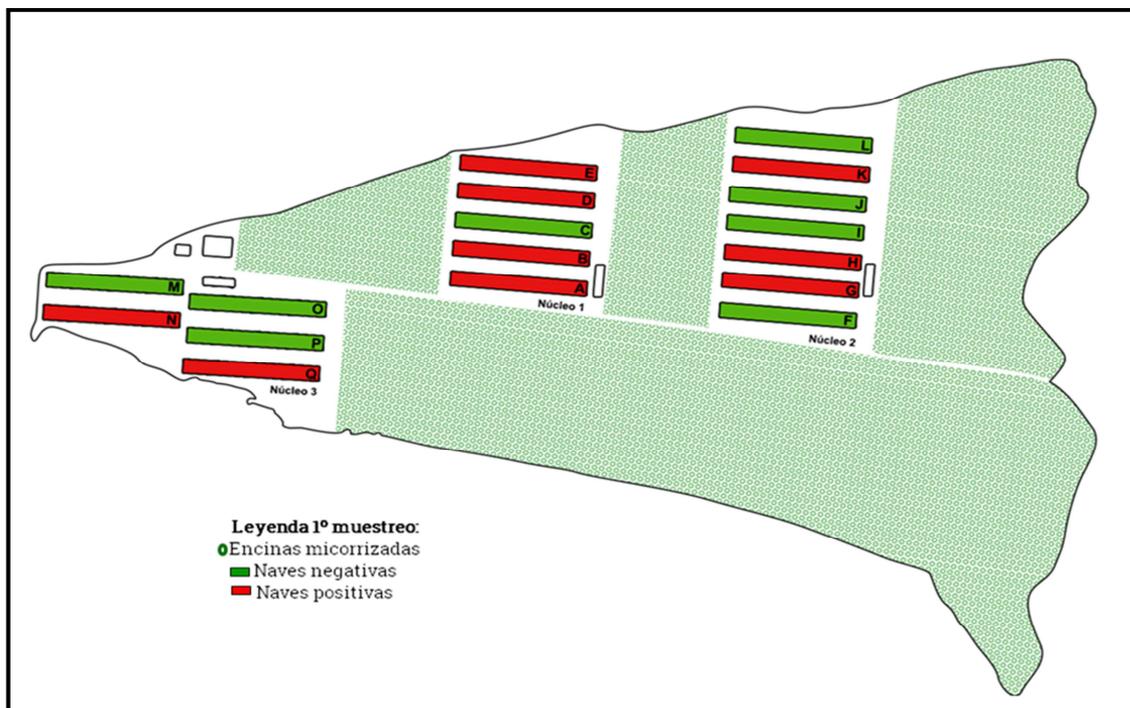


Figura 23. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/08/29. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. La nave A del núcleo 1 ha tenido un resultado positivo para esta bacteria. Además de esta, son positivas las naves N y Q procedentes del núcleo 3

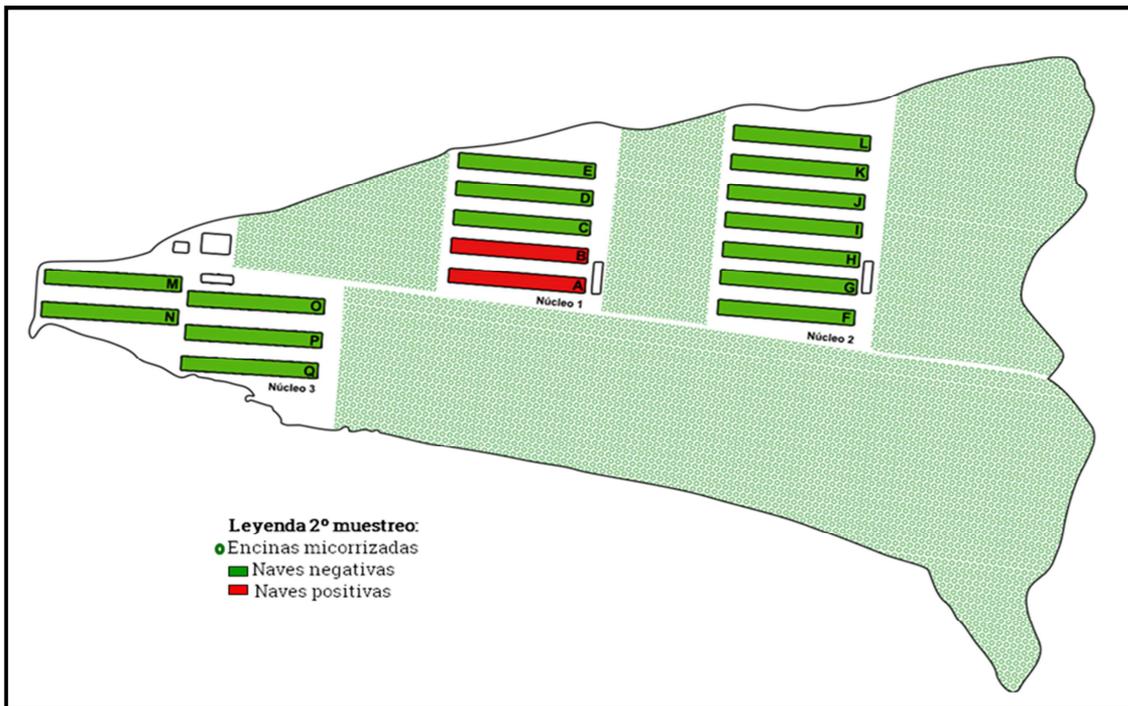


Figura 24. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/09/28. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. La nave A y B del núcleo 1 ha mostrado un resultado positivo para esta bacteria

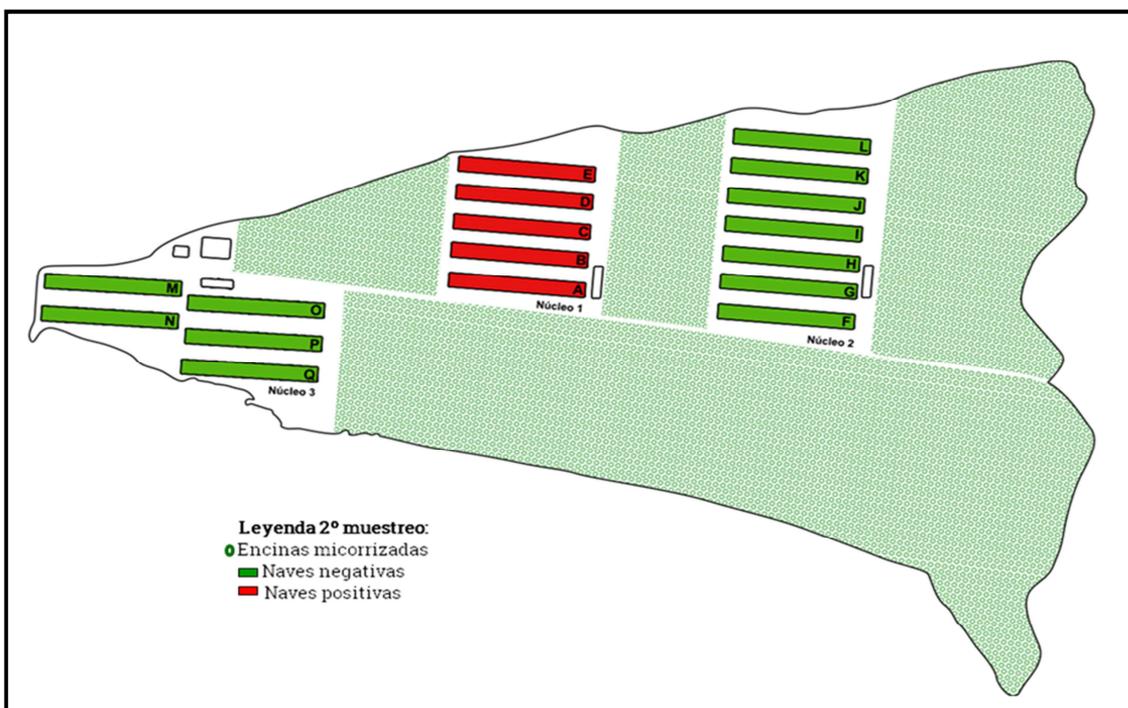


Figura 25. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/06. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Todas las naves del núcleo 1 fueron positivas (A-E)

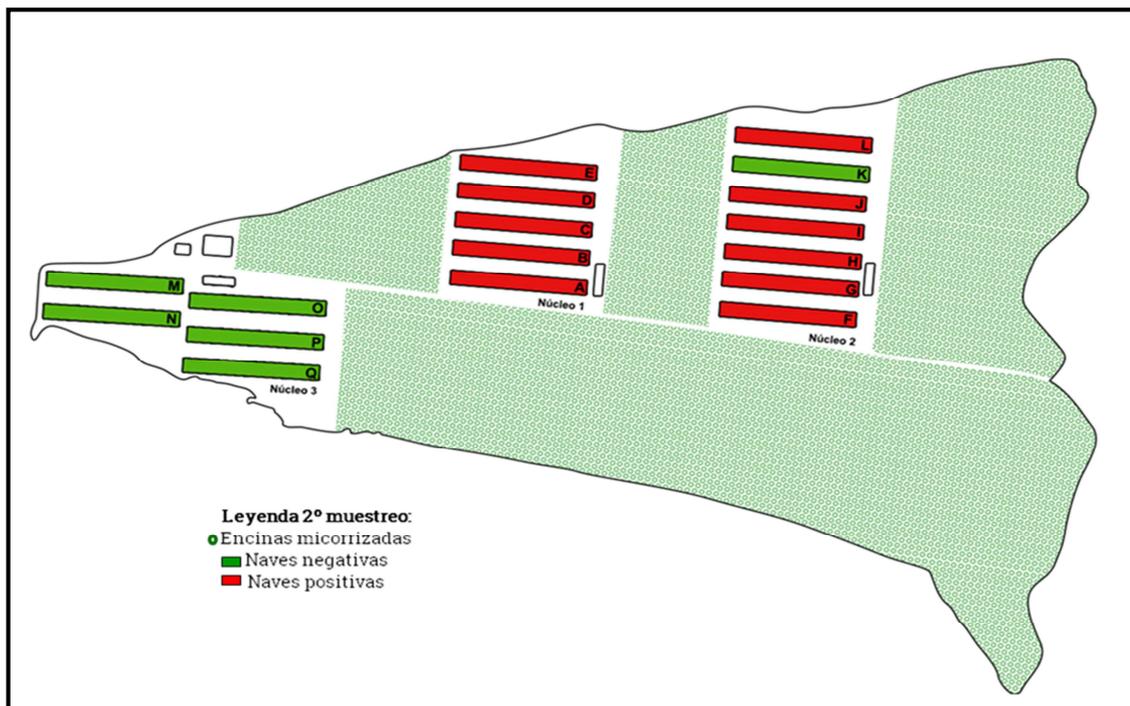


Figura 26. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/13. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Todas las naves del núcleo 2, con excepción de la nave K, fueron positivas para este patógeno (F-J y la L)

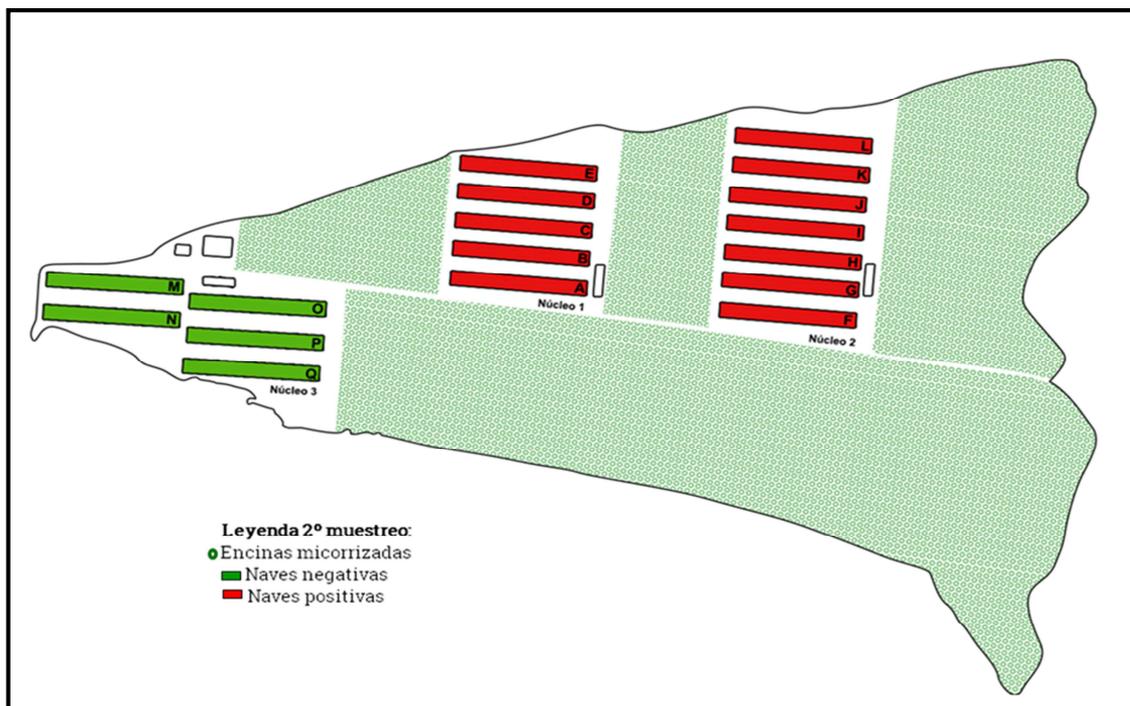


Figura 27. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/18. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. La nave K del núcleo 2 fue positiva

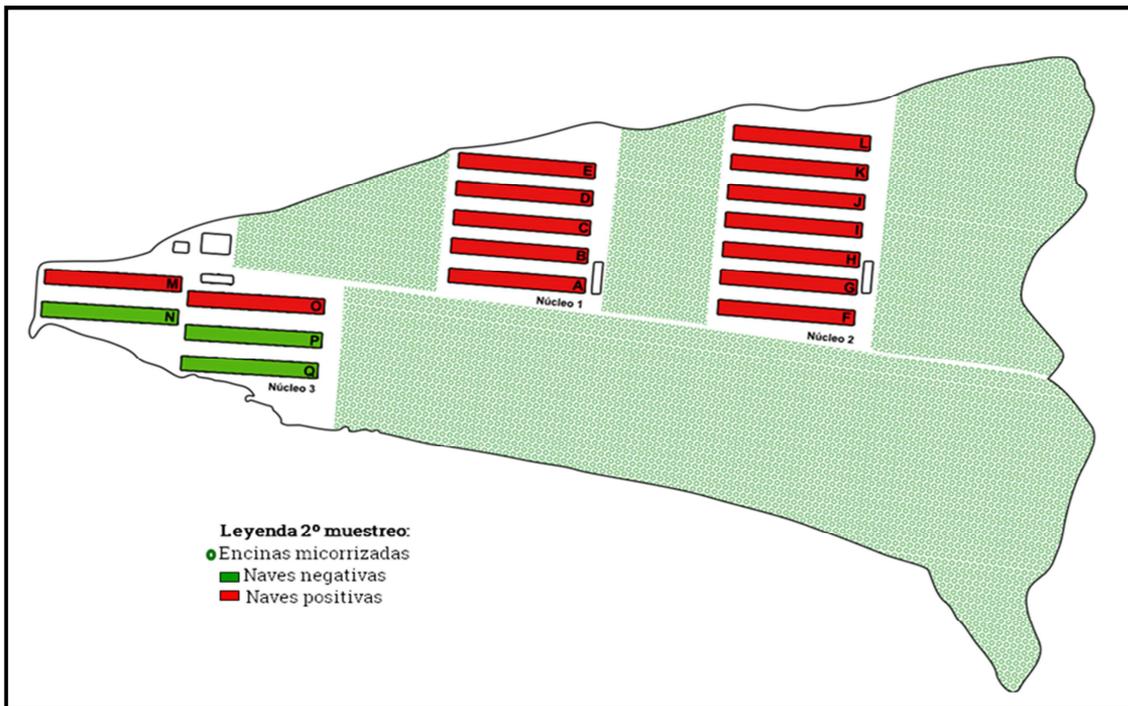


Figura 28. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/27. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Las naves M y O del núcleo 3 tuvieron un resultado positivo

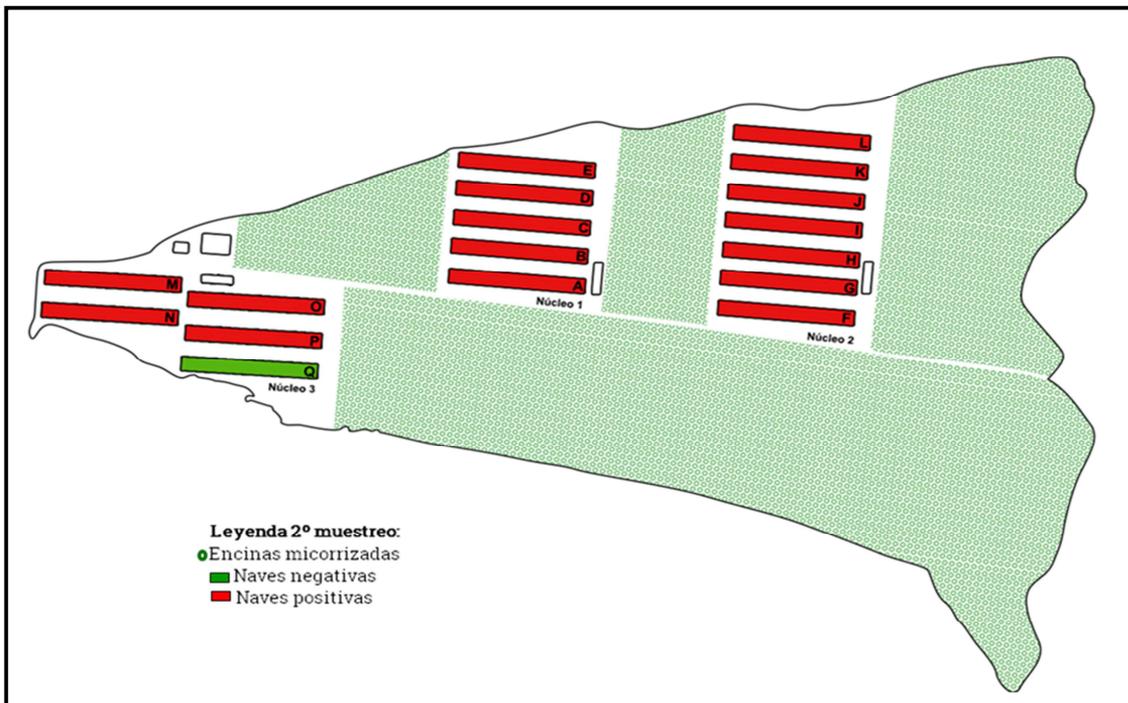


Figura 29. Explotación Montes del Palancia en la semana 2016/10/27. Esta figura corresponde a las naves muestreadas con resultado negativo (verde) y resultado positivo (rojo) a *Campylobacter*. Las naves N y P del núcleo 3 mostraron un resultado positivo a este patógeno

1.4 Análisis de los antibiogramas por la técnica BDM

La interpretación de los resultados, a partir de las colonias crecidas en agar sangre, se puede realizar de manera visual o a través de la lectura de la DO con un espectrofotómetro a 620 ó 690 nm, según se puede observar en la tabla 45. En este caso se ha realizado una interpretación visual de los mismos.

Tabla 45. Interpretación de los resultados del kit AviPro® PLATE

	Lectura Visual		Lectura Espectrofotómetro (OD)		Interpretación clínica
	LB	UB	LB	UB	
Crecimiento bacteriano	-	-	< 0,1	< 0,1	S
	+	-	≥ 0,1	< 0,1	I
	+	+	≥ 0,1	≥ 0,1	R

Leyenda: LB (menor concentración de antibiótico), UB (mayor concentración de antibiótico), + (crecimiento bacteriano, turbidez), - (categoría establecida para decir que no ha sido determinada para todos los antibióticos todavía), S (sensible), I (intermedio) y R (resistente).

La tabla 46 recoge los resultados de las 23 cepas de *Campylobacter* aisladas para los 21 antibióticos que dispone el kit AviPro® PLATE. Se recuerda que el número de análisis positivos frente a dicho germen, mediante técnicas de qPCR, fue superior. Este hecho podría ser debido a la detección de ADN en baja concentración sin llegar a conseguir ningún aislamiento debido a la sensibilidad de la técnica utilizada (Hadgu et al., 1999; Lawson et al., 1999).

La siguiente tabla recoge el fenotipo antimicrobiano presente en cada una de los diferentes aislados. Se puede encontrar fenotipos sensibles, intermedios o resistentes según la sensibilidad que posea el antibiótico a la cepa de *Campylobacter* enfrentada.

Tabla 46. Fenotipos de los antibióticos detectados en los aislados de Montes del Palancia

Aislados <i>Campylobacter</i>	PEN	AMOX	ENR	CET	CPP	CTX	TLS	TET	TILM	NEO	LIS	T/S	OXA	CST	ERY	DOX	TIA	LIN	ERD	STREP	RAM	C*
2016/08/16 (Nave H)	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/08/22 (Nave B)	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	OK
2016/08/22 (Nave D)	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	OK
2016/08/22 (Nave E)	R	R	I	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	I	S	R	S	S	R	OK
2016/08/22 (Nave G)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/08/22 (Nave K)	R	R	I	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	OK
2016/08/29 (Nave A)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/08/29 (Nave N)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/08/29 (Nave Q)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/09/28 (Nave A)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/09/28 (Nave B)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/10/06 (Nave C)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/10/06 (Nave D)	R	R	I	R	S	R	I	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/10/06 (Nave E)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/10/13 (Nave F)	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	OK
2016/10/13 (Nave G)	R	R	I	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	OK
2016/10/13 (Nave H)	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/10/13 (Nave I)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/10/13 (Nave J)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	OK
2016/10/13 (Nave L)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/10/18 (Nave K)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/10/27 (Nave M)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	R	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK
2016/10/27 (Nave O)	R	R	I	R	S	R	I	R	S	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	OK

Leyenda: PEN (penicilina G), AMX (amoxicilina), ENR (enrofloxacino), CET (ceftiofur), CPP (cefepodoxima proxetil), CTX (cefotaxima), TLS (tilosina), TET (tetraciclina), TILM (tilmicosina), NEO (neomicina), LIS (lincospectina/espectinomicina), T/S (sulfametoxazol/trimetropima), OXA (oxacilina), CST (colistina), ERY (eritromicina), DOX (doxiciclina), TIA (tiamulina), LIN (lincomicina), ERD (eritromicina que discierne Salmonella de campo frente a la empleada en las vacunas vivas de Lohmann), STRE (estreptomicina), RAM (rifampicina), C*(crecimiento), S (sensible), I (intermedio) y R (resistente)

Para facilitar el conocimiento del porcentaje de fenotipos presentes en nuestra población se ha llevado a cabo la realización de la tabla 50 en la que se visualiza, además de los diferentes fenotipos existentes, los intervalos de confianza correspondientes a todos ellos.

Tabla 47. Porcentaje e intervalo de confianza según los fenotipos de los antibióticos detectados en los aislados de Montes del Palancia

Antibiótico	Tipo de fenotipo					
	S (%)	IC _{95%}	I (%)	IC _{95%}	R (%)	IC _{95%}
PEN	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82	100,00	85,18-100,00
AMOX	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82	100,00	85,18-100,00
ENR	0,00	0,00-14,82	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82
CET	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82	100,00	85,18-100,00
CPP	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
CTX	26,09	10,23-48,41	0,00	0,00-14,82	73,91	51-60-89,77
TLS	4,35	0,11-21,95	86,96	66,41-97,23	8,70	1,07-28,04
TET	4,35	0,11-21,95	0,00	0,00-14,82	95,65	78,05-99,89
TILM	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
NEO	95,65	78,05-99,89	0,00	0,00-14,82	4,35	0,11-21,95
LIS	91,30	71,96-98,93	0,00	0,00-14,82	8,70	1,07-28,04
T/S	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82	100,00	85,18-100,00
OXA	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
CST	4,35	0,11-21,95	0,00	0,00-14,82	95,65	78,05-99,89
ERY	95,65	78,05-99,89	4,35	0,11-21,95	0,00	0,00-14,82
DOX	21,74	7,46-43,70	78,26	56,30-92,54	0,00	0,00-14,82
TIA	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
LIN	95,65	78,05-99,89	0,00	0,00-14,82	4,35	0,11-21,95
ERD	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
STREP	100,00	85,18-100,00	0,00	0,00-14,82	0,00	0,00-14,82
RAM	56,52	34,09-78,96	0,00	0,00-14,82	43,48	21,05-65,91

Leyenda: PEN (penicilina G), AMX (amoxicilina), ENR (enrofloxacino), CET (ceftiofur), CPP (cefepodoxima proxetil), CTX (cefotaxima), TLS (tilosina), TET (tetraciclina), TILM (tilmicosina), NEO (neomicina), LIS (lincospectina/espectinomicina), T/S (sulfametoxazol/trimetropima), OXA (oxacilina), CST (colistina), ERY (eritromicina), DOX (doxiciclina), TIA (tiamulina), LIN (lincomicina), ERD (eritromicina que discierne Salmonella de campo frente a la empleada en las vacunas vivas de Lohmann), STRE (estreptomicina), RAM (rifampicina), S (sensible), I (intermedio) y R (resistente), IC_{95%} (intervalo de confianza al 95%)

Los resultados referentes a las penicilina G y amoxicilina (grupo β -lactámicos) indican un claro resistotipo frente a ambos (100%). Los datos de resistencia frente a las quinolonas de esta Memoria concuerdan con los descritos en la bibliografía a nivel nacional ya que el porcentaje de cepas resistentes de *C. jejuni* al antibiótico ciprofloxacino entre los años 2002-2003 eran del 85% (Simjee et al., 2007). Con respecto a la tetraciclina el valor reflejado en nuestras experiencias concuerda con lo descrito por Zhao et al., (2016) (95,65% vs 94,74%). Estos resultados pueden ser debidos al uso inadecuado de terapias antibióticas y a la transferencia horizontal de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas que hace que se diseminen rápidamente (Lee et al., 1994; van Essen-Zandbergen et al., 2007; Piddock et al., 2008).

Gallay et al. (2007) encontraron mediante la técnica de difusión en disco unas prevalencias fenotípicas distintas a las que se recogen en la tabla anterior (tabla

48). Se observa como estas prevalencias durante los años 1999-2004, tanto para el grupo de las tetraciclinas como para el de las fluoroquinolonas, son más pequeñas que en nuestro estudio, llegando a disminuir hasta en un 9,40% de aislados resistentes en el último año del estudio. Por otra parte, todos los aislados procedentes de *C. coli* en la tabla presentan tasas de resistencia mayores para ambos grupos antimicrobianos, aunque también disminuyen en el año 2004. En nuestro estudio, los porcentajes de tetraciclinas y fluoroquinolonas se asemejan a los encontrados en el año 2002 por Gallay et al. (2007).

Tabla 48. Resistencias a *C. jejuni* y *C. coli* frente a tetraciclinas y fluoroquinolonas en Francia durante los años 1999-2004 (Gallay et al., 2007)

Año	Grupo Antibiótico	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)
1999	Tetraciclinas	56,60	69,80
	Fluoroquinolonas	16,80	39,60
2000	Tetraciclinas	55,20	60,00
	Fluoroquinolonas	23,50	28,60
2001	Tetraciclinas	65,60	80,00
	Fluoroquinolonas	29,50	37,80
2002	Tetraciclinas	67,50	84,40
	Fluoroquinolonas	31,70	41,30
2003	Tetraciclinas	60,90	96,70
	Fluoroquinolonas	13,30	41,00
2004	Tetraciclinas	40,60	71,60
	Fluoroquinolonas	9,40	32,40

El punto de corte en humanos establecido por el organismo EUCAST para las técnicas estandarizadas de difusión en disco y el método BDM (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf, validado desde el 2017/03/10) para los aislados de *C. jejuni* y para *C. coli* se plasma en la tabla 52. Se recoge en ella, una ausencia del fenotipo intermedio, estableciéndose así solamente dos fenotipos: sensible o resistente.

Esta tabla posee valores para la MIC sobre la eritromicina presente en el kit AviPro® PLATE, donde en este, la concentración máxima es de 4 mg/l, para la fluoroquinolona (enrofloxacino) posee un valor de 4 mg/l y para las tetraciclinas de 8 mg/l.

Tabla 49. Punto de corte para el método de difusión en disco y el método BDM, según EUCAST, para *C. jejuni* y *C. coli* en diferentes antibióticos

Grupo Antibiótico	Punto de corte MIC (mg/l)		Concentración disco antibiótico (µg)	Punto de corte diámetro (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Ciprofloxacino	0,5	0,5	5	26	26
¹ Eritromicina	4	4	15	20	20
² Eritromicina	8	8	15	24	24
Tetraciclina	2	2	30	30	30

Leyenda: Ciprofloxacino (fluoroquinolona), ¹eritromicina para *C. jejuni* (macrólido), ²eritromicina para *C. coli* (macrólido), tetraciclina (tetraciclinas)

Aunque los valores destacados como puntos de corte para evaluar la sensibilidad en la campilobacteriosis humana según el organismo estadounidense CLSI, se

plasman en la tabla 50 (Ge et al., 2013), como se puede comprobar estos valores difieren en parte con respecto al organismo europeo (EUCAST) dado que se establecen 3 fenotipos en vez de 2: sensible, intermedio y resistente.

