



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias*

“Evaluación de la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en granjas de engorde de pollos parrilleros y plantas faenadoras como base para sustentar científicamente medidas de gestión del riesgo en salud pública”.

Autor: Licenciada en Biotecnología Rossler Eugenia

Directora: Dra. Zbrun María Virginia

Codirector: Dr. Signorini Marcelo

2022

A Lara e Ivo

“No importa lo lento que vayas, no te detengas”- Confucio

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Veterinarias y al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por haberme brindado el espacio y el lugar físico para llevar adelante la realización de esta tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por darme la posibilidad y financiar mi formación académico-profesional.

A mi directora Dra. Ma. Virginia Zbrun y mi codirector Dr. Marcelo Signorini por la paciencia, dedicación y apoyo que me han brindado, así como también por su colaboración intelectual y absoluta presencia en este trabajo. Gracias por la confianza ofrecida y por permitirme trabajar con total libertad.

A la Dra. Lorena Soto, Dr. Laureano Frizzo y Dr. Marcelo Rosmini por la colaboración en el desarrollo de las actividades y por compartir sus conocimientos apuntando siempre a mejorar el trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Lic. Analía Romero-Scharpen, Lic. Ayelen Berisvil, Lic. Carolina Olivero, Dr. Jorge Zimmermann, Dra. Marcia Fusari, Lic. Noelí Sirini, Dr. Diego Astesana, M.V. Melisa Saluzzo y Dra. Jesica Blajman, por todo el tiempo compartido y estar predispuestos y presentes en todas las horas de trabajo a lo largo de nuestra formación. No puedo dejar de agradecerles por su apoyo y constancia y el estar en las horas más difíciles.

A los integrantes del Laboratorio de Ecología de Enfermedades, del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por colaborar en el desarrollo de actividades de este trabajo.

Y por último y no menos importante, a mi familia por brindarme apoyo incondicional, sin ellos nada de todo esto hubiera sido posible.

A todos, GRACIAS.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	II
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1- INTRODUCCIÓN	5
1-1. Historia y características generales del género <i>Campylobacter</i>	6
1-2. Campylobacteriosis humana	10
1-3. Epidemiología	11
1.3.a- Aspectos generales	11
1.3.b- <i>Campylobacter</i> spp. en granja de pollos parrilleros.....	14
1.3.c- <i>Campylobacter</i> spp. en el proceso de faena de pollos.....	20
1.3.d- Fuentes de infección para el hombre.....	24
2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO	25
2-1. HIPÓTESIS.....	26
2-2. OBJETIVO GENERAL	26
2-3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3- MATERIALES Y MÉTODOS	27
3-1. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en granja y planta de faena de pollos parrilleros	28
3.1.1- Toma de muestras y aislamiento de <i>Campylobacter</i> termotolerantes a partir de muestras obtenidas de pollos y vectores/fomites de granjas (PRIMER MUESTREO EN GRANJA).....	28
3.1.2- Toma de muestras y aislamiento de <i>Campylobacter</i> termotolerantes a partir de muestras obtenidas de ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	32
3.1.3- Toma de muestras y aislamiento de <i>Campylobacter</i> termotolerantes a partir de muestras obtenidas de pollos y vectores/fomites de granjas entre períodos consecutivos de crianza de pollos (SEGUNDO MUESTREO EN GRANJA).....	35
3.1.4- Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros.....	37

3-2.	Diversidad genotípica de aislamientos de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros	39
3-3.	Factores de virulencia de aislamientos de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros	41
4-	RESULTADOS	43
4-1.	<i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granja (Primer muestreo en granja)	44
4.1.1-	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	44
4.1.2-	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	54
4.1.3-	Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	59
4-2.	<i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	68
4.2.1-	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	68
4.2.2-	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	74
	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en granja y planta de faena de pollos parrilleros (Difusión por la cadena cárnica aviar).	78
4.2.3-	Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	80
4-3.	<i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos (Segundo muestreo en granja).....	88
4.3.1-	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	88
4.3.2-	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	96
	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en muestreo 1 de granja (G2 - 2015) y muestreo 2 de granja (G2 - 2018).	99
4.3.3-	Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	100
5-	DISCUSIÓN	105
5-1.	<i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granja.....	106
5.1.1-	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	106
5.1.2-	Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	111

5.1.3- Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas	113
5-2. <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	116
5.2.1- Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	116
5.2.2- Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	118
5.2.3- Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros	120
5-3. <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos.....	122
5.3.1- Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	122
5.3.2- Diversidad genotípica de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	124
5.2.3- Factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos	125
6- CONCLUSIONES	126
7- BIBLIOGRAFÍA.....	128
8- ANEXOS.....	165

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

AB	Alimento balanceado del galpón de crianza
ABOr	Alimento balanceado origen del galpón de crianza
ACh	Agua de <i>chiller</i>
AD	<i>Alphitobius diaperinus</i>
C1	Ciclo de crianza 1
C2	Ciclo de crianza 2
C3	Ciclo de crianza 3
C4	Ciclo de crianza 4
Ca	Carcasa de pollo
CCr	Cama de crianza del galpón
Ci	Ciego de pollo
CIA	del inglés <i>Campylobacter</i> invasion antigens; antígeno de invasión de <i>Campylobacter</i>
COr	Cama origen del galpón de crianza
D	Con desinfección
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptica
ECDC	del inglés European Centre for Disease Prevention and Control; Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades
EFSA	del inglés European Food Safety Authority; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	del inglés Food and Agriculture Organization; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

G1	Granja 1
G2	Granja 2
G3	Granja 3
GBS	del inglés Guillain-Barré Syndrome; Síndrome de Guillain-Barré
H₂O beb	Agua de bebedero del galpón de crianza
H₂O Or	Agua tanque origen del galpón de crianza
ISO	del inglés International Organization for Standardization; Organización Internacional de Normalización
LF1	Lote de faena 1
LF2	Lote de faena 2
LF3	Lote de faena 3
M1	Muestreo 1
M2	Muestreo 2
M3	Muestreo 3
M4	Muestreo 4
mCCDA	agar modificado Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón
MLST	del inglés MultiLocus Sequence Typing; Tipificación Multilocus de Secuencias
OpEn	Operario de envasado
OpEv	Operario de eviscerado
pb	Pares de bases
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction; reacción en cadena de la polimerasa
PEv	Pinza de eviscerado

PFGE	del inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis; Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
RAPD	del inglés Random Amplified Polymorphic DNA; ADN polimórfico Amplificado al Azar
RFLP	del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism; polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
SD	Sin desinfección
SupCh	Superficie post <i>chiller</i>
SupEn	Superficie de envasado
SupEv	Superficie de eviscerado
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
UE	Unión Europea
UFC	unidad formadora de colonia
UPGMA	del inglés unweighted pair group method with arithmetic mean; agrupamiento mediante el promedio aritmético no ponderado
USDA	del inglés United States Department of Agriculture; Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VBNC	del inglés “Viable but nonculturable”; viable no cultivable
WGS	del inglés Whole Genome Sequencing; secuenciación completa del genoma
WHO	del inglés “World Health Organization”; Organización mundial de la salud

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de <i>primers</i> y longitud de productos para PCR utilizados en las PCR específicas de género y especie de <i>Campylobacter</i>	39
Tabla 2. Secuencia de <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> y longitud de productos de PCR de factores de virulencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.	42
Tabla 3. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter jejuni</i> aislados en granja.....	54
Tabla 4. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter jejuni</i> aislados en cada granja.....	55
Tabla 5. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> aislados en granja.....	56
Tabla 6. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> aislados en cada granja.....	57
Tabla 7. Perfiles de virulencia para aislamientos de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. obtenidos en granja	65
Tabla 8. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter jejuni</i> aislados en planta de faena.....	74
Tabla 9. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter jejuni</i> aislados en cada lote de faena.	75
Tabla 10. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> aislados en planta de faena.	76
Tabla 11. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> aislados en cada lote de faena	77
Tabla 12: Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter</i> termotolerantes aislados en granja y en planta de faena.	79
Tabla 13. Perfiles de multivirulencia para aislamientos de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en planta de faena	84
Tabla 14. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter jejuni</i> obtenidos en los diferentes ciclos de crianza en granja 2.....	96
Tabla 15. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> obtenidos en los diferentes ciclos de producción en la granja 2.	97
Tabla 16. Perfiles de PFGE de <i>Campylobacter coli</i> obtenidos en muestreos del año 2015 y 2018	99
Tabla 17. Perfiles de multivirulencia para aislamientos de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en ciclos de crianza consecutivos en granja 2.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en granja de pollos.	44
Figura 2. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. total en granja de pollos.	45
Figura 3. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en cada granja de pollos.	45
Figura 4. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. en cada granja de pollos.	46
Figura 5. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes total en granja por muestreo (A) y prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. total en granja por muestreo (B)	47
Figura 6. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes y prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. por muestreo en granja 1 (A y D), granja 2 (B y E) y granja 3 (C y F).	48
Figura 7. Prevalencia <i>Campylobacter</i> termotolerantes totales en granja de pollos según origen de muestra	49
Figura 8. Prevalencia <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. totales en granja de pollos según origen de muestra.	50
Figura 9. Prevalencia <i>Campylobacter</i> termotolerantes por origen de muestra en granja 1 (A), granja 2 (B) y granja 3 (C).	51
Figura 10. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. por origen de muestra en granja 1 (A); granja 2 (B) y granja 3 (C).....	53
Figura 11. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtenidos en granja.	59
Figura 12. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en granja.....	60
Figura 13. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en granja 1 (A), granja 2 (B) y granja 3 (C).....	61
Figura 14. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos de muestras de pollos (A) y aves silvestres (B).	62
Figura 15. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes total en planta de faena de pollos.	68
Figura 16. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> total en planta de faena de pollos	69
Figura 17. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en cada lote de faena de pollos.....	69

Figura 18. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Campylobacter</i> spp. en cada lote de faena de pollos	70
Figura 19: Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en planta de faena de pollos parrilleros por zona muestreada (A) y por origen de muestra (B).	71
Figura 20. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en planta de faena de pollos parrilleros por zona muestreada (A) y por origen de muestra (B).	72
Figura 21. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes, <i>C. coli</i> total y <i>C. coli</i> en muestras de ciego de pollos en zona de eviscerado (zona 1) por lote de faena.	73
Figura 22. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes, <i>C. jejuni</i> total y <i>C. jejuni</i> en muestras de carcasas de pollos en zona de despacho (zona 3) por lote de faena.	73
Figura 23. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtenidos en planta de faena de pollos parrilleros.	80
Figura 24. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en planta de faena de pollos parrilleros.	81
Figura 25. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos del lote de faena 1 (A), lote de faena 2 (B) y lote de faena 3 (C).	82
Figura 26. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes total en la última semana de crianza en granja 2.	88
Figura 27. Prevalencia <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> total en la última semana de crianza en granja 2.	89
Figura 28. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en la última semana de crianza de cada ciclo muestreado en granja 2.	89
Figura 29. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> obtenidos en la última semana de crianza de cada ciclo muestreado en granja 2.	90
Figura 30. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2	91
Figura 31. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2.	91
Figura 32. Prevalencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2.	92
Figura 33. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en el ciclo de crianza 1 (A), ciclo de crianza 2 (B) y ciclo de crianza 4 (C) en granja 2.	93

Figura 34. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en la última semana de crianza por origen de muestra en el ciclo de crianza 1 (A), ciclo de crianza 2 (B) y ciclo de crianza 4 (C) en granja 2 94

Figura 35. Prevalencia de genes de virulencia en *Campylobacter* termotolerantes aislados en granja 2..... 100

Figura 36. Prevalencia de genes de virulencia en *C. jejuni* y *C. coli* aislados en granja 2..... 101

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento de la epidemiología de *Campylobacter* termotolerantes en la cadena cárnica aviar como base científica para el diseño de medidas de manejo del riesgo que permitan reducir el impacto en la salud pública. Para esto, en primer lugar, se estudió la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granjas y planta de faena de pollos de engorde. Se colectaron 1210 muestras en tres ciclos productivos completos de carne aviar en Santa Fe, Argentina. En granjas de crianza de pollos parrilleros se tomaron muestras de pollos (una semana previa al sacrificio), agua de bebida, cama de crianza, alimento balanceado, trabajadores de la granja, aves silvestres, animales domésticos, moscas, escarabajos adultos y larvas (*Alphitobius diaperinus*) y roedores. Posteriormente, se continuaron los muestreos en la línea de faena de los mismos lotes de pollos muestreados en granja. En la planta de faena se tomaron muestras a partir de la zona de eviscerado (ciego de pollo, superficies y pinzas de eviscerado y guantes de operarios), zona de chiller (agua de chiller y superficies) y de la zona de envasado (carcasas de pollos, superficies de trabajo y guantes de operarios). Los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras se obtuvieron en condiciones de microaerofilia por método de filtración en agar mCCDA luego de un enriquecimiento selectivo en caldo Bolton suplementado con antibióticos. Todos los aislamientos fueron identificados a nivel de especie (*C. jejuni* y *C. coli*) por PCR multiplex. En granja, a partir del 21% de las muestras analizadas (n=779) se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes y *C. jejuni* fue la especie más prevalente. Se detectó *Campylobacter* termotolerantes en muestras de pollos, aves silvestres, *Alphitobius diaperinus*, moscas, trabajadores de la granja y cama de crianza. En planta de faena (n=431), se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes del 31% de las muestras analizadas. Los aislamientos fueron obtenidos en todos los puntos muestreados en la línea de faena con excepción del agua de chiller. *C. coli* fue la especie más prevalente. Luego se evaluaron los perfiles genéticos de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado. En base a este análisis, se detectó una alta diversidad genotípica entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes. Sin embargo, se determinó la presencia de determinados genotipos a lo largo de la cadena de producción aviar, así como también la relación entre aislamientos obtenidos en muestras de pollos y en potenciales fuentes de contaminación en granja, o en muestras de ciegos, carcasas de pollos y potenciales fuentes de contaminación en la planta de faena. Por último, se evaluó la presencia de 11 genes asociados a virulencia en los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en las granjas y en planta de faena (*cadF*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *ciaB*, *flaA*, *flhA*, *iam*, *wlaN*, *virB11*, *racR*). Se pudo identificar que *flaA*, *flhA*, *cadF* fueron los genes de virulencia más prevalentes en la totalidad de los aislamientos obtenidos. Se pudo determinar que ciertos genes de virulencia se relacionaron

más a una especie de *Campylobacter* termotolerantes que a otra. También se determinó la presencia de aislamientos que se pueden clasificar como cepas multivirulentas, que presentaron al menos tres y hasta ocho de los 11 genes de virulencia evaluados en simultáneo.

Para finalizar con el trabajo, se estimó la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante cuatro ciclos de crianza consecutivos, se evaluó la relación clonal y se analizó la presencia de genes asociados a la virulencia entre los aislamientos obtenidos. Se tomaron muestras en una misma granja de crianza de pollos parrilleros durante el período de vaciamiento y en la semana previa a la faena de pollos en cuatro ciclos consecutivos de crianza (n=1095). En este estudio no se pudieron identificar fuentes de contaminación de *Campylobacter* termotolerantes en el período de vaciamiento, ya que todas las muestras fueron negativas en el aislamiento. Sin embargo, sí se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en la semana previa a la faena de los pollos a partir de muestras de pollos, vectores como *Alphitobius diaperinus*, aves silvestres y moscas, y de fómites como trabajadores de la granja, cama de crianza y alimento balanceado. La especie más prevalente fue *C. jejuni*. Se pudo detectar que algunos genotipos de *Campylobacter* termotolerantes persistieron en la granja durante ciclos de crianza consecutivos, indicando que algunas cepas permanecen durante el período de vaciamiento. También se detectó la relación entre aislamientos obtenidos a partir de muestras de pollos con aislamientos obtenidos de vectores y fómites. Para finalizar, de los genes de virulencia evaluados, *flaA*, *flhA* y *cadF* fueron los más prevalentes entre los aislamientos obtenidos. También se pudieron identificar ciertos genes más relacionados a cada una de las especies de *Campylobacter* termotolerantes y se encontraron aislamientos que evidenciaron la presencia de entre tres y ocho genes asociados a la virulencia en simultáneo. Toda la evidencia encontrada debería contribuir a las bases científicas para implementar medidas de manejo de riesgo en salud pública.

ABSTRACT

The aim of this work was to contribute to the knowledge of the epidemiology of thermotolerant *Campylobacter* in the poultry meat chain as a scientific basis for the design of risk management measures that reduce the impact on public health. First, the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in broiler farms and slaughterhouse was investigated. A total of 1210 samples were collected from three consecutive rearing cycles at broiler meat supply chains in Santa Fe, Argentina. At farm level, the sampling collection included broilers one week prior to slaughter, drinking water, litter, feed, farm worker's boots, wild-living birds, domestic dogs, flies, darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and wild rodents. At the slaughtering line, the samples taken were from the evisceration zone (broiler cecum, working surfaces, evisceration knives and worker's hands), from the chiller zone (surfaces and direct supply water) and from the packing zone (work surfaces, workers' hands and broiler carcasses). The isolates were obtained under microaerophilic conditions by filtration method onto mCCDA agar after selective enrichment in Bolton broth with supplements. All the isolates were identified to the species level (*C. jejuni* and *C. coli*) by multiplex PCR. At farm level (n=779), the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* was 21% and *C. jejuni* was the most prevalent specie. Thermotolerant *Campylobacter* were detected in samples obtained from broiler, wild birds, *Alphitobius diaperinus*, flies, farm worker's boots and litter. At the slaughterhouse (n=431), the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* was 31%. Thermotolerant *Campylobacter* isolates were obtained from all the points sampled along the process line except for the chiller water. *C. coli* was the most prevalent specie at slaughterhouse. Then, clonal relationship of thermotolerant *Campylobacter* isolated at the farm and slaughterhouse were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). By analyzing PFGE results, a high genotype diversity was found; however, relationships between isolates from different stages of the broiler meat chain, between broiler and potential sources of thermotolerant *Campylobacter* contamination at farm and between cecum and broiler carcasses and potential sources of contamination at slaughterhouse were found. Finally, presence of 11 virulence genes was investigated (*cadF*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *ciaB*, *flaA*, *flhA*, *iam*, *wlaN*, *virB11*, *racR*). *flaA*, *flhA*, *cadF* genes were the most prevalent virulence genes detected in all strains. It was also possible to determine that certain virulence genes were related to thermotolerant *Campylobacter* species. Furthermore, it was also determined the presence of isolates that can be classified as multivirulent strains, which harbored between three and eight of the 11 virulence genes.

Finally, the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in different reservoirs at the farm, the permanence of this pathogen during four consecutive rearing periods, clonal relationship among thermotolerant *Campylobacter* isolates and the presence of virulence genes was evaluated. The samples were taken from the same house farm in the downtime period and during the last week

of broiler rearing, prior to their slaughter during four consecutive cycles (n=1095). In this study, it was not possible to identify the *Campylobacter* sources in the downtime periods because all the samples were negative for *Campylobacter* isolation. However, thermotolerant *Campylobacter* isolates were obtained in the week prior to slaughter from broiler and vectors such as *Alphitobius diaperinus*, wild birds, and flies, as well as from fomites such as farm worker's boot, litter, and feed. *Campylobacter jejuni* was the most detected species. Some *Campylobacter* genotypes persisted in the house farm throughout consecutive rearing periods, indicating that those strains remain during downtime periods. In addition, it was found that there were the same *Campylobacter* clones in broilers and different vectors or fomites. Finally, the most prevalent virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* were *flaA*, *flhA* and *cadF*. There was an association between thermotolerant *Campylobacter* species and certain virulence genes. Furthermore, it was also found that multivirulent strains, which harbored between three and eight of the 11 virulence genes. All these findings are interesting for further evaluations and this evidence should contribute to the scientific basis to implement risk management measures in public health.

1- INTRODUCCIÓN

1-1. Historia y características generales del género *Campylobacter*

El primer reporte de la bacteria a la que se conoce hoy como *Campylobacter* spp. se atribuye a Theodore Escherich, quien al final del siglo XIX (Escherich, 1886) describió en heces de bebés con diarrea un microorganismo espiriláceo, no cultivable, que denominaban “*cholera infantum*”. Este microorganismo se relacionó posteriormente con abortos e infertilidad infecciosa en ganado ovino y bovino (McFadyean y Stockman, 1913; Smith y Taylor, 1919), por lo que se denominó *Vibrio fetus*. En 1957, King observó estas bacterias en diferentes muestras biológicas (King, 1957) y diferenció dos grupos en función de sus características bioquímicas y serológicas: el grupo de *Vibrio fetus* y otro al que denominó grupo termófilo o “*Vibrio relacionados*”. Sebald y Véron (1963) separaron formalmente estos “*Vibrio relacionados*” de la familia *Vibrionaceae* y propusieron el nombre del género *Campylobacter* (Del griego *kampulos*: curvado y *bacter*: bastón).

A partir de los trabajos de Dekeyser y Butzler en la década de los 70 (Dekeyser *et al.*, 1972; Butzler *et al.*, 1973), comenzó el aislamiento de forma rutinaria de aquellas especies de *Campylobacter* que causan infección intestinal. Finalmente, en la década de los 80 se estableció que, sorprendentemente y pese a haber sido ignorado en la microbiología clínica por tantas décadas, *Campylobacter jejuni* era la principal causa de gastroenteritis bacteriana en el hombre (Colgan *et al.*, 1980; Blaser y Reller, 1981).

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacilos Gram-negativos, que pueden medir entre 0,5 – 5 μm de longitud y 0,2 - 0,8 μm de ancho (Vandamme *et al.*, 2005; Facciola *et al.*, 2017). Su morfología puede variar entre vibriónica (bacilos curvados), espirilar, en forma de “S” durante el crecimiento en fase logarítmica y cocoide o esféricos a medida que los cultivos envejecen (Tresse *et al.*, 2017). Además, se ha descrito la aparición de formas viables-no cultivables (VBNC) que parecen ser una respuesta de la bacteria a condiciones de estrés como son la concentración de oxígeno atmosférico, temperaturas extremas o ausencia de nutrientes (Ikeda y Karlyshev, 2012; Facciola *et al.*, 2017). *Campylobacter* son bacterias móviles, con un flagelo en uno o ambos extremos de la célula de tamaño hasta tres veces el de la bacteria (Cohen *et al.*, 2020). Los flagelos son responsables de su movimiento característico en forma de sacacorchos o zig-zag (Debruyne *et al.*, 2008; Facciola *et al.*, 2017; Cohen *et al.*, 2020). Todas las especies pueden desarrollar a 37° C, pero existen especies termotolerantes cuya temperatura óptima de crecimiento es 42 °C (EFSA, 2014). Entre las especies termotolerantes de *Campylobacter* se encuentran aquellas que son patogénicas para el hombre (Fitzgerald, 2015; Facciola *et al.*, 2017).

Respecto al metabolismo, son quimiorganotrofas respiratorias (Vandamme *et al.*, 2015). Estos microorganismos crecen en ambientes microaerófilos, necesitan una atmósfera cuya composición sea 3-5 % de O₂, 2-10 % de CO₂ y 85 % N₂ (Fitzgerald, 2015). Presentan un

metabolismo de tipo respiratorio, son incapaces de oxidar o fermentar los carbohidratos y son oxidasa positivos (Vandamme *et al.*, 2015).

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae* dentro de las ϵ -proteobacterias (Pitkänen y Hänninen, 2017). A la fecha, el género *Campylobacter* está comprendido por 32 especies y 9 subespecies (Costa e Iraola, 2019), de las cuales, 19 especies fueron documentadas como agentes causales de infecciones en humanos y/u otros animales. Esto resalta la relevancia clínica y muestra la diversidad taxonómica del género (Lee *et al.*, 2016). Entre las especies causales de infecciones, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, especies termotolerantes del género, son las especies más frecuentemente asociadas a infecciones humanas causando diarrea o gastroenteritis (Facciola *et al.*, 2017; Tresse *et al.*, 2017; Costa e Iraola 2019).

Existen diferentes metodologías para la detección de *Campylobacter* spp. (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012). Una de ellas es la detección utilizando métodos de aislamiento convencional en medios de cultivo selectivos (Gharst *et al.*, 2013). Todos los medios selectivos contienen un medio base, suplementado con sangre u otros agentes como carbón activado y una variedad de combinación de antibióticos a los cuales *Campylobacter* termotolerantes son intrínsecamente resistentes (polimixina, vancomicina, cicloheximida, cefoperazona, trimetoprima) (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; Gharst *et al.*, 2013;). Para el aislamiento y crecimiento óptimo de microorganismos del género *Campylobacter* se necesitan condiciones de microaerofilia a 37-42 °C durante 48 a 72 h (Gharst *et al.*, 2013; Natsos *et al.* 2019). Si la muestra de origen se sospecha con una alta carga de esta bacteria (por ejemplo, materia fecal de aves de corral) es posible realizar una siembra directa en un medio de cultivo selectivo, como agar modificado Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón (mCCDA), agar Skirrow, agar Preston (Rodgers *et al.*, 2012; Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012; Gharst *et al.*, 2013). En cambio, si se sospecha un bajo número de células de *Campylobacter* spp. (muestras ambientales o de alimentos) se requiere un enriquecimiento previo en un medio selectivo líquido, como caldo Bolton, caldo Preston o caldo Nutritivo (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; Gharst *et al.*, 2013). Existe un método *standard* para la detección y el aislamiento, así como también para el recuento de *Campylobacter* spp. (ISO, 2006), que utiliza como medio de enriquecimiento caldo Bolton y agar selectivo mCCDA. Sin embargo, el aislamiento y la identificación de *Campylobacter* spp. puede ser una tarea muy difícil debido a las demandas particulares de crecimiento (requerimientos de nutrientes en los medios de cultivo, atmósfera con baja concentración de oxígeno, la utilización de antibióticos, etc.) (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012). Debido a estas dificultades en el cultivo tradicional es común el uso de técnicas rápidas de detección de género y especie que utilizan ensayos de PCR convencional o PCR en tiempo real (Pitkänen, 2013; Vandamme *et al.*, 2015) en los cuales, los genes *target* son: el gen *rRNA 16S* (Hellein *et al.*, 2011), el gen *rRNA 23S* (Engvall *et al.*, 2002) y los genes que codifican para flagelina, genes *flaA* y *flaB* (Moore *et al.*, 2001). Entre otros métodos de detección de

Campylobacter spp. se puede utilizar la observación directa por microscopia en campo oscuro para detectar la presencia de células curvadas con movilidad en un preparado fresco, coloración de Gram y tinción con fucsina.

Para la identificación del género y las especies de *Campylobacter* se utilizan pruebas de tipo fenotípicas como tolerancia a diferentes temperaturas, prueba de hidrólisis del hipurato e hidrólisis del indoxil acetato, sensibilidad a discos de determinados antibióticos y, según la especie a identificar, la tolerancia a diferentes concentraciones de sustancias como NaCl, glicina, etc. (Patton *et al.*, 1991; Ghosh *et al.*, 2014). También existen *kits* de inmunoensayos (Khan *et al.*, 2018), o pruebas de tipo genotípicas como reacciones de PCR (Vandamme *et al.*, 2015) e hibridación fluorescente *in situ* (Lehtola *et al.*, 2006).

Existen además diferentes herramientas para caracterizar la variabilidad intraespecie de *Campylobacter*, realizar estudios epidemiológicos, asignar características individuales a una cepa para compararlas con las de otras cepas de la misma especie, establecer un origen común, fuentes de infección, estudios de cepas en un área geográfica, etc. (Taboada *et al.*, 2013). Dentro de éstas, encontramos los métodos fenotípicos como la serotipificación (Lauwers y Penner, 2018) y fagotipificación (Janež y Loc-Carrillo, 2013) y los métodos moleculares como aquellas que se basan en la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) (Taboada *et al.*, 2013), amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (Taboada *et al.*, 2013), ribotipificación (Cox *et al.*, 2010), electroforesis en geles de agarosa con campo pulsado (PFGE) (Ribot *et al.*, 2001) o tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Taboada *et al.*, 2013).

De los métodos mencionados anteriormente PFGE es considerado el método de tipificación de referencia para *Campylobacter* spp. (Behringer *et al.*, 2011). En este método se determina un patrón de bandas de ADN según el tamaño de los fragmentos generados por la digestión enzimática del ADN genómico (Goering, 2010; Zamudio *et al.*, 2011; Ruiz-Castillo *et al.*, 2014). Sin embargo, esta técnica es costosa y laboriosa y puede suponer una limitación importante para la implementación de la técnica en muchos laboratorios. Por otro lado, MLST es uno de los métodos más ampliamente utilizado para la tipificación molecular de cepas de *Campylobacter* spp. (Maiden y Dingle, 2008). La técnica consiste en la secuenciación de fragmentos cortos de siete genes conservados (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* y *uncA*) que generan un perfil alélico y determinan un secuenciotipo que permite agrupar los aislamientos en complejos clonales (Dingle *et al.*, 2001). MLST es altamente reproducible y se ha convertido en la técnica *gold standard* de genotipado, permitiendo la comparación a nivel mundial de forma precisa y sencilla entre diferentes cepas (Dingle *et al.*, 2001; On *et al.*, 2013).

Sin embargo, PFGE y MLST tienen un limitado poder discriminatorio proporcionando únicamente información de tipificación. Existe otra herramienta denominada *Whole Genome*

Sequencing (WGS) que puede brindar un mayor caudal de información sobre *Campylobacter* spp. en cuanto a subtipos, la presencia de genes de virulencia y marcadores de resistencia a los antimicrobianos utilizando un solo método, además de proporcionar un mayor poder discriminatorio para identificar grupos de cepas relacionadas, lo cual es importante en los laboratorios de salud pública (Llarena *et al.*, 2017; Whitehouse *et al.*, 2018).

En el último tiempo se incrementó el conocimiento de ciertos aspectos biológicos de este patógeno y particularmente, los mecanismos de virulencia que contribuyen en la patogénesis de la campylobacteriosis humana (Dasti *et al.*, 2010). Sin embargo, las bases moleculares de tales mecanismos no están completamente descriptos (Bolton *et al.*, 2015).

Estudios previos han demostrado que *Campylobacter* spp. posee una movilidad mediada por flagelos y estas estructuras han sido ampliamente reconocidas como importantes para la patogénesis de esta bacteria. La movilidad mediada por el flagelo, combinado con la forma de la bacteria y el movimiento “saca corchos” permite penetrar la barrera de la mucosa (Dasti *et al.*, 2010; Bolton, 2015). El flagelo es una organela crucial en la patogénesis de *Campylobacter* spp. (da Fonseca Batistão *et al.*, 2016), no solo está involucrado en la movilidad sino que también asume un rol en la quimiotaxis, adherencia e invasión de las células huésped (Dasti *et al.*, 2010; Bolton, 2015). El flagelo de *Campylobacter* spp. está compuesto por flagelina A y flagelina B codificada en dos genes homólogos *flaA* y *flaB* (da Fonseca Batistão *et al.*, 2016). También se detectó que varias proteínas accesorias (como aquellas codificadas por los genes *flhA* y *flhB*) están involucradas en el ensamblado y expresión del flagelo y la exportación de la proteína Cia (antígeno de invasión de *Campylobacter*) esencial para la invasión (Koolman *et al.*, 2015).

Otra característica importante en la patogénesis es la unión y entrada a las células del huésped. Una vez que alcanza la zona *target* del huésped en el tracto gastrointestinal, *Campylobacter* spp. expresa varias proteínas de superficie (codificadas por algunos genes como *cadF*, *racR*, *virB11*) que le permiten adherirse al epitelio con alta afinidad y desencadenan la entrada de la bacteria a las células del hospedador (Dasti *et al.*, 2010; Koolman *et al.*, 2015). La invasión de las células epiteliales puede guiar al daño de la mucosa y la inflamación. Las proteínas Cia, antígenos de invasión de *Campylobacter*, codificadas por el gen *ciaB* están involucradas en la invasión bacteriana, donde son introducidas al citoplasma del huésped a través del sistema flagelar. Sin embargo, el rol de las proteínas Cia en conjunto con otros factores de invasión tal como iam (marcador asociado a la invasión) en los mecanismos de invasión es desconocido (Koolman *et al.*, 2015).

Un factor de virulencia importante de *Campylobacter* spp. es la capacidad de producción de citotoxinas de distensión citoletal (Lapierre, 2013). La más reportada es la toxina CDT codificada por un operón de tres genes (*cdtABC*) (da Fonseca Batistão *et al.*, 2016). La citotoxicidad de CDT

es causada por el bloqueo en la fase G2 del ciclo celular, causa la distensión celular e induce a la apoptosis de la célula del huésped (Lapierre, 2013; da Fonseca Batistão *et al.*, 2016). El gen *cdtB* codifica el componente responsable de la actividad DNAsa y toxicidad de CDT, mientras que los genes *cdtA* y *cdtC* codifican proteínas responsables de la unión e internalización del componente activo en la célula huésped (Lapierre, 2013).

Por último, existe un gen asociado al síndrome de Guillain-Barré, *wlaN*, cuyo producto es uno de los responsables de la estructura de lipopolisacáridos de membrana de *Campylobacter*, involucrado en la expresión de “mimics” de gangliósidos humanos que guían al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré posterior a una infección por *Campylobacter* spp. (Casabonne *et al.*, 2016).

En relación a la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter*, este microorganismo es resistente a penicilinas, cefalosporinas (1° y 2° generación), trimetoprima, sulfametoxazol, rifampicina y vancomicina (Iovine, 2013). Si bien las fluoroquinolonas pueden ser efectivas para el tratamiento de la infección por *Campylobacter* spp. en humanos, la resistencia de estos microorganismos a este tipo de antimicrobianos ha aumentado, limitando la efectividad de estos agentes para esta indicación (Silva *et al.*, 2011). En los últimos años se ha dado la aparición de casos de campylobacteriosis humana causados por cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a diferentes antimicrobianos y esto coincidió con el inicio de la administración de antibióticos a animales destinados a la producción primaria de alimentos. A nivel mundial, el aumento en la proporción de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a los agentes antimicrobianos se ha dado de manera acelerada lo que pone en evidencia la necesidad de un sistema de control en el uso de antibióticos en la producción primaria de alimentos y un sistema de vigilancia para este microorganismo (Signorini *et al.*, 2018).

1-2. Campylobacteriosis humana

La enfermedad más común causada en el hombre por *C. jejuni* y *C. coli* es una gastroenteritis (Kaakoush *et al.*, 2015). Se presenta con diarrea y dolor abdominal, frecuentemente acompañado por vómitos y fiebre y la infección puede resultar en una deshidratación significativa (Kaakoush *et al.*, 2015; Facciola, *et al.*, 2017). La campylobacteriosis es muy similar a otras enfermedades gastrointestinales, usualmente es leve y autolimitada, con síntomas que duran entre 24 y 48 horas en la mayoría de los pacientes (Osaili y Alaboudi, 2016). También, se han descrito, pero de manera infrecuente un número de complicaciones postdiarréicas (infecciones y secuelas extraintestinales) (Epps *et al.*, 2013). Estas pueden ser: infección en las vías urinarias, meningitis, endocarditis, peritonitis, aborto, artritis reactiva y Síndrome de Guillain-Barré (GBS) (Epps *et al.*, 2013; Keithlin *et al.*, 2014; O'Brien, 2017). Existen estudios que demuestran que el desarrollo del GBS es precedido por una infección por *Campylobacter* spp. entre el 20 y el 50 % de los casos

en Europa, América del Norte y del Sur, Japón y Australia; y se sospecha que el porcentaje es mayor en los países en desarrollo (Epps *et al.*, 2013).

Para los seres humanos, la dosis infecciosa de *Campylobacter* spp. se estima que es entre 800-1000 UFC/ml. El proceso de desarrollo de la enfermedad comienza con la ingesta de alimentos contaminados con *Campylobacter* spp. (Kaakoush *et al.*, 2015). Durante el pasaje a través del ambiente ácido del estómago una gran proporción de *Campylobacter* spp. puede ser eliminada, mientras que las bacterias que sobreviven son capaces de adherirse a las células del epitelio intestinal dando como resultado un estado de colonización asintomática o el desarrollo de la enfermedad (Janssen *et al.*, 2008; Lapierre, 2013). La enfermedad que este microorganismo causa es una enteritis inflamatoria que afecta inicialmente el intestino delgado y posteriormente el colon y el recto (Dasti *et al.*, 2010; Kaakoush *et al.*, 2015).

El tratamiento para campylobacteriosis requiere solo de cuidados de apoyo en la mayoría de los casos, que consiste en el mantenimiento de la hidratación y el equilibrio electrolítico y no requiere el uso de antibióticos debido a que es una enfermedad autolimitada (Wieczorek y Osek, 2013). Sin embargo, existen circunstancias clínicas específicas en las cuales es necesaria la utilización de antimicrobianos, dentro de los cuales los macrólidos y fluoroquinolonas, particularmente eritromicina y ciprofloxacina son los de elección (Wieczorek y Osek, 2013; Gaudreau *et al.*, 2015). La eritromicina (macrólido) es el antibiótico de primera elección para las diarreas producidas por *Campylobacter* termotolerantes, por su fácil administración, bajo costo, baja toxicidad, reducido espectro de actividad y su efectividad clínica (Zhang *et al.*, 2016a). La segunda droga de elección es ciprofloxacina (fluoroquinolona), cuyo amplio espectro permite que sea una droga útil para el tratamiento de las diarreas por *Campylobacter* termotolerantes y de otros enteropatógenos (Agunos *et al.*, 2013). Algunas otras drogas alternativas son tetraciclinas y aminoglucósidos como gentamicina (Maćkiw *et al.*, 2012; Wieczorek y Osek, 2013).

1-3. Epidemiología

1.3.a- Aspectos generales

En los últimos años, *Campylobacter* spp., principalmente las especies termotolerantes, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, fue considerado el patógeno zoonótico transmitido por alimentos responsable del mayor número de enfermos a nivel mundial (WHO, 2013). En países desarrollados, los casos reportados de campylobacteriosis a menudo superan los de salmonellosis (WHO, 2013). Esto lo demuestran los diferentes reportes de distintos organismos internacionales. Según la Autoridad Europea de Seguridad alimentaria, en la Unión Europea, los casos reportados de campylobacteriosis humana han ido en aumento desde el año 2005 (EFSA, 2013). Durante el transcurso del año 2008 a 2009 se pasó de 43,9 casos cada 100.000 habitantes

a 45,6 casos cada 100.000 habitantes (EFSA, 2011). Para el año 2011 se observó en la UE un incremento estadísticamente significativo (EFSA y ECDC, 2013), registrando en el último reporte en el año 2017 una totalidad de 64,8 casos cada 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2018). Esto demuestra la tendencia creciente del número de casos de esta enfermedad y hace notorio un problema que afectaría anualmente a un gran número de habitantes en esos países (EFSA y ECDC, 2018). También indica la gravedad del problema comparado con la salmonellosis humana, segunda zoonosis más común en humanos en la UE, que presentó para el año 2017 una totalidad de 19,1 casos cada 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2018). Es importante destacar que, a pesar de los datos, existe una gran incertidumbre sobre la verdadera incidencia de la campylobacteriosis humana (EFSA, 2011). Esta incertidumbre está relacionada con que existen factores de subregistro de datos; la fracción de casos informados está dada por la proporción de pacientes que visitan a un médico a causa de la enfermedad, la proporción de pacientes atendidos por un médico a los que se les tomó una muestra de heces, la proporción de patógenos correctamente identificados en muestras de heces enviadas a laboratorios y la proporción de resultados positivos que se notifican al sistema de vigilancia (Stafford *et al.*, 2008; Gibbons *et al.*, 2014). En un reporte del año 2013 se determinó que en el año 2009 en la UE uno de cada 47 casos de campylobacteriosis era notificado (Havelaar *et al.*, 2013).

Por otro lado, en países como EE.UU., el último reporte de la red de vigilancia activa de enfermedades de origen alimentario perteneciente al centro de control y prevención de enfermedades (CDC) también identifica a *Campylobacter* spp. como una de las causas más comunes de enfermedades de transmisión alimentaria (CDC, 2017). En el reporte del año 2017 se indica que la incidencia en el año 2016 de campylobacteriosis humana en EE.UU. tiene un valor de 12,82 casos cada 100.000 personas (CDC, 2017) y que para el año 2019 la tasa de incidencia subió a 19,5 casos cada 100.000 personas (Tack, *et al.*, 2019), lo que implica un aumento del 13 % en la tasa de incidencia desde el año 2016 al 2019. Esto, nuevamente comparado con la salmonellosis, representa una tasa mayor ya que para la salmonellosis la tasa de incidencia es de 17,1 casos cada 100.000 personas con un incremento del 5 % entre el año 2016 a 2019 (Tack, *et al.*, 2019).

En Australia, en el reporte de 2012 de la red OzFoodNet, se informó una tasa de incidencia de campylobacteriosis de 112,3 casos cada 100.000 personas (OzFoodNet network, 2012). Para el año 2015 el reporte de campylobacteriosis en Australia aumentó a 136,9 casos cada 100.000 personas (NNDSS, 2019).

En América del Sur, la incidencia de la campylobacteriosis también es estudiada debido al gran impacto que tiene, siendo *Campylobacter* spp. el patógeno zoonótico más frecuentemente aislado (Fernández, 2011). Fueron reportadas altas prevalencias de *Campylobacter* spp. en Ecuador,

Argentina, Paraguay y Perú (Rodríguez *et al.*, 2015). A diferencia del tratamiento de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como por ejemplo *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. no está incluido en el vocabulario común, a pesar de que se ha encontrado presente y es una de las bacterias responsable del mayor número de enfermedades de transmisión alimentaria. En Argentina, según datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud del Ministerio de Salud de la Nación, las diarreas agudas ocurren en una tasa de 3.000 casos cada 100.000 personas y *Campylobacter* spp. es el cuarto agente etiológico en orden de importancia según casos reportados (Boletín de Vigilancia, Ministerio de Salud Argentina, 2014). Dentro de las diarreas agudas informadas, *Campylobacter* spp. es el agente causal del 11 % de las infecciones en niños menores a 5 años, ubicándose en segundo lugar luego de *Salmonella* spp. Es importante remarcar que el número de casos con diagnóstico etiológico es muy bajo y no todos los laboratorios de análisis tienen las capacidades necesarias para aislar *Campylobacter*, lo que puede subestimar la prevalencia de la enfermedad y lo que significa que los datos sobre casos o brotes no reflejan la situación real. A pesar de esto, existen estudios realizados sobre este microorganismo en Argentina pero todavía la información epidemiológica es escasa (Fuentes, 2010; Zbrun *et al.*, 2013; Huerta *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015; Rossi, 2017).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos incurren en costos asociados con la enfermedad, e imponen una carga económica para la industria alimentaria y los sectores de salud pública (Buzby y Roberts, 2009). En los estudios de costo de enfermedad, generalmente se hace una distinción entre costos directos como asistencia sanitaria y recursos provistos para la atención médica e indirectos relacionados a pérdidas de productividad debido al ausentismo o pérdida de trabajo de pacientes y sus cuidadores (Mangen *et al.*, 2015). En países desarrollados existen estimaciones y en dichos estudios los costos indirectos parecen ser los que más contribuyen al costo de la enfermedad (Lake *et al.*, 2010; Mangen *et al.*, 2015). Sin embargo, para *Campylobacter* spp. no se estima el impacto económico global; la comparación entre estudios es difícil ya que no existe un método universalmente aceptado para estimar las pérdidas de productividad en caso de enfermedad y la estimación de los costos reales de la campylobacteriosis resulta complicada ya que estos cálculos deben basarse en los datos de incidencia real de la enfermedad (Devleesschauwer *et al.*, 2017). Además, en el impacto de las enfermedades transmitidas por los alimentos, hay otros costos económicos que incluyen las actividades de vigilancia epidemiológica y otras actividades regulatorias para monitorear, prevenir y controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos que tienen también un costo para la sociedad (Martins *et al.*, 2017).

Aunque los datos epidemiológicos globales aún están incompletos se revela un papel cada vez más importante de *Campylobacter* spp. en la salud pública (Kaakoush *et al.*, 2015). Por otro lado,

la falta de datos puede deberse a los requerimientos necesarios para la detección de este microorganismo, así como también a diferencias en la sensibilidad de las metodologías de detección, las diferencias en el estándar y rigurosidad de los protocolos de biocontrol, sesgo de vigilancia, y disponibilidad de reservorios naturales para especies del género *Campylobacter* (Wagenaar, *et al.*, 2013).

1.3.b- *Campylobacter* spp. en granja de pollos parrilleros

Las aves de corral, principalmente el pollo parrillero, son reservorios naturales de *Campylobacter* spp. (Mardones y López, 2017). Estudios epidemiológicos realizados indican que existe una relación lineal entre la presencia de *Campylobacter* spp. en pollos y la incidencia de campylobacteriosis en humanos (Williams *et al.*, 2015; Skarp *et al.*, 2016). La epidemiología de la campylobacteriosis en el hombre no es totalmente conocida y existen diferentes fuentes de infección para el hombre (Kaakoush *et al.*, 2015; Skarp *et al.*, 2016). Sin embargo, el consumo o manipulación de carne de pollo sigue siendo el principal factor para contraer la infección (Skarp *et al.*, 2016). La alta prevalencia de *Campylobacter* spp. en pollos de crianza se refleja en un alto nivel de contaminación de los productos (Jore *et al.*, 2010; Skarp *et al.*, 2016).

Las prevalencias de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos parrilleros son muy variables en los diferentes países (Jore *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2016; Vinueza-Burgos *et al.*, 2017). Esto podría deberse a factores geográficos, sobre todo el clima (Jore *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2016). La influencia del clima se puede observar en la estacionalidad de los datos, con picos en verano (Jore *et al.*, 2010; Bahrndorff *et al.*, 2013). Las altas temperaturas podrían tener efectos sobre posibles fuentes de infección en la granja (aumento de insectos y roedores, aumento del consumo de agua, etc.) posibilitando la entrada y diseminación del microorganismo en la granja (Lawes *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2013). En muchas ocasiones, la comparación de datos de prevalencia entre países e incluso dentro de un mismo país es muy difícil (Jore *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2016). La variación de datos puede deberse a que el método de muestreo, transporte de la muestra, método de detección o informe de resultados no están estandarizados (Sommer *et al.*, 2016). Otro factor que podría tener influencia en la prevalencia de *Campylobacter* spp. en granjas es la edad de las aves al momento del muestreo (Colles *et al.*, 2011; Torralbo *et al.*, 2014). Cuando el pollo adquiere la bacteria, permanece colonizado hasta su sacrificio, aproximadamente hasta los 45-55 días de vida (Hermans *et al.*, 2010). Esto le permite al pollo dispersar la bacteria con sus deposiciones contaminando el ambiente de la granja (Sahin *et al.*, 2015). Este proceso se ve favorecido por la densidad de población en los galpones de crianza, cuanto mayor sea el número de aves, mayores son las tasas de colonización por *Campylobacter* spp. (Skarp *et al.*, 2016; Sibanda *et al.*, 2018).

En las condiciones normales de producción, los pollos son colonizados por *Campyloacter* a una edad de dos a cuatro semanas de vida debido a la presencia de anticuerpos maternos que confieren protección contra la colonización (Pielsticker *et al.*, 2012). Una vez que el microorganismo es introducido en el lote, la diseminación entre individuos es muy rápida (Hermans *et al.*, 2012). Los pollos son coprófagos, lo que facilita la diseminación fecal oral (Wassenaar, 2011; Newell *et al.*, 2011). Sin embargo, la rapidez de colonización sugiere que también se disemina a través de otras fuentes (Skarp *et al.*, 2016). Cuando un lote de pollos se vuelve positivo para *Campylobacter*, la prevalencia hacia el final de la producción suele ser alta y puede alcanzar la totalidad de pollos colonizados (Pielsticker *et al.*, 2012). La infección persiste en el lote de pollos hasta el momento en el que se produce la faena (Sahin *et al.*, 2015).

Actualmente, es un debate si la transmisión vertical juega un papel importante en la diseminación de *Campylobacter* spp. entre los pollos (Silva *et al.*, 2011). La noción actual es que la transmisión vertical de *Campylobacter* spp. no ocurre u ocurre muy raramente debido a dos razones. Primero, los pollos de engorde jóvenes generalmente están libres de *Campylobacter* spp. antes de las 2 o 3 semanas de edad (Skarp *et al.*, 2016) a pesar de que nacen de huevos provenientes de gallinas reproductoras infectadas por *Campylobacter* spp. (Sahin *et al.*, 2003; Callicott *et al.*, 2006; Sahin *et al.*, 2015); y segundo, los estudios que rechazan la idea de la transmisión vertical se basan en que no se aíslan los mismos genotipos en las cepas aisladas en las gallinas reproductoras y en los descendientes (Cox *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la presencia de *Campylobacter* spp. en la superficie de los huevos de pollos está relacionado con la presencia de materia fecal de la gallina reproductora (Parisi *et al.*, 2015). Sin embargo, la penetración de la cáscara ocurre en muy bajo índice y las membranas sirven como una barrera efectiva (Fonseca *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta que en la industria avícola, tras la puesta de huevos fecundados y de forma previa a la incubación, se realizan procesos de higienización, por lo que la contaminación en las incubadoras una vez se ha constituido la cáscara parecería poco probable (Messens *et al.*, 2011).

Por otro lado, la transmisión horizontal de *Campylobacter* spp. en el ambiente de la granja y desde el ambiente hacia los pollos es considerada la forma más importante de diseminación de este microorganismo (Newell *et al.*, 2011). Esta diseminación de *Campylobacter* spp. se da a través de vectores (animales como artrópodos, mamíferos y aves que potencialmente pueden transmitir el patógeno) y/o fomites (objetos o sustancias inanimadas) (Hermans *et al.*, 2011b; Meerburg y Schoelitz, 2018). El riesgo de colonización y diseminación de *Campylobacter* spp. puede ser aumentado por la alta densidad de pollos en el galpón de crianza, la presencia de insectos, aves silvestres, roedores y otros animales en la granja y por el personal que allí trabaja (Hermans *et al.*, 2011b). El origen de la contaminación puede ser difícil de determinar debido a la ubicuidad de *Campylobacter* spp. en el ambiente de la granja (Colles *et al.*, 2008; Ridley *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2015). Además, existe una elevada diversidad genética entre los aislamientos obtenidos de

las diferentes fuentes de infección (Bronowski *et al.*, 2014). Entre las posibles fuentes de infección de *Campylobacter* spp. se encuentran las aves silvestres, que pueden tener un papel importante en la epidemiología de *Campylobacter* spp. debido a los hábitos alimenticios y cercanías al galpón de crianza (Keller *et al.*, 2011). Además, se cree que su agrupamiento y comportamiento influencia la prevalencia de *Campylobacter* spp. (Hald *et al.*, 2015). Esto hace que las aves silvestres sean consideradas un reservorio de este patógeno en las granjas (Ellis-Iversen *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce cómo es el ciclo de transmisión entre pollos y aves silvestres y si las aves actúan como fuente de infección o solo son un receptor del patógeno (Newell *et al.*, 2011). En relación a esto, hay indicios de la relación existente entre cepas aisladas de los pollos de crianza y de aves silvestres (Newell *et al.*, 2011; Sheppard y Maiden 2015).

Otra posible fuente de infección podrían ser los roedores presentes en la granja (Agunos *et al.*, 2014). El rol que cumplen los roedores como vectores para este patógeno es controversial (Robyn *et al.*, 2015). Algunos estudios han descrito que la presencia de roedores en una granja puede incrementar el riesgo de colonización del lote de pollos (McDowell *et al.*, 2008; Ellis-Iversen *et al.*, 2012). En este sentido, los roedores pueden desempeñar un papel importante en la colonización de *Campylobacter* spp. en los pollos de engorde actuando como vectores contaminando el alimento, la cama o las superficies del galpón sobre todo cuando la densidad de los roedores es alta y el control de plagas no es adecuado (Meerburg, 2010; Robyn *et al.*, 2015). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en la mayoría de las granjas se suelen aplicar programas de control de roedores, disminuyendo la densidad de los mismos y minimizando el riesgo de transmisión de *Campylobacter* spp. (Meerburg, 2010).

Los escarabajos de la cama, *Alphitobius diaperinus*, en estadios de larva y adultos, son también considerados una fuente de contaminación (Chinivasagam *et al.*, 2010). Este insecto se encuentra en un número muy elevado en la cama de crianza en los galpones de pollos (Dinev, 2013). Su biotipo y comportamiento lo señalan como vector y acumulador de poblaciones de microorganismos colonizadores de pollos (Agabou y Alloui, 2010). Se cree que estos insectos juegan un papel importante en la transferencia de *Campylobacter* spp. ya que existe evidencia de relación entre cepas de *Campylobacter* spp. obtenidas a partir de estos insectos y pollos de crianza durante el mismo ciclo productivo, así como también en ciclos productivos consecutivos de crianza (Rauber *et al.*, 2019). La población del escarabajo crece exponencialmente en el inicio de la crianza debido a la disponibilidad de alimento y las condiciones de temperatura y humedad favorables; luego el pollo consume el escarabajo favoreciendo de este modo el control del insecto por parte del ave y al finalizar la crianza de las aves, los insectos migran hacia lugares más oscuros como rincones, cortinas y techos (Cecco *et al.*, 2005). Los escarabajos emergen después de la limpieza y desinfección del galpón y pueden infectar al próximo lote de pollos (Hazeleger *et al.*,

2008). La ingesta de estos insectos sería una de las formas en que se produciría el contagio de *Campylobacter* spp. en las aves (Domínguez, 2012).

Por otro lado, la asociación entre *Campylobacter* spp. y las moscas presentes en la granja (*Musca domestica*) no es sorprendente, debido a que estos insectos son vectores naturales de numerosos patógenos (Bahrndorff *et al.*, 2013). Se ha sugerido que las moscas tienen un papel en la epidemiología de *Campylobacter* spp. ya que participan como vectores en la transmisión de este patógeno a las aves de corral (Royden *et al.*, 2016). Las moscas domésticas, son atraídas y se alimentan de heces de los animales de crianza u otros animales, que potencialmente contienen *Campylobacter* spp. y podrían depositar esta materia fecal en la siguiente ubicación, que podría ser un galpón de crianza de aves (Newell *et al.*, 2011). Se demostró que *Campylobacter* spp. podían recuperarse de superficies externas y del sistema digestivo de las moscas domésticas expuestas a materia fecal contaminada, lo que indicaría que puede actuar como vector biológico y mecánico (Newell *et al.*, 2011; Royden *et al.*, 2016). Todo esto, sumado al ingreso de un gran número de estos insectos en los galpones de crianza hace que la mosca sea considerada un factor de riesgo importante, sobre todo en los meses de verano (Hald *et al.*, 2004).

La presencia de animales domésticos, como perros y gatos en la granja de crianza de pollos parrilleros, fue documentado como un factor de riesgo específico de infección de *Campylobacter* spp. en pollos (Ellis-Iversen *et al.*, 2012; Andrzejewska *et al.*, 2013). Se ha documentado previamente el rol de las mascotas como reservorio de especies de *Campylobacter* principalmente *C. upsaliensis* y *C. jejuni* (Carbonero *et al.*, 2012; Holmberg *et al.*, 2015). Sin embargo, muchas cuestiones de la epidemiología de la infección por *Campylobacter* spp. en mascotas permanecen sin resolver (Andrzejewska *et al.*, 2013). Las tasas de aislamiento de *Campylobacter* spp. de perros y gatos varía dependiendo de varios factores como la edad del animal, la especie y la estación del año en la que se realiza la determinación (Andrzejewska *et al.*, 2013).

El suministro de agua en las granjas avícolas no debería constituir un riesgo de colonización si esa agua proviene de la red pública de abastecimiento, es decir, un agua tratada y potable (Jonsson *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de las granjas no cuenta con un suministro de agua público por lo que utilizan suministros de agua subterránea no tratada la cual puede constituir un vehículo de contaminación (Sasaki *et al.*, 2011). En el interior de los galpones de las granjas, el agua de bebida puede actuar como un vehículo eficaz de propagación de *Campylobacter* spp. (Newell *et al.*, 2011; Jonsson *et al.*, 2012). Los bebederos se contaminan con este microorganismo luego de que las aves del lote fueron colonizadas. Esto sugiere que los bebederos pueden actuar como fómites manteniendo la bacteria y como fuentes de diseminación incrementando el riesgo mediante el contacto con múltiples aves (Ellis-Iversen *et al.*, 2012; Agunos *et al.*, 2014).

Los pollos también pueden ser colonizados por *Campylobacter* spp. a través de la cama del galpón de crianza (Henry *et al.*, 2011). Los pollos ingieren una gran cantidad de la cama de crianza y la microbiota cecal de los pollos difiere según el material utilizado en la cama (Sibanda *et al.*, 2018). Entre los materiales más utilizados para la cama se puede mencionar el aserrín y la cascara de arroz (Toghyani *et al.*, 2010). La cama de crianza nueva y fresca se considera de poco riesgo debido al bajo contenido de humedad, lo que dificulta la viabilidad de *Campylobacter* spp. (Newell *et al.*, 2011). En muchos casos la cama solo es utilizada en un ciclo de crianza, pero existen prácticas de manejo que reutilizan la cama de crianza (Bolan *et al.*, 2010). Esto indica que la cama de crianza reutilizada puede actuar como una fuente de contaminación y propagación de *Campylobacter* spp. para los pollos (Sahin *et al.*, 2015). Es importante conocer que la presencia de *Campylobacter* spp. en la cama de crianza puede verse influenciada por ciertos factores como el período de vaciamiento del galpón y el recambio de la misma (Newell y Fearnley, 2003).

El alimento balanceado puede también ser una fuente de transmisión de *Campylobacter* spp. (Meunier *et al.*, 2016). El alimento que se utiliza para los pollos es de tipo granulado, con muy baja humedad, por lo que no tiene las condiciones para el crecimiento de *Campylobacter* spp. (Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, una vez colonizadas las aves con *Campylobacter* spp., el alimento puede contaminarse por deposición de las mismas aves y puede actuar como propagador de la infección dentro del lote de aves (Silva *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2012).

El manejo y las actividades desarrolladas por el personal en las granjas de manera rutinaria, como la alimentación, limpieza y control sanitario, son muy variables entre las diferentes granjas, compañías y países, y son factores muy importantes en la contaminación y diseminación de *Campylobacter* spp. (Newell *et al.*, 2011). Numerosos son los factores que pueden enumerarse en torno a esto, como las medidas de bioseguridad en la granja, higiene de la ropa y botas de los trabajadores, la cantidad de veces que el trabajador ingresa en el galpón y el número de trabajadores que ingresan, el trabajo con otros animales de crianza, el equipamiento utilizado, etc. (Hansson *et al.*, 2010; Ansari-Lari *et al.*, 2011; Agunos *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la implementación de barreras de bioseguridad y el mejoramiento de la higiene de los trabajadores reduce la colonización de *Campylobacter* spp. en los pollos (Newell *et al.*, 2011).

En diferentes estudios y con diferentes métodos de genotipificación, se mostró que existe una alta variabilidad de genotipos de *Campylobacter* spp. coexistiendo en las granjas avícolas (Griekspoor *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2016; Colles *et al.*, 2019; García-Sánchez *et al.*, 2020). Las poblaciones de *Campylobacter* spp. que infectan lotes de pollos de engorde pueden ser complejas, contener múltiples genotipos y los lotes pueden ser colonizados por una sucesión de genotipos diferentes a lo largo del tiempo (Vidal *et al.*, 2016). Se propuso que, inicialmente, los pollos están expuestos

a un número bajo de genotipos de *Campylobacter*, este número aumenta con la edad de las aves y este aumento en la diversidad sería acumulativa (Prachantasena *et al.*, 2016).

En la diversidad de genotipos pueden coexistir cepas de genotipos totalmente diferentes entre sí con cepas derivadas de una misma cepa parental, cuya aparición podría darse por un reordenamiento genético (Sheppard y Maiden, 2015). Es por esto que se sugiere una relación entre la diversidad genética de *Campylobacter* spp. y su capacidad de colonización, es decir, la diversidad genética en las subpoblaciones de *Campylobacter* spp. mejora la capacidad de colonizar el animal huésped (Wilson *et al.*, 2010). La detección de variabilidad en los genotipos sugiere una mayor proporción de subpoblaciones altamente adaptables al huésped y muestra la presencia de subpoblaciones de *Campylobacter* spp. altamente específicas del huésped (Agunos *et al.*, 2014).

Se conoce poco sobre la dirección del intercambio o el potencial como reservorio de *Campylobacter* spp. de las fuentes identificadas (Ridley *et al.*, 2011; Agunos *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019). En muchos casos no son mutuamente excluyentes, es decir, estos reservorios pueden contribuir tanto a la difusión como al mantenimiento de *Campylobacter* spp. en la granja de pollos (Sibanda *et al.*, 2018; Agunos *et al.*, 2014). Sin embargo, las variaciones de las técnicas de genotipado limitan la capacidad de establecer la dirección de propagación (Newell *et al.*, 2011).

Para el caso de los pollos parrilleros, el sitio predominante de colonización de *Campylobacter* spp. es el ciego, lugar donde este microorganismo se multiplica (Hermans, *et al.*, 2011a; Humphrey *et al.*, 2014; Connerton *et al.*, 2018), mientras que en humanos, la infección ocurre predominantemente en el intestino delgado (Young *et al.*, 2007; Man, 2011). Se cree que los mecanismos de invasión en los pollos y en humanos son similares, pero no idénticos y la capacidad de colonización y virulencia en humanos de *Campylobacter* spp. aumenta luego del pasaje de la bacteria *in vivo* por los pollos (Van Deun *et al.*, 2007; Hermans, *et al.*, 2011a). Independientemente, la colonización requiere movilidad mediada por el gen *flaA*, adhesión e invasión que involucra genes como *cadF*, *racR*, *virB11*, *iam*, *ciaB* y producción de toxinas (*cluster cdt*) como ya se ha descrito previamente (Young *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2013). Además, *Campylobacter* spp. posee una amplia diversidad genética y una alta frecuencia de recombinación intragenómica que puede alterar el fenotipo y el genotipo de la bacteria aumentando su capacidad de supervivencia y virulencia en un amplio rango de condiciones adversas tanto dentro como fuera del huésped (Hermans, *et al.*, 2011a).

Se describieron tres tipos de fenotipos de colonización: el primer fenotipo lo conforman aquellas cepas que no logran colonizar pollos de 14 días; el segundo fenotipo, las cepas denominadas transitorias que logran colonizar el intestino, pero se eliminan fácilmente; y el tercer fenotipo

incluye cepas que muestran una colonización eficiente y sostenida (Korolik *et al.*, 1998; Hänel *et al.*, 2009; Hermans *et al.*, 2011a).

1.3.c- *Campylobacter* spp. en el proceso de faena de pollos

El proceso de faena de los pollos parrilleros tiene como objetivo producir carne segura para el consumo humano. Esto implica una serie de pasos encaminados a transformar un pollo vivo en una carcasa lista para su cocción y consumo. Esta carcasa puede venderse entera o puede ser segmentada en presas o fileteada según la preferencia del consumidor (EFSA, 2011; Barbut, 2014).

El faenamamiento de los pollos en frigoríficos a gran escala es un proceso rápido y altamente automatizado (Tsola *et al.*, 2008; Althaus *et al.*, 2017). A lo largo del proceso, a pesar de los avances tecnológicos, es posible la contaminación de las carcasas y la propagación de ciertas bacterias como *Campylobacter* spp. (EFSA, 2011; Ma *et al.* 2014; Althaus *et al.*, 2017; Rouger *et al.*, 2017). Para evaluar el desempeño del proceso de faena, se requiere un análisis que incluya la identificación de operaciones que favorecen o tienden a disminuir la contaminación microbiológica de las carcasas en cada una de las etapas de este procesamiento (EFSA, 2011; Althaus *et al.*, 2017; Milios *et al.*, 2017). El procesamiento de los pollos comienza con la operación de recolección de aves. En esta etapa, las aves, una vez cumplido el ciclo de crecimiento 5-8 semanas, son capturadas en el galpón de crianza y cargadas en el medio de transporte. Estas aves deben tener un ayuno previo de 8 a 12 horas. Este ayuno consiste en la suspensión de la alimentación para evitar la acumulación de alimento en intestinos y el desperdicio de alimento no asimilado (FAO, 2007; Ali *et al.*, 2008; Rui *et al.*, 2011). La administración de agua de bebida se mantiene, ya que ésta impide la deshidratación y pérdida de peso que afectan el rendimiento por carcasa (Vanderhasselt *et al.*, 2013). Los pollos llegan desde la granja de producción hasta la planta de faena, allí se descargan en el momento que van a ser sacrificados y las jaulas vacías luego son lavadas y desinfectadas (FAO, 2007; Pandey y Bawa, 2010).

Posteriormente, los pollos ingresan en la línea de matanza que consta de tres pasos: colgado, matanza y desangrado. Este proceso comienza con el aturdimiento del ave (generalmente mediante un *shock* eléctrico) y luego continúa con un corte en la vena yugular que produce el desangrado y la muerte del ave (FAO, 2007; Aghwan *et al.*, 2016; EFSA, 2019). Desde allí, las aves son transportadas para ingresar al tanque de escaldado. El escaldado se realiza utilizando agua caliente (50 – 52 °C) para relajar los folículos de las plumas y facilitar su eliminación. Luego de esto se remueven las plumas en el proceso de desplumado. La calidad del desplumado está relacionada con la efectividad del escaldado. Finalmente, también se realiza un flameado con un soplete de baja intensidad para eliminar cualquier resto de plumas que no haya sido eliminado (Yashoda *et al.*, 2001; Keener *et al.*, 2004; FAO, 2007; Pandey y Bawa, 2010).

El proceso continúa luego con la etapa de eviscerado, en la cual se realiza la extracción de las vísceras de la cavidad gastrointestinal del ave, además de las patas y el cuello. El eviscerado se realiza en tres etapas, primero se abre la cavidad intestinal, se extraen las vísceras de la cavidad gastrointestinal, se lava la cavidad vacía, las vísceras y menudencias, luego se segmentan y clasifican (Jekayinfa, 2007; Pandey y Bawa, 2010; Rodionova y Paliy, 2017; Canet *et al.*, 2018). Una vez completado el procedimiento de evisceración, la carcasa debe ser lavada para eliminar restos de sangre, plumas y desechos del eviscerado, por lo general se utiliza agua clorinada. También las carcasas deben enfriarse a 4 – 5 °C tan pronto como sea posible. Los métodos más comunes incluyen enfriamiento por inmersión en agua con un contraflujo de agua fría, enfriamiento por aire y enfriamiento por pulverización *spray chilling* (que incluye aire y agua) (Bashor *et al.*, 2004; James *et al.*, 2006; FAO, 2007; Pergola *et al.*, 2010; Rodionova y Paliy, 2017).