Tabla 50. Punto de corte para el método de difusión en disco y el método BDM según CLSI, para *C. jejuni* y *C. coli* en diferentes antibióticos

Grupo Antibiótico	Punto de corte MIC (mg/l)			Concentración disco antibiótico (µg)	Punto de corte diámetro (mm)		
	S ≤	I	R ≥		S ≥	I ≥	R
Ciprofloxacino	1	2	4	5	6	6	6
Eritromicina	8	16	32	15	6	6	6
¹ Tetraciclina	4	8	16	-	-	-	-
² Doxiciclina	2	4	8	-	-	-	-

Leyenda: Ciprofloxacino (fluoroquinolona), eritromicina (macrólido), ¹tetraciclina (tetraciclinas) y ²doxiciclina (tetraciclinas)

En nuestro caso se ha utilizado el kit comercial AviPro® *PLATE* diseñado para estudiar las cepas de *Campylobacter* detectadas en pollos mediante la técnica de microdiluciones que recoge información sobre la sensibilidad de los antibióticos, que puede resultar comparable con los valores de corte establecidos por estos organismos de referencia según el enfoque de nuestro objetivo. Esta información aportada por ambas entidades sirve de gran ayuda ya que permite conocer la forma en que se debe trabajar si se desea estudiar su fenotipo bacteriano (sensibilidad bacteriana) tanto a nivel internacional o como europeo.

1.5 Análisis de los genes de resistencia

La tabla 51 muestra la temperatura de fusión específica del amplicón tras la realización de cada prueba de qPCR mediante el fluorocromo *SYBR Green I*.

Tabla 51. Temperaturas de fusión de los diferentes amplicones de genes de resistencia mediante el fluoróforo *SYBR Green I*

Pareja de cebadores	T _m
CmeB	77,50
Tet O	78,50
BLA OXA61	79
Lin C	77
Trl D	-
Trl B	-
Lin B	-

La realización de un análisis multiparámetro acerca del estudio de genes de resistencia en bacterias (*Campylobacter* en este caso), mediante el fluoróforo *SYBR Green I*, posee la ventaja de poder realizarse simultáneamente gracias a la observación de las temperaturas de fusión correspondientes a cada pareja de cebadores, además de ser una técnica rápida, fiable y económica (Yang et al., 2004; Ivanova et al., 2014; Law et al., 2014).

Para todos los aislados bacterianos, los resultados procedentes de los genes se detallan en la tabla 52. Estos se han obtenido a partir de la lectura e interpretación de las técnicas moleculares realizadas, qPCR y PCR convencional. Para los resultados de qPCR se ha observado el valor de C_q y las diferentes

temperaturas de fusión, y para los de la PCR convencional, la observación de bandas específicas en geles de agarosa. Las figuras 14-18 que figuran en el Anexo verifican esta información.

Tabla 52. Resultados de los genes de resistencia más frecuente en pollos para los diferentes aislados

Referencia	BLA OXA61	CmeB	TetO	TrlB	TrlD	LinB	LinC
2016/08/16 (Nave H)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Pres
2016/08/22 (Nave B)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/22 (Nave D)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/22 (Nave E)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/22 (Nave G)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/22 (Nave K)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/29 (Nave A)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/29 (Nave N)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/08/29 (Nave Q)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/09/28 (Nave A)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/09/28 (Nave B)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/06 (Nave C)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/06 (Nave D)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/06 (Nave E)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave F)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave G)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave H)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave I)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave J)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/13 (Nave L)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/18 (Nave K)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/27 (Nave M)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/10/27 (Nave O)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/11/03 (Nave N)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus
2016/11/03 (Nave P)	Pres	Pres	Pres	Aus	Aus	Aus	Aus

Leyenda: BLA OXA 61 (β -lactámicos), CmeB (bomba eflujo), TetO (tetraciclinas), TrlB (tilosina gen B), TrlD (tilosina gen D), LinB (lincomicina gen B), LinC (lincomicina gen C), Pres (presente) y Aus (ausente)

Los resultados obtenidos mediante las técnicas de PCR revelaron que todos los aislados analizados presentaban genes de resistencia en *Campylobacter* para los grupos β -lactámicos (*bla*_{OXA61}), tetraciclinas (*tet* (O)), macrólidos (CmeB) y fluoroquinolonas (CmeB). Estos hallazgos concuerdan de manera similar con lo descrito por otros autores (Griggs et al., 2009; Zhao et al., 2016).

Con respecto a la tilosina, que se encuentra dentro del grupo de los macrólidos, produjo resultados negativos en todos los aislados, es decir, no se detectó la presencia de los genes B (*trlB*) ni D (*trlD*) correspondientes a dicho antibiótico. La elección del estudio de estos genes específicos no descritos en la bibliografía para el G^o *Campylobacter* tuvo su origen en la búsqueda realizada para otras bacterias Gram negativas (como *E. coli*). Estos genes codifican las enzimas metiltransferasas que incorporan un solo metilo a los nucleótidos G748 y A2058 de la región 23S ARNr (Liu y Douthwaite, 2002). Además de ello, un aislamiento de *C. jejuni* mostró una mutación en la posición A2058 (Gibreel et al., 2005). Por este motivo, se decidió diseñar una pareja de cebadores para cada gen y realizar varias reacciones adicionales de cara a detectar la presencia de estos genes a

partir de nuestros aislados. Sin embargo, se detectó el gen de la bomba de eflujo (CmeB) inespecífica para macrólidos y fluoroquinolonas en todos los aislados, este hallazgo se correlacionó en alto grado con la detección del 86,96% de fenotipo intermedio para dicho macrólido. Esta bomba parece tener mayor efecto sobre la resistencia en macrólidos (Payot et al., 2005).

La detección de la presencia del gen *Inu* (B) para el antibiótico lincomicina mostró un resultado negativo, sucedió lo mismo que acabamos de observar para el caso de los genes de resistencia de la tilosina. No fue así para el gen *Inu* (C) del antibiótico lincomicina que, según Zhao et al. (2016), fueron los primeros en detectarlo para esta bacteria. En nuestros aislados solamente se ha detectado el gen *Inu* (C) para la especie de *Campylobacter*, *C. coli*, además concuerda con ser el único aislado detectado con el kit AviPro® PLATE y que muestra un fenotipo resistente.

Posteriormente, se ha realizado una tabla sobre la relación existente entre el fenotipo y el genotipo presente en todos los aislados (tabla 53).

Tabla 53. Correlación sobre la resistencia entre el fenotipo y el genotipo en *Campylobacter*

Grupo antimicrobiano	Agente antimicrobiano	Nº aislados (n=23) con fenotipo (S, I, R)	Presencia de genes de resistencia o mutaciones correspondientes al fenotipo de resistencia (nº aislados, n=23)	Correlación entre fenotipo y genotipo (%)
β-lactámicos	Amoxicilina	R,23	<i>bla</i> _{OXA61} , 23	100 (23/23)
Tetraciclinas	Tetraciclina	R,22	<i>tet</i> (O), 22	100 (22/22)
		S,1	<i>tet</i> (O), 1	-
	Doxiciclina	I,20	<i>tet</i> (O), 20	100 (20/20)
		S,3	<i>tet</i> (O), 3	-
Macrólidos	Tilosina	R,2	CmeB,2	100 (2/2)
		I,20	CmeB,20	100 (20/20)
		S,1	CmeB,1	-
Fluoroquinolonas	Enrofloxacino	I,23	CmeB,23	100 (23/23)
		I,22	<i>gyrA</i> The861le, 22	100 (22/22)
		(<i>C. jejuni</i>)		
Lincosamidas	Lincomicina	R,1	<i>Inu</i> (C), 1	100 (1/1)
		S,22	Ninguno	100 (22/22)

Leyenda: R (resistente), I (intermedio), S (sensible), - (correlación negativa)

Se ha observado que para el antibiótico amoxicilina la correlación entre la presencia del gen *bla*_{OXA61} y el fenotipo resistente fue del 100%.

Para la familia de las tetraciclinas la presencia del genotipo *tet* (O) fue del 100% aunque no ocurre lo mismo para el fenotipo resistente de la molécula química tetraciclina que asciende a un 95,65%, ni para la doxiciclina que refleja mayoritariamente un fenotipo intermedio (78,26%). Existe una correlación del 100% para el resistotipo y la detección del gen *tet* (O) en tetraciclina y del 100% para el fenotipo intermedio y el *tet* (O). Como se comprueba no ocurre lo mismo con los aislados sensibles para dichos fármacos y que poseen este gen.

La tilosina no posee ningún gen específico de resistencia (*trlB* y *trlD*) pero sí se ha detectado la presencia del gen de la bomba de eflujo inespecífico (CmeB) en todos los aislados para macrólidos y quinolonas. Estos resultados nos muestran

una correlación total entre los fenotipos, resistente e intermedio, para el gen *CmeB*, pero no así para el fenotipo sensible. Por ello, se tendría que enfocar el estudio de las posiciones 2074 y 2075 del dominio V del gen *rrn* que codifica para 23S rRNA ya que se trata del mecanismo que genera un mayor valor de CMI (Gibreel et al., 2005; Luangtongkum et al., 2009). El fenotipo resistente para este antibiótico es de tan solo 8,70% y para el intermedio de 86,96%.

El enrofloxacino posee exclusivamente un fenotipo intermedio en todos los aislados. Desde un punto de vista genético, se menciona la presencia de la bomba de eflujo inespecífica (*CmeB*) en todos ellos y, la mutación en la región QRDR del gen *gyrA* para todas las cepas de *C. jejuni*. En cambio, un estudio polaco sobre la sensibilidad de cepas procedentes de *Campylobacter* aisladas de pollos, durante los años 1994-1996, reflejó un 52,10% de genotipos resistentes para el antibiótico enrofloxacino y durante los años 2005-2008 fue del 92,30% (Wozniak, 2011). Este último valor se asemeja al detectado en nuestro Trabajo.

Por último, la correlación entre el fenotipo y genotipo del antibiótico lincomicina fue del 100% para el gen *lnu* (C). El análisis kappa de Cohen, para este aislado de *C. coli*, entre el fenotipo resistente del antibiótico lincomicina y su genotipo (*lnu* (C)) ha reflejado un valor de 1 y $p < 0,001$. Es el único valor que se puede analizar ya que el resto solamente poseen una única variable (presencia o ausencia).

Los antimicrobianos que tuvieron una correlación fuerte (100%) entre los genotipos de resistencia y los fenotipos detectados, sugieren que los métodos de PCR y secuenciación serían un indicador fiable de resistencia. Se cree que para el resto de antimicrobianos que reflejaron una correlación negativa es recomendable revisar los protocolos con el fin de optimizar de nuevo dichas técnicas. Además de ello, se puede ampliar el número de genes de resistencia o secuenciaciones con el fin de garantizar un resultado que abarcara un análisis más profundo.

La prueba de sensibilidad fenotípica sigue siendo necesaria para tener en cuenta la resistencia y detectar sus mecanismos. Si se conoce qué genes de resistencia están presentes en las cepas de *Campylobacter* resultaría una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias, mediante programas de vigilancia, que hagan frente a la resistencia antimicrobiana (Zhao et al., 2016).

Para la detección de cepas multirresistentes se ha seguido la definición recogida en el PNRA (2015) que establece que un aislado bacteriano tiene que presentar resistencia en, al menos, tres o más familias de antimicrobianos de uso habitual. En este Trabajo se ha seleccionado uno antibiótico de cada familia, es decir, para el grupo de β -lactámicos (amoxicilina), tetraciclinas (tetraciclina y doxiciclina), macrólidos (tilosina), fluoroquinolonas (enrofloxacino) y lincosamidas (lincomicina), y se ha observado cuantas bacterias poseen resistencia a estos grupos. Se ha detectado un alto porcentaje de cepas de *Campylobacter* multirresistentes (86,96%), aisladas de pollos de engorde, para la gran mayoría de los antimicrobianos que presentan un resistotipo frente a: amoxicilina, doxiciclina, tilosina y enrofloxacino. Este porcentaje se ha establecido según las directrices que marcan Magiorakos et al (2012) donde se refleja que una cepa es MDR cuando uno o más agentes antimicrobianos dentro de tres o más familias posee resistencia para un único aislado. Cabe resaltar que el único aislado de

C. coli posee resistencia frente amoxicilina, tetraciclina, doxiciclina, tilosina, enrofloxacino y lincomicina. Este resultado concuerda con un estudio realizado por la EFSA (2016a) donde se detectó un mayor porcentaje de multirresistencias en *C. coli* con relación a *C. jejuni*.

No existe ninguna clasificación estándar para determinar los agentes o familias de antimicrobianos que se deberían utilizar al definir la MDR. De esta manera, la resistencia de un aislado frente a un único agente dentro de una familia se propone como un indicador de resistencia a los antimicrobianos en ese grupo. Este planteamiento se refuerza por la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN) donde una cepa bacteriana se considera resistente a una familia cuando es resistente a uno o más agentes antimicrobianos de esa categoría (Kallen et al., 2010).

La detección del gen de resistencia por sí solo no genera un fenotipo resistente, para ello se debe realizar un estudio *in vitro* de dicha colonia sobre su MIC o halo de inhibición. Si bien es cierto, que el simple hecho de detectar un fenotipo resistente va ligado a la detección de uno o varios genes de resistencia (Zhao et al., 2016).

Los resultados de la secuenciación de la región QRDR, incorporada al gen *gyrA*, sobre los aislados de *C. jejuni* para el enrofloxacino, se refleja en la tabla X. En ella aparece la codificación aminoacídica correspondiente al triplete de nucleótidos de las regiones que presentan interés para este estudio. Además, se incluyen dos cepas de *C. jejuni* con mutaciones en este gen que ayudan en la interpretación de los resultados.

El único aislado de *C. coli* detectado en este muestreo ha revelado una ausencia de mutaciones en la región QRDR, es decir, se trata de una cepa que no tiene resistencia a este gen, aunque tal y como se acaba de mencionar esta bacteria posee un genotipo resistente para el gen inespecífico de la bomba de eflujo (CmeB), hecho que concuerda con la detección de un fenotipo intermedio. La ausencia de mutaciones en la región QRDR en este gen se ha descrito para bacterias como *Salmonella* (Barreiros de Souza et al., 2011).

En la tabla 54 se puede comprobar la existencia de mutaciones en la región QRDR incorporada al gen *gyrA* sobre los aislados de *C. jejuni* y qué cambio aminoacídico produce dicha mutación. También, se incluyen dos cepas de *C. jejuni*, procedentes de un base de datos de secuencias genéticas (*Genbank*), para comparar los resultados obtenidos.

Tabla 54. Mutaciones sobre la región QRDR del gen *gyrA* para los aislados de *C. jejuni*

Referencia_Muestra	Muestreo	Codones región QRDR (gen <i>gyrA</i>)												
		22	70	86	87	90	104	106	149	203	206	237	272	285
<i>C. jejuni</i> _ KF845970	Genbank	S	A	I	A	D	P	I	V	S	T	R	A	K
<i>C. jejuni</i> _ KF846002	Genbank	S	A	I	A	D	P	I	V	S	A	R	A	K
Nave B (2016/08/22)	1	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	T	R
Nave D (2016/08/22)	1	G	A	I	A	D	P	I	V	S	A	R	A	K
Nave G (2016/08/22)	1	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave A (2016/08/30)	1	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave N (2016/08/30)	1	G	A	I	A	D	P	I	V	S	A	R	A	K
Nave Q (2016/08/30)	1	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave A (2016/09/30)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave B (2016/09/30)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave C (2016/10/06)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave D (2016/10/06)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave E (2016/10/06)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave F (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave G (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave H (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave I (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave J (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave L (2016/10/14)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave K (2016/10/19)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave M (2016/10/28)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave O (2016/10/28)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave N (2016/11/03)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R
Nave P (2016/11/03)	2	S	A	I	A	D	P	I	V	N	A	C	A	R

Legenda: A (alanina), C (cisteína), D (aspartato), G (glicina), K (lisina), I (isoleucina), N (), P (prolina), R (arginina), S (serina), T (treonina) V (valina), codón 20 (Ser22Gly), codón 70 (Ala7Thr), codón 86(Thr86Ile), codón 87 (Ala87Pro), codón 90 (Asp90Asn), codón 104 (Pro104Ser), codón 106 (Val106Ile), codón 149 (Val149Ile), codón 203 (Asn203Ser), codón 206 (Ala206Thr), codón 237 (Cys237Arg), codón 272 (Ala272Thr), codón 285 (Arg285Lys)

Cabe destacar que la mutación más numerosa y que proporciona una alta CMI frente a quinolonas y fluoroquinolonas es la que se observa en el codón 86 cambiando la composición aminoacídica de treonina a isoleucina (Thr86Ile). En cambio, la mutación presente en esta misma región pero cambiando el aminoácido (Thr86Ala) confiere baja resistencia a ciprofloxacino pero alta resistencia al ácido nalidíxico (Wang et al., 2003). Sin embargo, esta última mutación no se encuentra en ninguno de nuestros aislados. Por otra parte, se observa mutación en la región Val106Ile en todos los aislados (Piddock et al., 2003).

También se han detectado mutaciones y polimorfismos fuera de la región QRDR como Ser22Gly, Asn203Ser y Ala206Thr, cuya detección implicaba cierta resistencia que posteriormente se descartó por Jesse et al. (2006). Además, se ha descrito otra mutación en el codón Arg285Lys, procedente de un aislado de *Campylobacter* a partir de un lote de vacuno de cebo, ligado a un aumento de su CMI (Tang et al., 2017). Por otra parte, existen otras mutaciones presentes en este estudio que no han sido descritas previamente para *Campylobacter*, como son la establecida para *E. coli* (Cys237Arg) (Rodrigues, 2014) y la que se observa en el

codón Ala272Thr descrita en *Pseudomonas aeruginosa* (Chung et al., 2012). Estos resultados se deben tener en cuenta como información adicional al estudiar dicha región perteneciente al gen *gyrA* de este patógeno.

Asimismo, en la diagonal inferior de la tabla 55 se presentan los números de sustituciones de bases por sitios entre las secuencias de la región QRDR del gen *gyrA*. En la diagonal superior se encuentran las estimaciones del error estándar. El análisis fue realizado en 24 secuencias de nucleótidos, comparando 821 posiciones entre todas las secuencias, aplicando el modelo de Máxima Verosimilitud, realizado con el *software* MEGA6. El objetivo radica en observar el porcentaje de homología o de variación que presentan entre sí dichos aislados. El porcentaje de homología mínimo observado fue de un 98,3%, es decir, tan solo se detectaron un máximo de 14 nucleótidos distintos entre las secuencias más extremas, tales como el aislado de *C. jejuni* procedente de la nave B (2016/08/22) comparado con el de la nave N (2016/08/30). La gran mayoría de las secuencias analizadas revelaron valores de homología muy cercanos entre sí, en la mayoría de los casos superiores al 99%.

Por tanto, los resultados de los aislados de *Campylobacter* procedentes de la explotación Montes del Palancia evidencian la necesidad de modificar las pautas de tratamiento antimicrobianas debido a la elevada resistencia creada frente a diversos antibióticos empleados en el tratamiento de enfermedades a lo largo de la crianza de los pollos.

Tabla 55. Estimación de las divergencias evolutivas entre la región QRDR del gen *gyrA* para los aislados de *Campylobacter*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1		0,001	0,005	0,002	0,005	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	
2	0,001		0,005	0,002	0,005	0,005	0,001	0,004	0,005	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004
3	0,017	0,016		0,005	0,002	0,001	0,005	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	
4	0,004	0,002	0,016		0,005	0,004	0,001	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	
5	0,016	0,015	0,002	0,016		0,001	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	
6	0,016	0,015	0,001	0,015	0,001		0,005	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	
7	0,002	0,001	0,017	0,001	0,016	0,016		0,004	0,005	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,004	
8	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015		0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
9	0,016	0,015	0,001	0,015	0,001	0,000	0,016	0,001		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	
10	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001		0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
11	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001	0,000		0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
12	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001	0,000	0,000		0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
13	0,016	0,015	0,002	0,016	0,000	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	
14	0,016	0,015	0,002	0,016	0,001	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
15	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001		0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
16	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	
17	0,016	0,015	0,002	0,016	0,001	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
18	0,016	0,015	0,002	0,016	0,000	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001		0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	
19	0,016	0,015	0,002	0,016	0,000	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000		0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	
20	0,016	0,015	0,002	0,016	0,000	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000		0,001	0,001	0,000	0,001	
21	0,016	0,015	0,001	0,015	0,001	0,000	0,016	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001		0,000	0,001	0,001	
22	0,016	0,015	0,001	0,015	0,001	0,000	0,016	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000		0,001	0,001	
23	0,016	0,015	0,002	0,016	0,000	0,001	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001		0,001	
24	0,015	0,014	0,002	0,016	0,001	0,001	0,015	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	

Leyenda: 1 (*C. jejuni*_ KF845970), 2 (*C. jejuni*_ KF846002), 3 (Nave B (2016/08/22)), 4 (Nave D (2016/08/22)), 5 (Nave G (2016/08/22)), 6 (Nave A (2016/08/30)), 7 (Nave N (2016/08/30)), 8 (Nave Q (2016/08/30)), 9 (Nave A (2016/09/30)), 10 (Nave B (2016/09/30)), 11 (Nave C (2016/10/06)), 12 (Nave D (2016/10/06)), 13 (Nave E (2016/10/06)), 14 (Nave F (2016/10/14)), 15 (Nave G (2016/10/14)), 16 (Nave H (2016/10/14)), 17 (Nave I (2016/10/14)), 18 (Nave J (2016/10/14)), 19 (Nave L (2016/10/14)), 20 (Nave K (2016/10/19)), 21 (Nave M (2016/10/28)), 22 (Nave O (2016/10/28)), 23 (Nave N (2016/11/03)) y 24 (Nave P (2016/11/03))

La figura 33 plasma el árbol filogenético de las secuencias procedentes de la región QRDR del gen *gyrA* para los 22 aislados de *C. jejuni*. Se aprecian claramente dos grupos distintos, aunque con homología muy cercana entre ambos (0,002). Las naves D (2016/08/22) y N (2016/08/30) pertenecen al mismo grupo que las secuencias procedentes del *Genbank* para *C. jejuni*. Por otro lado, el resto de las naves se albergan en el grupo más grande. A su vez dentro de este gran grupo, se pueden apreciar cuatro subgrupos: desde la nave K (2016/10/9) hasta la nave G (2016/08/22), nave F (2016/10/14) y nave I (2016/10/14), desde la nave A (2016/08/30) hasta la nave O (2016/08/22) y, por último, desde la nave Q (2016/08/30) hasta la nave P (2016/11/03).

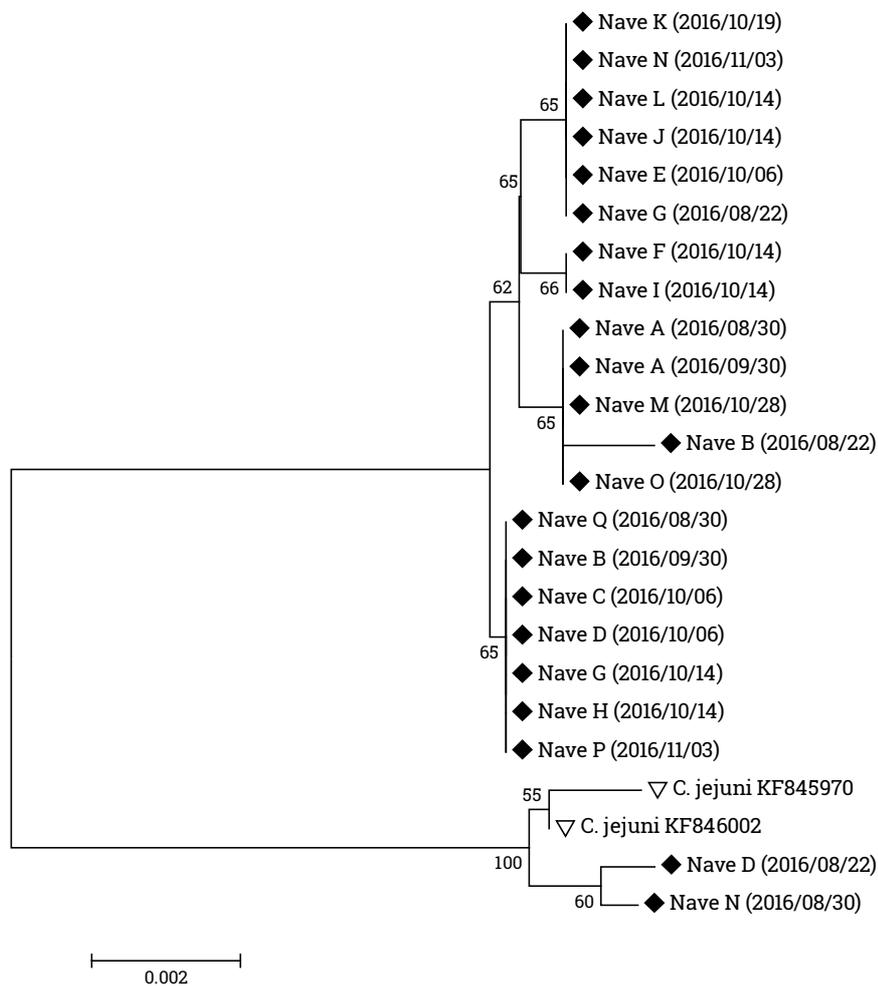


Figura 30. Árbol filogenético para las secuencias de la región QRDR del gen *gyrA*
 ◆ Secuencias de los aislados de *C. jejuni* ▽ Secuencias de referencia obtenidas del *GenBank*.
 La historia evolutiva fue inferida aplicando el método de neighbor-joining. Los números en los taxones (ramificaciones) representan el porcentaje de aparición de cada una, calculado mediante la prueba de bootstrap (1000 réplicas). Las distancias evolutivas fueron estimadas usando el método de Máxima Verosimilitud, con ayuda del *software* MEGA6.

1.6 Análisis de las identificaciones mediante huellas digitales (Rep-PCR)

Los resultados de la PCR convencional para conocer el patrón genético de los diferentes aislados con el microsatélite (GTG)₅ revelaron la presencia de dos patrones distintos, uno para todos los aislados de *C. jejuni* y otro para la cepa de *C. coli*. Como se ha citado en la revisión bibliográfica no se han encontrado estudios que hagan referencia a la utilización de este cebador para el estudio de brotes de las especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*), pero sí para *Campylobacter concisus* (Matsheka et al., 2006).

Las figuras 31 y 32 recogen el patrón genético de los 22 aislados de *C. jejuni* y del único aislado correspondiente a *C. coli*, según el *software* Gene Tools. En el apartado Anexo se puede observar la figura 19 que corresponde a la lectura de todos estos aislados en un gel de agarosa. A partir de esa foto este *software* realiza las figuras que se presentan.

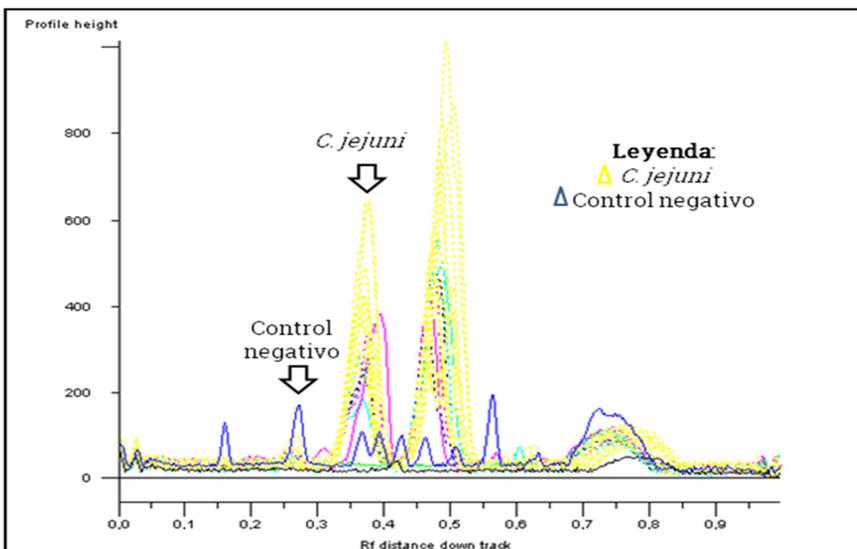


Figura 31. Patrón genético de los aislados de *C. jejuni*

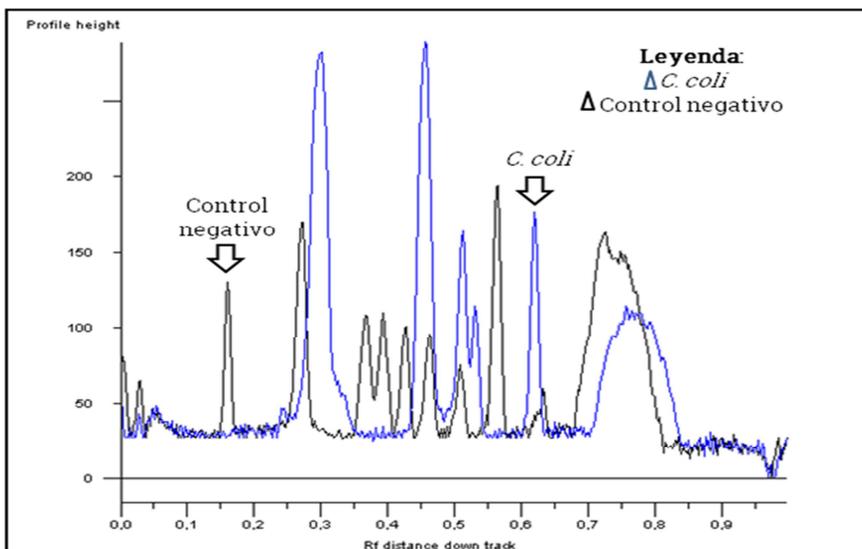


Figura 32. Patrón genético de los aislados de *C. coli*

2. Estudio de la microbiota intestinal a partir de ciegos de pollos

Este otro estudio realizado en la explotación ganadera de Cosuenda (Zaragoza) se basa en un ensayo clínico (prospectivo y experimental), dado que el investigador es quién asigna la exposición a las naves que participan en el estudio, y el resultado no se ha producido al comenzar el mismo. Por tanto, existe una nave control, que no está expuesta al pienso complementario (Vitaïd), y otra nave problema en la que si se ha administrado dicho pienso.

2.1 Análisis de secuenciación masiva

Los resultados revelan que la proporción de secuencias totales del experimento de secuenciación asignadas a cada una de las muestras osciló dentro del rango 0,69-1,59% y las 116.540-282.864 secuencias útiles tras el filtrado y trimado por calidad se plasman en la tabla 56.

Tabla 56. Distribución de muestras y diseño experimental teniendo en cuenta los dos factores de estudio: tratamiento con Vitaïd y sexo

Tipo de muestra por factor	Referencia	Nº Secuencias	% Secuencias a nivel de género	Diversidad e índice de Shannon	Nº especies
Sexo: Macho(M) Tratamiento: Vitaïd+ (V+)	Vitaïd-M41	204.309	92,15%	1.093	280
	Vitaïd-M42	212.409	91,06%	2.131	339
	Vitaïd-M43	175.348	95,20%	1.848	304
	Vitaïd-M44	121.095	86,69%	1.531	236
	Vitaïd-M45	282.864	84,32%	1.719	350
Sexo: Hembra (H) Tratamiento: Vitaïd+ (V+)	Vitaïd-H46	191.156	93,55%	1.844	314
	Vitaïd-H47	226.154	91,47%	2.166	309
	Vitaïd-H48	209.534	92,58%	2.082	319
	Vitaïd-H49	260.663	88,97%	2.173	396
	Vitaïd-H50	116.540	89,05%	2.319	341
Sexo: Macho(M) Tratamiento: Control (C)	Vitaïd-M51	202.994	96,83%	1.056	230
	Vitaïd-M52	180.017	95,90%	1.375	296
	Vitaïd-M53	191.240	95,99%	1.548	289
	Vitaïd-M54	218.736	93,63%	1.788	316
	Vitaïd-M55	248.004	85,35%	1.374	306
Sexo: Hembra (H) Tratamiento: Control (C)	Vitaïd-H56	142.089	87,62%	1.539	252
	Vitaïd-H57	242.532	85,09%	1.789	340
	Vitaïd-H58	226.858	91,63%	1.748	346
	Vitaïd-H59	207.460	82,44%	999	290
	Vitaïd-H60	215.155	93,66%	1.727	302

La profundidad de la secuenciación alcanzada para cada una de las muestras permitió abarcar gran parte de la diversidad de especies y garantizar la ausencia de un sesgo, permitiendo establecer niveles de diversidad alfa (intra-grupo) y diversidad beta (inter-grupos), así como comparaciones robustas entre individuos de distinto sexo o tratamiento.

Para la realización de los principales grupos taxonómicos es necesario disponer alrededor de 10.000 secuencias acumuladas, por tanto, tal y como se muestra en la tabla anterior se cumple con este criterio. Por otra parte, los trazos de

pendiente indican que la proporción de diversidad explorada en cada una de las muestras es similar, dibujando un *plateau* típico de metagenomas con niveles de cobertura óptimos, en los cuales el aumento del número de secuencias ya no se acompaña de un incremento tan determinante del número de OTU (Ercolini et al., 2013). La cobertura secuenciada para cada una de las muestras fue muy superior a la empleada en estudios metagenómicos intestinales previos en pollos (Ercolini et al., 2013; Shaufi et al., 2015) (ver Anexo, figura 20).

A pesar de que el análisis individual procedente de cada individuo muestra un perfil metagenómico específico, en general, se observaron patrones diferenciales atendiendo a los grupos de estudio. Los análisis comparativos con dendrogramas de agrupamiento jerárquico (*Hierarchical Clustering Dendrogram*) a nivel de género se recogen en la figura 33.

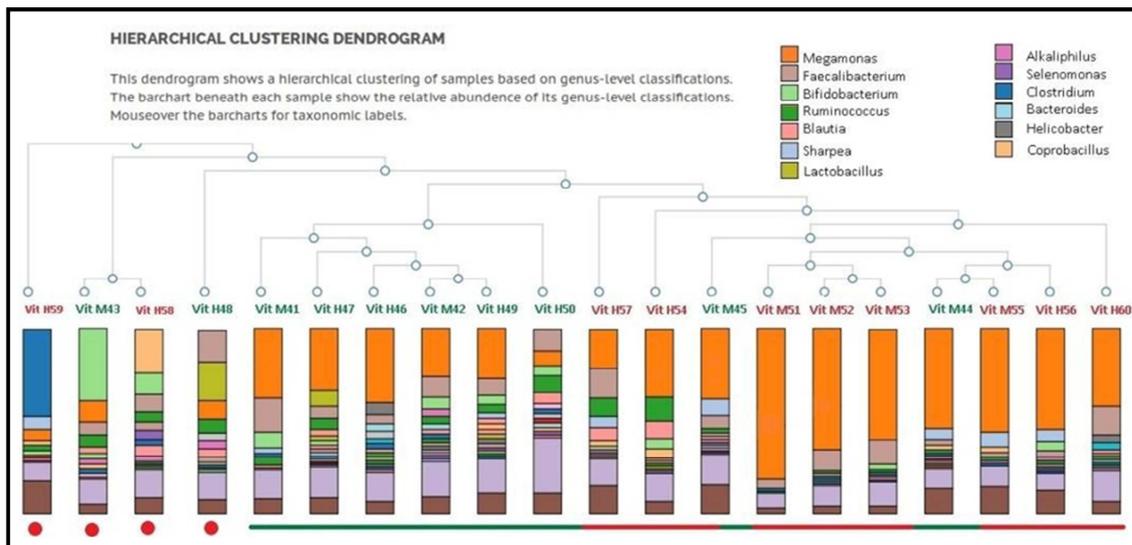


Figura 33. Dendrograma de agrupamiento jerárquico a nivel de género para las 20 muestras exploradas. Para cada perfil metagenómico se representan los principales géneros y su abundancia relativa. En la imagen se aprecia que a nivel taxonómico de género las muestras tratadas con Vitaid presentan más similitud entre sí que con las del grupo control. Se destacan con un punto rojo aquellos perfiles significativamente distintos al de los patrones observados para las dos clases de tratamiento

Aunque los resultados obtenidos muestran un agrupamiento claro, algunas de las muestras presentaron perfiles muy diferentes al resto. De hecho, cuatro de las muestras analizadas Vitaid-H59, Vitaid-M43, Vitaid-H58 y, en menor proporción, Vitaid-H48 (señaladas con un punto rojo en la Figura 3) presentaron perfiles de diversidad muy distintos, a primera vista, a los del resto de las muestras procedentes de individuos tratados o sin tratar. Este último dato sugiere que factores externos no controlados en este diseño experimental, como la carga microbiana en el momento de la infección, una distribución de patógenos diferente en cada uno de los individuos analizados e incluso variabilidad inmunológica, herencia vertical o variabilidad genética poblacional, dentro de la explotación, podrían influir en la composición de la microbiota de los ciegos, tal y como indican otros estudios metagenómicos (Sergeant et al., 2014; Schokker et al., 2015).

Por otra parte, este agrupamiento se corroboró también a nivel taxonómico de especie con los resultados derivados del análisis de coordenadas principales (PCOA) (figura 34). En este último análisis se observa un agrupamiento claro de los individuos tratados con Vitaid y los que actuaron como controles. Los resultados derivados de estos dos tipos de análisis estadísticos revelan que el factor tratamiento ejerce una influencia importante sobre los perfiles metagenómicos intestinales, tanto a nivel de género como de especie. También existe cierta variabilidad entre individuos machos y hembras.

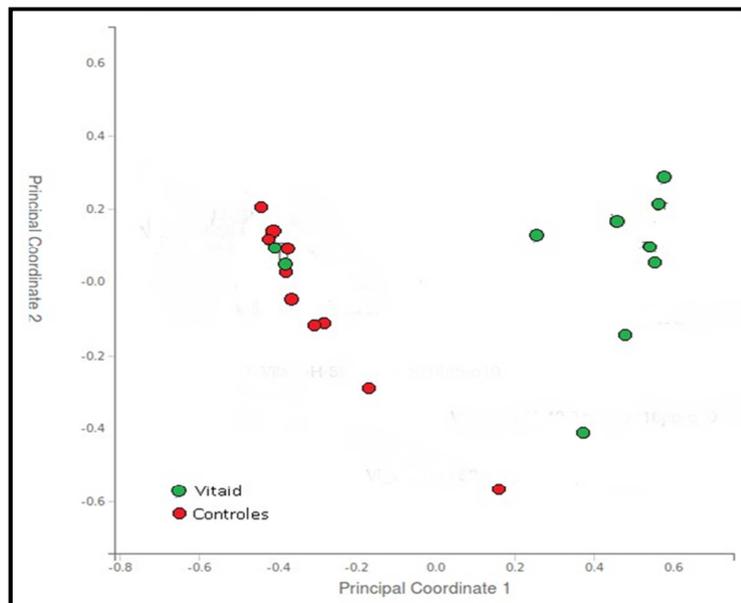


Figura 34. Análisis de coordenadas principales (PCOA) a nivel de especie para los metagenomas de los 20 individuos muestreados. Se muestra el agrupamiento de aquellos metagenomas procedentes de pollos tratados con Vitaid (verde) y de los individuos controles (rojo)

2.1.1 Diversidad microbiana observada

El primer aspecto referente a la composición microbiana analizado fue la diversidad de cada uno de los individuos muestreados. La figura 35 muestra una serie de curvas de rarefacción para el número de especies u OTU observadas con el incremento de secuencias y para los principales índices de diversidad alfa, incluyendo el índice de Shannon, Chao y PD entre las clases Vitaid (línea de color azul) y control (línea de color roja), recogidas en la parte derecha. En la parte izquierda se indica el factor sexo, donde el macho es de color azul y la hembra de color rojo. También están representados estos datos por medio de diagramas de cajas (ver Anexo, figura 21).

En las gráficas de esta figura, se observan que las hembras e individuos tratados con Vitaid presentaron una diversidad de especies mayor que los machos. Las muestras más diversas fueron las que recibieron tratamiento en detrimento de las hembras, y las mayores diferencias de diversidad alfa se observaron precisamente entre los ciegos de individuos tratados con Vitaid y el grupo control. Tal y como se comentará más adelante, las principales diferencias de abundancia entre taxones se encontraron también entre éstos dos grupos, por lo

que además de tener un contenido taxonómico distinto, la abundancia de los taxones representados en ambos grupos varió significativamente en muchos casos.

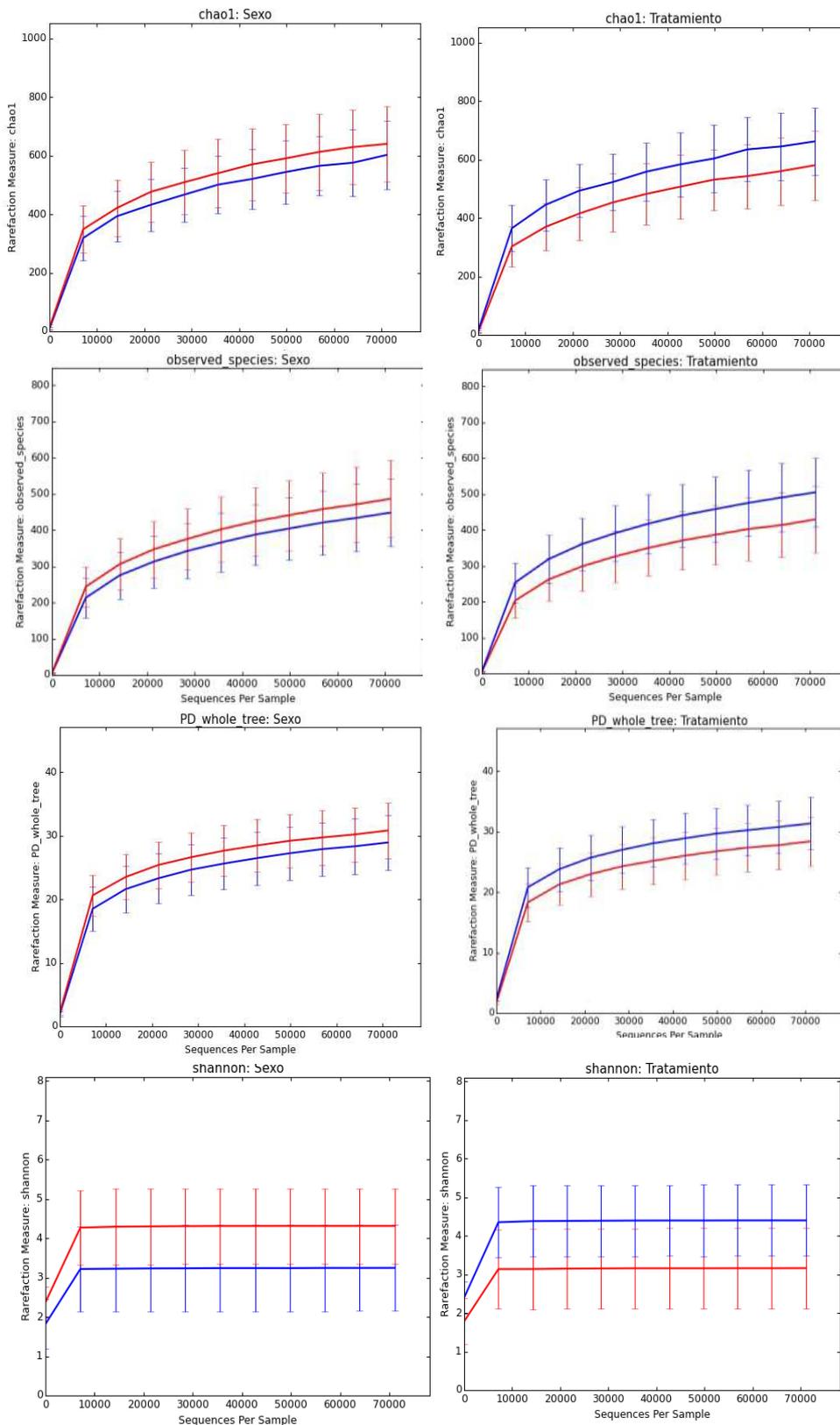


Figura 35. Curvas de rarefacción para los principales índices de diversidad alfa, incluyendo el índice de Shannon, PD y Chao

2.1.2 Principales grupos taxonómicos en los individuos control

La diversidad identificada para los taxones mayoritarios a nivel de *phylum* en el ciego de los individuos control coincidió con otros estudios realizados hasta el momento, donde los más abundantes fueron *Firmicutes* (40-85%), *Bacteroidetes* o *Proteobacteria* en segundo lugar y, por último, *Actinobacterias* (Pedroso y Lee, 2014; Sharfi et al., 2015). En cambio, en nuestro caso el *phylum Firmicutes* fue el más abundante (89,61%), seguido de *Actinobacteria* (3,80%), *Proteobacteria* (1,72%) y *Bacteroidetes* (1,27%) en último lugar (figura 36).

Dentro del *phylum Firmicutes*, y coincidiendo de nuevo con estos estudios, se encontraron representantes de tres de las cinco clases más abundantes en las muestras de ciego: *Bacilli*, *Clostridia* y *Erysipelotrichia* (figura 39).

A su vez, dentro de la clase *Clostridia* se localiza el orden más abundante en las muestras *Clostridiales* (80,34%) del que destacan la presencia de las familias y géneros más abundantes (figura 33 y 37):

- ~ F^a *Veillonellaceae* (48,12%). G^o *Megamonas* (45,78%) y G^o *Selenomonas* (1,44%).
- ~ F^a *Ruminococcaceae* (11,97%). G^o *Ruminococcus* (5,42%).
- ~ F^a *Lachnospiraceae* (10,67%). G^o *Lachnospira* (0,24%).
- ~ F^a *Clostridiaceae* (9,89%). G^o *Clostridium* (7,71%), G^o *Faecalibacterium* (9,64%) y G^o *Pectinatus* (1,03%).
- ~ F^a *Coprobacillaceae* (7,62%). G^o *Coprobacillus* (4,34%) y G^o *Alkaliphilus* (128%).

La segunda clase más abundante fue *Erysipelotrichia*, la cual incluyó el orden *Erysipelotrichales* (7,49%). Después, en última proporción, se encuentra la clase *Bacilli* que destacó la presencia de familias y géneros del orden *Bacillales* (0,29%) como *Bacillaceae* (0,11%) y del orden *Lactobacillales* (3,68%) como *Lactobacillus* (1,86% familia *Lactobacillaceae* (1,9)) u *Oscillospira* (0,82%). Algunos de estos géneros presentan un elevado potencial probiótico en la estabilización de la microbiota intestinal, una mejora de la absorción de nutrientes y un impedimento en la adhesión y colonización del intestino por parte de algunos grupos de patógenos (Choi et al., 2015).

La mayoría de representantes del *phylum* de las *Actinobacterias* pertenecieron al orden *Bifidobacteriales*, tercero en abundancia en los metagenomas procedentes del ciego de las aves, dentro del cual se identificó una elevada representación del género *Bifidobacterium* (4,1%) de la familia *Bifidobacteriaceae* (4,1%) (figura 36 y 40).

En cambio, el *phylum Proteobacteria* estuvo representado en su mayoría por:

- ~ G^o *Campylobacter*. Orden *Campylobacteriales* (0,98%) y F^a *Campylobacteriaceae* (0,063%).
- ~ G^o *Helicobacter* (0,95%). Orden *Campylobacteriales* (0,98%) y F^a *Helicobacteriaceae* (0,063%).

Por último, en los *Bacteroidetes* se identificaron, entre las más abundantes de las muestras, algunas familias como *Sphingobacteriaceae* (0,088%) o *Flavobacteriaceae* (0,34%) (*G^o Flavobaerium* (0,33%)).

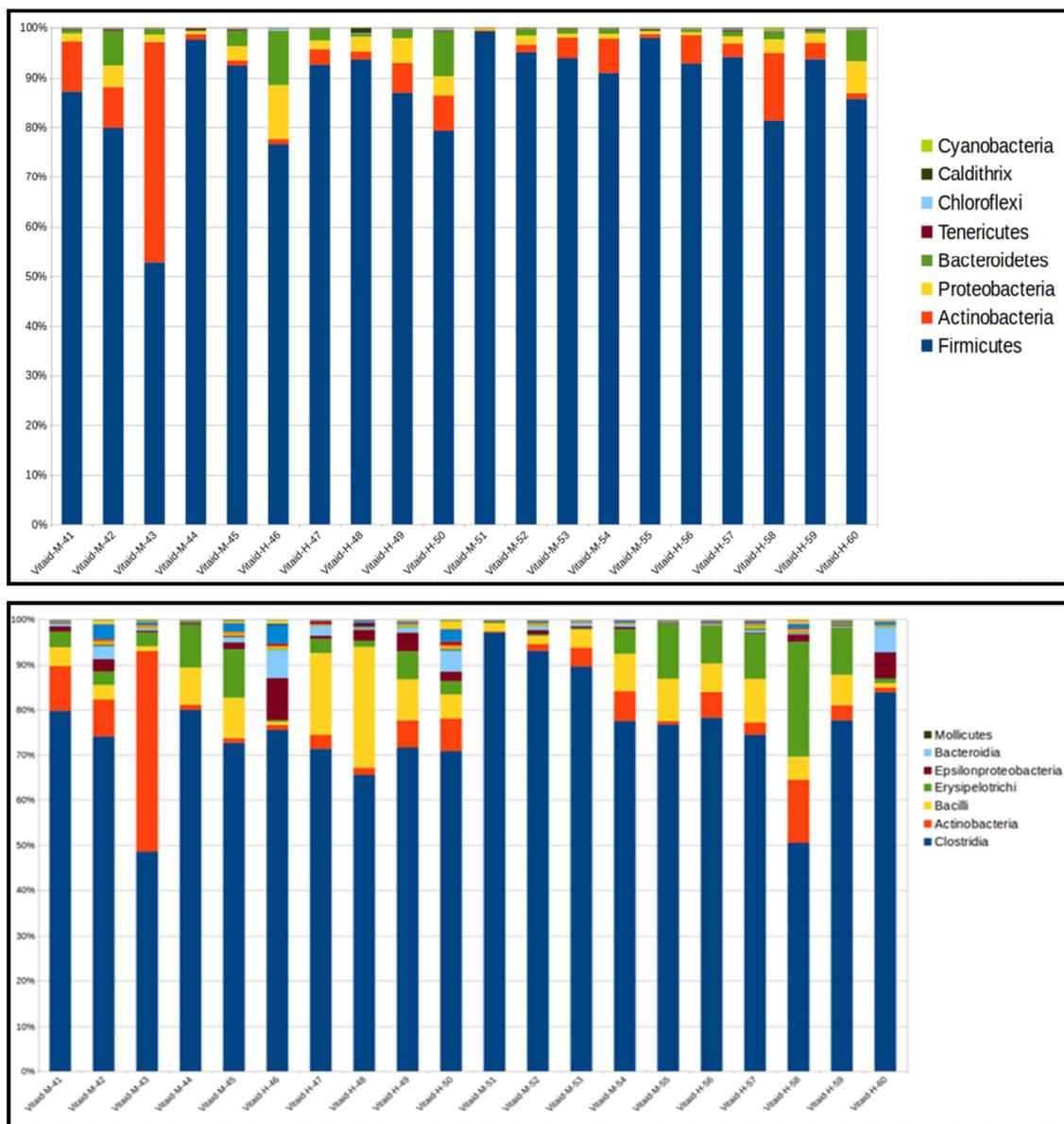


Figura 36. Distribución de taxones más abundantes a lo largo de las 20 muestras analizadas para los niveles taxonómicos *phylum* (figura superior) y *clase* (figura inferior). En el eje de abscisas se indica las referencias de cada una de las muestras

Muchos de los géneros y especies mencionados, entre los más abundantes, coinciden con los destacados por su abundancia en estudios metagenómicos previos, en donde se han detectado en proporciones similares (Pedroso y Lee, 2014). Sergeant et al., (2014) destacan la presencia de los *G^o Megamonas* (representa más de un tercio de la abundancia de la muestra) y *G^o Alipestes*. Por otra parte, el estudio presentado por Shaufi et al., (2015) destaca la presencia en el ciego de los géneros: *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Escherichia* y *Shigella* en proporciones similares a las detectadas en los nuestros y de las *F^a Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* (Sergeant et al., 2014; Shaufi et al., 2015).

En promedio, las especies más abundantes de las muestras analizadas pertenecieron al G° *Megamonas* (*Megamonas funiformis* y *Megamonas hypermegale*). En general se detectaron 30 especies del G° *Lactobacillus* entre las que destacan: *L. aviarius*, *L. salivarius*, *L. intermedius*, *L. ultunensis*, *L. johnsonii* o *L. crispatus*.

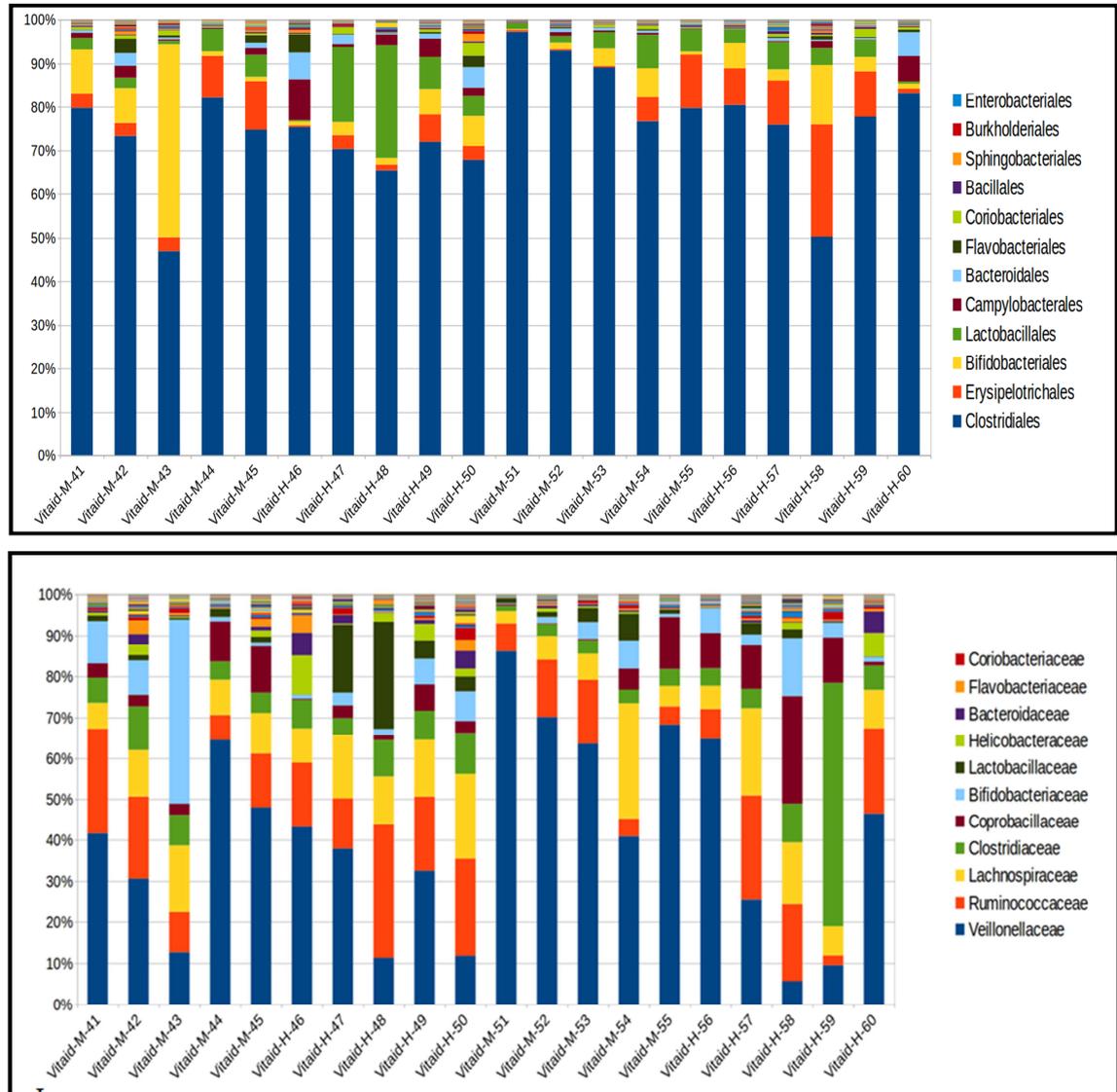


Figura 37. Distribución de taxones más abundantes a lo largo de las 20 muestras analizadas para los niveles taxonómicos orden (figura superior) y familia (figura inferior). En el eje de abscisas se indica las referencias de cada una de las muestras.

2.1.3 Diferencias en la composición microbiana observada según tratamiento y sexo

A la hora de analizar el efecto de tratamientos prebióticos y probióticos, resulta de especial interés observar la influencia de los mismos sobre la microbiota de regiones concretas como el ciego. La diversidad y composición de la población del ciego varía de manera sustancial frente a cambios en la dieta y tratamientos pro y prebióticos que permiten modular la misma (Torok *et al.*, 2011; Oakley *et al.*, 2014). Estas argumentaciones, junto a su importancia en el metabolismo de

carbohidratos y grasas, hacen que el análisis de ciegos sea el idóneo para el estudio del efecto que tienen estas sustancias frente a las heces por su composición u otras regiones intestinales con mayor variabilidad individual.

Mediante el cálculo del logaritmo 2 del porcentaje de cambio se compararon los perfiles de variación entre tratamientos (control *vs* Vitaid) y sexo (macho *vs* hembra) para los distintos niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género y especie). En general se observaron diferencias de mayor magnitud en la proporción de taxones entre las clases Vitaid y control. Este producto incrementó la diversidad microbiana de los ciegos analizados de manera general. Dentro de los individuos tratados con Vitaid, los cambios de mayor magnitud, en todos los niveles taxonómicos, se observaron en el subgrupo de las hembras. Dentro del perfil microbiano, a la hora de evaluar el efecto global de Vitaid sobre la microbiota del ciego, se analizaron especialmente aquellas familias o géneros con potencial probiótico, de especial interés por su capacidad metabólica, por su potencial patógeno humano o para el hospedador, o que participan de manera activa en la degradación de la carne procesada, especialmente en procesos fermentativos tras el envasado. Además de estos grupos, se evaluó la presencia diferencial de los taxones más abundantes y que representan una mayor proporción de la biomasa del microbioma del ciego de los pollos, y para las que las diferencias tienen un mayor peso estadístico.

En general, en muchos casos se observó que los mismos taxones que variaron su abundancia relativa en presencia de Vitaid también eran los que mostraban diferencias importantes entre individuos de distinto sexo, mientras que otros apenas cambiaban. De este modo, se podría decir que existe una fracción de la microbiota que permanece algo más estable frente a cambios ambientales (diferente de sexo o tratamiento).