Cuando las carcasas fueron enfriadas, están listas para ser empaquetadas enteras, por porciones o como carne deshuesada. Para esto, cada carcasa individual es clasificada por peso y calidad, de modo que pueda asignarse al proceso correcto según lo dicte el mercado. Las carcasas son embolsadas en bolsas de polietileno que son selladas y perforadas para evitar la acumulación de líquidos (exudados). El empaquetado tiene como función la protección del producto y además debe contener la información necesaria de dicho producto (FAO, 2007; Tsola *et al.*, 2008; Pandey y Bawa, 2010). Los productos empaquetados son almacenados en cuartos fríos a temperaturas de refrigeración si van a ser almacenados por un tiempo corto (días) o en *freezers* industriales a temperaturas de congelación si van a ser almacenados por un período prolongado de tiempo (semanas, meses) (FAO, 2007; Sampers *et al.*, 2010; Pandey y Bawa, 2010; Mawlood y Khidhir, 2018). La temperatura de refrigeración oscila de 2 – 4 °C y la de congelación depende del tiempo que se desee almacenar el producto (FAO, 2007; Pandey y Bawa, 2010).

En las condiciones en las que se desarrolla el proceso de faena de pollos parrilleros (cambios rápidos de temperatura, osmolaridad, presencia de oxígeno atmosférico) *Campylobacter* termotolerantes, con una temperatura óptima de crecimiento de 37 a 42 °C y requerimientos de bajos niveles de oxígeno, es poco probable que se multiplique en carcasas de pollos o equipos de procesamiento (Newell *et al.*, 2001; Garénaux *et al.*, 2008; USDA, 2008). Sin embargo, este microorganismo se encuentra en altas proporciones en carne de pollo lista para consumir (Hue *et al.*, 2010; EFSA, 2011), por lo que las carcasas de los pollos se contaminan con *Campylobacter* termotolerantes durante el procesamiento en la planta de faena, aún cuando existen métodos de bioseguridad, higiene y desinfección y (Kudirkiénė *et al.*, 2011; Lawes *et al.*, 2012).

Los posibles factores de riesgo relacionados con la contaminación de las carcasas con *Campylobacter* spp. en el frigorífico se pueden ir detectando en las diferentes etapas del proceso

de faena. La contaminación de la superficie de la carcasa de los pollos con *Campylobacter* spp. puede darse por contacto directo con materia fecal de los pollos o por contaminación cruzada al pasar por la línea de proceso por contacto con equipamiento y superficies contaminadas (Malher *et al.*, 2011; Seliwiorstow *et al.*, 2016).

En la recepción de animales vivos la contaminación puede provenir de las plumas y la piel de los pollos, en el ciego y en el contenido intestinal de aves vivas (Hanninen, 2010; Boysen *et al.*, 2016). En el escaldado el riesgo reside en la contaminación del agua del tanque de escaldado y por lo tanto la contaminación de las superficies internas y externas de las carcasas presentes en ese proceso y en procesos subsecuentes (Hanninen, 2010). Si bien el agua que se utiliza en el escaldado se encuentra a temperaturas elevadas, el tiempo de exposición de las carcasas es muy corto como para eliminar la contaminación microbiológica (Gruntar *et al.*, 2015).

En la etapa de evisceración, la manipulación de las carcasas puede generar la contaminación cruzada primero al abrir la cavidad y luego al extraer las vísceras. Esto se da por la ruptura intestinal durante el eviscerado, contaminando las carcasas, las superficies de trabajo, el equipamiento y las manos de los operadores que se encuentren realizando dicha actividad con el contenido intestinal, donde existe una alta carga de *Campylobacter* spp. (EFSA, 2011; Hue *et al.*, 2011; Gruntar *et al.*, 2015; Perez-Arnedo y González-Fandos, 2019). Sumado a esto, cuando las aves pasan mucho tiempo sin alimentarse, el revestimiento intestinal se pierde y los intestinos pueden romperse más fácilmente durante la extracción (Hanninen, 2010; Seliwiorstow *et al.*, 2016).

En el proceso de enfriamiento de las carcasas por inmersión en *chiller*, la contaminación del agua del *chiller* puede llevar a una contaminación cruzada debido al volumen de carcasas que entran en contacto unas con otra y la duración extendida de este proceso (Keener, *et al.*, 2004; EFSA, 2011; Possas *et al.*, 2017; Toyofuku *et al.*, 2017). El enfriamiento de la carcasa es una oportunidad para reducir y eliminar patógenos como *Campylobacter* spp. utilizando ciertos antibacterianos como hipoclorito de sodio o ácido peroxiacético en concentraciones variables. Sin embargo, la carga de materia orgánica en el agua del *chiller* condiciona la actividad bactericida (Smith *et al.*, 2015).

El problema más difícil de controlar en el procesamiento de aves de corral es el de la contaminación cruzada a partir de aerosoles, agua de proceso y contacto de carcasas entre sí o con equipos o manos de operadores (Hanninen, 2010; Perez-Arnedo y González-Fandos, 2019). Además, la técnica y la velocidad del procesamiento de las aves dificulta la prevención de la contaminación cruzada entre las aves de un mismo lote y entre aves de lotes diferentes (Peyrat *et al.*, 2008).

La prevalencia de *Campylobacter* spp. en la planta de faena de pollos tiene diferentes factores que pueden influenciarla, entre ellos podemos mencionar: el estado de las aves al momento de la llegada a la planta de faena, la edad del ave al momento de la faena, el número de granjas o lotes que se faenan en un proceso y las condiciones del procesamiento (Lawes *et al.*, 2012). Se ha reportado que la prevalencia de *Campylobacter* spp. es variable a lo largo del proceso en la planta de faena de los pollos. Esta prevalencia tiende a incrementarse en la etapa de desplumado debido al escape de materia fecal a través de la cloaca por efecto del proceso de desplumado y en el proceso de eviscerado por el estrecho contacto de las carcasas con el contenido intestinal de los pollos. Por otro lado, la prevalencia de *Campylobacter* spp. tiende a disminuir luego del proceso de escaldado y en el proceso de enfriado en el *chiller* debido al efecto de la temperatura en ambas etapas. (Guerin *et al.*, 2010; Perez-Arnedo y González-Fandos, 2019). La elevada prevalencia de *Campylobacter* spp. a lo largo del proceso de faena del pollo demuestra que dicho procesamiento no significa/implica un control de *Campylobacter* spp. (Guerin *et al.*, 2010). En algunos estudios fue reportado que la mayoría de los aislamientos obtenidos a partir de diferentes muestras en planta de faena pertenecían a la especie a *C. jejuni* (Hue *et al.*, 2011; García-Sánchez *et al.*, 2017), mientras que en otros la especie predominante fue *C. coli* (Ma *et al.*, 2014; Torralbo *et al.*, 2015; Guirin *et al.*, 2020).

Por otro lado, mediante estudios de relación clonal, se ha demostrado que en la planta de faena existe una alta diversidad de genotipos de *Campylobacter* termotolerantes. Esto es debido a la elevada cantidad de genotipos únicos encontrados de acuerdo a la especie de la cepa, el origen de la muestra y la fecha de aislamiento (Wieczorek *et al.*, 2013; Wieczorek *et al.*, 2015; Rafei *et al.*, 2019). Sin embargo, se hallaron cepas con genotipos idénticos, provenientes de diferentes fuentes de aislamiento, lo que sugiere la contaminación cruzada en el proceso de faena y la circulación de las cepas desde la materia fecal a las carcasas o al ambiente (Wieczorek *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2020). Por otro lado, se detectó también relación clonal entre cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas de carcasas en la etapa final de diferentes ciclos de procesamiento que en principio fueron negativas para este microorganismo (Kudirkiénė *et al.*, 2011; García-Sánchez *et al.*, 2017; Pergola *et al.*, 2017). Se conoce además que la diversidad genética es mayor en *C. jejuni* que en *C. coli*. Se sugirió que esta alta diversidad es una posible consecuencia de la alta frecuencia de variación genética de *C. jejuni* (Noormohamed y Fakhr, 2014; Sheppard y Maiden, 2015; Pergola *et al.*, 2017).

Campylobacter spp. no puede crecer y sobrevivir bien en el ambiente por largos períodos y es sensible a los desinfectantes más comúnmente utilizados en la industria de la carne de pollos (Kudirkiénė *et al.*, 2011). De todas maneras, *Campylobacter* spp. puede ser aislado de varias fuentes ambientales en la planta de faena así como también de los animales vivos (Colles *et al.*, 2010). Esto indica que muchas cepas de *Campylobacter* spp. parecen sobrevivir al procesamiento

de los pollos así como también a la limpieza y desinfección de la planta de faena entre los lotes procesados (García-Sánchez *et al.*, 2017; Umaraw *et al.*, 2017). Algunas cepas de *Campylobacter* spp. son capaces de sobrevivir *overnight* y existe evidencia que demuestra la persistencia de hasta 21 días de ciertas cepas de *Campylobacter* termotolerantes (Rejab, *et al.*, 2012; García-Sánchez *et al.*, 2017). Esta capacidad de supervivencia no es limitada solo a un genotipo de *Campylobacter* spp. y está relacionada a variantes genéticas en la cepa (Colles *et al.*, 2010). El mecanismo de supervivencia de *Campylobacter* spp. es menos conocido que el de otros agentes patógenos y muchos de los mecanismos de defensa al estrés presentes en otros patógenos no están presentes (Murphy *et al.*, 2006; Kudirkienė *et al.*, 2011). Sin embargo, la habilidad de formar biofilm sobre diferentes superficies y la habilidad de entrar en un estado viable pero no cultivable son mecanismos que podrían proteger a *Campylobacter* spp. y permitir su supervivencia en condiciones desfavorables en el procesamiento de los pollos (Klančnik *et al.*, 2008; Klančnik *et al.*, 2014). Consecuentemente, el ambiente con condiciones desfavorables, como ocurre en la planta de faena, puede seleccionar variantes con una alta capacidad de adaptación a esas condiciones (Kudirkienė *et al.*, 2011).

1.3.d- Fuentes de infección para el hombre

En el hombre, la campylobacteriosis tiene diferentes fuentes y rutas potenciales de infección, no comprendidas aún en su totalidad (Wagenaar *et al.*, 2013). La infección principalmente dada por *C. jejuni* o *C. coli* se adquiere a través de la cadena alimentaria (Gözl *et al.*, 2014). Entre las fuentes más importantes de infección para el hombre podemos destacar la carne de pollo (Wagenaar *et al.*, 2013). También se apuntan a otras fuentes que pueden ayudar a comprender la complejidad de la epidemiología de la enfermedad como la carne de cerdo, la leche sin pasteurizar u otros alimentos (verduras) por contaminación con materia fecal o por contaminación cruzada con alimentos contaminados (Vencia *et al.*, 2014). Los animales domésticos como perros y gatos pueden ser portadores asintomáticos de *Campylobacter* spp. y algunos insectos son vectores mecánicos y biológicos (mediante sus deyecciones) (Silva *et al.*, 2011). El agua de consumo puede actuar como vehículo de las campylobacteriosis debido a la contaminación de las aguas con materia fecal, por animales de abasto o por aves silvestres (Silva *et al.*, 2011).

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

2-1. HIPÓTESIS

El estudio de la epidemiología de *Campylobacter* termotolerantes presentes en cadenas agroalimentarias permitirá identificar y aplicar medidas de manejo del riesgo sustentadas científicamente, las que evitarán la diseminación de los mismos y reducirán el impacto en la salud pública.

2-2. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la epidemiología de *Campylobacter* termotolerantes en las granjas de pollos parrilleros y en plantas de faena como base científica para el diseño de medidas de manejo del riesgo que permitan reducir el impacto en la salud pública.

2-3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granjas de pollos de engorde.

Evaluar la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes etapas del proceso de faena de los pollos de engorde.

Evaluar la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante ciclos de crianza consecutivos.

Estudiar y comparar los perfiles genéticos de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes entre los diferentes ciclos productivos y galpones dentro de una misma granja, así como entre diferentes granjas y con los *Campylobacter* termotolerantes aislados desde los establecimientos faenadores.

Determinar la presencia de genes asociados a virulencia en los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en las granjas y establecimientos faenadores.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3-1. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granja y planta de faena de pollos parrilleros

3.1.1- Toma de muestras y aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras obtenidas de pollos y vectores/fomites de granjas (PRIMER MUESTREO EN GRANJA)

Se realizó un muestreo entre los meses de mayo y diciembre del año 2015. Para esto se trabajó en tres granjas comerciales de pollos parrilleros (G1, G2 y G3) localizadas en la zona de influencia de la FCV-UNL pero ubicadas entre sí a una distancia no menor a los 5 km. Cada granja fue muestreada durante 3 ciclos de producción consecutivos (M1, M2 y M3). Solo en el caso de G1 se realizó un muestreo adicional (M4) debido a que en el primer muestreo (M1) hubo aislamientos que se perdieron en las diferentes etapas del procesamiento. Se evaluaron diferentes ciclos de producción en la misma granja con el objeto de determinar la permanencia de los mismos clones en dicho establecimiento. La selección de las granjas fue del tipo aleatorio simple. En cada granja se seleccionó un galpón donde se realizaba la crianza de los pollos. La selección del mismo fue del tipo aleatorio simple. En cada una de las granjas se tomaron muestras de pollos de engorde, de fómites (agua de bebida, cama del galpón de crianza, alimento balanceado y botas de los trabajadores) y de vectores (aves silvestres, animales domésticos, moscas, *Alphitobius diaperinus* en estadio larva y adulto, y roedores) La toma y el procesamiento de la muestra se realizó de la siguiente manera:

Pollos: El día de visita a la granja se seleccionó un galpón al azar (que fue el mismo en los sucesivos muestreos) y se realizó hisopado de la cloaca de 30 pollos que cursaban la quinta semana de vida (Bolton y Coates, 1983). Cada hisopo se colocó en un tubo con 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 5% de sangre equina hemolizada, cicloheximida (50 mg/l), cefoperazona (20 mg/l), trimetoprima (20 mg/l) y vancomicina (20 mg/l). Los tubos se transportaron al laboratorio, en donde se incubaron a 42° C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂, 85:10:5) generada por desplazamiento de gases en jarras de anaerobiosis (AnaeroJar™, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Transcurridas las 24 h, se centrifugaron (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados Unidos) los tubos de caldo Bolton a 4500 g durante 10 min (Blaser *et al.*, 1986; Khanna *et al.*, 2006). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. Por otro lado, se colocaron filtros de 0,45 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany) estériles sobre placas de agar modificado desoxicolato-cefoperazona-carbón activado (mCCDA) sin suplemento de antibióticos (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (Goossens *et al.*, 1986; Jokinen *et al.*, 2012). Sobre cada filtro se colocó el *pellet* obtenido de la centrifugación y se incubó a 37°C durante 10 min (Jokinen *et al.*, 2012; He *et al.*, 2015). Transcurridos los 10 min se quitó el filtro con una pinza previamente

esterilizada y se descartó. Las placas se incubaron posteriormente durante 48 h a 42°C en condiciones de microaerofilia.

Agua de bebida: se colectó agua del tanque madre de abastecimiento y de 10 picos de bebida del galpón donde se alojaban los pollos (Pitkänen, 2013). Se colectaron asépticamente 50 ml de agua del tanque madre en un tubo falcon de 50 ml estéril. También se formó un pool de agua de 10 picos de bebida del galpón donde se alojaban las aves en un tubo falcon de 50 ml estéril. En el Laboratorio se transfirieron 5 ml de cada tubo colectado a otro tubo falcon de 50 ml estéril y se agregaron 40 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (preparado para un volumen final de 45 ml) con suplementos. Luego, los tubos se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Cama: se tomó una muestra de la cama de origen y se formó un pool de muestras de la superficie del piso del galpón donde se encontraban las aves, el cual fue dividido en 10 fracciones y se tomaron muestras de cada sector (Bull *et al.*, 2006). Las muestras se recogieron en bolsas de nylon transparente y se transportaron al laboratorio. En el laboratorio se pesaron 5 g de cada muestra y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml estéril. Por último, se enrasó con caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos a 45 ml y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Alimento balanceado: se tomó una muestra desde el silo que provee a los galpones y de los comederos presentes en el interior del galpón de crianza (Bull *et al.*, 2006). Para el caso de los comederos, se recolectó un *pool* de alimento balanceado de 10 comederos dentro del galpón, dividiendo el galpón en 10 fracciones tomando muestras de alimento balanceado de los comederos de cada sector. Se tomaron las muestras en bolsa de nylon transparente y se transportaron al laboratorio. En el laboratorio se pesaron 5 g de cada muestra y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml estéril. Por último, se enrasó con caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos a 45 ml y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Trabajadores: Se tomaron muestras de las botas de los empleados de la granja (Herman *et al.*, 2003). Se colocaron 150 ml de agua de peptona (Britania, Buenos Aires, Argentina) en bolsas de residuo y dentro de cada bolsa se realizó el lavado de las botas de cada operario de la granja. Se trasvasó el contenido de cada bolsa a frascos de 250 ml estériles debidamente rotulados y se transportaron al laboratorio. En el laboratorio se centrifugó el agua de lavado de cada frasco a 4500 g durante 10 min (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados

Unidos). Se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. Por último, se agregó caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos en cada tubo hasta 45 ml y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Aves silvestres: Se tomaron muestras de materia fecal de aves silvestres de la zona del galpón en la granja (Sippy *et al.*, 2012; Pao *et al.*, 2014). Las aves fueron capturadas con redes de niebla y posterior al muestreo fueron liberadas. La muestra se tomó desde la cloaca del animal mediante un hisopo estéril. Cada hisopo se colocó en un tubo con 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se transportaron al laboratorio, en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de pollos.

Animales domésticos: Se tomaron muestras de hisopados rectales de animales domésticos (perros y gatos) presentes en cada granja (Andrzejewska *et al.*, 2013). La muestra se tomó desde el recto del animal mediante un hisopo estéril. Cada hisopo se colocó en un tubo con 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se transportaron al laboratorio, en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Moscas: Se tomaron muestras de moscas presentes en el galpón de la granja. Se recogieron dos muestras de 5 g cada una en tubos falcon de 50 ml estériles (Stern *et al.*, 2001). En el laboratorio el contenido de uno de los tubos falcon fue tratado con cloro 30% para realizar la desinfección externa de las moscas. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Se colocaron las muestras en bolsas para muestreo (Whirl-pak®) y se agregaron 45 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos. Cada bolsa se homogeneizó por 2 min a velocidad normal (Stomacher 80 Biomaster, SEWARD). Posteriormente se trasvaso el contenido de las bolsas a tubos falcon de 50 ml estériles y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

***Alphitobius diaperinus* adultos (AD Adultos):** Se tomaron muestras de escarabajos presentes en la cama del galpón de la granja, el cual fue dividido en 10 fracciones. Se recolectaron las muestras de cada sector (debajo de los comederos) en bolsas de nylon transparentes y se formó un *pool* (Hazeleger *et al.*, 2008). En el laboratorio se separaron los escarabajos adultos y se recolectaron dos muestras de 5 g de cascarudos en 2 tubos falcon de 50 ml estériles. El contenido de uno de los tubos falcon fue tratado con cloro 30% para realizar la desinfección. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Se colocaron las muestras en bolsas de

stoamacher, se agregaron 45 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se homogeneizaron por 2 min a velocidad normal (Stomacher 80 Biomaster, SEWARD). Posteriormente se trasvaso el contenido de las bolsas a tubos falcon de 50 ml estériles y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

***Alphitobius diaperinus* larvas (AD larvas):** Se tomaron muestras de larvas presentes en la cama del galpón de la granja, el cual fue dividido en 10 fracciones. Se recolectaron las muestras de cada sector (debajo de los comederos) en bolsas de nylon transparentes y se formó un *pool* (Hazeleger *et al.*, 2008). En el laboratorio se separaron las larvas y se recolectaron dos muestras de 5 g de larvas en 2 tubos falcon de 50 ml estériles. El contenido de uno de los tubos falcon fue tratado con cloro 30% para realizar la desinfección. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Se colocaron las muestras en bolsas de stoamacher, se agregaron 45 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se homogeneizaron por 2 min a velocidad normal (Stomacher 80 Biomaster, SEWARD). Posteriormente se trasvaso el contenido de las bolsas a tubos falcon de 50 ml estériles y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron de igual manera que las muestras obtenidas de pollos.

Roedores: Se tomaron muestras de contenido intestinal de roedores que circulaban por el galpón en la granja. Los ratones fueron capturados con trampas de aluminio plegables para roedores tipo Shermann, colocadas el día previo al muestreo (Sippy *et al.*, 2012). Se realizó la necropsia de cada ratón capturado y se obtuvo el tracto intestinal de cada uno. Los órganos se colocaron en recipientes estériles y fueron trasladados refrigerados al laboratorio. Por otro lado, se colocaron filtros de 0,45 µm estériles (Sartorius AG, Goettingen, Germany) sobre placas de agar modificado desoxicolato-cefoperazona-carbón activado (mCCDA) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sin suplemento de antibióticos. Sobre cada filtro se colocó el contenido intestinal obtenido y se incubó a 37°C durante 10 min. Transcurridos los 10 min se retiró el filtro con una pinza previamente esterilizada y se descartó. Se incubaron las placas durante 48 h a 42°C en condiciones de microaerofilia.

Todas las placas de mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) obtenidas a partir de todas las muestras, luego de la incubación de 48 h a 42°C se observaron para detectar la presencia de colonias morfológicamente sospechosas de *Campylobacter*. Las colonias sospechosas para *Campylobacter* termotolerantes presentan una coloración grisácea, de aspecto cremoso, húmedo y con tendencia a extenderse con un brillo plateado por toda la placa (Salim *et al.*, 2014). A partir de estas colonias se realizaron preparados frescos para observar al microscopio de contraste de fases la morfología curvada y la movilidad típica de *Campylobacter*. Además, se realizó la tinción

de Gram, y la prueba de la catalasa y oxidasa (On, 1996). Al confirmarse la presencia de *Campylobacter* termotolerantes se repicaron a otra placa de mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sin suplemento de antibióticos para obtener cantidad suficiente de cultivo y luego conservarlas a -80°C en medio crioprotector (Terzolo *et al.*, 1987).

3.1.2- Toma de muestras y aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras obtenidas de ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

El muestreo se realizó entre los meses de mayo y diciembre del año 2015. Para esto se trabajó con un establecimiento dedicado a la faena de pollos parrilleros localizado en la zona de influencia de la FCV-UNL. Los lotes de animales muestreados durante el proceso de faena fueron los mismos que se utilizaron durante la etapa de muestreos en granjas, por lo que se realizaron tres muestreos consecutivos (M1, M2 y M3) siguiendo la faena correspondiente a los pollos de cada lote muestreado en granja (LF1, LF2 y LF3).

La toma de muestras durante el proceso de faena se realizó en tres zonas específicas de la planta.

Zona 1: Zona de eviscerado de los pollos. La toma y el procesamiento de las muestras se realizaron de la siguiente manera:

- **Ciegos de pollos (Ci):** se tomaron al azar los ciegos de 10 pollos, los cuales fueron trasladados en recipientes estériles bajo condiciones de refrigeración hasta el laboratorio (Hansson *et al.*, 2010). En el laboratorio se colocaron filtros estériles con diámetro de poro de 0,45 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany) sobre placas de agar mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sin suplemento de antibióticos. Sobre cada filtro se colocó parte del contenido de los ciegos (extraído con cuchara, pinza y tijera estériles) y se incubaron a 37°C durante 10 min. Transcurridos los 10 min se quitaron cuidadosamente los filtros con el contenido cecal utilizando una pinza estéril y se descartaron. Se colocaron las placas a incubar durante 48 h a 42° C en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5) generada por desplazamiento de gases en jarras de anaerobiosis (AnaeroJar™, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

- **Superficie de la zona de eviscerado (SupEv):** Se tomaron muestras de dos áreas de trabajo de la zona (de 100 cm²) mediante hisopos estériles (Cools *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Franchin *et al.*, 2007; Peyrat *et al.*, 2008). Cada hisopo se colocó en un tubo con 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos. Los tubos se transportaron al laboratorio, en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Transcurridas las 24 h, se centrifugaron (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados Unidos) los tubos de caldo Bolton a 4500 g durante 10 min (Blaser *et al.*, 1986; Khanna *et al.*, 2006). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se

conservó el *pellet*. Por otro lado, se colocaron filtros estériles con tamaño de poro de 0,45 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany) sobre placas de agar mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sin suplemento de antibióticos. Sobre cada filtro se colocó el *pellet* obtenido de la centrifugación y se incubó a 37°C durante 10 min. Transcurridos los 10 min se quitó el filtro con una pinza estéril y se descartó. Se incubaron las placas durante 48 h a 42°C en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5).

- **Pinzas de eviscerado (PEv):** se muestrearon mediante la utilización de un hisopo estéril tres pinzas utilizadas por los trabajadores para la extracción de las vísceras de los pollos durante el proceso de faena (Abu-Ruwaida *et al.*, 1994). Cada hisopo se colocó en un tubo con 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se transportaron al laboratorio, en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

- **Lavado de guantes de operarios de eviscerado (OpEv):** Se tomaron muestras del lavado de guantes de tres operarios que realizaban el eviscerado de pollos (Abd-Elaleem *et al.*, 2014). Las muestras fueron recogidas mediante el lavado de los guantes del operario en bolsas de residuos que contenían 150 ml de agua de peptona estéril. Una vez realizado el lavado se trasvasó el contenido de cada bolsa a frascos de 250 ml estériles debidamente rotulados y se transportaron al laboratorio. En el laboratorio se centrifugó el agua de lavado de cada frasco a 4500 g durante 10 min (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados Unidos). Se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. Por último, se agregó caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos en cada tubo hasta 45 ml y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

Zona 2: Zona de lavado de los pollos. Allí se tomaron y se procesaron muestras de:

- **Agua proveniente del chiller (ACh):** se colectaron asépticamente 50 ml de agua del tanque en un tubo falcon de 50 ml estéril (Sasaki *et al.*, 2014) que contenía en su interior una solución 0,1% de tiosulfato de sodio (Kemp *et al.*, 2000). En el laboratorio, el contenido del tubo se centrifugó (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados Unidos) a 4500 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*, al cual se le agregó caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos hasta 45 ml. Luego, los tubos se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

- **Superficie a continuación del *chiller* (SupCh):** Se tomaron muestras de tres áreas de trabajo de la zona inmediatamente posteriores a la salida de los pollos del *chiller* (de 100 cm²) mediante hisopos estériles (Cools *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Franchin *et al.*, 2007; Peyrat *et al.*, 2008). Cada hisopo se colocó en un tubo de 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se transportaron al laboratorio en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

Zona 3: Zona de despacho de los pollos. Allí se tomaron muestras de:

- **Carcasas de pollos (Ca):** Se tomaron muestras de 10 carcasas de pollos envasadas previo a su ingreso a la cámara frigorífica (Corry *et al.*, 2002; Bashor *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2014). Las muestras fueron recogidas mediante el lavado de las carcasas en bolsas que contenían 150 ml de agua de peptona. Una vez realizado el lavado se trasvasó el contenido de cada bolsa a un frasco de 250 ml estéril. En el laboratorio, el contenido del tubo se centrifugó (Thermo Scientific Sorvall® RC 6™ Plus Superspeed Centrifuge, Estados Unidos) a 4500 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*, al cual se le agregó caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos hasta 45 ml. Luego, los tubos se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

- **Superficie envasado (SupEn):** Se tomaron muestras de tres áreas de trabajo de la zona donde se realiza el envasado de las carcasas de los pollos (de 100 cm²) (Cools *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Franchin *et al.*, 2007). Las muestras fueron recogidas con hisopos estériles. Cada hisopo se colocó en un tubo de 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y los tubos se transportaron al laboratorio en donde se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). El procesamiento de la muestra continuó de la misma manera que para las muestras de superficie de la zona de eviscerado de pollos.

- **Lavado de guantes de operarios de envasado (OpEn):** Se tomaron muestras del lavado de guantes de tres operarios que realizaban el envasado de las carcasas de los pollos (Abd-Elaleem *et al.*, 2014). La toma y el procesamiento de la muestra se llevó a cabo de la misma manera que para las muestras de guantes de operarios de eviscerado.

Todas las placas de mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) obtenidas a partir de todas las muestras, luego de la incubación de 48 h a 42°C se observaron para detectar la presencia de colonias morfológicamente sospechosas de *Campylobacter*. Las colonias sospechosas para

Campylobacter termotolerantes presentan una coloración grisácea, de aspecto cremoso, húmedo y con tendencia a extenderse con un brillo plateado por toda la placa (Salim *et al.*, 2014). A partir de estas colonias se realizaron preparados frescos para observar al microscopio de contraste de fases la morfología curvada y la movilidad típica de *Campylobacter*. Además, se realizó la tinción de Gram, y la prueba de la catalasa y oxidasa (On, 1996). Al confirmarse la presencia de *Campylobacter* termotolerantes se repicaron a otra placa de mCCDA (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sin suplemento de antibióticos para obtener cantidad suficiente de cultivo y luego conservarlas a -80°C en medio crioprotector (Terzolo *et al.*, 1987).

3.1.3- Toma de muestras y aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras obtenidas de pollos y vectores/fomites de granjas entre períodos consecutivos de crianza de pollos (SEGUNDO MUESTREO EN GRANJA)

Con el objetivo de evaluar la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios y la permanencia en la granja de este patógeno durante varios ciclos de crianza consecutivos, se realizó un muestreo entre los meses de abril y diciembre del año 2018. Para esto se trabajó en una granja comercial de pollos parrilleros (granja G2 muestreo 2015) localizada en la zona de influencia de la FCV-UNL. Dicha granja fue muestreada en dos etapas durante 4 ciclos de producción consecutivos (C1, C2, C3 y C4). En cada ciclo de crianza, en la primera etapa se visitó la granja una semana previa al ingreso de los pollos (período de vaciamiento) y en la segunda etapa se visitó la granja durante la semana previa al sacrificio de los pollos (última semana de crianza de pollos). En ambas etapas se tomaron muestras de fómites (agua de bebida, cama del galpón de crianza, alimento balanceado y botas de los trabajadores) y de vectores (aves silvestres, animales domésticos, moscas, *Alphitobius diaperinus* en estadio larva y adulto, y roedores). Además, en la segunda etapa de cada muestreo se incluyeron muestras de pollos de engorde. La toma y el procesamiento de la muestra de fómites y vectores en ambas etapas se realizaron de la siguiente manera:

Agua de bebida: se colectó agua del tanque madre de abastecimiento (H₂O Or) y de 10 picos de bebida del galpón donde se alojaban los pollos (H₂O beb) (Pitkänen, 2013). Se colectaron asépticamente 50 ml de agua del tanque madre en un tubo falcon de 50 ml estéril. También se colectaron por separado agua de 10 picos de bebida del galpón donde se alojaban las aves en tubos falcon de 50 ml estériles. Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, agua de bebida.

Cama: se tomaron cinco muestras de la cama de origen (COr) y 10 muestras de la superficie del piso del galpón donde se encontraban las aves (CCr), el cual fue dividido en 10 fracciones y se tomaron muestras de cada sector (Bull *et al.*, 2006). Las muestras se recogieron en bolsas de nylon

transparente y se transportaron al laboratorio. Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, cama.

Alimento balanceado: se tomó una muestra desde el silo que provee de alimento a los galpones (ABOr) y de 10 comederos presentes en el interior del galpón de crianza (AB) (Bull *et al.*, 2006). Para el caso de los comederos se dividió el galpón en 10 fracciones tomando muestras de alimento balanceado de los comederos de cada sector. Se tomaron las muestras en bolsa de nylon transparente y se transportaron al laboratorio. Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, alimento balanceado.

Trabajadores: La toma y el procesamiento de las muestras se realizaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, trabajadores.

Aves silvestres: La toma y el procesamiento de las muestras se realizaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, aves silvestres.

Animales domésticos: La toma y el procesamiento de las muestras se realizaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, animales domésticos.

Moscas: Se tomaron muestras de moscas presentes en el galpón de la granja. Se recogieron 20 muestras de moscas y se colocaron por separado en tubos de 4 ml (Stern *et al.*, 2001). En el laboratorio la mitad de las muestras fueron tratadas con cloro 30% para realizar la desinfección externa de las moscas. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Todas las muestras fueron disgregadas con pinza estéril. Posteriormente, se agregaron en cada tubo 4 ml de Caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, moscas.

***Alphitobius diaperinus* adultos (AD Adultos):** Se tomaron muestras de escarabajos presentes en la cama del galpón de la granja, el cual fue dividido en 10 fracciones. Se recolectaron las muestras de cada sector (debajo de los comederos) en bolsas de nylon transparentes (Hazeleger *et al.*, 2008). En el laboratorio se separaron dos escarabajos adultos de cada muestra y se colocaron por separado en tubos de 4 ml. El contenido de la mitad de los tubos fue tratado con cloro 30% para realizar la desinfección. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Todas las muestras fueron disgregadas con pinza estéril. Posteriormente, se agregaron 4 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos a cada tubo y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, *Alphitobius diaperinus* adultos.

***Alphitobius diaperinus* larvas (AD larvas):** Se tomaron muestras de larvas presentes en la cama del galpón de la granja, el cual fue dividido en 10 fracciones. Se recolectaron las muestras de cada sector (debajo de los comederos) en bolsas de nylon transparentes (Hazeleger *et al.*, 2008). En el laboratorio se separaron dos larvas de cada muestra y se colocaron por separado en tubos de 4 ml. El contenido de la mitad de los tubos fue tratado con cloro 30% para realizar la desinfección. Luego de la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada estéril. Todas las muestras fueron disgregadas con pinza estéril. Posteriormente, se agregaron 4 ml de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con suplementos a cada tubo y se incubaron a 42°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5). Las muestras se procesaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, *Alphitobius diaperinus* larvas.

En la segunda etapa de cada muestreo además se incluyeron las muestras de **Pollos**. La toma y el procesamiento de las muestras se realizaron tal como se detalla en el punto 3.1.1 de materiales y métodos, pollos.

3.1.4- Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros.

En principio se reactivaron los aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes conservados a -80°C en agar mCCDA sin suplemento de antibióticos (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). La incubación se realizó a 42°C durante 48 h en microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5) generada por desplazamiento de gases en jarras de anaerobiosis (AnaeroJar™, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Se verificó la pureza del cultivo y se observó movilidad y morfología típica de *Campylobacter* termotolerantes mediante microscopía de contraste de fases. A partir de cada aislamiento presuntivo se preparó una suspensión de cultivo fresco y se hizo extracción de ADN genómico mediante la utilización de un *kit* comercial (Wizard Promega®) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN extraído de cada aislamiento presuntivo fue utilizado como molde para la identificación molecular del aislamiento.

En primer lugar, se realizó una PCR específica de género *Campylobacter* siguiendo el protocolo propuesto por Linton *et al.* (1996). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes para una reacción de 25 µL: 25 ng de ADN genómico; 0,2 mM de cada desoxinucleótido; 0,4 µM de cada *primer*; 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl (pH 8,3); 2,5 mM MgCl₂; y 0,625 U de Taq PEGASUS DNA polimerasa (PB-L®). Las secuencias de los *primers* empleados se detallan en la Tabla 1. Cada PCR se realizó en un termociclador (HealForce®) y comprendió un paso de desnaturalización inicial de ADN a 94°C durante 4 minutos, seguido de 25 ciclos de 3 etapas: 1) desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; 2) *annealing* a 55°C durante 1 minuto y 3) extensión a 72°C durante 1 minuto. Por último, las reacciones se sometieron a una extensión prolongada a 72°C durante 10 minutos. El análisis de los productos amplificados se realizó mediante

electroforesis a 80V durante 45 minutos en gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Red® (Biotium®) 1 µl/10 ml, utilizando como *buffer* de corrida TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Como patrón de comparación se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100pb, PB-L®). Para la lectura se utilizó un transiluminador UV (Labnet®, Canadá).

Posteriormente, para la identificación de especie (*C. coli* y *C. jejuni*) se realizó una PCR múltiple siguiendo el protocolo descrito por Vandamme *et al.* (1997) utilizando los *primers* detallados también en la tabla 1. Todas las amplificaciones se prepararon para un volumen final de 25 µl de reacción. Para ello se utilizó una solución que contuvo 25 ng de ADN genómico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ y cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) en una concentración de 0,2 mM. Cada mezcla de reacción también contuvo 1U de Taq PEGASUS DNA polimerasa (PB-L®) y 20 pmol de cada uno de los *primers* (Jun3, Jun4, Col1 y Col2)

La PCR fue realizada en un termociclador (HealForce®) utilizando un protocolo *touch-down* que consistió de una desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 64°C y extensión a 72°C por 1 min; 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 62°C y extensión a 72°C por 1 min; 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 60°C y extensión a 72°C por 1 min; 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 58°C y extensión a 72°C por 1 min; 2 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 56°C y extensión a 72°C por 1 min y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, *annealing* por 1 min a 54°C y extensión a 72°C por 1 min y un paso final de extensión a 72°C durante 10 min. El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis a 80V durante 45 minutos en gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Red® (Biotium®), 1 µl/10 ml, utilizando como *buffer* de corrida TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Como patrón de comparación se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100pb, PB-L®). Para la lectura se utilizó un transiluminador UV (Labnet®, Canadá).

Los aislamientos que resultaron negativos a la PCR múltiple, fueron sometidos a dos nuevas PCR para determinar si pertenecían a la especie *C. upsaliensis* o *C. lari* siguiendo el protocolo de Linton *et al.* (1996) utilizando los *primers* también detallados en la tabla 1. Para un volumen final de reacción de 25 µl se preparó una solución de 25ng de ADN genómico, 20mM Tris-HCl (pH 8.3); 50mM KCl; 2.5mM MgCl₂; 0,2 mM de cada desoxinucleótido; 0,4 µM de cada *primer* y 0.625 U de Taq PEGASUS DNA polimerasa (PB-L®). Cada PCR se realizó en un termociclador (HealForce®) y comprendió un paso de desnaturalización inicial de ADN a 94°C durante 4 minutos, seguido de 25 ciclos de 3 etapas: 1) desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; 2) *annealing* a 60°C (*C. upsaliensis*) o 64°C (*C. lari*) durante 1 minuto y 3) extensión a 72°C durante 1 minuto. Por último, las reacciones se sometieron a una extensión prolongada a 72°C durante 10

minutos. El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis a 80V durante 45 minutos en gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Red® (Biotium®) 1 µl/10 ml, utilizando como *buffer* de corrida TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Como patrón de comparación se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100pb, PB-L®). Para la lectura se utilizó un transiluminador UV (Labnet®, Canadá).

Tabla 1. Secuencia de *primers* y longitud de productos para PCR utilizados en las PCR específicas de género y especie de *Campylobacter*.

	Denominación del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>	Tamaño del fragmento generado	Referencia
<i>Campylobacter</i>	C412	GGATGACACTTTTCGGAGC	816 pb	Linton <i>et al.</i> , 1996
	C1288	CATTGTAGCACGTGTGTC		
<i>C. jejuni</i>	Jun-3	CATCTTCCCTAGTCAAGCCT	773 pb	Vandamme <i>et al.</i> , 1997
	Jun-4	AAGATATGGCTCTAGCAAGAC		
<i>C. coli</i>	Col-1	AGGCAAGGAGCCTTTAATC	364 pb	
	Col-2	TATCCCTATCTACAAATTCGC		
<i>C. lari</i>	CL594F	CAAGTCTCTTGTGAAATCCAAC	561 pb	Linton <i>et al.</i> , 1996
	CL1155R	ATTTAGAGTGCTCACCCGAAG		
<i>C. upsaliensis</i>	CHCUI46F	GGGACAACACTTAGAAATGAG	878 pb	Linton <i>et al.</i> , 1996
	CU1024R	.CACTTCCGTATCTCTACAGA		

3-2. Diversidad genotípica de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros

Los aislamientos de *Campylobacter* spp. fueron analizados por electroforesis en gel de campo pulsado siguiendo el protocolo descrito en la red PulseNet (Ribot *et al.*, 2001; https://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/campy_protocol.pdf). En primer lugar, se reactivaron los aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes conservados a -80°C en agar mCCDA sin suplemento de antibióticos (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). La incubación se realizó a 42°C durante 48 h en microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ 85:10:5) generada por desplazamiento de gases en jarras de anaerobiosis (AnaeroJar™, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Se verificó la pureza del cultivo y se observó movilidad y morfología típica de *Campylobacter* spp. mediante microscopía de contraste de fases.

A partir de la placa de mCCDA con crecimiento de *Campylobacter* termotolerantes se tomaron varias colonias mediante un hisopo estéril previamente humedecido en solución salina (0.85% NaCl; Biopack, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente se colocó el hisopo en un tubo con 2 ml de una solución 0.85% NaCl (Biopack, Buenos Aires, Argentina) para generar una suspensión del microorganismo. Esta suspensión se ajustó a una densidad óptica de 0,680 (rango entre 0,570 a 0,820) medida en espectrofotómetro en una longitud de onda de 610 nm. Una vez preparada la suspensión, se procedió al armado del *plug* de agarosa. Para esto, en primer lugar, se transfirieron 400 µl de la suspensión celular a un tubo *eppendorf* de 1,5 ml y se agregaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml; Promega, Madison, USA). Luego en el mismo tubo se adicionaron 400 µl de agarosa 1% fundida (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados

Unidos), se mezcló cuidadosamente e inmediatamente se dispensó la mezcla en un molde de *plug* de PFGE previamente rotulado. Los moldes se colocaron en refrigeración (4°C) durante 5 minutos para lograr la solidificación de la agarosa. Una vez solidificados, se colocaron los *plugs* en tubos de 50 ml que contenían 5 ml de la solución de lisis celular formada por un *buffer* de lisis 50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos), sal lauril sarcosina sódica 1% (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) y proteinasa K (20 mg/ml; Promega, Madison, USA). Los tubos se incubaron en un baño termostático a 54-55°C en constante agitación durante 15-30 min. Luego de la incubación se descartó el *buffer* de lisis y se enjuagaron los *plugs* con agua ultrapura estéril a 54-55°C. Luego se realizaron tres lavados de los *plugs* con 10-15 ml de *buffer* TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) a 54-55°C. Los *plugs* se conservaron a 4°C en *buffer* TE en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml.

Para la digestión del ADN en los *plugs* de agarosa se utilizó la enzima de restricción *SmaI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Se cortaron fragmentos de *plugs* de aproximadamente 2-2,5 mm de ancho y se transfirieron a tubos *eppendorf* de 1,5 ml que contenían la *master mix* de restricción compuesta por *buffer* de restricción (10X diluido 1/10) y enzima de restricción *SmaI* (40U). Los tubos se incubaron a 25°C (temperatura ambiente) por 4 h.

Para la electroforesis, los *plugs* digeridos se posicionaron en la parte inferior del peine en el molde para la preparación del gel y se agregó agarosa 1% (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Estados Unidos) fundida a 55-60°C y se dejó solidificar. Se colocó el gel en la cuba de electroforesis y se agregaron aproximadamente 2L de *buffer* TBE 05X (Tris/Borato/EDTA). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo para electroforesis en campo pulsado CHEF-DR III (Bio-Rad®). Las condiciones electroforéticas fueron 6 V/cm (cambio de orientación inicial 6,76 s, cambio de orientación final 35,38 s) durante 18 h a 14°C. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos 30 min en bromuro de etidio (10 mg/ml). La imagen fue capturada con un sistema de fotodocumentación.

Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante PFGE se analizaron con el software BioNumerics Software V6.6. El método de alineación utilizado fue el agrupamiento promedio no ponderado (UPGMA), basado en un coeficiente de similitud “DICE”, con un 2% de optimización y una tolerancia en la posición de bandas de 4%. El dendrograma fue analizado de acuerdo al criterio de tipificación de cepas bacterianas (Tenover et al., 1995) y se generaron perfiles de restricción considerando porcentaje de similitud 95% (Krause et al., 1996; Rönner et al., 2005; Zhang et al., 2010; Wieczorek et al., 2015; Di Giannatale et al., 2019; Rafei et al., 2019). Además, ciertos aislamientos se agruparon con un porcentaje cercano a 95% (94,7%) por lo cual también fueron considerados el mismo perfil.

Para este protocolo se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup strain H9812 (ATCC BAA-664) como estándar de referencia de tamaño molecular (Ribot *et al.*, 2001) de acuerdo al protocolo estandarizado (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). Los *plugs* de *Salmonella* H9812 se realizaron a partir de colonias aisladas crecidas en agar tripticasa de soya durante 24 horas. A partir de este cultivo se preparó una suspensión de las células en buffer (EDTA 100 mM, Tris 100 mM, pH 8.0), se midió la DO a 600 nm, ajustando la concentración de las suspensiones celulares a DO 1,0±0,2. Posteriormente, 400 µl de esta suspensión bacteriana fueron mezclados con 400 µl de agarosa 1% fundida y se agregaron 20 µl de proteinasa K (20mg/ml). Inmediatamente, se dispensó la mezcla en moldes para *plugs* (Bio-Rad laboratorios). La lisis celular in situ fue realizada colocando los *plugs* solidificados en tubos que contenían 5 ml de buffer de lisis (Tris50 mM :EDTA 50 mM, pH 8, Sarcosyl 1%) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubados en un baño de agua a 55-60°C por 2 h. Seguidamente los *plugs* fueron lavados con agua estéril ultrapura a 55-60°C y cuatro veces con TE (Tris10 mM-EDTA 1mM, pH 8) a 55-60°C, durante 15 minutos en baño de agua. Finalmente, Los *plugs* se conservaron a 4°C en *buffer* TE en un tubo *ependorf* de 1,5 ml. La digestión de los *plugs* de *Salmonella braenderup* H9812 se realizó utilizando *buffer* de restricción (10X, diluido 1/10) y enzima de restricción *XbaI* (40U; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) durante un tiempo de incubación de 2 h a 37 °C. Los marcadores se sembraron en el gel de electroforesis en las líneas 1,5 y 10.

3-3. Factores de virulencia de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja y planta de faena de pollos parrilleros

Aunque han sido reportados numerosos genes que están relacionados a la virulencia de *Campylobacter* spp. (Bolton, 2015); en este estudio, se examinó la presencia de 11 genes patogénicos responsables para la expresión de movilidad (*flaA*, *flhA*), adherencia (*cadF*, *virB11*, *racR*), invasión (*ciaB*, *iam*), producción de citotoxinas (*cdtA*, *cdtB* y *cdtC*) y desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (*wlaN*) de *Campylobacter*.

Se realizaron reacciones de PCR específicas para cada uno de los genes de virulencia antes mencionado utilizando como molde el ADN extraído de cada aislamiento detallado en el apartado 1.3 de materiales y métodos. Los *primers* utilizados para la detección de estos genes fueron descritos por Konkel *et al.* (1999; *cadF*), Hickey *et al.* (2000; *cdtA*), Korsak *et al.* (2004; *iam*), Müller *et al.* (2006; *flhA*, *wlaN*), y Bacon *et al.* (2000; *virB11*). Cinco *sets* más de *primers* fueron diseñados por Datta *et al.* (2003; *flaA*, *cdtB*, *cdtC*, *ciaB*, *racR*). La secuencia de los *primers*, la temperatura de *annealing* y la longitud de los productos de las reacciones de PCR están listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de *primers*, temperatura de *annealing* y longitud de productos de PCR de factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes.

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	Secuencia	Producto	Referencia	T <i>annealing</i>
<i>cadF</i>	cadF-F	TTGAAGGTAATTTAGATAT	400 pb	Konkel <i>et al.</i> , 1999	45°C
	cadF-R	CTAATACCTAAAGTTGAAAC			
<i>cdtA</i>	cdtA-F	CCTTGTGATGCAAGCAATC	370 pb	Hickey <i>et al.</i> , 2000	55°C
	cdtA-R	ACACTCCATTTGCTTTCTG			
<i>cdtB</i>	cdtB-F	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	620 pb	Datta <i>et al.</i> , 2003	55°C
	cdtB-R	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT			
<i>cdtC</i>	cdtC-F	CGATGAGTTAAAAACAAAAAGATA	182 pb	Datta <i>et al.</i> , 2003	55°C
	cdtC-R	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT			
<i>ciaB</i>	ciaB-F	TTTTTATCAGTCCTTA	986 pb	Datta <i>et al.</i> , 2003	42°C
	ciaB-R	TTTCGGTATCATTAGC			
<i>flaA</i>	flaA-F	AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG	855 pb	Datta <i>et al.</i> , 2003	53°C
	flaA-R	TACCGAACCAATGCTGCTCTGATT			
<i>flhA</i>	flhA-F	GGAAGCGGCACTTGGTTTTGC	735 pb	Müller <i>et al.</i> , 2006	54°C
	flhA-R	GCTGTGAGTGAGATTATAGCAGC			
<i>iam</i>	iam-F	GCGCAAATATTATCACCC	518 pb	Korsak <i>et al.</i> , 2004	55°C
	iam-R	TTCACGACTACTATGCGG			
<i>wlaN</i>	wlaN-F	TGCTGGGTATACAAAGGTTGTG	330 pb	Müller <i>et al.</i> , 2006	56°C
	wlaN-R	AATTTTGGATATGGGTGGGG			
<i>virB11</i>	virB11-F	GAACAGGAAGTGAAAACTAGC	708 pb	Bacon <i>et al.</i> , 2000	55°C
	virB11-R	TTCCGCATTGGGCTATATG			
<i>racR</i>	racR-F	GATGATCCTGACTTTG	584 pb	Datta <i>et al.</i> , 2003	45°C
	racR-R	TCTCCTATTTTACCC			

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, cuya solución estaba formada por 25 ng de ADN genómico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ y cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) en una concentración de 0,2 mM. Cada mezcla de reacción también contuvo 1U de Taq PEGASUS DNA polimerasa (PB-L®) y 20 pmol de cada uno de los *primers*. Cada PCR fue realizada en un termociclador (HealForce®) y comprendió un paso de desnaturalización inicial de ADN a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 3 etapas: 1) desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; 2) *annealing* a la temperatura específica de cada par de primer durante 1 minuto y 3) extensión a 72°C durante 1 minuto. Por último, las reacciones se sometieron a una extensión prolongada a 72°C durante 10 minutos. El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis a 80V durante 45 minutos en gel de agarosa al 2 % teñido con Gel Red® (Biotium®) 1 µl/10 ml, utilizando como *buffer* de corrida TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Como patrón de comparación se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100pb, PB-L®). Para la lectura se utilizó un transiluminador UV (Labnet®, Canadá).

Para el análisis de los resultados cada gen fue considerado individualmente, a excepción del operón *cdtABC*, que en el análisis se considera como uno e incluye los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* ya que para la expresión de una proteína funcional se requiere del producto de los tres genes.

4- RESULTADOS

4-1. *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granja (Primer muestreo en granja)

4.1.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

Del análisis de la totalidad de las muestras obtenidas de pollos, vectores y fómites en granja (n=779), se pudo determinar que 396 fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real) (Figura 1). Sin embargo, sólo se pudieron obtener 191 aislamientos presuntivos para *Campylobacter* termotolerantes y 162 aislamientos presuntivos pudieron ser confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Los restantes 29 aislamientos presuntivos no tuvieron la capacidad de sobrevivir a los diferentes repiques en placa o no amplificaron en la reacción de PCR de género.

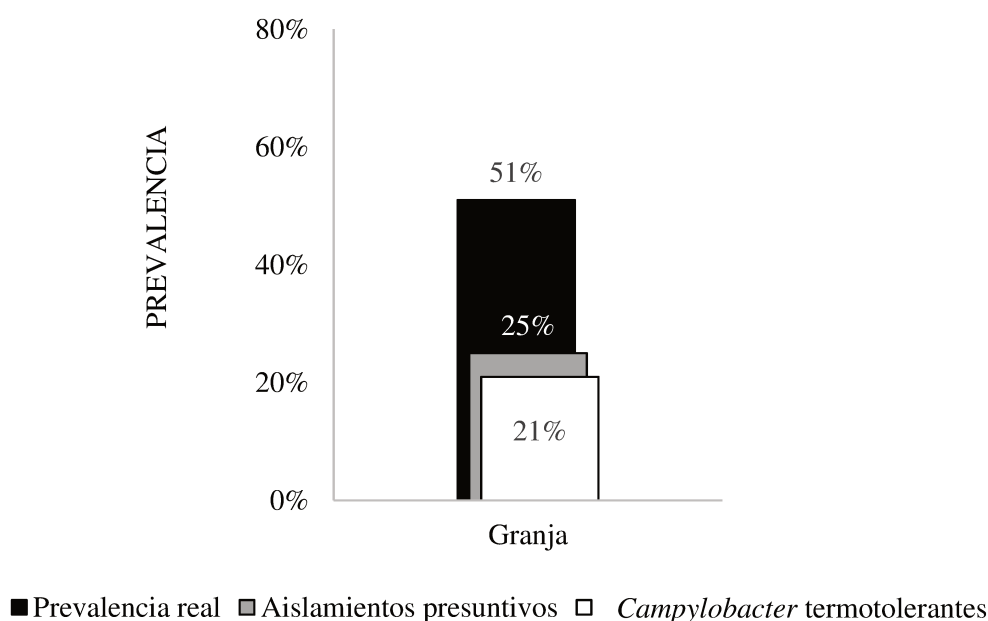


Figura 1. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de *Campylobacter* termotolerantes en granja de pollos.

De los 162 aislamientos confirmados a nivel de género, la mayor proporción correspondió a *C. jejuni*. No se obtuvieron aislamientos de *C. lari* como así tampoco de *C. upsaliensis*. Sin embargo, 22 aislamientos no pudieron ser identificados a nivel de especie (Figura 2).

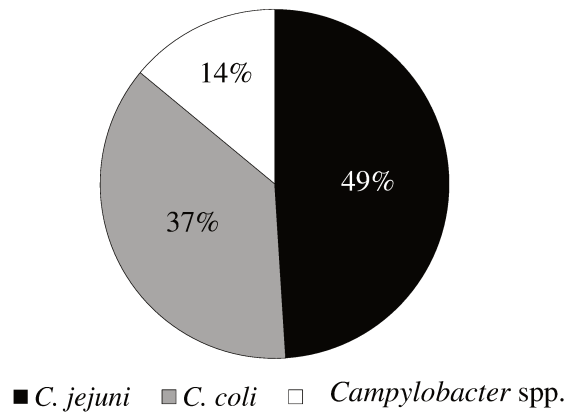


Figura 2. Prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. total en granja de pollos.

El mismo análisis se realizó para cada una de las granjas (Figura 3). Para el caso de la granja 1, de la totalidad de muestras tomadas (n=322), se detectaron 152 muestras positivas de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real). Sólo 63 fueron aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 52 fueron confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Los restantes 11 aislamientos fueron incapaces de sobrevivir el cultivo en placa o no amplificaron en la reacción de PCR de género.

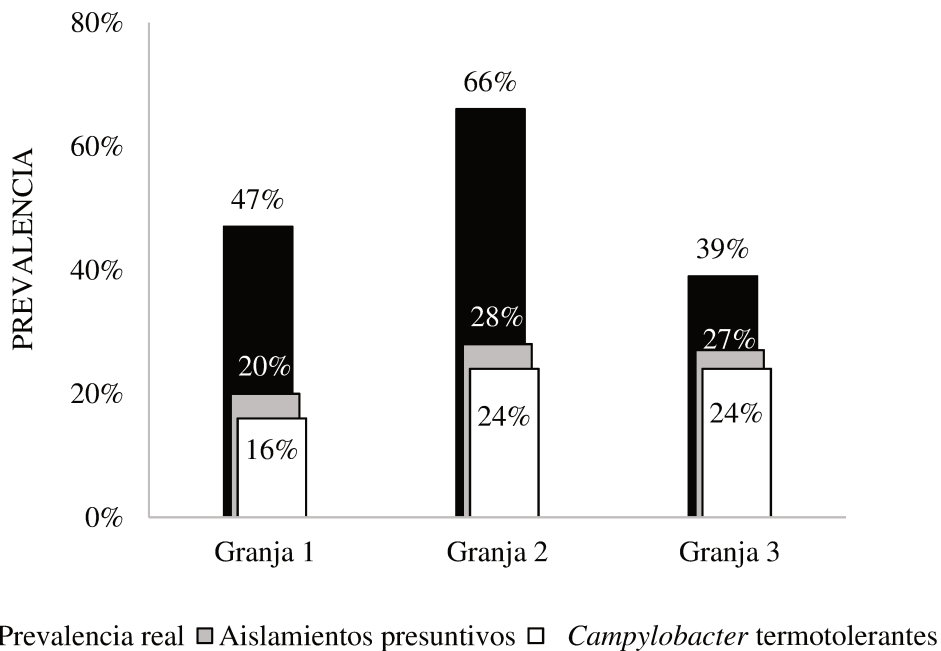


Figura 3. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de *Campylobacter* termotolerantes en cada granja de pollos.

Para la granja 2 (Figura 3), de 239 muestras, 158 fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real). Se obtuvieron 68 aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 57 aislamientos fueron confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Los restantes 11 aislamientos fueron incapaces de sobrevivir el cultivo en placa o no amplificaron en la reacción de PCR de género.

Por último, para la granja 3 (Figura 3), de 218 muestras tomadas, se detectaron 86 muestras positivas de *Campylobacter* termotolerantes. Se obtuvieron 60 aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 53 aislamientos fueron confirmados a nivel de género. Los 7 aislamientos restantes fueron aislamientos incapaces de sobrevivir en los sucesivos repiques en placa o que no amplificaron en la reacción de PCR de género.

Continuando con el análisis a nivel de especie de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en cada granja (Figura 4), tanto para la granja 1 como para la granja 3 se obtuvieron mayores proporciones de *C. jejuni* (28/52 y 36/53 respectivamente). Sin embargo, en la granja 2 se obtuvo una mayor proporción de *C. coli* (30/57). En las tres granjas se obtuvieron aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie (6/52 en granja 1, 11/57 en granja 2 y 5/53 en granja 3). En ninguna de las tres granjas se obtuvieron aislamientos de *C. lari* como así tampoco de *C. upsaliensis*.

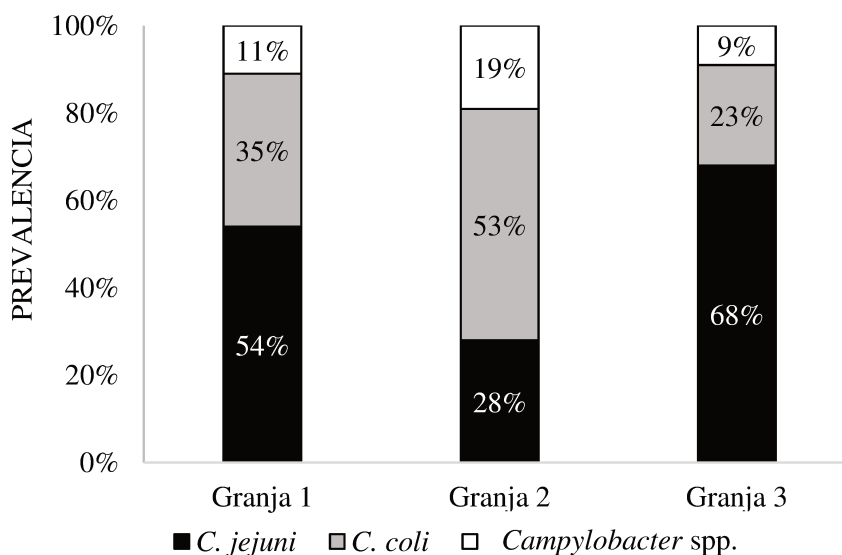


Figura 4. Prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. en cada granja de pollos.

Si se analizan los resultados desde el punto de vista de los diferentes muestreos (Figura 5A), se pudo observar que la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes fue aumentando en los sucesivos muestreos. Las proporciones obtenidas fueron 25/263 para el muestreo 1 (M1), 44/230 para el muestreo 2 (M2) y 75/223 para el muestreo 3 (M3). Considerando también los datos

obtenidos en el cuarto muestreo (M4) solo en granja 1, la proporción de *Campylobacter* termotolerante fue de 18/63. Si además se incluye el análisis de la presencia de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. coli* (Figura 5B) se pudo determinar que en el muestreo 1 y 3 se obtuvo una mayor proporción de *C. jejuni* (15/25 y 58/77, respectivamente), mientras que en el muestreo 2, la mayor proporción fue para *C. coli* (30/44). Para el caso de M4 en G1 se obtuvo una mayor proporción de *C. coli* (17/18).

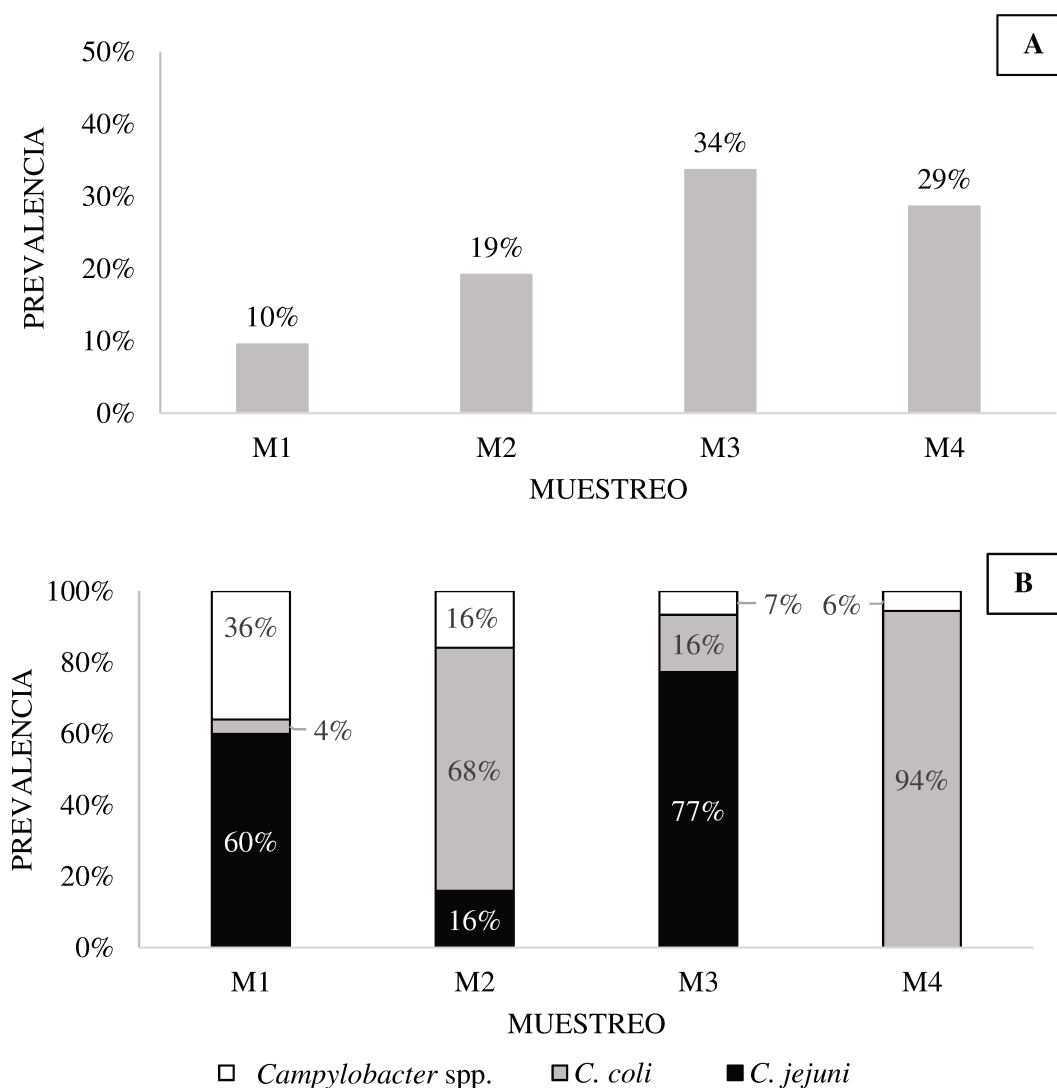


Figura 5. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes total en granja por muestreo (A) y prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. total en granja por muestreo (B)

Por otro lado, del análisis de los diferentes muestreos en cada una de las granjas (Figura 6) se pudo determinar que los datos de prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes fueron diferentes a lo largo de los muestreos (Figura 6A, B y C). Sin embargo, se pudo notar que en cada uno de los muestreos siempre hay una especie de *Campylobacter* termotolerantes que predomina sobre el resto y en una prevalencia elevada (Figura 6D, E y F).

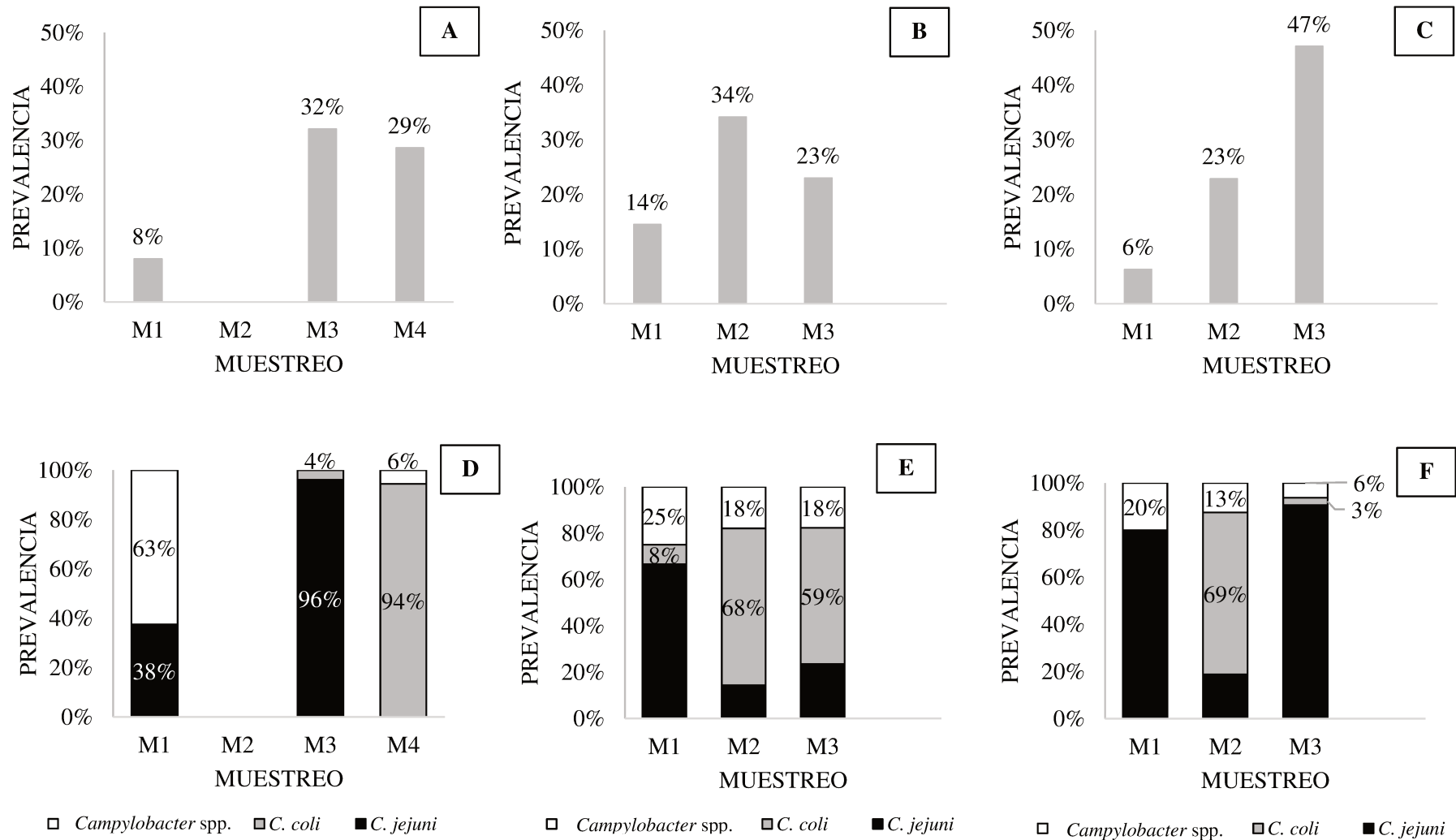


Figura 6. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes y prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. por muestreo en granja 1 (A y D), granja 2 (B y E) y granja 3 (C y F).