A nivel de *phylum*, los principales cambios se observaron en *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes*, todos ellos con más del doble de carga bacteriana presente en los ciegos de individuos tratados con Vitaid (figura 8B). A nivel taxonómico de orden, las diferencias más importantes entre los taxones abundantes se encontraron en *Bifidobacteriales*, *Campylobacteriales*, *Bacteroidales*, *Sphingobacteriales*, *Burkholderiales*, *Caldilineales* y *Natrabacteriales*, donde se apreciaron incrementos de abundancia entre 2 y 4 veces en los individuos tratados con Vitaid respecto al control. Las familias que experimentaron un mayor incremento, entre 2-4 veces, en presencia de Vitaid fueron las familias: *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacteriaceae*, *Helicobacteriaceae*, *F^a Bacteroidaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae*, *Alcaigenaceae*, *Calditrichaceae* y *Desulfobacteriaceae*. Se apreció una disminución de la abundancia de la familia *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* y *Clostridiaceae*, en esta última de cerca del 25%.

Para los niveles taxonómicos más profundos, el análisis de los géneros más abundantes muestra una disminución notoria del contenido en bacterias de los géneros: *Megamonas* (ver Anexo figura 22), *Comprobacillus*, *Clostridium* y *Pectinatus*, y una disminución más moderada de otras del género *Streptococcus* o *Enterococcus*. Entre aquellos géneros que incrementaron sus niveles entre 2-4 veces se encuentran los géneros: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Helicobacter*,

Oscillospira (ver Anexo figura 23), *Bacteroidetes*, *Flavobacterium*, *Campylobacter* (figura 38) y *Pedobacter*.

Grupo tratamiento vs grupo control para el G° *Campylobacter*

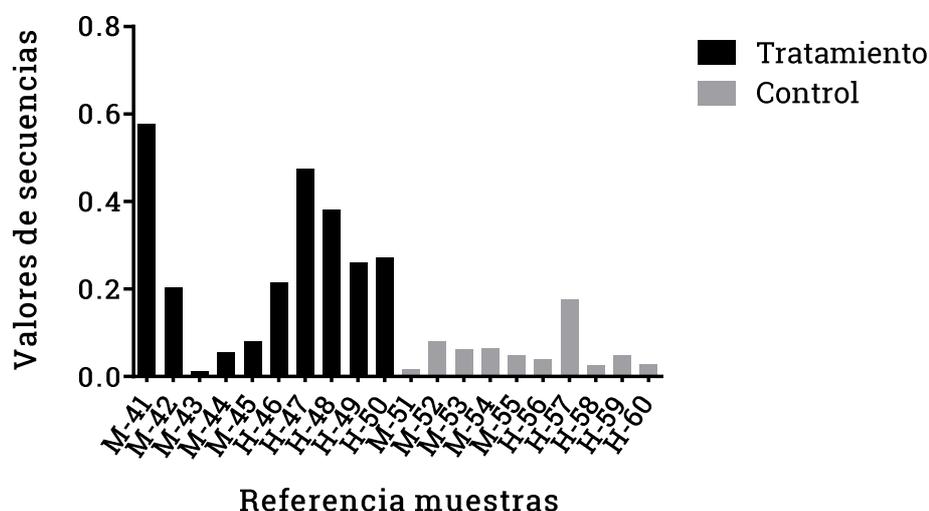


Figura 38. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género bacteriano *Campylobacter*

Entre las 20 especies más abundantes se identificaron tres pertenecientes al G° *Lactobacillus*, entre ellas algunas con importantes propiedades probióticas como *L. salivarum* (Cisek et al., 2014; Pedroso y Lee 2015), y dos del G° *Bifidobacterium* (*B. subtile* y *B. saeculare*), que incrementaron su abundancia en presencia de Vitaid. Dentro del G° *Campylobacter*, la mayoría de secuencias pertenecieron a las especies de *C. coli* que aumentaron casi en 3 veces sus niveles (figura 39).

Grupo tratamiento vs grupo control para la bacteria *C. coli*

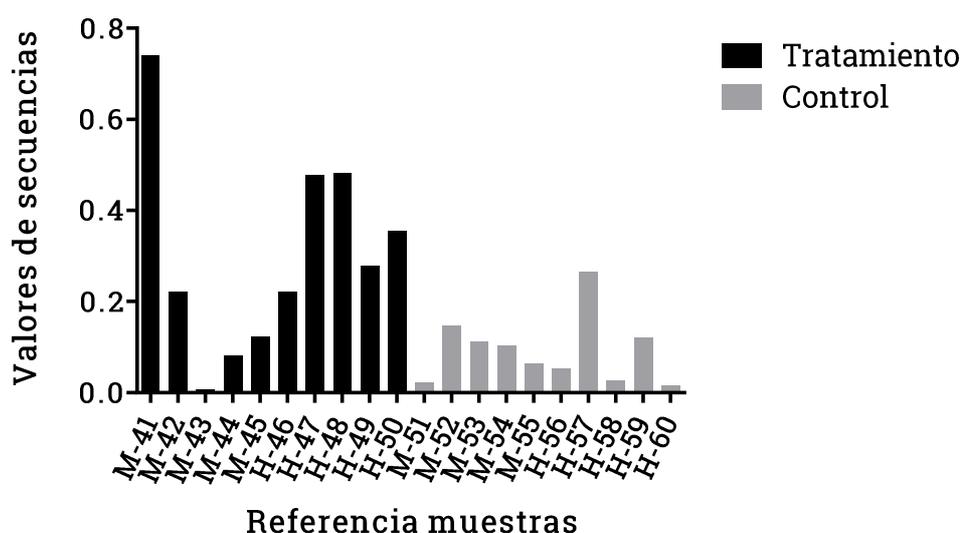


Figura 39. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para la bacteria *C. coli*

Para terminar, se evaluó la variación de aquellos géneros relacionados por estudios metagenómicos con la degradación del producto final. El incremento de especies del G^o *Lactobacillus* y G^o *Clostridium* se relaciona directamente con procesos de fermentación y aceleración de la degradación del producto cárnico de ave envasado (Borch et al., 1996; Doulgeraki et al., 2012, Nieminen et al., 2012b; Chaillou et al., 2015). El primero de estos dos incrementó sus niveles en el ciego de los pollos tratados con Vitaid, y el segundo los disminuyó.

Por último pero no menos importante, como se ha podido comprobar, la región genómica del gen ribosómico 16S ARN es la que mejor estudia la diversidad bacteriana ya que está presente en todas las bacterias, contiene tramos que son casi universales y regiones hipervariables ampliamente divergentes entre los diferentes taxones (Lane et al., 1985). Esta tarea no resulta sencilla debido a la enorme cantidad de datos que derivan de estas amplificaciones de ADN. Sin embargo, está claro que la secuenciación masiva, es una herramienta que se va a aplicar en futuros estudios con el objetivo de observar posibles interacciones entre diferentes microorganismos relacionadas con su entorno para adoptar una visión más detallada acerca del equilibrio en cualquier ecosistema microbiano (Hodkinson y Grice, 2015).

VII. Conclusiones

Según nuestras condiciones de estudio se han obtenido las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Hemos implementado técnicas moleculares *in house* basadas en PCR a tiempo real para la determinación individual de *C. jejuni* y *C. coli*, así como una técnica LAMP para la detección conjunta de *Campylobacter* e individual para *C. jejuni* y *C. coli* que garantizan un excelente grado de concordancia con las técnicas validadas y autorizadas.

SEGUNDA: La práctica del aclarado o clareo llevada a cabo en las naves de engorde se puede considerar uno de los principales factores de riesgo en la aparición de este germen en la explotación debido a la ruptura de las medidas de bioseguridad como consecuencia de la introducción de fómites.

TERCERA: La determinación de una correlación entre un resistotipo presente en todos los antibióticos objeto de este estudio en relación a su genotipo resistente mediante la realización de técnicas de PCR y secuenciación tipo Sanger se convierte en un excelente indicador de resistencia antimicrobiana.

CUARTA: Las técnicas utilizadas en nuestro estudio para la determinación de la resistencia antimicrobiana pueden ser un método eficaz a la hora establecer pautas de tratamiento terapéutico basadas en un uso responsable de los agentes quimioterapéuticos.

QUINTA: El análisis de secuenciación masiva es una herramienta de gran utilidad para evaluar la eficacia de métodos preventivos en explotaciones avícolas de pollos de engorde con el fin de combatir *Campylobacter*.

VIII. Bibliografía

1. Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res. 2001; 32: 311-321.
2. Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. Health Technol Assess. 2007; 11(36): 1-216.
3. Achard A, Villers C, Pichereau V, Leclercq R. New *Inu* (C) gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2716-2719.
4. ACMSF. Second Report on *Campylobacter*. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Londres. 2004.
5. Adkin A, Hartnett E, Jordan L, Newell D, Davison H. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. J Appl Microbiol. 2006; 100: 306-315.
6. Adzitey F, Rusul G, Huda N, Cogan T, Corry J. Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. Int J Food Microbiol. 2012; 154: 197-205.
7. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMP). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan Nacional Resistencia a Antibióticos. 2014. Disponible en: http://semfyc2016.com/readcontents.php?file=webstructure/eduardo_padilla.pdf
8. Akiba M, Lin J, Barton YW, Zhang QJ. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother 2005; 57(1): 52-60.
9. Al-Abri SS, Beeching NK, Nye FJ. Traveller's diarrhoea. Lancet Infect Dis. 2005; 5: 349-360.
10. Alderton MR, Korolik V, Coloe PJ, Dewhirst FE, Paster BJ. *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 61-66.
11. Alfredson DA, Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol Lett. 2007; 277: 123-132.
12. Alfredson DA, Korolik V. Isolation and Expression of a Novel Molecular Class D Lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. Agents Chemother. 2005; 49(6): 2515-2518.
13. Allen KJ, Griffiths MV. Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. J Food Prot. 2001; 64: 2058-2062.
14. Allen VM, Burton CH, Wilkinson DJ, Whyte RT, Harris JA, Howell M, et al. Evaluation of the performance of different cleaning treatments in reducing microbial contamination of poultry transport crates. Br Poult Sci. 2008b; 49: 233-240.
15. Allen VM, Weaver H, Ridley AM, Harris JA, Sharma M, Emery J, et al. Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. J Food Prot. 2008a; 71: 264-70.
16. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1201-1206.
17. Almaraz G, Canós Cabedo M, Rodilla Calvelo F, Ferrer Gómez C. Nuevos Macrólidos ¿Superan a eritromicina? Farm Hosp. 1995; 19(5): 259-265.

18. Almasi MA, Aghapour-ojaghkandi M, Aghaei S. Visual Detection of Curly Top Virus by the Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Plant Pathol Microb.* 2013, 4: 9.
19. Alonso JL, Mascellaro S, Moreno Y, Ferrús MA, Hernández J. Doublestaining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 5151-5154.
20. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289(1036): 321-331.
21. Annamalai T, Pina-Mimbela R, Kumar A, Binjawadagi B, Liu Z, Renukaradhya GJ, et al. Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poult Sci.* 2013; 92: 2201-2211.
22. Ansari-Lari M, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Abdollahi M, Berizi E. Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *Int J Food Microbiol.* 2011; 144: 475-479.
23. Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. California. 2004; 1-60.
24. Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nishimura K, Matsuhisa A, et al. 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.* 2008; 52: 260-266.
25. Atlas RM, Bartha R. *Microbial ecology: fundamentals and applications.* 4. Menlo Park, Calif: Harlow: Benjamin/Cummings. 1998.
26. Avrain L, Vernozy-Rozand C, Kempf I. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol.* 2004; 97: 134-140.
27. Bachoual R, Ouabdesselam S, Mory F, Lascols C, Soussy CJ, Tankovic J. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbial Drug Resistance.* 2001; 7: 257-261.
28. Balamurugan V, Sen A, Venkatesan G, Yadav V, Bhanot V, Bhanuprakash V, et al. A Rapid and Sensitive One Step-SYBR Green Based Semi Quantitative Real Time RT-PCR for the Detection of peste des petits ruminants Virus in the Clinical Samples. *Virologica Sinica.* 2012; 27(1): 1-9.
29. Barletta F, Mercado EH, Lluque A, Ruiz J, Cleary TG, Ochoa TJ. Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2822-2829.
30. Barreiros de Souza R, Magnani M, Gomes Ferrari R, Mikito Kottwitz LB, Sartori D, Bronharo Tognim MC, et al. Detection of quinolone-resistance mutations in *Salmonella* spp. strains of epidemic and poultry origin. *Braz J Microbiol.* 2011; 42: 211-215.
31. Barton Behravesh C, Jones TF, Vugia DJ, Long C, Marcus R, Smith K, et al. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005. *J Infect Dis.* 2011; 204: 263-7.
32. Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P, Wells JM. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology.* 2004; 150: 3507-3517.
33. Benjamin J, Leaper S, Owen RJ, Skirrow MB. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr Microbiol.* 1983; 8: 231-238.
34. Beraun-Villa M, Valdez LM. Diarrea del viajero. *Rev Med Hered.* 2013; 24(1): 54-61.
35. Berrang ME, Smith DP, Meinersmann RJ. Variations on standard broiler processing in an effort to reduce *Campylobacter* numbers on postpick carcasses. *J Appl Poult Res.* 2011; 20: 197-202.

36. Bessède E, Delcamp A, Sifré E, Buissonnière A, Mégraud F. New Methods for Detection of *Campylobacters* in Stool Samples in Comparison to Culture. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(3): 941-944.
37. Bibserstein EL, Zee YCH. Tratado de microbiología veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza. 1994; 275-276.
38. Birk T, Grønlund AC, Christensen BB, Knøchel S, Lohse K, Rosenquist H. Effect of organic acids and marination ingredients on the survival of *Campylobacter jejuni* on meat. *J Food Prot.* 2010; 73(2): 258-65.
39. Bless PJ, Schmutz C, Suter K, Jost M, Hattendorf J, Mausezahl-Feuz M, et al. A tradition and an € epidemic: determinants of the campylobacteriosis winter peak in Switzerland. *Eur J Epidemiol.* 2014; 29: 527-537.
40. Bolton FJ. Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, animals, food and water. The increasing incidence of campylobacteriosis in humans. Report and proceedings of a WHO consultation of experts. Geneva: World Health Organization. 2001; 87: 94.
41. Borch E, Kant-Muermans ML, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol.* 1996; 33: 103-120.
42. Boysen L, Rosenquist H. Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. *J Food Protect.* 2009; 72: 497-502.
43. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, et al. A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(4): 925-929.
44. Brown M, Roberts M. Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Vet Microb.* 1991; 29: 173-180.
45. Buhr RJ, Cox NA, Stern NJ, Musgrove MT, Wilson JL, Hiatt KL. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. *Avian Dis.* 2002; 46: 919-924.
46. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(6): 1211-1233.
47. Butzler J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 868-876.
48. Callicott KA, Fri dhriksd óttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon J, Gunnarsson E, et al. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5794-5798.
49. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 May; 7(5): 335-336.
50. Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR, Federighi M. 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.* 1999; 65: 5154-5157.
51. Carbonero A., A. Torralbo, C. Borge, I. García-Bocanegra, A. Arenas, A. Perea, *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012; 35: 505-512.
52. Cardinale E, Tall F, Guèye EF, Cisse M, Salvat G. Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler chicken flocks. *Prev Vet Med.* 2004; 64: 15-25.
53. Carrillo CL, Atterbury RJ, El-Shibiny A, Connerton PL, Scott A, Connerton IF. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 6554-6563.

54. Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, et al. The *in vivo* efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 232.
55. Castanon JI. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci.* 2007; 86: 2466-2471.
56. Cawthraw SA, Newell DG. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.* 2010; 54: 86-93.
57. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Programa de Vigilancia de Resistencias a Antimicrobianos que incluirá el diseño del programa, la toma de muestras, el aislamiento, la identificación y caracterización de microorganismos sometidos al programa de vigilancia, el análisis de datos obtenidos y formación continua de profesionales implicados en la resistencia a antimicrobianos. Informe de resultados 2014-2015. Universidad Complutense de Madrid. 2015.
58. Chaillou S, Chaulot-Talmon A, Caekebeke H, Cardinal M, Christieans S, Denis C, et al. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J.* 2015; 9: 1105-18.
59. Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian J Stat.* 1984; 11: 265-270.
60. Chatzipanagiotou S, Kilidireas K, Trimis G, Nicolaou C, Anagnostouli M, Athanassaki C, et al. *Campylobacter jejuni* O:19 serotype-associated Guillain-Barre´ syndrome in a child: the first case reported from Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 69-72.
61. Chen X, Naren GW, Wua CM, Wanga Y, Dai L, Xia LN, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol.* 2010; 144: 133-139.
62. Choi KY, Lee TK, Sul WJ. Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens - A Review. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2015; 28: 1217-25.
63. Chon JW, Hyeon JY, Choi IS, Park CK, Kim SK, Heo S, et al. Comparison of three selective media and validation of the VIDAS *Campylobacter* assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in ground beef and fresh-cut vegetables. *J Food Prot.* 2011; 74(3): 456-60.
64. Choo LC, Saleha AA, Wai SS, Fauziah N. Isolation of *Campylobacter* and *Salmonella* from houseflies (*Musca domestica*) in a university campus and a poultry farm in Selangor, Malaysia. *Trop Biomed.* 2011; 28: 16-20.
65. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 232-260.
66. Chung JCS, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic Variation among Contemporary *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronically Infected Cystic Fibrosis Patients. *J Bacteriol.* 2012; 194(18): 4857-4866.
67. Cilliers FJ, Warren RM, Hauman JH, Wiid IJ, Helden PD. Oligonucleotide (GTG)₅ as an epidemiological tool in the study of nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6): 1545-9.
68. Cisek AA, Binek M. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Pol J Vet Sci.* 2014; 17: 385-394.
69. Clark AG, Bueschkens DH. Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49: 1467-1471.
70. Clark JD, Oakes RD, Redhead K, Crouch CF, Francis MJ, Tomley FM, et al. *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine.* 2012; 30(16): 2683-2688.

71. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960; 20: 37-46.
72. Comité Mixto OMS/FAO de Expertos en Zoonosis; Organización Mundial de la Salud...; Ginebra. 1959.
73. Contreras A, Sánchez A, Corrales JC. *Epidemiología Veterinaria.* Ed. ICE, Universidad de Murcia. 2001; 9: 145-161.
74. Corry J, Purnell G, James C, James S. Commercial trials to investigate the feasibility under commercial conditions of decontaminating chicken carcasses using hot water immersion at 80 °C for 20 s. FSA Project no. MO 1019: Physical methods readily adapted to existing commercial lines for reducing pathogens, particularly *Campylobacter*, on raw poultry. 2006
75. Corry J, Purnell G, James C, Pinho R, Hedges A, Jorgensen F, et al. Evaluation of chemicals for the inactivation of naturally occurring thermophilic *Campylobacter* spp. on poultry carcasses. *Food Microbiol.* Aberdeen. 2008.
76. Corujo A. *Campylobacter* en la producción avícola: situación actual y posibles medidas de control. *Nutreco Food Research Centre.* 2013; 1-73.
77. Corujo A. Control de *Campylobacter*: un gran reto para la industria avícola. 53 Simposio Científico de Avicultura. Zaragoza. 2016.
78. Cowan MM. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999; 12(4): 564-582.
79. Cox N, Stern N, Wilson J, Musgrove M, Buhr R, Hiatt R. Isolation of *Campylobacter* from semen samples of commercial 50 week old parent roosters. *Int J Med Microbiol.* 2001; 291: 39.
80. Cox NA, Richardson LJ, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ. *Campylobacter* can remain in various organs. *WorldPoultry.net.* 2010. Disponible en: <http://www.worldpoultry.net/turkeys/management/breeding/campylobacter-can-remain-in-various-organs-7663.html>.
81. Crushell E, Harty S, Sharif F, Bourke B. Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? *Pediatr Res.* 2004; 55: 3-12.
82. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Groß U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity associated factors and disease mediating mechanisms. *International J Med Microbiol.* 2010; 300: 205-211.
83. de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Bayot B, Ferreira C. *Manual de Epidemiología Veterinaria.* 2008; 5: 59-74.
84. de Jong A, Thomas V, Simjee S, Godinho K, Schiessl B, Klein U, et al. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 638-651.
85. de los Santos FS, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Metcalf JH, Reyes Herrera I, Dirain ML, et al. The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market aged broiler chickens. *Poult Sci.* 2009; 88: 61-64.
86. Debruyne L, Broman T, Bergström S, Olsen B, Stephen LWO, Vandamme P. *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60: 815-819.
87. Debruyne L, On SLW, de Brandt E, Vandamme P. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 1126-1132.
88. Decisión de Ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (Decisión 2013/652/UE).

89. Dediste A, Vandenberg O, Vlaes L, Ebraert A, Douat N, Bahwere P, et al. Evaluation of ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9: 1085-1090.
90. Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J Infect Dis*. 1972; 25(4): 390-392.
91. Deshmukh DR, Larsen CT, Dutta SK, Pomeroy BS. Characterization of pathogenic filtrate and viruses isolated from turkeys with bluecomb. *Am J Vet Res*. 1969; 30: 1019-1025.
92. Di Giannatale E, Prencipe V, Colangeli P, Alessiani A, Barco L, Staffolani M, et al. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in broiler flocks and broiler carcasses in Italy. *Vet Ital*. 2010; 46: 405-423.
93. Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 14-23.
94. Directiva 2003/99/CE del Parlamento europeo y del consejo, de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia y los agentes zoonóticos (Anexo I: *Campylobacter*).
95. Directiva 2007/43/CE del Consejo de 28 de junio de 2007 por la que se establecen las disposiciones mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne.
96. Donis JH. Validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avan Biomed*. 2012; 1(2): 73-81.
97. Dougherty TJ, Beaulieu D, Barrett JF. New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discov Today*. 2001; 6: 529-536.
98. Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas GJE. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int J Food Microbiol*. 2012; 157: 130-141.
99. Doyle LP. The etiology of swine dysentery. *Am J Vet Res*. 1948; 9: 50-51.
100. Doyle MP y Roman DJ. Growth and Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a Function of Temperature and pH. *J Food Prot*. 1981; 44(8): 596-601.
101. Doyle MP. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 47: 533-536.
102. Doyle, LP. A vibrio associated with swine dysentery. *Am J Vet Res*. 1944; 5: 3-5.
103. Dray S, Legendre P, Peres-Neto PR. Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM). *Ecol Model*. 2006; 196: 483-493.
104. ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Estocolmo. 2013.
105. ECDC. EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates. Estocolmo. 2014. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/harmonised-monitoring-antimicrobial-resistance-human-salmonella-campylobacter-isolates-EU-protocol.pdf>.
106. ECDC. EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates. Estocolmo. 2016. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-Salmonella-Campylobacter-harmonised-monitoring.pdf>.
107. EFSA. 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 J 2010a; 8(03):1503.
108. EFSA. 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. Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method

- diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. EFSA Journal. 2010b; 8(8): 1522. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1522.pdf>
109. EFSA. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. Journal. 2011; 9(4): 2105-2249.
 110. EFSA. Technical specifications on the harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. bacteria transmitted through food. EFSA Journal. 2012b; 10(6): 2742.
 111. EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA Journal. 2016a; 14(2): 4380.
 112. EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA Journal. 2017; 15(2): 4694.
 113. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal. 2015; 13: 51-58.
 114. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal. 2016b; 14(12): 4634.
 115. EFSA. The European Union Summary Report Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. EFSA Journal. 2012a; 10(3): 2597.
 116. Ellebroek L, Lienau JA, Alter T, Schlichting D. Effectiveness of different chemical decontamination methods on the *Campylobacter* load of poultry carcasses. Fleischwirtschaft. 2007; 87: 224-227.
 117. Ellis-Iversen J, Ridley A, Morris V, Sowa A, Harris J, Atterbury R, et al. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. Epidemiol Infect. 2011; 1-9.
 118. Emborg HD, Teunis P, Simonsen J, Krogfelt KA, Jorgensen CS, Takkinen J, et al. Was the increase in culture-confirmed *Campylobacter* infections in Denmark during the 1990s a surveillance artefact? Euro Surveill. 2015; 20(41): 5-12.
 119. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter* infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10: 6292-6304.
 120. Ercolini D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. Appl Environ Microbiol. 2013; 79: 3148-3155.
 121. Escherich, T. Beiträge zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Über das Vorkommen van Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgängen der Säuglinge. Münch Med Wochenschr. 1886; 33: 815-817, 833-835.
 122. Etoh Y, Dewhirst FE, Paster BJ, Yamamoto A, Goto N. *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43: 631-639.
 123. European Network of GMO Laboratories (ENGL). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Sci Tech Rep. 2015; 1-24.
 124. European Network of GMO Laboratories (ENGL). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL). JRC Sci Tech Rep. 2011; 1-60.
 125. Evans S, Sayers AR. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med. 2000; 46: 209-223.
 126. Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. Genome Res. 1998; 8: 186-194.

127. Faith DP. Conservation Evaluation and Phylogenetic Diversity. *Biological Conservation*. 1992; 61(1): 1-10.
128. Fajo-Pascual M, Godoy G, Aramburu A, Nogues B. Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por *Campylobacter* en niños. *Gac Sanit*. 2009; 23(4): 326-329.
129. Fernández F, López L, Pascual A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(Supl 1): 20-25.
130. Fernandez F, Sharma R, Hinton M, Bedford MR. Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57: 1793-1801.
131. Firlieyanti AS, Connerton PL, Connerton IF. *Campylobacters* and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *Int J Food Microbiol*. 2016; 237: 121-127.
132. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining a light on LAMP assays. A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*. 2015; 58: 189-194.
133. Fischer S, Kittler S, Klein G, Glunder G. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. *PLoS One*. 2013; 8: e78543.
134. Fitzgerald C, Tu ZC, Patrick M, Stiles T, Lawson AJ, Santovenia M et al. *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014; 64: 2944-2948.
135. Fitzgerald F, Whichard J, Nachamkin I. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. Washington DC, USA: MBio. 2008; 227-243.
136. Fleming PC, D'Amico A, De Grandis S, Karmali MA. The detection and frequency of β -lactamase production in *Campylobacter jejuni*, p. 217. In D. G. Newell (ed.), *Campylobacter*. Epidemiology, pathogenesis and biochemistry. MTP Press, Lancaster, Reino Unido. 1982.
137. Florent A. Les deux vibriosis génitales; la vibriose due à *V. fetus venerealis* et la vibriose d'origine intestinale due à *V. fetus intestinalis*. *Meded. Veeartsenijsch. Rijksuniv Gent*. 1959; 3: 1-60.
138. Flores Somarriba B. Comportamiento epidemiológico de *Leptospira* spp., en animales domésticos, roedores y aguas, cercanos a los casos de leptospirosis humana en Nicaragua, durante los años 2007-2013. Universidad de Zaragoza. 2015.
139. Foster G, Holmes B, Steigerwalt AG, Lawson PA, Thorne P, Byrer DE, et al. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 2369-2373.
140. Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, et al. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol*. 2005; 3: e15.
141. Fox JG, Chilvers T, Goodwin CS, Taylor NS, Edmonds P, Sly Li, et al. *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. *Int J Syst Bacteriol*. 1989; 39: 301-303.
142. Fuertes H. Estudio sociológico en estudiantes de Ciencias de la Salud sobre ciertas enfermedades vectoriales y/o zoonóticas. Diplomado Salud Pública. Zaragoza. 2016.
143. Gallay FA, Prouzet-Mauléon V, Kempf I, Lehours P, Labadi L, Camou C, et al. *Campylobacter* Antimicrobial Drug Resistance among Humans, Broiler Chickens, and Pigs. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(2): 259-266.
144. Garcés C, Soler MD, Barragán JI. Evaluación del uso de extractos vegetales en la alimentación de pollos de carne. *Symp A Q J Mod Foreign Lit*. 2015; 161-169.

145. García AB, Steele WB, Taylor DJ. Prevalence and carcass contamination with *Campylobacter* in sheep sent for slaughter in Scotland. *J Food Saf.* 2010; 30: 237-250.
146. García FJ, Abad JC, Serrano T, Frías N, Castro M, Lorente S. Epidemiología de *Campylobacter* en avicultura. 50 Simposio de Avicultura WPSA-AECA. Lérida. 2013.
147. García FJ, Abad JC. Epidemiología de *Campylobacter* en Avicultura de carne: de la teoría a los hechos. Resultados del proyecto europeo Campybro. Madrid. 2016; 1-42.
148. García-Hernández Y, Pérez-Sánchez T, Boucourt R, Balcázar JL, Nicoli JR, Moreira-Silva J, et al. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Res Vet Sci.* 2016; 108: 125-132.
149. Ge B, McDermott PF, White DG, Meng J. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3347-3354.
150. Ge B, Wang F, Sjölund-Karlsson M, McDermott PF. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*. Susceptibility Testing Methods and Resistance Trends. *J Microbiol Methods.* 2013; 95(1): 57-67.
151. Ge B, White DG, McDermott PF, Girard W, Zhao S, Hubert S, et al. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 3005-7.
152. Gebhart CJ, Edmonds P, Ward GE, Kurtz HJ, Brenner DJ. *Campylobacter hyointestinalis* sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 715-720.
153. Georgsson F, Porkelsson AE, Geirsdottir M, Reiersen J, Stern NJ. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.* 2006; 23: 677-683.
154. Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnes M, Bohm J, et al. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poult Sci.* 2012; 91: 1825-1832.
155. Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C, Piccirillo A. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Poultry in Italy. *Microb Drug Resist.* 2014; 20: 2.
156. Gibbons CL, Mangen MJ, Plass D, Havelaar AH, Brooke RJ, Kramarz P, et al. Measuring underreporting and under-ascertainment in infectious disease datasets: a comparison of methods. *BMC Public Health.* 2014; 147.
157. Gibreel A, Kos VN, Keelna M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Molecular Mechanism and Stability of the Resistance Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(7): 2753-2759.
158. Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(2): 243-255.
159. Gibson JR, Ferrús MA, Woodward D, Xerry J, Owen RJ. Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulsed-field gel electrophoresis. *J Appl Microbiol.* 1998; 87: 602-610.
160. Gilbert MJ, Kik M, Miller MG, Duim B, Wagenaar JA. *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65: 975-982.
161. Goldman E. Antibiotic abuse in animal agriculture: exacerbating drug resistance in human pathogens. *Hum Ecol Risk Assess.* 2004; 10(1): 121-134.
162. Gordis L. Epidemiología (3ª ed.). Ed. Elsevier. Madrid. 2005.
163. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques.* 2009; 46: 167-172.