Desde el punto de vista del origen de la muestra (Figura 7), se pudo determinar que la proporción más alta de muestras positivas a *Campylobacter* termotolerantes total en granja fueron obtenidas a partir de los hisopados cloacales de pollos (106/318) y de aves silvestres (44/180). También se obtuvieron aislamientos a partir de AD adultos (4/20), trabajadores de la granja (4/23), AD larvas (2/20), cama del galpón de crianza (1/20) y de moscas (1/20). Sin embargo, no se pudieron obtener aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras obtenidas de animales domésticos (0/44), roedores (0/94), alimento balanceado (0/20) y de agua de bebida (0/20). Es importante aclarar también que todos los aislamientos obtenidos de AD adultos fueron a partir de aquellas muestras que fueron sometidas a desinfección antes del cultivo y para el caso de AD larvas los aislamientos obtenidos son todas de muestras que no pasaron por el proceso de desinfección. Para el caso de las muestras obtenidas a partir de moscas se obtuvieron aislamientos en la misma proporción de muestras con y sin desinfección.

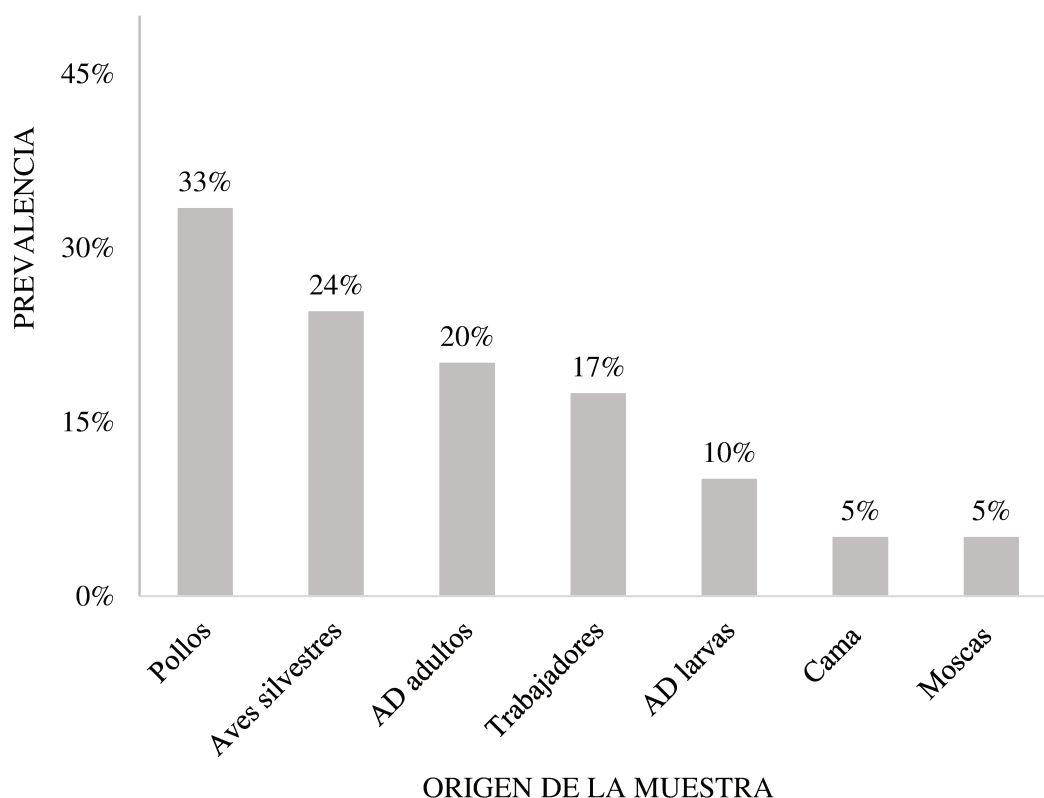


Figura 7. Prevalencia *Campylobacter* termotolerantes totales en granja de pollos según origen de muestra

Por otro lado, según los datos de prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. aislados a partir de las diferentes muestras en la granja (Figura 8), tanto en las muestras obtenidas a partir de pollos como de AD adultos se obtuvo una prevalencia similar tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* (53/106 - 51/106 y 2/4 - 2/4, respectivamente). En el caso de las muestras obtenidas a partir

de moscas se obtuvo un solo aislamiento de *C. coli* y, en el caso de las muestras obtenidas de AD larvas, solo se obtuvieron dos aislamientos de *C. jejuni*. Para el caso de las muestras de aves silvestres y de trabajadores de la granja la especie más prevalente fue *C. jejuni* (20/44 y 3/4, respectivamente), pero también presentaron cepas de *Campylobacter* spp. (18/44 y 1/4 respectivamente). Sólo se obtuvo un aislamiento y solo pudo ser identificado a nivel de género a partir de las muestras de la cama del galpón.

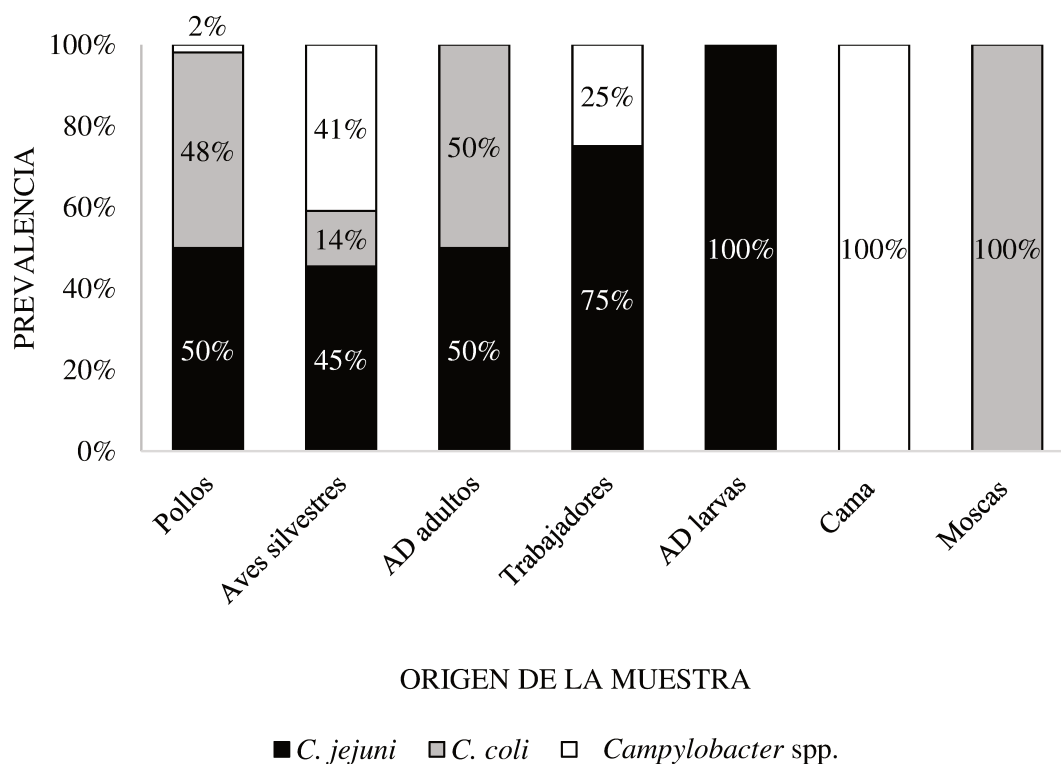


Figura 8. Prevalencia *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. totales en granja de pollos según origen de muestra.

Del análisis de los resultados, teniendo en cuenta cada una de las granjas, encontramos que, para las tres granjas (Figura 9), la mayor cantidad de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes se obtuvieron a partir de las muestras tomadas de pollos (G1:41/133 , G2:33/90 y G3:32/95). En granja 1 (Figura 9A) en orden de prevalencia a las muestras de pollos le siguieron AD adultos y larvas (1/8), aves silvestres (8/73) y trabajadores de la granja (1/11). En la granja 2 se obtuvieron aislamientos de mayor variedad de vectores y fómites, en orden de prevalencia a las muestras de pollos le siguieron aves silvestres (18/52) y AD adultos (2/6) (Figura 9B). Para la granja 3 (Figura 9C), le siguieron las muestras de aves silvestres (18/55) y trabajadores de la granja (2/6) y por último AD adultos (1/6).

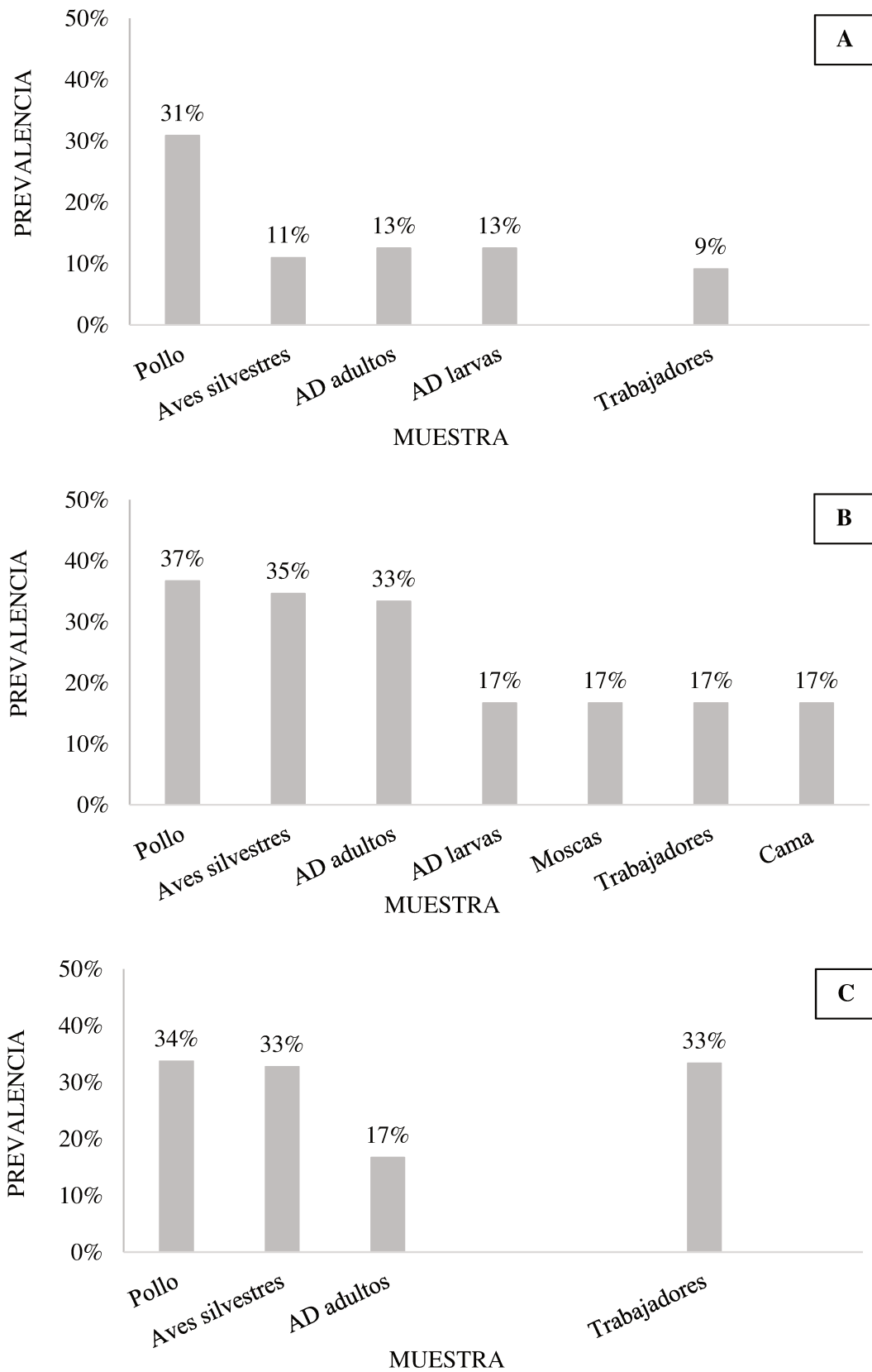


Figura 9. Prevalencia *Campylobacter* termotolerantes por origen de muestra en granja 1 (A), granja 2 (B) y granja 3 (C).

De los aislamientos confirmados a nivel de especie, en la granja 1 (Figura 10A) y en la granja 3 (Figura 10C) se observó la mayor prevalencia de la especie *C. jejuni* en la mayoría de las fuentes de aislamiento. También se observó que en la granja 2 (Figura 10B) se identificó *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. en cada una de las muestras analizadas, a diferencia de las otras dos granjas en las cuales muchos de los vectores y fómites presentaron una sola especie. También se pudo determinar que, para el caso de aves silvestres, en las tres granjas se obtuvieron aislamientos que solo se identificaron a nivel de género e incluso en granja 1 (Figura 10A) y en la granja 2 (Figura 10B) fueron más prevalentes que *C. jejuni* y *C. coli*. En la granja 1 y 3 (Figura 10A y C) la prevalencia de *C. jejuni* en pollos fue mayor que la de *C. coli*, mientras que en la granja 2 se dio de la manera contraria. Para el caso de AD adultos se pudo observar que en la granja 1 solo se obtuvieron aislamientos de *C. jejuni* mientras que en la granja 3 solo fueron de *C. coli* y en la granja 2 se obtuvieron aislamientos de ambas especies.

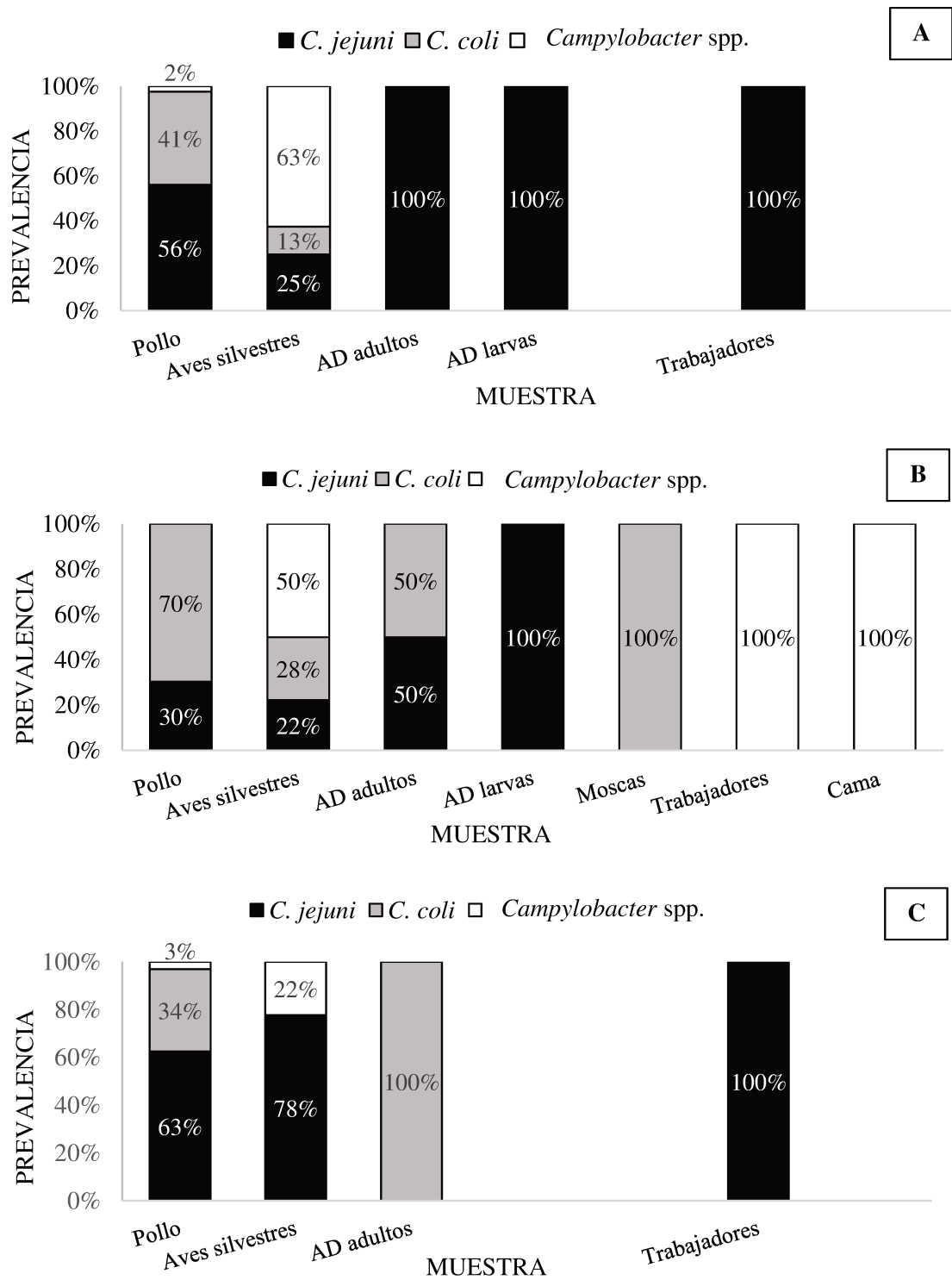


Figura 10. Prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. por origen de muestra en granja 1 (A); granja 2 (B) y granja 3 (C).

4.1.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

Analizando los resultados de PFGE obtenidos y tal como se pueden observar en el anexo correspondiente (Anexo I-A1 y Anexo I-B1), se detectó una alta diversidad genotípica entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja. Sin embargo, se pudieron determinar algunas relaciones clonales que pueden resultar de interés. Como se detallará a continuación, se observó relación clonal entre aislamientos que fueron obtenidos en muestreos sucesivos dentro de una misma granja, así como también aislamientos obtenidos en granjas diferentes. También se hizo evidente que, para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, se hallaron los mismos clones en muestras de pollos y en potenciales fuentes de contaminación como aves silvestres, AD adultos y trabajadores de la granja.

Analizando los resultados de manera general por especie de *Campylobacter* termotolerantes, se observó que de los 80 aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de las muestras de granja (anexo IA-1), 50 aislamientos dieron origen a 16 perfiles de restricción (A-P) con $\geq 95\%$ de similitud, de los cuales dos perfiles (A y B) fueron los perfiles predominantes (Tabla 3). Por otro lado, 21 aislamientos presentaron patrones únicos de restricción y 9 aislamientos no mostraron patrones de restricción por PFGE. Asimismo, los perfiles obtenidos estuvieron formados por aislamientos de *C. jejuni* provenientes de diferentes fuentes de origen (Tabla 3, perfiles A, B, D, F, G, I, J, M, O), así como también de diferentes muestreos (Tabla 3, perfiles A, J, L) y de diferentes granjas (Tabla 3, perfiles A, F, J, M y P).

Tabla 3. Perfiles de PFGE de *Campylobacter jejuni* aislados en granja

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	9	13	Pollos (M1-G2, M2-G2, M1-G3), AD adultos (M1-G2), AD larvas (M1-G2)
B	8	11	Pollos y AD adultos (M3-G1)
C	4	6	Pollos (M3-G1)
D	3	4	Pollos (M3-G3) y aves silvestres (M3-G3,)
E	3	4	Pollos (M3-G1)
F	3	4	Pollos (M3-G1) y aves silvestres (M3-G3)
G	2	3	Pollos y trabajadores (M3-G3)
H	2	3	Aves silvestres (M3-G3)
I	2	3	Aves silvestres y trabajadores (M3-G3)
J	2	3	Pollos (M1-G2) y aves silvestres (M3-G3)

K	2	3	Pollos (M2-G3)
L	2	3	Pollos (M1-G3, M3-G3)
M	2	3	Pollos (M3-G3) y Aves silvestres (M3-G2)
N	2	3	Pollos (M3-G1)
O	2	3	Pollos y Aves silvestres (M3-G3)
P	2	3	Aves silvestres (M3-G2, M3-G3)

La letra M indica el orden de muestreo y G hace referencia a la granja muestreada

Se pudo determinar también, que en la granja 1 (Tabla 4 y anexo I-A2), de los 28 aislamientos obtenidos de *C. jejuni*, 17 de ellos se agruparon en tres perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 4, perfiles G1-A, G1-B y G1-C). Sólo seis aislamientos presentaron patrones únicos de restricción y cinco aislamientos no mostraron patrones de restricción por PFGE. Para el caso de la granja 2 (Tabla 4, anexo I-A3), de los 16 aislamientos obtenidos de *C. jejuni*, solo un aislamiento no mostró patrón de restricción por PFGE y solo se generó un perfil de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 4, perfil G2-A), el resto de los aislamientos presentaron patrones únicos de restricción por PFGE. Para la granja 3 (Tabla 4, anexo I-A4), de los 36 aislamientos de *C. jejuni*, 15 presentaron patrones únicos de restricción y tres de ellos no presentaron patrones de restricción por PFGE. Los restantes 18 aislamientos se agruparon en ocho perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 4, perfiles G3-A a G3-H).

Tabla 4. Perfiles de PFGE de *Campylobacter jejuni* aislados en cada granja

	Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
Granja 1	G1-A	8	35	Pollos (M3) y AD adultos (M3)
	G1-B	6	26	Pollos (M3)
	G1-C	3	13	Pollos (M3)
Granja 2	G2-A	7	47	Pollos (M1 y M2) y AD adultos y larvas (M1)
Granja 3	G3-A	3	9	Pollos (M1 y M3)
	G3-B	3	9	Pollos y aves silvestres (M3)
	G3-C	2	6	Pollos (M1 y M3)
	G3-D	2	6	Pollos (M2)
	G3-E	2	6	Pollos y trabajadores (M3)
	G3-F	2	6	Aves silvestres y trabajadores (M3)
	G3-G	2	6	Aves silvestres (M3)
	G3-H	2	6	Aves silvestres (M3)

La letra M indica el orden de muestreo

Del análisis de los aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de muestras provenientes de pollos (Tabla 4 y Anexo I-A5), se pudo determinar en las tres granjas la existencia de relación clonal entre aislamientos obtenidos a partir de muestras de pollos del mismo o de diferentes muestreos en una misma granja (Tabla 4, Perfiles G1-A,B;C; G2-A y G3-A,B,C,D,E) así como también se pudo observar la relación clonal existente entre cepas obtenidas a lo largo del mismo muestreo y en diferentes granjas (Anexo I-A5). Por otro lado, así como se detectó la relación clonal entre aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de muestras de pollos y de diferentes vectores: AD adultos y larvas (Tabla 4, Perfiles G1-A y G2-A), aves silvestres (Tabla 4, Perfil G3-B) y fómites: trabajadores de la granja (Tabla 4, Perfil G3-E), también se pudo determinar la relación clonal entre cepas aisladas de vectores y fómites entre sí (Tabla 4, Perfil G3-F, anexo IA-6). Así, se halló relación clonal entre cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de aves silvestres y trabajadores de la granja y entre cepas aisladas de AD adultos y larvas (todos pertenecientes al mismo muestreo y misma granja entre sí).

Por otro lado, para *C. coli* (Anexo I-B1), 40 aislamientos se agruparon en 11 perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud, de los cuales tres perfiles (A, B y C) fueron los predominantes (Tabla 5). Otras 10 cepas presentaron patrones únicos de restricción y 11 cepas no mostraron patrones de restricción por PFGE. Se determinó también que para *C. coli* los perfiles de restricción estuvieron formados por aislamientos provenientes de diferentes fuentes de origen (Tabla 5, perfiles A, G y H), así como también de diferentes muestreos (Tabla 5, perfiles A e I) y de diferentes granjas (Tabla 5, perfil G).

Tabla 5. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* aislados en granja

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	8	16	Pollos (M2-G2), aves silvestres (M3-G2)
B	8	16	Pollos (M2-G3)
C	6	12	Pollos (M2-G2)
D	4	8	Pollos (M4-G1)
E	3	6	Pollos (M4-G1)
F	2	4	Pollos (M4-G1)
G	2	4	Pollos (M3-G3) y aves silvestres (M3-G2)
H	2	4	Pollos y AD adultos (M3-G2)
I	2	4	Pollos (M2-G2) Pollos (M3-G2)

J	2	4	Pollos (M2-G2)
K	2	4	Pollos (M1-G4)

La letra M indica el orden de muestreo y G hace referencia a la granja muestreada

Se pudo determinar que, en la granja 1 (Tabla 6, Anexo I-B2), de los 18 aislamientos de *C. coli* analizados, 11 de ellos se agruparon en cuatro perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 6, perfiles G1-A, B, C y D), los cuales todos comparten únicamente aislamientos obtenidos de pollos y del mismo muestreo (M4). Dos aislamientos presentaron patrones únicos de restricción y cinco aislamientos no mostraron patrones de restricción para PFGE.

Tabla 6. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* aislados en cada granja

	Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
Granja 1	G1-A	4	31	Pollos (M4)
	G1-B	3	15	Pollos (M4)
	G1C	2	15	Pollos (M4)
	G1-D	2	15	Pollos (M4)
Granja 2	G2-A	8	32	Pollos (M2) y aves silvestres (M3)
	G2-B	6	24	Pollos (M2)
	G2-C	2	8	Pollos (M2)
	G2-D	2	8	Pollos (M2 y M3)
	G2-E	2	8	Pollos y AD adultos (M3)
	G2-F	2	8	Aves silvestres y moscas (M3)
Granja 3	G3-A	8	63	Pollos (M2)

La letra M indica el orden de muestreo

Para el caso de la granja 2 (Tabla 6, Anexo I-B3), de 30 aislamientos de *C. coli*, 25 pudieron ser analizados mediante esta técnica, de los cuales 22 aislamientos se agruparon en seis perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 6, perfiles G2-A-F), y tres aislamientos presentaron patrones únicos de restricción. Sólo cinco aislamientos no mostraron patrones de restricción de PFGE. Del análisis de los perfiles de restricción obtenidos en granja 2 se determinó que existe relación clonal entre cepas obtenidas a partir de muestras de pollos a lo largo de un mismo muestreo (Tabla 6, Perfiles G2-A, B, C y E, Anexo I-B5) así como también cepas obtenidas a partir de muestras de pollos de diferentes muestreos (Tabla 6, Perfil G2-D, Anexo IB-5). Por otro

lado, en la misma granja se halló la relación clonal entre aislamientos de *C. coli* obtenidos de pollos y vectores: aves silvestres (Tabla 6, Perfil G2-A), AD adultos (Tabla 6, Perfil G2-E), así como también se detectó relación clonal entre cepas aisladas de vectores (Tabla 6, Perfil G2-F, Anexo I-B6).

Por último, para la granja 3 (Tabla 6, Anexo I-B4), de los 12 aislamientos de *C. coli*, 11 de ellos pudieron ser analizados mediante esta técnica y un aislamiento no presentó patrón de restricción de PFGE. De los 11 aislamientos analizados, ocho de ellos y todos correspondientes a muestras provenientes de pollos del mismo muestreo (M2) se agruparon en un único perfil de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 6, Perfil G3-A). Solo tres aislamientos presentaron patrones únicos de restricción PFGE.

4.1.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

A partir de los resultados de la prevalencia de los genes de virulencia en los aislamientos obtenidos de la totalidad de muestras en granja (Figura 11), se pudo determinar que dos de los 11 genes evaluados (*flaA* y *flhA*), fueron detectados en todas las cepas (162/162) y el tercer gen más prevalente fue *cadF* (147/162). De los 162 aislamientos, 83 presentaron los genes pertenecientes al operón *cdt*, 77 el gen *iam*, 74 el gen *racR* y 51 *ciaB*. Por otro lado, los genes menos prevalentes fueron *wlaN* (23/162) y *virB11* (17/162).

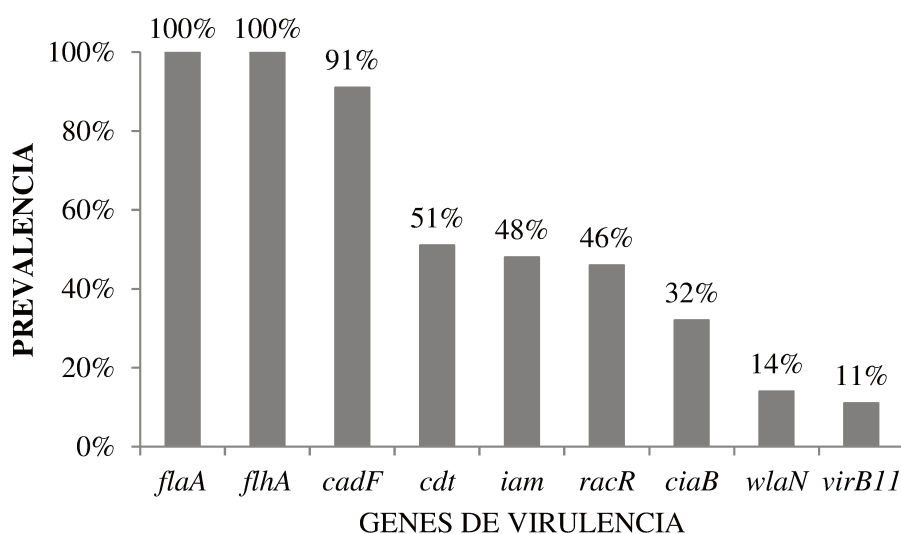


Figura 11. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja.

Desde el punto de vista de las especies de los aislamientos totales obtenidos en granja (Figura 12), se pudo observar que tanto para los aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* así como también para aquellos aislamientos solo identificados a nivel de género, los genes más prevalentes fueron *flaA*, *flhA* y *cadF*. Para el resto de los genes evaluados se pudo determinar que *C. jejuni* tuvo una prevalencia más elevada que *C. coli* para casi la totalidad de los genes de virulencia, excepto para los genes *iam* y *virB11* los cuales tuvieron una mayor prevalencia para *C. coli*. Además, por otro lado, *Campylobacter* spp. presentaron la mayor prevalencia para el gen *Wlan* respecto de *C. jejuni* y *C. coli*.

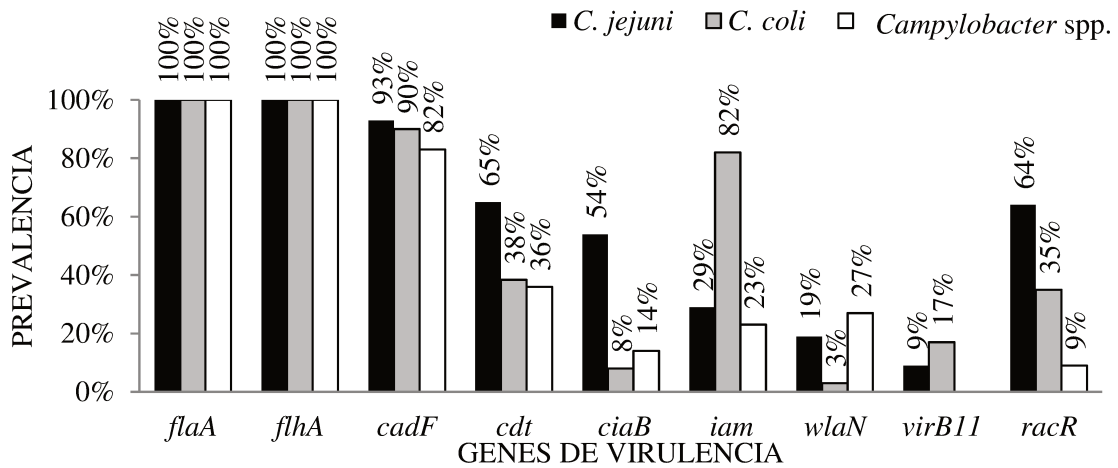


Figura 12. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en granja.

Analizando los datos de los genes de virulencia para las especies de *Campylobacter* termotolerantes (Figura 13), teniendo en cuenta cada una de las granjas muestreadas, podemos observar que la prevalencia de los genes de virulencia *ciaB* y *racR* fue mayor para los aislamientos de *C. jejuni* que para *C. coli* en las tres granjas muestreadas. Por otro lado, la prevalencia del gen *iam* fue mayor para *C. coli* que para *C. jejuni* en las tres granjas muestreadas. El resto de los datos de prevalencia fueron variables para cada especie dependiendo de la granja muestreada.

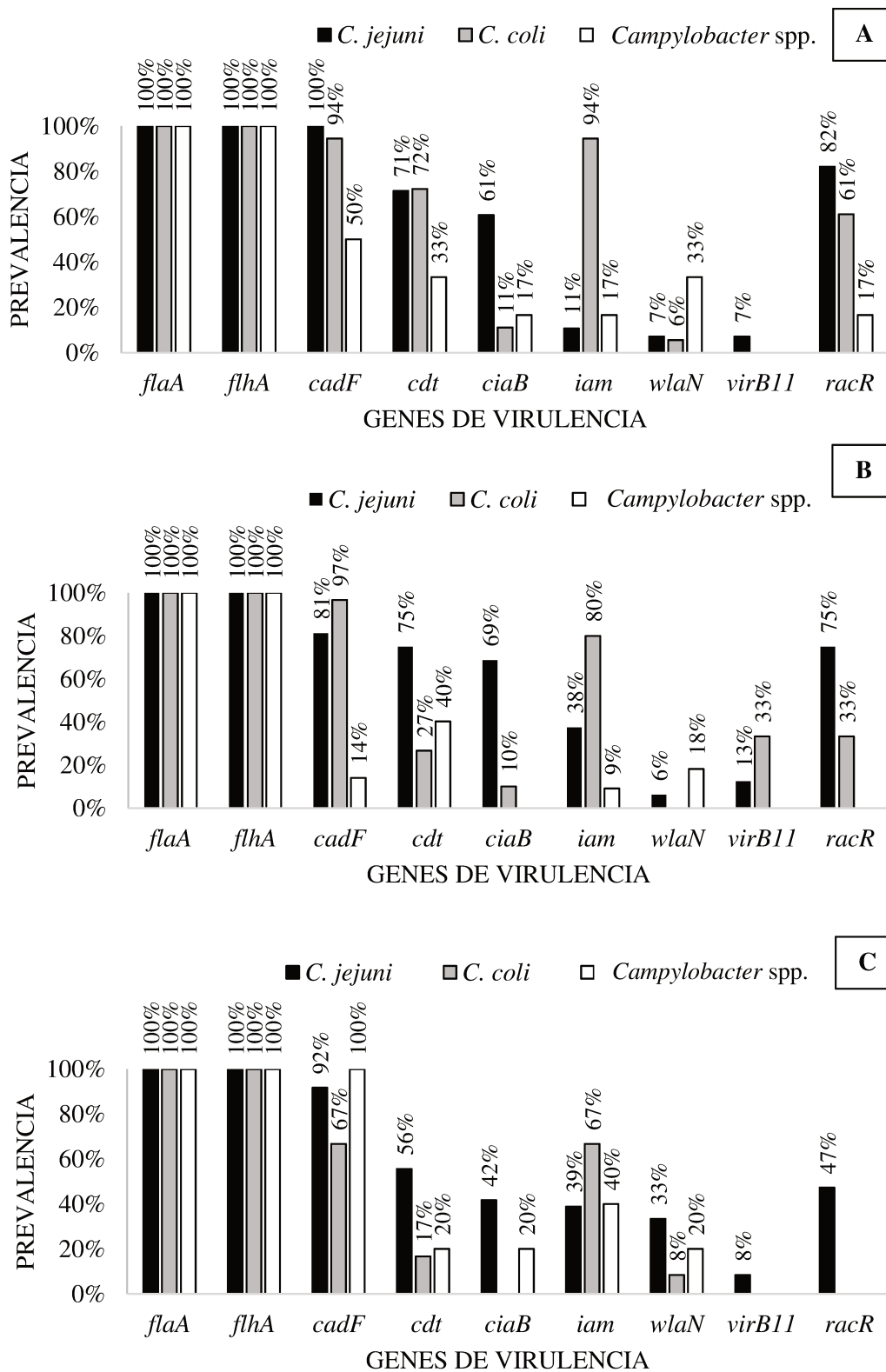


Figura 13. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en granja 1 (A), granja 2 (B) y granja 3 (C)

Focalizando el análisis de la prevalencia de los genes de virulencia en las especies de *Campylobacter* termotolerantes según el origen de las muestras (Figura 14), se pudo determinar que, para el caso de los aislamientos obtenidos de pollos (Figura 14 A) y aves silvestres (Figura 14 B) nuevamente la prevalencia de casi la totalidad de los genes de virulencia fue más alta para la especie *C. jejuni* respecto de *C. coli*, excepto para los genes *iam* y *virB11* que fueron más altas para los aislamientos de *C. coli*.

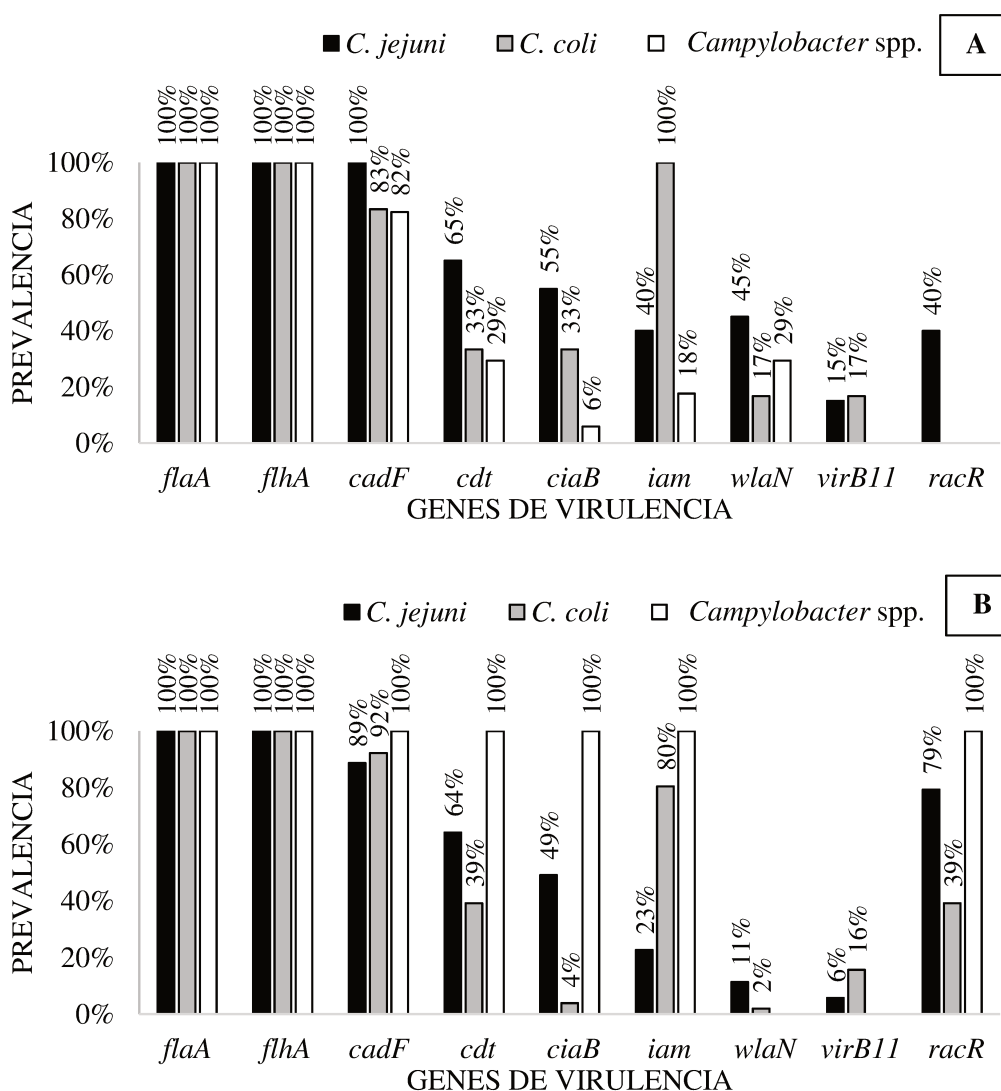


Figura 14. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos de muestras de pollos (A) y aves silvestres (B).

Según el origen de muestra también lo que se pudo determinar fue que dos de los aislamientos con mayor cantidad de genes de virulencia obtenidos en granja fueron pertenecientes a la especie *C. jejuni*. Uno de ellos fue obtenido a partir de una muestra de aves silvestres que evidenció la presencia de todos los genes excepto *virB11* y otro fue a partir de una muestra de pollo que

presentó todos los genes excepto *iam*. Un aislamiento perteneciente a la especie *C. coli* presentó todos los genes excepto *wlaN* y fue obtenido a partir de una muestra de mosca.

A partir de los resultados obtenidos se observó que un gran número de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja presentaron al menos tres de los 11 genes de virulencia evaluados. Esto determinó la presencia de cepas que se pueden clasificar como multivirulentas. Se pudo determinar entonces, la presencia de diferentes perfiles de virulencia para *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. En la tabla 7 se muestran los perfiles de virulencia más representativos.

El perfil de virulencia más representativo en los tres casos (Tabla 7, perfiles Cj-A, Cc-A y Cssp-A) fue aquel que agrupó genes relacionados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*) con el gen asociado a la adherencia de las células epiteliales (*cadF*). Además, se pudo observar que *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. compartieron otros dos perfiles, uno de ellos con cuatro genes de virulencia que agrupó genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 7, perfiles Cj-D, Cc-D y Cssp-C) y el otro agrupó genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*, *racR*), invasión (*ciaB*, *iam*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 7, perfiles Cj-L, Cc-K y Cssp-G).

También se pudieron identificar perfiles de virulencia compartidos por *C. jejuni* y *C. coli*, entre ellos, los más representativos fueron los que compartieron genes de movilidad (*flaA* y *flhA*) y adherencia (*cadF*, *racR*) (Tabla 7, perfiles Cj-E y Cc-F) y los que compartieron genes de movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia (*cadF*, *racR*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 7, perfiles Cj-H y Cc-H).

Por último, por un lado se hallaron dos perfiles de virulencia compartidos entre *C. jejuni* y *Campylobacter* spp.. El primer perfil agrupó genes relacionados con la movilidad y la producción de citotoxinas, *flaA*, *flhA* y *cdtABC* (Tabla 7, perfiles Cj-B y Cssp-B) y el segundo agrupó genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*), invasión (*ciaB*, *iam*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 7, perfiles Cj-K y Cssp-F). Por otro, se pudieron detectar dos perfiles de virulencia compartidos entre *C. coli* y *Campylobacter* spp. Uno de ellos agrupó genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*) e invasión (*iam*) (Tabla 7, perfiles Cc-C y Cssp-D) y el otro perfil agrupó genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*), invasión (*iam*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 7, perfiles Cc-E y Cssp-E).

Además de los perfiles de virulencia compartidos entre *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. coli* se hallaron perfiles de virulencia únicos para *C. jejuni* y *C. coli*. La diferencia en los perfiles de

virulencia únicos de ambas especies fue en la presencia del gen de invasión *ciaB* en los perfiles de *C. jejuni* y la presencia del gen de invasión *iam* en los perfiles de *C. coli*. Sumado a esto, ninguno de los perfiles de virulencia único representativos para *C. coli* evidenció la presencia del gen *wlaN*, lo que sí ocurrió en los perfiles de virulencia de *C. jejuni*.

Tabla 7. Perfiles de virulencia para aislamientos de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. obtenidos en granja

	Cantidad de genes de virulencia compartidos	Perfil de virulencia	Genes de virulencia	Prevalencia (%) total
<i>C. jejuni</i>	3	Cj-A	<i>flaA flhA cadF</i>	74/80 (93%)
	3	Cj-B	<i>fla A flhA cdtABC</i>	52/80 (65%)
	3	Cj-C	<i>flaA flhA racR</i>	52/80 (65%)
	4	Cj-D	<i>flaA flhA cadF cdtABC</i>	49/80 (61%)
	4	Cj-E	<i>flaA flhA cadF racR</i>	47/80 (59%)
	4	Cj-F	<i>flaA flhA cadF ciaB</i>	40/80 (50%)
	5	Cj-G	<i>flaA flhA cadF ciaB cdtABC</i>	32/80 (40%)
	5	Cj-H	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC</i>	30/80 (38%)
	5	Cj-I	<i>flaA flhA cadF racR ciaB</i>	30/80 (38%)
	6	Cj-J	<i>flaA flhA cadF racR ciaB cdtABC</i>	24/80 (30%)
	6	Cj-K	<i>flaA flhA cadF ciaB iam cdtABC</i>	12/80 (15%)
	7	Cj-L	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC</i>	9/80 (11%)

	8	Cj-M	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC wlaN</i>	1/80 (1%)
	8	Cj-N	<i>flaA flhA cadF racR virB11 ciaB cdtABC wlaN</i>	1/10 (1%)
<i>C. coli</i>	3	Cc-A	<i>flaA flhA cadF</i>	54/60 (90%)
	3	Cc-B	<i>flaA flhA iam</i>	49/60 (82%)
	3	Cc-C	<i>flaA flhA cadF iam</i>	44/60 (73%)
	4	Cc-D	<i>flaA flhA cadF cdtABC</i>	23/60 (38%)
	4	Cc-E	<i>flaA flhA iam cdtABC</i>	22/60 (37%)
	4	Cc-F	<i>flaA flhA cadF racR</i>	21/60 (35%)
	5	Cc-G	<i>flaA flhA cadF racR iam</i>	22/60 (37%)
	5	Cc-H	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC</i>	13/60 (22%)
	5	Cc-I	<i>flaA flhA racR iam cdtABC</i>	13/60 (22%)
	6	Cc-J	<i>flaA flhA cadF racR iam cdtABC</i>	13/60 (22%)
	7	Cc-K	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC</i>	3/60 (5%)
	8	Cc-L	<i>flaA flhA cadF racR virB11 ciaB iam cdtABC</i>	1/60 (2%)

	3	Cspp-A	<i>flaA flhA cadF</i>	19/22 (86%)
	3	Cspp-B	<i>flaA flhA cdtABC</i>	6/22 (27%)
	4	Cspp-C	<i>flaA flhA cadF cdtABC</i>	6/22 (27%)
<i>Campylobacter</i> spp.	4	Cspp-D	<i>flaA flhA cadF iam</i>	5/22 (23%)
	5	Cspp-E	<i>flaA flhA cadF iam cdtABC</i>	3/22 (14%)
	6	Cspp-F	<i>flaA flhA cadF ciaB iam cdtABC</i>	2/22 (11%)
	7	Cspp-G	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC</i>	1/22 (5%)

4-2. *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

4.2.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

Del análisis de la totalidad de las muestras obtenidas de ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros (n=431) (Figura 15), se pudo determinar que 249 muestras fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real). Sin embargo, sólo se pudieron obtener 140 aislamientos presuntivos para *Campylobacter* termotolerantes y 135 aislamientos pudieron ser confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Los restantes cinco aislamientos fueron aislamientos presuntivos que no tuvieron la capacidad de sobrevivir a los diferentes repiques en placa o no amplificaron en la reacción de PCR de género.

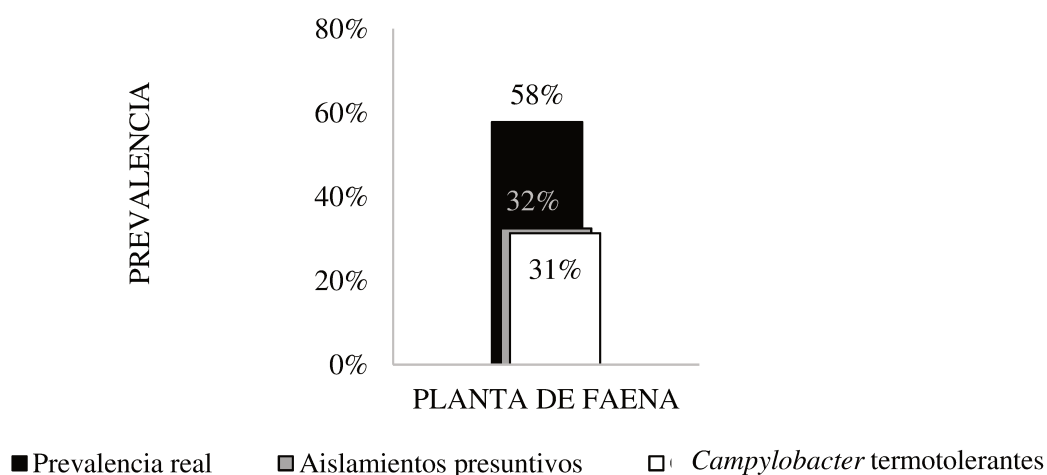


Figura 15. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de *Campylobacter* termotolerantes total en planta de faena de pollos.

De los 135 aislamientos confirmados a nivel de género, 58 fueron identificados como *C. jejuni* y 77 correspondieron a la especie *C. coli* (Figura 16). No se obtuvieron aislamientos de *C. lari* ni de *C. upsaliensis*. Tampoco hubo aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie.

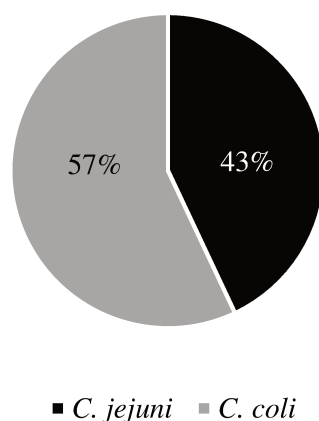


Figura 16. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* total en planta de faena de pollos

Del análisis en cada uno de los lotes de faena muestreados (Figura 17), para el lote de faena 1, de la totalidad de muestras tomadas (n=162), 86 muestras fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real). Sólo 38 aislamientos fueron aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 37 aislamientos fueron confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Solo un aislamiento presuntivo fue incapaz de sobrevivir el cultivo en placa y no pudo ser identificado.

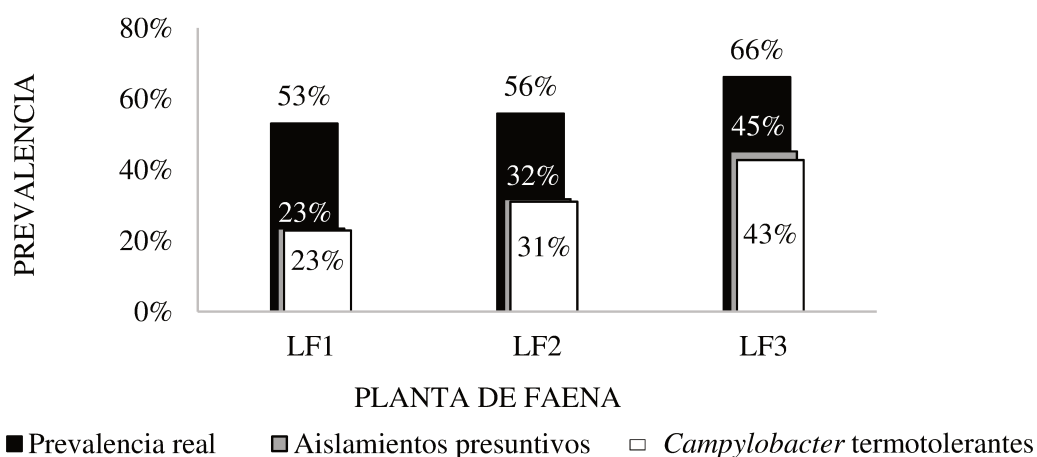


Figura 17. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de *Campylobacter* termotolerantes en cada lote de faena de pollos.

Para el lote de faena 2 (Figura 17), de la totalidad de muestras tomadas (n=145), 81 muestras fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes (prevalencia real). Se obtuvieron 46 aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 45 aislamientos fueron confirmados a nivel de género como *Campylobacter* termotolerantes. Solo un aislamiento presuntivo fue incapaz de sobrevivir el cultivo en placa y no pudo ser identificado.

Por último, para el lote de faena 3 (Figura 17), de la totalidad de muestras tomadas (n=124), 82 muestras fueron positivas en la detección de *Campylobacter* termotolerantes. Se pudieron obtener 56 aislamientos presuntivos de *Campylobacter* termotolerantes y 53 aislamientos fueron confirmados a nivel de género. Los restantes tres aislamientos fueron incapaces de sobrevivir en los sucesivos repiques en placa o que no amplificaron en la reacción de PCR de género.

Considerando los aislamientos confirmados a nivel de género (Figura 18), tanto para el lote de faena 1 como el lote de faena 2 *C. coli* fue la especie más prevalente (LF1: 25/37 y LF2: 30/45) respecto de *C. jejuni* (LF1: 12/37 y LF2: 15/45). Sin embargo, ocurrió lo opuesto en el lote de faena 3 (Figura 18), en el cual de los 53 aislamientos confirmados como *Campylobacter* termotolerantes, 31 fueron *C. jejuni* y 22 *C. coli*. En ninguno de los tres lotes hubo aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie, ni tampoco se obtuvieron aislamientos de *C. lari* o *C. upsaliensis*.

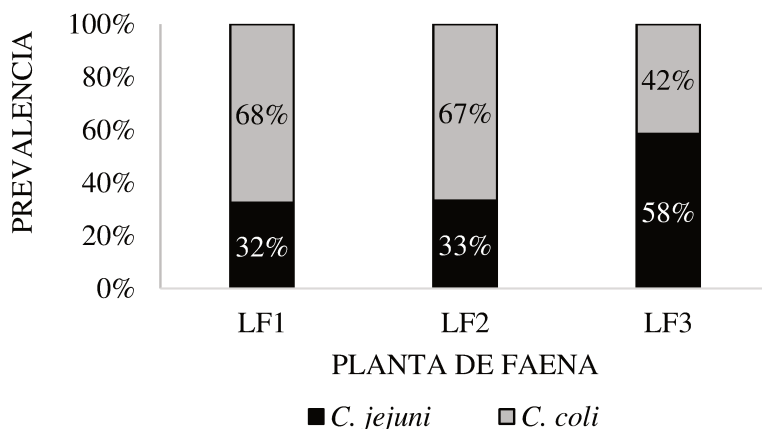


Figura 18. Prevalencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Campylobacter* spp. en cada lote de faena de pollos

A partir de los datos obtenidos, se pudo determinar que la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes se mantuvo a lo largo de todo el proceso de faena. Es decir, se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes de la totalidad de los puntos de muestreo en la planta de faena (Figura 19).

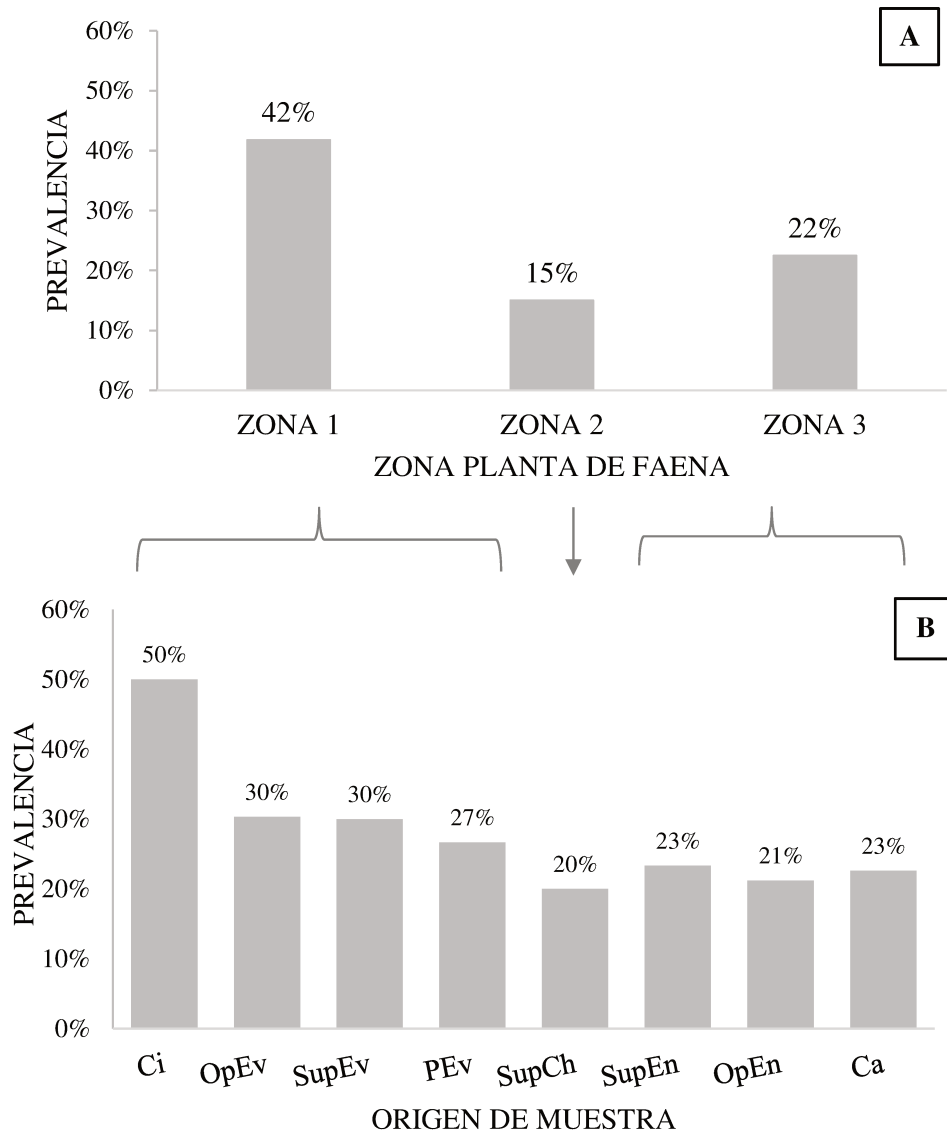


Figura 19: Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena de pollos parrilleros por zona muestreada (A) y por origen de muestra (B).

En la zona 1, zona de eviscerado (n=213), se obtuvieron 89 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes (Figura 19A) de los cuales la mayor prevalencia se obtuvo a partir de muestras de ciegos de pollos (65/130, Figura 19B). En la zona 2, zona de lavado de pollos (n=40), se obtuvieron seis aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes (Figura 19A). No hubo aislamientos en esta zona a partir de muestras de agua de *chiller* (0/10) y todos los aislamientos obtenidos fueron a partir de muestras de superficies inmediatamente posteriores al *chiller* (6/30) (Figura 19B). Por último, en la zona 3, zona de despacho de pollos (n=178) se obtuvieron 40 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes (Figura 19A). En esta última zona se obtuvo la mayor prevalencia en carcasas de pollos y superficies de envasado (26/115 y 7/30, respectivamente).

Por otro lado, se detectó que la prevalencia de las especies de *Campylobacter* termotolerantes variaron entre las distintas etapas del proceso de faena de pollos parrilleros (Figura 20).

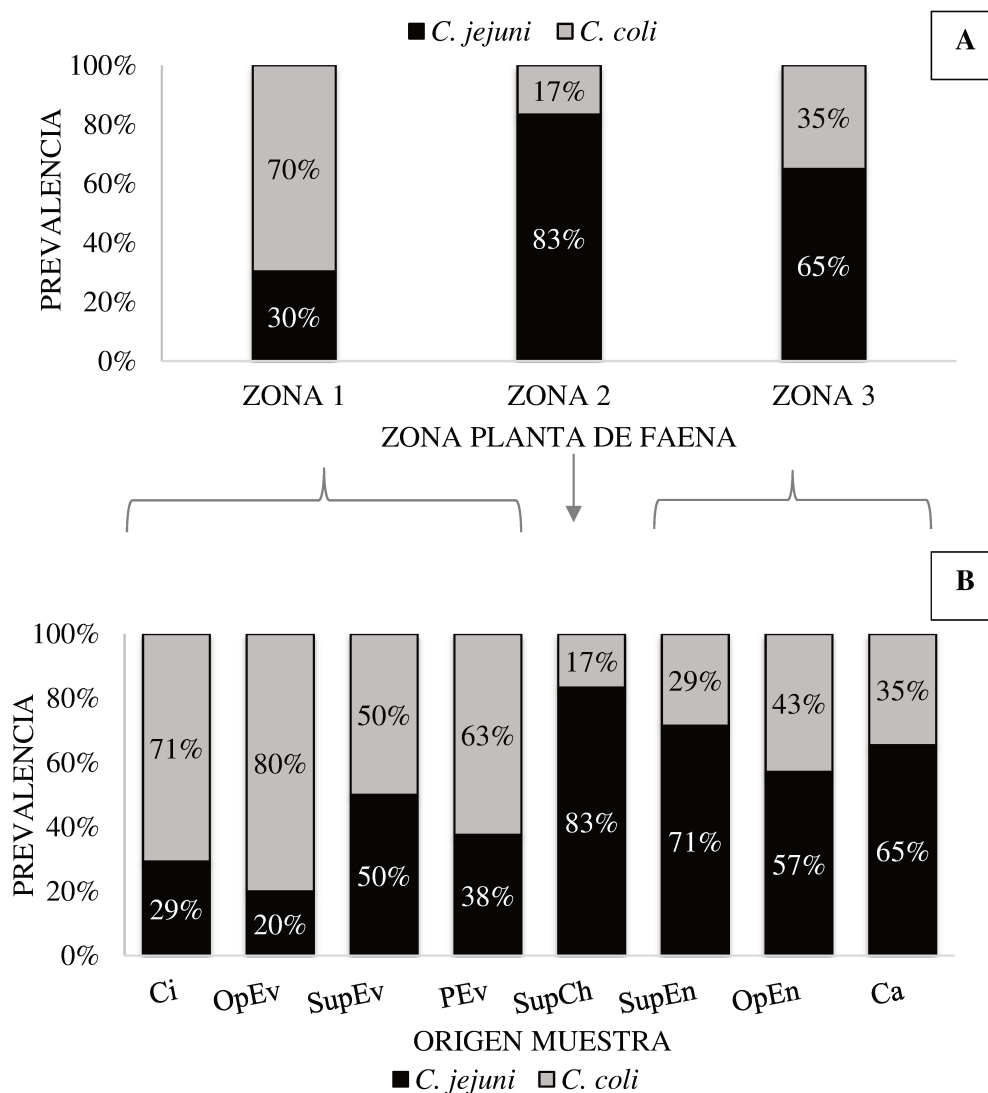


Figura 20. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en planta de faena de pollos parrilleros por zona muestreada (A) y por origen de muestra (B).

Se pudo determinar que, en el inicio del procesamiento, en la zona de eviscerado (zona 1) hubo una mayor prevalencia de *C. coli* (62/89) que *C. jejuni* (27/89) (Figura 20A). Posteriormente, luego de la etapa de lavado de las carcasas de los pollos, zona 2 y zona 3, hubo un cambio en la prevalencia y *C. jejuni* pasó a tener valores de prevalencias más altos (5/6 y 26/40 respectivamente) que *C. coli* (1/6 y 14/40) (Figura 20A). Se pudo determinar que esta diferencia de las prevalencias entre *C. jejuni* y *C. coli* no solo se da a nivel global por zona, sino que también ocurre en los diferentes puntos de muestreo en las etapas del proceso de faena (Figura 20B). Por último, a pesar de que *C. coli* fue menos prevalente que *C. jejuni* en la zona 2 y zona 3, la prevalencia de esta especie fue incrementando hacia el final del proceso de faena.

Continuando con el estudio, del análisis de los resultados desde el punto de vista de la relación entre los aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* de cada zona muestreada en cada uno de los lotes de faena y los diferentes orígenes de muestra en cada zona, se detectó que en cada lote de faena la prevalencia principalmente de *C. coli* en la zona de eviscerado se relacionó con la mayor prevalencia de esta especie en los aislamientos obtenidos en ciegos de pollos (Figura 21). Cabe aclarar que a partir de las muestras de ciegos de pollos se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en la zona de eviscerado.

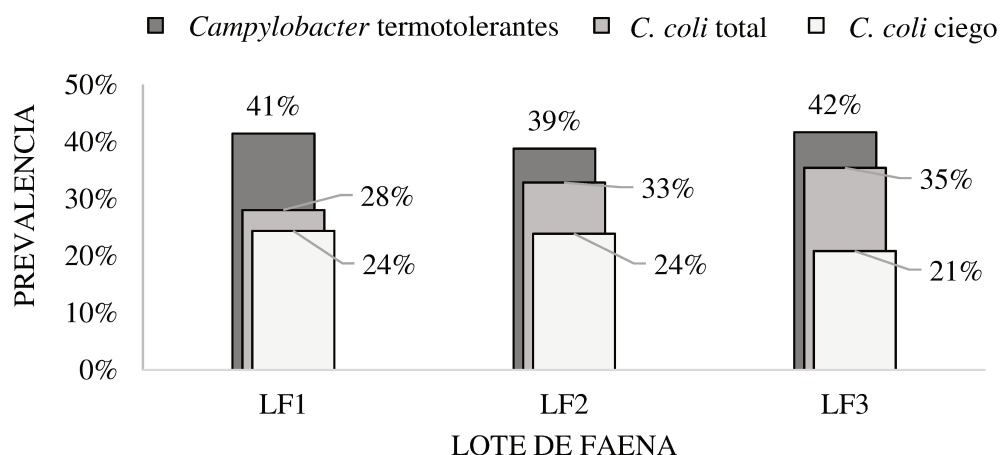


Figura 21. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes, *C. coli* total y *C. coli* en muestras de ciego de pollos en zona de eviscerado (zona 1) por lote de faena.

Siguiendo con este análisis, la mayor prevalencia de *C. jejuni* respecto de *C. coli* al final del proceso también se relacionó con la mayor cantidad de aislamientos de *C. jejuni* en muestras obtenidas a partir de carcasas de pollos listas para el despacho (Figura 22).

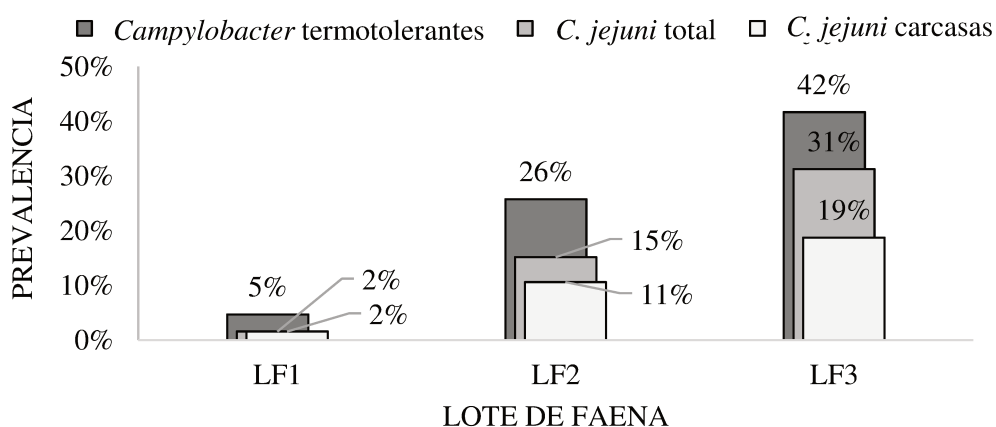


Figura 22. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes, *C. jejuni* total y *C. jejuni* en muestras de carcasas de pollos en zona de despacho (zona 3) por lote de faena.

4.2.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

De los resultados de PFGE obtenidos, tal como se pueden observar en el anexo correspondiente (Anexo I-C1 e I-D1), se detectó una elevada diversidad genotípica entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en planta de faena. Sin embargo, se pudieron determinar algunas relaciones que se detallarán a continuación. Se pudo observar relación clonal tanto entre aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes que fueron obtenidos en muestreos sucesivos dentro de un mismo lote de faena, así como también aislamientos obtenidos en lotes de faena diferentes. También se pudo determinar que para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes se hallaron los mismos genotipos en aislamientos obtenidos a partir de muestras de ciegos, carcasas de pollos y en potenciales fuentes de contaminación en la planta de faena como operarios y superficies de la planta de faena y utensilios utilizados durante el procesamiento.

Analizando los resultados de manera general por especie de *Campylobacter* termotolerantes, se observó que de los 58 aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de las muestras de planta de faena (Anexo I-C1), solo 44 aislamientos pudieron ser analizados mediante esta técnica, los restantes 14 aislamientos no mostraron patrones de restricción por PFGE. De los 44 aislamientos analizados, 18 aislamientos presentaron patrones únicos de restricción por PFGE y 26 aislamientos se agruparon en nueve perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (A-I), de los cuales un perfil (perfil A) fue el predominante (Tabla 8). Se determinó que los perfiles están formados por aislamientos de *C. jejuni* provenientes de diferentes muestras evaluadas (Tabla 8, perfiles A, B, C, F, G, H, I), así como también de diferentes muestreos (Tabla 8, perfil B) y de diferentes lotes de faena (Tabla 8, perfil C).

Tabla 8. Perfiles de PFGE de *Campylobacter jejuni* aislados en planta de faena.

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	8	18	Ci, OpEn y Ca (M3-LF3)
B	3	7	SupCh (M1-LF3), PEv y OpEv (M3-LF3)
C	3	7	PEv (M3-F2), SupEv y OpEn (M3-LF3)
D	2	4	Ci (M3-LF1)
E	2	4	SupCh y Ca (M1-LF2)
F	2	4	SupCh y SupEn (M1-LF3)
G	2	4	Ci y Ca (M3-LF3)
H	2	4	Ci y SupCh (M3-LF3)
I	2	4	SupCh (M3-LF3) y Ca (M3-LF3)

La letra M indica el muestreo (M1, M2, M3) y LF hace referencia al lote de pollos faenados (LF1, LF2, LF 3)

Se pudo determinar también, que de los 12 aislamientos de *C. jejuni* obtenidos en el lote de faena 1 (Anexo I-C2), siete aislamientos pudieron ser analizados por PFGE. Solo dos aislamientos fueron agrupados en un único perfil de restricción con $\geq 95\%$ de similitud y ambos aislamientos se obtuvieron a partir de muestras de ciegos de pollos en un mismo muestreo (Tabla 9, perfil LF1-A). Los restantes cinco aislamientos presentaron patrones únicos de bandas. Por último, cinco aislamientos no mostraron patrones de restricción por PFGE.

Tabla 9. Perfiles de PFGE de *Campylobacter jejuni* aislados en cada lote de faena.

	Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
LF1	LF1-A	2	29	Ci (M3)
LF2	LF2-A	2	25	SupCh y Ca (M1)
LF3	LF3-A	8	28	Ci y OpEn (M3)
	LF3-B	3	10	SupCh (M1), OpEv y PEv (M3)
	LF3-C	2	7	Ci y Ca (M3)
	LF3-D	2	7	SupCh y Ca (M3)
	LF3-E	2	7	SupCh y SupEn (M1)
	LF3-F	2	7	SupEv y OpEn (M3)

La letra M indica el orden de muestreo

Para el caso del lote de faena 2 (Tabla 9, Anexo I-C3), de los 15 aislamientos obtenidos de *C. jejuni*, siete de ellos no mostraron patrón de restricción por PFGE y solo se generó un único perfil de restricción con $\geq 95\%$ de similitud compartido por dos aislamientos (Tabla 9, perfil LF2-A). Dichos aislamientos provenían de muestras carcasa de pollo y de superficie posterior al *chiller*, ambos del mismo muestreo. Los restantes seis aislamientos presentaron patrones únicos de restricción por PFGE.

Para el lote de faena 3 (Tabla 9, Anexo I-C4), de los 31 aislamientos de *C. jejuni*, 10 presentaron patrones únicos de bandas y dos de ellos no presentaron patrones de restricción por PFGE. Los restantes 19 aislamientos se agruparon en seis perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud. Del análisis de los perfiles obtenidos se pudieron detectar las mismas cepas de *C. jejuni* en diferentes zonas de la planta de faena durante un mismo muestreo. Se detectaron los mismos clones en la zona de eviscerado y zona de lavado (Tabla 9, perfil B) en la zona de eviscerado y zona de envasado (Tabla 9, perfiles LF3- A, C y F) y en la zona de lavado y zona de envasado (Tabla 9, perfiles LF3-D y E).

Se pudo determinar también una elevada diversidad entre los aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de muestras provenientes de carcasas de pollos ya que todas las cepas analizadas por

PFGE presentaron perfiles únicos de restricción (Anexo I-C5). Sin embargo, sí se detectó relación clonal entre cepas de *C. jejuni* obtenidas a partir de ciegos y carcasas de pollos (Anexo I-C6). Por otro lado, también se pudo determinar la relación entre cepas de *C. jejuni* aisladas en las diferentes superficies de la planta de faena (SupPCh) y los operarios de trabajo (OpEn) con cepas de *C. jejuni* obtenidas en las carcasas de pollos (Anexo I-C7). Por último, también se halló relación clonal entre cepas de *C. jejuni* aisladas a partir de las diferentes superficies (SupEv, SupPCh, SupEn) y utensilios de procesamiento (PEv) entre sí (Anexo I-C8). Todas las cepas de *C. jejuni* que pudieron ser relacionadas siempre pertenecieron al mismo muestreo, solo un agrupamiento presentó dos cepas de muestreos diferentes.

Por otro lado, de un total de 77 aislamientos de *C. coli* (Tabla 10, Anexo I-D1), 53 aislamientos dieron origen a 12 perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 10), de los cuales dos perfiles (A y B) fueron los predominantes. Por otro lado, nueve cepas de *C. coli* presentaron patrones únicos y 15 cepas no mostraron patrones de restricción por PFGE. Tal como se puede apreciar en la Tabla 10, los perfiles están formados por aislamientos de *C. coli* provenientes de diferentes fuentes de origen (perfiles B, D, E, H, I, J y L), así como también de diferentes muestreos (perfiles A, E, F, G y H) y de diferentes lotes de faena (perfiles A, E y H). Cabe mencionar que en 10 de los 12 agrupamientos hallados están incluidos aislamientos obtenidos a partir de muestras de ciego de pollos.

Tabla 10. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* aislados en planta de faena.

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	9	14	Ci (M2-LF2), Ci y PEv (M3-LF1) y Ci (M3-LF2)
B	7	11	Ci y OpEv (M2-LF3)
C	6	10	Ci (M4-LF1)
D	6	10	PEv y Ca (M2-LF3)
E	6	10	Ci (M2-LF1); Ci (M2-LF2) y Ca (M3-LF2)
F	5	8	Ci (M2-LF1); Ci (M3-LF1)
G	3	5	Ci (M2-LF2); Ci (M3-LF2)
H	3	5	Ci (M2-LF1); SupEv y OpEv (M3-LF2)
I	2	3	Ci y OpEv (M3-LF2)
J	2	3	Ci y OpEv (M2-LF3)
K	2	3	OpEv (M2-LF2)
L	2	3	Ci y OpEn (M3-LF2)

La letra M indica el orden de muestreo y LF hace referencia al lote de pollos correspondiente a la granja muestreada

Se pudo determinar que, en el lote de faena 1 (Tabla 11, Anexo I-D2), de los 25 aislamientos de *C. coli* obtenidos, 14 de ellos se agruparon en cuatro perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud

(perfiles LF1-A, B, C y D), seis aislamientos presentaron patrones únicos de restricción y cinco aislamientos no mostraron patrones de restricción para PFGE. Tres de los cuatro perfiles de restricción hallados relacionaron aislamientos de *C. coli* obtenidos a partir de muestras de ciego de pollo, solo un perfil incluyó un aislamiento obtenido a partir de otro origen de muestra, pero perteneciente a la zona de eviscerado (Tabla 11).

Tabla 11. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* aislados en cada lote de faena

	Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
LF1	LF1-A	4	20	Ci (M2)
	LF1-B	5	25	Ci (M4)
	LF 1-C	3	15	Ci (M2)
	LF1-D	2	10	Ci y PEv (M3)
LF2	LF2-A	6	25	Ci (M2 y M3)
	LF2-B	3	13	Ci, SupEv y Ca (M3)
	LF2-C	3	13	Ci (M2 y M3)
	LF2-D	3	13	Ci y OpEv (M2)
	LF2-E	2	8	Ci (M2)
	LF2-F	2	8	Ci y OpEv (M2)
	LF2-G	2	8	Ci y OpEn (M3)
LF3	LF3-A	7	39	Ci y OpEv (M2)
	LF3-B	7	39	Ci, OpEv, PEv y Ca (M2)

La letra M indica el orden de muestreo

Para el caso del lote de faena 2 (Tabla 11, Anexo I-D3), de 30 aislamientos de *C. coli* obtenidos, 24 pudieron ser analizados mediante esta técnica. Los restantes seis aislamientos de *C. coli* no mostraron patrones de restricción de PFGE. De los 24 aislamientos analizados por PFGE, 21 se agruparon en siete perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 11, LF2-A a G) y tres presentaron patrones únicos de restricción. Del análisis de los perfiles hallados se detectó que cinco de los siete agrupamientos incluyeron aislamientos de *C. coli* obtenidos a partir de muestras de ciego de pollo o muestras de la zona de eviscerado (Tabla 11, Perfiles LF2-A, C, D, E y F). Solo dos perfiles (Tabla 11, Perfiles LF2-B y G) agruparon aislamientos de *C. coli* obtenidos en diferentes zonas de la planta de faena (zona de eviscerado y zona de envasado)

Por último, para el lote de faena 3 (Tabla 11, Anexo I-D4), de los 22 aislamientos obtenidos de *C. coli*, 14 aislamientos se agruparon en dos perfiles de restricción con $\geq 95\%$ de similitud (Tabla

11, perfiles LF3-A y LF3-B). Solo cuatro aislamientos de *C. coli* presentaron patrones únicos de restricción y cuatro aislamientos no presentaron patrones de restricción por PFGE. Los dos perfiles hallados agruparon aislamientos de la zona de eviscerado, y solo uno incluyó aislamientos de *C. coli* obtenidos en zona de eviscerado y zona de envasado.

Del análisis de los aislamientos obtenidos en carcasas de pollos (Anexo I-D5), se pudo determinar la existencia de un perfil que agrupó aislamientos obtenidos de carcasas de pollos, todos pertenecientes al muestreo 2 del lote de faena 3. Analizando los datos de la relación entre aislamientos obtenidos de ciegos y de carcasas de pollos (Anexo I-D6), lo que se pudo determinar fue que existieron agrupamientos que solo contenían aislamientos obtenidos de ciego o de carcasas de pollos. Sin embargo, solo un agrupamiento evidenció la relación clonal entre cepas obtenidas de ciego y carcasas de pollos y además de lotes de faena y muestreos diferentes. Se detectaron también perfiles de restricción que agruparon aislamientos obtenidos carcasas de pollos y pinzas de eviscerado pertenecientes al mismo muestreo y lote de faena, así como también al mismo muestreo pero en diferentes lotes de faena (Anexo I-D7). Finalmente, se detectó también la relación clonal entre aislamientos de *C. coli* obtenidos a partir de muestras de operarios de eviscerado en el mismo muestreo y lote de faena (Anexo I-D8).

Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en granja y planta de faena de pollos parrilleros (Difusión por la cadena cárnica aviar).

Adicionalmente, se analizó la relación clonal entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja (80 *C. jejuni* y 60 *C. coli*) con aquellos aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en planta de faena (58 *C. jejuni* y 77 *C. coli*). En este sentido se pudieron identificar siete agrupamientos para *C. jejuni* y 12 agrupamientos para *C. coli* que incorporaron aislamientos obtenidos tanto a partir de muestras de granja como de planta de faena (Tabla 12).

Tabla 12: Perfiles de PFGE de *Campylobacter* termotolerantes aislados en granja y en planta de faena.

	Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
<i>C. jejuni</i>	A	11		Pollo, AD larvas, AD adulto (M1-G2); SupCh, Ca (M1-LF2)
	B	10		Aves silvestres, Trabajador granja (M3-G3); Ci, OpEn, Ca (M3-LF3)
	C	3		Aves silvestres (M3-G3), OpEv (M3-LF3)
	D	3		SupCh (M1-LF3), Pollos (M3-G3), PEv (M3-LF3)
	E	3		Pollos (M3-G3), SupCh, Ca (M3-LF3)
	F	2		Pollos (M1-G1), Ci (M1-LF1)
	G	2		Aves silvestres (M3-G3), Ca (M3-LF3)
<i>C. coli</i>	A	13		Pollos (M2-G3), PEv (M2-LF3), Ca (M2-LF3)
	B	10		Pollos (M2-G2), Ci, OpEv (M2-LF2)
	C	8		Pollos (M3-G2), AD adultos (M3-G2), Ci (M2-LF1, M2-LF2), Ca (M3-LF2)
	D	8		Pollos (M2-G2, M3-G2), SupEv (M3-LF2)
	E	8		Pollos (M2-G3), Ci (M2-G3), OpEv (M2-LF3)
	F	7		Pollos (M2-G2), Ci (M2-LF1)
	G	4		Pollos (M2-G2), Ci (M2-G1), OpEv (M3-LF2)
	H	4		Moscas, aves silvestres (M3-G2), Ci, OpEv (M3-LF2)
	I	3		Aves silvestres (M3-G2), Ci (M2-LF2), Ci (M3-LF2)
	J	3		Pollos (M2-G2), Ci (M2-LF1)
	K	3		Pollos (M4-G1), Ci (M4-LF1)
	L	2		Pollos (M2-G2), Ci (M2-LF1)

A partir de este análisis se identificó que, para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, los agrupamientos relacionaron aislamientos obtenidos a partir de diferentes etapas de la cadena de producción aviar. En los agrupamientos más representativos (Tabla 12, *C. jejuni* perfil A y B y *C. coli* perfil A), los genotipos identificados persistieron desde el inicio de la producción en la granja hasta el final del procesamiento de carne aviar en la planta de faena. Para ambas especies, los agrupamientos encontrados relacionaron aislamientos obtenidos en sucesivos muestreos a partir de muestras obtenidas en la misma cadena de producción. Además, se encontró relación

clonal entre aislamientos obtenidos en las diferentes fuentes de contaminación de la granja y en las diferentes fuentes de contaminación en planta de faena.

4.2.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

A partir de los resultados de la prevalencia de los genes de virulencia en los aislamientos obtenidos de la totalidad de muestras en planta de faena (n=135), se pudo determinar que dos de los 11 genes evaluados (*flaA* y *flhA*), fueron detectados en todas las cepas (Figura 23) y el tercer gen más prevalente fue *cadF* (129/135). Los genes menos prevalentes fueron *wlaN* (27/135) *ciaB* (23/135) y *virB11* (5/135).

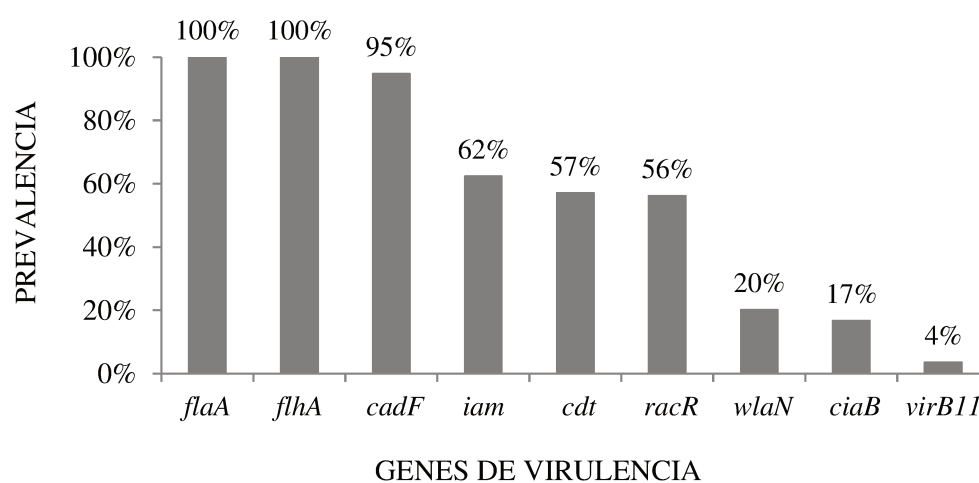


Figura 23. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en planta de faena de pollos parrilleros.

Si analizamos los resultados teniendo en cuenta las especies de *Campylobacter* termotolerantes obtenidas en la planta de faena de pollos parrilleros (Figura 24), se pudo determinar que para ambas especies los genes de virulencia más prevalentes fueron *flaA*, *flhA* y *cadF*. Por otro lado, la prevalencia de casi todos los genes de virulencia evaluados fue más elevada para la especie *C. jejuni* respecto de *C. coli*, a excepción de los genes *iam* y *virB11* para los cuales la especie *C. coli* tuvo una mayor prevalencia que *C. jejuni* e incluso fueron los genes menos prevalentes para esta última especie.

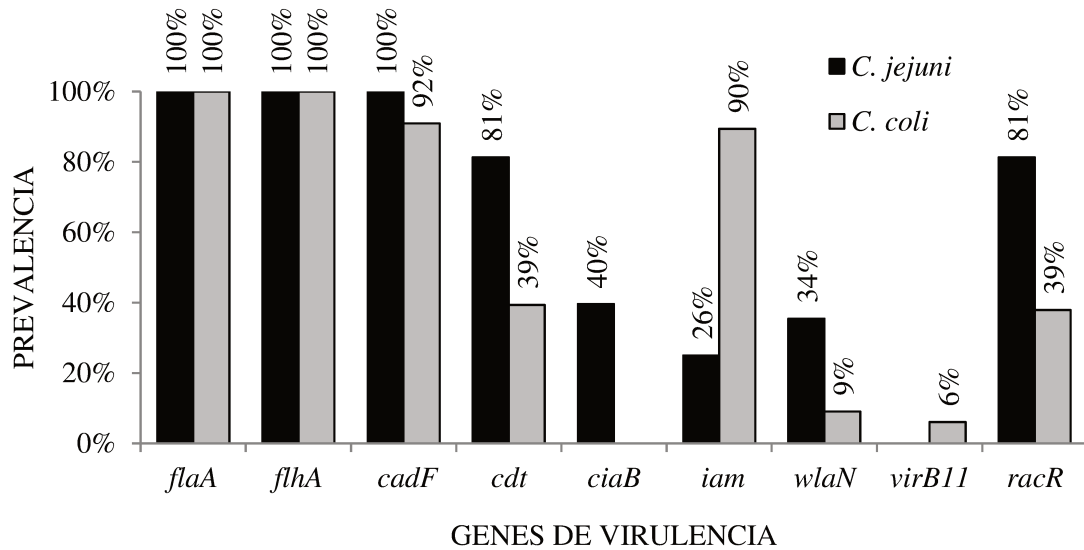


Figura 24. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en planta de faena de pollos parrilleros.

Siguiendo con el análisis, se consideraron los resultados de prevalencia de genes de virulencia por especie de *Campylobacter* termotolerantes en cada uno de los lotes de faena (Figura 25). Se pudo determinar que nuevamente la especie *C. jejuni* presentó mayor prevalencia en los genes *cdt*, *ciaB*, *wlaN* y *racR* respecto de la especie *C. coli* en todos los lotes de faena muestreados. Sin embargo, la prevalencia del gen *iam* fue mayor para *C. coli* respecto de *C. jejuni* en los tres lotes muestreados.

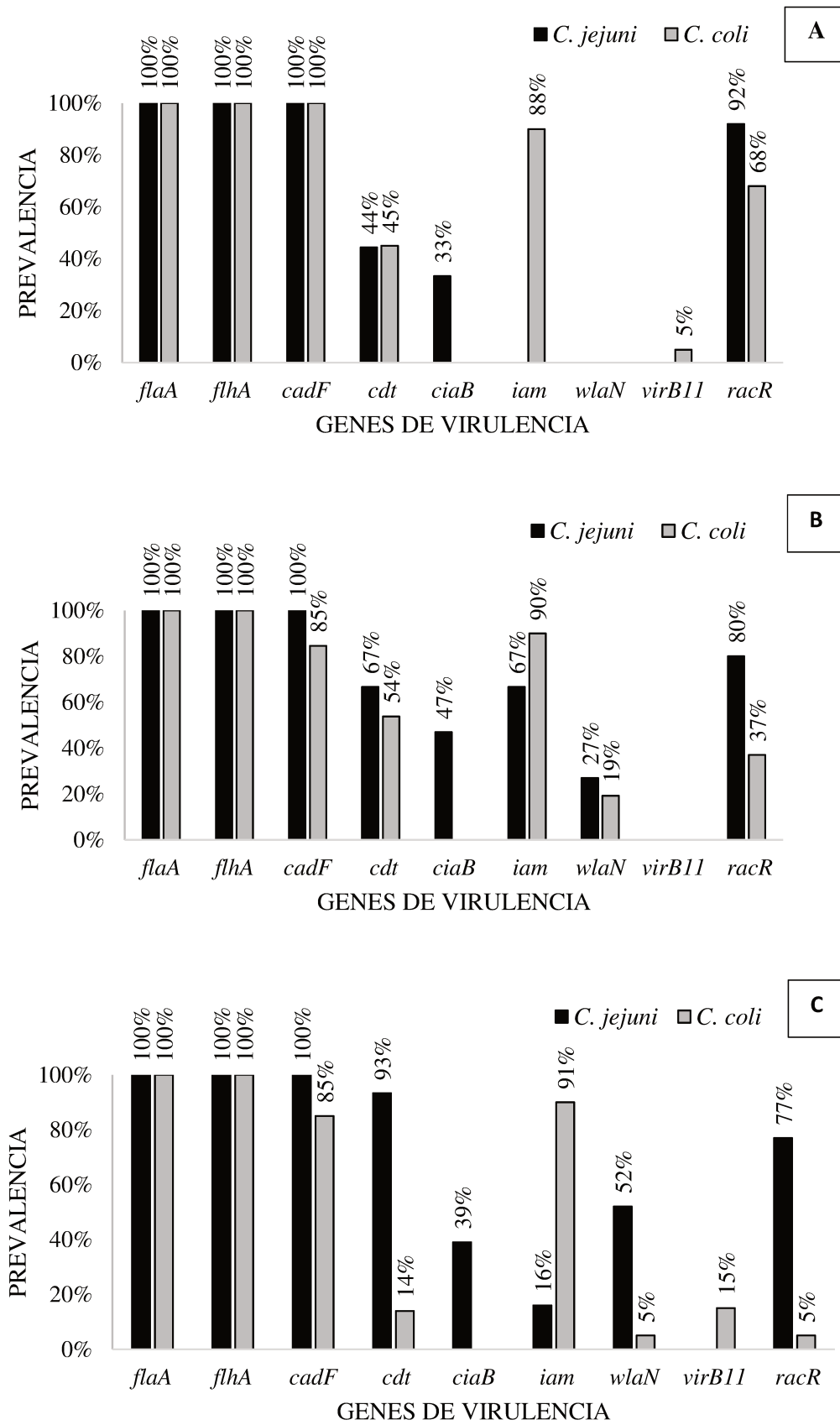


Figura 25. Prevalencia de genes de virulencia en aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos del lote de faena 1 (A), lote de faena 2 (B) y lote de faena 3 (C)

Según el origen de muestra, lo que se pudo detectar fue que los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes positivos a la mayor cantidad de genes de virulencia fueron obtenidos a partir de muestras de carcasas de pollos y todos pertenecientes a la especie *C. jejuni*. De los mencionados aislamientos, cuatro evidenciaron la presencia de siete genes de virulencia, dos fueron positivos para todos los genes excepto *wlaN* y *virB11* y otros dos presentaron los genes *flaA*, *flhA*, *cadF*, *cdt*, *ciaB*, *iam* y *wlaN*. Finalmente, solo un aislamiento presentó ocho genes de virulencia (excepto *virB11*).

Lo que se pudo determinar también entre los aislamientos obtenidos de *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena fue que un gran número de aislamientos presentaron al menos tres de los 11 genes de virulencia evaluados. Esto determinó la presencia de cepas que se pueden clasificar como multivirulentas. En este sentido, se pudo determinar la prevalencia de diferentes perfiles de multivirulencia para *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en planta de faena. En la Tabla 13 se muestran los perfiles de multivirulencia más representativos.

Tabla 13. Perfiles de multivirulencia para aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en planta de faena

	Cantidad de genes de virulencia compartidos	Perfil de virulencia	Genes de virulencia	Prevalencia (%) total
<i>C. jejuni</i>	3	Cj-A	<i>flaA flhA cadF</i>	48/58 (83%)
	3	Cj-B	<i>flaA flhA racR</i>	39/58 (67%)
	4	Cj-C	<i>flaA flhA cadF racR</i>	39/58 (67%)
	4	Cj-D	<i>flaA flhA cadF cdtABC</i>	38/58 (66%)
	4	Cj-E	<i>flaA flhA cdtABC racR</i>	33/58 (57%)
	5	Cj-F	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC</i>	33/58 (57%)
	5	Cj-G	<i>flaA flhA cadF racR ciaB</i>	18/58 (31%)
	5	Cj-H	<i>flaA flhA cadF cdtABC wlaN</i>	17/58 (29%)
	6	Cj-I	<i>flaA flhA cadF racR ciaB cdtABC</i>	15/58 (26%)
	6	Cj-J	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC wlaN</i>	13/58 (22%)
	6	Cj-K	<i>flaA flhA cadF racR iam cdtABC</i>	7/58 (12%)
	6	Cj-L	<i>flaA flhA cadF iam cdtABC wlaN</i>	7/58 (12%)
	7	Cj-M	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC</i>	2/58 (3%)

	7	Cj-N	<i>flaA flhA cadF ciaB iam cdtABC wlaN</i>	2/58 (3%)
	7	Cj-O	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam wlaN</i>	1/58 (2%)
	7	Cj-P	<i>flaA flhA racR ciaB iam cdtABC wlaN</i>	1/58 (2%)
	8	Cj-Q	<i>flaA flhA cadF racR ciaB iam cdtABC wlaN</i>	1/58 (2%)
	<hr/>			
	3	Cc-A	<i>flaA flhA cadF</i>	59/77 (77%)
	3	Cc-B	<i>flaA flhA iam</i>	59/77 (77%)
	4	Cc-C	<i>flaA flhA cadF iam</i>	55/77 (71%)
	4	Cc-D	<i>flaA flhA cadF racR</i>	25/77 (32%)
	4	Cc-E	<i>flaA flhA cadF cdtABC</i>	25/77 (32%)
<i>C. coli</i>	4	Cc-F	<i>flaA flhA racR iam</i>	25/77 (32%)
	5	Cc-G	<i>flaA flhA cadF racR iam</i>	25/77 (32%)
	5	Cc-H	<i>flaA flhA cadF iam cdtABC</i>	23/77 (30%)
	5	Cc-I	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC</i>	16/77 (21%)
	5	Cc-J	<i>flaA flhA racR iam cdtABC</i>	16/77 (21%)
	6	Cc-K	<i>flaA flhA cadF iam cdtABC wlaN</i>	6/77 (8%)

6	Cc-L	<i>flaA flhA cadF racR cdtABC wlaN</i>	5/77 (6%)
6	Cc-M	<i>flaA flhA cadF racR iam wlaN</i>	5/77 (6%)
6	Cc-N	<i>flaA flhA racR iam cdtABC wlaN</i>	5/77 (6%)
7	Cc-O	<i>flaA flhA cadF racR virB11 iam wlaN</i>	1/77 (1%)

Lo observado fue que el perfil de multivirulencia más representativo tanto para *C. jejuni* como para *C. coli* (Tabla 13, perfiles Cj-A, Cc-A) fue aquel que agrupó genes relacionados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*) con el gen asociado a la adherencia de las células epiteliales (*cadF*). Además, se pudo observar que *C. jejuni* y *C. coli* compartieron otros cinco perfiles más. Dos de esos perfiles compartidos estuvieron formados por cuatro genes de virulencia relacionados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*, *racR*) (Tabla 13, perfiles Cj-C y Cc-D) o producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 13, perfiles Cj-D y Cc-E). Otro perfil compartido por ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes agrupó cinco genes relacionados con la movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*, *racR*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) (Tabla 13, perfiles Cj-F y Cc-I). Otros dos perfiles también compartidos por *C. jejuni* y *C. coli* agruparon genes de movilidad (*flaA* y *flhA*), adherencia (*cadF*, *racR*) y producción de citotoxinas (*cdtABC*) con genes relacionados con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (*wlaN*) (Tabla 13, perfiles Cj-J y Cc-L) y con genes relacionados a la invasión (*iam*) (Tabla 13, perfiles Cj-L y Cc-K).

Además de las similitudes de los perfiles de multivirulencia para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, se encontraron algunas diferencias. Por un lado, en los principales perfiles de multivirulencia encontrados para *C. coli* no se encontró en ninguno de ellos el gen de invasión *ciaB*, lo que si ocurrió para los perfiles de multivirulencia de *C. jejuni* (Tabla 13, perfiles Cj-G, Cj-I, Cj-M, Cj-N, Cj-O, Cj-P y Cj-Q). Por otro lado, en ninguno de los perfiles de multivirulencia de *C. jejuni* se halló el gen *virB11*, lo que si ocurrió para *C. coli* (Tabla 13, perfil Cc-O).

4-3. *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos (Segundo muestreo en granja).

4.3.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

Para este estudio se tomaron muestras de vectores y fómites de la granja en la etapa de vaciamiento del galpón de crianza (n= 488) y de pollos, vectores y fómites en la 5^{ta} semana de vida de los pollos de la crianza posterior a dicho vaciamiento (n= 607). De un total de 1095 muestras tomadas en la granja 2, antes de la crianza y en el final de la crianza de los pollos, se detectó *Campylobacter* termotolerantes en un total de 225 muestras (21%) y se obtuvieron 197 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes. Sin embargo, no hubo detección ni aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes en los períodos de vaciamiento del galpón de crianza (0/488) por lo que los aislamientos y prevalencia obtenidos corresponden a la etapa posterior a la crianza de pollos (Figura 26).

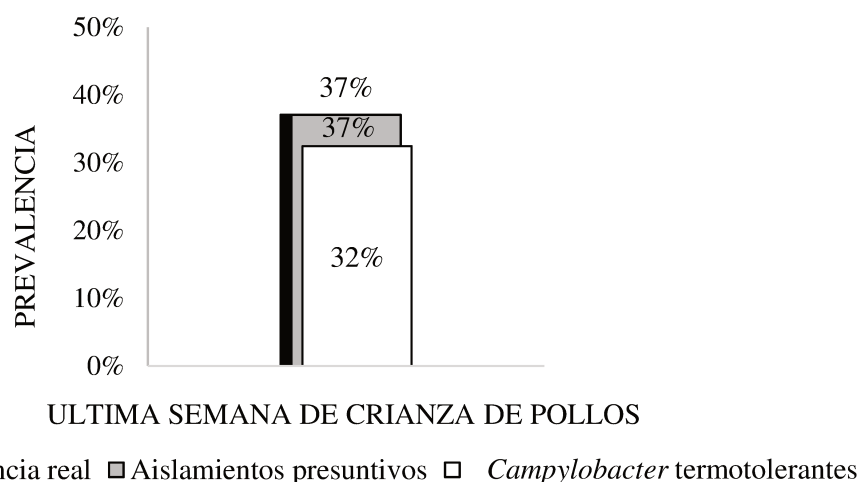


Figura 26. Prevalencia real, prevalencia de aislamientos presuntivos y de aislamientos confirmados de *Campylobacter* termotolerantes total en la última semana de crianza en granja 2.

De los 197 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos, se obtuvo una mayor prevalencia de la especie *C. jejuni* (Figura 27) respecto de *C. coli* (106 y 91 respectivamente). No se obtuvieron aislamientos de *C. lari* ni de *C. upsaliensis*.

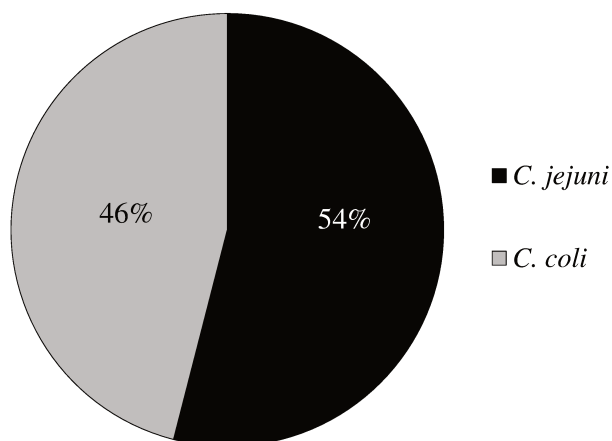


Figura 27. Prevalencia *C. jejuni* y *C. coli* total en la última semana de crianza en granja 2.

Continuando con el análisis, se determinaron los resultados a partir de los datos de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en cada uno de los ciclos de crianza de pollos muestreados (Figura 28).

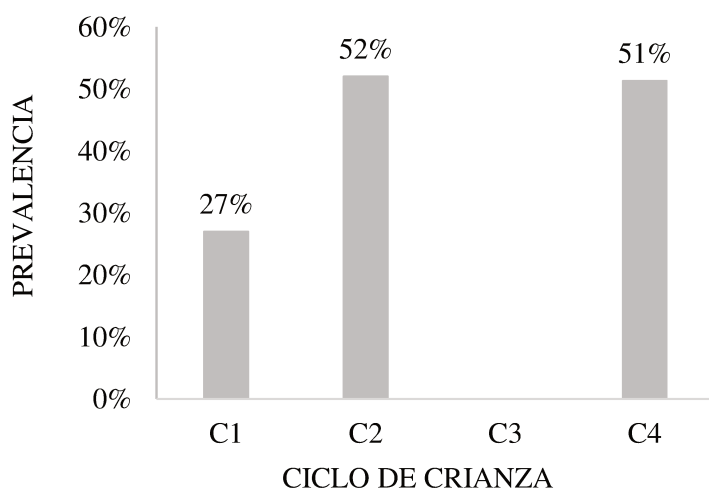


Figura 28. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la última semana de crianza de cada ciclo muestreado en granja 2.

Se encontró que, en primer lugar, como ya se mencionó previamente, en ninguno de los ciclos de crianza de pollos muestreados se pudo obtener aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras obtenidas durante el período de vaciamiento previo a la crianza de pollos (0/119 en el ciclo 1, 0/126 en el ciclo 2, 0/120 en el ciclo 3 y 0/123 en el ciclo 4). En cambio, en la última semana de crianza de los pollos (Figura 28), los datos de prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la última semana de crianza de pollos fue de 41/152 en el ciclo de crianza 1, 78/150 en el ciclo de crianza 2, 0/153 en el ciclo de crianza 3 y 78/152 en el ciclo de crianza 4. Particularmente se detectó que en el ciclo de crianza 3 no se obtuvieron aislamientos de

Campylobacter termotolerantes. Esto último coincidió, según información provista por el veterinario responsable del manejo sanitario de la granja, con el tratamiento de los pollos del galpón con enrofloxacina (Floxagen, VETANCO; 20 mg/kg) durante la semana previa a la toma de las muestras.

De los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en cada uno de los ciclos de crianza muestreados se pudo determinar la prevalencia de cada una de las especies estudiadas (Figura 29).

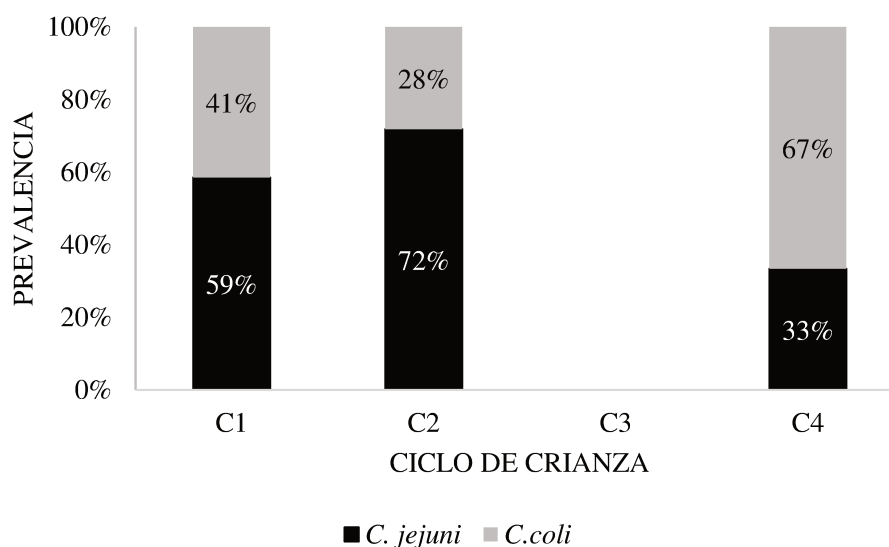


Figura 29. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en la última semana de crianza de cada ciclo muestreado en granja 2.

Así se identificó que tanto en el ciclo de crianza 1 como en el ciclo de crianza 2 (Figura 29), la prevalencia de *C. jejuni* fue más elevada (24/41 y 56/78, respectivamente) respecto de la prevalencia de *C. coli* (17/41 y 22/78, respectivamente). Sin embargo, en el ciclo de crianza 4, luego de la ausencia de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en el ciclo de crianza 3, *C. coli* fue la especie más prevalente (52/78) respecto de *C. jejuni* (26/78).

Analizando los resultados desde el punto de vista del origen de las muestras en la última semana de crianza de pollos en granja 2 (Figura 30), la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes más elevada se obtuvo a partir de las muestras de pollos (116/120) y muestras de trabajadores de la granja (6/8). En ordenes de prevalencia menores (Figura 30) también se determinó la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en muestras vectores como AD larvas (18/80) y adultos (12/80), moscas (15/80) y aves silvestres (14/75) así como también de fómites como cama de crianza del galpón (14/40), alimento balanceado en comederos (10/40) y cama de origen del galpón de crianza (2/20). Por otro lado, no se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras de agua (0/4 tanque de origen y 0/40 bebederos del galpón),

de alimento balanceado de origen (0/4), ni tampoco de animales domésticos (perros) de la granja (0/16).

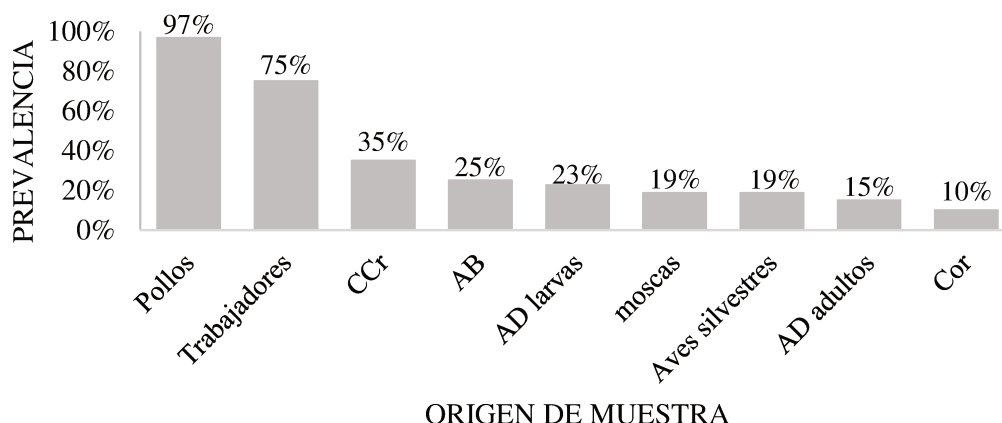


Figura 30. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2

Los datos obtenidos a partir de muestras de *Alphitobius diaperinus* y de moscas pueden ser analizados diferenciando aquellas muestras que tuvieron un proceso de desinfección (D) de aquellas que no (SD) (Figura 31). Para el caso de AD larvas se encontró una mayor prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras que tuvieron el proceso de desinfección (15/40), de aquellas que no fueron desinfectadas (3/40). Para el caso de AD adultos, se determinó que la prevalencia en las muestras que no fueron desinfectadas (9/40) fue mayor de aquellas que si tuvieron el proceso de desinfección (3/40). Por último, la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en moscas fue levemente mayor en las muestras con desinfección (3/40) respecto de las muestras sin desinfección (1/40).

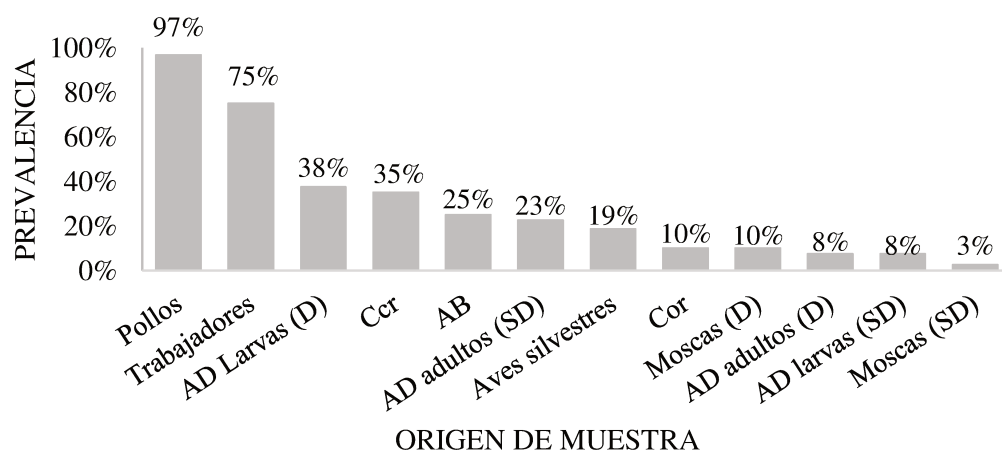


Figura 31. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2.

Desde el punto de vista de las especies de *Campylobacter* termotolerantes identificadas en cada una de las fuentes de aislamiento en granja (Figura 32) se detectó que *C. jejuni* fue la especie más prevalente respecto de *C. coli* en muestras de pollos (60/116), alimento balanceado de los comederos (9/10) y aves silvestres (13/14).

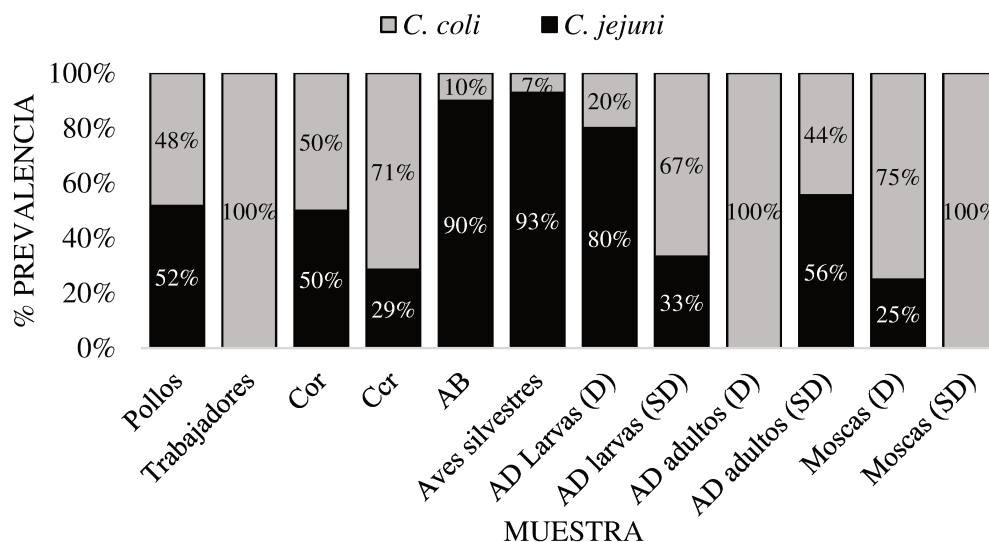


Figura 32. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en la última semana de crianza por origen de muestra en granja 2.

Por otro lado, *C. coli* fue la especie más prevalente (Figura 32) en muestras provenientes de trabajadores de la granja (6/6) y cama de crianza del galpón (10/14). Para el caso de las muestras obtenidas a partir de moscas, la prevalencia fue mayor para la especie *C. coli* tanto en las muestras que fueron desinfectadas (3/4) como en las que no tuvieron el proceso de desinfección (1/1). Para el caso de AD tanto en larvas como en adultos la especie de *Campylobacter* termotolerantes más prevalente en la muestra con desinfección difirió de la especie más prevalente en la muestra sin desinfección. De las muestras obtenidas a partir de AD larvas la especie más prevalente en las muestras con desinfección fue *C. jejuni* (12/15), mientras que en las muestras que no tuvieron el proceso de desinfección, *C. coli* fue la especie más prevalente (2/3). En el caso de AD adultos, solo se obtuvo *C. coli* a partir de las muestras desinfectadas (3/3), mientras que en las muestras sin desinfección la especie más prevalente fue *C. jejuni* (5/9).

El último análisis correspondió a los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos a partir de los diferentes orígenes de muestras y los distintos ciclos muestreados en la granja 2 (Figura 33). Se pudo determinar que se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras de alimento balanceado, cama de crianza, aves silvestres, AD adultos (SD) y AD larvas (D) tanto en el ciclo de crianza 1 (Figura 33 A), como en el ciclo de crianza 2 (figura 33 B) y ciclo de crianza 4 (Figura 33 C). El ciclo de crianza 4 fue el ciclo que presentó una mayor variedad de fuentes de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes.

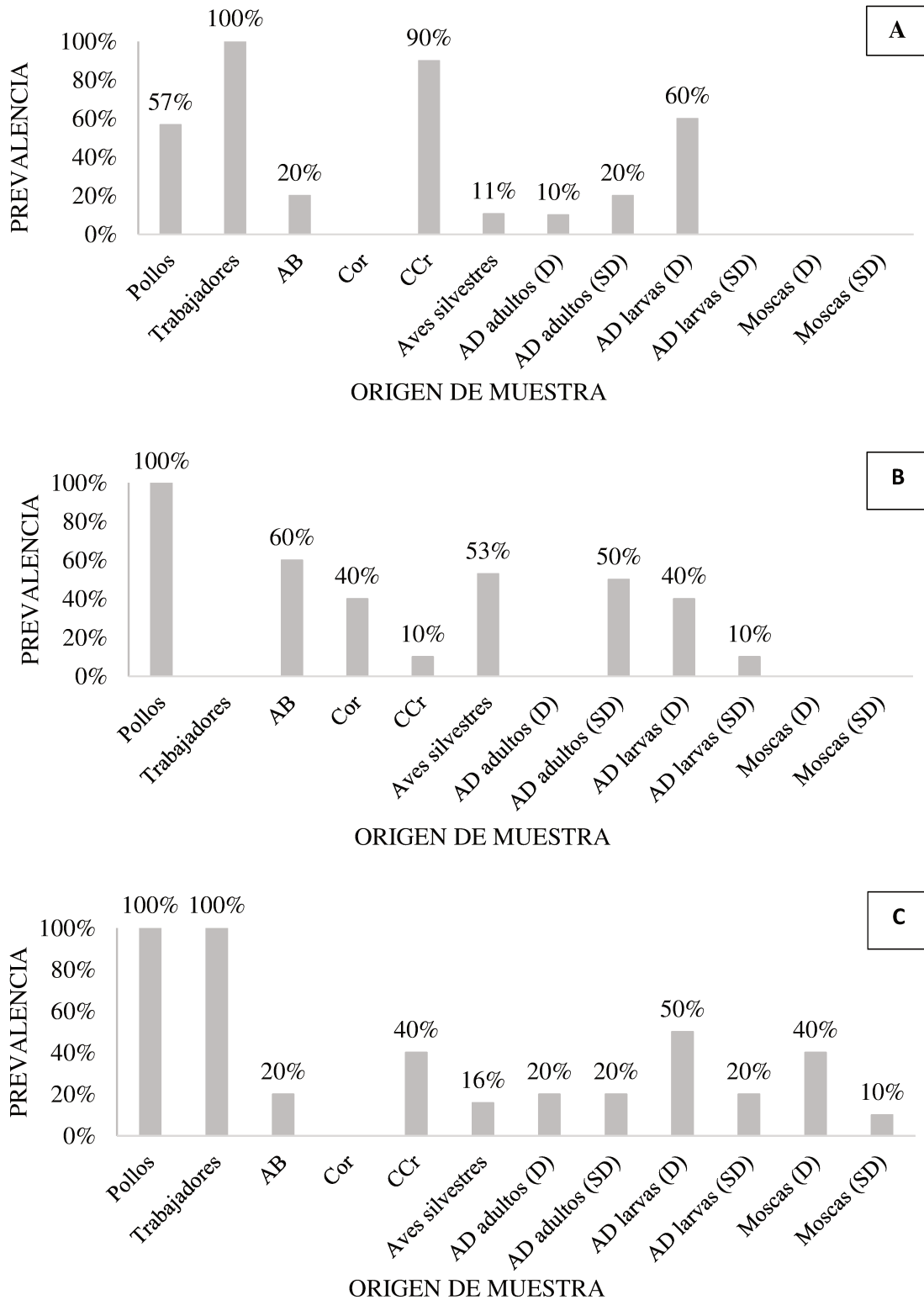


Figura 33. Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la última semana de crianza por origen de muestra en el ciclo de crianza 1 (A), ciclo de crianza 2 (B) y ciclo de crianza 4 (C) en granja 2

De aquellas muestras a partir de las cuales se pudieron obtener aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en más de un ciclo de crianza se pudo detectar una variación en la prevalencia de las especies de *Campylobacter* termotolerantes aisladas (Figura 34).

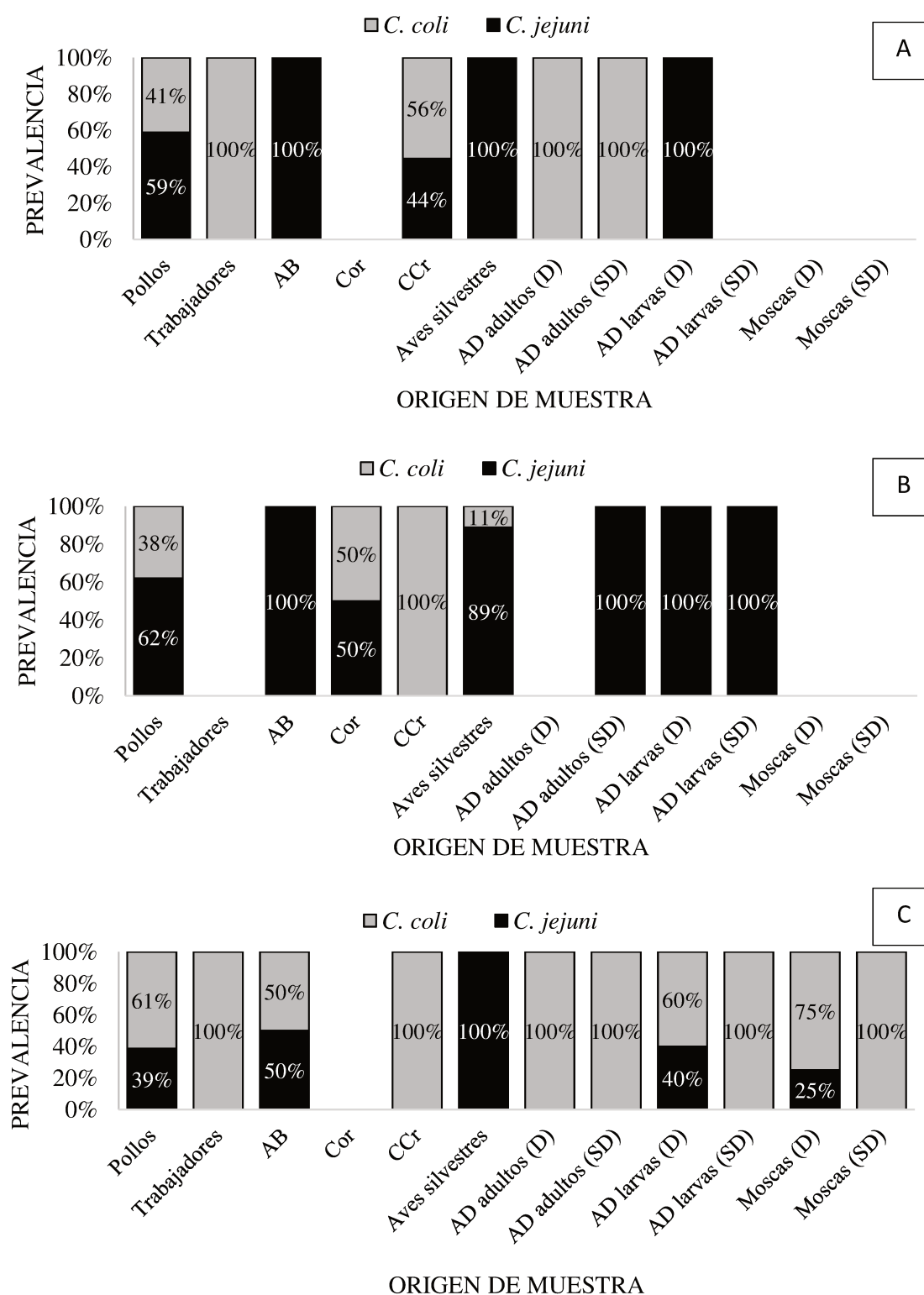


Figura 34. Prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en la última semana de crianza por origen de muestra en el ciclo de crianza 1 (A), ciclo de crianza 2 (B) y ciclo de crianza 4 (C) en granja 2

De esta manera (Figura 34), para las muestras obtenidas en pollos en el ciclo de crianza 1 y 2 fue mayor la prevalencia de *C. jejuni* (10/17 y 31/50, respectivamente). Sin embargo, en el ciclo de crianza 4, la prevalencia de *C. coli* fue mayor (30/49). De las muestras obtenidas a partir de alimento balanceado de los comederos del galpón solo se obtuvieron aislamientos de *C. jejuni* en el ciclo de crianza 1 y 2 (2/2 y 6/6, respectivamente) y en el ciclo de crianza 4 la prevalencia fue de 50% para cada especie (1/2). De las muestras obtenidas en la cama de crianza del galpón la mayor prevalencia fue para la especie *C. coli* tanto en el ciclo de crianza 1 (5/9), como en el ciclo de crianza 2 y 4 (1/1 y 4/4 respectivamente). En el caso de aves silvestres, tanto en el ciclo de crianza 1 como en el ciclo 2 y 4, la prevalencia de *C. jejuni* fue mayor (2/2, 8/9 y 3/3, respectivamente). Para el caso de las muestras de AD adultos sin proceso de desinfección en el ciclo 1 y 4 sólo se obtuvieron aislamientos de *C. coli*, mientras que en el ciclo 2 solo se obtuvieron aislamientos de *C. jejuni*. De las muestras de AD larvas con desinfección en el ciclo de crianza 1 y 2 solo se obtuvieron aislamientos de *C. jejuni*, pero en el ciclo de crianza 4 se obtuvo una mayor prevalencia de *C. coli* (3/5). De las muestras de AD larvas sin proceso de desinfección se obtuvieron solo aislamientos de *C. jejuni* mientras que en el ciclo 4 se obtuvieron solo aislamientos de *C. coli*. Por último, dos de las fuentes de origen muestreadas (muestras de trabajadores y AD adultos con desinfección) solo aparecieron en el ciclo de crianza 1 y 4 y solo se obtuvieron aislamientos de *C. coli* (Figura 37). Mientras que únicamente en el ciclo de crianza 2 se obtuvieron aislamientos de ambas especies en muestras obtenidas a partir de la cama de origen.

4.3.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

Para la determinación de la difusión y persistencia de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes obtenidas en sucesivos ciclos de crianza de pollos en la granja 2, se realizó el análisis mediante la técnica de PFGE.

En primer lugar, se analizaron 48 aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de pollos, vectores y fómites obtenidos en ciclos sucesivos de crianza en granja 2 (anexo I-E1). De estos 48 aislamientos, 12 de ellos presentaron patrones únicos de restricción por PFGE. Los restantes 36 aislamientos se agruparon en 11 perfiles de restricción $\geq 95\%$ de similitud (Tabla 14), de los cuales tres perfiles de restricción fueron predominantes (Perfiles A, B y C). Los perfiles de restricción estuvieron formados por aislamientos de *C. jejuni* provenientes de diferentes fuentes de origen (Tabla 14, Perfiles A, B, C, E, F, G, H y J), que pudieron pertenecer a un mismo ciclo de crianza (Tabla 14, perfiles A, B, C, F, G, H y J) así como también de diferentes ciclos de crianza (Tabla 14, perfiles A, B, E y K).

Tabla 14. Perfiles de PFGE de *Campylobacter jejuni* obtenidos en los diferentes ciclos de crianza en granja 2.

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	8	17	CCr (C1), pollos y AD larvas (D) (C2)
B	6	13	pollos (C1), pollos (C2), AD larvas (D) y aves silvestres (C1)
C	5	11	pollos y moscas (D) (C4)
D	3	6	pollos (C2)
E	2	4	AD larvas (D) (C1), aves silvestres (C2)
F	2	4	AD larvas (D) y AB (C1)
G	2	4	AD adultos (SD) y aves silvestres (C2)
H	2	4	pollos y AD larvas (D) (C1)
I	2	4	pollos (C2)
J	2	4	AB y AD larvas (D) (C4)
K	2	4	pollos (C4)

C: ciclo de crianza
D: muestras con desinfección
SD: muestras sin desinfección

Del análisis de los aislamientos de *C. jejuni* (Anexo I-E1) se detectó la presencia de aislamientos de pollos relacionados con al menos un vector de la granja muestreada (AD larvas (D), aves

silvestres y moscas (D)) en los tres ciclos muestreados (Tabla 14, perfiles A, B, C y H). Por último, también se pudo determinar que aquellos aislamientos de *C. jejuni* obtenidos en el ciclo de crianza 4, tuvieron perfiles de restricción no compartidos con ningún aislamiento obtenido en otros ciclos de crianza (Tabla 14, Perfiles C, J y K).

Del análisis de 26 aislamientos de *C. jejuni* obtenidos a partir de muestras de pollos (Anexo I-E2), se pudieron detectar seis perfiles de restricción $\geq 95\%$ de similitud y seis aislamientos con patrones únicos de restricción. De los seis perfiles de restricción formados, cinco de ellos agruparon cada uno aislamientos de *C. jejuni* obtenidos de pollos pertenecientes a un mismo ciclo de crianza. Solo un perfil de restricción agrupó cepas de *C. jejuni* pertenecientes a muestras de pollo de diferentes ciclos de crianza (C1 y C2).

Desde el punto de vista de los aislamientos obtenidos a partir de vectores y fómites en los diferentes ciclos de crianza de la granja 2 (Anexo I-E3) se pudo detectar que de 21 aislamientos de *C. jejuni* analizados, ocho presentaron patrones únicos de restricción y 13 aislamientos se agruparon en seis perfiles de restricción $\geq 95\%$ de similitud. En cuatro de dichos perfiles de restricción se encontraron cepas de *C. jejuni* obtenidas a partir de muestras de AD larvas (D) asociadas a cepas aisladas de algún otro vector/fomite (aves silvestres, AB y CCr) pero siempre pertenecientes al mismo ciclo de crianza. Solo un perfil de restricción evidenció relación entre cepas de *C. jejuni* obtenidas a partir de AD larvas (D) y aves silvestres de ciclos diferentes (C1 y C2).

Para el caso de *C. coli* (Tabla 15; Anexo I-F1), de un total de 63 aislamientos evaluados, 17 presentaron patrones únicos de restricción por PFGE. Los restantes 46 aislamientos se agruparon en nueve perfiles de restricción $\geq 95\%$ de similitud, de los cuales se obtuvieron tres perfiles predominantes (Tabla 15, perfiles A, B y C).

Tabla 15. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* obtenidos en los diferentes ciclos de producción en la granja 2.

Perfil	Aislamiento (n)	Muestras/total %	Origen del aislamiento
A	16	25	pollos, CCr, trabajadores, AD larvas (D) y AD adultos (SD) (C4)
B	9	14	Moscas (D), pollos, CCr, trabajadores y AB (C4)
C	5	8	pollos y CCr (C2)
D	4	6	AD adultos (D), trabajadores y AD larvas (D) (C4)
E	3	5	Pollos y AD adultos (D) (C1) y pollos (C2)
F	3	5	pollos y CCr (C1)
G	2	3	CCr y trabajadores (C1)

H	2	3	pollos (C2)
I	2	3	pollos y AD adultos (D) (C1)

C: ciclo de crianza
D: muestras con desinfección
SD: muestras sin desinfección

Para *C. coli*, los perfiles de restricción formados contienen aislamientos provenientes de diferentes fuentes de origen (Tabla 15, Perfiles A-G), que pudieron pertenecer a un mismo ciclo de crianza (Tabla 15, Perfiles A-I) así como también de diferentes ciclos de crianza (Tabla 15, Perfil E). Del análisis de los aislamientos de *C. coli* (Anexo IF-1) se pudo detectar que se obtuvieron aislamientos de pollos relacionados con al menos un vector/fomite de la granja muestreada y siempre se corresponden en el mismo ciclo de crianza (Tabla 15, perfiles A, B, C, E, F, H e I). Se halló que la cama de crianza y los trabajadores de la granja resultaron ser los fómites a partir de los cuales se obtuvieron aislamientos de *C. coli* que mayormente se encontraron relacionados con aislamientos obtenidos a partir de muestras de pollos (Tabla 15, perfiles A, B, C F y G). En cuanto a los vectores, AD adultos fue la fuente más representativa de aislamiento a partir de la cual se obtuvieron aislamientos de *C. coli* que se relacionaron con aislamientos obtenidos a partir de muestras de pollos (Tabla 15, perfiles A, D, E I). También se pudieron obtener aislamientos de *C. coli* a partir de muestras de moscas y AD larvas que se relacionaron con aislamientos obtenidos a partir de pollos, pero estas fuentes de aislamientos estuvieron representadas en un menor número de perfiles (Tabla 15, perfil A para moscas y B para AD larvas).

Del análisis de 35 aislamientos de *C. coli* obtenidos a partir de muestras de pollos (Anexo I-F2), 14 aislamientos presentaron patrones únicos de restricción por PFGE. Se pudieron detectar un perfil de restricción de 10 aislamientos, un perfil de restricción de cinco aislamientos y tres perfiles de restricción de dos aislamientos cada uno. Los cinco perfiles de restricción agruparon cada uno aislamientos de *C. coli* obtenidos de pollos pertenecientes a un mismo ciclo de crianza.

Desde el punto de vista de los aislamientos de *C. coli* obtenidos a partir de vectores y fómites en los diferentes ciclos de crianza de la granja 2 (Anexo I-F3) se pudo detectar que de 28 aislamientos de *C. coli* analizados, cinco presentaron patrones únicos de restricción y 23 aislamientos se agruparon en seis perfiles de restricción $\geq 95\%$ de similitud. Los perfiles de restricción más representativos agruparon aislamientos provenientes de vectores y fómites, todos aislamientos obtenidos en el ciclo de crianza 4. Solo dos perfiles de restricción de dos aislamientos cada uno agruparon cepas de *C. coli* obtenidas a partir de muestras fómites o vectores en diferentes ciclos de crianza.

Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en muestreo 1 de granja (G2 - 2015) y muestreo 2 de granja (G2 - 2018).

Para completar este análisis se compararon los perfiles de restricción obtenidos para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes entre el primer muestreo en granja del año 2015 y el segundo muestreo en granja del año 2018 (Anexo I-G). Aunque en el análisis se incluyeron la totalidad de aislamientos en granja de *C. jejuni* obtenidos en granja durante el muestreo 2015 y durante el muestreo 2018 solo se encontró un perfil de restricción $\geq 95\%$ de similitud que agrupó nueve aislamientos (Anexo I-G1, perfil F). De estos aislamientos, ocho pertenecieron a muestreos en la granja 2. De manera más específica, un aislamiento tuvo origen en una muestra de pollo del primer muestreo del año 2015, tres aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de pollos del ciclo 1, 2 y 4 muestreados durante el año 2018, dos aislamientos se obtuvieron a partir de muestras de AD larvas (D) en el primer ciclo de crianza del 2018 y una muestra de ave silvestre obtenida del primer ciclo de crianza del 2018. Solo un aislamiento de este perfil no perteneció a la granja 2 y tuvo origen en muestra de ave silvestre en el tercer muestreo de la granja 3 de 2015.

De este análisis ahora para *C. coli* se obtuvieron seis perfil de restricción $\geq 95\%$ de similitud que agruparon aislamientos en granja 2 tanto del año 2015 como del año 2018 (Tabla 16, Anexo I-H1).