164. Granato PA, Chen L, Holiday I, Rawling RA, Novak-Weekley SM, Quinlan T, et al. Comparison of Premier CAMPY Enzyme Immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY Tests with Culture for Laboratory Diagnosis of *Campylobacter* Enteric Infections. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(11): 4022-4027.
165. Griggs DJ, Peake L, Johnson MM, Ghori S, Mott A, Piddock LJ. β -Lactamase-mediated β -Lactam resistance in *Campylobacter* species: Prevalence of Cj0299 (*bla*OXA-61) and evidence for a novel β -Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 3357-3364.
166. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 456-461.
167. Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS, et al. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 79: 581-593.
168. Gupta RS. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (*Campylobacteriales*). *BMC Genomics.* 2006; 7: 167.
169. Guyard-Nicodème M, Rivoal K, Houard E, Rose V, Quesne S, Mourand G, et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *Int J Food Microbiol.* 2015; 203: 8-14.
170. Hadgu, A. Discrepant analysis: a biased and an unscientific method for estimating test sensitivity and specificity. *J Clin Epidemiol.* 1999; 52: 1231-1237.
171. Halbert LW, Kaneene JB, Mansfield LS, Ruegg PL, Warnick LD, Wells SJ, et al. Comparison of automated microbroth dilution and agar dilution for antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy sources. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 686-91.
172. Hald B, Madsen M. Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3351-3352.
173. Han Z, Pielsticker C, Gerzova L, Rychlik I, Rautenschlein R. The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev Comp Immunol.* 2016; 62: 58-71.
174. Hansson I, Vagsholm I, Svensson L, Olsson Engvall E. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 640-649.
175. Haruna M, Sasaki Y, Murakami M, Ikeda A, Kusukawa M, Tsujiyama Y, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in broiler flocks in Japan. *Zoonoses Public Health.* 2012; 59: 241-245.
176. Harvey P, Battle T, Leach S. Different invasion phenotypes of *Campylobacter* isolates in Caco 2 cell monolayers. *J Med Microbiol.* 1999; 48: 461-469.
177. Havelaar AH, Mangen MJ, De Koeijer AA, Bogaardt MJ, Evers EG, Jacobs Reitsma WF, et al. Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* 2007; 27: 831-844.
178. Hazeleger WC, Bolder NM, Beumer RR, Jacobs Reitsma WF. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java between successive broiler flocks. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 6887-6891.
179. Helfand MS, Bonomo RA. β -Lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect.* 2003; 3: 9-23.
180. Hendrixson DR, DiRita VJ. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol Microbiol.* 2004; 52.
181. Hendrixson DR. A phase variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Mol Microbiol.* 2006; 61: 1646-1659.

182. Henry I, Reichardt J, Denis M, Cardinale E. Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean). *Prev Vet Med.* 2011; 100: 64-70.
183. Hermans D, Martel A, Van Deun K, Verlinden M, Van Immerseel F, Garmyn A, et al. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium chain fatty acids. *Poult Sci.* 2010; 89: 1144-1155.
184. Hermans D, Pasmans F, Messens W, Martel A, van Immerseel F, Rasschaert G, et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 2012; 12: 89-98.
185. Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, et al. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol.* 2011; 152: 219-228.
186. Hiett KL, Cox NA, Rothrock Jr. MJ. Polymerase chain reaction detection of naturally occurring *Campylobacter* in commercial broiler chicken embryos. *Poult Sci.* 2013; 92: 1134-1137.
187. Hiett KL, Stern NJ, Fedorka-Cray P, Cox NA, Seal BS. Molecular phylogeny of the flaA short variable region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2007; 4: 339-347.
188. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol.* 1992; 10: 413-417.
189. Hilbert F, Scherwitzel M, Paulsen P, Szostak MP. Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(17): 5911-5917.
190. Hoang KV, Stern NJ, Lin J. Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter* spp. *J Appl Microbiol.* 2011; 111: 1544-1550.
191. Hochman A. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol.* 1997; 23: 207-14.
192. Hodkinson BP, Grice EA. Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in Wound Care.* 2015; 4(1): 50-58.
193. Horrocks SM, Anderson RC, Nielsbet DJ, Ricke SC. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and coli in animals. *Anaerobe.* 2009; 15: 18-25.
194. Horwitz W. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of method Performance Studies. *Pure Appl Chem.* 1995; 67: 331-343.
195. Hülse de Souza SG, Carpentieri-Pipolo V, Ruas CdF, Carvalho VdP, Ruas PM, Gerage AC. Comparative Analysis of Genetic Diversity Among the Maize Inbred Lines (*Zea mays* L.) Obtained by RAPD and SSR Markers. *Braz Arch Biol Technol.* 2008; 51(1): 183-192.
196. Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, et al. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *mBio.* 2014; 5(4): 01364-01414.
197. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol.* 2007; 117: 237-257.
198. Inglis GD, Hoar BM, Whiteside DP, Morck DW. *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57: 2636-2644.
199. Iovine NM. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*, Virulence. 2013; 4: 230-240.
200. Ivanova M, Singh R, Dharmasena M, Gong C, Krastanov A, Jiang X. *Campylobacter jejuni*, real-time PCR, poultry carcass, slaughtering environment, hippuricase gene. *Poult Sci.* 2014; 93: 1587-1597.
201. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(2): S120-126.

202. Jesse TW, Englen MD, Pittenger-Alley LG, Fedorka-Cray PJ. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *J Appl Microbiol.* 2006; 100: 682-688.
203. Jimenez M, Soler P, Venanzi JD, Cante P, Varela C, Martinez Navarro F. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain. *Euro Surveill.* 2005; 10: 118-21.
204. Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL. JlpA, a novel surface exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2001; 39: 1225-1236.
205. Johnsen G, Kruse H, Hofshagen M. Genotyping of thermotolerant *Campylobacter* from poultry slaughterhouse by amplified fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 271-279.
206. Johnson WM, Lior H. A new heat labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog.* 1988; 4: 115-126.
207. Jones FS, Orcutt M, Little RB. Vibrios (*Vibrio jejuni*, N.Sp.) Associated with Intestinal Disorders of Cows and Calves. *J Exp Med.* 1931; 53: 853-63.
208. Jones K. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. *Appl Microbiol.* 2001; 90: 68-79.
209. Jonsson ME, Chriél M, Norström M, Hofshagen M. Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonization in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med.* 2012; 107: 95-104.
210. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3): 687-720.
211. Kaakoush NO, Miller WG, Reuse HD, Mendz GL. Oxygen Requirement and Tolerance of *Campylobacter jejuni*. *Res Microbiol.* 2007; 158(8-9): 644-650.
212. Kaiser P, Howell MMJ, Fife M, Sadeyen JR, Salmon N, Rothwell L, et al. Towards the selection of chickens resistant to *Salmonella* and *Campylobacter* infections. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2009; 164 (1-2): 17-25; discussion 25-6.
213. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31: 528-531.
214. Kaur T, Singh J, Huffman MA, Petrželková KJ, Taylor NS, Xu S. *Campylobacter troglodytis* sp. nov., Isolated from Feces of Human-Habituated Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(7): 2366-373.
215. Keller J, Wieland B, Wittwer M, Stephan R, Perreten V. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses Public Health.* 2007; 54: 2-7.
216. Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology.* 1997; 143: 5-21.
217. Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Nicholson MA, Baker CN, Patton CM, Steigerwalt AG, et al. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 376-385.
218. Kinana AD, Cardinale E, Bahsoun I, Tall F, Sire JM, Garin B, et al. Analysis of topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant and -susceptible *Campylobacter jejuni* strains isolated in Senegal. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 397-401.
219. King EO. Human Infections with *Vibrio fetus* and a Closely Related *Vibrio*. *Int J Infect Dis.* 1957; 101(2): 119-128.

220. Kirk M, Glass K, Ford L, Brown K, Hall G. Foodborne illness in Australia. Annual incidence circa. National Centre for Epidemiology and Population Health. Universidad Nacional de Australia. 2010.
221. Klein G. *Campylobacter*. Features, Detection and Prevention of Foodborne Disease. Ed. Elsevier. Trends Food Sci Technol. 2017; 3: 45.
222. Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson Jr DE, Cieplak Jr. W. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. Mol Microbiol. 1997; 24: 953-963.
223. Konkel ME, Monteville MR, Rivera Amill V, Joens LA. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* mediated enteritis. Curr Issues Intest Microbiol. 2001; 2: 55-71.
224. Koziel M, O'doherty P, Vandamme P, Corcoran GD, Sleator RD, Lucey B. *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64: 2878-2883.
225. Kudirkienė E, Malakauskas M, Malakauskas A, Bojesen AM, Olsen JE. Demonstration of persistent strains of *Campylobacter jejuni* within broiler farms over a 1-year period in Lithuania. J Appl Microbiol. 2010; 108: 868-877.
226. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, Lariviere LA. Role of the β -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to β -lactam agents. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35: 813-818.
227. Lahey C. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Burlington, MA: Lahey Clinic Foundation. 2011.
228. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33: 159-74.
229. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 6955-6959.
230. Larkin C, Van Donkersgoed C, Mahdi A, Johnson P, McNab B, Odumeru J. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. J Food Prot. 2006; 69: 22-26.
231. Law JWF, Mutalib NSA, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front Microbiol. 2014; 5: 770.
232. Lawson AJ, Logan J, O'Neill GL, Desai M, Stanley J. Large-scale survey of *Campylobacter* spp. in human gastroenteritis by PCR and PCR-ELISA. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3860-3864.
233. Lawson AJ, On SL, Logan JM, Stanley J. *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 651-660.
234. Lawson HK, Leaver JL, Pettigrew GW, Rowland AC. Some Features of *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* subsp. nov., nom. rev. and Their Taxonomic Significance. Int J Syst Evol Microbiol. 1981; 31(4): 385-391.
235. Ledent P, Raquet X, Joris B, Van Beeumen J, Frere JM. A comparative study of the class D β -lactamases. Biochem J. 1993; 292: 555-562.
236. Lee CY, Tai CL, Lin SC, Chen YT. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. Int J Food Microbiol. 1994; 24: 161-170.
237. Lee MD, Newell DG. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. Avian Dis. 2006; 50: 1-9.

238. Levine C, Hiasa H, Mariani KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1400: 29-43.
239. Levy AJ. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J Biol Med*. 1946; 18: 243-58.
240. Ley 11/2003, de 19 de marzo, de Protección Animal en la Comunidad Autónoma de Aragón.
241. Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Además de la modificación de esta Ley, por la Ley 6/2013, de 11 de junio.
242. Ley 44/2003, de 21 de noviembre, de ordenación de las profesiones sanitarias. BOE num.280, 2003. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-21340>.
243. Ley 8/2003, de 24 de abril, Sanidad Animal.
244. Lillehaug A, Bergsjø B, Schau J, Bruheim T, Vikoren T, Handeland K. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet Scand*. 2005; 46: 23-32.
245. Lin J, Overbye Michel L, Zhang QJ. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2002; 46(7): 2124-131.
246. Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol*. 1982; 15: 761-768.
247. Little CL, Gormley FJ, Rawal N, Richardson JF. A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. *Epidemiol Infect*. 2010; 138: 1691-1694.
248. Liu M, Douthwaite S. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *PNAS*. 2002; 99(23): 14658-14663.
249. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT}. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
250. Logan JM, Burnens A, Linton D, Lawson AJ, Stanley J. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 50: 865-872.
251. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persist. *Future Microbiol*. 2009; 4(2): 189-200.
252. Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang Q. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2003; 47: 390-394.
253. Lynch OA, Cagney C, McDowell DA, Duffy G. A method for the growth and recovery of 17 species of *Campylobacter* and its subsequent application to inoculated beef. *J Microbiol Methods*. 2010; 83: 1-7.
254. Lyngstad TM, Jonsson ME, Hofshagen M, Heier BT. Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poultry Science*. 2008; 87: 1987-1994.
255. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3): 268-281.
256. Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 2980-2986.

257. Manning G, Dowson CG, Bagnall MC, Ahmed IH, West M, Newell DG. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(11): 6370-6379.
258. Marin C, Peñaranda DS, Ingesa-Capaccioni S, Vega S, Marco-Jiménez. Molecular detection of *Campylobacter* spp in day-old chick demonstrate vertical transmission in poultry production. J Anim Vet Sci. 2015; 2(4): 32-36.
259. Marshall BJ, Royce H, Annear DI, Goodwin CS, Pearman JW, Warren JR, et al. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbios Lett. 1984; 25: 83-88.
260. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Epidemiología Veterinaria, principio y métodos. Ed. Acribia. Zaragoza. 1997; 169-200.
261. Martiny D, Dediste A, Debruyne L, Vlaes L, Haddou NB, Vandamme P, et al. Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 *Neisseria Haemophilus* card and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1001-1006.
262. Matsheka MI, Lastovical AJ, Zappe H, Elishal BG. The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. Appl Microbiol. 2006; 42: 600-605.
263. Mayo B, Rachid CTCC, Alegría A, Leite AMO, Peixoto RS, Delgado S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. Curr Genomics. 2014; 15: 293-309.
264. McClung CR, Patriquin DG, Davis RE. *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. Int J Syst Bacteriol. 1983; 33: 605-612.
265. McFadyean F, Stockman S. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Londres. 1909.
266. Medalla F, Whichard JM, Smith J, Stuart A, Joyce K, Hoekstra RM, et al. Ciprofloxacin and erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in the United States, NARMS, 1997-2004. Zoonoses Public Health. 2007; 54: 1-45.
267. Meerburg BG, Kijlstra A. Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. J Sci Food Agr. 2007; 87: 2774-2781.
268. Meinersmann RJ, Phillips RW, Hiatt KL, Fedorka-Cray P. Differentiation of *Campylobacter* populations as demonstrated by flagellin short variable region sequences. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 6368-6374.
269. Melero B, Juntunen P, Hanninen ML, Jaime I, Rovira J. 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. 2012; 32: 124-128.
270. Messens W, Herman L, De Zutter L, Heyndrickx M. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. Vet Microbiol. 2009; 138: 120-31.
271. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, et al. Kempf The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect. 2006; 8: 1955-1966.
272. Moore JE, Lanser J, Heuzenroeder M, Ratcliff RM, Millar BC, Madden RH. Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs at slaughter by flaA-RFLP analysis and ribotyping. J Vet Med B-Infect Dis Vet Public Health. 2002; 49: 388-393.
273. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 289(1): 150-4.
274. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother. 2009; 15(2): 62-9.

275. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa T. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011; 28(4): 648-656.
276. Murphy C, Carroll C, Jordan KN. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol. 2006; 100: 623-632.
277. Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31: 1531-1536.
278. Nakamura S, Maeda N, Miron IM, Yoh M, Izutsu K, Kataoka C, et al. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1784-6.
279. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian J Microbiol. 2000; 31: 247-256.
280. Näther G, Alter T, Martin A, Ellerbroek L. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broilers flocks. Poult Sci. 2009; 88: 1299-1305.
281. Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, et al. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. Methods Enzymol. 2013; 531: 371-444.
282. Nebola M, Steinhäuserová I. PFGE and PCR/RFLP typing of *Campylobacter jejuni* strains from poultry. Br Poult Sci. 2006; 47(4): 456-461.
283. Neill SD, Campbell JN, O'Brien JJ, Weatherup STC, Ellis WA. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1985; 35: 342-356.
284. Newell DG, Elvers KT, Dopfer D, Hansson I, Jones P, James S, et al. Biosecurity based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. Appl Environ Microbiol. 2011; 77: 8605-8614.
285. Newell DG, Fearnley C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 4343-4351.
286. Ngulukun SS, Oboegbulem SI, Fagbamila I, Barde I. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in a diagnostic laboratory. Afr J Microbiol Res. 2015; 9(43): 2197-2201.
287. Nieminen TT, Koskinen K, Laine P, Hultman J, Säde E, Paulin L, et al. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. Int J Food Microbiol. 2012a; 157: 142-149.
288. Nieminen TT, Vltalo H, S de E, Paloranta a., Koskinen K, Bjrkroth J. The effect of marination on lactic acid bacteria communities in raw broiler fillet strips. Front Microbiol. 2012b; 3: 1-8.
289. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28(12).
290. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedrosa A, et al. The chicken gastrointestinal microbiome. FEMS Microbiol Lett. 2014; 360: 100-112.
291. Obeng AS, Rickard H, Sexton M, Pang Y, Peng H, Barton M. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. J Appl Microbiol. 2012; 113(2): 294-307.
292. OIE. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008; 2.9.3: 1-8.
293. OIE. Recomendaciones de la OIE sobre las competencias mínimas que se esperan de los veterinarios recién licenciados para garantizar Servicios Veterinarios Nacionales de calidad. PVS Proceso; 2012. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Support_to_OIE_Members/Edu_Vet_AHG/day_1/DAYONE-B-esp-VC.pdf.

- 294.Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1661-1669.
- 295.OMS. *Campylobacter*. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>.
- 296.OMS. Enfermedades diarreicas. 2009. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index.html
- 297.OMS. Medicamentos esenciales y políticas farmacéuticas: Expansión de la base de evidencia farmacéutica. Informe anual OMS. 2001; 1-12.
- 298.OMS. Organización Mundial de la Salud. *Campylobacter*. 2011; 255. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>.
- 299.On SL, Bloch B, Holmes B, Hoste B, Vandamme P. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 767-774.
- 300.On SL. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2001; 1S-15S.
301. Organización Internacional de Normalización (ISO) 10272-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Campylobacter* spp. Parte 1: Método de detección. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2006; 1-22.
302. Organización Internacional de Normalización (ISO) 10272-2. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Campylobacter* spp. Parte 2: Método de recuento. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2006.
303. Organización Internacional de Normalización (ISO) 16140-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2016; 1-77.
304. Organización Internacional de Normalización (ISO) 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2005; 1-36.
305. Organización Internacional de Normalización (ISO) 6887-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2000.
306. Organización Internacional de Normalización (ISO) 7218. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). España. 2007; 1-95.
307. Orihuel E, Bertó R, Milvaques A, Vidal V, Donet C. Manual de manipuladores de alimentos para industrias (6ª ed.). Ed. Trotta-Betelgeux. Gandía. 2011.
308. Orihuel E, Bertó R, Milvaques A. Manual de manipuladores de alimentos para hostelería (3ª ed.). Ed. Trotta-Betelgeux. Gandía. 2008.
309. Orihuel E, Sanz M, Berto R, Canet JJ, Lorenzo F, Corujo A, Milvaques A. *Campylobacter*, la bacteria discreta. Ed. Trotta-Betelgeux. Gandía. 2015.
310. Owen RJ, Hernández J. Ribotyping and arbitrary primer PCR fingerprinting of *Campylobacters*. In: *New techniques in food and beverage microbiology* (Kroll RG, Gilmour A, Sussman M). Soc Appl Bacteriol Technica Series. 1993; 31: 265-285.

311. Pan D, Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 2014; 5: 108-119.
312. Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*. 2002; 74: 177-188.
313. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 2000; 403: 665-8.
314. Parlamento Europeo y Consejo. Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *ES Diario Oficial de la Unión Europea*. 2003; L268/29.
315. Pascal M. Campilobacteriosis, una zoonosis perfecta. *aviNews*. 2017; 2: 84-93.
316. Patriarchi A, Maunsell B, O'Mahony E, Fox A, Fanning S, Buckley J, et al. Prevalence of *Campylobacter* spp. in a subset of intensive poultry flocks in Ireland. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 49: 305-310.
317. Patrick ME, Christiansen LE, Waino M, Ethelberg S, Madsen H, Wegener HC. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 7474-7480.
318. Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 23: 468-472.
319. Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Megraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect*. 2006; 8: 1967-1971.
320. Payot S, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin. *Microb Drug Resist*. 2002; 8(4): 335-343.
321. Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet Microbiol*. 2004; 101: 91-99.
322. Peckham MC. Avian vibriotic hepatitis. *Avian Dis*. 1958; 2: 348-358.
323. Pedrosa AA, Lee MD. The composition and role of microbiota in chickens. 2015; 2: 21-50.
324. Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol*. 1980; 12: 732-737.
325. Pérez-Boto D, López-Portolés JA, Simón C, Valdezate S, Echeita MA. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 2083-2088.
326. Perko-Makela P, Hakkinen M, Honkanen-Buzalski T, Hanninen ML. Prevalence of *Campylobacters* in chicken flocks during the summer of 1999 in Finland. *Epidemiol Infect*. 2002; 129: 187-192.
327. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(10): 2188-2195.
328. Piccirillo A, Niero G, Calleros L, Perez R, Naya H, Iraola G. *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66: 3468-3476.
329. Piddock LJ, Griggs D, Johnson MM, Ricci V, Elviss NC, Williams LK, et al. Persistence of *Campylobacter* species, strain types, antibiotic resistance and mechanisms of tetracycline

- resistance in poultry flocks treated with chlortetracycline. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 303-315.
330. Piddock LJ, Ricci V, Pumbwe L, Everett MJ, Griggs DJ. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 19-26.
331. Pittman MS, Elvers KT, Lee L, Jones MA, Poole RK, Park SF. Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol Microbiol.* 2007; 63: 575-590.
332. Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe simplificado de zoonosis y resistencias antimicrobianas de pollos y pavos de engorde para profesionales del sector avícola. España. 2014.
333. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 870-881.
334. Poppert S, Haas M, Yildiz T, Alter T, Bartel E, Fricke U, et al. Identification of Thermotolerant *Campylobacter* Species by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(6): 2133-2136.
335. Pratt A, Korolik V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55: 452-460.
336. Price LB, Roess A, Graham JP, Baqar S, Vailes R, Sheikh KA, et al. Neurologic symptoms and neuropathologic antibodies in poultry workers exposed to *Campylobacter jejuni*. *J Occup Environ Med.* 2007; 49: 748-755.
337. Pumbwe L, Piddock LJV. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters.* 2002; 206(2): 185-189.
338. Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ, Piddock LJ. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 341-347.
339. Rajkovic A, Tomic T, Smigic N, Uyttendaele M, Ragaert P, Devlieghere F. Survival of *Campylobacter Jejuni* on Raw Chicken Legs Packed in High-Oxygen or High-Carbon Dioxide Atmosphere After the Decontamination With Lactic Acid/Sodium Lactate Buffer. *Int J Food Microbiol.* 2010; 140(2-3): 201-206.
340. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3615-3623.
341. RD 348/2000, de 10 de marzo, por el que se incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 98/58/CE, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas. Este RD se encuentra modificado por el RD 441/2001, de 27 de abril.
342. RD 692/2010, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne y se modifica el RD 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros.
343. Real Decreto 1084/2005, de 16 de septiembre, de ordenación de la avicultura de carne.
344. Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
345. Rechenburg A, Kistemann T. Sewage effluent as a source of *Campylobacter* sp. In a surface water catchment. *Int J Environ Health Res.* 2009; 19: 239-249.
346. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Instituto de Salud Carlos III-Ministerio de Economía y Competitividad-Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Informe

- anual del sistema de información microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. España. 2017.
347. Reglamento (CE) n.º 1099/2009, del Consejo, de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.
 348. Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria.
 349. Reglamento (CE) n.º 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
 350. Reglamento (CE) N.º 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por alimentos.
 351. Reglamento (CE) n.º 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
 352. Reglamento (CE) N.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.
 353. Reglamento (UE) N.º 209/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 en lo que respecta a los criterios microbiológicos para los brotes y las normas de muestreo para las canales de aves de corral y la carne fresca de aves de corral.
 354. Resolución de 18 de octubre de 2011, del Instituto Aragonés de Gestión Ambiental por la que se formula declaración de impacto ambiental y se otorga autorización ambiental integrada para la instalación de una explotación avícola con capacidad para 550.800 pollos de engorde, a ubicar en el polígono 41 parcela 92 y polígono 42 parcela 34 del término municipal de La Puebla de Valverde (Teruel), y promovida por la sociedad Montes del Palancia, S.L. (N.º Expte. INAGA 500301/02/2011/00807) (BOA n.º 223).
 355. Resolución de 2 de marzo de 2006, de la Dirección General de Calidad Ambiental, por la que se formula la Declaración de Impacto Ambiental y se otorga la Autorización Ambiental Integrada para una explotación avícola de pollos de engorde con una capacidad total de 65.000 plazas, ubicadas en las parcelas n.º 117 y 109 del polígono 22 y parcelas n.º 2 y 3 del polígono 15 del término municipal de Cosuenda (Zaragoza) (BOA n.º 33).
 356. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, van Vliet AHM. Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(7): 2122-2128.
 357. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1889-1894.
 358. Riedel CT, Brndsted L, Rosenquist H, Haxgart SN, Christensen BB. Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. *J Food Prot*. 2009; 72: 1173-1180.
 359. Ring M, Zychowska MA, Stephan R. Dynamics of *Campylobacter* spp. spread investigated in 14 broiler flocks in Switzerland. *Avian Dis*. 2005; 49: 390-396.
 360. Roberts M. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Letters*. 2005; 245: 195-203.
 361. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 282: 147-159.
 362. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *BMJ*. 1981; 282(6276): 1584.
 363. Rodrigo C. Uso de los antimicrobianos en la población pediátrica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(5): 310-320.

364. Rodrigues AL. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of violacein and deoxyviolacein. Universidad de Saarland (Alemania). 2014.
365. Rodríguez Ferri EF. Zoonosis emergentes. Profesión veterinaria. 2009; 16(72): 62-79.
366. Romero MR, D'Agostino M, Pérez Arias A, Robles S, Fernández Casado C, Orueta Iturbe L. An immunomagnetic separation/loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. during poultry production. J Appl Microbiol. 2015; 120: 469-477.
367. Rosenquist H, Nielsen NL, Sommer HM, Norrung B, Christensen BB. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. Int J Food Microbiol. 2003; 83: 87-103.
368. Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, Christensen BB. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. Int J Food Microbiol. 2006; 108: 226-232.
369. Rossi M, Debruyne L, Zanoni RG, Manfreda G, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59: 2364-2369.
370. Royden A, Wedley A, Merga JY, Rushton S, Hald B, Humphrey T, et al. A role for flies (Diptera) in the transmission of *Campylobacter* to broilers? Epidemiol Infect. 2016; 1-9.
371. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastanares MJ, Baquero F, Torres C. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 267-271.
372. Sahin O. Ecology of *Campylobacter* colonization in poultry: role of maternal antibodies in protection and sources of flock infection. Universidad Estatal de Ohio. EE. UU. 2003.
373. Salman MD. Animal Disease Surveillance and Survey Systems. Methods and Application. Iowa State Press First Edition. Ed. Blackwell Publishing Professional. Iowa. 2003.
374. Sammarco ML, Ripabelli G, Fanelli I, Grasso GM, Tamburro M. Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. J Food Prot. 2010; 73: 720-728.
375. Sandberg M, Nygård K, Meldal H, Valle PS, Kruse H, Skjerve E. Incidence trend and risk factors for *Campylobacter* infections in humans in Norway. BMC Public Health. 2006; 6: 179.
376. Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, Di Gioia D, et al. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol. 2010; 141(Suppl 1): S98-S108.
377. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nature Rev. Microbiol. 2010; 8: 74-82.
378. Savey M, Dufour B. Diversité des zoonoses, définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. Épidémiol. et santé anim. 2004; 46: 1-16.
379. Saxena M, John B, Mu M, Van TTH, Taki A, Coloe PJ, et al. Strategies to reduce *Campylobacter* colonisation in chickens. Procedia Vaccinol. 2013; 7: 40-43.
380. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 7-15.
381. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, et al. Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. BMC Genomics. 2015; 16: 418.
382. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, et al. Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. BMC Genomics. 2015; 16: 418.
383. Sebald M., and Veron M. Base DNA Content and Classification of Vibrios. Ann Inst Pasteur (Paris). 1963; 05: 897-910.

384. Sellars MJ, Hall SJ, Kelly DJ. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *J Bacteriol.* 2002; 184: 4187-96.
385. Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan T a., Bedford MR, Penn CW, Pallen MJ. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS One.* 2014; 9.
386. Shannon CE, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. Universidad de Illinois. EE. UU. 1949.
387. Shaufi MAM, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog.* 2015; 7: 4.
388. Siemer BL, Harrington CS, Nielsen EM, Borck B, Nielsen NL, Engberg J, et al. Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *J Appl Microbiol.* 2004; 96: 795-802.
389. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review *Front Microbiol.* 2011; 2: 200.
390. Simjee S, EASSA Study Group. European antimicrobial susceptibility surveillance in animals (EASSA) preliminary results (2002-2003): *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from healthy cattle, pigs, and chickens from 8 EU countries. *Zoonoses Public Health.* 2007; 54(1): 48-49.
391. Skanseng B, Kaldhusdal M, Moen B, Gjevre AG, Johannessen GS, Sekelja M, et al. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of infeed organic acids. *J Appl Microbiol.* 2010; 109: 1265-1273.
392. Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br Med J.* 1997; 2(6078): 9-11.
393. Smith T. The Etiological Relation of Spirilla (*Vibrio Fetus*) to Bovine Abortion. *J Exp Med.* 1919; 30: 313-23.
394. Snelling WJ, McKenna JP, Lecky DM, Dooley JS. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 5560-5571.
395. Soejima T, Iida K, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida S. Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(7): 2305-2313.
396. Sommerlad SM, Hendrixson DR. Analysis of the roles of FlgP and FlgQ in flagellar motility of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol.* 2007; 189: 179-186.
397. Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, et al. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol.* 2014; 53: 541-553.
398. Sougakoff W, Papa dopoulou B, Nordmann, Courvalin P. Nucleotide sequence and distribution of gene tetO encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1987; 44: 153-159.
399. Stahl M, Friis LM, Nothaft H, Liu X, Li J, Szymanski CM, et al. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 7194-9.
400. Stanley J, Burnens AP, Linton D, On SLW, Costas M, Owen RJ. *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization and cloning of a species-specific DNA probe. *J Gen Microbiol.* 1992; 138: 2293-2303.
401. Steele TW, Owen RJ. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative *Campylobacters* isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 316-318.
402. Svetoch EA, Stern NJ. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-a review. *Poult Sci.* 2010; 89: 1763-1768.

403. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect.* 2008; 12(3): 217-222.
404. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res.* 2014; 3: 85.
405. Tam CC, O'Brien SJ. Economic Cost of *Campylobacter*, Norovirus and Rotavirus Disease in the United Kingdom. *PLoS ONE* 2016; 11(2): e0138526.
406. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725-2729.
407. Tang Y, R Sahin O, Pavlovic N, LeJeune J, Carlson J, Wu Z, et al. Rising fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* isolated from feedlot cattle in the United States. *Sci Rep.* 2017; 7: 494.
408. Tanner ACR, Badger S, Lai CH, Listgarten MA, Visconti RA, Socransky SS. *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* comb. nov., and description of *Bacteroides gracillis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int J Syst Bacteriol.* 1981; 31: 432-445.
409. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL. *Wolinella curva* sp. nov. *Vibrio succinogenes* of human origin. *Int J Syst Bacteriol.* 1984; 34: 275-282.
410. Tanner NA, Zhang Y, Evans Jr TC, Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques.* 2015; 58: 59-68.
411. Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 1-5.
412. Taylor DE, Hiratsuka K, Ray H, Manavathu EK. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466. *J Bacteriol.* 1987; 169(7): 2984-2989.
413. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006; 119: S3-10; discussion S62-70.
414. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.* 2003; 330: 1005-1014.
415. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 419-431.
416. The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). 2017. Disponible en: <http://www.bacterio.net/Campylobacter.html>
417. Thomas C, Gibson H, Hill DJ. *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *J Appl Microbiol, Symposium Supplement.* 1999; 85: 168S-177S.
418. Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G. Stable concentrated emulsions of the 1 monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 522-526.
419. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology* (2ª ed.). Ed. Wiley Blackwell Science Ltd. Oxford. 1995; 17: 266-285.
420. Torok VA, Hughes RJ, Mikkelsen LL, Perez-Maldonado R, Balding K, MacAlpine R, et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 5868-5878.
421. Torre ME. Aportación al estudio de la incidencia de *Campylobacter jejuni* en pollos broiler tras el sacrificio, destinados al consumo humano. Universidad de Zaragoza. 1985; 6:84.

422. Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM. LAVA: An open-source approach to designing LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) DNA Signatures. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12.
423. Totten P, Fennell CL, Tenover FC, Wezenberg JM, Perine PL, Stamm WE, et al. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.), and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J Infect Dis*. 1985; 151: 131-139.
424. Truscott RB. Transmissible enteritis of turkeys: disease reproduction. *Avian Dis*. 1968; 12: 239-245.
425. Tsai HJ, Huang HC, Tsai HL, Chang CC. PCR-Based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens and dogs in Northern Taiwan. *J Vet Med Sci*. 2006; 68(8): 815-819.
426. Ude GN, Dimkpa CO, Anegebeh PO, Shaibu AA, Tenkouano A, Pillay M, et al. Analysis of genetic diversity in accessions of *Irvingia gabonensis* (Aubry-Lecomte ex O'Rorke) Baill. *Afr J Biotechnol*. 2006; 5(3): 219-223.
427. Urdaneta S, Talavera S, Verdún M, Pagès N, Dolz R, Hald B, et al. Papel de la mosca doméstica (*Musca domestica*) como vector de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en granjas de pollos de engorde de España. 50 Congreso Científico de Avicultura. Lérida. 2013.
428. Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Nguyen Tran D, Thi Kim Pham N, et al. Sensitive and Rapid Detection of *Campylobacter* Species from Stools of Children with Diarrhea in Japan by the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Jpn J Infect Dis*. 2014; 67: 374-378.
429. Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, Shimizu-Onda Y, Nguyen Tran D, Pham NTK, et al. Sensitive and Rapid Detection of *Campylobacter* Species from Stools of Children with Diarrhea in Japan by the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Jpn J Infect Dis*. 2004; 67: 374-378.
430. Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist*. 2005; 11(1): 40-47.
431. van Deun K, Haesebrouck F, Hendrickx M, Favoreel H, Dewulf J, Ceelen L, et al. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 1284-1289.
432. van Deun K, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. Short chain fatty acids and l lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers. *Avian Pathol*. 2008a; 37: 379-383.
433. van Deun K, Pasmans F, Ducatelle R, Flahou B, Vissenberg K, Martel A, et al. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol*. 2008b; 130(3,4): 285-297.
434. Van Dijk JFW, Wiersum F. NTFP resource management as an option for multiple-use forest management in South Cameroon. In M.A.F. RosTonen (ed.) Seminar proceedings. NTFP research in the Tropenbos Programme: results and perspectives. Wageningen: The Tropenbos Foundation. 1999.
435. van Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemo*. 2007; 59: 746-750.
436. Van Gerwe T, Mifflin JK, Templeton JM, Bouma A, Wagenaar JA, Wilma FJ. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75: 625-628.

437. Van TT, Elshagmani E, Gor MC, Scott PC, Moore RJ. *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66: 4518-4524.
438. Vandamme P, Daneshvar MI, Dewhirst FE, Paster BJ, Kersters K, Goossens H, et al. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 145-152.
439. Vandamme P, Debruyne L, De Brandt E, Falsen E. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov. and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60: 2016-2022.
440. Vandamme P, Dewhirst FE, Paster BJ, On SL. *Campylobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* EE. UU. 2015; 1-27.
441. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1991; 41: 88-103.
442. Vandamme P, Van Doorn LJ, al Rashid ST, Quint WG, van der Plas J, Chan VL, et al. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47(4): 1055-1060.
443. Velayudhan J, Kelly DJ. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Microbiol.* 2002; 148: 685-94.
444. Verhoeff-Bakkenes L, Jansen HA, in 't Veld PH, Beumer RR, Zwietering MH, van Leusden FM. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol.* 2011; 144: 406-12.
445. Véron M, Chatelain R. 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.* 1973; 23: 122-134.
446. Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(2): 122-130.
447. Vinzent R, Dumas J, Picard N. Septicémie grave au cours de la grossesse due a un vibrion: avortement consécutif. *Bull Acad Nat Méd.* 1947; 90.
448. Wagenaar JA, Mevius DJ, Havelaar AH. *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Rev Sci Tech.* 2006; 25: 581-594.
449. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol.* 2005; 109: 275-283.
450. Waite DW, Taylor MW. Characterizing the avian gut microbiota: Membership, driving influences, and potential function. *Front Microbiol.* 2014.; 5: 1-12.
451. Waite DW, Taylor MW. Exploring the avian gut microbiota: Current trends and future directions. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1-12.
452. Wanf Y, Huang WM, Taylor DE. Cloning and Nucleotide Sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* Gene and Characterization of Quinolone Resistance Mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(3): 457-463.
453. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2242-2248.
454. Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 1-9.

455. Wassenaar TM. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53: 253-263.
456. Whiley H, Akker VDB, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human Campylobacteriosis. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10(11): 5886-907.
457. White PL, Baker AR, James WO. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. *Rev Sci Tech.* 1997; 16: 525-541.
458. Whittaker RH. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon.* 1972; 21(2/3): 213-251.
459. Whittaker RH. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs.* 1960; 30(3): 280-338.
460. Wiczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int.* 2013; 340605.
461. Wilfinger WW, Mackey M, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques.* 1997; 22: 474.
462. Wilson DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, et al. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet.* 2008; 4: e1000203.
463. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014; 15(3): R46.
464. Wozniak A. Fluoroquinolones resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in 1994-1996 and 2005-2008 in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2011; 55.
465. Yamamoto T, Takano T, Higuchi W, Hung WC, Reva I, Yabe S, et al. Unique features of the motility and structures in the flagellate polar region of *Campylobacter jejuni* and other species: and electron microscopic study. *Microbiol Immunol.* 2013; 57: 83-90.
466. Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 444-451.
467. Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y, Gong JH, et al. A Real-time PCR Assay for the Detection and Quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale J Biol Med.* 2004; 77: 125-132.
468. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 337-348.
469. Yao R, Burr DH, Guerry P. CheY mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol Microbiol.* 1997; 23: 1021-1031.
470. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 1950; 3: 32-35.
471. Zanoni RG, Debryune L, Rossi M, Revez J, Vandamme P. *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59: 1666-1671.
472. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 82(2): 459-466.

IX. Anexo

Figuras

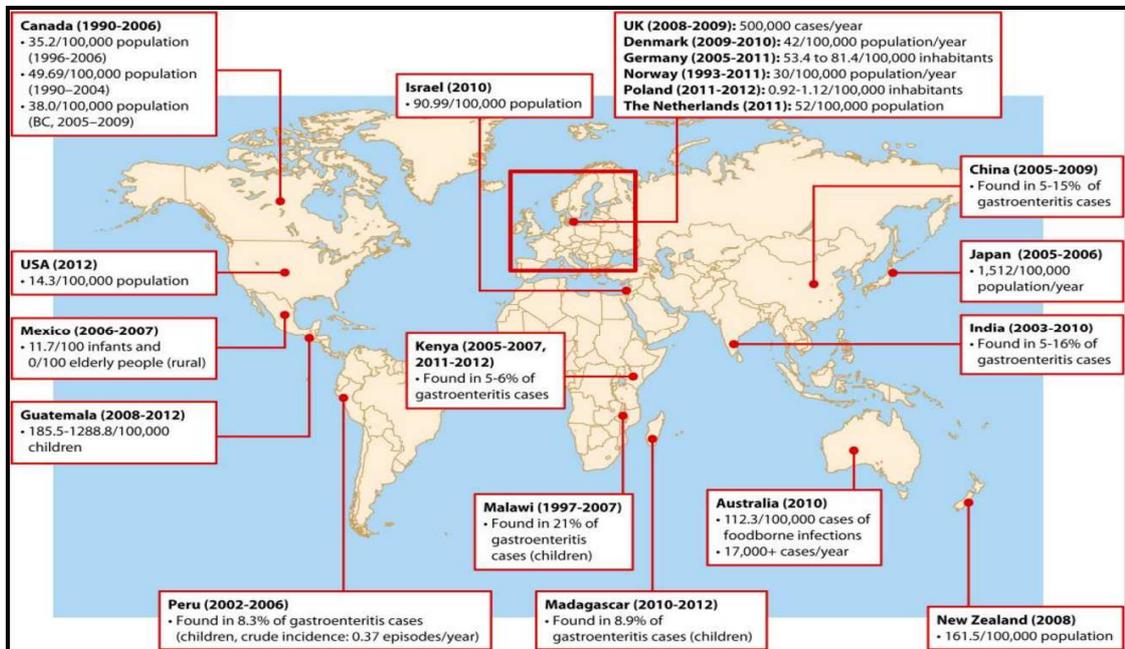


Figura 1. Mapa mundial de casos de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*) (Kaakoush et al., 2015)

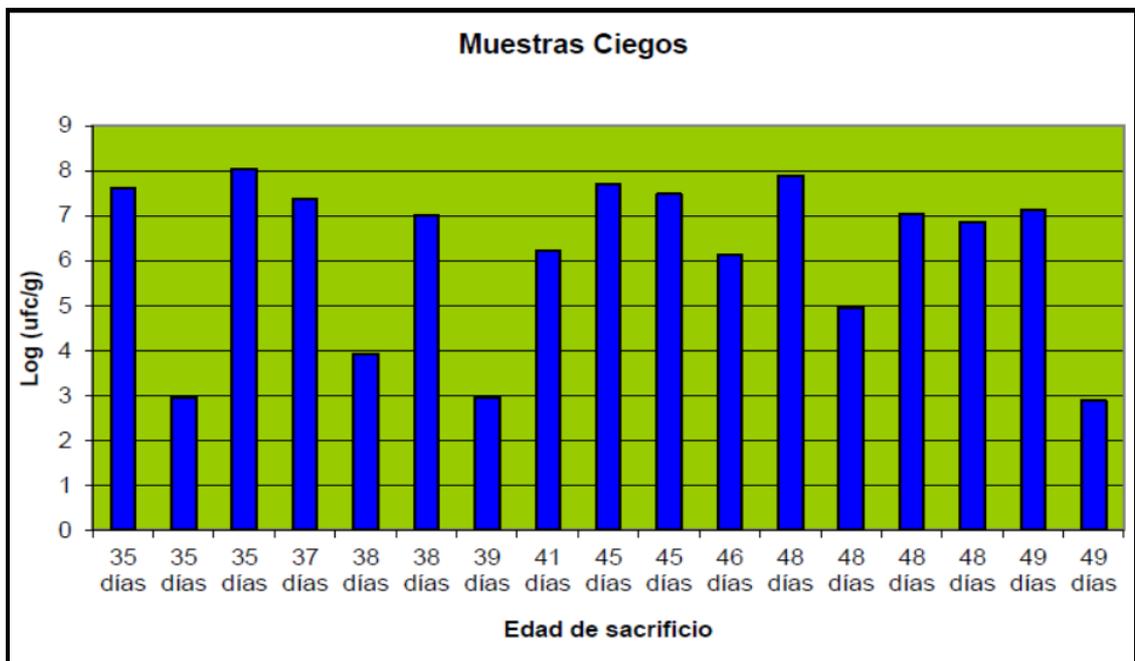


Figura 2. *Campylobacter* en ciegos de broilers según la edad de los pollos (Grupo SADA, Nutreco, 2015)

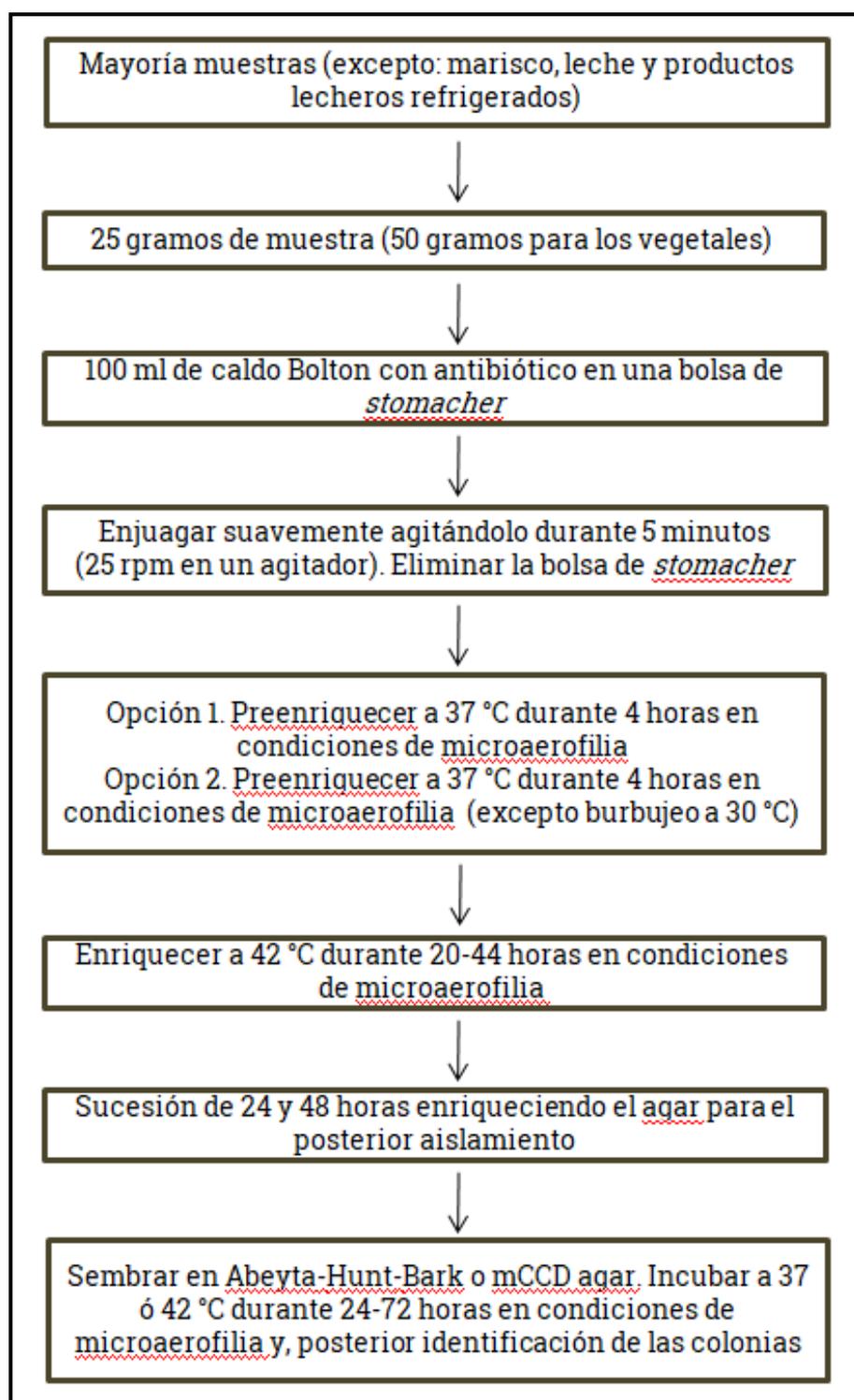


Figura 3. Protocolo establecido por la FDA para *Campylobacter*

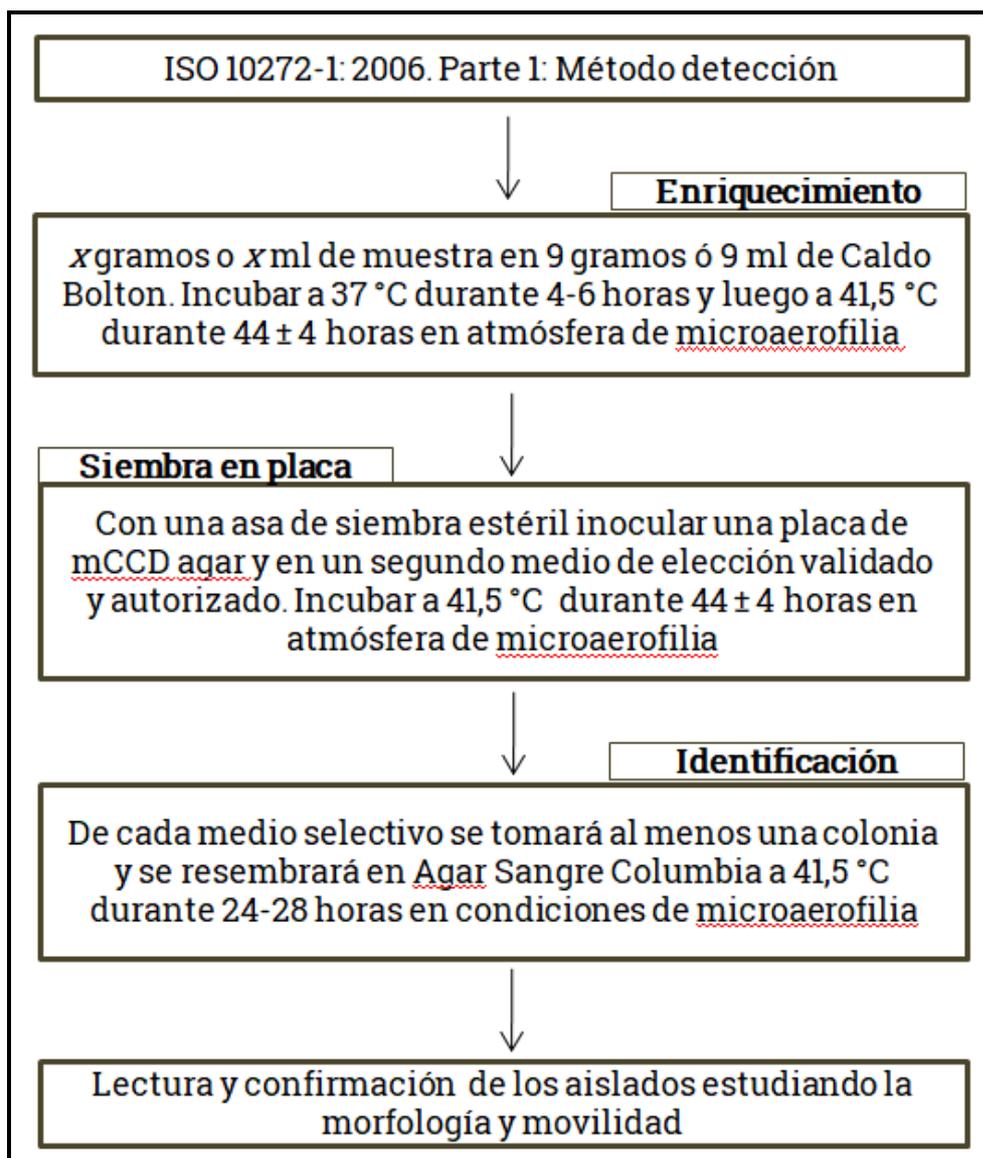


Figura 4. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 10272-1:2006 para *Campylobacter*

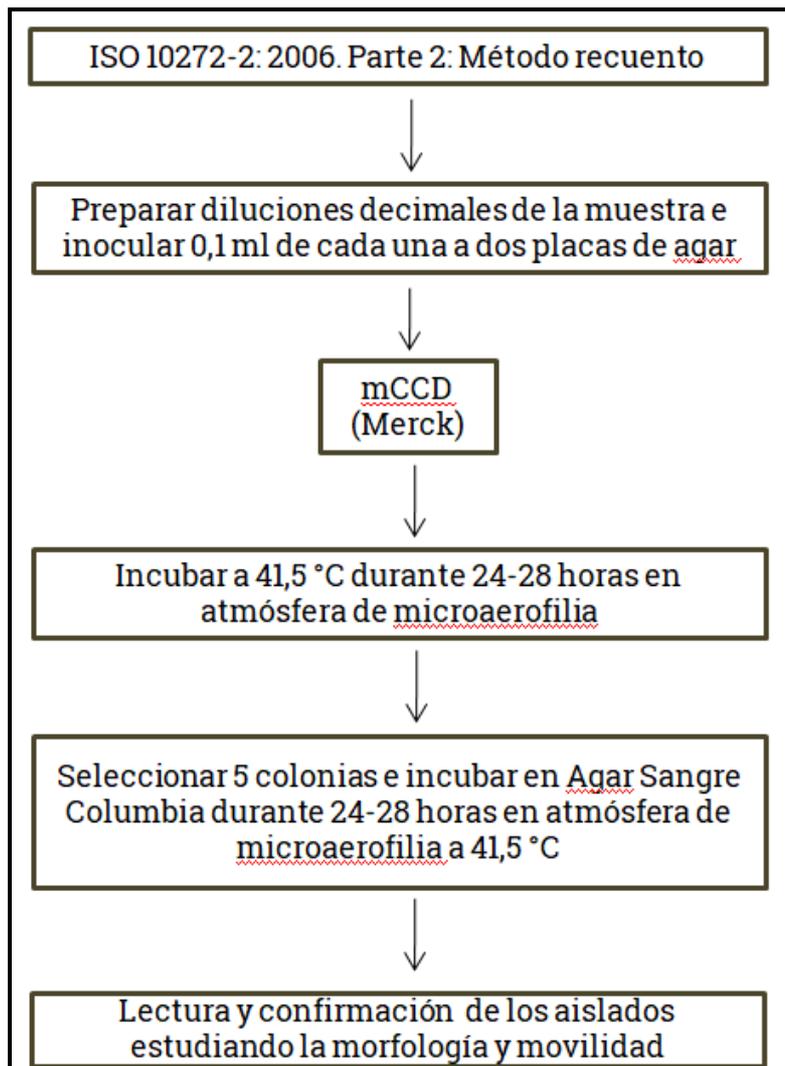


Figura 5. Protocolo establecido por la norma UNE-EN ISO 10272-2:2006 para *Campylobacter*

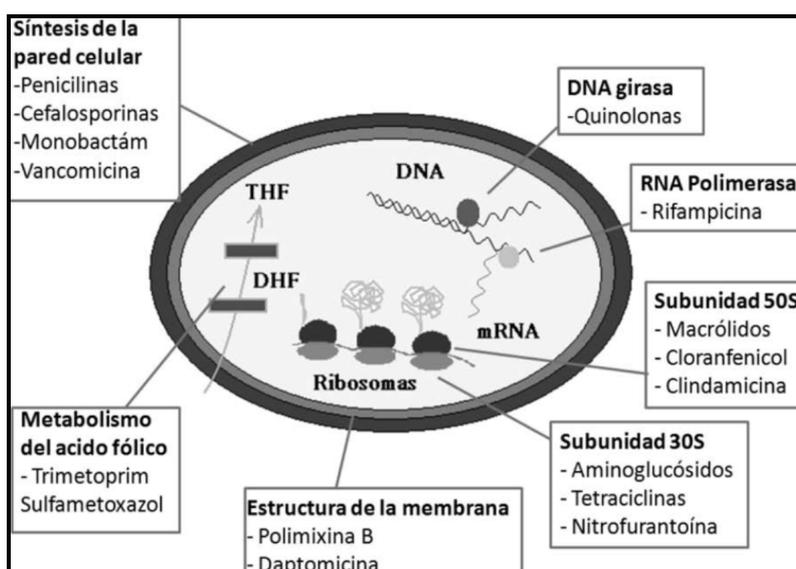


Figura 6. Lugares de acción de los antibióticos (Tafur et al., 2008)



MINISTERIO
DE AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

FONDO ESPAÑOL DE
GARANTÍA AGRARIA

SISTEMA DE IDENTIFICACION DE PARCELAS AGRICOLAS

ORTOFOTO Y PARCELARIO SUPERPUESTO

DATUM HUSO ESCALA FECHA DE IMPRESION



Figura 7. Parcela Montes del Palancia (La Puebla de Valverde, Teruel)



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

FONDO ESPAÑOL DE GARANTÍA AGRARIA

DATOS IDENTIFICATIVOS SIGPAC

Provincia: 50 - ZARAGOZA
Municipio: 88 - COSUENDA
Agregado: 0 Zona: 0
Polígono: 15 Parcela: 2

Coordenadas UTM del centro	Fecha de vuelo de la foto del centroide de la parcela:	06/2015
	Fecha de la cartografía Catastral (*):	07/10/2014
X: 641614,21	Fecha de impresión:	20/07/2017
Y: 4579542,76	Escala aproximada de impresión:	1 : 1500
DATUM WGS84		
HUSO 30		



(*) Pueden existir cambios en la parcelación catastral que aún no se reflejen en SIGPAC.