Tabla 16. Perfiles de PFGE de *Campylobacter coli* obtenidos en muestreos del año 2015 y 2018

Perfil	Aislamientos (n)	Origen de los aislamientos 2015	Origen de los aislamientos 2018
J	18	Pollos (M2 y M3-G2)	Pollos, CCr, trabajadores, AD larvas (D) y AD adultos (SD) (G2-C4)
A	16	Pollos (M2-G2)	Pollos (G2-C4) AB (G2-C4), moscas con desinfección (G2-C4)
B	5	Aves silvestres (M3-G2)	Trabajadores (G2-C4), AD adultos (G2-C4) y AD larvas (G2-C4)
I	3	Pollo y AD adultos (D) (M3-G2)	CCr (G2-C1)
E	3	Pollos (M2-G2)	Pollo (G2-C4)
K	2	Ave silvestre (M3-G2)	Pollo (G2-C4)

G: granja muestreada
 M: orden de muestreo 2015
 C: ciclo de crianza
 D: muestras con desinfección
 SD: muestras sin desinfección

Se pudo determinar relación clonal entre aislamientos de *C. coli* obtenidos en granja 2 a partir de muestras de pollos en el ciclo de crianza 4 del año 2018 con aislamientos de pollos obtenidos en el segundo muestreo realizado durante el año 2015 (Tabla 16 perfiles A, B y E). También se detectó relación clonal entre vectores y fomites presentes en la misma granja tanto en el año 2015 como en el 2018 (Tabla 16 perfiles C y D). Por último, también se pudo determinar la existencia de los mismos clones de *C. coli* presentes en pollos y en vectores y fómites tanto en 2015 como en 2018 (Tabla 16 perfiles A, B, D y F)

4.3.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

A partir de los resultados de la prevalencia de los genes de virulencia en los aislamientos obtenidos de la totalidad de muestras en granja (Figura 35), se pudo determinar que los tres genes más prevalentes fueron *flaA* y *flhA* (197/197) y *cadF* (192/197). Los tres genes menos prevalentes fueron *virB11* (31/197), *ciaB* (30/197) y *wlaN* (24/197).

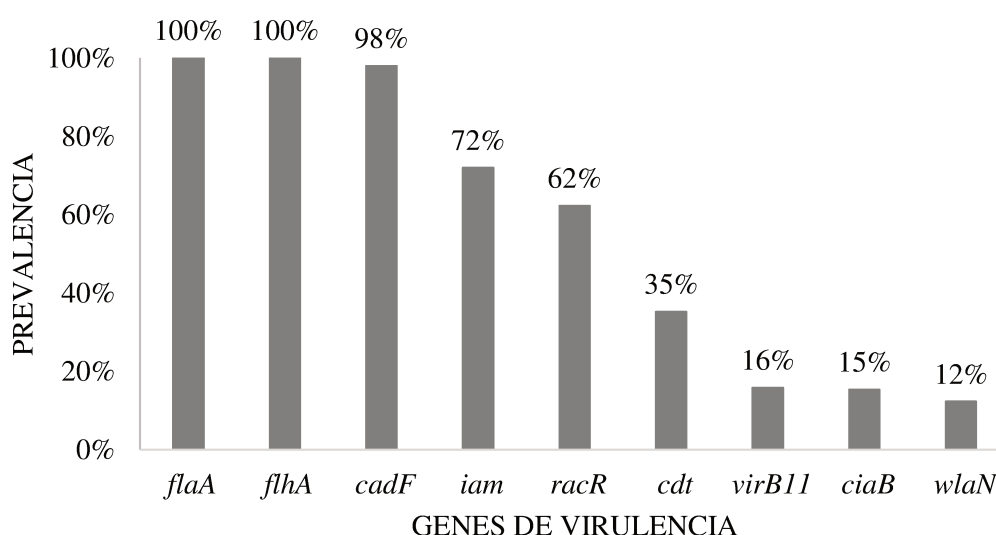


Figura 35. Prevalencia de genes de virulencia en *Campylobacter* termotolerantes aislados en granja 2.

Desde el punto de vista de las especies de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en granja 2 (Figura 36), se pudo observar que tanto para *C. jejuni* (n=106) como para *C. coli* (n=91), los genes de virulencia más prevalentes fueron *flaA*, *flhA* (106/106 y 91/91 para ambos genes, respectivamente) y *cadF* (104/106 y 88/91, respectivamente). Por otro lado, *C. jejuni*, tuvo una prevalencia más elevada que *C. coli* para los genes *racR*, *cdt* y *wlaN*. En cambio, *C. coli* tuvo una mayor prevalencia que *C. jejuni* para los genes *iam*, *virB11* y *ciaB*. Por último, para ambas especies, el gen menos prevalente fue *wlaN* (17/106 y 7/91, respectivamente)

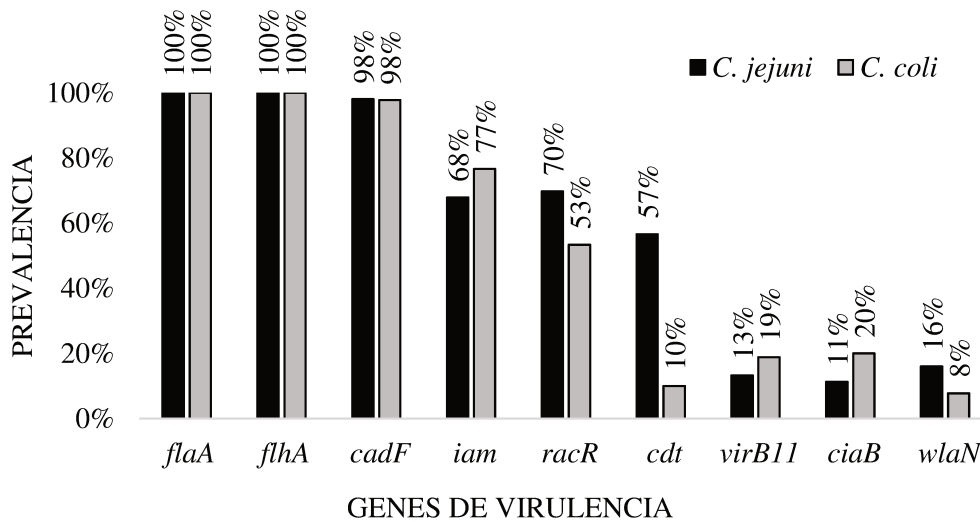


Figura 36. Prevalencia de genes de virulencia en *C. jejuni* y *C. coli* aislados en granja 2.

Del análisis de la presencia de genes de virulencia en aislamientos obtenidos de *Campylobacter* termotolerantes en ciclos consecutivos de crianza en granja 2, se halló que un gran número de aislamientos presentaron al menos tres de los 11 genes de virulencia evaluados. Esto indicó la presencia de cepas que se pueden clasificar como multivirulentas, por lo que se pudo determinar la prevalencia de diferentes perfiles de multivirulencia para *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en ciclos de crianza consecutivos en granja 2 (Tabla 17).

Tabla 17. Perfiles de multivirulencia para aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos en ciclos de crianza consecutivos en granja 2.

	Cantidad de genes de virulencia compartidos	Perfil de virulencia	Genes de virulencia	Prevalencia (%) total
<i>C. jejuni</i>	3	Cj-A	<i>flaA flhA cadF</i>	98 (104/106)
	3	Cj-B	<i>flaA flhA racR</i>	70 (74/106)
	3	Cj-C	<i>flaA flhA iam</i>	68 (72/106)
	4	Cj-D	<i>flaA flhA cadF racR</i>	69 (73/106)
	4	Cj-E	<i>flaA flhA cadF iam</i>	67 (71/106)
	4	Cj-F	<i>flaA flhA cadF cdt</i>	57 (60/106)
	5	Cj-G	<i>flaA flhA cadF iam racR</i>	46 (49/106)
	5	Cj-H	<i>flaA flhA cadF cdt racR</i>	43 (46/106)
	5	Cj-I	<i>flaA flhA cadF cdt iam</i>	40 (42/106)
	6	Cj-J	<i>flaA flhA cadF cdt iam racR</i>	29 (31/106)
	6	Cj-K	<i>flaA flhA cadF cdt wlaN racR</i>	10 (11/106)
	6	Cj-L	<i>flaA flhA cadF iam wlaN racR</i>	9 (10/106)
	7	Cj-M	<i>flaA flhA cadF cdt ciaB iam racR</i>	6 (6/106)

	8	Cj-N	<i>flaA flhA cadF cdt ciaB iam wlaN racR</i>	1 (1/106)
	8	Cj-O	<i>flaA flhA cadF cdt iam wlaN virB11 racR</i>	1 (1/106)
	3	Cc-A	<i>flaA flhA cadF</i>	97 (88/91)
	3	Cc-B	<i>flaA flhA iam</i>	76 (69/91)
	3	Cc-C	<i>flaA flhA racR</i>	53 (48/91)
	4	Cc-D	<i>flaA flhA cadF iam</i>	74 (67/91)
	4	Cc-E	<i>flaA flhA cadF racR</i>	53 (48/91)
<i>C. coli</i>	5	Cc-F	<i>flaA flhA cadF iam racR</i>	38 (35/91)
	5	Cc-G	<i>flaA flhA cadF iam virB11</i>	18 (16/91)
	6	Cc-H	<i>flaA flhA cadF ciaB iam racR</i>	8 (7/91)
	6	Cc-I	<i>flaA flhA cadF cdt iam racR</i>	7 (6/91)
	7	Cc-J	<i>flaA flhA cadF ciaB iam wlaN racR</i>	1 (1/91)
	7	Cc-K	<i>flaA flhA cadF ciaB iam wlaN virB11</i>	1 (1/91)

Lo observado fue que el perfil de multivirulencia más representativo tanto para *C. jejuni* como para *C. coli* fue aquel que agrupó genes relacionados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*) con el gen asociado a la adherencia de las células epiteliales (*cadF*) (Tabla 17, Perfiles Cj-A y Cc-A). Además, se pudo observar que *C. jejuni* y *C. coli* compartieron otros seis perfiles de multivirulencia. Dos de esos perfiles compartidos estuvieron formados por tres genes de virulencia relacionados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*) y adherencia a las células epiteliales (*racR*) (Tabla 17, Perfiles Cj-B y Cc-C) o con genes relacionados a la invasión (*iam*) (Tabla 17, perfiles Cj-C y Cc-B). Otros dos perfiles de multivirulencia compartidos tanto por *C. jejuni* como por *C. coli* agruparon cuatro genes de virulencia asociados con la movilidad de *Campylobacter* termotolerantes (*flaA* y *flhA*), adherencia a las células epiteliales (*cadF*) con genes relacionados a la invasión (*iam*) (Tabla 17, Perfiles Cj-E y Cc-D) o genes relacionados también a la adherencia de *Campylobacter* termotolerantes a las células epiteliales (*racR*) (Tabla 17, Perfiles Cj-D y Cc-E). Otro perfil de multivirulencia en común entre ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes agrupó los cinco genes de virulencia ya mencionados (Tabla 17, Perfiles Cj-G y Cc-F). El último perfil de multivirulencia compartido entre ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes fue aquel que agrupó los genes de virulencia mencionados junto con el *cluster cdtABC* relacionado con la producción de citotoxinas (Tabla 17, Perfiles Cj-J y Cc-I).

Además de las similitudes de los perfiles de multivirulencia para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, se encontraron algunas diferencias. En primer lugar, si bien los perfiles compartidos de tres y cuatro genes en simultáneo agruparon los mismos genes, se mantuvo la tendencia que el perfil que contenía al gen *racR* fue más prevalente para *C. jejuni* que para *C. coli* (Tabla 17). De la misma manera, los perfiles compartidos con tres y cuatro genes de virulencia que contenían al gen *iam* fueron más prevalentes para *C. coli* respecto de *C. jejuni* (Tabla 17). Por otro lado, en los principales perfiles de multivirulencia de más de cuatro genes encontrados para *C. jejuni* se encontró el gen relacionado con la citotoxicidad de *Campylobacter* termotolerantes (*cluster cdtABC*; Tabla 17, Perfiles Cj-F, Cj-H, Cj-I, Cj-J, Cj-K y Cj-M), lo que no ocurrió para *C. coli*. Por último, se encontraron dos perfiles de multivirulencia que agruparon ocho genes y pertenecieron a dos aislamientos de *C. jejuni* (Tabla 17, Perfiles Cj-N y Cj-O).

5- DISCUSIÓN

La campylobacteriosis humana, es la enfermedad zoonótica más reportada mundialmente y es ocasionada por las especies termotolerantes del género *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni* y *C. coli*. Estas especies patogénicas se encuentran dentro de los peligros microbiológicos más relevantes asociados al consumo de carne aviar (CDC, 2017; EFSA, 2018). En Argentina, la producción y consumo de carne de pollo ha ido en incremento durante los últimos años, alcanzando durante el 2019 una faena total de 757 millones de cabezas y un consumo *per cápita* aparente de carne de pollo de 43,3 kg/hab/año (MAGyP, 2020).

Conociendo la presencia de este patógeno en la cadena agroalimentaria, es importante entonces ahondar en el conocimiento sobre la epidemiología del mismo. Resulta necesario comprender los mecanismos por los cuales *Campylobacter* termotolerantes ingresa en la granja y se difunde a lo largo de toda la cadena de producción de carne aviar y persiste en sucesivos ciclos productivos. Estos aspectos epidemiológicos son de suma importancia para lograr magnificar el problema que conlleva la contaminación de los pollos para consumo humano con este patógeno. La información generada podrá ser utilizada posteriormente para sustentar con base en ciencia las medidas de manejo del riesgo tendientes a disminuir la incidencia del mismo.

5-1. *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granja

5.1.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

En primer lugar, el estudio de la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granja de pollos parrilleros demostró, en general, una elevada presencia de este microorganismo en el ambiente de la granja de crianza. En este estudio se pudo detectar inicialmente *Campylobacter* termotolerantes en un gran número de muestras. Sin embargo, luego de aplicar la técnica de cultivo y aislamiento, los valores obtenidos de prevalencia reflejaron un número menor a los resultados de la detección inicial. Así como ocurrió de manera general, también sucedió de manera particular en cada una de las granjas muestreadas. Esto deja en evidencia la subestimación de la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes; lo que lleva a obtener valores de prevalencia por debajo de los reales y podría estar relacionado a la dificultosa tarea de cultivo y el aislamiento de este patógeno (Christidis *et al.*, 2016; Del Collo *et al.*, 2017; Pintar *et al.*, 2017). Por otro lado, la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en las granjas de pollos depende de varios factores entre los que se puede mencionar: estación del año, edad y tamaño de los pollos, tamaño del lote muestreado, dieta y prácticas de cría y esto es lo que podría haber generado diferencias en las prevalencias de las distintas granjas (McDowell *et al.*, 2008; Hermans *et al.*, 2012; Hog *et al.*, 2016). Sin embargo, las tres granjas evaluadas durante el 2015 pertenecían a la misma empresa, con el mismo sistema de crianza, eran atendidas por el mismo Médico Veterinario y fueron muestreadas de manera escalonada, por lo que otros factores podrían ser los que están

influyendo en la presencia de *Campylobacter* termotolerantes. Entre otros factores se pueden mencionar las medidas de bioseguridad en cada una de las granjas: estado del alambrado perimetral del galpón, acceso de personas y vehículos, estado de los galpones de crianza, utilización de indumentaria de trabajo, malezas o chatarra alrededor de los galpones, etc.

La principal especie de *Campylobacter* termotolerantes encontrada en el ambiente de la granja fue *C. jejuni* (Zbrun *et al.*, 2013; Allain *et al.*, 2014; Giombelli y Gloria, 2014; Vidal *et al.*, 2016; Gharbi *et al.*, 2018). Esto se observó también en particular en G1 y G3. En G2, la prevalencia de *C. coli* fue mayor respecto a la de *C. jejuni* y esto coincidió con lo reportado previamente por otros autores (Henry *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014; Vinuesa-Burgos *et al.*, 2017). Estas diferencias en los valores de prevalencias de *C. jejuni* y *C. coli* en las diferentes granjas pueden estar relacionadas a la metodología de aislamiento. Durante la etapa de enriquecimiento selectivo, la utilización de antimicrobianos para disminuir la flora acompañante podría ejercer presión selectiva y en consecuencia, la recuperación de alguna de las especies de *Campylobacter* termotolerantes sobre la otra en determinadas condiciones, por ejemplo, bajo número de células o células dañadas (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2013; Alaboudi *et al.*, 2020). También se hallaron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes que no pudieron ser identificados a nivel de especie como *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* o *C. upsaliensis* (Semaan *et al.*, 2014; Torralbo *et al.*, 2014).

En este estudio también se demostró un incremento en la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes a lo largo de los diferentes muestreos. Este incremento podría estar relacionado con diversos factores. Uno de los factores que se podría mencionar es la metodología utilizada para el aislamiento, debido a que este microorganismo presenta una serie de dificultades en su aislamiento, dentro de las cuales se puede mencionar la preparación de medios selectivos con suplementos, los pasos de enriquecimiento y filtración, la correcta composición de la atmósfera de incubación, etc. (Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012; Ricke *et al.*, 2019). Por lo tanto, a medida que se fue avanzando en los sucesivos muestreos, se pudo haber adquirido una mayor destreza en la detección y en las técnicas de aislamiento que llevó a aumentar el número de *Campylobacter* termotolerantes aislados. Otro factor que se puede mencionar y que se podría relacionar con el aumento en el número de aislamientos es el clima, ya que se conoce de la estacionalidad de *Campylobacter* termotolerantes, presentando picos de incidencia durante el verano (Taylor *et al.*, 2013; Friedrich *et al.*, 2016; Sibanda *et al.*, 2018). Con respecto a esto, el primer muestreo (M1) se realizó durante los meses de otoño, el segundo muestreo (M2) fue durante los meses de invierno y el tercer muestreo (M3) se realizó en primavera. Por lo tanto, el desarrollo de habilidades para el aislamiento, sumado al incremento de *Campylobacter* termotolerantes durante los meses más cálidos, podría explicar la mayor prevalencia de este microorganismo hacia el final de los muestreos. Por otro lado, se pudo determinar el marcado predominio de una de las especies de

Campylobacter termotolerantes sobre otra en cada uno de los muestreos. Esto podría estar evidenciando una alternancia en la especie dominante en diferentes períodos de tiempo debido a alguna ventaja competitiva de una especie sobre la otra en determinado momento (Colles *et al.*, 2015). Una ventaja competitiva podría relacionarse al uso eficiente de nutrientes, sensibilidad a la predación de bacteriófagos o bacteriocinas u otros metabolitos antagonistas que pueden llevar al declive en número de alguna de las especies sobre la otra (El-Shibiny *et al.*, 2007).

Es aceptado que los pollos son los hospedadores naturales para *Campylobacter* termotolerantes y que la colonización de estas aves es el principal factor para la transmisión de este patógeno a los seres humanos (EFSA y ECDC, 2011, Hermans *et al.*, 2012). En este trabajo, los pollos de crianza fueron la principal fuente de aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes en granja. Esto avala el conocimiento previo que demuestra que los pollos son el principal reservorio de este microorganismo y concuerda con la información que indica que una vez que *Campylobacter* termotolerante ingresa en un lote de pollos, se dispersa rápidamente y coloniza el lote completo (Newell *et al.*, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Sibanda *et al.*, 2018). De los aislamientos obtenidos de muestras de pollos de manera global en granja se obtuvo una mayor prevalencia de la especie *C. jejuni* y un bajo porcentaje de aislamientos que no pudieron ser identificados a nivel de especie. En relación a esto, se conoce que las especies de *Campylobacter* termotolerantes relacionadas al sistema digestivo de los pollos son principalmente dos: *C. jejuni* y *C. coli*, de las cuales *C. jejuni* es considerada la especie dominante (Keller y Shriver, 2014; Sibanda *et al.*, 2018). Por otro lado, tal como lo informaron Rossi *et al.* (2009) y Van *et al.* (2016) se pueden encontrar otras especies de *Campylobacter* en pollos como *C. avium* y *C. hepaticus* que no fueron incluidas en este estudio y a las cuales podrían pertenecer aquellos aislamientos que no fueron identificados a nivel de especie. La mayor prevalencia de una de las especies sobre la otra en muestras de pollos podría estar relacionado a un mayor éxito y ventaja competitiva en la colonización del tracto gastrointestinal de pollos en un determinado momento (Colles *et al.*, 2015). Entre los factores que pueden relacionarse a esto se pueden mencionar: el desarrollo del sistema inmune de pollos que afecta la especie dominante (El-Shibiny *et al.*, 2007), el predominio de alguna de las dos especies en el ambiente de la granja en ese momento (Miller *et al.*, 2010) o la utilización de antibióticos en la etapa de crianza de los pollos (Wang *et al.*, 2016). Se conoce que *C. coli* presenta una mejor adaptación y supervivencia a la presión selectiva ejercida por antibióticos y puede explicar el por qué *C. coli* reemplaza a *C. jejuni* como la especie dominante de *Campylobacter* termotolerantes (Wang *et al.*, 2016).

Además de colonizar los pollos, *Campylobacter* termotolerantes puede encontrarse muy diseminado en el ambiente de la granja y suele ser muy difícil la identificación de los reservorios ambientales de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes que luego colonizan el lote de pollos. Es importante poder discernir entre aquellas fuentes de contaminación de *Campylobacter*

termotolerantes en las cuales la colonización de este microorganismo resulta en una amplificación bacteriana y aquellas fuentes de contaminación que actúan como reservorios ambientales o sitios de supervivencia (Newell *et al.*, 2011; Robyn *et al.*, 2015; Sibanda *et al.*, 2018).

Respecto del ambiente de la granja, lo que se encontró en este trabajo y en coincidencia con estudios previos, fue que vectores como aves silvestres e insectos (*Alphitobius diaperinus* y moscas) y fómites como las botas de los trabajadores y la cama de crianza del galpón podrían ser los reservorios de *Campylobacter* termotolerantes que actúan como fuente de contaminación de este microorganismo en pollos (Agabou y Alloui, 2010; Cox *et al.*, 2010; Choo *et al.*, 2011; Keller *et al.*, 2011; Dinev *et al.*, 2013; Agunos *et al.*, 2014; Hald *et al.*, 2015; Royden *et al.*, 2016). La mayor prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en uno u otro vector o fomite particularmente en cada granja podría deberse a que existían entre las granjas diferencias respecto a las condiciones de higiene y estado edilicio de los galpones de crianza (Robyn *et al.*, 2015; Umaraw *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados negativos en las otras posibles fuentes de contaminación estudiadas, no necesariamente reflejan la ausencia de *Campylobacter* termotolerantes en esas matrices de muestra, sino que indica que este microorganismo podría encontrarse en un número por debajo de la sensibilidad de la técnica de aislamiento en dichas muestras (Silva *et al.*, 2011; Schets *et al.*, 2017).

En referencia al hallazgo de *Campylobacter* termotolerantes en muestras de aves silvestres se conoce que son fuentes potenciales de contaminación de los pollos (Sippy *et al.*, 2012; Griekspoor *et al.*, 2013). Estas aves silvestres, debido a sus hábitos de alimentación y proximidad al galpón de crianza, pueden ingresar al mismo (si las condiciones de bioseguridad no son las adecuadas) e incorporar *Campylobacter* termotolerantes. Posteriormente, estas mismas aves silvestres pueden contaminar el ambiente de la granja a través de sus deposiciones (Keller *et al.*, 2011; Newell *et al.*, 2011). Sin embargo, se desconoce si las aves representan una fuente de infección de *Campylobacter* termotolerantes para el lote de pollos o si solo es un hospedador accidental del patógeno siendo desconocido aún cuál es su rol en el ciclo de infección (Hughes *et al.*, 2009). Para el caso de aves silvestres se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos no identificados a nivel de especie. Esto podría darse debido a que las aves silvestres adquieren *Campylobacter* termotolerantes de las mismas fuentes que los pollos, pero se contaminan con aquellas especies adaptadas a su tracto intestinal específico (Hald *et al.*, 2015).

Con respecto a los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos a partir de AD en estadio de larva y adulto, así como también en moscas, se puede mencionar que estos insectos son considerados vectores de *Campylobacter* termotolerantes y actúan como fuentes potenciales de contaminación diseminando este microorganismo en el ambiente del galpón de crianza (Hansson *et al.*, 2010; Vandeplas *et al.*, 2010; Royden *et al.*, 2016; Sibanda *et al.*, 2018). Esto concuerda

con el análisis realizado por Newell *et al.* (2011) quienes sugirieron que estos insectos son portadores de *Campylobacter* termotolerantes e indican que, aunque la temperatura corporal de los insectos no es favorable para el desarrollo de este microorganismo, pueden ser vectores mecánicos y trasladarlo a diferentes sitios. Sin embargo, en este trabajo los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos a partir de estos insectos fueron tanto del exterior como del interior de los mismos, por lo que no solo estarían actuando como vectores mecánicos sino también como vectores biológicos, tal como lo reportado por Choo *et al.* (2011). Sumado a esto, AD adultos y larvas pueden permanecer en el ambiente de la granja por varios ciclos de crianza consecutivos permitiendo así la permanencia del microorganismo (Hazeleger *et al.*, 2008). Para el caso de AD adultos de la cama de crianza se determinó que no habría una especie específica que colonice mayormente este vector. Por ende, esto hace suponer que los insectos podrían actuar como vectores tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* dependiendo de la especie de *Campylobacter* termotolerantes que sea predominante en el galpón de crianza (Rauber Würfel *et al.*, 2019).

Los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos a partir de las muestras de las botas de los trabajadores de la granja demuestran que el tráfico humano en la granja es un vehículo importante de este microorganismo. Las normas de higiene y bioseguridad de los trabajadores, la cantidad de trabajadores que componen el *staff* de trabajo y la cantidad de veces que cada trabajador ingresa en el galpón de crianza son variables que deben tenerse en cuenta (Ramabu *et al.*, 2004; Saleha, 2004).

Por último, a pesar de no haber obtenido aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en la cama de crianza nueva, la cual no es considerada una fuente significativa de contaminación, debido al bajo contenido de humedad, sí se obtuvieron aislamientos en la cama de crianza utilizada en el galpón de crianza. Cuando la cama es utilizada durante la etapa de crianza se humedece con las deposiciones de los pollos y se generan condiciones de pH y humedad que hace que *Campylobacter* termotolerantes se mantenga viable en esas condiciones. De esta manera, la cama reutilizada entre ciclos productivos podría actuar como fuente de infección de *Campylobacter* termotolerantes para los pollos (Kassem *et al.*, 2010; Sahin *et al.*, 2015; Kassem *et al.*, 2017; Rauber Würfel *et al.*, 2019).

En este estudio, aunque no se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras de alimento balanceado, roedores, agua de bebida y animales domésticos cabe resaltar que varias de estas fuentes son consideradas reservorios de este microorganismo por otros autores (Newell *et al.*, 2011; Thakur *et al.*, 2013; Robyn *et al.*, 2015; Battersby *et al.*, 2016). El alimento balanceado fue identificado como un vehículo de transmisión horizontal en el galpón de crianza de pollos, debido a que puede ser contaminado con materia fecal de las aves. Sin embargo, la baja actividad de agua le provee un ambiente hostil para el crecimiento de *Campylobacter*

termotolerantes (Bull *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2017). Por otro lado, la evidencia indica que la presencia de roedores en el ambiente de la granja puede estar fuertemente asociado con la positividad de un lote de pollos a *Campylobacter* termotolerantes (Meerburg y Kijlstra, 2007; McDowell *et al.*, 2008). Para el caso del agua de bebida, considerarla como un vehículo de este microorganismo es controversial. Una de las posibles razones del no aislamiento de este microorganismo podría estar relacionado al proceso de clorinado del agua de bebida que es efectivo contra *Campylobacter* spp. o al estado fisiológico de la bacteria como resultado de una respuesta al estrés. Además, en estudios previos se indicó que el agua de bebida se convierte en un vehículo para *Campylobacter* termotolerantes luego de que el lote de pollos fue infectado con este microorganismo (Newell *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2011; Ellis-Iversen *et al.*, 2012).

5.1.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

En este trabajo se decidió utilizar la técnica de PFGE para evaluar la diversidad genotípica de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes obtenidas en granja. PFGE es una técnica poderosa para análisis epidemiológicos a corto plazo o para un amplio número de cepas (Wassenaar *et al.*, 2000; Ribot *et al.*, 2001). Aunque los protocolos de PFGE se encuentran estandarizados, algunas cepas no muestran patrones de restricción por esta metodología. Esto puede deberse a modificaciones en segmentos del genoma de *Campylobacter* spp. (metilación) que podría inhibir el accionar de las enzimas de restricción utilizadas en la técnica (Wassenaar *et al.*, 2000; Oyarzabal *et al.*, 2008).

Del análisis de los perfiles genéticos de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en pollos y vectores/fomites de las granjas se pudo detectar que tanto para *C. jejuni* como *C. coli* hubo una alta variabilidad genética. La heterogeneidad de *Campylobacter* termotolerantes es un hallazgo común en diversos estudios (Gruntar *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2011; Wiczorek *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2016). Se cree que lo que puede estar influenciando la diversidad genética de *Campylobacter* spp. es la alta tasa de recombinación de ADN y la capacidad de ser un microorganismo naturalmente competente (Wiczorek *et al.*, 2015; Sheppard *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009). Incluso, la recombinación de ADN puede haber ocurrido en el pasaje de *Campylobacter* spp. a través de algún huésped (Perko-Mäkelä, 2011). Por otro lado, el elevado nivel de diversidad hace difícil poder identificar un origen común de contaminación con *Campylobacter* termotolerantes (Denis *et al.*, 2011) por lo que se deduce la existencia de diferentes fuentes de contaminación en el ambiente de la granja (Gruntar *et al.*, 2010) y también hace suponer la existencia de reservorios u hospedadores vectores que aún no se han identificado (Sheppard y Maiden, 2015).

La existencia de relación clonal entre aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos de diferentes orígenes y de muestreos sucesivos dentro de una misma granja refuerza la idea de

que algunos genotipos pueden circular en la granja y persistir durante rotaciones de crianzas sucesivas y reafirman la existencia de varios reservorios y fuentes de contaminación (Gruntar *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2011). Por otro lado, la relación clonal entre aislamientos obtenidos a partir de diferentes muestras, en las diferentes granjas y en sucesivos muestreos podría estar relacionada al hecho de que las granjas pertenecen a la misma compañía y la conexión podría estar dada en el veterinario que atiende las granjas, el origen de los animales o los diferentes insumos de la granja. También podría indicar similares respuestas adaptativas de *Campylobacter* spp. a las mismas presiones ambientales en las diferentes granjas ya que también se suelen aplicar los mismos procedimientos de limpieza y desinfección (Zweifel *et al.*, 2008; Gruntar *et al.*, 2010).

Para el caso de *C. jejuni* la relación clonal entre aislamientos obtenidos de pollo con AD fue reportada previamente por Skov *et al.* (2004). Por otro lado, la asociación de cepas de *C. jejuni* obtenidas de pollos con aves silvestres y botas de los trabajadores fue reportada por Iglesias-Torrens *et al.* (2018) y Messens *et al.* (2009). Todo lo anterior podría estar indicando la posible fuente de contaminación de los pollos en cada una de las granjas muestreadas, aunque la ruta de infección aún permanece desconocida. Los genotipos predominantes, es decir, que agruparon la mayor cantidad de aislamientos, pueden estar relacionados con alguna característica específica del microorganismo que hace que esas cepas sean ventajosas para la colonización o para la transmisión en el ambiente (Perko-Mäkelä, 2011). Sumado a esto, estos genotipos predominantes son persistentes, debido a que se presentaron en sucesivos muestreos.

Para el caso de *C. coli* no se encontró relación clonal entre aislamientos obtenidos de pollos con aislamientos obtenidos a partir de alguno de los reservorios estudiados en dos de las granjas muestreadas. La ausencia de relación clonal entre aislamientos obtenidos de pollos y algún reservorio podría estar indicando la supervivencia de *Campylobacter* termotolerantes en algún otro nicho deferente a los evaluados (Zweifel *et al.*, 2008). Por otro lado, a diferencia de *C. jejuni*, para *C. coli* no se encontraron agrupamientos con cepas de diferentes orígenes, en diferentes granjas o distintos muestreos. Esto hace suponer que las cepas de *C. coli* encontradas pueden presentar alguna desventaja que hace que su supervivencia solo sea temporal en un ciclo productivo (Colles *et al.*, 2015).

Todo lo anterior evidencia que las fuentes de contaminación evaluadas juegan un rol importante en la dispersión y epidemiología de *Campylobacter* spp. transmitiendo el microorganismo a los pollos y al ambiente. También demuestra que las cepas de *Campylobacter* spp. son persistentes y capaces de sobrevivir en distintos huéspedes (Anderson *et al.*, 2012; Wiczorek *et al.*, 2015). Se demostró que *Campylobacter* spp. tiene un elevado potencial de adaptación y que este microorganismo coloniza diferentes huéspedes. En esta transición puede sufrir variaciones genéticas las cuales, además de ser importantes en la supervivencia del microorganismo, son

importantes en la ruta de transmisión (Perko-Mäkelä, 2011). Esto también es soportado por la evidencia de que diferentes cepas de *Campylobacter* termotolerantes que han pasado a través de un huésped animal mostraron mayores tasas de colonización y virulencia, lo que constituye un mecanismo de adaptación que generan subpoblaciones con fenotipos mejorados en la interacción con el huésped y le da acceso a este microorganismo a distintos huéspedes (Sheppard y Maiden, 2015).

5.1.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas

Analizando los resultados de las prevalencias de genes de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en pollos y vectores/fomites de granjas se detectó que los genes relacionados a la movilidad, la adherencia, la invasión y la producción de citotoxinas parecen ser factores esenciales (Andrzejewska *et al.*, 2015). En primer lugar, los genes asociados con la motilidad bacteriana *flaA* y *flhA*, fueron detectados en todas las cepas tal como fue encontrado también por otros autores (Cantero *et al.*, 2018; García-Sánchez *et al.*, 2020) lo que indica que el producto de ambos genes son importantes factores para la colonización de *Campylobacter* spp. y constituyen un mecanismo clave en el desarrollo de la infección. Esto también proporciona evidencia adicional de que los genes flagelares están altamente conservados para *Campylobacter* spp. (Cantero *et al.*, 2018). Se ha reportado previamente que aquellas cepas que presentaron alguna mutación en la secuencia de estos genes fueron incapaces de colonizar la mucosa intestinal tanto de humanos como de pollos (Guerry, 2007). En aislamientos de *C. jejuni* obtenidos de muestras humanas se detectó una alta proporción de estos genes, lo que podría ayudar a explicar por qué *C. jejuni* es más comúnmente hallado como causa de infecciones en humanos (Thakur *et al.*, 2010).

Otro gen altamente prevalente entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes fue *cadF*, en concordancia con las altas prevalencias encontradas por otros autores (Lapierre *et al.*, 2016; Reddy y Zishiri, 2018; García-Sánchez *et al.*, 2020). Esta elevada prevalencia se presentó en ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, tal como fue encontrado por Khoshbakht *et al.* (2013). El gen *cadF* codifica para una proteína de unión a la fibronectina involucrada en el proceso de invasión, influenciando la organización de los microfilamentos en las células del huésped (Khoshbakht *et al.*, 2013; Reddy y Zishiri, 2018). Existen estudios que demuestran que las cepas mutantes negativas a *cadF* no son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal de los pollos, por lo que *cadF* parece ser esencial para esta función y pueden tener presumiblemente un rol similar en la patogénesis del humano (Khoshbakht *et al.*, 2013; Iglesias-Torrens *et al.*, 2018; Melo *et al.*, 2019). Por esto, podemos deducir que la adhesión a las células epiteliales es un

mecanismo clave en el desarrollo de la infección por *Campylobacter* spp. y que además este gen se encuentra altamente conservado (Lapierre *et al.*, 2016; Wieczorek *et al.*, 2018).

Por otro lado, los genes que presentaron las menores prevalencias entre los aislamientos de *Campylobacter* spp. fueron *wlaN* y *virB11*. El gen *wlaN*, a diferencia de lo observado en este trabajo, fue encontrado en alta proporción en los aislamientos reportados por Khoshbakht *et al.* (2013). El producto del gen *wlaN* está relacionado con efectos inmunoreactivos a largo plazo en humanos como el síndrome de Guillain-Barre y Miller-Fischer luego de la infección causada por *Campylobacter* spp. (Khoshbakht *et al.*, 2013; Wieczorek *et al.*, 2018). Este autor atribuye diferencias en las prevalencias del gen *wlaN* a la variación de los aislamientos de diferentes áreas geográficas. Por otro lado, en otros estudios y en concordancia con este trabajo, el gen *wlaN* se detectó con baja frecuencia (Lapierre *et al.*, 2016; Cantero *et al.*, 2018; Wieczorek *et al.*, 2018). Respecto del gen *virB11*, codifica un sistema de secreción que contribuye a la adherencia e invasión de *Campylobacter* spp. en las células intestinales (Wieczorek *et al.*, 2018). La prevalencia de este gen fue muy baja tal como lo han reportado previamente Van Deun *et al.* (2007) y Khoshbakht *et al.* (2013). El gen *virB11* también fue detectado en cepas de *Campylobacter* spp. de origen humano, lo que sugiere el papel de este marcador en la patogénesis de la diarrea y que, al menos algunos de los aislamientos obtenidos en la granja, podrían invadir el intestino humano (González-Hein *et al.*, 2013; Wieczorek *et al.*, 2018).

La virulencia de las especies de *Campylobacter* spp. está también asociada a la producción de citotoxinas. Los tres genes *cdt*, forman un operón policistrónico necesario para la expresión de la citotoxina que es conocida por ser letal para los enterocitos del huésped (Khoshbakht *et al.*, 2013). Se acepta que los genes *cdt* están muy extendidos entre los aislamientos provenientes de aves de corral y humanos (Ripabelli *et al.*, 2010; González-Hein *et al.*, 2013). Se demostró que se requieren las tres subunidades para la actividad de toxina completa (Lindmark *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2016). En este estudio existieron cepas que no presentaron uno o dos de los genes que codifican para alguna de las subunidades, lo que puede sugerir que dichos aislamientos no pueden expresar todo el producto o que los genes de la toxina no se identificaron con los cebadores utilizados en el estudio debido a, por ejemplo, mutaciones puntuales en la región de codificación (Wieczorek *et al.*, 2018). Los mutantes de los genes *cdtABC* han mostrado menor habilidad de adherirse e invadir células epiteliales (Melo *et al.*, 2019).

La prevalencia del gen *iam* fue similar a lo reportado por Andrzejewska *et al.* (2015). Este gen es otro marcador potencialmente asociado con la severidad de la enteritis inducida por *Campylobacter* spp. en humanos ya que es frecuentemente detectado en aislamientos de pacientes pediátricos con diarrea (Rozynek *et al.*, 2005). La adhesión a las células epiteliales podría estar determinada por el producto del gen *racR*, el cual está involucrado en los mecanismos claves en

el desarrollo de la infección por *Campylobacter*, tal como también fue reportado por Wiczorek *et al.* (2018). Se conoce que el gen *racR* también es parte de la respuesta reguladora de *Campylobacter* spp. a cambios en la temperatura y juega un rol importante en la colonización del ciego de pollo (Wysok y Wojtacka, 2018). Por último, el producto del gen *ciaB* (proteína B de invasión de *Campylobacter*) desempeña un papel tanto en la invasividad como en la colonización de las células epiteliales (Ó Cróinín y Backert, 2012; Eucker y Konkel, 2012). El gen *ciaB* ha sido reconocido como un importante factor de virulencia en cepas de *Campylobacter* spp. que conducen a enteritis en humanos (Ghorbanalizadgan *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2017). Cepas mutantes del gen *ciaB* mostraron una reducción significativa en el proceso de internalización (Melo *et al.*, 2019).

Si se evalúan los resultados teniendo en cuenta las especies de los aislamientos obtenidos, las prevalencias más elevadas en la mayoría de los genes de virulencia evaluados para *C. jejuni* respecto de *C. coli* fue reportado previamente por García-Sánchez *et al.* (2020). *C. jejuni* presentó mayor prevalencia para los genes *cdt* que *C. coli*, lo cual podría estar relacionada con la severidad de la enfermedad pudiendo generar una actividad citotóxica mayor (Khoshbakht *et al.*, 2013; García-Sánchez *et al.*, 2020). Se obtuvo también una alta prevalencia del gen *ciaB* principalmente en *C. jejuni*. Dado que los genes *ciaB* son importantes en las etapas iniciales de colonización en humanos, la alta prevalencia de estos marcadores en *C. jejuni* puede sugerir que estas bacterias tienen la habilidad de superar las condiciones de estrés durante el pasaje a través del tracto intestinal y luego inducir la enfermedad (Wiczorek *et al.*, 2018). La mayor prevalencia para el gen *iam* y *virB11* en *C. coli* respecto de *C. jejuni* también fue reportada por Rozynek *et al.* (2005) y Khoshbakht *et al.* (2013). Estas diferencias genéticas, como la presencia o ausencia de un gen, encontradas entre las distintas especies de *Campylobacter* aisladas con diferentes orígenes y diferentes sitios geográficos pueden determinar la habilidad de las especies de infectar determinados huéspedes. (Khoshbakht *et al.*, 2013).

Este estudio reveló la presencia de cepas de *Campylobacter* termotolerantes multivirulentas, es decir, cepas que presentaron al menos tres de todos los genes de virulencia evaluados. Los perfiles de virulencia dominantes encontrados en este estudio incluyen: genes de movilidad (*flaA*, *flhA*), adhesión (*cadF*) y citotoxicidad (*cdt*), los cuales son necesarios para una rápida adaptación y supervivencia en el ambiente y han sido encontrado de manera conservados en el género *Campylobacter*, tal como fue reportado previamente por Melo *et al.* (2019). Estos perfiles de virulencia también fueron hallados a partir de aislamientos de *Campylobacter* spp. obtenidos de muestras humanas, lo que destaca que gran cantidad de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* albergan estos genes pudiendo estar involucradas en la producción de la campylobacteriosis humana (Oh *et al.*, 2017). Los perfiles con la mayor cantidad de genes de virulencia fueron detectados tanto en cepas de *C. jejuni* como de *C. coli*, lo que indica que ambas especies tienen un elevado potencial de

virulencia. Más aún, el hecho de la existencia de una gran variedad de perfiles de virulencia encontrados puede sugerir diferencias en los mecanismos de infección en cada una de las especies de *Campylobacter* termotolerantes en los diferentes sitios de colonización. Sin embargo, también hay perfiles compartidos entre las especies de *Campylobacter* termotolerantes, por lo que también hace suponer la similitud en determinados mecanismos de colonización.

5-2. *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

La contaminación de la carne de pollo y sus productos derivados con *Campylobacter* termotolerantes es considerada la fuente más importante de la campylobacteriosis humana. La contaminación de la carne de pollo ocurre durante el proceso de faena en el matadero (Berrang *et al.*, 2001) y es capaz de sobrevivir a las diferentes etapas de la cadena de producción.

5.2.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

La prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en el proceso de faena de pollos parrilleros se ha estudiado mundialmente. Existen diversos reportes en los cuales el porcentaje de aislamiento de este microorganismo varía según las diferentes etapas del procesamiento (Ivanova *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2020). Los autores atribuyen los distintos valores de prevalencia en las etapas del proceso de faena a las diferencias en las plantas de procesamiento de diferentes países (Hue *et al.*, 2010; Ivanova *et al.*, 2014; Vinueza-Burgos *et al.*, 2017). En general, se ha detectado que la etapa de evisceración de los pollos es la que presenta la mayor prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes (Torralbo *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2020).

En este estudio se pudo determinar, inicialmente, la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en un gran número de muestras obtenidas en planta de faena de pollos parrilleros. Luego de aplicar la técnica de cultivo y aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes los valores obtenidos de prevalencia reflejaron un número menor a los resultados de la detección inicial. Así como ocurrió de manera general en la totalidad de muestras obtenidas en planta de faena, también sucedió de manera particular en cada uno de los lotes de faena muestreados. Esto refleja la subestimación de la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes; lo que lleva a obtener valores de prevalencia por debajo de los reales debido al desafío que implica el cultivo y el aislamiento de este patógeno (Arsenault *et al.*, 2007; Seliwiorstow *et al.*, 2015; Rodger *et al.*, 2017).

Se pudo determinar que, en planta de faena a diferencia de lo que ocurrió en granja, la especie de *Campylobacter* termotolerantes más prevalente fue *C. coli*, coincidiendo con los resultados reportados por otros autores (Torralbo *et al.*, 2015; Rafei *et al.*, 2019; Alaboudi *et al.*, 2020). Este resultado se replicó particularmente en el lote de faena 1 y en el lote de faena 2. Sin embargo, en

el lote de faena 3 fue más prevalente *C. jejuni*, tal como lo reportado por Hue *et al.* (2011). Estos autores atribuyen la diferencia en la prevalencia de especies de *Campylobacter* termotolerantes a distintas capacidades de supervivencia y recuperación de este microorganismo en el ambiente de la planta de faena. Otra posible explicación según otro autor es la concentración de determinados antibióticos en los medios selectivos utilizados en el enriquecimiento de la muestra (Rodgers *et al.*, 2017).

Por otro lado, la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en todas las zonas muestreadas a lo largo del proceso de faena estuvo en coincidencia con lo descrito por Rejab *et al.* (2012). Esto evidenció que *Campylobacter* termotolerantes ingresa en las instalaciones de la planta de faena en el tracto gastrointestinal de pollos y logra difundir y contaminar equipos, líneas de procesamiento y finalmente las carcasas de los pollos. La faena de los pollos es un proceso que comprende varias etapas en las cuales la contaminación cruzada por *Campylobacter* termotolerantes es muy común y casi inevitable (Huat *et al.*, 2010; Rejab *et al.*, 2012; Messad, *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2020).

En la zona de eviscerado, la mayor prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes se detectó en muestras de ciego de pollos. Se conoce a partir de estudios previos que la principal fuente de contaminación por *Campylobacter* termotolerantes de las carcasas de pollos en planta de faena incluye la fuga de contenido fecal de la cloaca debido a la ruptura de los órganos durante el paso de evisceración. Esto, además, puede representar una ruta potencial para contaminación cruzada en las superficies donde se realiza esta tarea y los utensilios utilizados para tal fin (Huat *et al.*, 2010; Trimble *et al.*, 2013; Gruntar *et al.*, 2015; García-Sánchez *et al.*, 2017). Coincidentemente, se pudieron obtener aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las superficies de la zona de eviscerado, operarios de eviscerado y pinzas de eviscerado.

Para el caso de la zona de lavado, no se obtuvieron aislamientos de este microorganismo en las muestras de agua de *chiller* utilizada para el enfriamiento de los pollos. Esto concuerda con lo reportado previamente por Cortez *et al.* (2006). La discrepancia de este dato con los resultados de prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en las etapas inmediatamente posteriores estaría evidenciando que *Campylobacter* termotolerantes sí estaría presente en la etapa de lavado, en el *chiller*. El hecho de que no se haya detectado en esta etapa podría deberse a que *Campylobacter* termotolerantes pueda estar adherido a la carcasa de los pollos confinado a los folículos de la piel luego de la etapa de desplumado (Latt *et al.*, 2017) o que además estaría en presente en el agua de lavado pero en un estado viable pero no cultivable (Bronowski *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). También podría estar relacionado con un bajo nivel de población de este microorganismo en la muestra de agua y la limitación en la sensibilidad de detección del método microbiológico (Ivanova *et al.*, 2014). Sumado a esto, se ha demostrado que el enfriamiento por inmersión con

una temperatura del agua por debajo de 4°C y con agregado de cloro busca el efecto de reducir la concentración de los patógenos en las carcasas de los pollos (Kameyama *et al.*, 2011; Rejab *et al.*, 2012). Sin embargo, la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en superficies inmediatamente posteriores al *chiller* en esta misma zona indicaría que este patógeno es capaz de sobrevivir a dichos factores adversos (Rejab *et al.*, 2012; Ivanova *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2020). Además, el tanque de enfriamiento se considera un sitio potencial para la contaminación cruzada, ya que varias carcasas de pollos se encuentran sumergidas en el mismo contenedor de agua permitiendo que las carcasas que ingresan a dicho tanque libres de bacterias puedan contaminarse en este paso (Rahimi *et al.*, 2010; Trimble *et al.*, 2013; Ivanova *et al.*, 2014).

Por último, en la zona de envasado, la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en los diferentes puntos de muestreo fueron muy similares. Estos resultados, tal como los reportados por Seliwiorstow *et al.* (2015) demuestran que la reducción de *Campylobacter* termotolerantes en el lavado de carcasas logra una reducción en el número de células, pero no logra eliminar completamente la contaminación.

Por otro lado, así como también lo reportó Torralbo *et al.* (2015) se detectó una variación en la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* durante el procesamiento. Sin embargo, a diferencia de Torralbo *et al.* (2015), en este estudio al inicio, en la zona de eviscerado, la especie más prevalente fue *C. coli* y luego del pasaje de las carcasas por el *chiller*, zona de lavado y zona de despacho, la especie más prevalente fue *C. jejuni*. Se ha abordado previamente la respuesta de *Campylobacter* termotolerantes al estrés ambiental, destacando la existencia de muchos mecanismos de supervivencia y en este estudio se evidenciaría que existe una variación en la supervivencia de las especies de *Campylobacter* termotolerantes (Murphy *et al.*, 2006; Hue *et al.*, 2011). Es posible que *C. jejuni* pudiera adaptarse de una manera más exitosa que *C. coli* contra el estrés sufrido debido a las condiciones del proceso de faena y esto podría estar relacionado a diferencias genéticas entre las especies. Con respecto a esto, se ha descrito que *C. jejuni* presenta mayor adherencia en las carcasas de los pollos y en superficies inertes que *C. coli* y se asume que *C. jejuni* tiene mejores capacidades para la formación de biopelículas (Reuter *et al.*, 2010; Hue *et al.*, 2011; Kudirkienė *et al.*, 2011; Torralbo *et al.*, 2015; García-Sánchez *et al.*, 2017).

Por último, en cada lote de faena se detectó que, en la zona de eviscerado, la mayor prevalencia de *C. coli* en esta zona está relacionada con una mayor prevalencia de *C. coli* en los ciegos de pollos, tal como fue reportado por Di Giannatale *et al.* (2010). De la misma manera fue detectada una mayor prevalencia de *C. jejuni* hacia el final de proceso de faena relacionado con una mayor prevalencia de esta especie en carcasas de pollos, tal como fue demostrado por Zbrun *et al.* (2020).

5.2.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

Del análisis de los perfiles genéticos de los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en ciegos, carcasas y fómites en planta de faena de pollos se pudo detectar que tanto para *C. jejuni* como *C. coli* hubo una alta variabilidad genética. La heterogeneidad de *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena es un hallazgo común en diversos estudios (Damjanova *et al.*, 2011; Wiczorek *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Rafei *et al.*, 2019). El elevado nivel de diversidad de *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena puede estar relacionado con la contaminación cruzada de múltiples cepas provenientes de lotes de faena de pollos procesados previo al lote de faena muestreado (Sasaki *et al.*, 2011; Kudirkienė *et al.*, 2011; Garcia-Sanchez *et al.*, 2017). También hace evidente la multiplicidad de fuentes de contaminación de carcasas de pollos durante el procesamiento debido a la supervivencia de *Campylobacter* termotolerantes en superficies y equipamiento en planta de faena (Kudirkienė *et al.*, 2011; Rasschaert *et al.*, 2020).

Para *C. jejuni*, el bajo número de agrupamientos y la elevada cantidad de cepas con patrones únicos de restricción, evidencia una mayor diversidad entre los aislamientos de *C. jejuni* respecto de *C. coli* en planta de faena (Klein *et al.*, 2007; Melero *et al.*, 2012). Aquellos genotipos de *C. jejuni* y *C. coli* que fueron predominantes, es decir, que agruparon la mayor cantidad de aislamientos en cada una de las especies, pueden estar relacionados con alguna característica específica del microorganismo que hace que esas cepas sean ventajosas en la supervivencia y en la difusión a través de la contaminación cruzada en el ambiente de la planta de faena (Han *et al.*, 2016; García-Sánchez *et al.*, 2017).

Para ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes, se determinó la presencia de perfiles de restricción que agrupan aislamientos obtenidos a partir de muestras obtenidas en ciegos de pollos con aislamientos obtenidos de muestras de diferentes fuentes a lo largo del proceso de faena e incluso en muestras de carcasas de pollos listas para la comercialización. Esto demostraría la inevitable y elevada contaminación producida en el proceso de eviscerado de los pollos que hace que *Campylobacter* termotolerantes se disperse en todo el ambiente de la planta de faena (Hue *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2013; Gruntar *et al.*, 2015).

La ausencia de relaciones clonales para aislamientos de *C. jejuni* obtenidos en muestras de carcasas de pollos y la presencia de sólo un agrupamiento para aislamientos de *C. coli* a partir de las mismas muestras demuestra nuevamente la amplia heterogeneidad y confirma la multiplicidad de orígenes de contaminación de carcasas de pollos con *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena (Lindmark *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2016; Rasschaert *et al.*, 2020). Sin embargo, se determinó la presencia de perfiles de restricción idénticos entre aislamientos obtenidos a partir de ciego de pollos con aislamientos obtenidos en carcasas provenientes de diferentes lotes de faena, tal como lo reportado por Han *et al.* (2016). La presencia de varios

genotipos compartidos entre las muestras de ciego y las superficies de las carcasas de los pollos en ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes confirma la alta frecuencia de contaminación fecal en el sacrificio (Han *et al.*, 2016).

La existencia de aislamientos tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* con los mismos perfiles de restricción obtenidos de diferentes orígenes de muestra y muestreos sucesivos indicaría que existe una contaminación residual que hace que el equipamiento y las superficies de trabajo sean una fuente potencial de contaminación cruzada en la planta de faena, incluso luego de aplicar procedimientos de limpieza y desinfección, contaminando también lotes de faenas sucesivos (García-Sánchez *et al.*, 2017; García-Sánchez *et al.*, 2019). La persistencia de *Campylobacter* termotolerantes en el entorno de la planta de procesamiento de pollos ha recibido poca atención; principalmente debido a la creencia generalizada de que *Campylobacter* spp. es extremadamente sensible al ambiente extraintestinal, agravado por las condiciones de estrés (temperatura, atmósfera) dadas en las instalaciones de la planta de faena (García-Sánchez *et al.*, 2017). Como ya fue descrito por Melero *et al.* (2012), algunas cepas cuyos genotipos aparecieron en diferentes lugares de muestreo pueden persistir en el entorno y convertirse en una fuente de contaminación cruzada a lo largo del tiempo. Sin embargo, no está claro en la literatura cuánto tiempo podrían persistir esas cepas en el entorno de procesamiento de los pollos (García-Sánchez *et al.*, 2017). Estos resultados son consistentes con un estudio previo que muestra la existencia de clones de *C. jejuni* y *C. coli* capaces de adaptarse y sobrevivir en las superficies del equipo de la planta de faena después limpieza y desinfección (Iannetti *et al.*, 2020). Además, algunas cepas pueden formar biopelículas *in vitro* y algunas pueden sobrevivir más tiempo y resistir la inactivación por desinfectantes en biopelículas preexistentes formadas por otros microorganismos (Melero *et al.*, 2012; Han, *et al.*, 2016). Sumado a esto, en el paso de evisceración hay condiciones de temperatura más elevada que pueden facilitar la formación de biopelículas (García-Sánchez *et al.*, 2019). La aparición de biopelículas normalmente está relacionada con la acumulación de materia orgánica en la superficie del equipo que protege las bacterias para una limpieza y desinfección eficiente (García-Sánchez *et al.*, 2017).

5.2.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas de pollos y fómites en planta de faena de pollos parrilleros

Analizando los resultados de las prevalencias de genes de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en ciegos, carcasas y fómites en planta de faena se detectó que, al igual de lo que ocurrió en granja, los genes relacionados a la movilidad (*flaA*, *flhA*), la adherencia (*cadF*), la invasión (*iam*) y la producción de citotoxinas (*cdtABC*) parecen ser factores esenciales (Andrzejewska *et al.*, 2015). La presencia de determinados factores de virulencia puede llegar a contribuir a la supervivencia de *Campylobacter* termotolerantes en un ambiente hostil (García-

Sánchez *et al.*, 2019). Más aún, las condiciones de estrés en las cuales se encuentra *Campylobacter* termotolerantes en planta de faena puede aumentar su patogenicidad (Bolton, 2015).

En primer lugar, los genes más prevalentes estuvieron asociados con la motilidad bacteriana *flaA* y *flhA* y a la adherencia a células epiteliales (*cadF*) y están relacionados con mecanismos claves en el desarrollo de la infección por *Campylobacter*, principalmente por ser también los genes más prevalentes en aislamientos obtenidos de personas que padecen campylobacteriosis (Rizal *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016b). Los genes que presentaron las menores prevalencias entre los aislamientos (*wlaN*, *ciaB* y *virB11*) fueron reportados previamente también por Han *et al.* (2019). En cuanto al gen *wlaN*, resultados similares a los de este estudio en cuanto a este gen relacionado con el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré en aquellos pacientes que hayan padecido campylobacteriosis fueron obtenidos por Lapierre *et al.* (2016). Para el caso de *virB11* también fue identificado en otros estudios entre un 7% y un 15% (Bang *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2003). Se sugirió que el producto de este gen puede tener un rol significativo en los casos más severos de campylobacteriosis humana (Tracz *et al.*, 2005). Por otro lado, la alta prevalencia para otros genes también se relacionó en estudios previos con aislamientos en infecciones humanas. Así se determinó para el gen *iam* (Rizal *et al.*, 2010), para el operón *cdt* (Wieczorek *et al.*, 2013; Wieczorek *et al.*, 2018) y para *racR* (Samad *et al.*, 2019).

Si se evalúan los resultados teniendo en cuenta las especies de los aislamientos obtenidos, se determinó que *C. jejuni* tiene prevalencias más elevadas en la mayoría de los genes de virulencia evaluados que *C. coli*, tal como también fue reportado por Zhang *et al.* (2016b). La presencia de estos genes en los aislamientos de *C. jejuni* podría implicar una mayor severidad en el desarrollo de la campylobacteriosis humana causada por este microorganismo (Ramírez *et al.*, 2020). Tal como lo reportado por Andrzejewska *et al.* (2015) *C. coli* presentó mayor prevalencia del gen *iam* y *virB11* que *C. jejuni*, demostrando nuevamente que la prevalencia de determinados genes de virulencia está asociada a la especie de *Campylobacter* termotolerantes. Resultados similares fueron obtenidos también por Tang *et al.* (2020).

Este estudio reveló la presencia en planta de faena de cepas de *Campylobacter* termotolerantes multivirulentas, es decir, cepas que presentaron al menos tres de todos los genes de virulencia evaluados. Los perfiles de virulencia dominantes encontrados en este estudio incluyen: genes de movilidad (*flaA*, *flhA*), adhesión (*cadF*) e invasión (*iam*). Estos perfiles de virulencia también fueron hallados a partir de aislamientos de *Campylobacter* spp. obtenidos de muestras humanas, lo que destaca que gran cantidad de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* albergan estos genes pudiendo estar involucradas en la producción de la campylobacteriosis humana (Oh *et al.*, 2017). El perfil con la mayor cantidad de genes de virulencia fue detectado en una cepa de *C. jejuni* tal como fue

reportado por Han *et al.* (2019). *C. jejuni* presentó una mayor cantidad de genes asociados a la virulencia, lo que hace a esta especie potencialmente más nociva. Más aún, el hecho de la existencia de una gran variedad de perfiles de virulencia encontrados puede sugerir diferencias en los mecanismos de supervivencia, lo que indicaría que *Campylobacter* termotolerantes podría modular su virulencia en respuesta a estímulos ambientales (Mihaljevic *et al.*, 2007). Sin embargo, también hay perfiles compartidos entre las especies de *Campylobacter* termotolerantes, por lo que también hace suponer la similitud en determinados mecanismos de colonización.

5-3. *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

Se conoce que *Campylobacter* spp. puede contaminar el ambiente de la granja de pollos parrilleros y puede persistir durante varios ciclos consecutivos de crianza. Sin embargo, la epidemiología de este microorganismo aún no está completamente descrita. Aún se desconocen los posibles reservorios del ambiente de la granja en los cuales *Campylobacter* termotolerantes puede persistir entre varios ciclos de crianza consecutivos (Shreeve *et al.*, 2002, Zweifel *et al.*, 2008).

5.3.1- Prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

En este trabajo se analizaron las posibles fuentes de contaminación de *Campylobacter* termotolerantes en el ambiente de la granja de crianza de pollos parrilleros. En primer lugar, no se pudieron obtener aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras tomadas durante el período de descanso del galpón de crianza previo al ingreso de los pollos. Esto podría estar relacionado con una baja concentración de *Campylobacter* termotolerantes en las muestras tomadas o que este microorganismo se encuentre en un estado viable pero no cultivable (Kassem *et al.*, 2017; Rauber Würfel *et al.*, 2019). Además, la duración del período de vaciamiento del galpón, es un factor asociado a la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes. Estudios previos sugieren que un período de vaciamiento menor a nueve días está relacionado con un mayor riesgo de colonización de *Campylobacter* termotolerantes (Lyngstad *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2012).

Otra de las cuestiones surgidas en este estudio fue la ausencia de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes en el ciclo 3 de crianza. Según reportes del Médico Veterinario responsable del manejo sanitario de la granja, una semana previa al muestreo, el galpón fue tratado durante 7 días con enrofloxacin, el cual fue utilizado para tratar un cuadro infeccioso que presentaron los pollos del lote y controlar la tasa de mortalidad (Jansen *et al.*, 2016; Troughon y Lefebvre, 2016). Se ha reportado una elevada resistencia de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes a este antimicrobiano y esto podría estar relacionado con su utilización en la producción primaria de

alimentos (Iovine y Blaser *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio, ocurrió lo contrario, el uso de este antimicrobiano en el ciclo de crianza ocasionó que todas las muestras tomadas para el aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes fueran negativas. Una posible explicación a esto podría estar relacionada con la sensibilidad de las cepas a este antimicrobiano, la dosis que fue suministrada o la duración del tratamiento realizado.

En este estudio se detectó que en cada uno de los ciclos muestreados una de las especies de *Campylobacter* termotolerantes fue más prevalente que la otra. Se pudo observar que en el ciclo de crianza 1 y en el ciclo de crianza 2, la especie más prevalente fue *C. jejuni*, mientras que en el ciclo de crianza 4 la especie más prevalente fue *C. coli*. Esto podría estar nuevamente relacionado con la utilización de enrofloxacin durante el ciclo de crianza 3 ya que este antimicrobiano pudo haber actuado como un agente selectivo (Giacomelli *et al.*, 2014). Pudo haber ocurrido que algunas cepas de *C. coli* hayan podido resistir la acción de este antimicrobiano, pudiendo así sobrevivir y colonizar pollos, vectores y fomites en el ciclo de crianza posterior (Delsol *et al.*, 2004). Otra posibilidad es que la interacción de *C. coli* con otro microorganismo de la microbiota o la capacidad de formar biofilm les haya otorgado a determinadas cepas de *C. coli* alguna protección frente a la acción del antimicrobiano permitiéndole así sobrevivir a los efectos de este agente (Indikova *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista del origen de la muestra, en este estudio no se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras de agua y de animales domésticos (perros). Estos resultados son controversiales ya que ambos orígenes de muestras son considerados fuentes de contaminación con *Campylobacter* termotolerantes en granja (Sparks *et al.*, 2009; Ellis-Iversen *et al.*, 2012; Mughini-Gras *et al.*, 2016). Entre los fomites muestreados, tres de ellos se encontraron como fuentes de contaminación en los 3 ciclos de crianza positivos para *Campylobacter* termotolerantes: los trabajadores de la granja, la cama de crianza del galpón y el alimento balanceado. Los trabajadores de la granja, la cama de crianza y el alimento balanceado fueron estudiados previamente como participantes necesarios en la transmisión horizontal de *Campylobacter* termotolerantes en el ambiente de la granja (Cox *et al.*, 2012; Sibanda *et al.*, 2018). Los trabajadores pueden transportar este microorganismo en su vestimenta o en sus botas (Cardinale *et al.*, 2004). *Campylobacter* termotolerantes suele estar ausente en la cama de crianza nueva o el alimento balanceado (Bull *et al.*, 2006; Thakur *et al.*, 2013). Sin embargo, la reutilización de la cama de crianza y la contaminación de los comederos con heces de los pollos pueden ser factores que contribuyan a la aparición de este microorganismo en este tipo de muestras (Kassem *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Rauber Würfel *et al.*, 2019).

De los vectores evaluados, tanto AD larvas con desinfección, como AD adultos sin desinfección (orígenes de muestras con mayor prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes para este vector)

fueron vectores que permitieron el aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes en los tres ciclos muestreados. Varios estudios demostraron la relación existente entre aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos en pollos y AD (Templeton *et al.*, 2006; Hazeleger *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Skov *et al.* (2004) se pudo lograr el aislamiento de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de AD durante la etapa de vaciamiento del galpón de crianza de pollos. AD es considerado un vector que interviene en la difusión y permanencia de *Campylobacter* termotolerantes en el ciclo de producción de pollos parrilleros (Ahmed *et al.*, 2016). Otro vector común en los tres ciclos de crianza muestreados fueron las aves silvestres. Las aves silvestres son otra potencial fuente de contaminación de *Campylobacter* termotolerantes para los pollos. Estos vectores también están relacionados con la difusión y permanencia de *Campylobacter* termotolerantes en el ambiente de la granja de pollos (Newell *et al.*, 2003; Hald *et al.*, 2015). Por último, para el caso de las moscas, los aislamientos sólo se obtuvieron en el ciclo 4 de crianza, entre los cuales *C. coli* fue la especie más prevalente. El último ciclo de crianza muestreado (C4) coincidió con meses cálidos del año, en los cuales este insecto suele encontrarse en mayor cantidad y la posibilidad del ingreso al galpón de crianza puede permitir la transmisión y colonización de *Campylobacter* termotolerantes (Hald *et al.*, 2008; Royden *et al.*, 2016).

5.3.2- Diversidad genotípica de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

Del análisis de los diferentes agrupamientos de cepas de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos a partir de la técnica de PFGE, se pudo detectar que existieron aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes que fueron compartidos en más de un ciclo de crianza. Sin embargo, se compartieron aislamientos entre el ciclo de crianza 1 y el ciclo de crianza 2. Solo un agrupamiento de todos los hallados en este análisis agrupó cepas de *C. coli* obtenidas a partir de muestras de AD adultos (D) tanto en el ciclo de crianza 1 como en el ciclo de crianza 4. Esto es un hallazgo importante, debido a que todos los perfiles de PFGE detectados en el ciclo de crianza 4 fueron perfiles que no habían sido detectados previamente en el ambiente de la granja. Esto podría indicar, continuando con la perspectiva de la aplicación de enrofloxacin como tratamiento en pollos en el ciclo de crianza 3, que este antimicrobiano ejerció una presión selectiva sobre *Campylobacter* termotolerantes, permitiendo así la supervivencia de determinadas cepas que luego fueron halladas en diferentes fuentes de aislamiento en el ciclo de crianza 4.

El hecho de que existan perfiles genéticos que relacionan aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes obtenidos tanto en el ciclo de crianza 1 como en el ciclo de crianza 2, confirmaría que algunos genotipos persisten en el ambiente de la granja durante ciclos de crianza sucesivos en reservorios que todavía no fueron detectados o que permanecen en baja concentración o en estado viable pero no cultivable, lo que dificulta su detección. Estas cepas permanecen latentes

en los reservorios y cuando ingresa el pollo en el galpón de crianza hace que se produzca un crecimiento exponencial de este microorganismo permitiendo así la detección en las diferentes fuentes de contaminación (Zweifel *et al.*, 2008).

5.2.3- Factores de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos

Del análisis de los resultados de las prevalencias de genes de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes en diferentes reservorios en la granja durante varios ciclos de crianza consecutivos se pudo determinar una vez más la importancia de los genes de virulencia relacionados a la movilidad (*flaA* y *flhA*) y la adherencia (*cadF*) de este microorganismo y permite deducir la influencia clave que pueden tener en el desarrollo de la infección por *Campylobacter* spp. (Samad *et al.*, 2019; Wysok *et al.*, 2020). Tal como se pudo determinar en el primer muestreo 2015, en el muestreo 2018 el gen menos prevalente fue *wlaN*, tal como fue reportado también por otros autores (Lapierre *et al.*, 2016; Wysok *et al.*, 2020). Por otro lado, otros dos factores de virulencia presentaron una elevada prevalencia para *Campylobacter* termotolerantes, *iam* y *racR*. Sin embargo, por un lado, el gen *racR* asociado a la colonización del tracto gastrointestinal de los pollos estuvo mayoritariamente presente en aislamientos pertenecientes a la especie *C. jejuni* (Mahmoodipour *et al.*, 2017; Samad *et al.*, 2019) mientras que, por otro lado, el gen *iam*, marcador potencialmente asociado con la severidad de la enteritis inducida por *Campylobacter* spp. en humanos (Rozynek *et al.*, 2005) estuvo mayormente asociado a los aislamientos de *C. coli* (Kalantar *et al.*, 2017).

En términos de especies, para el caso de *C. jejuni* se encontró una mayor prevalencia de los genes relacionados a la producción de citotoxinas (*cluster cdtABC*) respecto de *C. coli*, lo cual podría estar evidenciando una mayor capacidad citotóxica para esta especie (Khoshbakht *et al.*, 2013; García-Sánchez *et al.*, 2020). Los aislamientos obtenidos de ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes presentaron diferencias en el número y combinación de los genes de virulencia, esto podría indicar diferencias en el grado de virulencia entre estas fuentes y puede sugerir diferencias en los mecanismos de infección en cada una de las especies de *Campylobacter* termotolerantes en los diferentes sitios de colonización (Lapierre *et al.*, 2016).

Del análisis de los resultados se evidenció también la presencia de cepas de *Campylobacter* termotolerantes multivirulentas, es decir, cepas que presentaron al menos tres de todos los genes de virulencia evaluados. Existieron perfiles de multivirulencia compartidos entre *C. jejuni* y *C. coli* lo que hace suponer la similitud en determinados mecanismos de colonización. Estos perfiles incluyen genes de movilidad (*flaA* y *flhA*) con genes de adhesión a células epiteliales (*cadF* y *racR*) y genes relacionados con la invasión (*iam*), lo que indica que ambas especies tienen un elevado potencial de virulencia.

6- CONCLUSIONES

Este trabajo reveló que *Campylobacter* termotolerante presenta una elevada prevalencia a lo largo de la cadena de producción aviar. Los resultados de este trabajo demuestran la elevada prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granja de pollos parrilleros y sugieren la presencia de un amplio rango de reservorios como fuente de contaminación de *Campylobacter* termotolerantes en granja. También se evidenció la presencia de vectores y fómites en granja que contribuyen a la persistencia y diseminación de *Campylobacter* termotolerante. Si bien no se pudo demostrar la presencia de *Campylobacter* termotolerantes en los períodos de vaciamiento de la granja de pollos, se demostró la presencia de este microorganismo en diferentes fuentes de contaminación y en ciclos de crianza consecutivos. Adicionalmente, un hallazgo importante fue el efecto del tratamiento con Enrofloxacin en un ciclo de crianza. El uso del antibiótico coincidió con un cambio en la prevalencia y el genotipo de las especies de *Campylobacter* termotolerantes en los ciclos de crianzas previos y posterior al tratamiento.

Se determinó también una elevada prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en la planta de faena de pollos y se pudo evidenciar la existencia de contaminación cruzada en las diferentes etapas del proceso de faena. Se determinó además la contribución de diferentes vectores y fómites en la persistencia y diseminación de diferentes cepas de *Campylobacter* termotolerantes en la planta de faena.

En este estudio se halló una elevada diversidad genotípica entre los aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes, así como también la existencia de una estrecha relación clonal entre cepas de *Campylobacter* termotolerantes obtenidas en diferentes puntos de la cadena de producción aviar. Se evidenció además la persistencia de algunos genotipos de *Campylobacter* termotolerantes durante ciclos de crianzas consecutivos.

Se confirmó además en este trabajo la presencia de aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes con diferentes combinaciones de genes asociados a la virulencia y diversos potenciales patogénicos circulando en la granja y en la planta de faena que podrían ser transmitidas a los productos cárnicos y a los humanos. Además, se hizo evidente la diferencia en la presencia de importantes determinantes de virulencia entre las especies de *Campylobacter* termotolerantes, *C. jejuni* y *C. coli*.

Se deberían diseñar nuevos estudios con el objetivo de detectar las fuentes de contaminación de *Campylobacter* termotolerantes entre los ciclos de crianza y con el objetivo de revelar el efecto del uso de antimicrobianos en la dinámica de la población de *Campylobacter*. La diversidad detectada por PFGE remarca la importancia de llevar a cabo nuevos estudios para intentar comprender la epidemiología de *Campylobacter* termotolerantes en el ambiente de la granja y de la planta de faena. Por último, para entender la patogénesis de *Campylobacter* spp. se deberían conducir otros estudios para poder determinar cómo este microorganismo desarrolla este potencial para establecer la infección

7- BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elaleem, R., Bakr, W. M. K., Hazzah, W. A., & Nasreldin, O.** (2014). Assessment of the personal hygiene and the bacteriological quality of butchers' hands in some abattoirs in Alexandria, Egypt. *Food Control*, 41, 147-150.
- Abu-Ruwaida, A. S., Sawaya, W. N., Dashti, B. H., Murad, M., Al-Othman, H. A.** (1994). Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *J. Food Prot.* 57(10), 887-892.
- Agabou, A., Alloui, N.** (2010). Importance of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) as a reservoir for pathogenic bacteria in Algerian broiler houses. *Vet World*, 3(2), 71.
- Aghwan, Z. A., Bello, A. U., Abubakar, A. A., Imlan, J. C., Sazili, A. Q.** (2016). Efficient halal bleeding, animal handling, and welfare: A holistic approach for meat quality. *Meat Sci.* 121, 420-428.
- Agunos, A., Léger, D., Avery, B. P., Parmley, E. J., Deckert, A., Carson, C. A., Dutil, L.** (2013). Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, western Canada. *Emerging Infect Dis*, 19(7), 1121.
- Agunos, A., Waddell, L., Léger, D., Taboada, E.** (2014). A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. *PLoS One*, 9(8).
- Ahmed, M. F. E. M., El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Kemper, N., Hafez, H. M.** (2016). Prevalence, genotyping and risk factors of thermophilic *Campylobacter* spreading in organic turkey farms in Germany. *Gut pathog.* 8(1), 1-9.
- Ali, M., Kang, G. H., Joo, S. T.** (2008). A review: Influences of pre-slaughter stress on poultry meat quality. *Asian-Australas J Anim Sci.* 21(6), 912-916.
- Alaboudi, A. R., Malkawi, I. M., Osaili, T. M., Abu-Basha, E. A., Guitian, J.** (2020). Prevalence, antibiotic resistance and genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in Irbid governorate, Jordan. *Int. J. Food Microbiol.* 327, 108656.
- Allain, V., Chemaly, M., Laisney, M. J., Rouxel, S., Quesne, S., Le Bouquin, S.** (2014). Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. *Br. Poult. Sci.* 55(4), 452-459.
- Althaus, D., Zweifel, C., Stephan, R.** (2017). Analysis of a poultry slaughter process: influence of process stages on the microbiological contamination of broiler carcasses. *Ital J Food Saf*, 6(4).

- Alves, M. B. R., Fonseca, B. B., Melo, R. T., Mendonça, E. P., Nalevaiko, P. C., Girão, L. C., Rossi, D. A.** (2017). Feed can be a source of *Campylobacter jejuni* infection in broilers. Br. Poult. Sci. 58(1), 46-49.
- Anderson, J., Horn, B. J., Gilpin, B. J.** (2012). The prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in domestic 'backyard' poultry in Canterbury, New Zealand. Zoon Pub health, 59(1), 52-60.
- Andrzejewska, M., Szczepańska, B., Klawe, J. J., Śpica, D., Chudzińska, M.** (2013). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* species in cats and dogs from Bydgoszcz (Poland) region. Pol J Vet Sci, 16(1), 115-120.
- Andrzejewska, M., Szczepańska, B., Śpica, D., Klawe, J. J.** (2015). Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. Food Control, 51, 190-194.
- Ansari-Lari, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., Abdollahi, M., Berizi, E.** (2011). Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. Int J Food Microbiol. 144(3), 475-479.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Normand, V., & Boulianne, M.** (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. Prevent. Vet. Med. 81(4), 250-264.
- Bacon D.J., Alm R.A., Burr D.H., Hu L., Kopecko D.J., Ewing C.P., Trust T.J. Guerry P.** (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. J Infect Immun 68, 4384-4390.
- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., Hald, B.** (2013). Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. Emerg Infect Dis. 19(3), 425.
- Bang, D. D., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., & Madsen, M.** (2003). PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. J. Appl. Mol. 94(6), 1003-1014.
- Barbut, S.** (2014). Automation and meat quality-global challenges. Meat science, 96(1), 335-345.

- Bashor MP, Curtis PA, Keener KM, Sheldon BW, Kathariou S, Osborne JA.** (2004). Effects of carcass washers on *Campylobacter* contamination in large broiler processing plants. *Poult Sci.* 83(7):1232-9
- Battersby, T., Whyte, P., Bolton, D. J.** (2016). The pattern of *Campylobacter* contamination on broiler farms; external and internal sources. *J. Appl. Microbiol.* 120(4), 1108-1118.
- Behringer, M., Miller, W. G., Oyarzabal, O. A.** (2011). Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods*, 84(2), 194-201.
- Berrang, M. E., Buhr, R. J., Cason, J. A., & Dickens, J. A.** (2001). Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *J Food Protect.* 64(12), 2063-2066.
- Blaser, M. J., y Reller, L. B.** (1981). *Campylobacter* enteritis. *N Engl J Med*, 305(24), 1444-1452.
- Blaser, M. J., Smith, P. F., Wang, W. L., & Hoff, J. C.** (1986). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(2), 307-311.
- Bolan, N. S., Szogi, A. A., Chuasavathi, T., Seshadri, B., Rothrock Jr, M. J., Panneerselvam, P.** (2010). Uses and management of poultry litter. *Poult. Sci. J.*, 66(4), 673-698.
- Bolton, F. J., Coates, D.** (1983). Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. *J. Appl. Bacteriol.* 54(1), 115-125.
- Bolton, D. J.** (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol*, 48, 99-108.
- Boysen, L., Nauta, M., & Rosenquist, H.** (2016). *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli* contamination of broiler carcasses across the slaughter line in Danish slaughterhouses. *Microb Risk Anal.* 2, 63-67.
- Bronowski, C., James, C. E., Winstanley, C.** (2014). Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett.* 356(1), 8-19.
- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., Humphrey, T. J.** (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1), 645-652.

- Butzler, J. P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F.** (1973). Related vibrio in stools. *J Pediatrics*, 82(3), 493-495.
- Buzby, J. C., Roberts, T.** (2009). The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterol*, 136(6), 1851-1862.
- Callicott, K. A., Friðriksdóttir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J. R., Gunnarsson, E., Stern, N. J.** (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol*. 72(9), 5794-5798.
- Canet, Z. E., Cantaro, H. L., Almada, N. S., Ruiz Posse, P., & Gange, J. M.** (2018). Faena de aves: guía de buenas prácticas para el uso y construcción del faenador de aves INTA. INTA. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/faena-de-aves>.
- Cantero, G., Correa-Fiz, F., Ronco, T., Strube, M., Cerdà-Cuéllar, M., Pedersen, K.** (2018). Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole-genome sequencing. *Foodborne Pathog Dis*. 15(3), 145-152.
- Carbonero, A., Torralbo, A., Borge, C., García-Bocanegra, I., Arenas, A., Perea, A.** (2012). *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*. 35(6), 505-512.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E. F., Cisse, M., & Salvat, G.** (2004). Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Prev. Vet. Med*. 64(1), 15-25.
- Casabonne, C., Gonzalez, A., Aquili, V., Subils, T., Balague, C.** (2016). Prevalence of seven virulence genes of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with diarrhea in Rosario, Argentina. *Int J Infect*. 3(4), e37727.
- CDC** 2017. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet 2015 Surveillance Report (Final Data). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, **OzFoodNet Working Group**. (2012). Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2010. *Communicable diseases intelligence quarterly report*, 36(3), E213. CDC.
- Cecco, L., González, H., Deluchi, P., Barrios, H., & De Franceschi, M.** (2005). Determinación de los estados de desarrollo de *Alphitobius diaperinus* en granjas avícolas. *Rev. arg. prod. anim*. 25(1-2), 93-99.

- Chinivasagam, H. N., Redding, M., Runge, G., & Blackall, P. J.** (2010). Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. *Br. Poult. Sci.* 51(3), 311-318.
- Choo, L. C., Saleha, A. A., Wai, S. S., Fauziah, N.** (2011). Isolation of *Campylobacter* and *Salmonella* from houseflies (*Musca domestica*) in a university campus and a poultry farm in Selangor, Malaysia. *Trop Biomed.* 28(1), 16-20.
- Chowdhury, S., Themudo, G. E., Sandberg, M., Ersbøll, A. K.** (2013). Spatio-temporal patterns of *Campylobacter* colonization in Danish broilers. *Epidemiol. Infect.* 141(5), 997-1008.
- Christidis, T., Pintar, K. D. M., Butler, A. J., Nesbitt, A., Thomas, M. K., Marshall, B., & Pollari, F.** (2016). *Campylobacter* spp. prevalence and levels in raw milk: a systematic review and meta-analysis. *J. Food Prot.* 79(10), 1775-1783.
- Cohen, E. J., Nakane, D., Kabata, Y., Hendrixson, D. R., Nishizaka, T., Beeby, M.** (2020). *Campylobacter jejuni* motility integrates specialized cell shape, flagellar filament, and motor, to coordinate action of its opposed flagella. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008620>.
- Colgan, T., Lambert, J. R., Newman, A., Luk, S. C.** (1980). *Campylobacter jejuni* enterocolitis. A clinicopathologic study. *Arch Pathol Lab Med.* 104(11), 571-574.
- Colles, F. M., Jones, T. A., McCarthy, N. D., Sheppard, S. K., Cody, A. J., Dingle, K. E., Maiden, M. C.** (2008). *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environ Microbiol.* 10(8), 2042-2050.
- Colles, F. M., McCarthy, N. D., Sheppard, S. K., Layton, R., Maiden, M. C.** (2010). Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *Int J Food Microbiol.* 137(2-3), 259-264.
- Colles, F. M., McCarthy, N. D., Layton, R., Maiden, M. C.** (2011). The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. *PloS one*, 6(12).
- Colles, F. M., McCarthy, N. D., Bliss, C. M., Layton, R., Maiden, M. C.** (2015). The long-term dynamics of *Campylobacter* colonizing a free-range broiler breeder flock: an observational study. *Environ. Microbiol.* 17(4), 938-946.

- Colles, F. M., Preston, S. G., Barfod, K. K., Flammer, P. G., Maiden, M. C., Smith, A. L.** (2019). Parallel sequencing of *porA* reveals a complex pattern of *Campylobacter* genotypes that differs between broiler and broiler breeder chickens. *Sci. Rep.* 9(1), 1-13.
- Connerton, P. L., Richards, P. J., Lafontaine, G. M., O’Kane, P. M., Ghaffar, N., Cummings, N. J., Connerton, I. F.** (2018). The effect of the timing of exposure to *Campylobacter jejuni* on the gut microbiome and inflammatory responses of broiler chickens. *Microbiome*, 6(1), 88.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Cerpentier, J., D’haese, E., Nelis, H. J., Debevere, J.** (2005). Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. *Lett. Appl. Microbiol.* 40(6), 418-423.
- Corry, J. E., Allen, V. M., Hudson, W. R., Breslin, M. F., Davies, R. H.** (2002). Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *J. Appl. Microbiol.* 92(3), 424-432.
- Cortez, A. L., Carvalho, A. C., Scarcelli, E., Miyashiro, S., Vidal-Martins, A., Bürger, K. P.** (2006). Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 48(6), 307-310.
- Costa, D., Iraola, G.** (2019). Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin Microbiol Rev.* 32(4).
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Musgrove, M. T.** (2010). *Campylobacter jejuni* and other *Campylobacters*. *Pathog Tox Foods.* 20-30.
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Maurer, J. J., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., Buhr, R. J., Lammerding, A. M.** (2012). Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *J Food Protect.* 75(10), 1896-1902.
- da Fonseca Batistão, D. W., Fonseca, B. B., Júnior, Á. F., Beletti, M. E.** (2016). Colonization of *Campylobacter jejuni* in Poultry. In *Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry* (pp. 37-58). Springer, Cham.
- Damjanova, I., Jakab, M., Farkas, T., Meszaros, J., Galántai, Z., Turcsányi, I., Kardos, G.** (2011). From farm to fork follow-up of thermotolerant *Campylobacters* throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2-3), 95-102.

- da Silva, D. T., Tejada, T. S., Blum-Menezes, D., Dias, P. A., Timm, C. D.** (2016). *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. *Int J Food Microbiol.* 217, 189-194.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., Groß, U.** (2010). *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol Suppl.* 300(4), 205-211.
- Datta S., Niwa H., Itoh K.** (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol*, 52, 345-348.
- Debruyne L, Gevers D, Vandamme P.** Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin I, Szymanski C, Blaser M, editors. *Campylobacter*. Third Edition. Washington, DC: ASM Press; 2008. pp. 3–25
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., Sternon, J.** (1972). Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis*, 125(4), 390-392.
- Del Collo, L. P., Karns, J. S., Biswas, D., Lombard, J. E., Haley, B. J., Kristensen, R. C., Van Kessel, J. A. S.** (2017). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* spp. in bulk tank milk and milk filters from US dairies. *J. Dairy Sci.* 100(5), 3470-3479.
- Delsol, A. A., Sunderland, J., Woodward, M. J., Pumbwe, L., Piddock, L. J., & Roe, J. M.** (2004). Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(5), 872-874.
- Denis, M., Henrique, E., Chidaine, B., Tircot, A., Bougeard, S., Fravallo, P.** (2011). *Campylobacter* from sows in farrow-to-finish pig farms: risk indicators and genetic diversity. *Vet Microbiol.* 154(1-2), 163-170.
- Devleeschauwer, B., Bouwknegt, M., Mangen, M. J. J., Havelaar, A. H.** (2017). Health and economic burden of *Campylobacter*. In *Campylobacter* (pp. 27-40). Academic Press.
- Di Giannatale, E., Prencipe, V., Colangeli, P., Alessiani, A., Barco, L., Staffolani, M., Migliorati, G.** (2010). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in broiler flocks and broiler carcasses in Italy. *Vet Ital.* 46(4), 405-423.
- Di Giannatale, E., Calistri, P., Di Donato, G., Decastelli, L., Goffredo, E., Adriano, D., Migliorati, G.** (2019). Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken and bovine meat in

- Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. *PLoS One*, 14(12), e0225957.
- Dinev, I.** (2013). The darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*)—a health hazard for broiler chicken production. *Trakia J. Sci.* 11(1), 1-4.
- Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Maiden, M. C. J.** (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 39(1), 14-23.
- Domínguez, I.** (2012). *Alphitobius diaperinus* ¿Un problema bajo control o bajo los comederos? Últimos avances en su control. *Selecciones Avícolas*, 54(5), 23-27.
- EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA J.* 9(4):2105.
- EFSA y ECDC.** (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *EFSA J* 9:2090.
- EFSA y ECDC** (2013). (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA J.* 11(5):3196.
- EFSA.** (2014). EFSA explains zoonotic diseases. *Campylobacter.* 1–2. <https://doi.org/10.2805/59450>
- EFSA y ECDC** (2018) (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J*; 16(12):5500.
- EFSA** (2019) Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicot, D. J., Calistri, P., Depner, K., Miranda Chueca, M. Á. Slaughter of animals: poultry. *EFSA J.* 17(11).
- Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Morris, V., Sowa, A., Harris, J., Atterbury, R., Allen, V.** (2012). Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. *Epidemiol Infect.* 140(5), 916-924.
- El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Connerton, I. F.** (2007). *Campylobacter* succession in broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 125(3-4), 323-332.

- Engvall, E. O., Brändström, B., Gunnarsson, A., Mörner, T., Wahlström, H., Fermer, C.** (2002). Validation of a polymerase chain reaction/restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic *Campylobacters* isolated from domestic and wild animals. *J Appl Microbiol.* 92(1), 47-54.
- Epps, S. V., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., Nisbet, D. J.** (2013). Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10(12), 6292-6304.
- Escherich, T.** (1886). Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (Articles adding to the knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies.). *Munch Med Wochenschr*, 33, 815-817.
- Eucker, T. P., & Konkel, M. E.** (2012). The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell. Microbiol.* 14(2), 226-238.
- Facciolà, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., Laganà, P.** (2017). *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *J. Prev Med Hyg.* 58(2), E79.
- FAO** (2007). Poultry. Meat Processing Toolkit. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-au131e.pdf>
- Fernández, H.** (2011). *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(1), 121-127.
- Fitzgerald, C.** (2015). *Campylobacter*. *Clin Chem Lab Med.* 35(2), 289-298.
- Fonseca, B. B., Soncini, R. A., Gimarães, A. R., Rossi, D. A.** (2006). *Campylobacter* sp in eggs from cloacal swab positive breeder hens. *Braz J Microbiol.* 37(4), 573-575.
- Franchin, P. R., Ogliari, P. J., & Batista, C. R. V.** (2007). Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *Br. Poult. Sci.*, 48(2), 127-132.
- Friedrich, A., Marshall, J. C., Biggs, P. J., Midwinter, A. C., & French, N. P.** (2016). Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human campylobacteriosis in the Manawatu region, New Zealand. *Epidemiol. Infect.* 144(4), 820-828.
- Fuentes, L. S.** (2010). Prevalencia y perfiles de sensibilidad en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de diarreas en Córdoba, Argentina. *Gastroenterol.* 12, 2-5.

- García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Hänninen, M. L., Rossi, M., Rovira, J.** (2017). *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiol.* 65, 185-192.
- García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Rossi, M., Ortega, I., Rovira, J.** (2019). Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. *Food Microbiol.* 83, 193-199.
- García-Sánchez, L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., Canepa, A., Rovira, J.** (2020). Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. *Prev Vet Med*, 176, 104935.
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., De Jonge, R., Denis, M., Federighi, M., Ritz, M.** (2008). Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr. Microbiol.* 56(4), 293-297.
- Gaudreau, C., Rodrigues-Coutlée, S., Pilon, P. A., Coutlée, F., Bekal, S.** (2015). Long-lasting outbreak of erythromycin-and ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* from 2003 to 2013 in men who have sex with men, Quebec, Canada. *Clin Infect Dis.* 61(10), 1549-1552.
- Gharbi, M., Béjaoui, A., Ben Hamda, C., Jouini, A., Ghedira, K., Zrelli, C., ... & Maaroufi, A.** (2018). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in the North of Tunisia. *BioMed research international*, 2018.
- Gharst, G., Oyarzabal, O. A., Hussain, S. K.** (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *J. Microbiol. Methods.* 95(1), 84-92.
- Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Lili, A. K., Najar-Peerayeh, S., Nikmanesh, B.** (2014). A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. *Iran. Biomed. J.* 18(3), 158.
- Ghosh, R., Uppal, B., Aggarwal, P., Chakravarti, A., Jha, A. K., Dubey, A. P.** (2014). A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of *Campylobacter* gastroenteritis in children. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 44(1), 42-48.
- Giacomelli, M., Salata, C., Martini, M., Montesissa, C., Piccirillo, A.** (2014). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb. Drug Resist.* 20(2), 181-188.

- Gibbons, C. L., Mangan, M. J. J., Plass, D., Havelaar, A. H., Brooke, R. J., Kramarz, P., Kretzschmar, M. E.** (2014). Measuring underreporting and under-ascertainment in infectious disease datasets: a comparison of methods. *BMC public health*, 14(1), 147.
- Giombelli, A., Gloria, M. B. A.** (2014). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on broiler chickens from farm to slaughter and efficiency of methods to remove visible fecal contamination. *J. Food Prot.* 77(11), 1851-1859.
- Goering, R. V.** (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* 10(7), 866-875.
- Gözl, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., Alter, T.** (2014). Relevance of *Campylobacter* to public health—the need for a One Health approach. *Int. J. Med. Microbiol.* 304(7), 817-823.
- González-Hein, G., Huaracán, B., García, P., Figueroa, G.** (2013). Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. *Brazilian J. Microbiol.* 44(4), 1223-1229.
- Goossens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van den Borre, C., Butzler, J. P.** (1986). Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium, and a filtration system. *J. Clin. Microbiol.* 24(5), 840-843.
- Griekspoor, P., Engvall, E. O., Olsen, B., Waldenström, J.** (2010). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet. Microbiol.* 140(1-2), 180-185.
- Griekspoor, P., Colles, F. M., McCarthy, N. D., Hansbro, P. M., Ashhurst-Smith, C., Olsen, B., Waldenström, J.** (2013). Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. *Mol. Ecol.* 22(5), 1463-1472.
- Gruntar, I., Ocepek, M., Avberšek, J., Mićunović, J., Pate, M.** (2010). A pulsed-field gel electrophoresis study of the genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry flocks in Slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(1), 19-28.
- Gruntar, I., Biasizzo, M., Kušar, D., Pate, M., Ocepek, M.** (2015). *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiol.* 50, 97-101.
- Guerry, P.** (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 15(10), 456-461.

- Guerin, M. T., Sir, C., Sargeant, J. M., Waddell, L., O'connor, A. M., Wills, R. W., Byrd, J. A.** (2010). The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: a systematic review. *Poult. Sci.* 89(5), 1070-1084.
- Guirin, G. F., Brusa, V., Adriani, C. D., Leotta, G. A.** (2020). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broilers at conventional and kosher abattoirs and retail stores. *Rev. Argent. Microbiol.* 52(3), 217-220.
- Hald, B., Skovgård, H., Bang, D. D., Pedersen, K., Dybdahl, J., Jespersen, J. B., Madsen, M.** (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg. Infect. Dis.* 10(8), 1490.
- Hald, B., Skovgård, H., Pedersen, K., & Bunkenborg, H.** (2008). Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. *Poultry Sci.* 87(7), 1428-1434.
- Hald, B., Skov, M. N., Nielsen, E. M., Rahbek, C., Madsen, J. J., Wainø, M., Madsen, M.** (2015). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. *Acta Vet. Scand.*, 58(1), 11.
- Han, X., Zhu, D., Lai, H., Zeng, H., Zhou, K., Zou, L., Liu, S.** (2016). Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. *Food Control*, 69, 160-170.
- Han, X., Guan, X., Zeng, H., Li, J., Huang, X., Wen, Y., Zou, L.** (2019). Prevalence, antimicrobial resistance profiles and virulence-associated genes of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from ducks in a Chinese slaughterhouse. *Food control*, 104, 157-166.
- Hänel, I., Borrmann, E., Müller, J., Müller, W., Pauly, B., Liebler-Tenorio, E. M., & Schulze, F.** (2009). Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut. *Vet. Microbiol.*, 136(1-2), 121-129.
- Hanninen, M.L.** (2010). *Campylobacter* in poultry processing. In: *Handbook of poultry science and technology*. John Wiley and Sons, Inc.: 495-506.
- Hansson, I., Engvall, E. O., Vågsholm, I., Nyman, A.** (2010). Risk factors associated with the presence of *Campylobacter*-positive broiler flocks in Sweden. *Prev Vet Med*, 96(1-2), 114-121.

- Hansson, I., Pudas, N., Harbom, B., & Engvall, E. O.** (2010). Within-flock variations of *Campylobacter* loads in caeca and on carcasses from broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 141(1-2), 51-55.
- Havelaar, A. H., Ivarsson, S., Löfdahl, M., & Nauta, M. J.** (2013). Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.* 141(2), 293-302
- Hazeleger, W. C., Bolder, N. M., Beumer, R. R., & Jacobs-Reitsma, W. F.** (2008). 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.* 74(22), 6887-6891.
- He, Y., Reed, S., Bhunia, A. K., Gehring, A., Nguyen, L. H., Irwin, P. L.** (2015). Rapid identification and classification of *Campylobacter* spp. using laser optical scattering technology. *Food Microbiol.* 47, 28-35.
- Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., Lepo, J. E.** (2011). Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters. *J Water Health.* 9(4), 695-707.
- Henry, I., Reichardt, J., Denis, M., & Cardinale, E.** (2011). Prevalence and risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean). *Prev. Vet. Med.* 100(1), 64-70.
- Herman, L., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Vandekerchove, D., Rollier, I., De Zutter, L.** (2003). Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.* 131(3), 1169-1180.
- Hermans, D., Martel, A., Van Deun, K., Verlinden, M., Van Immerseel, F., Garmyn, A., Pasmans, F.** (2010). Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poult. Sci.* 89(6), 1144-1155.
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Pasmans, F.** (2011a). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet Res.* 42(1), 1-14.
- Hermans, D., Van Deun, K., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Pasmans, F.** (2011b). *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures

ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol*, 152(3-4), 219-228.

Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Haesebrouck, F. (2012). Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(2), 89-98.

Hickey T.E., McVeigh A.L., Scott D.A., Michielutti R.E., Bixby A., Carroll S.A., Bourgeois A.L., Guerry P. (2000). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 68, 6535-6541.

Høg, B. B., Sommer, H. M., Larsen, L. S., Sørensen, A. I. V., David, B., Hofshagen, M., & Rosenquist, H. (2016). Farm specific risk factors for *Campylobacter* colonisation in Danish and Norwegian broilers. *Prev. Vet. Med.* 130, 137-145.

Holmberg, M., Rosendal, T., Engvall, E. O., Ohlson, A., Lindberg, A. (2015). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 19.

Huat, J. T. Y., Aziz, S. A., Abu, J., Ghazali, F. M., Chitek, T. Z. T., Ahmad, N., Radu, S. (2010). Thermophilic *Campylobacter* spp. occurrence on chickens at farm, slaughter house and retail. *Int. J. Poult. Sci*, 9(2), 13.

Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M. J., Allain, V., Lalande, F., Petetin, I., Santolini, J. (2010). Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiol.* 27(8), 992-999.

Hue, O., Allain, V., Laisney, M. J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., Santolini, J. (2011). *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol.* 28(5), 862-868.

Huerta, V. G., González, P. A., Contreras Funes, V. P., Barcudi, D., Dichiara, D. M., Cortes, P. R. (2013). Etiología de la diarrea bacteriana aguda en pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba. *Boletín Colegio de Bioquímicos de Córdoba* (fecha de acceso: 22 de mayo de 2020). Disponible en: <http://cobico.com.ar/wp-content/archivos/2014/02/Dra.-Huerta-VERSION-FINAL-corregido-noviembre-2013-febrero.pdf>

Hughes, L. A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T. R., Jones, R. C., Williams, N. J. (2009). Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10), 3007-3015.

- Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K., Davidson, N., Williams, N., Kipar, A., ... & Wigley, P.** (2014). *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio*, 5(4).
- Iannetti, S., Calistri, P., Di Serafino, G., Marotta, F., Alessiani, A., Antoci, S., Migliorati, G.** (2020). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: prevalence, contamination levels, genetic diversity and antibiotic resistance in Italy. *Veterinaria Italiana*, 56(1).
- Iglesias-Torrens, Y., Miró, E., Guirado, P., Llovet, T., Muñoz, C., Cerdà-Cuéllar, M., Navarro, F.** (2018). Population structure, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: Gastroenteritis patients, broilers, and wild birds. *Front. Microbiol.* 9, 1676.
- Ikeda, N., Karlyshev, A. V.** (2012). Putative mechanisms and biological role of coccoid form formation in *Campylobacter coli*. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2(1), 41-49.
- Indikova, I., Humphrey, T. J., & Hilbert, F.** (2015). Survival with a helping hand: *Campylobacter* and microbiota. *Frontiers in microbiology*, 6, 1266.
- International Organization for Standardization (ISO).** (2006). ISO 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.
- Iovine, N. M., Blaser, M. J.** (2004). Antibiotics in animal feed and spread of resistant *Campylobacter* from poultry to humans. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1158.
- Iovine, N M.** (2013) Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*, *Virulence*, 4:3, 230-240.
- Ivanova, M., Singh, R., Dharmasena, M., Gong, C., Krastanov, A., Jiang, X.** (2014). Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. *Poult. Sci.* 93(6), 1587-1597.
- James, C., Vincent, C., de Andrade Lima, T. I., & James, S. J.** (2006). The primary chilling of poultry carcasses—a review. *Int J Refrig.* 29(6), 847-862.
- Janež, N., Loc-Carrillo, C.** (2013). Use of phages to control *Campylobacter* spp. *J. Microbiol. Methods* 95(1), 68-75.
- Janssen, R., Krogfelt, K. A., Cawthraw, S. A., van Pelt, W., Wagenaar, J. A., Owen, R. J.** (2008). Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3), 505-518.

- Jansen, L. J., Bolck, Y. J., & Berendsen, B. J.** (2016). Feather segmentation to discriminate between different enrofloxacin treatments in order to monitor off-label use in the poultry sector. *Anal. Bioanal. Chem. Res.* 408(2), 495-502.
- Jekayinfa, S. O.** (2007). Energetic analysis of poultry processing operations. *Leonardo J Sci*, 10(1), 77-92.
- Jokinen, C. C., Koot, J. M., Carrillo, C. D., Gannon, V. P., Jardine, C. M., Mutschall, S. K., Taboada, E. N.** (2012). An enhanced technique combining pre-enrichment and passive filtration increases the isolation efficiency of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from water and animal fecal samples. *J. Microbiol. Meth.* 91(3), 506-513.
- Jonsson, M. E., Chriél, M., Norström, M., Hofshagen, M.** (2012). Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonisation in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med*, 107(1-2), 95-104.
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B. T., Borck, B., Ethelberg, S., Engvall, E. O.** (2010). Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. *Prev Vet Med*, 93(1), 33-41.
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., Man, S. M.** (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28(3), 687-720.
- Kalantar, M., Soltan Dallal, M. M., Fallah, F., Yektaie, F.** (2017). Monitoring the virulence genes in *Campylobacter coli* strains isolated from chicken meat in Tehran, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 3(1), 12-15.
- Kameyama, M., Chuma, T., Nishimoto, T., Oniki, H., Yanagitani, Y., Kanetou, R., ... & Okamoto, K.** (2011). Effect of cooled and chlorinated chiller water on *Campylobacter* and coliform counts on broiler carcasses during chilling at a middle-size poultry processing plant. *J. Vet. Med. Sci.* 1108300621-1108300621.
- Kassem, I. I., Sanad, Y., Gangaiah, D., Lilburn, M., Lejeune, J., & Rajashekara, G.** (2010). Use of bioluminescence imaging to monitor *Campylobacter* survival in chicken litter. *J. appl. Microbiol.* 109(6), 1988-1997.
- Kassem, I. I., Helmy, Y. A., Kathayat, D., Candelero-Rueda, R. A., Kumar, A., Deblais, L., Rajashekara, G.** (2017). Nonculturability might underestimate the occurrence of *Campylobacter* in broiler litter. *Foodborne pathogens and disease*, 14(8), 472-477.

- Keener, K. M., Bashor, M. P., Curtis, P. A., Sheldon, B. W., Kathariou, S.** (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 3(2), 105-116.
- Keithlin, J., Sargeant, J., Thomas, M. K., Fazil, A.** (2014). Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health*, 14(1), 1-19.
- Keller, J. I., Shriver, W. G., Waldenström, J., Griekspoor, P., & Olsen, B.** (2011). Prevalence of *Campylobacter* in wild birds of the mid-Atlantic region, USA. *J. Wildl. Dis.* 47(3), 750-754.
- Keller, J. I., Shriver, W. G.** (2014). Prevalence of three *Campylobacter* species, *C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*, using multilocus sequence typing in wild birds of the Mid-Atlantic region, USA. *J. Wildl. Dis.* 50(1), 31-41.
- Kemp, G. K., Aldrich, M. L., Waldroup, A. L.** (2000). Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. *J Food Protect.* 63(8), 1087-1092.
- Khan, J. A., Rathore, R. S., Abulreesh, H. H., Qais, F. A., Ahmad, I.** (2018). Cultural and Immunological methods for the Detection of *Campylobacter jejuni*: A Review. *Indian J. Biotech. Pharm. Res.* 6(3), 4– 10.
- Khanna, M. R., Bhavsar, S. P., & Kapadnis, B. P.** (2006). Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(1), 84-90.
- Khoshbakht, R., Tabatabaei, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., Aski, H. S.** (2013). Distribution of nine virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from broiler feces in Shiraz, Southern Iran. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(9), 764-770.
- King, E. O.** (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.* 119-128.
- Klančnik, A., Zorman, T., Smole Možina, S.** (2008). Effects of low temperature, starvation and oxidative stress on the physiology of *Campylobacter jejuni* cells. *Croat. Chem. Acta*, 81(1), 41-46.
- Klančnik, A., D. Vučković, P. Jamnik, M. Abram, and S.S. Možina.** (2014). Stress response and virulence of heat-stressed *Campylobacter jejuni*. *Microbes Environ.* 29:338–345

- Klein, G., Beckmann, L., Vollmer, H. M., & Bartelt, E.** (2007). Predominant strains of thermophilic *Campylobacter* spp. in a German poultry slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.* 117(3), 324-328.
- Konkel, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Garvis, S.G. Yoon, J.** (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.* 37(3), 510-517.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D.** (2015). Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(5), 424-432.
- Korolik, V., Alderton, M. R., Smith, S. C., Chang, J., Coloe, P. J.** (1998). Isolation and molecular analysis of colonising and non-colonising strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* following experimental infection of young chickens. *Vet. Microbiol.*, 60(2-4), 239-249.
- Korsak D., Dzierżanowska-Fangrat K., Popowski J., Rożynek E.** (2004). Prevalence of potential virulence markers *iam* in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from chicken carcasses. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 55, 307–312.
- Krause, U., Thomson-Carter, F. M., Pennington, T. H.** (1996). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J. Clin. Microbiol.*, 34(4), 959-961.
- Kudirkienė, E., Bunevičienė, J., Brøndsted, L., Ingmer, H., Olsen, J. E., Malakauskas, M.** (2011). Evidence of broiler meat contamination with post-disinfection strains of *Campylobacter jejuni* from slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.* 145, S116-S120.
- Lai, C. K., Chen, Y. A., Lin, C. J., Lin, H. J., Kao, M. C., Huang, M. Z., Lai, C. H.** (2016). Molecular mechanisms and potential clinical applications of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 9.
- Lake, R. J., Cressey, P. J., Campbell, D. M., Oakley, E.** (2010). Risk ranking for foodborne microbial hazards in New Zealand: burden of disease estimates. *Risk Anal.* 30(5), 743-752.
- Lapierre, L.** (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. *Av. cienc. vet.* 28(1).
- Lapierre, L., Gatica, M. A., Riquelme, V., Vergara, C., Yañez, J. M., San Martín, B., Flores, R.** (2016). Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and

Campylobacter coli isolates from animals, meat, and humans. *Microb. Drug Resist.* 22(5), 432-444.

Latt, K. M., Urata, A., Shinki, T., Sasaki, S., Taniguchi, T., & Misawa, N. (2017). Effect of morphological changes in feather follicles of chicken carcasses after defeathering and chilling on the degree of skin contamination by *Campylobacter* species. *J. Vet. Med. Sci.* 17-0534.

Lauwers, S., Penner, J. L. (2018). Serotyping *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* en Butzler J.P., *Campylobacter* infection in Man and Animals, 51-58.

Lawes, J. R., Vidal, A., Clifton-Hadley, F. A., Sayers, R., Rodgers, J., Snow, L., ... Powell, L. F. (2012). Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks at slaughter: results from a UK survey. *Epidemiol. Infect.* 140(10), 1725-1737.

Lee, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Kim, S., Lee, H., Choi, K. H. (2016). Clinical relevance of infections with zoonotic and human oral species of *Campylobacter*. *J. Microbiol.* 54(7), 459-467.

Lehtola, M. J., Pitkänen, T., Miebach, L., Miettinen, I. T. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Science and Technology*, 54(3), 57-61.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258.

Lim, S. K., Moon, D. C., Chae, M. H., Kim, H. J., Nam, H. M., Kim, S. R., Lee, H. S. (2016). Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and carcasses. *J. Vet. Medic. Sci.* 16-0307.

Lindmark, H., Diedrich, C., Andersson, L., Lindqvist, R., Engvall, E. O. (2006). Distribution of *Campylobacter* genotypes on broilers during slaughter. *J. Food Protect.* 69(12), 2902-2907.

Lindmark, B., Rompikuntal, P. K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., Wai, S. N. (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 9(1), 1-10.

Linton, D., Owen, R.J. Stanley, J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.* 147: 707-718.

- Llarena, A.K., Taboada, E., Rossi, M.** (2017). Whole-Genome Sequencing in Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections. *J Clin Microbiol.*; 55(5):1269–75.
- Lyngstad, T. M., Jonsson, M. E., Hofshagen, M., & Heier, B. T.** (2008). Risk factors associated with the presence of *Campylobacter* species in Norwegian broiler flocks. *Poultry Sci.* 87(10), 1987-1994.
- Ma, L., Wang, Y., Shen, J., Zhang, Q., Wu, C.** (2014). Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *Int. J. Food Microbiol.*, 181, 77-84.
- Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., Rożynek, E.** (2012). Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, 23(2), 297-301.
- MAGyP** (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2020. Boletín Avícola-Anuario 2019. Disponible en: [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos//000082_Nro%2082%20Abril%202020%20\(Anuario%202019\).pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos//000082_Nro%2082%20Abril%202020%20(Anuario%202019).pdf)
- Mahmoodipour, H., Baserisalehi, M., Emami, A.** (2017). Molecular detection of virulence genes involved in adherence, colonization, invasion and cytotoxin production in *campylobacter jejuni* and *campylobacter coli* isolated from poultry, cow and sheep faeces. *Acta Medica Mediterranea*, 33, 763.
- Maiden, M. C., Dingle, K. E.** (2008). Population biology of *Campylobacter jejuni* and related organisms. In *Campylobacter*, Third Edition (pp. 27-40). American Society of Microbiology.
- Malher, X., Simon, M., Charnay, V., Des Déserts, R. D., Lehébel, A., Belloc, C.** (2011). Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 150(1), 8-13.
- Man, S. M.** (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(12), 669-685.
- Mangen, M. J. J., Bouwknegt, M., Friesema, I. H., Haagsma, J. A., Kortbeek, L. M., Tariq, L., Havelaar, A. H.** (2015). Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *Int. J. Food Microbiol.* 196, 84-93.
- Mardones, G., López, J.** (2017). Implicancias de *Campylobacter* spp. como patógeno alimentario. *Chilean journal of agricultural animal sciences*, 33(1), 73-83.

- Martins, S. B., Rushton, J., Stärk, K. D. C.** (2017). Economics of zoonoses surveillance in a 'One Health' context: an assessment of *Campylobacter* surveillance in Switzerland. *Epidemiol. Infect.* 145(6), 1148-1158.
- Mawlood, M. H., Khidhir, Z. K.** (2018). Effect of slaughtering in different slaughter houses on some traits of broiler chicken meat during different storage periods under refrigeration and freezing. *J. of Kirkuk Univ. for Agri. Sci.* 9(4), 1-9.
- McDowell, S. W. J., Menzies, F. D., McBride, S. H., Oza, A. N., McKenna, J. P., Gordon, A. W., Neill, S. D.** (2008). *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. *Prev Vet Med*, 84(3-4), 261-276.
- McFadyean, J., Stockman, S.** (1913). Abortion in sheep: Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to enquire into epizootic abortion. Technical Report Appendix Part II, 64 pp., His Majesty's Stationary Office, London.
- Meerburg, B. G., Kijlstra, A.** (2007). Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *J Sci. Food Agricul.* 87(15), 2774-2781.
- Meerburg, B. G.** (2010). Rodents are a risk factor for the spreading of pathogens on farms. *Vet Microbiol*, 142(3-4), 464-465.
- Meerburg B., Schoelitz B.** (2018). Biosecurity: methods to reduce contact risks between vectors and livestock. In: Garros C, JBouyer J, Takken W and Smallegange R (eds.). *Pests and vector-borne diseases in the livestock industry*. Wageningen Academic Publishers, Netherlands. pp. 453-464
- Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M. L., Jaime, I., Rovira, J.** (2012). Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol.* 32(1), 124-128.
- Melo, R. T., Nalevaiko, P. C., Mendonça, E. P., Borges, L. W., Fonseca, B. B., Beletti, M. E., Rossi, D. A.** (2013). *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. *Food Control*, 33(1), 227-231.
- Melo, R. T., Grazziotin, A. L., Júnior, E. C. V., Prado, R. R., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Rossi, D. A.** (2019). Evolution of *Campylobacter jejuni* of poultry origin in Brazil. *Food Microbiol.* 82, 489-496.

- Messad, S., Hamdi, T. M., Bouhamed, R., Ramdani-Bouguessa, N., Tazir, M.** (2014). Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. *Food control*, 40, 324-328.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L., & Heyndrickx, M.** (2009). Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.* 138(1-2), 120-131.
- Messens, W., Gittins, J., Leleu, S., Sparks, N.** (2011). Egg decontamination by washing. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products* (pp. 163-180). Woodhead Publishing.
- Mihaljevic, R. R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S. S., & Abram, M.** (2007). Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathogen.* 43(2-3), 120-125.
- Miller, R. S., Miller, W. G., Behringer, M., Hariharan, H., Matthew, V., Oyarzabal, O. A.** (2010). DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *J. Appl. Microbiol.* 108(3), 1041-1049.
- Milios, K. T., Drosinos, E. H., Zoiopoulos, P. E.** (2014). Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria—A review. *Food Control*, 43, 74-81.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Dory, D., Chemaly, M.** (2016). Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J. Appl. Microbiol.* 120(5), 1139-1173.
- Ministerio de salud. Presidencia de la Nación Argentina.** 2014. Boletín Integrado de Vigilancia Nro 205.
- Moore, J., Caldwell, P., Millar, B.** (2001). Molecular detection of *Campylobacter* spp. in drinking, recreational and environmental water supplies. *International journal of hygiene and environmental health*, 204(2-3), 185-189.
- Mughini-Gras, L., Penny, C., Ragimbeau, C., Schets, F. M., Blaak, H., Duim, B., ... & Van Pelt, W.** (2016). Quantifying potential sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Water Res.* 101, 36-45.

- Müller, J., Schulze, F., Müller, W., Hänel, I.** (2006). PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol.* 113: 123-129.
- Murphy, C., Carroll, C., & Jordan, K. N.** (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.*, 100(4), 623-632.
- Natsos, G., Mouttotou, N. K., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A., Koutoulis, K. C.** (2019). The genus *Campylobacter*: detection and isolation methods, species identification typing techniques. *J Hellenic Vet Med Soc*, 70(1), 1327-1338.
- Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H., & Angulo, F. J.** (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin. Infect. Dis* 44(7), 977-980.
- Newell, D. G., Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Domingue, G., Bull, S., Humphrey, T., Mead, G.** (2001). Changes in the Carriage of *Campylobacter* Strains by Poultry Carcasses during Processing in Abattoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6), 2636-2640.
- Newell, D. G., Fearnley, C.** (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(8), 4343-4351.
- Newell, D. G., Elvers, K. T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Pearson, D.** (2011). Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(24), 8605-8614.
- NNDSS, A. R. W. G.** (2019). Australia's notifiable disease status, 2015: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Communicable diseases intelligence quarterly report*, 43(1), doi: 10.33321/cdi.2019.43.6.
- Noormohamed, A., Fakhr, M. K.** (2014). Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from various retail meats by MLST and PFGE. *Foods*, 3(1), 82-93.
- Ó Cróinín, T., & Backert, S.** (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 25.
- O'Brien, S. J.** (2017). The consequences of *Campylobacter* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 33(1), 14-20.

- Oh, J. Y., Kwon, Y. K., Wei, B., Jang, H. K., Lim, S. K., Kim, C. H., ... Kang, M. S.** (2017). Epidemiological relationships of *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans and chickens in South Korea. *J. Microbiol.* 55(1), 13-20.
- On, S. L.** (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(3), 405-422.
- On, S. L.** (2013). Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: where to from here?. *J. Microbiol. Methods*, 95(1), 3-7.
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R.** (2016). Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* sp. in Food Borne Pathogens and Antibiotic Resistance. First edition. p417.
- Oyarzabal, O. A., Backert, S., Williams, L. L., Lastovica, A. J., Miller, R. S., Pierce, S. J., Rebollo-Carrato, F.** (2008). Molecular typing, serotyping and cytotoxicity testing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from commercial broilers in Puerto Rico. *J Appl. Microbiol.* 105(3), 800-812.
- Pandey, M.C.; Bawa, A.S.** (2010). Basic operations and conditions. In: Handbook of poultry science and technology. John Wiley and Sons, Inc.: 401-416.
- Pao, S., Hagens, B. E., Kim, C., Wildeus, S., Ettinger, M. R., Wilson, M. D., Kaseloo, P.** (2014). Prevalence and molecular analyses of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. in co-grazing small ruminants and wild-living birds. *Livest. Sci.* 160, 163-171.
- Parisi, M. A., Northcutt, J. K., Smith, D. P., Steinberg, E. L., Dawson, P. L.** (2015). Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control*, 47, 161-165.
- Patton, C. M., Wachsmuth, I. K., Evins, G. M., Kiehlbauch, J. A., Plikaytis, B. D., Troup, N., Lior, H.** (1991). Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 29(4), 680-688.
- Perez-Arnedo, I., & Gonzalez-Fandos, E.** (2019). Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant. *Foods*, 8(3), 111.
- Pergola, S., Franciosini, M. P., Comitini, F., Ciani, M., De Luca, S., Bellucci, S., Casagrande Petracci, M., Bianchi, M., Cavani, C.** (2010). Pre-slaughter handling and slaughtering factors influencing poultry product quality. *Worlds Poult Sci J.*, 66(1), 17-26.
- Pergola, S., Franciosini, M. P., Comitini, F., Ciani, M., De Luca, S., Bellucci, S., ... & Casagrande Proietti, P.** (2017). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of

Campylobacter coli and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. J. App. Microbiol., 122(5), 1348-1356.

Proietti, P. (2017). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. J. Appl. Microbiol. 122(5), 1348-1356.

Perko-Mäkelä, P. (2011). *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Finnish poultry production, Evira Res. Rep. 3/2011.

Peyrat, M. B., Soumet, C., Maris, P., Sanders, P. (2008). Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: analysis of a potential source of carcass contamination. Int. J. Food Microbiol. 124(2), 188-194.

Pielsticker, C., Glünder, G., Rautenschlein, S. (2012). Colonization properties of *Campylobacter jejuni* in chickens. Eur. J. Microbiol. Immunol. 2(1), 61-65.

Pintar, K. D., Thomas, K. M., Christidis, T., Otten, A., Nesbitt, A., Marshall, B., Ravel, A. (2017). A comparative exposure assessment of *Campylobacter* in Ontario, Canada. Risk Anal. 37(4), 677-715.

Pitkänen, T. (2013). Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. J. Microbiol. Methods, 95(1), 39-47.

Pitkänen, T., Hänninen, M. L. (2017). Members of the family *Campylobacteraceae*: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. Global Water Pathogens Project. <http://www.waterpathogens.org> Part 3 Specific excreted pathogens: environmental and epidemiology aspects Disponible en: <http://www.waterpathogens.org/book/campylobacter>.

Possas, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., Valero, A. (2017). Models of microbial cross-contamination dynamics. Curr. Opin. Food Sci. 14, 43-49.

Prachantasena, S., Charunontakorn, P., Muangnoicharoen, S., Hankla, L., Techawal, N., Chaveerach, P., Luangtongkum, T. (2016). Distribution and genetic profiles of *Campylobacter* in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. PLoS One, 11(2), e0149585.

Rafei, R., Al Kassaa, I., Osman, M., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from broiler slaughterhouses in Tripoli, North of Lebanon. Br. Poult. Sci. 60(6), 675-682.

- Rahimi, E., Momtaz, H., Ameri, M., Ghasemian-Safaei, H., Ali-Kasemi, M.** (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. *Poultry Sci.* 89(5), 1015-1020.
- Ramabu, S. S., Boxall, N. S., Madie, P., Fenwick, S. G.** (2004). Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. *Lett. Appl. Microbiol.* 39(3), 252-256.
- Ramires, T., de Oliveira, M. G., Kleinubing, N. R., de Fátima Rauber Würfel, S., Mata, M. M., Iglesias, M. A., da Silva, W. P.** (2020). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of thermophilic *Campylobacter* isolated from broiler production chain. *Brazilian J. Microbiol.* 1-12.
- Rasschaert, G., De Zutter, L., Herman, L., & Heyndrickx, M.** (2020). *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.* 322, 108564.
- Rauber Würfel, S. D. F., Voss-Rech, D., dos Santos Pozza, J., Coldebella, A., Santiago Silva, V., Vaz, C. S. L.** (2019). Population Dynamics of Thermotolerant *Campylobacter* in Broilers Reared on Reused Litter. *Foodborne Pathog. Dis.* 16(11), 738-743.
- Reddy, S., Zishiri, O. T.** (2018). Genetic characterisation of virulence genes associated with adherence, invasion and cytotoxicity in *Campylobacter* spp. isolated from commercial chickens and human clinical cases. *J Vet Res*, 85(1), 1-9.
- Reiter, M. G., Bueno, C. M., Lopez, C., Jordano, R.** (2005). Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. *J. Food Prot.* 68(9), 1903-1906.
- Rejab, S. B. M., Zessin, K. H., Fries, R., Patchanee, P.** (2012). *Campylobacter* in chicken carcasses and slaughterhouses in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 43(1), 96-104.
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., & van Vliet, A. H.** (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7), 2122-2128.
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barrett. T.** (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1889-1894.

- Ricke, S. C., Feye, K. M., Chaney, W. E., Shi, Z., Pavlidis, H., & Yang, Y.** (2019). Developments in rapid detection methods for the detection of foodborne *Campylobacter* in the United States. *Front. Microbiol.* 9, 3280.
- Ridley, A. M., Morris, V. K., Cawthraw, S. A., Ellis-Iversen, J., Harris, J. A., Kennedy, E. M., Allen, V. M.** (2011). Longitudinal molecular epidemiological study of thermophilic *Campylobacters* on one conventional broiler chicken farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(1), 98-107.
- Ripabelli, G., Tamburro, M., Minelli, F., Leone, A., & Sammarco, M. L.** (2010). Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33(4), 355-364.
- Rizal, A., Kumar, A., Vidyarthi, A. S.** (2010). Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *Internet Journal of Food Safety*, 12, 29-34.
- Robyn, J., Rasschaert, G., Pasmans, F., Heyndrickx, M.** (2015). Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: risk factors and intervention. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14(2), 81-105.
- Rodgers, J. D., Lawes, J. R., Vidal, A. B., Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Pleydell, E. J., ... Clifton-Hadley, F. A.** (2012). Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca. *Vet Microbiol*, 159(3-4), 390-396.
- Rodgers, J. D., Simpkin, E., Lee, R., Clifton-Hadley, F. A., & Vidal, A. B.** (2017). Sensitivity of Direct Culture, Enrichment and PCR for Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Broiler Flocks at Slaughter. *Zoonoses and public health*, 64(4), 262-271.
- Rodionova, K. O., Paliy, A. P.** (2017). Analysis of quality and safety indicators of poultry meat during primary processing. *J. vet. med. biotechnol. Biosafety.* 3 (2), 5-9.
- Rodríguez Gutiérrez, V., Guzmán Osorio, L., Verjan García, N.** (2015). *Campylobacter* spp. in poultry products and its impact in public health. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 203-213.
- Rönner, A. C., Borch, E., Kaijser, B.** (2005). Genetic profiling of *Campylobacter jejuni* strains from humans infected in Sweden or in Thailand, and from healthy Swedish chickens, studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Scand J Infect Dis*, 37(8), 579-584.

- Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R. G., Manfreda, G., Revez, J., Vandamme, P.** (2009). *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(9), 2364-2369.
- Rossi, M.A.** (2017). Campilobacteriosis asociada al consumo de alimentos: impacto en la salud pública. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M.** (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 5(3), 50.
- Royden, A., Wedley, A., Merga, J. Y., Rushton, S., Hald, B., Humphrey, T., Williams, N. J.** (2016). A role for flies (Diptera) in the transmission of *Campylobacter* to broilers? *Epidemiol. Infect.* 144(15), 3326-3334.
- Rozynek, E., Dzierzanowska-Fangrat, K., Jozwiak, P., Popowski, J., Korsak, D., Dzierzanowska, D.** (2005). Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.* 54(7), 615-619.
- Rui, B. R., Angrimani, D. D. S. R., & Silva, M. A. A. D.** (2011). Pontos críticos no manejo pré-abate de frango de corte: jejum, captura, carregamento, transporte e tempo de espera no abatedouro. *Cienc. Rural.* 41(7), 1290-1296.
- Ruiz-Castillo, A., Torres-Sánchez, M. J., Aznar-Martín, J.** (2014). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter coli* clinical isolates. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 32(7), 443-445.
- Sahin, O., Kobalka, P., Zhang, Q.** (2003). Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J. Appl. Microbiol.* 95(5), 1070-1079.
- Sahin, O., Kassem, I. I., Shen, Z., Lin, J., Rajashekara, G., Zhang, Q.** (2015). *Campylobacter* in poultry: ecology and potential interventions. *Avian Diseases*, 59(2), 185-200.
- Saleha, A. A.** (2004). Epidemiological study on the colonization of chickens with *Campylobacter* in broiler farms in Malaysia: possible risk and management factors. *Int. J. Poult. Sci.* 3(2), 129-134.
- Salim, S. M., Mandal, J., Parija, S. C.** (2014). Isolation of *Campylobacter* from human stool samples. *Indian journal of medical microbiology*, 32(1), 35.

- Samad, A., Abbas, F., Ahmed, Z., Akbar, A., Naeem, M., Sadiq, M. B., Achakzai, S. K.** (2019). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and virulence of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken meat. *J. Food Saf.* 39(2), e12600.
- Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A., & Uyttendaele, M.** (2010). Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 137(2-3), 147-153.
- Sasaki, Y., Tsujiyama, Y., Tanaka, H., Yoshida, S., Goshima, T., Oshima, K., Yamada, Y.** (2011). Risk factors for *Campylobacter* colonization in broiler flocks in Japan. *Zoonoses and public health*, 58(5), 350-356.
- Sasaki, Y., Haruna, M., Mori, T., Kusakawa, M., Murakami, M., Tsujiyama, Y., Yamada, Y.** (2014). Quantitative estimation of *Campylobacter* cross-contamination in carcasses and chicken products at an abattoir. *Food Control*, 43, 10-17.
- Schets, F. M., Jacobs-Reitsma, W. F., van der Plaats, R. Q., Heer, L. K. D., van Hoek, A. H., Hamidjaja, R. A., Blaak, H.** (2017). Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment. *J Water Health* 15(6), 849-862.
- Sebald, M., Veron, M.** (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. In *Annales de l'Institut Pasteur*, 105(5), 897-910.
- Seliwiorstow, T., Baré, J., Van Damme, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L.** (2015). *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 25-31.
- Seliwiorstow, T., Baré, J., Berkvens, D., Van Damme, I., Uyttendaele, M., De Zutter, L.** (2016). Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* 226, 26-32.
- Semaan, E. H., Dib, H., Mrad, R., Chami, C., & Jalkh, R.** (2014). Dynamic of *Campylobacter* species contamination along a poultry slaughtering chain. *Italian journal of food safety*, 3(3).
- SENASA; sns N° 8, 27-31.
- Sheppard, S. K., McCarthy, N. D., Falush, D., & Maiden, M. C.** (2008). Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Sci.* 320(5873), 237-239.
- Sheppard, S. K., Maiden, M. C.** (2015). The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(8), a018119.

- Shreeve, J. E., Toszeghy, M., Ridley, A., & Newell, D. G.** (2002). The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avian Dis.*, 46(2), 378-385.
- Sibanda, N., McKenna, A., Richmond, A., Ricke, S. C., Callaway, T., Stratakos, A. C., Corcionivoschi, N.** (2018). A review of the effect of management practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms. *Front. Microbiol.* 9, 2002.
- Signorini, M.L.; Rossler, E.; Diaz, D.C.; Olivero, C.R.; Romero-Scharpen, A.; Soto, L.P.; Astesana, D.M.; Berisvil, A.P.; Zimmermann, J.A.; Fusari, M.L.; Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.** (2018). Antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* species isolated from humans, food-producing animals, and products of animal origin: a worldwide meta-analysis. *Microb. Drug Resist.* 24(8), 1174-1190.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., Teixeira, P.** (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2, 200.
- Sippy, R., Sandoval-Green, C. M., Sahin, O., Plummer, P., Fairbanks, W. S., Zhang, Q., Blanchong, J. A.** (2012). Occurrence and molecular analysis of *Campylobacter* in wildlife on livestock farms. *Vet. Microbiol.* 157(3-4), 369-375.
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., Rautelin, H. I. K.** (2016). *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103-109.
- Skov, M. N., Spencer, A. G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B., & Madsen, M.** (2004). The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella* enterica and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. *Avian Dis.* 48(1), 9-18.
- Smith, T., Taylor, M. S.** (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *The Journal of experimental medicine*, 30(4), 299-311.
- Smith, J., Corkran, S., McKee, S. R., Bilgili, S. F., Singh, M.** (2015). Evaluation of post-chill applications of antimicrobials against *Campylobacter jejuni* on poultry carcasses. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(4), 451-456.
- Sparks, N. H. C.** (2009). The role of the water supply system in the infection and control of *Campylobacter* in chicken. *Poult. Sci. J.* 65(3), 459-474.
- Sommer, H. M., Høg, B. B., Larsen, L. S., Sørensen, A. I. V., Williams, N., Merga, J. Y., ... Osek, J.** (2016). Analysis of farm specific risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers in six European countries. *Microbial Risk Analysis*, 2, 16-26.

- Stafford, R. J., Schluter, P. J., Wilson, A. J., Kirk, M. D., Hall, G., Unicomb, L., & OzFoodNet Working Group.** (2008). Population-attributable risk estimates for risk factors associated with *Campylobacter* infection, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 14(6), 895.
- Stern, N. J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J. S., Cox, N. A., Craven, S. E., Hiett, K. L., Mead, G. C.** (2001). Distribution of *Campylobacter* spp. in selected US poultry production and processing operations. *J. Food Prot.* 64(11), 1705-1710.
- Taboada, E. N., Clark, C. G., Sproston, E. L., Carrillo, C. D.** (2013). Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J. Microbiol. Methods.* 95(1), 24-31.
- Tack DM, Ray L, Griffin PM, et al.** Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69: 509–514. DOI: 10.15585/mmwr.mm6917a1
- Tang, Y., Jiang, Q., Tang, H., Wang, Z., Yin, Y., Ren, F., Huang, J.** (2020). Characterization and Prevalence of *Campylobacter* spp. From Broiler Chicken Rearing Period to the Slaughtering Process in Eastern China. *Front Vet Sci*, 7, 227.
- Taylor, E. V., Herman, K. M., Ailes, E. C., Fitzgerald, C., Yoder, J. S., Mahon, B. E., Tauxe, R. V.** (2013). Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008. *Epidemiol. Infect.* 141(5), 987-996.
- Templeton, J. M., De Jong, A. J., Blackall, P. J., & Mifflin, J. K.** (2006). Survival of *Campylobacter* spp. in darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Appl. Environm. Microbiol.* 72(12), 7909-7911.
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239
- Terzolo, H. R.; Lawson, G. H. K.; Angus, K. W. y D. R. Snodgrass** (1987), “Enteric *Campylobacter* infection in gnotobiotic calves and lambs”, *Res Vet Sci*; 43, pp. 72-77.
- Thakur, S., Zhao, S., McDermott, P. F., Harbottle, H., Abbott, J., English, L., White, D. G.** (2010). Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(7), 835-844.

- Thakur, S., Brake, J., Keelara, S., Zou, M., Susick, E.** (2013). Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. *Res Vet Sci*, 94(1), 33-42.
- Toghyani, M., Gheisari, A., Modaresi, M., Tabeidian, S. A., & Toghyani, M.** (2010). Effect of different litter material on performance and behavior of broiler chickens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122(1), 48-52.
- Torralbo, A., Borge, C., Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Sheppard, S. K., Perea, A., Carbonero, A.** (2014). Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Prev Vet Med*, 114(2), 106-113.
- Torralbo, A., Borge, C., García-Bocanegra, I., Méric, G., Perea, A., Carbonero, A.** (2015). Higher resistance of *Campylobacter coli* compared to *Campylobacter jejuni* at chicken slaughterhouse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 47-52.
- Toyofuku, C., Alam, M. S., Yamada, M., Komura, M., Suzuki, M., Hakim, H., Takehara, K.** (2017). Enhancement of bactericidal effects of sodium hypochlorite in chiller water with food additive grade calcium hydroxide. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1019-1023.
- Tracz, D. M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska, K., Taylor, D. E.** (2005). pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 11(6), 839.
- Tresse, O., Alvarez-Ordóñez, A., & Connerton, I. F.** (2017). About the foodborne pathogen *Campylobacter*. *Front. Microbiol.* 8, 1908.
- Trimble, L. M., Alali, W. Q., Gibson, K. E., Ricke, S. C., Crandall, P., Jaroni, D., Berrang, M.** (2013). *Salmonella* and *Campylobacter* prevalence and concentration on pasture-raised broilers processed on-farm, in a Mobile Processing Unit, and at small USDA-inspected facilities. *Food Control*, 34(1), 177-182.
- Trouchon, T., Lefebvre, S.** (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open J. Vet. Med.* 6(2), 40-58.
- Tsola, E., Drosinos, E. H., Zoiopoulos, P.** (2008). Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, 19(4), 423-431.
- Ugarte-Ruiz, M., Gómez-Barrero, S., Porrero, M. C., Alvarez, J., Garcia, M., Comeron, M. C., Dominguez, L.** (2012). Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *J. Appl. Microbiol.* 113(1), 200-208.