Figura 8. Explotación de Cosuenda (Zaragoza)

Vitaid AVES

DESCRIPCIÓN: Pienso complementario líquido para aves. Combinación de antioxidantes y aceites esenciales de plantas. Soluble en agua. **INDICACIONES:** Prevención y mejora de trastornos digestivos (bacterianos o parasitarios). **COMPOSICIÓN:** extracto de *Saccharum officinarum*, sales minerales y aceites esenciales (eugenol). **ADITIVOS (x Kg):** Extracto de Satureja sp, N°CAS:8016-18-0:1500 mg; Vitamina E natural (α -Tocoferol): 22300 mg; Extracto de Alliáceas, N°CAS:8000-68-0: 100000 mg. **ANÁLISIS NUTRICIONAL:** Materia seca: 29%, Proteína bruta<1%, Fibra bruta<1%, Grasa bruta:10%; Cenizas<4.5%; Sodio:0.03%; Magnesio:0.01%; **DOSIFICACIÓN:** Administrar 5 gotas por litro de agua de bebida de manera habitual o bien la recomendada por el veterinario. **ALMACENAMIENTO:** Mantener el envase bien cerrado y alejado de las fuentes de calor y luz solar. **PRESENTACIÓN:** Frasco topacio de 125 mL con gotero. **LOTE:** 170/214/VA; **CADUCIDAD:** 31/08/2015; **N° Registro Fabricante:** ESP45000371



Comercializado por LN43, S.L; N° Registro: ESP45000373;
Tfno./Fax:925 278 55 1;central@ln43.com www.ln43.com

Figura 9. Etiqueta composición Vitaid

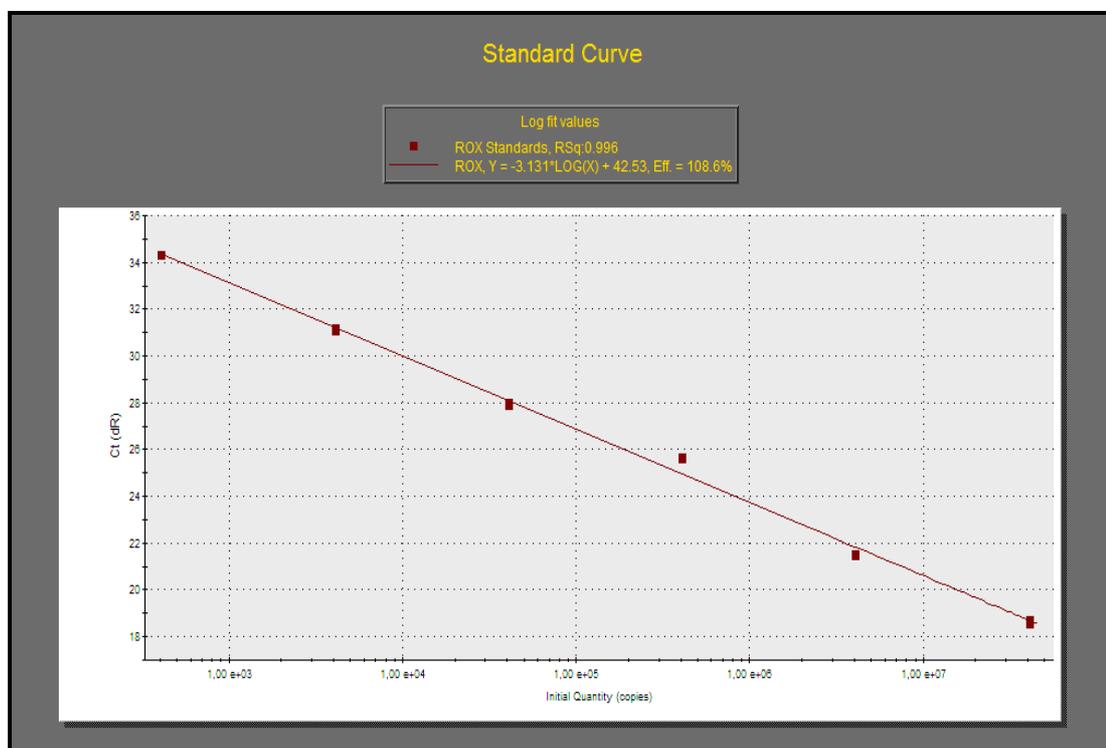


Figura 10. Curva patrón para *C. jejuni* (canal ROX). En ella se aprecia la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente

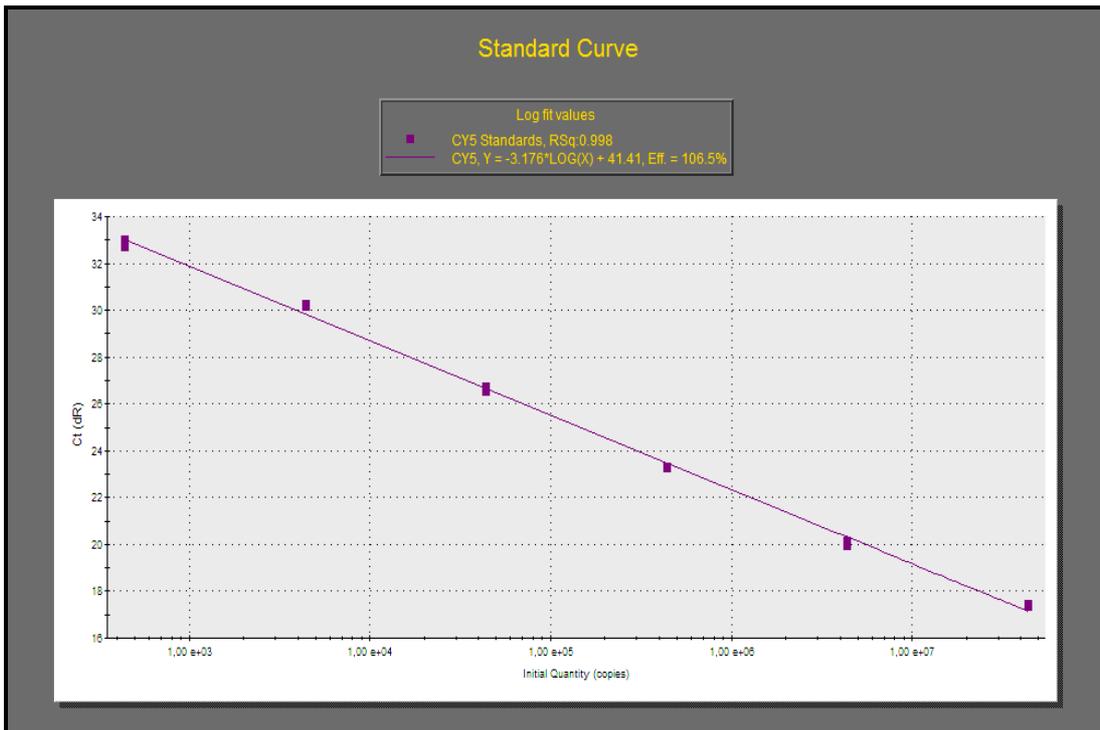


Figura 11. Curva patrón para *C. coli* (canal Cy5). En ella se recoge la eficiencia de la reacción, el coeficiente de correlación (R^2), la intersección y el valor de la pendiente

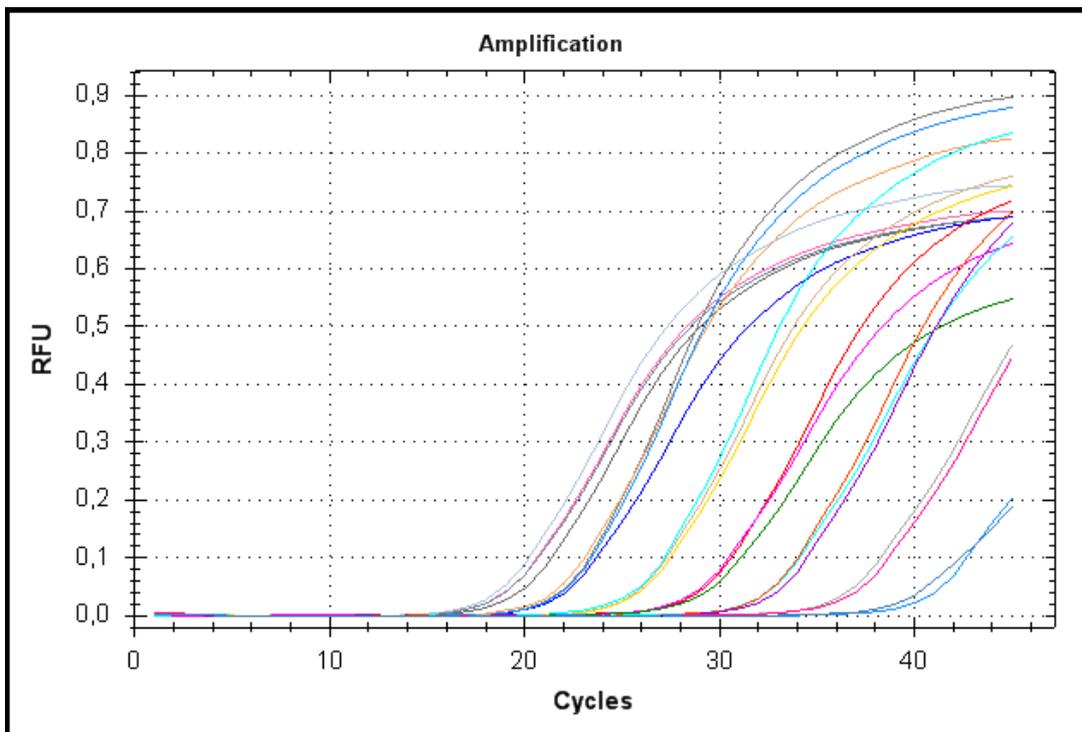


Figura 12. Representa un modelo de gráfica de cuantificación procedente del termociclador CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

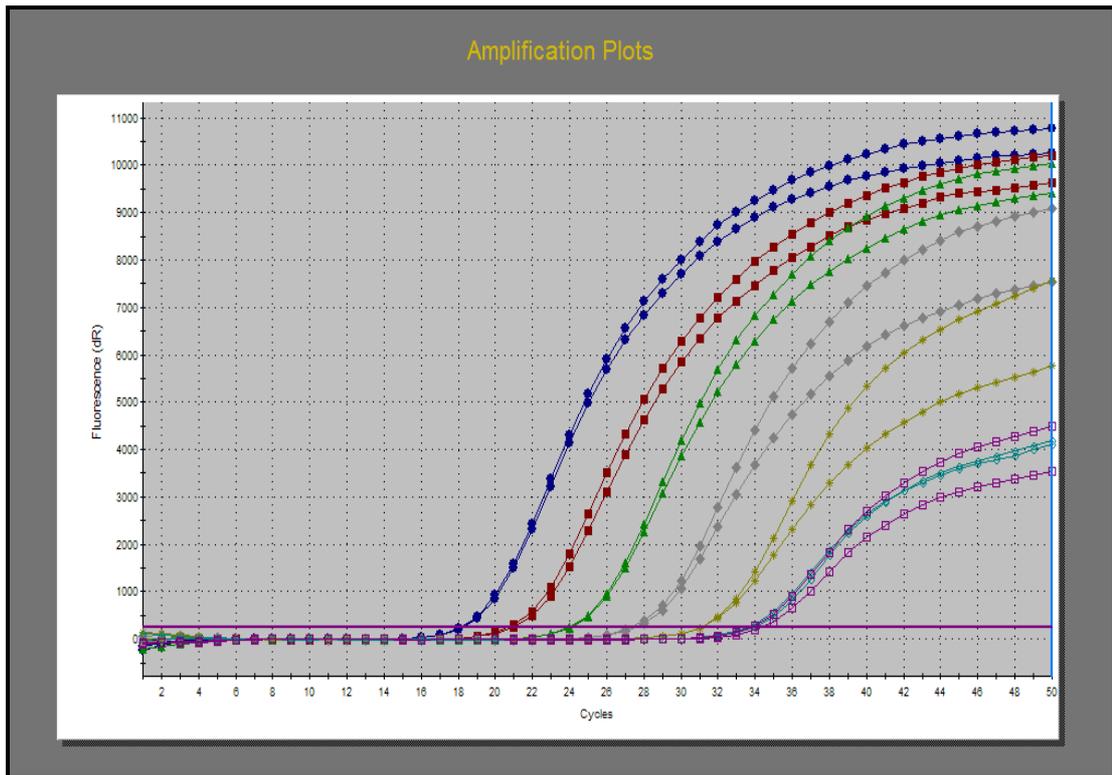


Figura 13. Representa un modelo de gráfica de cuantificación procedente del termociclador Mx3000P® QPCR System (Stratagene)

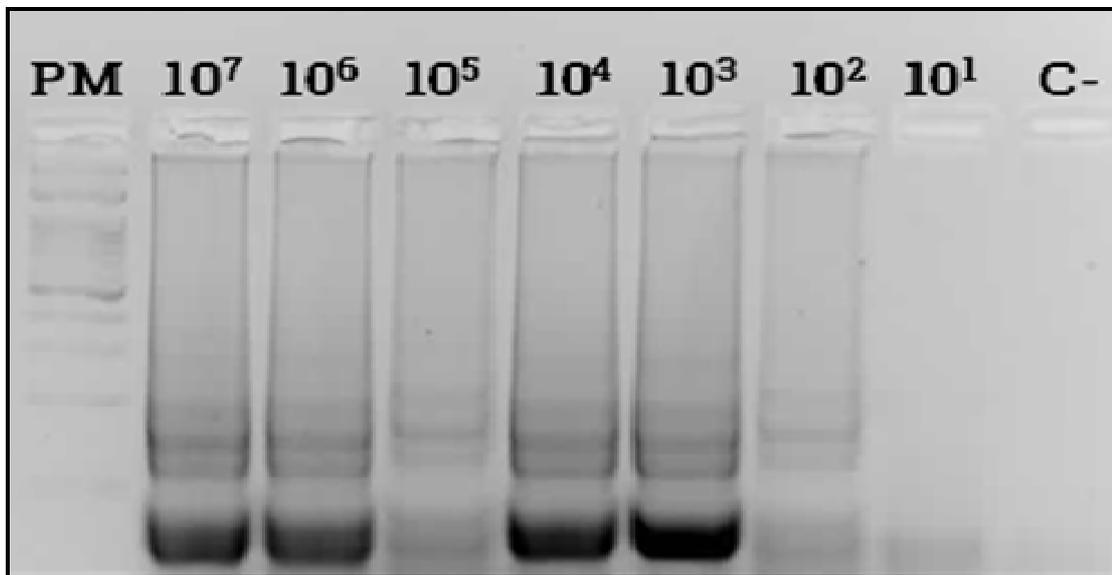


Figura 14. Curva patrón para la prueba LAMP *Campylobacter*. Leyenda: carril 1 (peso molecular), carril 2 ($4-4,4 \times 10^7$ UFC/ml), carril 3 ($4-4,4 \times 10^6$ UFC/ml), carril 4 ($4-4,4 \times 10^5$ UFC/ml), carril 5 ($4-4,4 \times 10^4$ UFC/ml), carril 6 ($4-4,4 \times 10^3$ UFC/ml), carril 7 ($4-4,4 \times 10^2$ UFC/ml), carril 8 ($4-4,4 \times 10^1$ UFC/ml), carril 9 (control negativo)

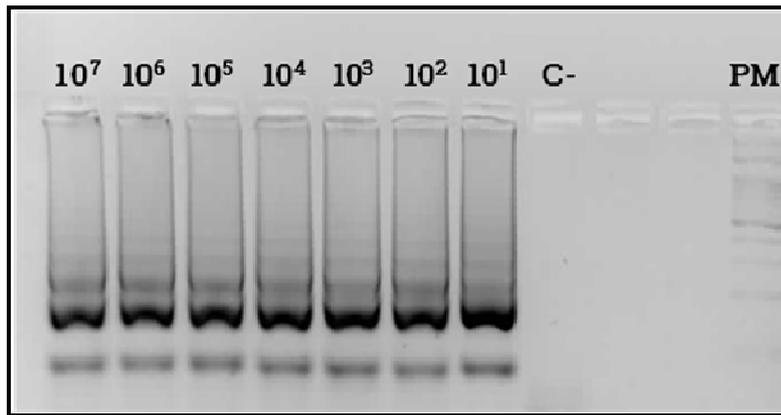


Figura 15. Curva patrón para la prueba LAMP *C. jejuni*. Leyenda: carril 1 (4×10^7 UFC/ml), carril 2 (4×10^6 UFC/ml), carril 3 (4×10^5 UFC/ml), carril 4 (4×10^4 UFC/ml), carril 5 (4×10^3 UFC/ml), carril 6 (4×10^2 UFC/ml), carril 7 (4×10^1 UFC/ml), carril 8 (control negativo), carril 9-10 (pocillos en blanco) y carril 11 (peso molecular)

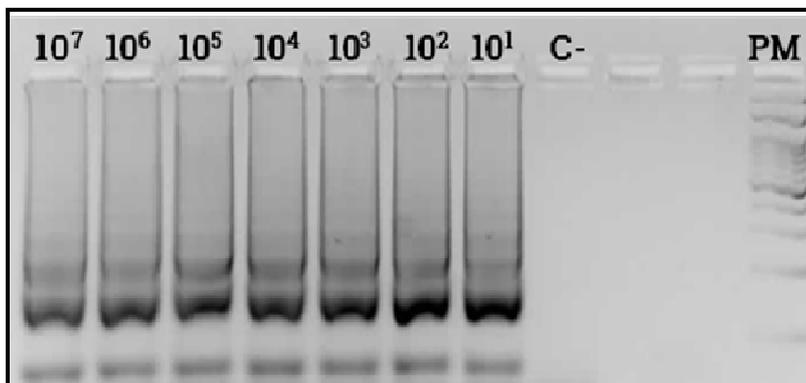


Figura 16. Curva patrón para la prueba LAMP *C. coli*. Leyenda: carril 1 ($4,4 \times 10^7$ UFC/ml), carril 2 ($4,4 \times 10^6$ UFC/ml), carril 3 ($4,4 \times 10^5$ UFC/ml), carril 4 ($4,4 \times 10^4$ UFC/ml), carril 5 ($4,4 \times 10^3$ UFC/ml), carril 6 ($4,4 \times 10^2$ UFC/ml), carril 7 ($4,4 \times 10^1$ UFC/ml), carril 8 (control negativo), carril 9-10 (pocillos en blanco) y carril 11 (peso molecular)

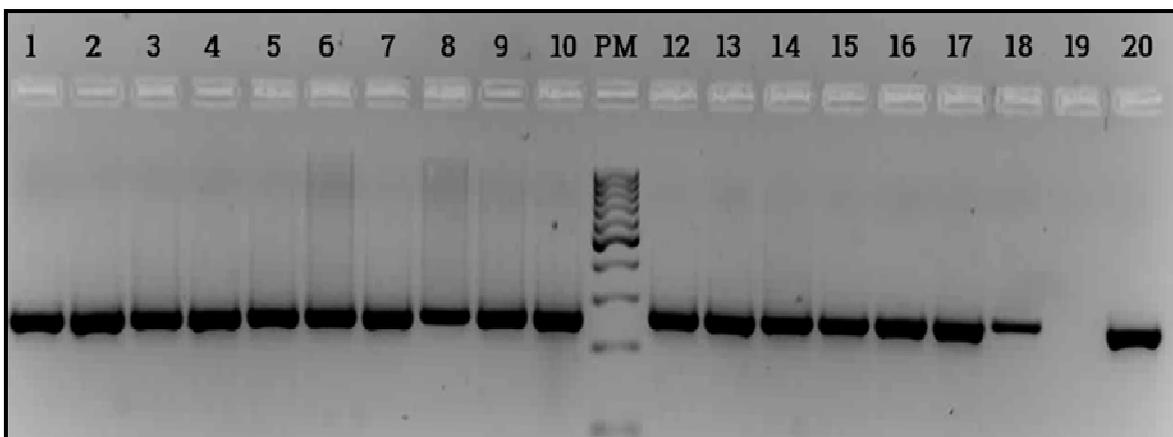


Figura 17. Resultados de PCR para el gen CmeB de los aislados de *Campylobacter*. Leyenda: carriles 1-10 (aislados de *Campylobacter*), carril 11 (peso molecular), carriles 12-18 (aislados de *Campylobacter*), carril 19 (control negativo) y carril 20 (control positivo a 260 pb)

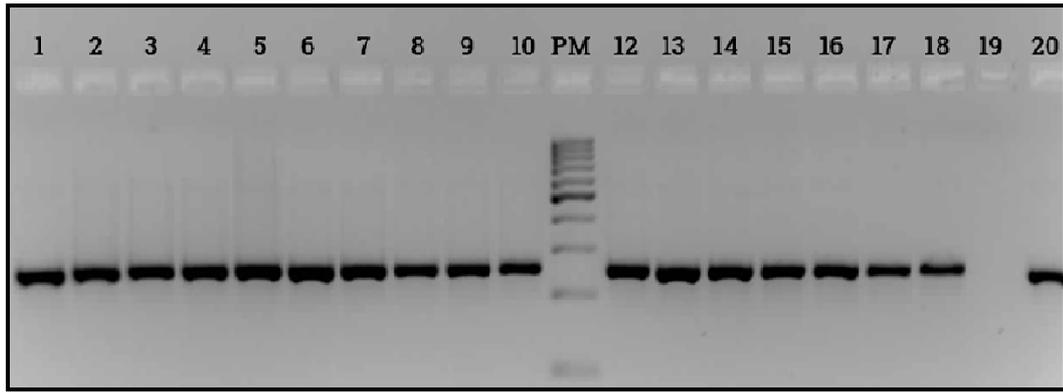


Figura 18 Resultados de PCR para el gen TetO de los aislados de *Campylobacter*. Leyenda: carriles 1-10 (aislados de *Campylobacter*), carril 11 (peso molecular), carriles 12-18 (aislados de *Campylobacter*), carril 19 (control negativo) y carril 20 (control positivo a 241 pb)

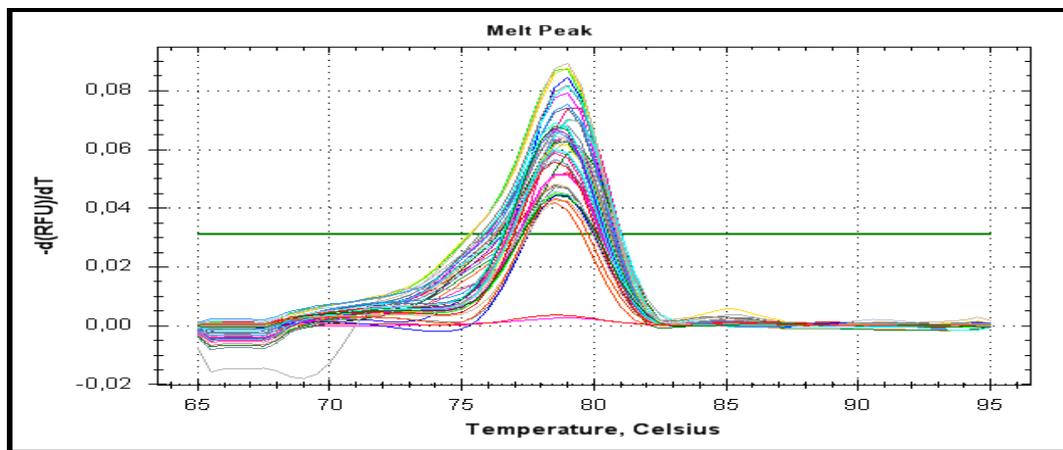


Figura 19. Resultados de qPCR para el gen BLA OXA61 de los aislados de *Campylobacter*. Se trata de una figura con las curvas de fusión específica a 79 °C. Además, la placa de qPCR cuenta con un control negativo y otro positivo

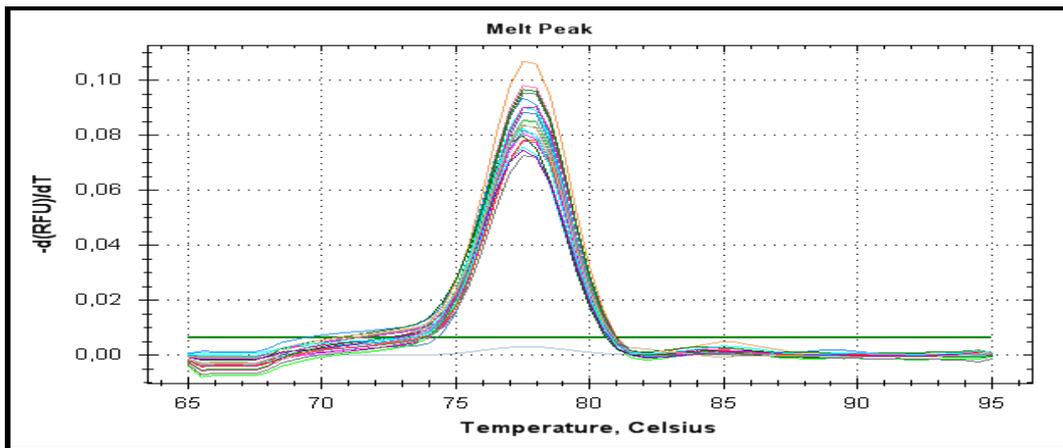


Figura 20. Resultados de qPCR para el gen CmeB de los aislados de *Campylobacter*. Se trata de una figura con las curvas de fusión específica a 77,50 °C. Además, la placa de qPCR cuenta con un control negativo y otro positivo

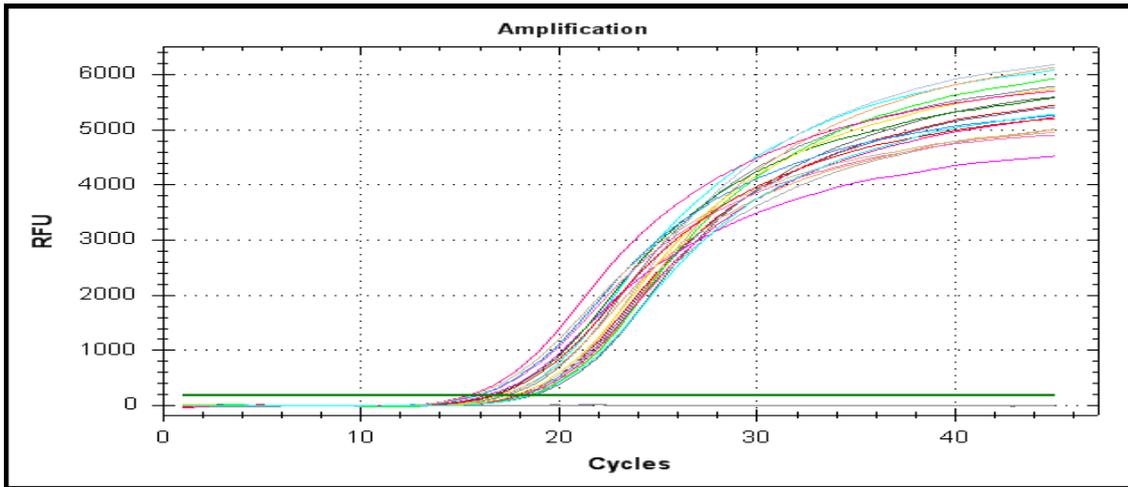


Figura 21. Resultados de qPCR para el gen CmeB de los aislados de *Campylobacter*. Se trata de una figura con las curvas amplificación, en ella se puede observar el número de C_q que poseen nuestros aislados bacterianos.. Además, la placa de qPCR cuenta con un control negativo y otro positivo

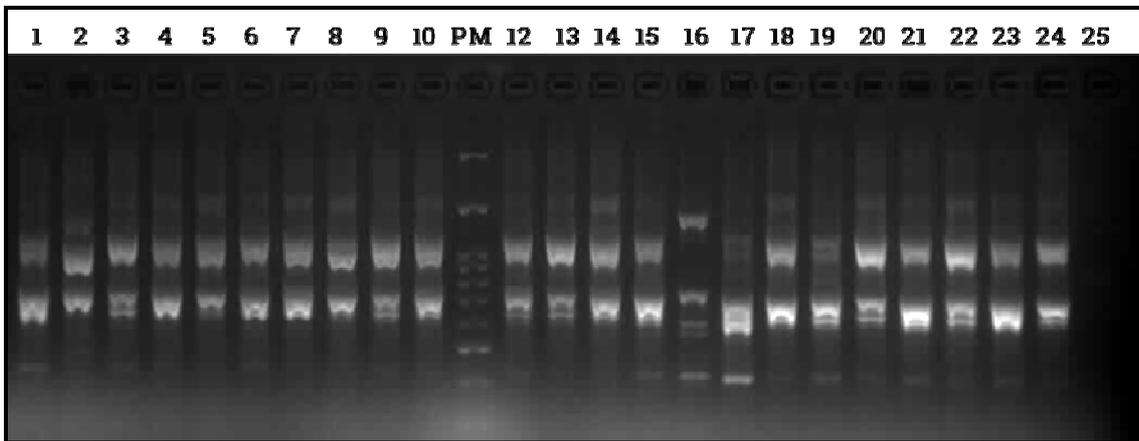


Figura 22. Huellas digitales de los aislados de *Campylobacter*. Leyenda: carriles 1-10 (aislados de *C. jejuni*), carril 11 (peso molecular), carriles 12-15 (aislados de *C. jejuni*), carril 16 (aislado de *C. coli*), carriles 17-24 (aislados de *C. jejuni*) y carril 25 (control negativo)

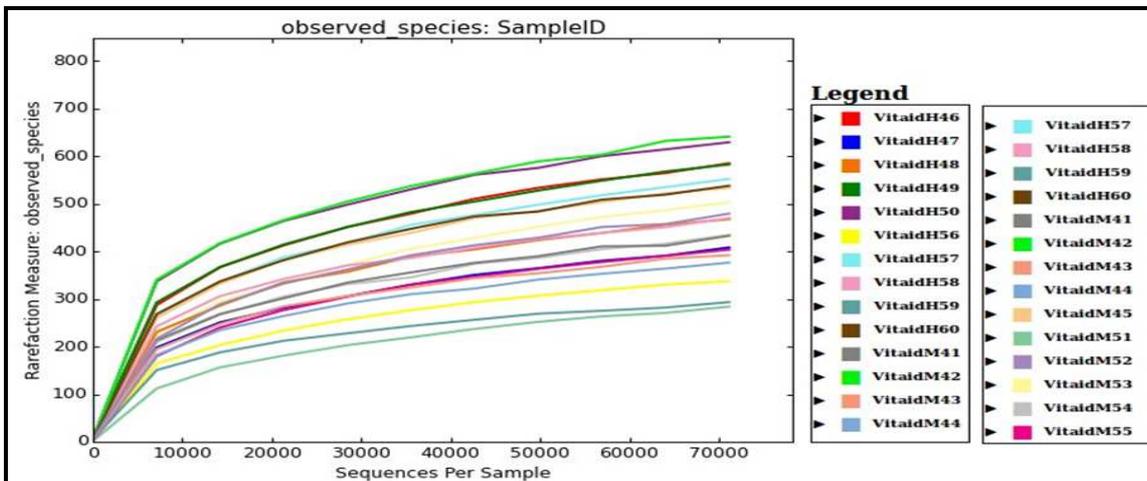


Figura 23. Curvas de rarefacción para cada uno de los 20 metagenomas analizados. En la imagen se muestra el detalle de la simulación del incremento del número de especies con la profundidad de secuenciación