- United States Department of Agriculture (USDA).** (2008). Food Safety and Inspection Service. Improvements for Poultry Slaughter Inspection. Appendix C – Literature Review of the Poultry Slaughter Process. Disponible en https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/927cb971-ac4d-4fc5-9f65-09cb84ad46fc/Slaughter_Appendix_C.pdf?MOD=AJPERES.
- Umaraw, P., Prajapati, A., Verma, A. K., Pathak, V., Singh, V. P.** (2017). Control of *Campylobacter* in poultry industry from farm to poultry processing unit: A review. Crit Rev Food Sci Nutr., 57(4), 659-665.
- Valentini, E. M.; Espejo, C.; Martincic, D. G.; Fernández, M.; Nevilly, R. D.; Gracia,**
- Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Scott, P. C., Moore, R. J.** (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. Int J Syst Evol Microbiol. 66(11), 4518-4524.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Ducatelle, R.** (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. J. Med. Microbiol. 56(10), 1284-1289.
- Vandamme, P., van Doorn, L-J., Rashid, S.T.A., Quint, W.G.V., Plas Jvd; Chan, V.L., On, S.L.W.** (1997). *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int. J. Sys. Bacteriol., 47: 1055-1060.
- Vandamme P, Dwhirst FE, Paster BJ.** *Campylobacteraceae*. In: Garrity GM, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer; 2005. pp. 1145–1168
- Vandamme, P., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., On, S. L.** (2015). *Campylobacter*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-27.
- Vandeplas, S., Dubois Dauphin, R., Palm, R., Beckers, Y., Thonart, P., & Théwis, A.** (2010). Prevalence and sources of *Campylobacter* spp. contamination in free-range broiler production in the southern part of Belgium. Biotechnol. agron. soc. environ. 14(2), 279-288.
- Vanderhasselt, R. F., Buijs, S., Sprenger, M., Goethals, K., Willemsen, H., Duchateau, L., Tuytens, F. A. M.** (2013). Dehydration indicators for broiler chickens at slaughter. Poult. Sci. 92(3), 612-619.
- Vencia, W., Nogarol, C., Bianchi, D. M., Gallina, S., Zuccon, F., Adriano, D., Decastelli, L.** (2014). Validation according to ISO 16140: 2003 of a commercial real-time PCR-based

method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 78-80.

Vidal, A. B., Rodgers, J., Arnold, M., & Clifton-Hadley, F. (2013). Comparison of different sampling strategies and laboratory methods for the detection of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler flocks at primary production. *Zoonoses and public health*, 60(6), 412-425.

Vidal, A. B., Colles, F. M., Rodgers, J. D., McCarthy, N. D., Davies, R. H., Maiden, M. C. J., Clifton-Hadley, F. A. (2016). Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from conventional broiler flocks and the impacts of sampling strategy and laboratory method. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(8), 2347-2355.

Vinueza-Burgos, C., Wautier, M., Martiny, D., Cisneros, M., Van Damme, I., De Zutter, L. (2017). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in Ecuadorian broilers at slaughter age. *Poult. Sci.* 96(7), 2366-2374.

Wang, Y., Dong, Y., Deng, F., Liu, D., Yao, H., Zhang, Q., Shen, Z. (2016). Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008–14. *J. Antimicrob. Chemother.* 71(3), 666-669.

Wassenaar, T. M., & Newell, D. G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *ppl Environ Microbiol.* 66(1), 1-9.

Wassenaar, T. M. (2011). Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Letters in applied microbiology*, 53(3), 253-263.

Wagenaar, J. A., French, N. P., Havelaar, A. H. (2013). Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clinical infectious diseases*, 57(11), 1600-1606.

Whitehouse, C. A., Young, S., Li, C., Hsu, C. H., Martin, G., Zhao, S. (2018). Use of whole-genome sequencing for *Campylobacter* surveillance from NARMS retail poultry in the United States in 2015. *Food Microbiol.* 73, 122-128.

Wieczorek, K., Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res. Int.*, 2013.

Wieczorek, K., Denis, E., Lynch, O., Osek, J. (2013). Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. *Food Microbiol.* 34(1), 130-136.

- Wieczorek, K., Denis, E., Osek, J.** (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 24-32.
- Wieczorek, K., Wołkowicz, T., Osek, J.** (2018). Antimicrobial resistance and virulence-associated traits of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry food chain and humans with diarrhea. *Front. Microbiol.* 9, 1508.
- Williams, L. K., Sait, L. C., Cogan, T. A., Jørgensen, F., Grogono-Thomas, R., Humphrey, T. J.** (2012). Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. *Epidemiol. Infect.* 140(7), 1227-1235.
- Williams, M. S., Golden, N. J., Ebel, E. D., Craey, E. T., Tate, H. P.** (2015). Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their relationship to campylobacteriosis cases in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* 208, 114-121.
- Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fearnhead, P.** (2009). Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. *Mol. Biol. Evol.* 26(2), 385-397.
- Wilson, D. L., Rathinam, V. A., Qi, W., Wick, L. M., Landgraf, J., Bell, J. A., ... Linz, J. E.** (2010). Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiol.*, 156(7), 2046-2057.
- World Health Organization (WHO).** 2013. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.
- Wysocki, B., & Wojtacka, J.** (2018). Detection of virulence genes determining the ability to adhere and invade in *Campylobacter* spp. from cattle and swine in Poland. *Microbial pathogenesis*, 115, 257-263.
- Wysocki, B., Wojtacka, J., Wiszniewska-Łaszczych, A., & Sztejn, J.** (2020). Antimicrobial Resistance and Virulence Properties of *Campylobacter* Spp. Originating from Domestic Geese in Poland. *Animals*, 10(4), 742.
- Yang, Y., Ashworth, A. J., Cook, K., Willett, C., Upadhyay, A., Owens, P., Moore, P. A.** (2019). Review of antibiotic resistance, ecology, dissemination, and mitigation in US broiler poultry systems. *Front. Microbiol.* 10, 2639.

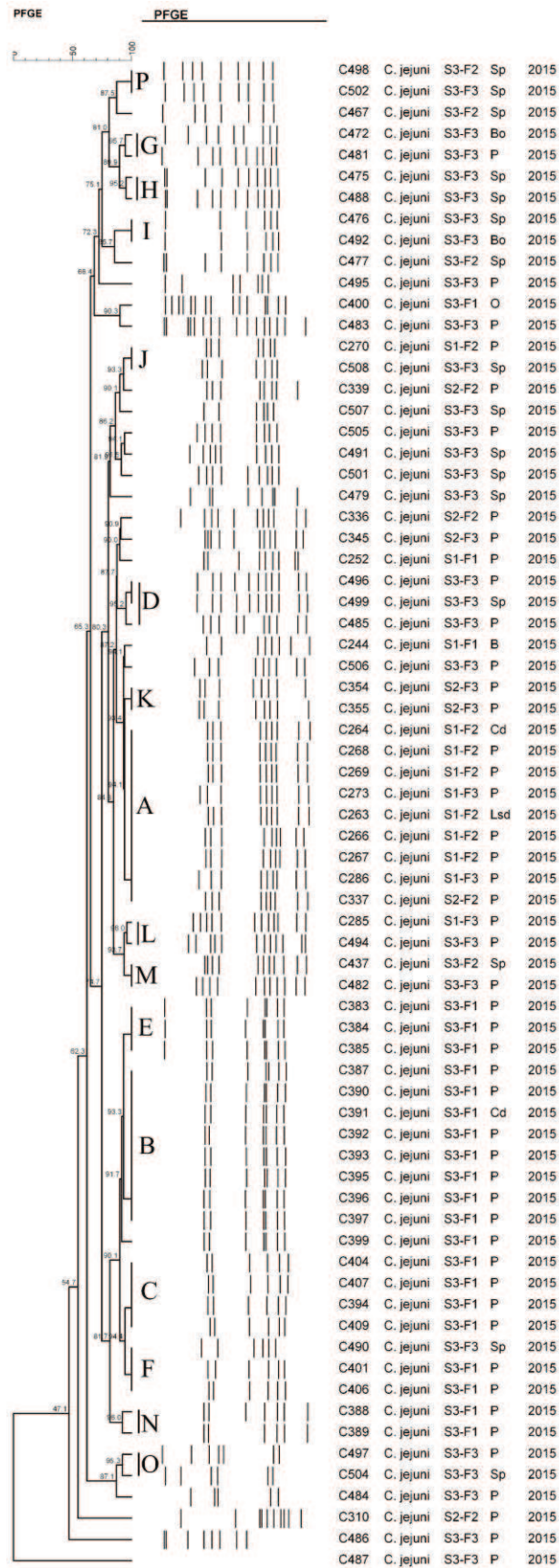
- Yashoda, K. P., Sachindra, N. M., Sakhare, P. Z., RAO, D. N.** (2001). Microbiological quality of broiler chicken carcasses processed hygienically in a small-scale poultry processing unit. *J. Food Qual.* 24(3), 249-259.
- Young, K. T., Davis, L. M., DiRita, V. J.** (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665-679.
- Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martínez-Urtaza, J., Campos, J.** (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 128-135.
- Zbrun, M. V., Romero-Scharpen, A., Olivero, C., Rossler, E., Soto, L. P., Rosmini, M. R., ... Frizzo, L. S.** (2013). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. at different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. *New Zealand veterinary journal*, 61(6), 337-343.
- Zbrun, M. V., Rossler, E., Romero-Scharpen, A., Soto, L. P., Berisvil, A., Zimmermann, J. A., Frizzo, L. S.** (2020). Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. *Res. Vet. Sci.* 132, 69-77.
- Zhang, M., Gu, Y., He, L., Ran, L., Xia, S., Han, X., Zhang, J.** (2010). Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. *J. Med. Microbiol.* 59(10), 1171-1177.
- Zhang, A., Song, L., Liang, H., Gu, Y., Zhang, C., Liu, X., Zhang, M.** (2016a). Molecular subtyping and erythromycin resistance of *Campylobacter* in China. *J. Appl. Microbiol.* 121(1), 287-293.
- Zhang, T., Luo, Q., Chen, Y., Li, T., Wen, G., Zhang, R., Shao, H.** (2016b). Molecular epidemiology, virulence determinants and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spreading in retail chicken meat in Central China. *Gut Pathog.* 8(1), 1-9.
- Zweifel, C., Scheu, K. D., Keel, M., Renggli, F., Stephan, R.** (2008). Occurrence and genotypes of *Campylobacter* in broiler flocks, other farm animals, and the environment during several rearing periods on selected poultry farms. *Int. J. Food Microbiol.* 125(2), 182-187.

8- ANEXOS

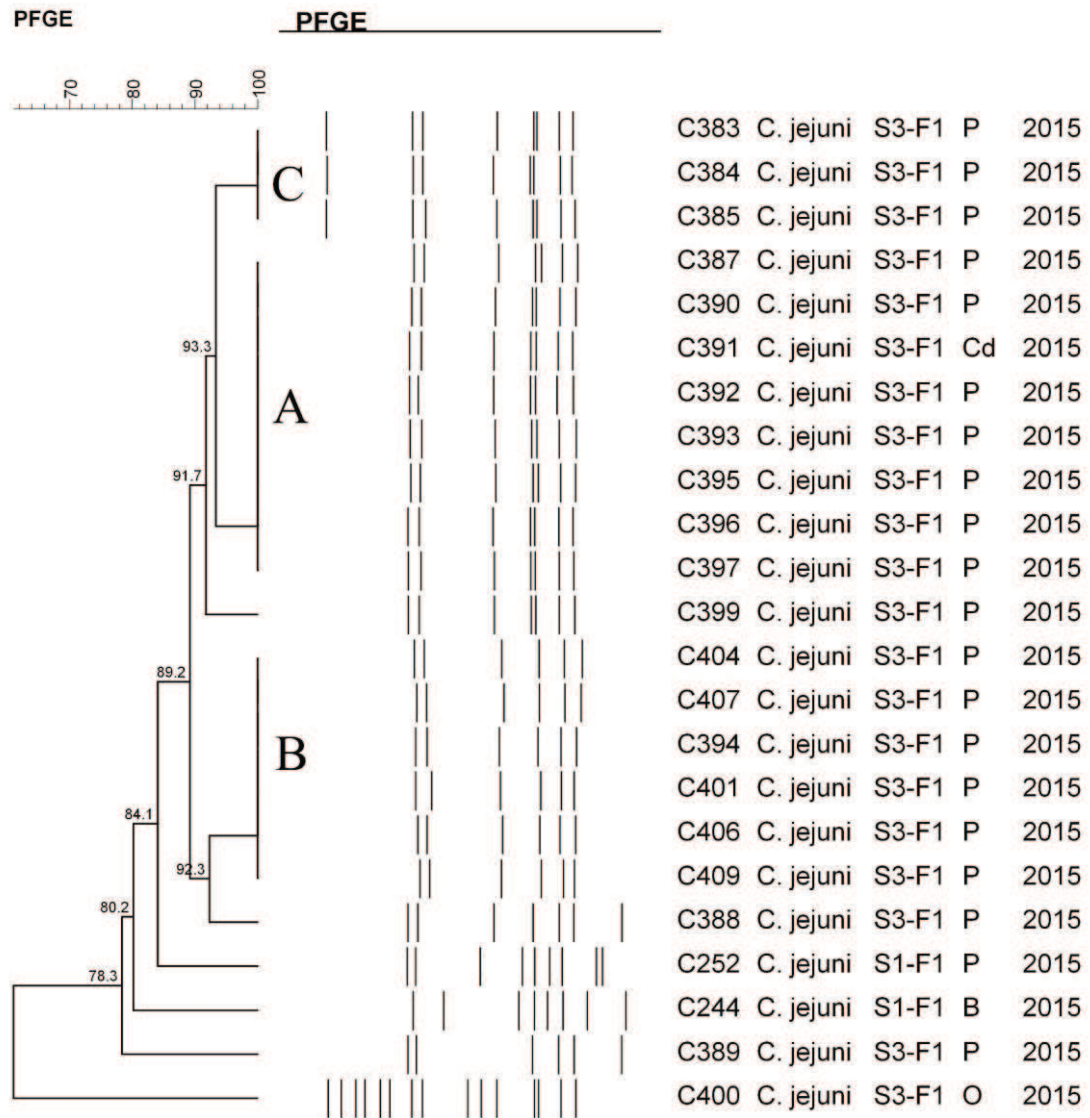
ANEXO I: Dendrogramas PFGE

ANEXO I-A
PFGE *Campylobacter jejuni*
GRANJA 2015

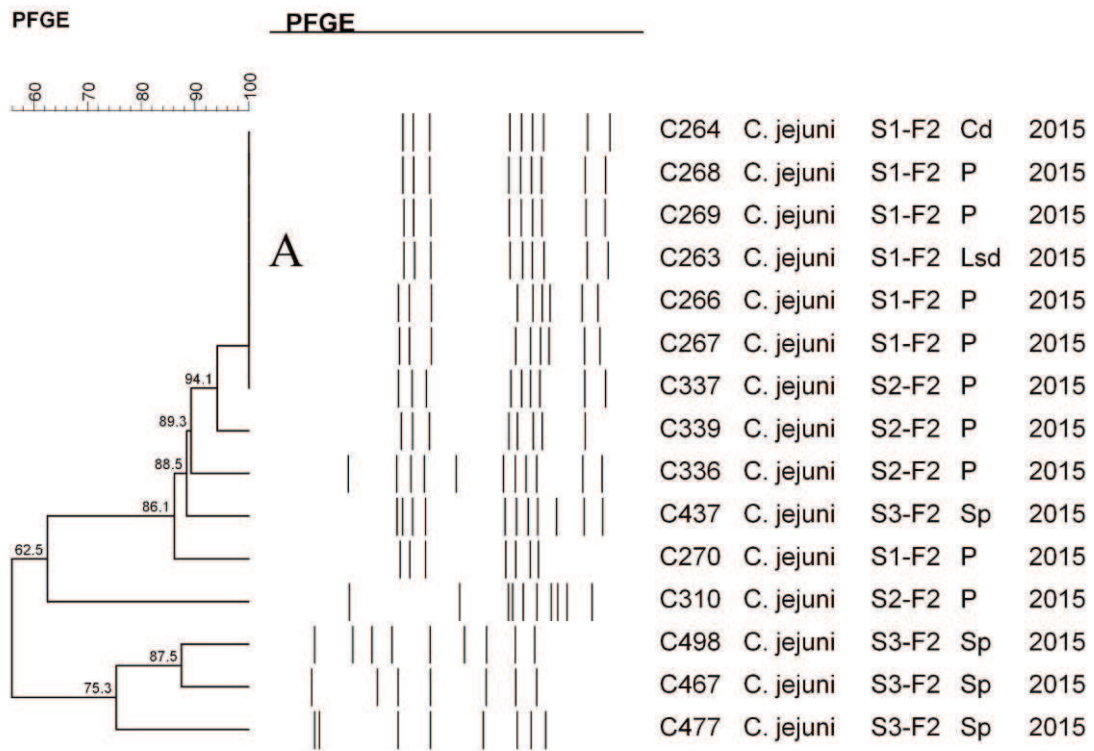
ANEXO I-A1. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* total en granja



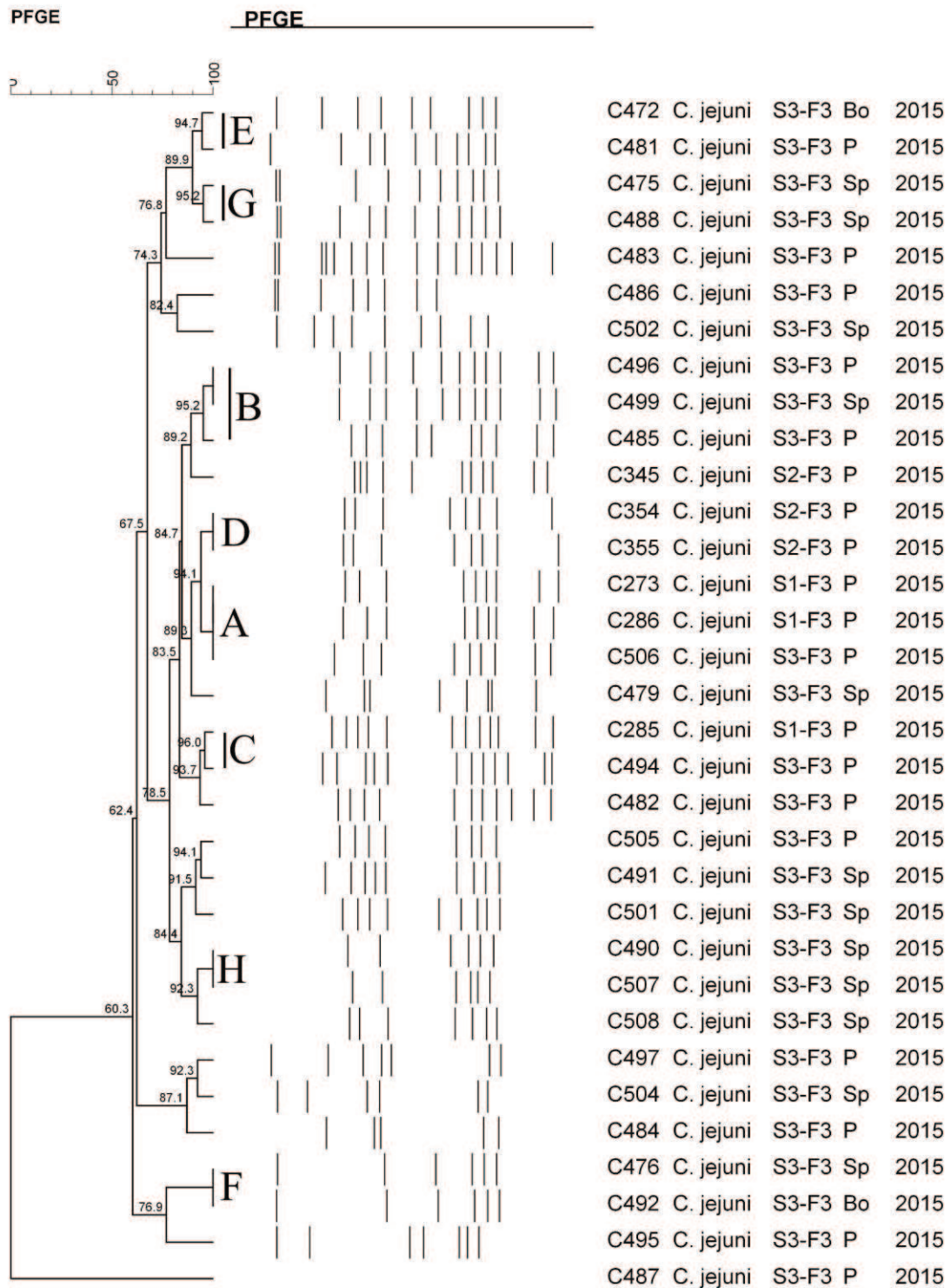
ANEXO I-A2. Dendrograma PFGE *C. jejuni* en granja 1



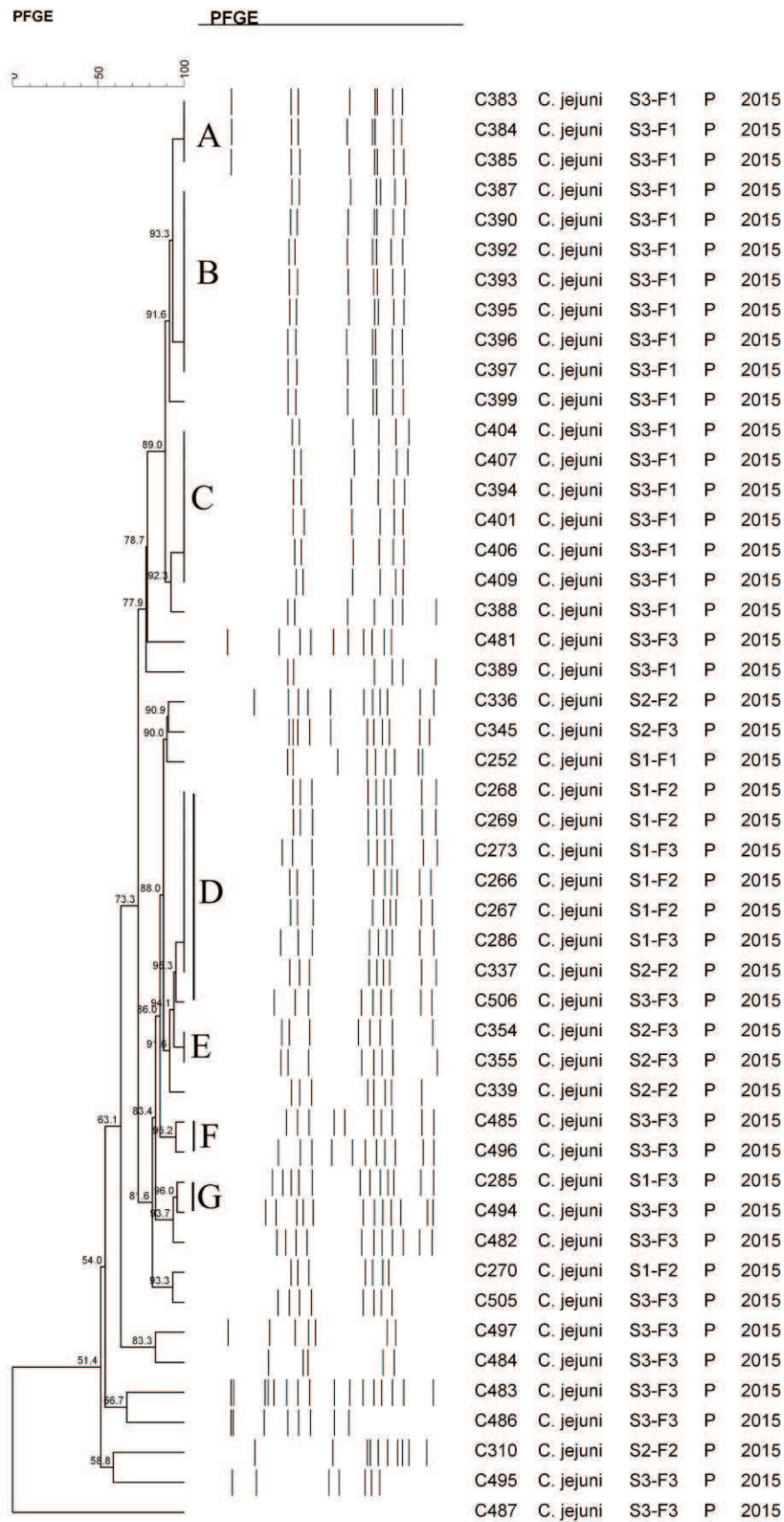
ANEXO I-A3. Dendrograma PFGE *C. jejuni* en granja 2



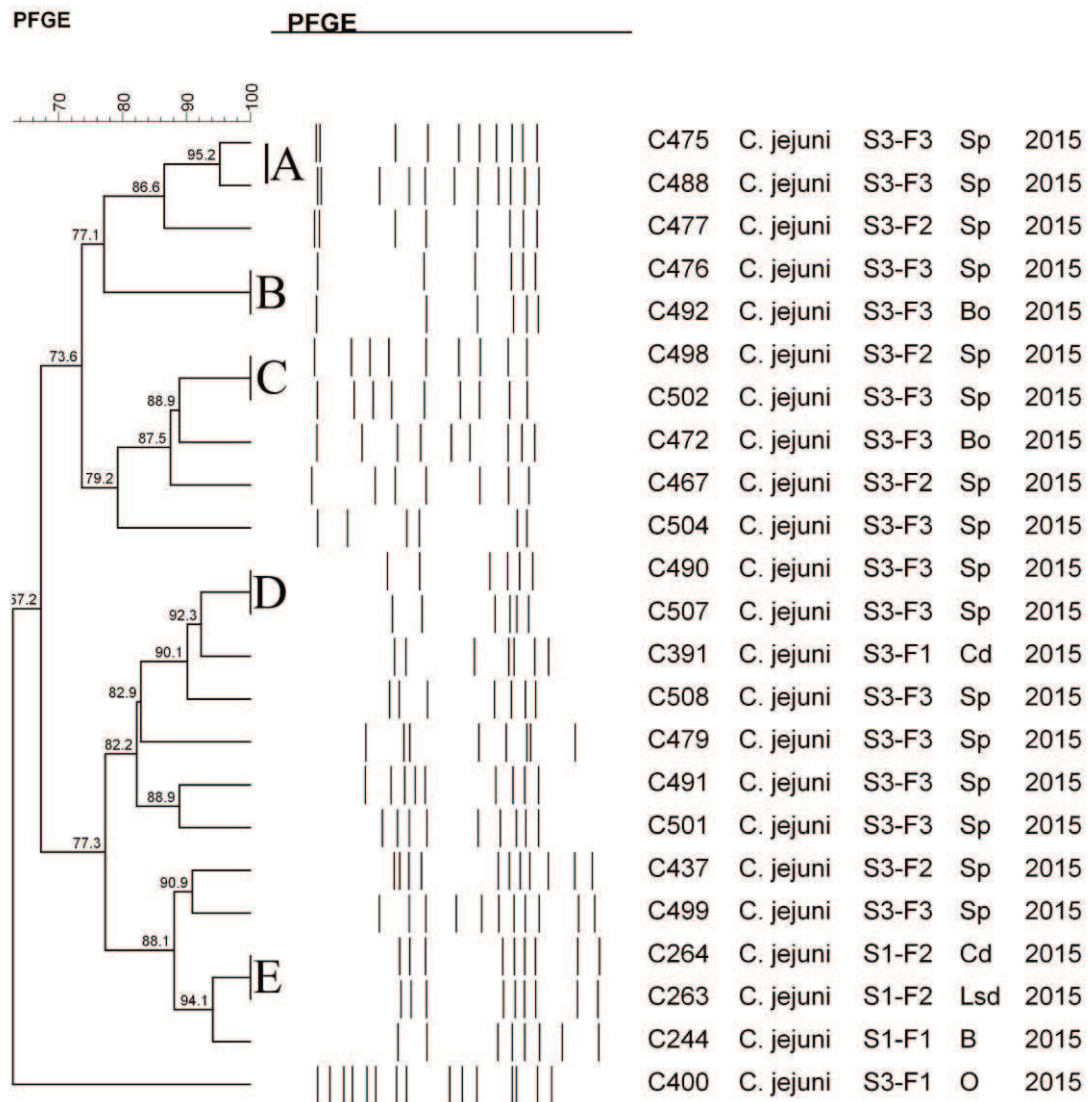
ANEXO I-A4: - Dendrograma PFGE *C. jejuni* en granja 3



ANEXO I-A5. Dendrograma PFGE *C. jejuni* en pollos

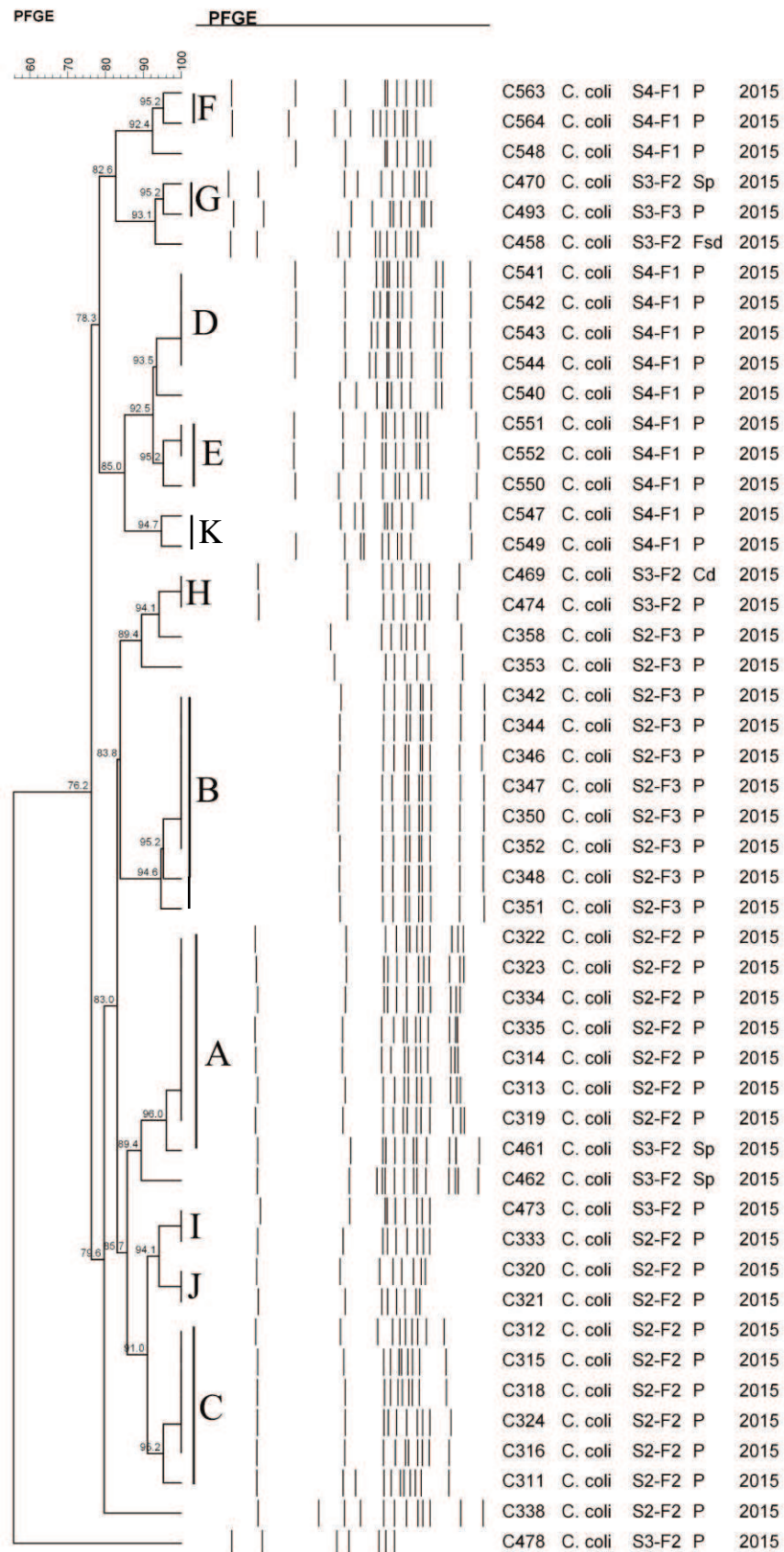


ANEXO I-A6. Dendrograma PFGE *C. jejuni* en vectores y fómites en granja

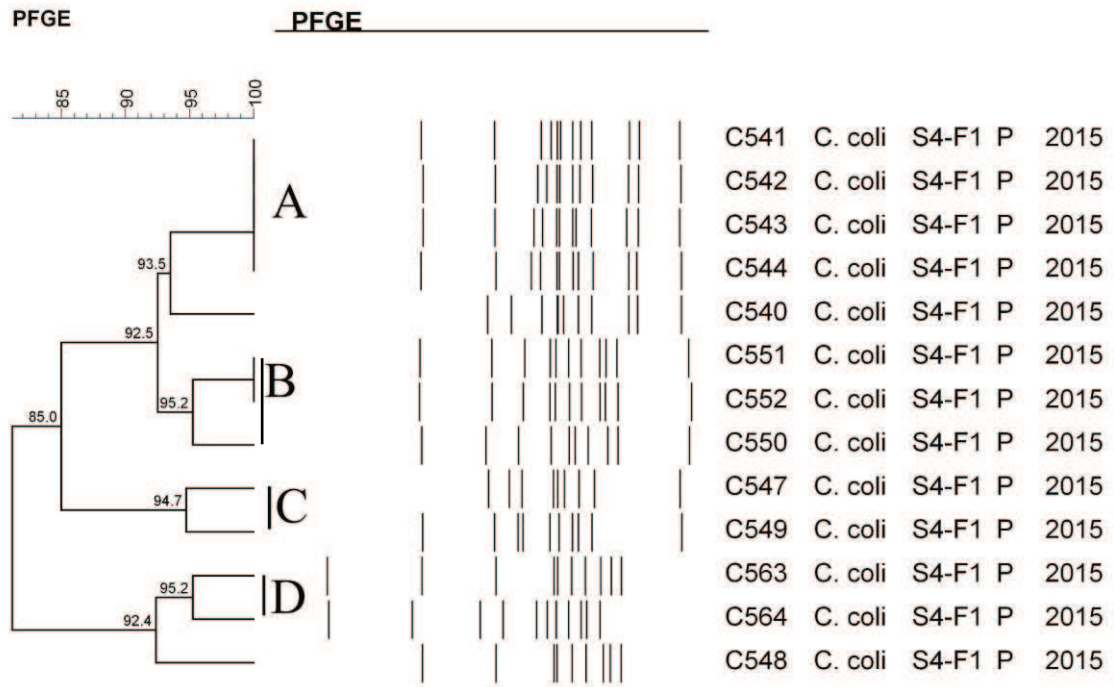


ANEXO I-B
PFGE *Campylobacter coli*
GRANJA 2015

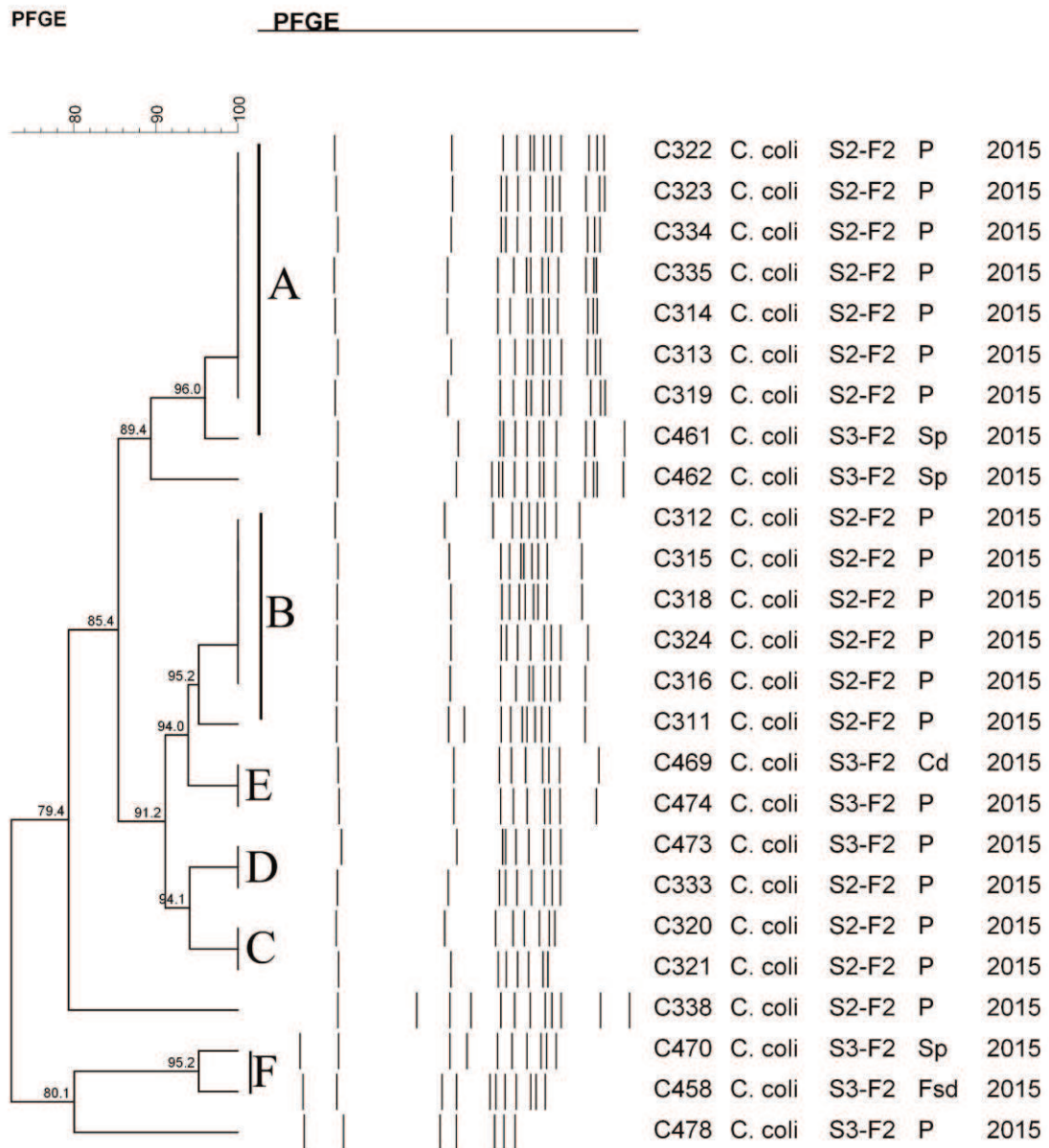
ANEXO I-B1. Dendrograma PFGE *C. coli* total en granja



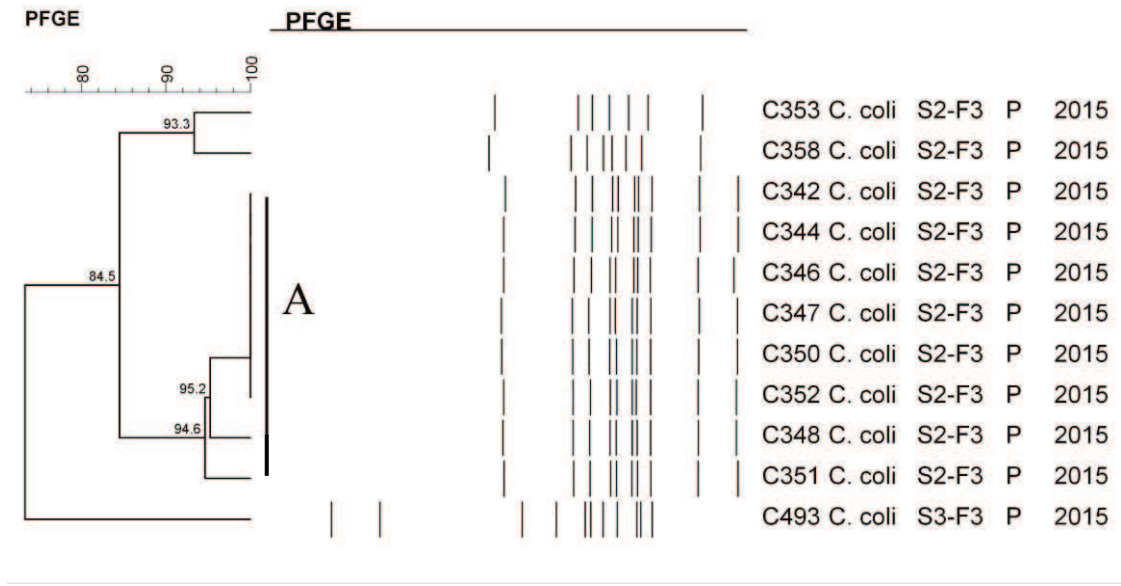
ANEXO I-B2. Dendrograma PFGE *C. coli* en granja 1



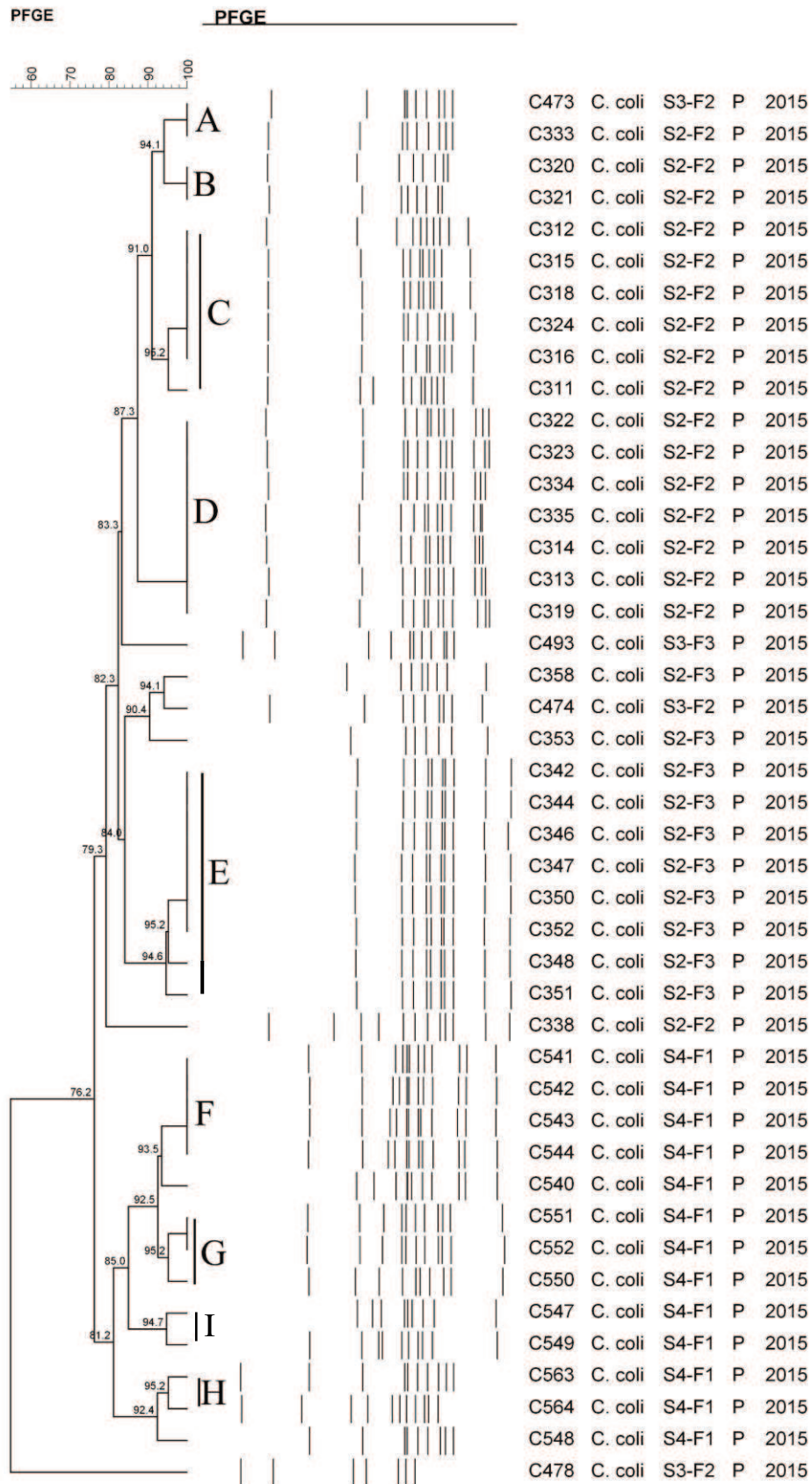
ANEXO I-B3. Dendrograma PFGE *C. coli* en granja 2



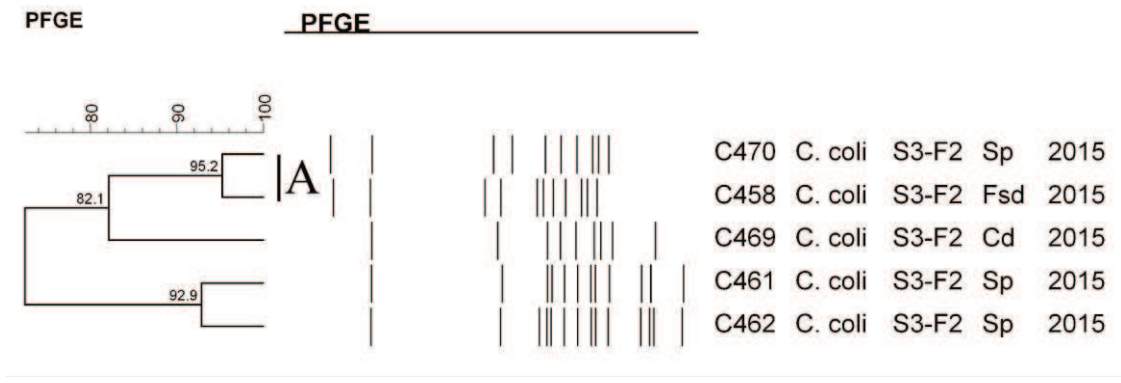
ANEXO I-B4. Dendrograma PFGE *C. coli* en granja 3



ANEXO I-B5. Dendrograma PFGE *C. coli* en pollos

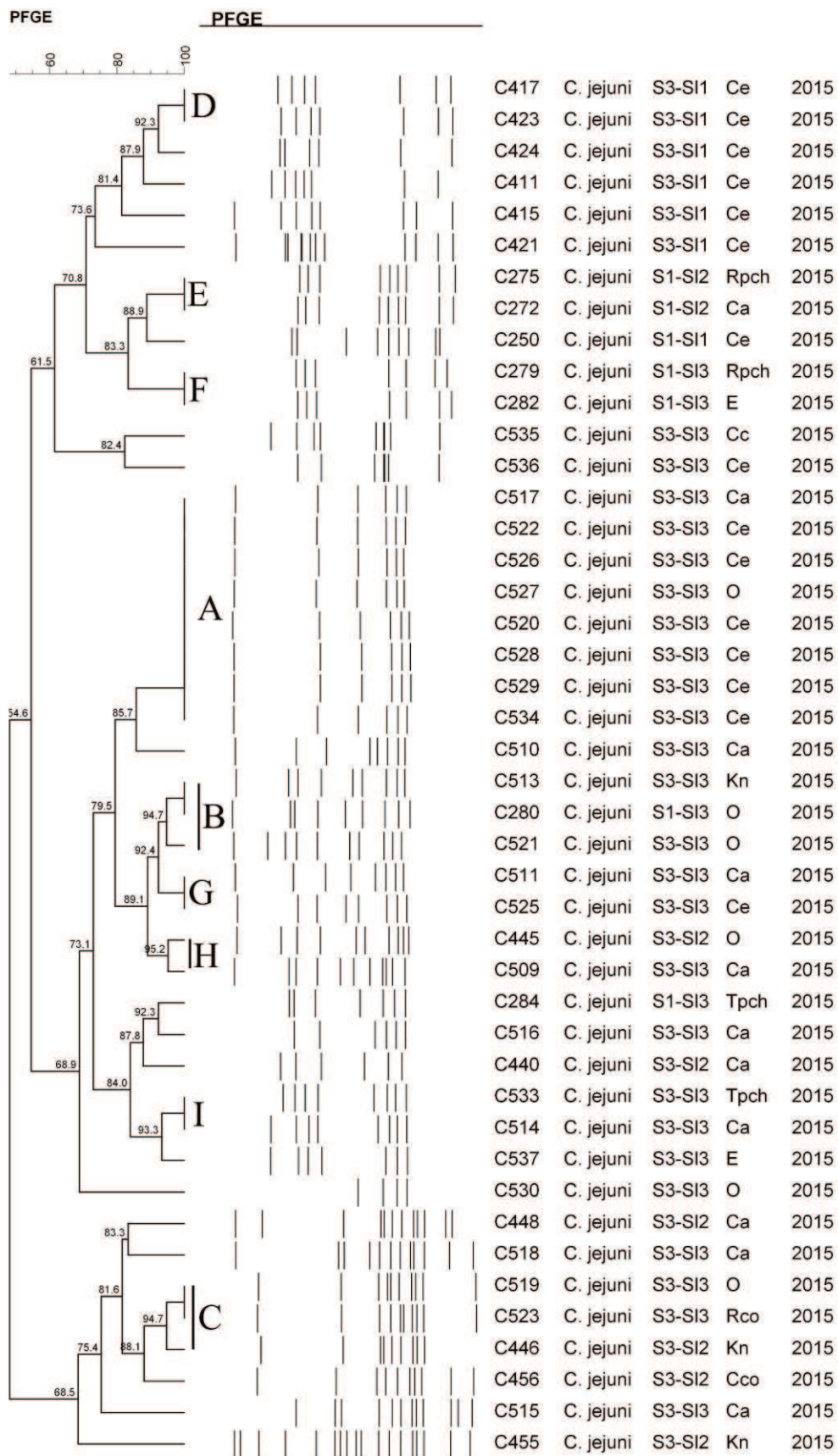


ANEXO I-B6. Dendrograma PFGE *C. coli* en vectores y fómites en granja

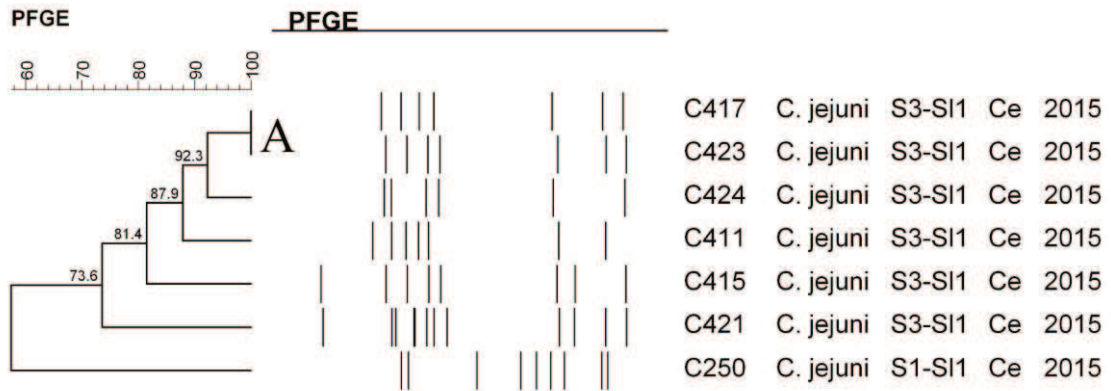


ANEXO I-C
PFGE *Campylobacter jejuni*
PLANTA DE FAENA

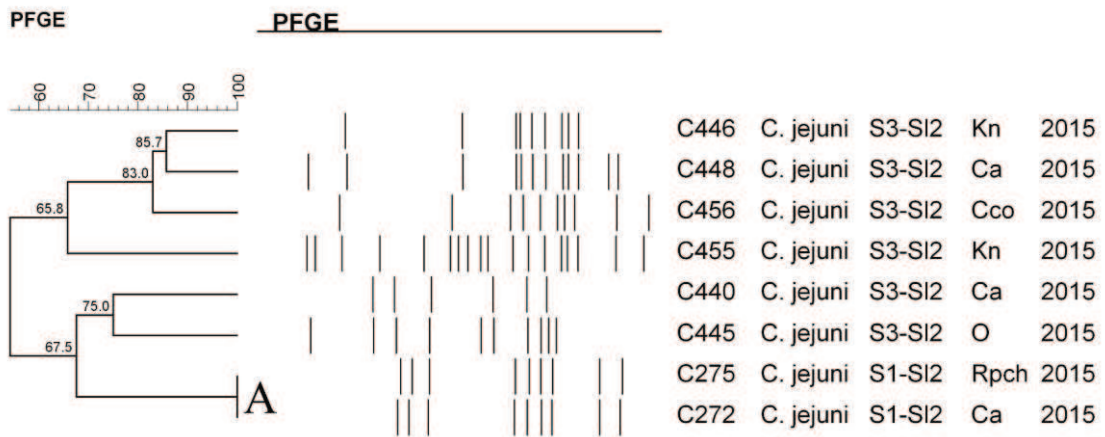
ANEXO I-C1. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* total en planta de faena



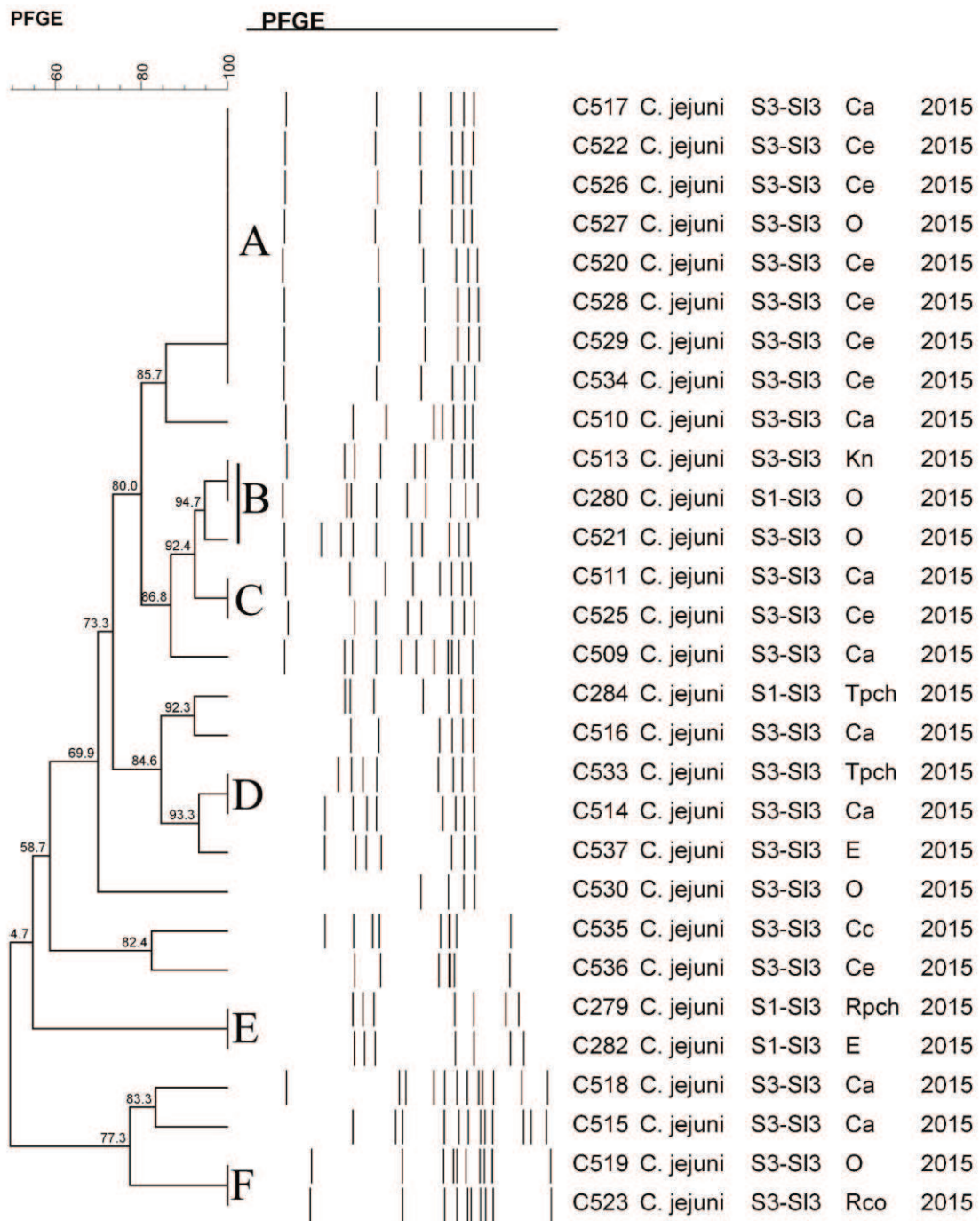
ANEXO I-C2. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en lote de faena 1



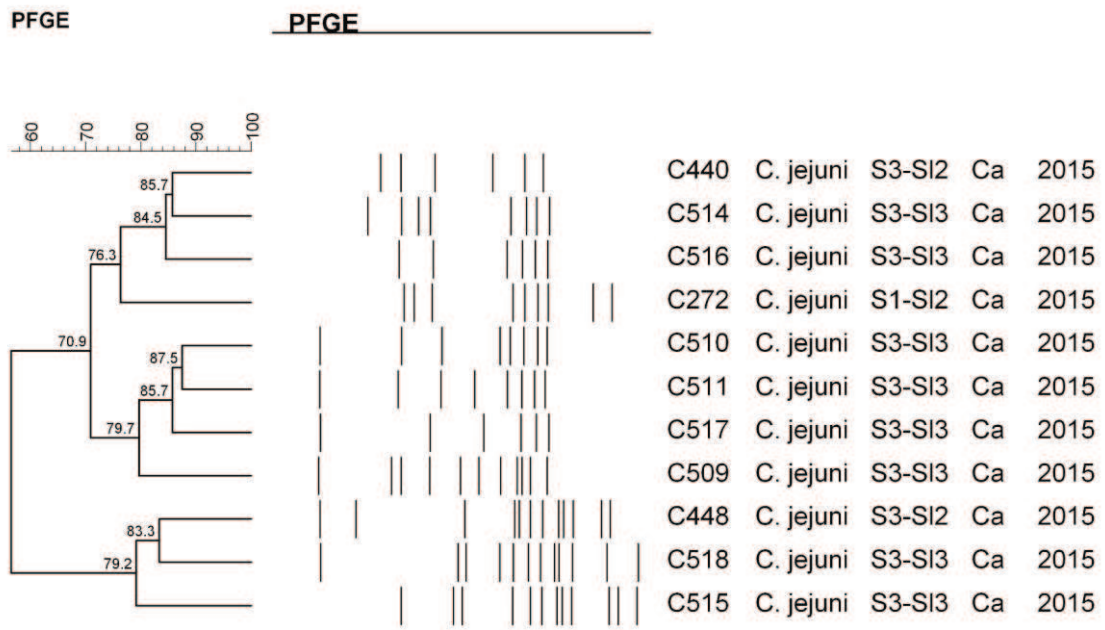
ANEXO I-C3. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en lote de faena 2



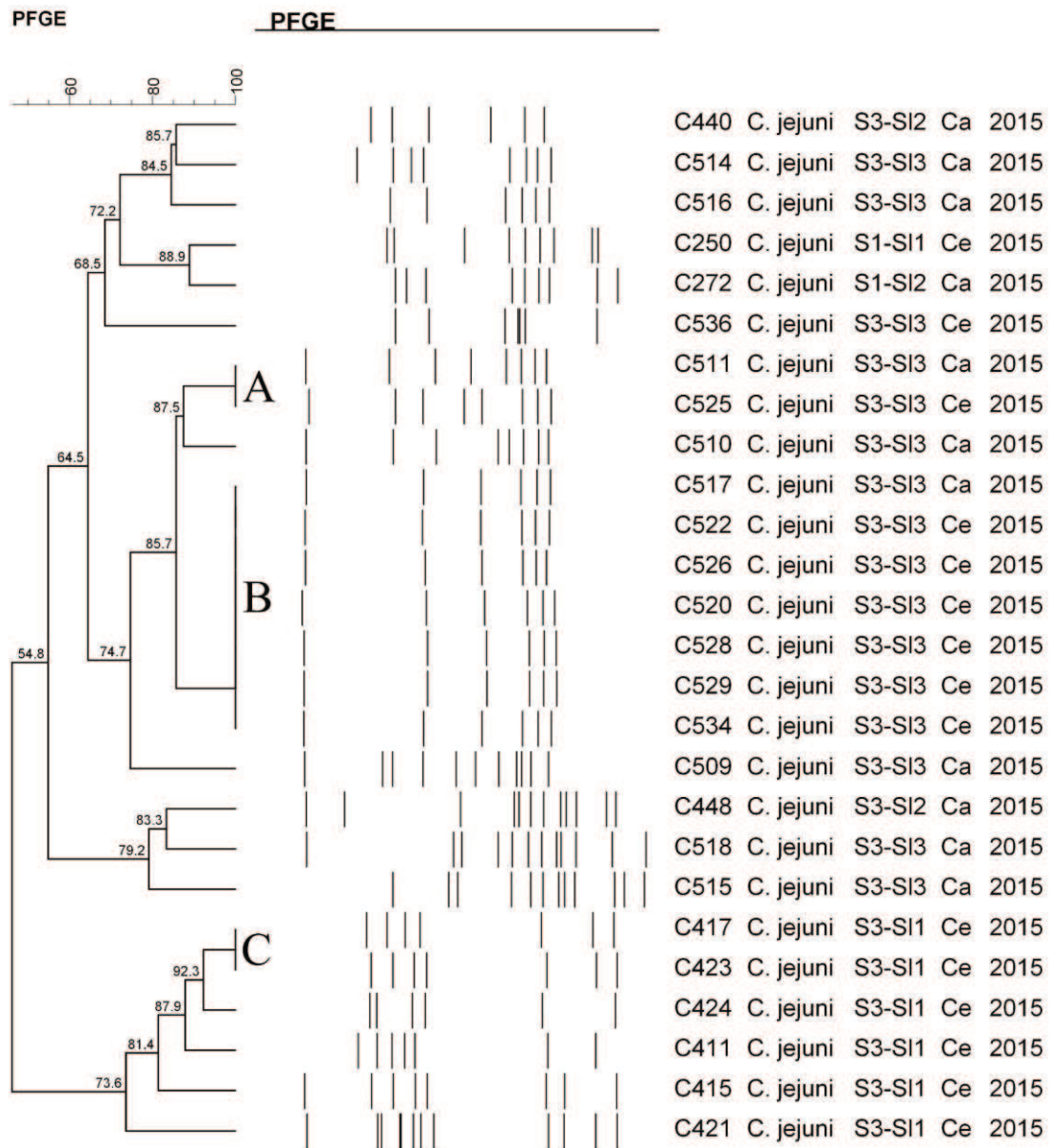
ANEXO I-C4. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en lote de faena 3



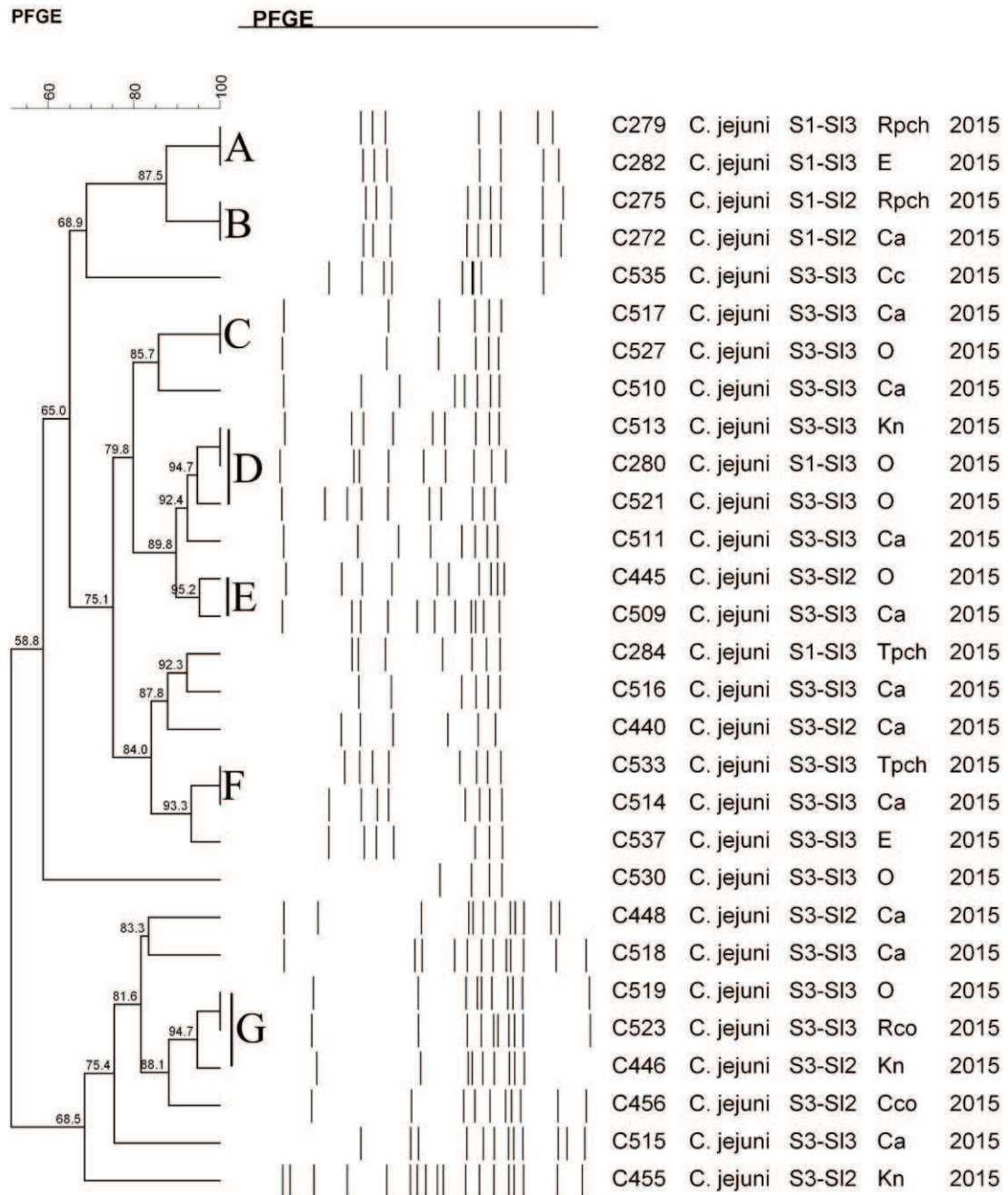
ANEXO I-C5. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en carcasas de pollos



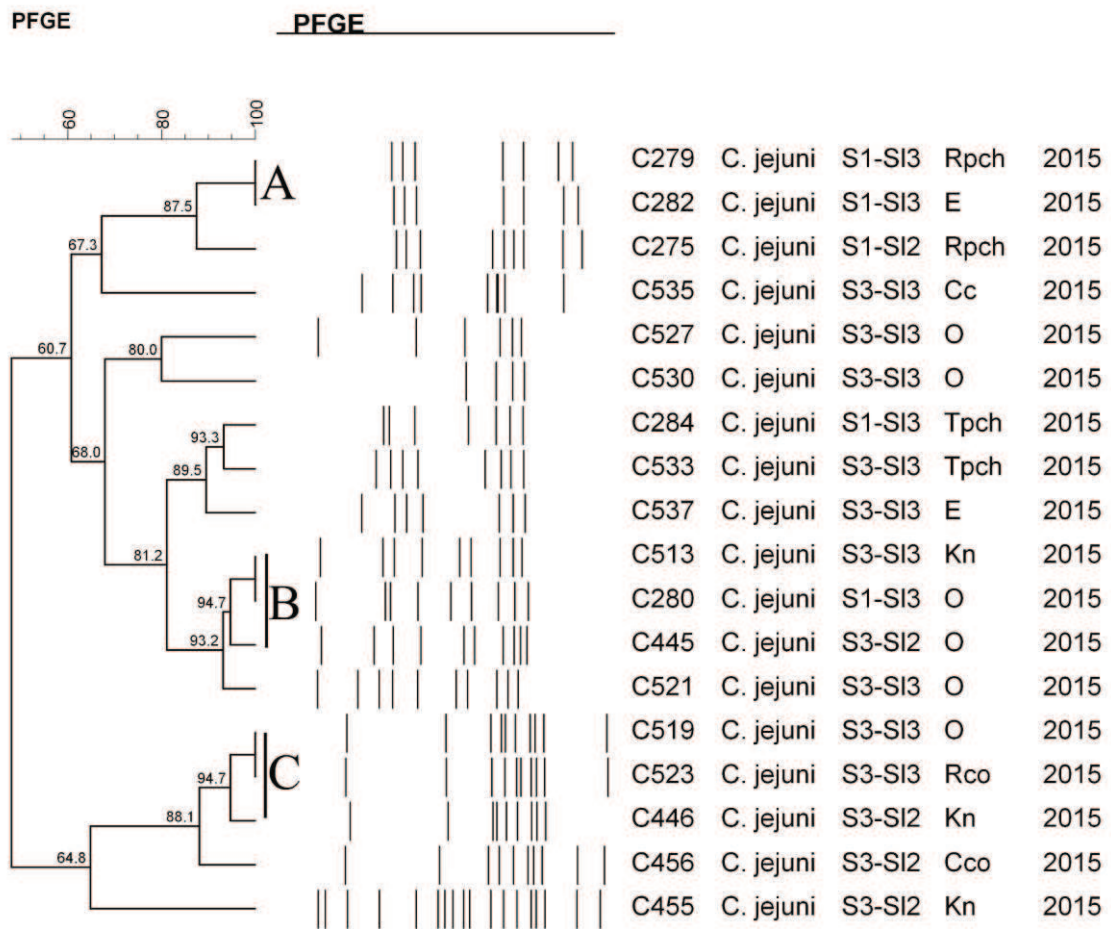
ANEXO I-C6. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en carcasas y ciegos de pollos



ANEXO I-C7. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en carcasas y fómites de planta de faena

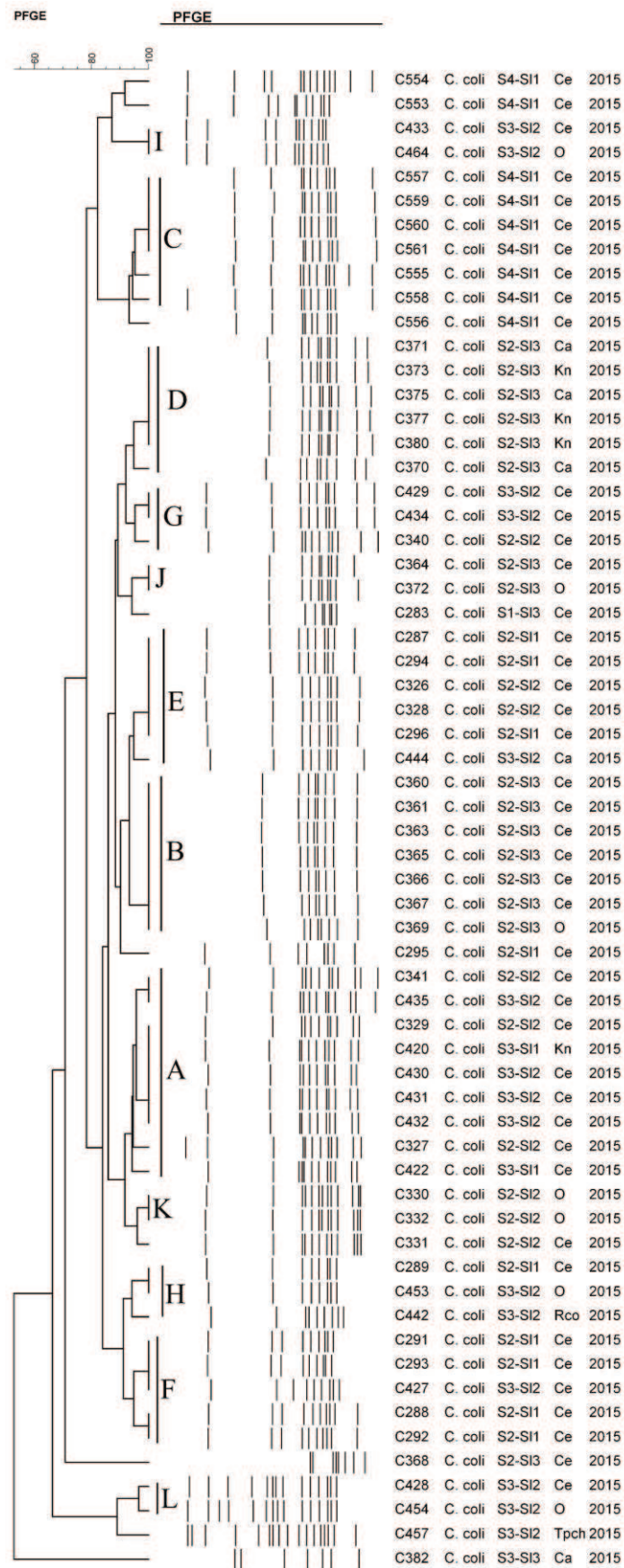


ANEXO I-C8. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en fómites en planta de faena

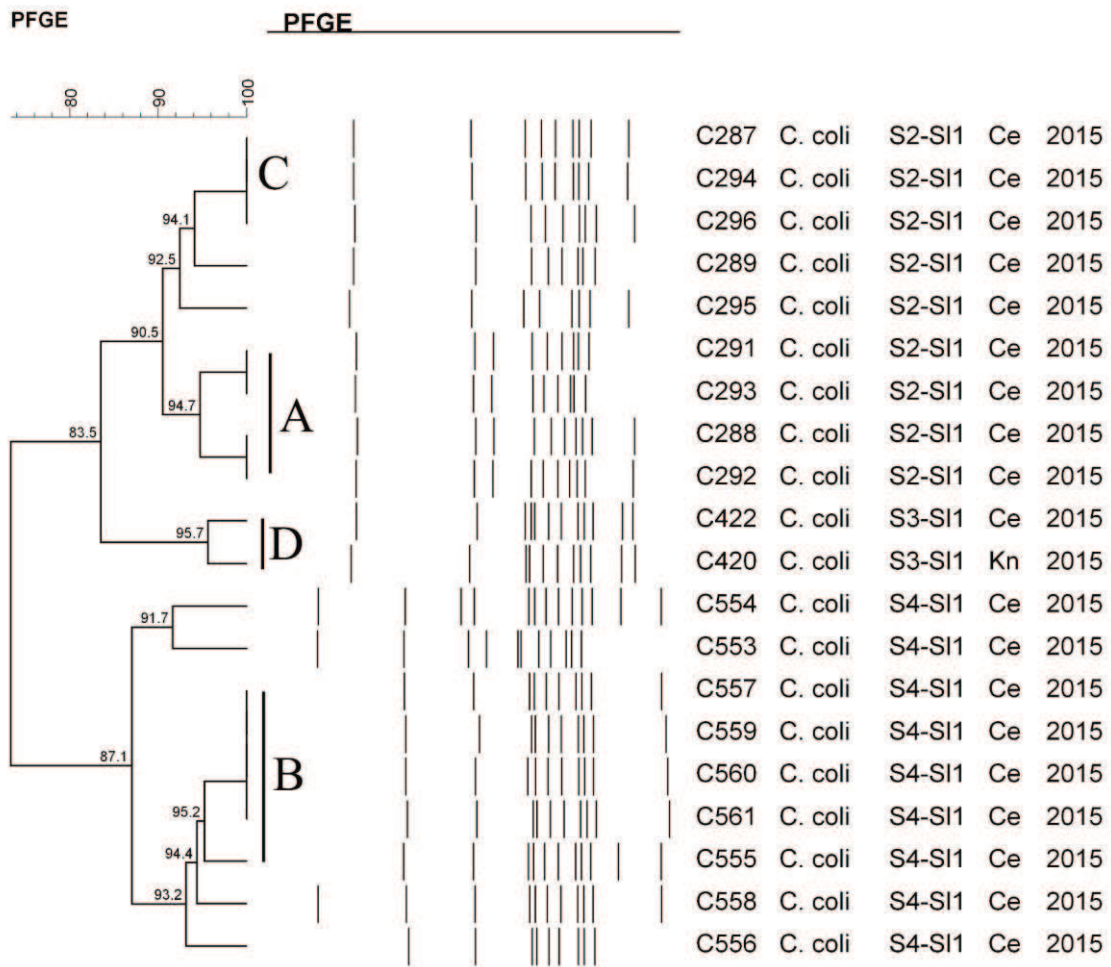


ANEXO I-D
PFGE *Campylobacter coli*
PLANTA DE FAENA

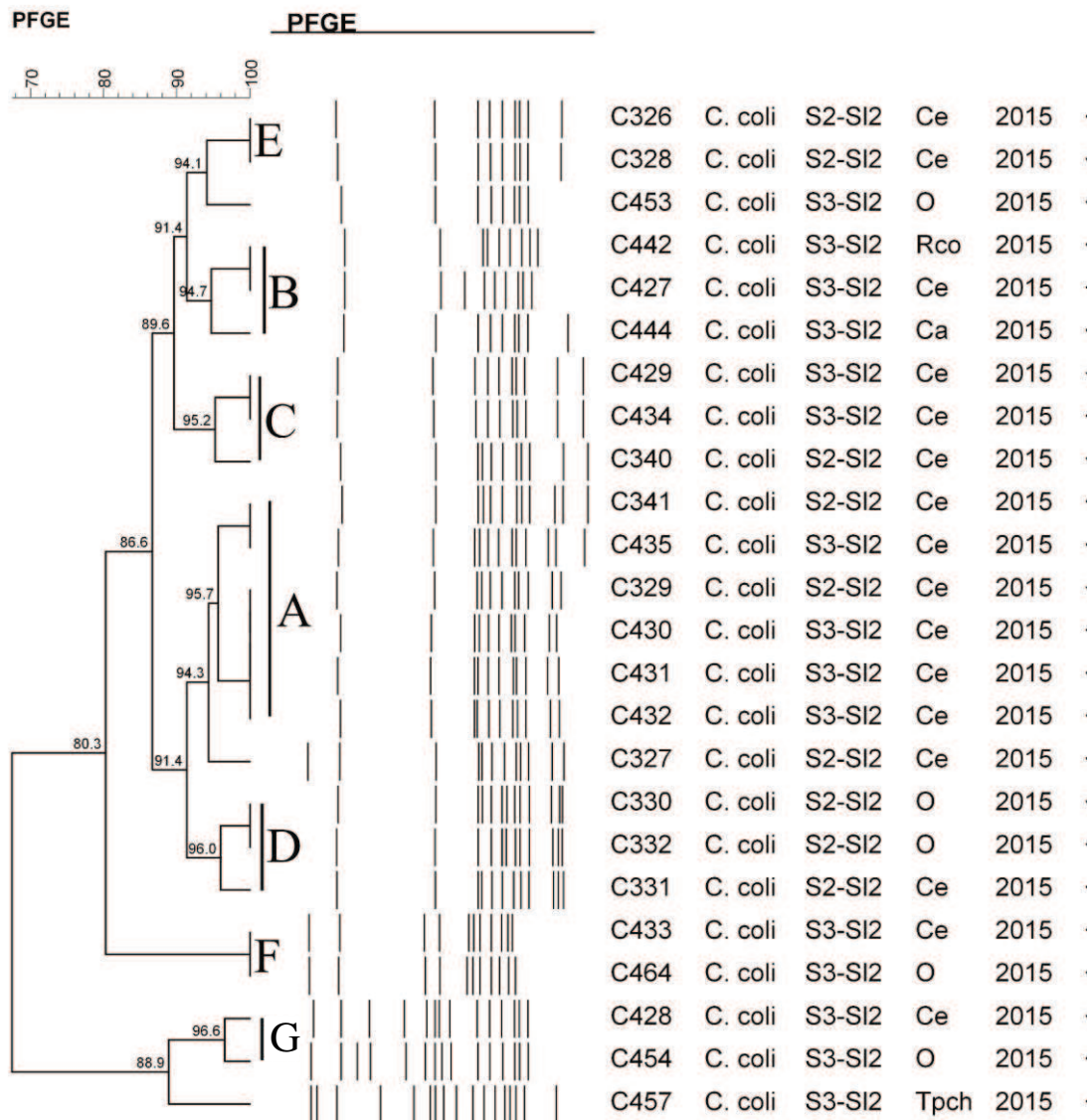
ANEXO I-D1. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* total en planta de faena



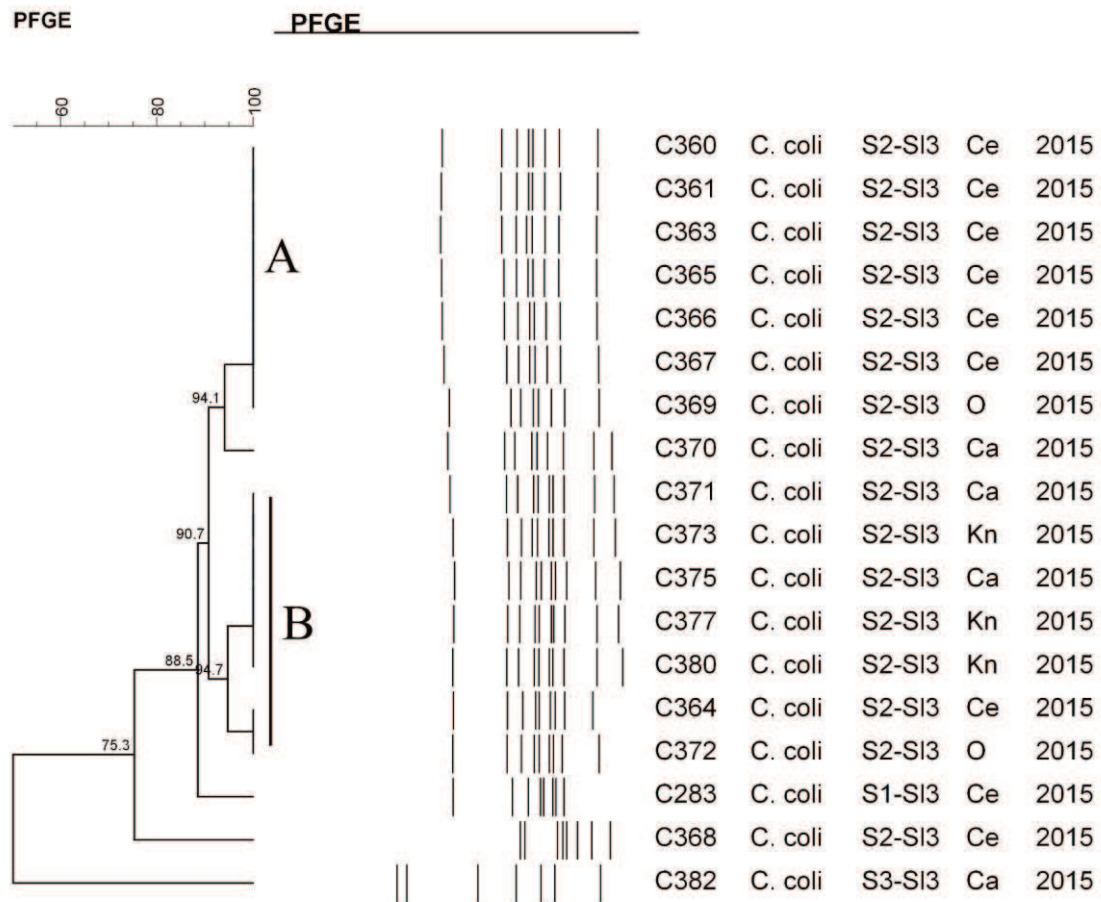
ANEXO I-D2. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en lote de faena 1



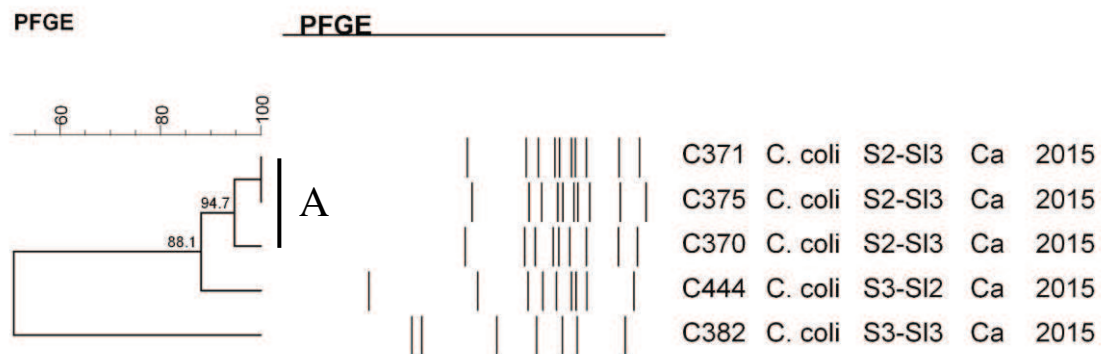
ANEXO I-D3. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en lote de faena 2



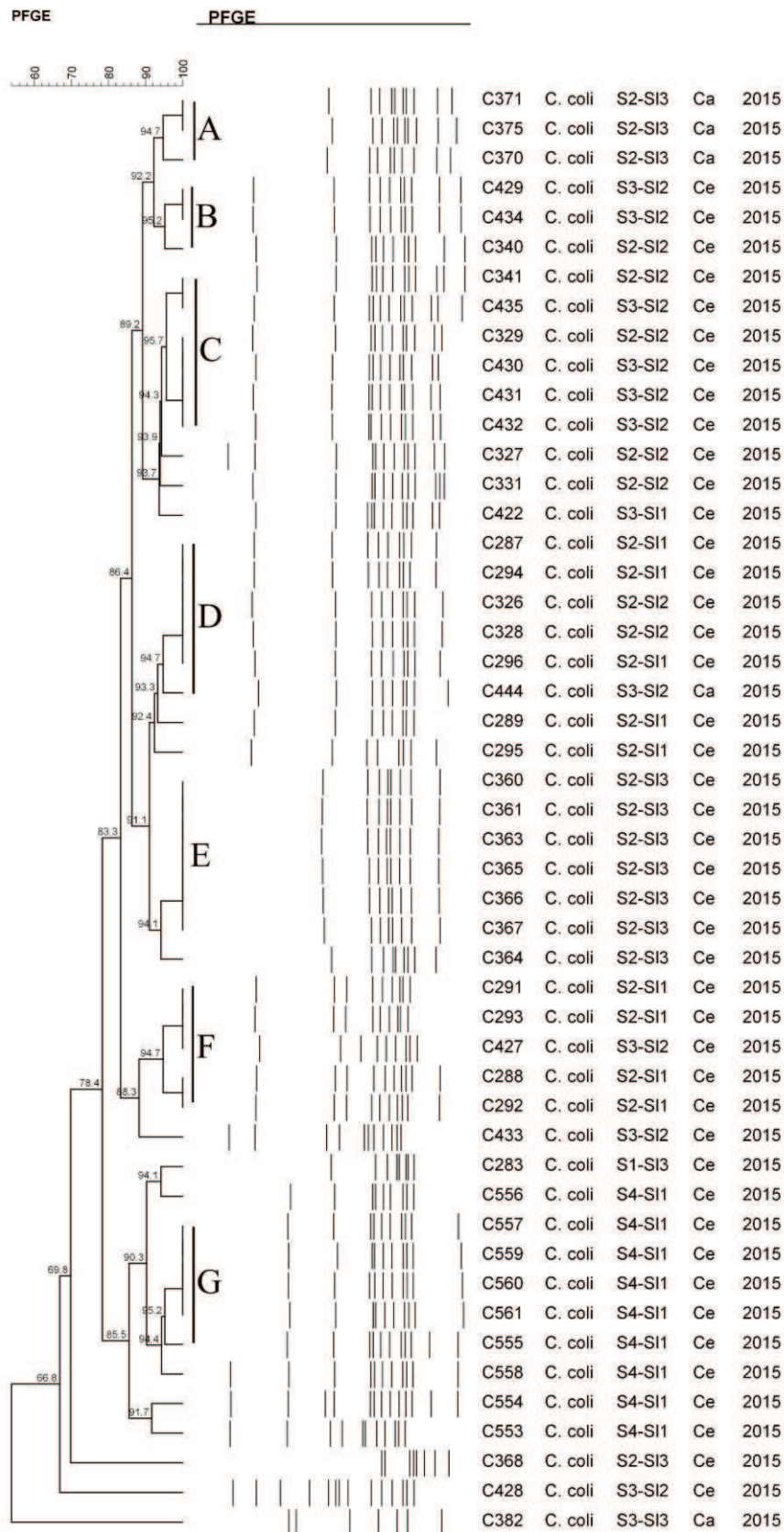
ANEXO I-D4. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en lote de faena 3



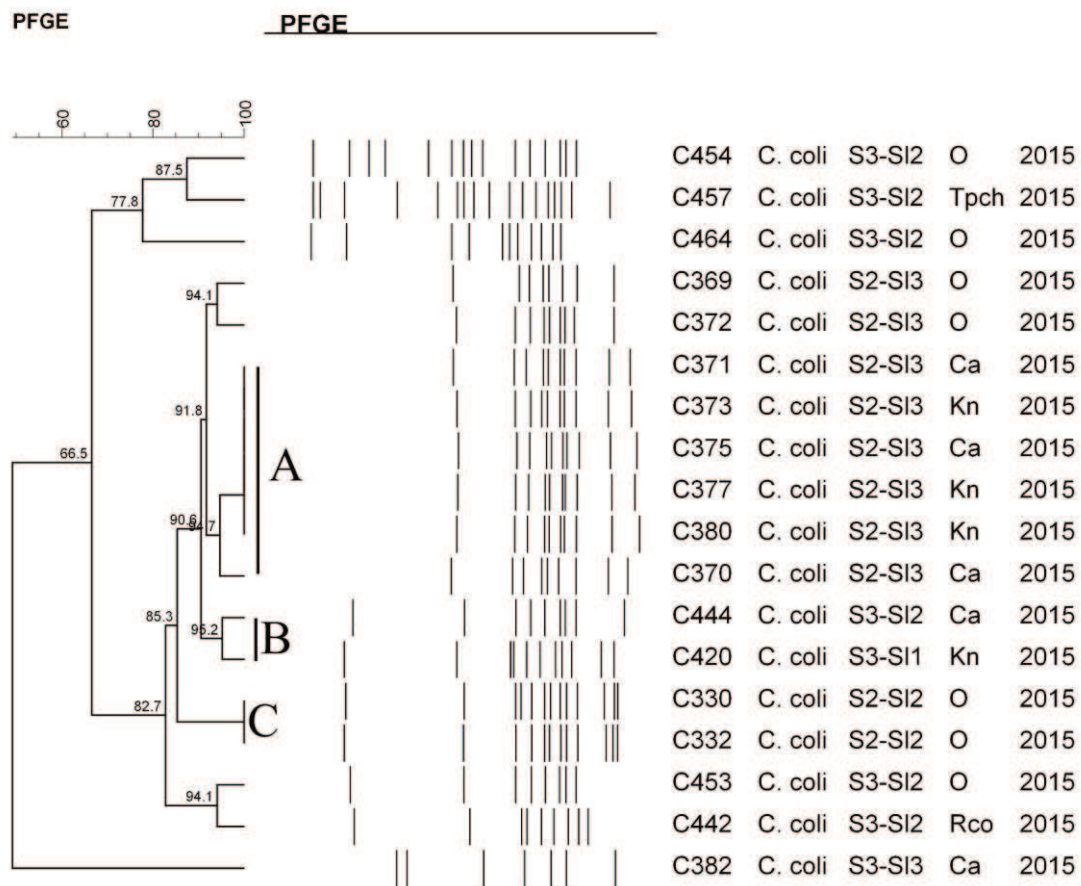
ANEXO I-D5. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en carcasas de pollos



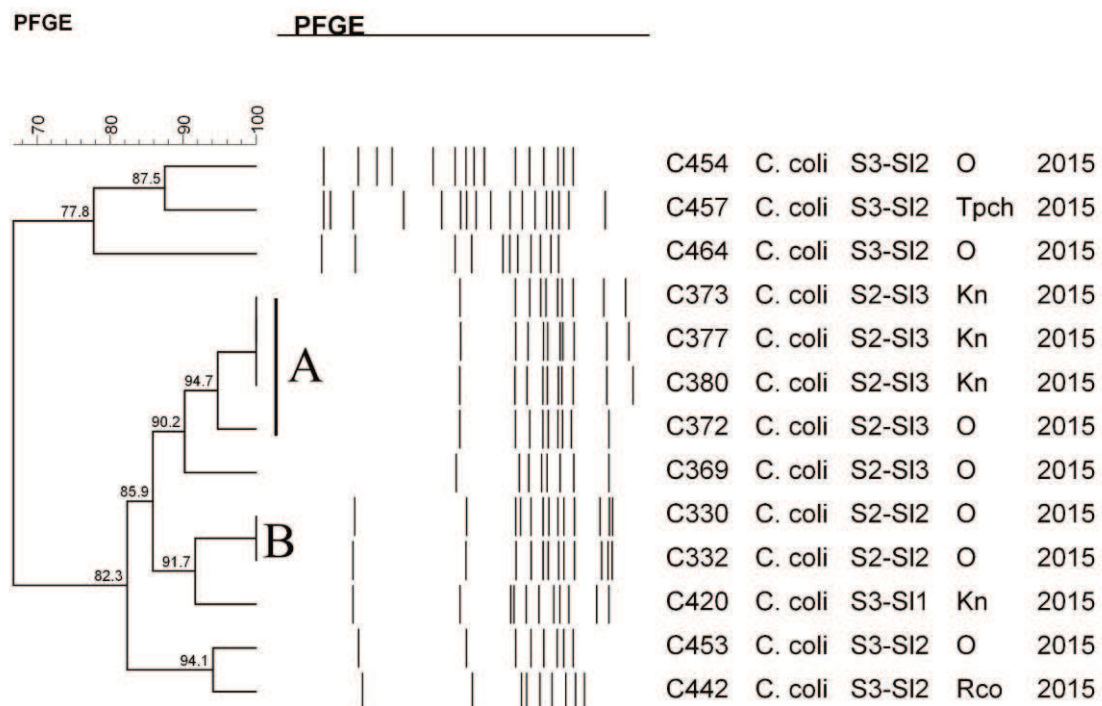
ANEXO I-D6. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en carcasas y ciegos de pollos



ANEXO I-D7. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en carcasas y fómites de planta de faena



ANEXO I-D8. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en fómites en planta de faena



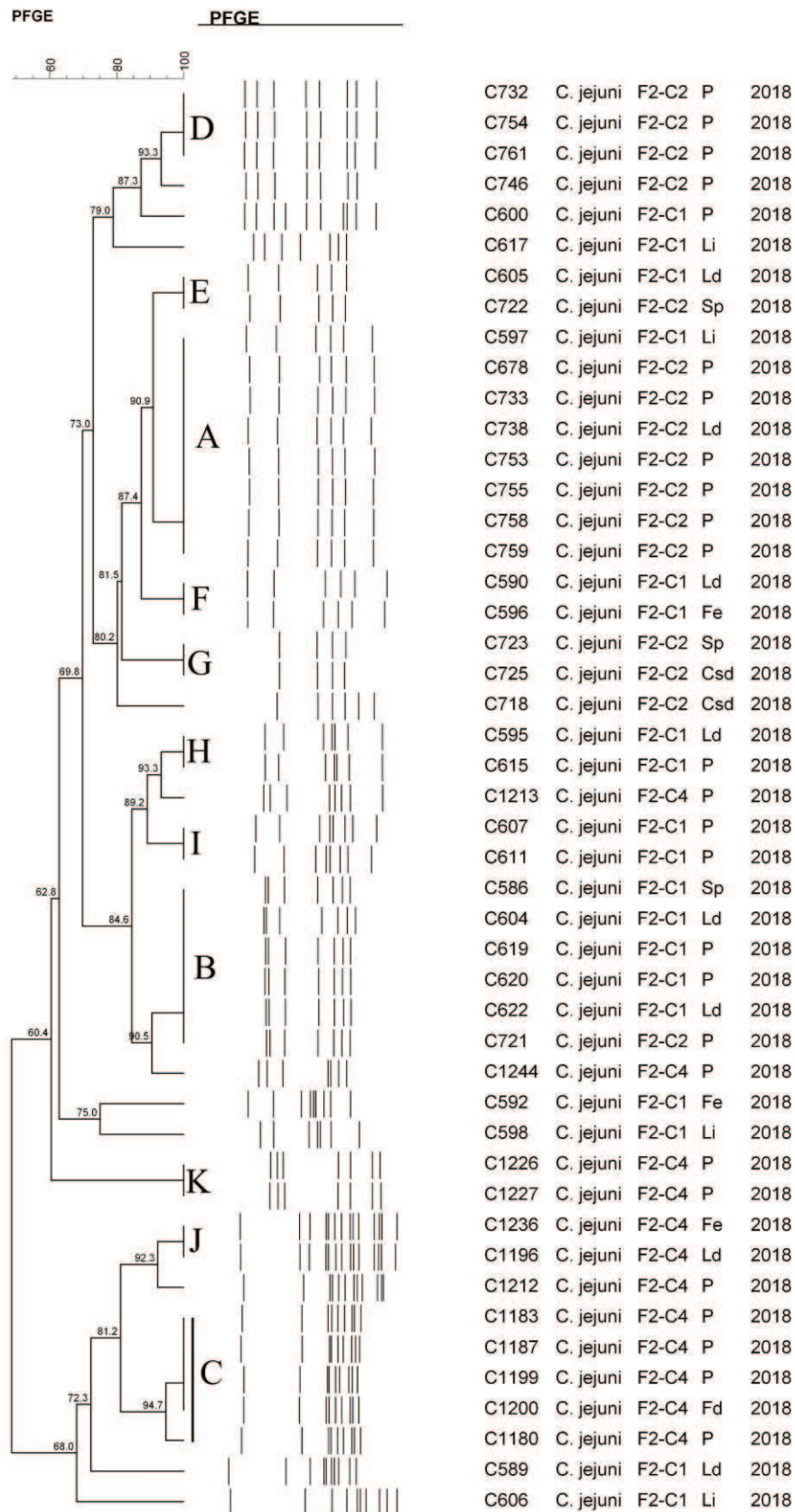
ANEXO I-E

PFGE *Campylobacter jejuni*

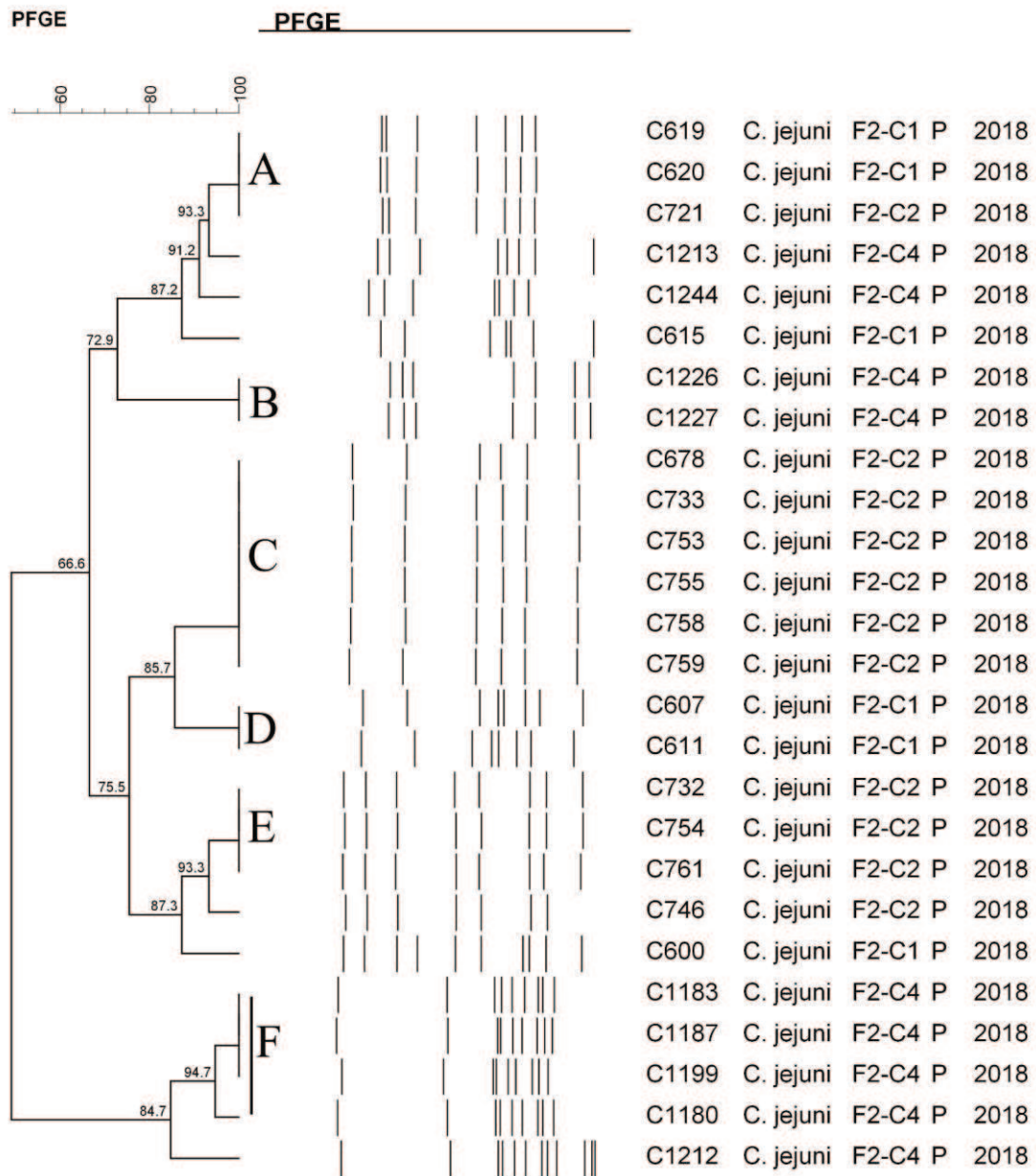
CICLOS SUCESIVOS DE

CRIANZA - GRANJA 2- 2018

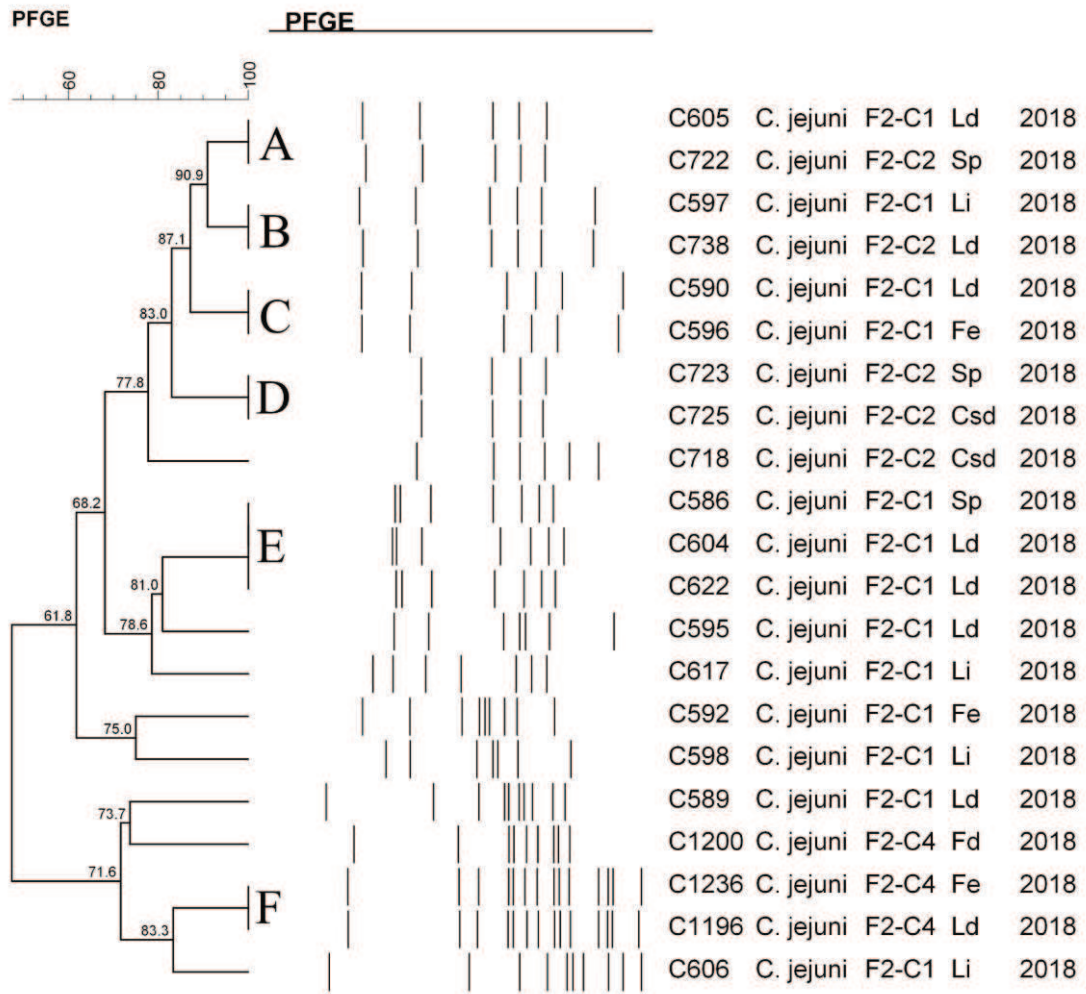
ANEXO I-E1. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* total en granja 2



ANEXO I-E2. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en muestras de pollos en granja 2



ANEXO I-E3. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* en muestras de vectores y fómites en granja 2



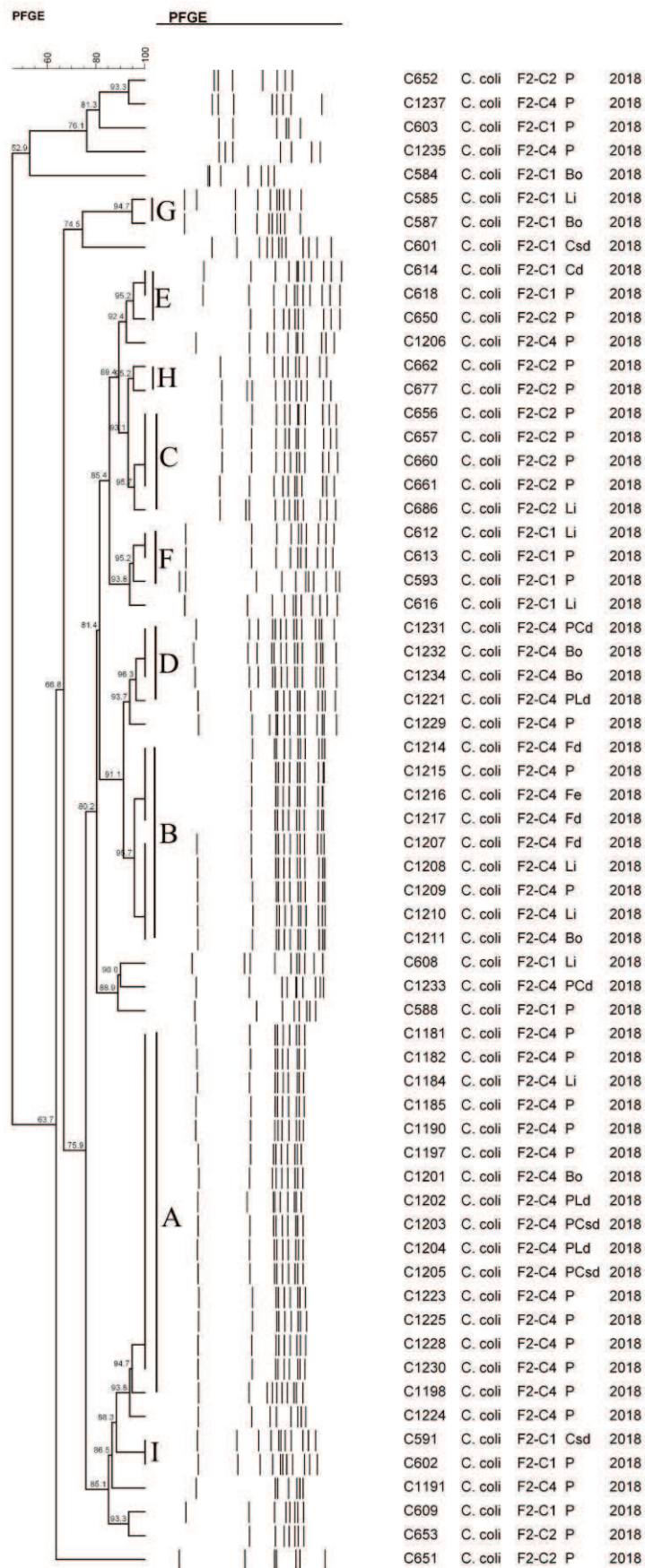
ANEXO I-F

PFGE *Campylobacter coli*

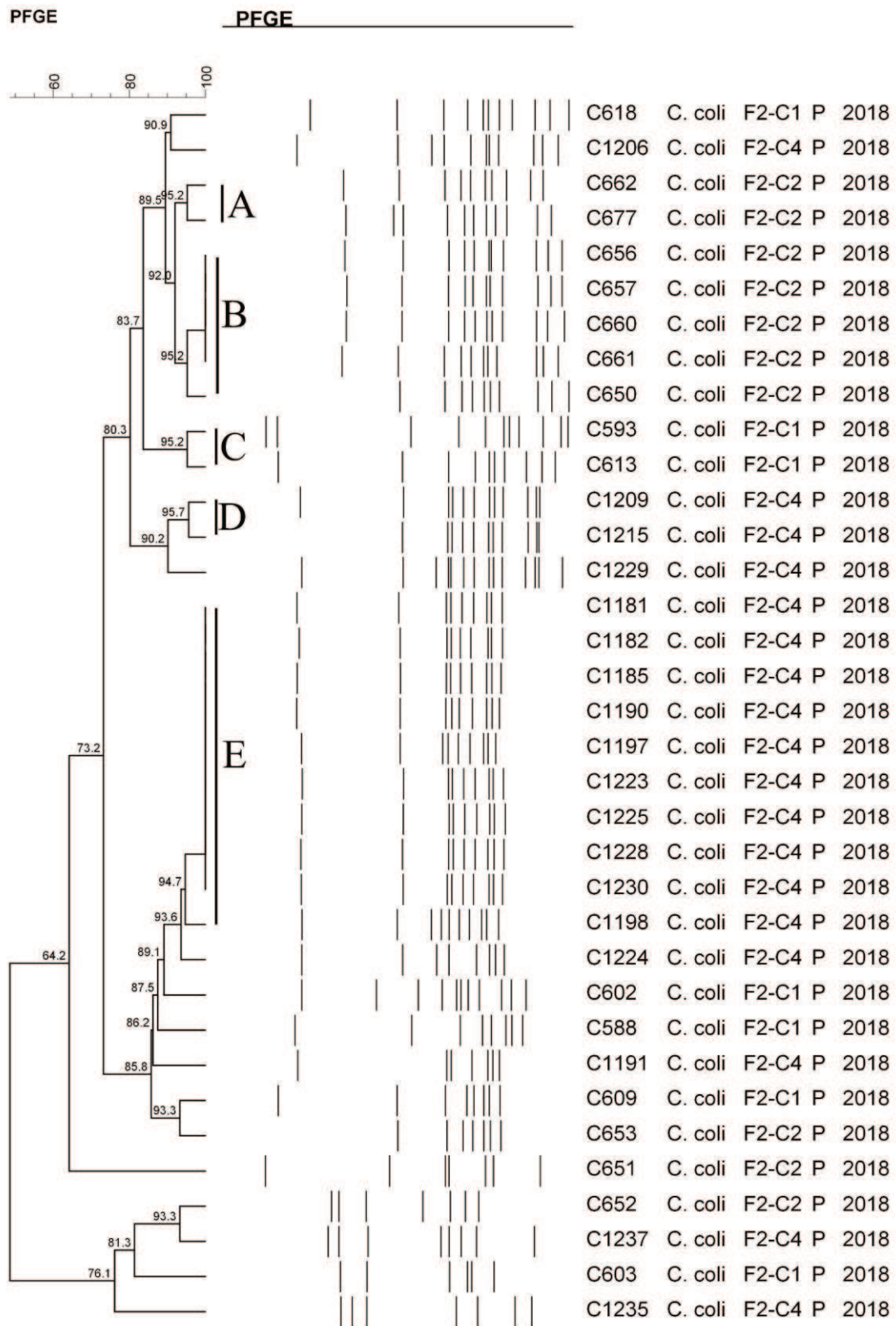
CICLOS SUCESIVOS DE

CRIANZA - GRANJA 2- 2018

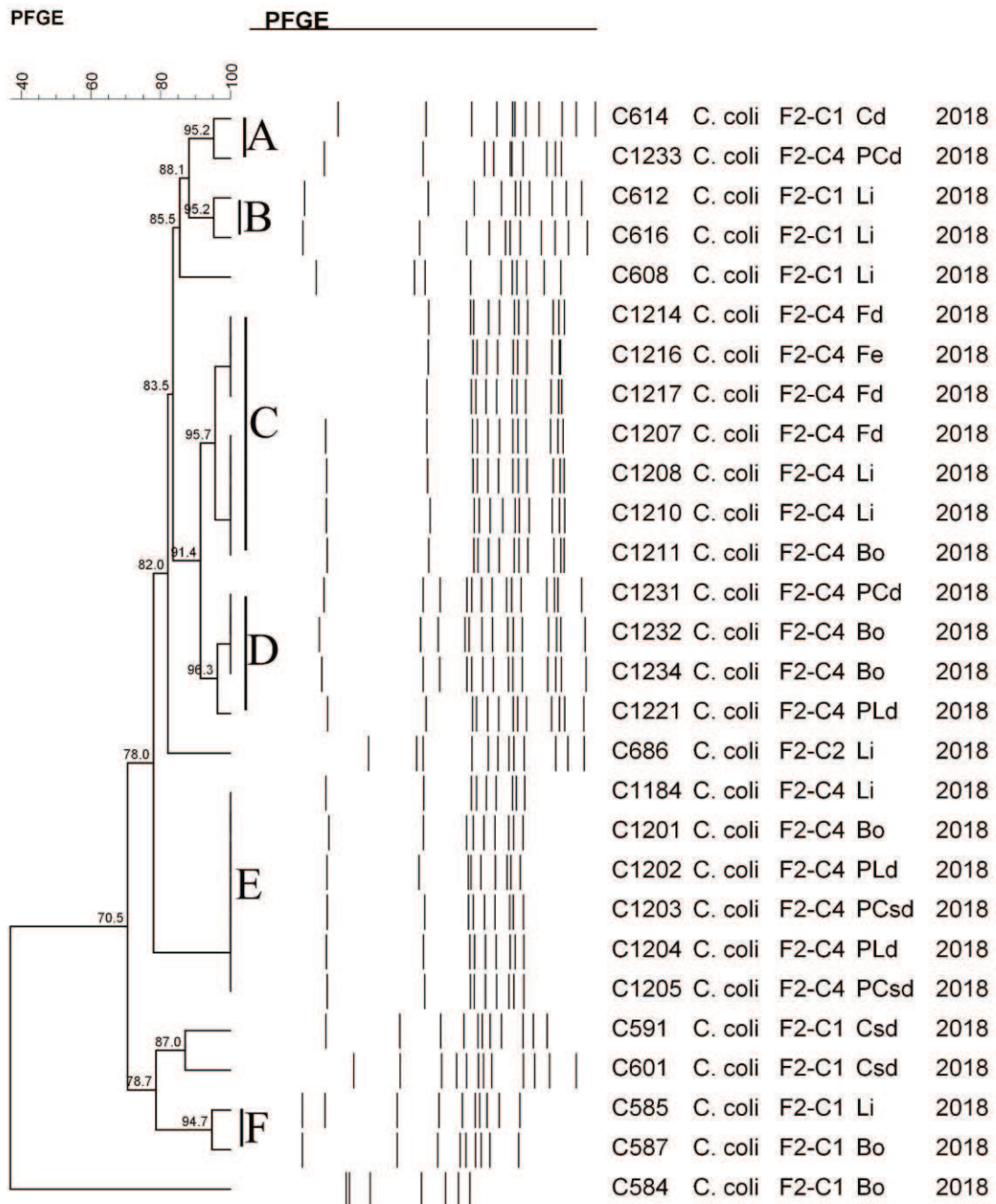
ANEXO I-F1. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* total en granja 2



ANEXO I-F2. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en muestras de pollos en granja 2

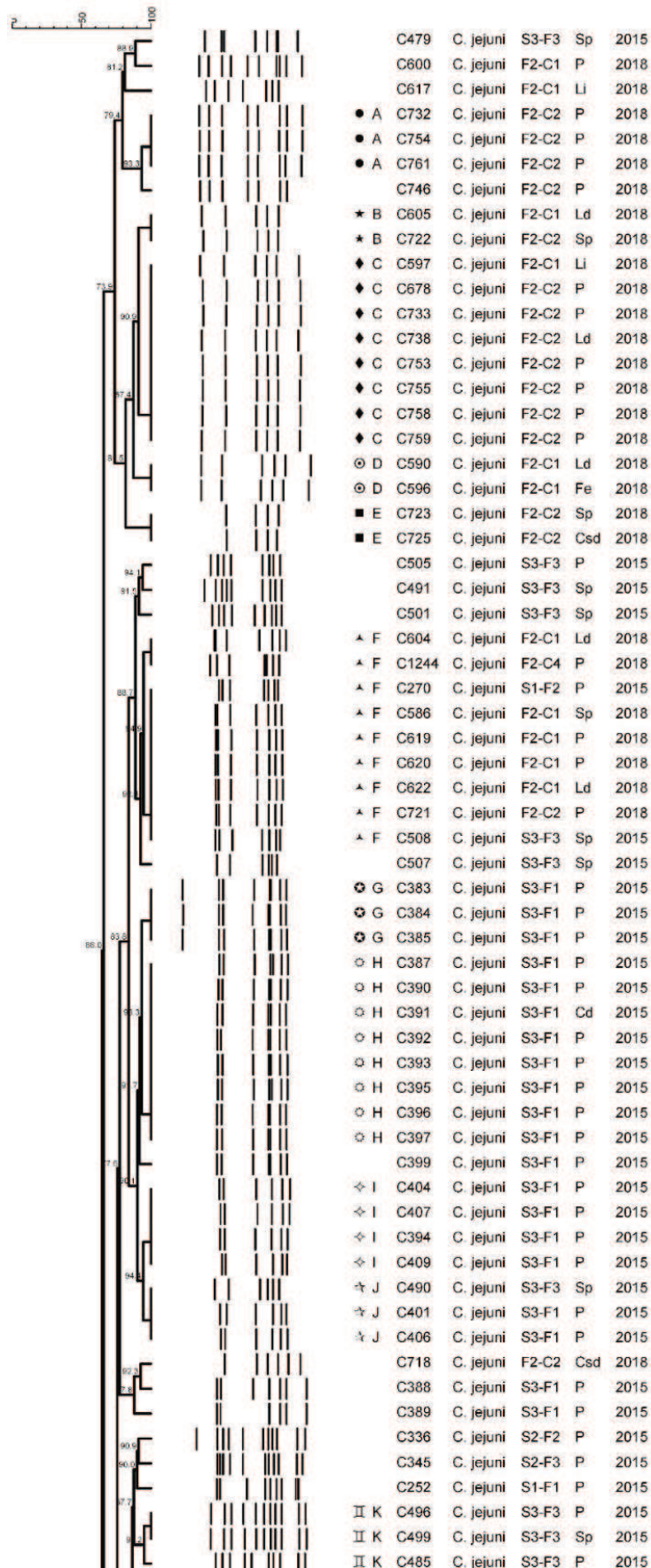


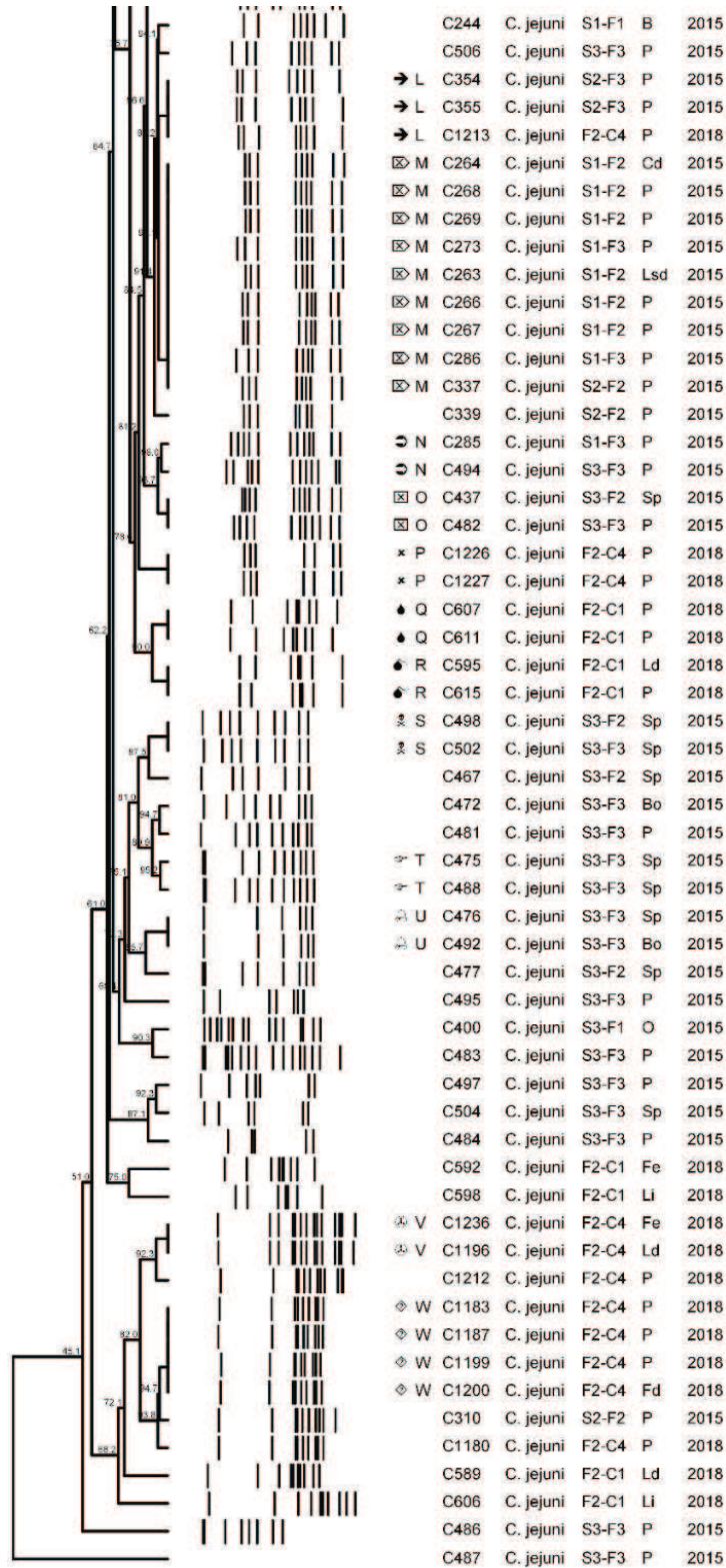
ANEXO I-F3. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* en muestras de vectores y fómites en granja 2



ANEXO I-G
PFGE *Campylobacter jejuni*
GRANJA 2015 y 2018

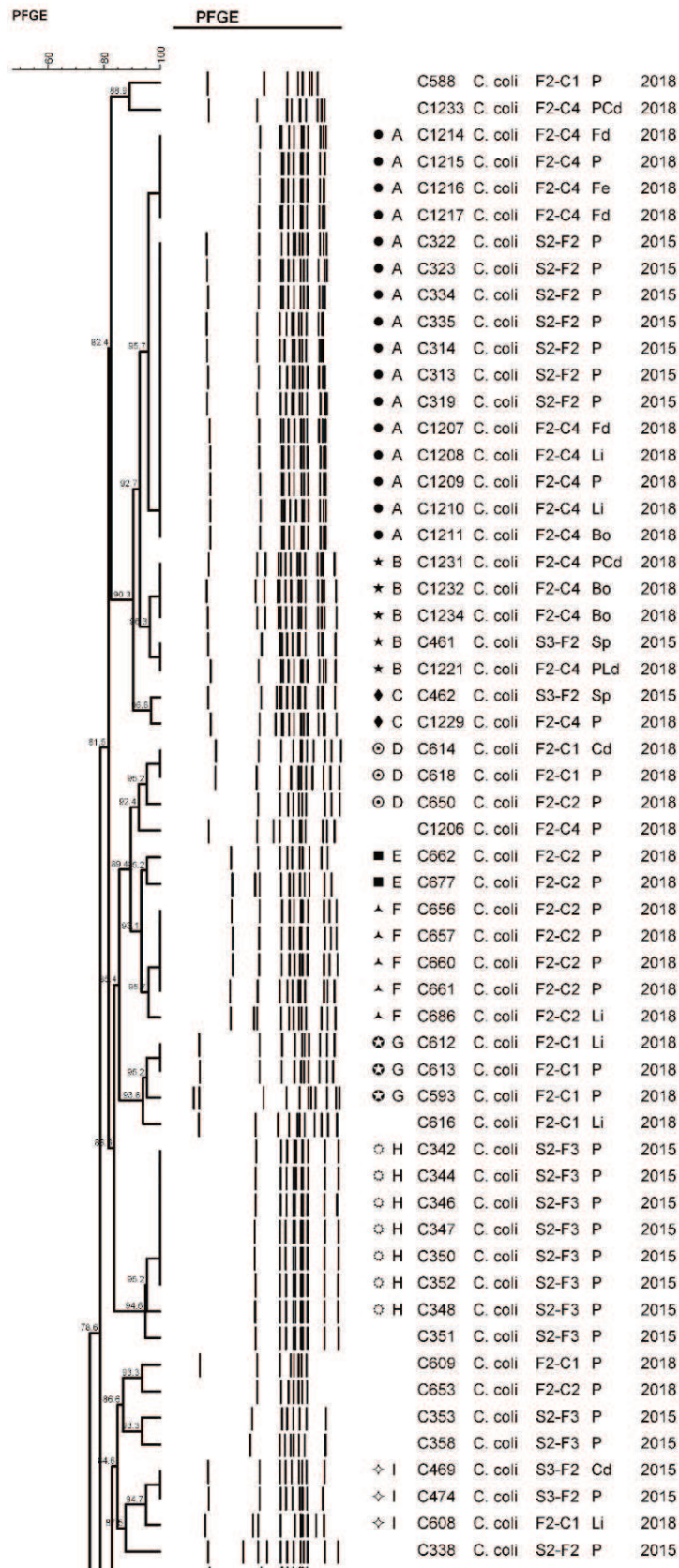
ANEXO I-G1. Dendrograma PFGE *Campylobacter jejuni* total en granja

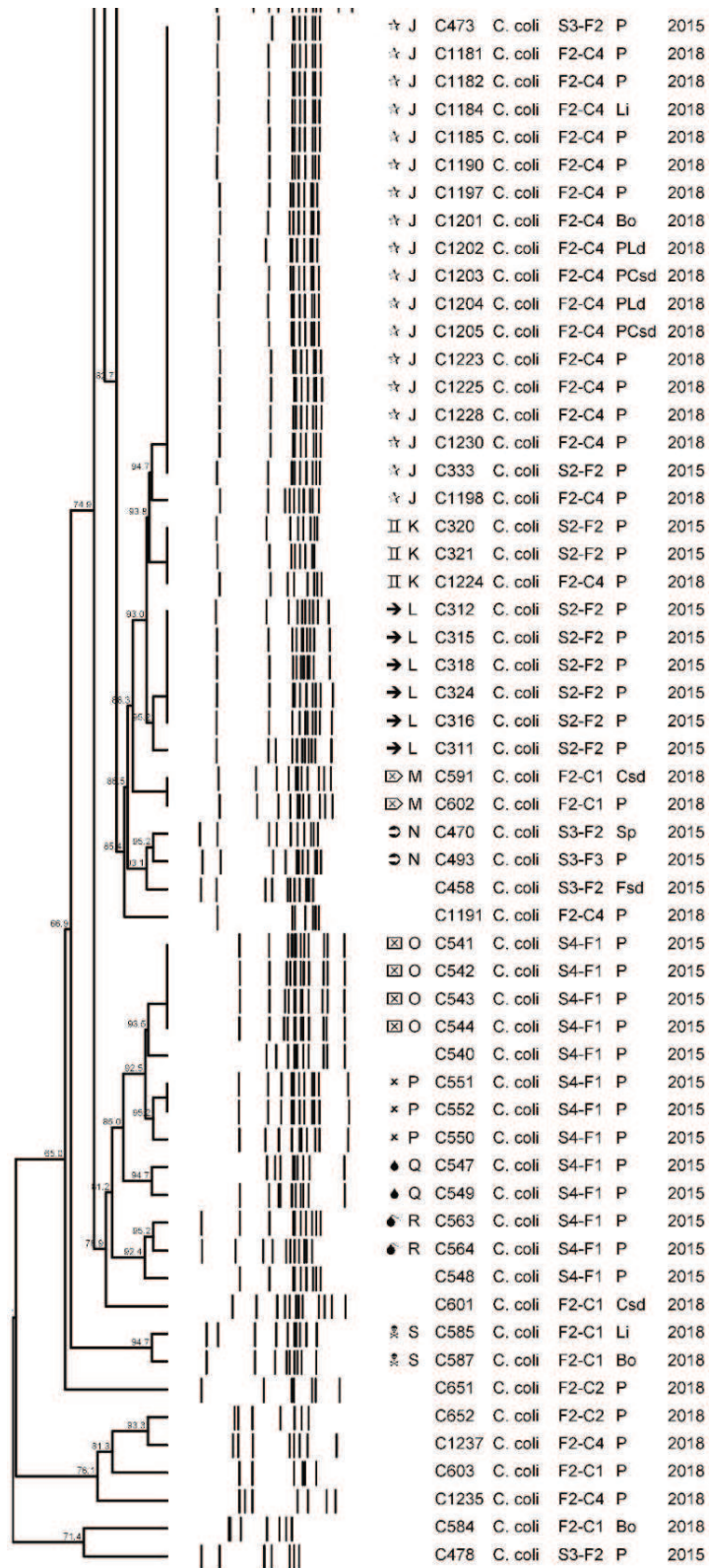




ANEXO I-H
PFGE *Campylobacter coli*
GRANJA 2015 y 2018

ANEXO I-H1. Dendrograma PFGE *Campylobacter coli* total en granja





ANEXO II: Producción Científica

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS

Rosler, E., Fuhr, E. M., Lorenzón, G., Romero-Scharpen, A., Berisvil, A. P., Blajman, J. E., Astesana, D. M., Zimmermann, J. A., Fusari, M. L., Signorini, M. L., Soto, L. P., Frizzo, L. S., Zbrun, M. V. (2017). Presencia de serotipos de *Campylobacter jejuni* O: 19 en la cadena avícola Argentina. Revista Argentina de Microbiología, 49(2), 178-182.

Rosler, E., Signorini, M. L., Romero-Scharpen, A., Soto, L. P., Berisvil, A., Zimmermann, J. A., Fusari, M. L., Olivero, C.R., Zbrun, M. V., Frizzo, L. S. (2019). Meta-analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. Zoonoses and Public Health, 66(4), 359-369.

Rosler, E., Olivero, C., Soto, L. P., Frizzo, L. S., Zimmermann, J., Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., Signorini, M. L., Zbrun, M. V. (2020). Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain. International Journal of Food Microbiology, 326, 108641.

Zbrun, M. V., Rosler, E., Olivero, C. R., Soto, L. P., Zimmermann, J. A., Frizzo, L. S., Signorini, M. L. (2021). Possible reservoirs of thermotolerant *Campylobacter* at the farm between rearing periods and after the use of enrofloxacin as a therapeutic treatment. International Journal of Food Microbiology, 340, 109046.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS:

2016- **ROSSLER, E.**; FUHR, E.M.; LORENZÓN, G.; FUSARI M.L.; BLAJMAN, J.E.; BERISIVIL, A.P.; ASTESANA, D.M.; ROMERO SCHARPEN, A.; ZIMMERMANN, J.A.; FRIZZO, L.S.; SOTO, L.P.; FANTOZZI, C.; ANTONIAZZI, L.; ARCE, S.; FASSANO, A.; FERNANDEZ, C.; ZBRUN, M. V.; SIGNORINI, M.L. Determinación de posibles factores de riesgos asociados a la presencia y difusión de *Campylobacter* termotolerantes en granja de pollos parrilleros y planta de faena. XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2016. Facultad de Ciencias Veterinarias. IV Jornada Latinoamericana II Jornadas de Ciencia y Tecnología 2016. Facultad de Ciencias Agrarias. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2016, Universidad Nacional de Rosario. Casilda – Argentina

2017- **ROSSLER, E.**; FUHR, E.M.; LORENZÓN, G.; BERISVIL, A.P.; OLIVERO, C.R.; FERNÁNDEZ, C.; FANTOZZI, C.; ANTONIAZZI, L.; SIGNORINI, M.L. Presencia de *Campylobacter* termotolerantes en aves silvestres capturadas en granjas comerciales de pollos parrilleros. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2017. Facultad de Ciencias Veterinarias. V Jornada Latinoamericana. III Jornadas de Ciencia y Tecnología 2017. Facultad de Ciencias Agrarias. II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2017, Universidad Nacional de Rosario. Casilda - Argentina

2018- **ROSSLER E.**; ROMERO-SCHARPEN, A.; BERISVIL, A.P.; SIRINI, N.E.; SALUZZO, M.; ZIMMERMANN, J.A.; OLIVERO, C.R.; ANTONIAZZI, L.; FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; SIGNORINI, M.L. Influencia de vectores y fómites en la transmisión de *Campylobacter* termotolerante en crianzas sucesivas de pollos parrilleros en granjas avícolas. VI Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión. Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional del Litoral. Esperanza - Argentina.

2019- **ROSSLER E.**; ZIMMERMANN, J.A.; OLIVERO C.R.; SALUZZO, M.; FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; SEQUEIRA, G.J.; ANTONIAZZI, L.; SIGNORINI, M.L. Evaluación del perfil de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes aislados de granjas comerciales de pollos parrilleros. VII Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión. Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional del Litoral. Esperanza - Argentina.