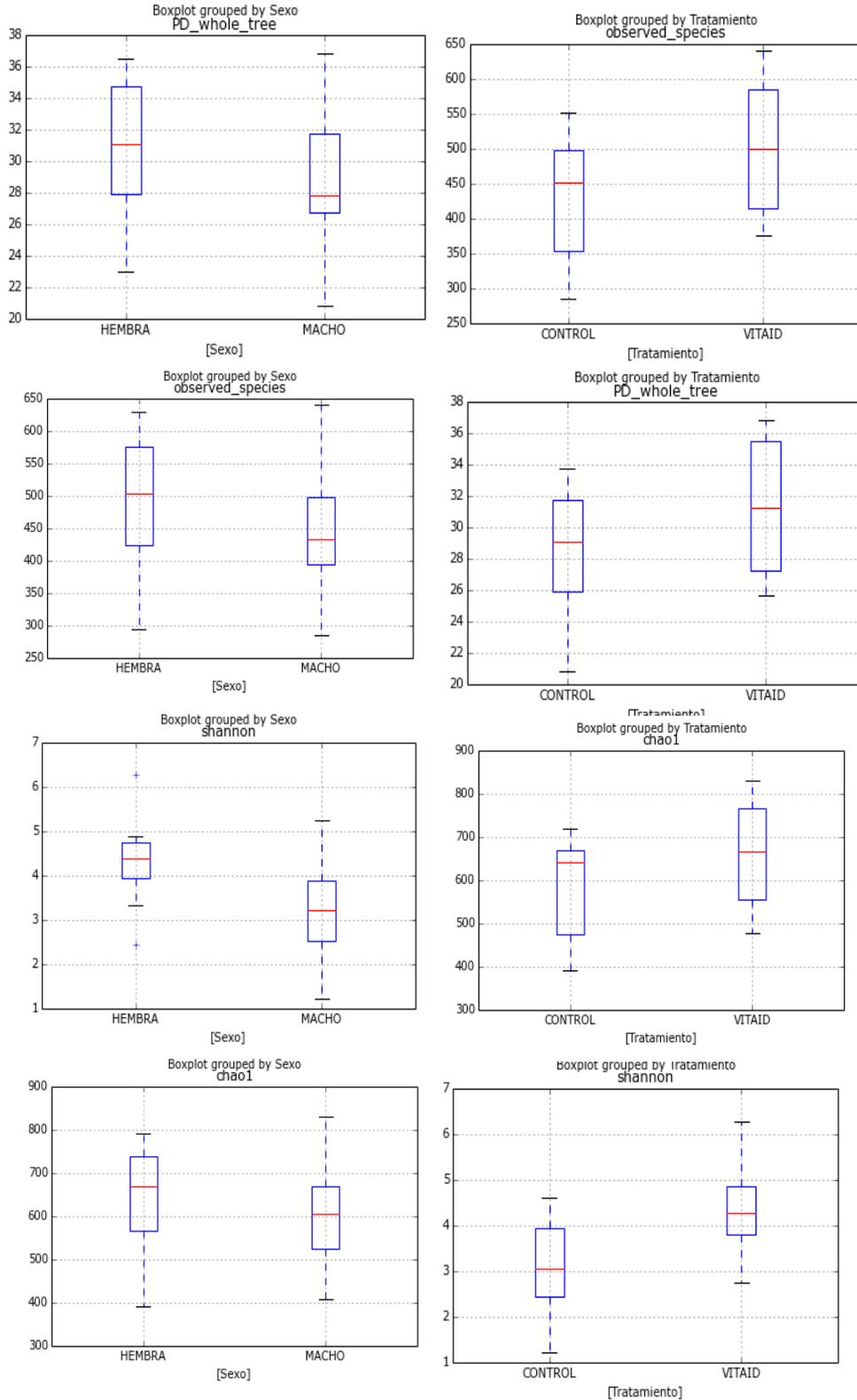


Figura 24. Diagramas de cajas en los que se muestra la distribución de medianas para los principales índices de diversidad (Shannon, Chao y PD) así como para el número de especies identificadas en cada metagenoma individual teniendo en cuenta su sexo (a la izquierda) y el tratamiento recibido (a la derecha)

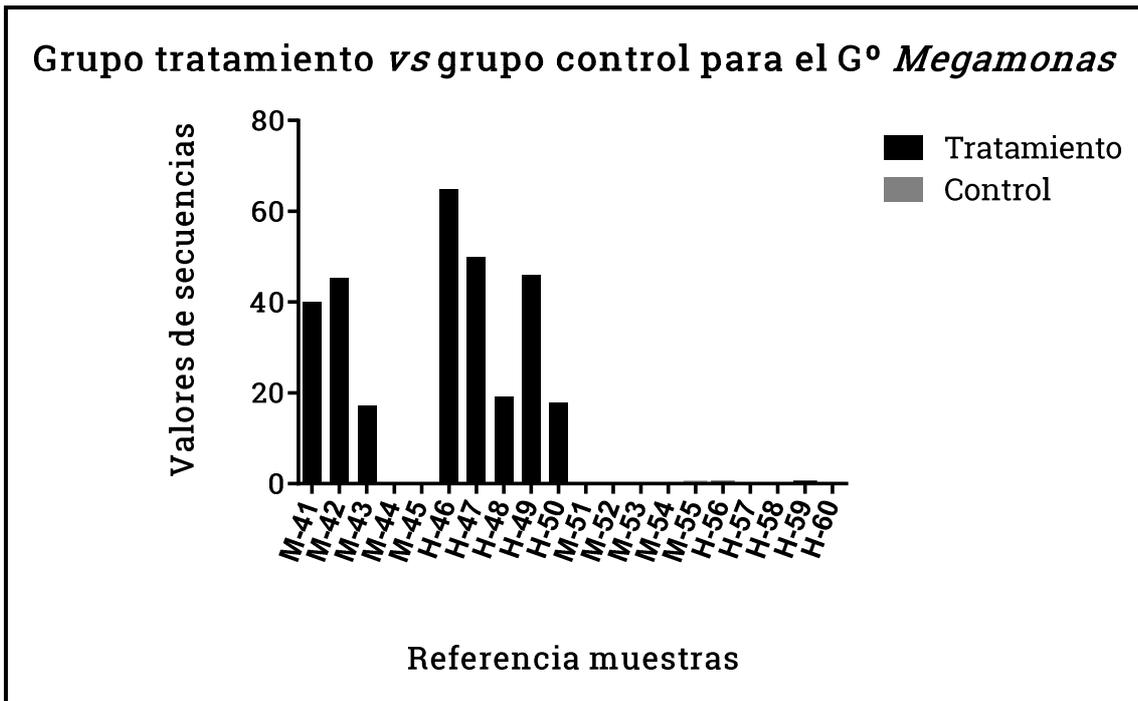


Figura 25. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género *Megamonas*

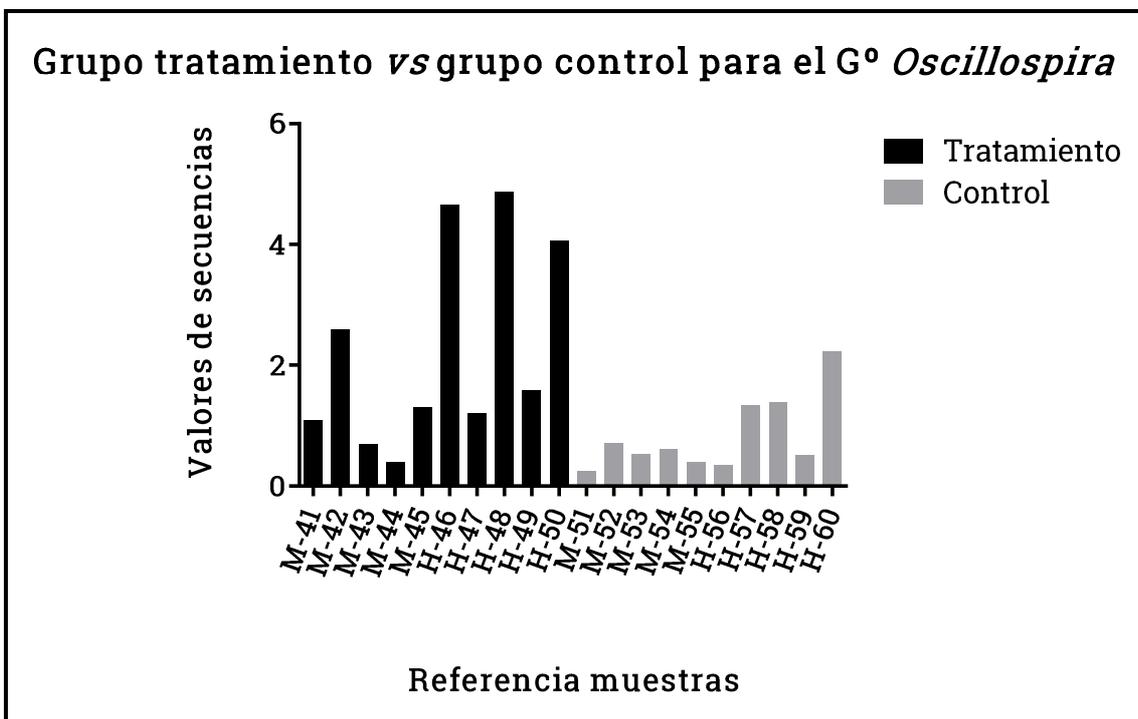


Figura 26. Distribución de las 20 secuencias metagenómicas analizadas según el grupo tratamiento en relación al control para el género *Oscillospira*

Tabla 1. Especies del G° *Campylobacter*

Espece de <i>Campylobacter</i>	Referencia
<i>C. avium</i>	Rossi et al., 2009
<i>C. butzleri</i>	Kiehlbauch et al. 1991
<i>C. canadensis</i>	Inglis et al., 2007
<i>C. cinaedi</i>	Totten et al., 1988
<i>C. coli</i>	Doyle, 1948
<i>C. concisus</i>	Tanner et al., 1981
<i>C. corcagiensis</i>	Koziel et al., 2014
<i>C. cryaerophilus</i>	Neil et al., 1985
<i>C. cuniculorum</i>	Zanoni et al., 2009
<i>C. curvus</i>	Tanner et al., 1984
<i>C. fennelliae</i>	Totten et al., 1988
<i>C. fetus</i>	Sebald y Véron, 1963
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. fetus</i> subsp. <i>testudinum</i>	Fitzgerald et al., 2014
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. geochelonis</i>	Piccirillo et al., 2016
<i>C. gracilis</i>	Vandamme et al., 1995
<i>C. helveticus</i>	Stanley et al., 1992
<i>C. hepaticus</i>	Van et al., 2016
<i>C. hominis</i>	Lawson et al., 2001
<i>C. hyoilei</i>	Alderton et al., 1995
<i>C. hyointestinalis</i>	Gebhart et al., 1985
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	On et al., 1995
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Gebhart et al., 1985
<i>C. insulaenigrae</i>	Foster et al., 2004
<i>C. iquaniorum</i>	Gilbert et al., 2015
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Steele y Owen, 1988
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Jones et al., 1931
<i>C. lanienae</i>	Logan et al., 2000
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Debruyne et al., 2010
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	Benjamin et al., 1983
<i>C. mucosalis</i>	Lawson et al., 2001
<i>C. mustelae</i>	Fox et al., 1989
<i>C. nitrofigilis</i>	McClung et al., 1983

<i>C. peloridis</i>	Debruyne et al., 2009
<i>C. pylori</i>	Marshall et al., 1985
<i>C. pylori</i> subsp. <i>mustelae</i>	Fox et al., 1988
<i>C. pylori</i> subsp. <i>pylori</i>	Fox et al., 1988
<i>C. rectus</i>	Vandamme et al., 1991
<i>C. showae</i>	Etoh et al., 1993
<i>C. sputorum</i>	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>mucosalis</i>	Lawson et al., 1981
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. subantarcticus</i>	Debruyne et al., 2010
<i>C. troglodytis</i>	Kaur et al., 2011
<i>C. upsaliensis</i>	Stanley et al., 1992
<i>C. ureolyticus</i>	Vandamme et al., 2010
<i>C. volucris</i>	Debruyne et al., 2010

Tabla 2. Especies de *Campylobacter* con implicaciones en humanos

Especie de <i>Campylobacter</i>	Hospedador	Referencia
<i>C. coli</i>	Cerdos	Doyle, 1948
<i>C. concisus</i>	Hombre	Tanner et al., 1981
<i>C. curvus</i>	Hombre	Tanner et al., 1984
<i>C. fetus</i>	Ganado, ovejas	Sebald y Véron, 1963
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Ganado, ovejas	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Ganado, ovejas	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. gracilis</i>	Hombre	Vandamme et al., 1995
<i>C. helveticus</i>	Gatos, perros,	Stanley et al., 1992
<i>C. hominis</i>	Hombre	Lawson et al., 2001
<i>C. hyointestinalis</i>	Cerdos, ganado, hombre	Gebhart et al., 1985
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Cerdos	On et al., 1995
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Cerdos, ganado, hombre	Gebhart et al., 1985
<i>C. insulaenigrae</i>	Focas, marsopas	Foster et al., 2004
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Hombre	Steele y Owen, 1988
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves de corral, ganado, hombre	Jones et al., 1931
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Hombre, mársico	Debruyne et al., 2009
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	Gaviotas, perros, marisco	Benjamin et al., 1983
<i>C. mucosalis</i>	Cerdos	Lawson et al., 2001

<i>C. rectus</i>	Hombre	Vandamme et al., 1991
<i>C. showae</i>	Hombre	Etoh et al., 1993
<i>C. sputorum</i>	Ganado, cerdos, hombre	Véron y Chatelain, 1973
<i>C. upsaliensis</i>	Gatos, perros, monos	Stanley et al., 1992
<i>C. ureolyticus</i>	Hombre	Vandamme et al., 2010

Tabla 3. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Campylobacter* procedentes de explotaciones avícolas españolas durante los años 2014-2015 (VISAVET, 2015)

Cepa <i>Campylobacter</i>	Antibiótico	Punto de corte según CMI (µg/ml) (R)	Porcentaje (%)
<i>C. jejuni</i>	Eritromicina	4	0,00
	Cirpofloxacina	0,5	95,00
	Tetraciclina	2	86,25
	Gentamicina	2	0,00
	Ácido nalidixico	16	78,75
	Estreptomicina	4	3,75
<i>C. coli</i>	Eritromicina	8	34,44
	Cirpofloxacina	0,5	94,44
	Tetraciclina	2	97,78
	Gentamicina	2	6,67
	Ácido nalidixico	16	90,00
	Estreptomicina	4	53,33

Leyenda: R (resistente)

Tabla 4. Compuestos activos testados en el PRC

Aditivo	Inclusión (%)	Tipo de combinación	Condiciones
Ácido heptanóico	0,5	Individual en pienso	Experimentales
Ácido caprílico	1		
Ácido cáprico	1		
Ácido cáproico	1		
Etil caprato	1,16		
Carvacrol	0,04		
Eugenol	0,04		
Cinamaldehído	0,04		
Aceite de cilantro	0,08		
Propionato cálcico + ácido sórbico + timol + eugenol	1	Combinada	Experimentales

Mezcla de oligosacáridos	1,5	en pienso	Experimentales
Polifenoles de la uva	0,8		Experimentales
Fermentado de <i>Saccharomyces boulardi</i>	1,5		Experimentales
Campylostát (Proyecto Campybro)	0,5 (0-10 días)		Reales durante todo el ciclo
	1,5 (10-43 días)		
Monocaprina + ácido propiónico	1		Experimentales (3 últimos días)
Ácido fórmico + Ácido propiónico + Formiato amónico + Ácido benzoico + Ácido acético + Quitosatos	1		Experimentales (3 últimos días)
Glicérido C8 y C10 + Glicérido de caprílico + Monobutirina + Monocaprina + Diglicérido de caprílico + Diglicérido de caprílico	1	Combinada en agua	Reales (3 últimos días)
Extracto de satureja sp. + vitamina E + extracto de aliáceas	0,04		Todo el ciclo
Extracto de romero + ácido carnosólico	1		Experimentales (3 últimos días)

Tabla 5. Código de los aminoácidos

Código 1 letra	Código 3 letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

Tabla 6. Referencia material fungible y equipos empleados para este trabajo

Nombre	Referencia	Casa comercial
Calzas	4050	Sodibox
Peptona	355-4179	Bio-Rad
iQ-Check® <i>Campylobacter</i> PCR detection kit	357-8135	Bio-Rad
CASA® medio cromogénico	AEB520270	bioMérieux
Bolsas de plástico para microaerofilia	45 511	bioMérieux
Clips de plástico	45 532	bioMérieux
Microgen® <i>Campylobacter</i>	M46	Microgen Bioproducts Ltd
Agar sangre Columbia + 5% sangre de cordero	43 041	bioMérieux
Foodproof® <i>Campylobacter</i> Quantification Kit - 5'Nuclease-	R30205	Biotecon Diagnostics
AviPro® PLATE	201 5102700	Lohman Animal Health
Mueller Hinton (MH) 2	90922	Sigma-Aldrich
Peptona bacteriológica	LP0037	Oxoid
Agar sangre	CM0271,	Oxoid
Bio-Rad SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	170-2525	Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	3594900	Bio-Rad
MiniOpticon™ RealTime PCR Detection System	3593995	Bio-Rad
RAPID' <i>Campylobacter</i> Agar	356-4295	Bio-Rad
Suplemento liofilizado 10 viales QSP	356-4296	Bio-Rad
Asas de drigalsky estériles	200500	Deltalab®
Generadores de microaerofilia	AG0020C	Oxoid
Clips de plástico	CN0020C	Oxoid
Bolsas de plástico	AN0005C	Oxoid
Master mix de sonda 2X	10.604	Biotoools
Marcador de talla de 100 pb	31.006	Biotoools
MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler	PTC148	Bio-Rad

Tabla 7. Referencia laboratorios

Nombre	Dirección postal
Laboratorio grupo SADA (Nutreco)	Casarrubios del Monte, ctra. CM 4004 km 10,5 de Yuncos a Valmojado, 49950 Toledo
Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología Alquizvetek SL	Facultad de Veterinaria (Universidad de Zaragoza). C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza C/ Dr. Horno Alcorta 31 5 °C, 5004 Zaragoza
Ainia Centro Tecnológico	Parque Tecnológico de Valencia. C/ Benjamín Franklin 5-11, 46980E Paterna (Valencia)
Imegenagro	Parque Científico (Universidad de Valencia). C/ Catedrático Agustín escardino 9, 46980 Paterna (Valencia)
StabVida	Campus FCT-UNL (Lisboa), edificio Departamental de Química. Laboratorios 007-009, 2825-516 Caparica

Tabla 8. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar los medios de cultivo (CASA® y RAPID') con las variables categóricas: tipo de cama y sexo

		CASA® bioMèriux			RAPID' Bio-Rad		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>
Tipo cama	Viruta	81,95	18,05	0,296	82,71	17,29	0,308
	Yeso	100,00	0,00		100,00	0,00	
Sexo	Hembras	86,67	13,33	0,661	86,67	13,33	0,714
	Mixto	82,11	17,89		82,71	17,29	

Tabla 9. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar las técnicas de qPCR (iQ-Chek, qPCR *C. jejuni* y qPCR *C. coli*) con las variables categóricas: tipo de cama y sexo

		iQ-Chek			qPCR <i>C. jejuni</i>			qPCR <i>C. coli</i>		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>
Tipo cama	Viruta	81,95	18,05	0,296	81,95	18,05	0,911	99,25	0,75	0,846
	Yeso	100	0		80	20		100	0	
Sexo	Hembras	86,67	13,33	0,661	86,67	13,33	0,610	100	0	0,726
	Mixto	82,11	17,89		81,3	18,7		99,19	0,81	

Tabla 10. Resultados de las frecuencias obtenidas al relacionar las técnicas de LAMP (LAMP *Campylobacter*, LAMP *C. jejuni* y LAMP *C. coli*) con las variables categóricas: tipo de cama y sexo

		LAMP <i>Campylobacter</i>			LAMP <i>C. jejuni</i>			LAMP <i>C. coli</i>		
		Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>	Negativo (%)	Positivo (%)	Valor <i>p</i>
Tipo cama	Viruta	82,71	17,29	0,875	81,95	18,05	0,911	99,25	0,75	0,846
	Yeso	80	20		80	20		100	0	
Sexo	Hembras	86,67	13,33	0,661	86,67	13,33	0,610	100	0	0,726
	Mixto	82,11	17,89		81,3	18,7		99,19	0,81	

Protocolos

Protocolo. iQ-Chek™ *Campylobacter* PCR Detection Kit (ref. 357-8135). Casa comercial: Bio-Rad

Etapas previas:

Preparar un termobloque o incubador entre 95-100 °C.

Abrir los tapes de los tubos cuidadosamente para evitar contaminaciones cruzadas.

Pipetear el reactivo de lisis mientras se agita cuidadosamente a media velocidad en un agitador magnético para que la solución se mantenga y se pueda recoger la resina sin problemas.

Pasos:

1. Transferir 100 µl del reactivo de lisis homogeneizado en el agitador magnético a un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 100 µl de la muestra a dicho tubo. Mezclar con la pipeta mediante movimientos suaves de arriba hacia abajo y cerrar la tapa del tubo.
3. Incubar la solución en el termobloque a 95-100 °C durante 10-15 minutos.
4. Realizar un vortex de todos los tubos a la máxima velocidad.
5. Centrifugar a 10.000-12.000 × *g* durante al menos 2 minutos cada uno de los tubos.
6. El sobrenadante contiene el DNA puro y puede utilizarse directamente en la PCR. Es estable hasta un año a -20 °C y siempre que se descongele se tiene que centrifugar a 10.000-12.000 × *g* durante 5 minutos.

Protocolo. Microgen® *Campylobacter* (ref. M46). Casa comercial: Microgen Bioproducts Ltd

Control de calidad:

Cada vez que se utilice el kit, se deberán hacer la siguiente comprobación con el control positivo, para confirmar que los reactivos funcionan correctamente:

1. Se deberá colocar una sola gota de 50 µl de control positivo en dos zonas adyacentes de la lámina de prueba.
2. Éstas se deberán analizar con los reactivos de látex de prueba y de control, tal como se describe en "Procedimiento de la prueba", más adelante.
3. Se deberá sospechar el deterioro de un reactivo si:
 - No existe reacción entre el reactivo de látex de prueba y el control positivo, o si la reacción muestra una pérdida significativa de intensidad con el tiempo.
 - El reactivo de látex de control reacciona con el control positivo.
 - Un reactivo de látex se decolora o forma grumos que no se dispersan al agitar con cuidado.

Procedimiento de la prueba:

1. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente. Agitar con cuidado los reactivos de látex para asegurar una suspensión homogénea.

2. Colocar 50 μ l de diluyente de la muestra en cada uno de dos óvalos de la lámina de aglutinación.
3. Utilizar un asa de inoculación para eliminar varias colonias con morfología similar a la de *Campylobacter*. Si hay pocos indicios de crecimiento microbiano, efectuar un barrido amplio de la superficie de agar. Mezclar en la lámina las bacterias de cada una de las dos gotas de diluyente de la muestra, para formar suspensiones uniformes.
4. Añadir una gota (50 μ l) de reactivo de látex de control a una de las suspensiones bacterianas de la lámina. De manera similar, colocar una gota (50 μ l) de reactivo de látex de prueba en la otra suspensión bacteriana.
5. Mezclar las suspensiones bacterianas con los reactivos de látex, usando una varilla para mezclar, comenzando con el reactivo de látex de control. Esparcir las mezclas hacia los bordes de las zonas ovaladas.
6. Balancear con cuidado la lámina, para mantener las suspensiones de líquido en movimiento constante, durante 2 minutos. Observar la presencia de aglutinación.
7. Leer los resultados de la prueba.
8. Desechar las varillas para mezclar y las láminas usadas, con un desinfectante adecuado.

Protocolo. Foodproof® StarPrep One Kit (ref. S40007). Casa comercial: Biotecon Diagnostics

Etapas previas:

No agitar para evitar la formación de espuma en el tampón de lisis. Mezclar cuidadosamente a baja velocidad mediante un agitador magnético mientras se pipetea el tampón para la preparación de la muestra.

Preparar un termobloque o incubador entre 95-100 °C.

Pasos:

1. Mezclar la muestra con un cultivo de enriquecimiento (por ejemplo, peptona) y dejar reposar durante 5-10 minutos.
2. Transferir 100 μ l de la solución a un tubo de 1,5 ml.
3. Si el cultivo enriquecido es totalmente transparente, se recomienda centrifugar durante 5 minutos a $\geq 13.000 \times g$ para incrementar la eficiencia y el rendimiento de la extracción.
4. Eliminar el sobrenadante mediante una pipeta inmediatamente después de la centrifugación, desechando el residuo adecuadamente.
5. Añadir 200 μ l de solución tampón de lisis.
6. Resuspender el *pellet* mediante vortex o pipeteando suavemente arriba y abajo.
7. Incubar la solución en un termobloque o incubador a 95-100 °C durante 10 minutos.

8. Eliminar cuidadosamente el tubo del termobloque y dejar reposar la solución 1 minuto a T^a ambiente (15-25 °C). Después, homogeneizar 2 segundos el vial.
7. Centrifugar 2 minutos a 13.000 × g. El sobrenadante contiene el DNA puro y puede utilizarse directamente en la PCR. Las partes del sedimento podrían inhibir la PCR, por ello, no se recomienda pipetear del fondo del tubo.

Protocolo. Metodología de caracterización genética para *Campylobacter* (Ainia, servicios analíticos).

1. Visualizar macroscópicamente las colonias crecidas en las placas de agar selectivo, con objeto de comprobar la pureza y características morfológicas. En caso de observar diferentes tipos de colonias típicas, caracterizar todas ellas.
2. Extraer el DNA bacteriano. La metodología utilizada está basada en la lisis de los microorganismos mediante una combinación de calor y el uso de un tampón de lisis (chelex-100) con agentes quelantes.
3. Lectura espectrofotométrica del DNA a una longitud de onda de 260 y 280 nm. El DNA cuantificado se ajusta a una concentración de entre 25-50 ng/μl con la finalidad de realizar la amplificación con una cantidad similar de DNA para todas las cepas.
4. Amplificar los fragmentos repetidos del genoma del microorganismo mediante la técnica de Rep-PCR.
5. Detectar los fragmentos amplificados mediante el uso de un chip de microfluidos.
6. Analizar los resultados mediante la comparación de patrones genéticos.

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

Etapas previas:

Corroborar que la solución tampón B5 y la proteinasa K han sido preparados como se indica en la sección 3.

Preparar un termobloque o incubador a 70 °C para pre-calentar el tampón BBE antes de su elución.

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 DNA a la columna: añadir 250 μl de etanol (96-100%) y mezclar bien empleando el vortex. Dejar reposar el lisado a T^a ambiente.
3. Unión del DNA: por cada muestra utilizar una columna de silica provista por el kit comercial. Cargar todo el lisado y centrifugar a 11.000 × g durante

- 1 minuto. Descartar el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
4. Lavado de la membrana de silica: 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 silica: 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 DNA 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 DNA puro extraído de la muestra.

Protocolo. RAPID' *Campylobacter* Agar (ref. 356-4295) + suplemento liofilizado 10 viales QSP (ref. 356-4296). Casa comercial: Bio-Rad

Pasos:

1. Pesar 20 gramos de agar base RAPID' *Campylobacter* y añadirlos a un volumen de 370 ml de agua destilada.
2. Autoclavar 15 minutos a 121 °C y dejar enfriar hasta 50 °C.
3. Rehidratar asépticamente un vial de suplemento liofilizado de RAPID' *Campylobacter* con 30 ml de agua destilada estéril. Homogeneizar con la mano.
4. No se recomienda almacenar las placas en cajas completamente cerradas para así evitar excesos de humedad, tampoco cerrarlas completamente con aluminio.

RESUMEN

En la actualidad, y desde los últimos doce años, la bacteria conocida como *Campylobacter* continúa siendo la zoonosis con el mayor número de casos humanos notificados en la Unión Europea (229.213 en el año 2015). Es por ello que la mayoría de los Estados Miembros tiene la obligación de notificarlos, siendo *C. jejuni* la principal especie termofílica aislada en las personas, seguida en la distancia de *C. coli*. La principal fuente de infección humana es el consumo de carne de pollo contaminada por este patógeno.

Esta Tesis tiene como objetivo principal diseñar e implementar técnicas de diagnóstico rápido y fiables basadas en biología molecular con el fin de permitir su detección en explotaciones de pollos de engorde. Por otra parte, se ha realizado un estudio minucioso acerca de la resistencia antimicrobiana a partir de diferentes aislados procedentes de muestras de calzas. La metodología empleada consistió en la técnica de microdiluciones y la detección de genes de resistencia para los antibióticos que se administran con mayor frecuencia en avicultura de carne.

Otro de los enfoques de este Trabajo radica en el estudio de la microbiota intestinal de ciegos de pollos para observar el efecto de un pienso complementario líquido administrado en el agua de bebida (Vitaid) mediante análisis de secuenciación masiva.

Los resultados derivados de la puesta a punto de las diferentes técnicas diagnósticas revelaron excelentes valores de validez y fiabilidad (> 99%) en todas las pruebas diseñadas para la detección individual o conjunta de *Campylobacter* (*C. jejuni* o *C. coli*). Además, se aislaron 23 cepas de *Campylobacter* sobre un total de las 25 naveas positivas, con tan solo un aislado correspondiente a *C. coli*.

El estudio antimicrobiano determinó una correlación del 100% entre el resistotipo (amoxicilina, doxiciclina, enrofloxacina, lincomicina y tilosina) y el genotipo resistente presente en todos los aislados bacterianos. Asimismo, se ha detectado la mutación Thr86Ile en la región QRDR del gen *gyrA* para todos los aislados de *C. jejuni*.

Para finalizar, el análisis de secuenciación masiva reflejó una mayor diversidad de especies microbianas en los individuos tratados en relación al grupo control. Además, se ha observado que las hembras poseían una microbiota más heterogénea en comparación a los machos. Sin embargo, este ensayo preventivo no resultó efectivo para *Campylobacter* ya que aumentó entre 2-4 veces su carga bacteriana.

