

Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de Chile

SINDY GUTIÉRREZ^{1,a}, DANIEL ORELLANA^{1,b},
CLAUDIO MARTÍNEZ^{1,2,c}, VERÓNICA GARCÍA MENA^{1,2,d}

Characterization of *Campylobacter jejuni* samples coming from poultry meat and feces

Background: *Campylobacter jejuni* is one of the main causal agents of food borne diseases. Infections with this pathogen are mainly caused by chicken meat consumption. **Aim:** To characterize antibiotic resistance and virulence factors in *C. jejuni* strains obtained from chicken meat and poultry feces in Central Chile. **Material and Methods:** The presence of *C. jejuni* in 30 meat and 40 feces samples from poultry was studied. From these samples, we obtained 40 strains which were characterized at the molecular level for the presence of 16 genes involved in virulence using PCR. In parallel, antibiotic resistance for ciprofloxacin, nalidixic acid, tetracycline, erythromycin, azithromycin, chloramphenicol and ampicillin was analyzed. **Results:** Twenty and 63% of feces and chicken meat samples were positive for *C. jejuni*, respectively. Moreover, a high percentage of strains showed antibiotic resistance, where 27% of strains were resistant to all tested antibiotics, except for azithromycin. Finally, 10% of the strains coming from feces contained 14 out of 16 virulence genes evaluated. Only 23% of the strains did not contain any of these genes. **Conclusions:** A high percentage of feces and chicken meat samples are contaminated with *C. jejuni*. Moreover, these strains show a high genetic and phenotypic diversity represented by their antibiotic resistance profiles and the presence of virulence factors.

(Rev Med Chile 2017; 145: 1551-1558)

Key words: Anti-Bacterial Agents; *Campylobacter jejuni*; Poultry; Poultry Products.

Campylobacter jejuni es una de las principales bacterias que causa gastroenteritis en países industrializados¹. En Chile, *Campylobacter* es el tercer agente causal de diarreas en niños^{2,3}. Es adquirida por consumo de leche no pasteurizada, aguas contaminadas, etc. Sin embargo, se encuentra en altas densidades en el intestino de las aves de corral, como consecuencia, el consumo de carne de ave mal cocida es responsable de 50-80% de los casos de campylobacteriosis⁴.

La campylobacteriosis es una gastroenteritis aguda, autolimitada⁵ y habitualmente no requiere

tratamiento. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos o con infecciones prolongada es necesario el tratamiento con antibióticos⁶, siendo las fluoroquinolonas y los macrólidos los antibióticos comúnmente seleccionados, a pesar del aumento de cepas resistentes a estos^{1,7}.

En este trabajo caracterizamos la susceptibilidad de 40 cepas de *C. jejuni*, obtenidas de heces de aves de corral de crianza doméstica (14) y de carne de pollo de consumo humano (26), a antibióticos de distintas familias, entre ellos macrólidos (eritromicina y azitromicina), por el aumento de

¹Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago (USACH). Santiago, Chile.

²Centro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Universidad de Santiago. Santiago, Chile.

^aMédico veterinario.

^bIngeniero de Alimentos.

^cDoctor en Ciencias, mención Biología.

^dBioquímica. PhD.

Fuente de financiamiento:

Proyecto financiado por Fondecyt 11130148 y Proyecto de inserción a la academia 791220024.

Autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 6 de enero de 2017, aceptado el 28 de diciembre de 2017.

Correspondencia a:

Verónica García Mena

Departamento de Ciencias y

Tecnología de los Alimentos.

Facultad Tecnológica. Universidad de Santiago de Chile.

Obispo Manuel Umaña 050.

Edificio de Alimentos. Estación

Central, Santiago, Chile.

veronica.garcia@usach.cl

cepas resistentes, y quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) por ser utilizado en la industria avícola. Además, evaluamos la presencia de genes involucrados en virulencia, incluyendo genes que participan en adhesión, invasión, sobrevivencia, producción de toxina y en transporte de sideróforo. Estos genes entregan una panorámica general de la virulencia^{8,9}, aunque los genes que participan en la infección de *Campylobacter* involucran otros procesos.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y medios de cultivos

Las 40 cepas analizadas fueron obtenidas a partir de heces de aves de corral o carne de ave disponible a la venta según los protocolos descritos anteriormente¹⁰. Las muestras de carne de pollo fueron obtenidas de supermercados (15 muestras) y carnicerías (15 muestras) de las comunas de Estación Central, Quinta Normal y Santiago Centro, mientras que 40 muestras de heces fueron obtenidas de aves de crianza doméstica de las comunas de Talagante, Casablanca, Melipilla y Cauquenes. Diluciones de las muestras fueron sembradas en agar selectivo mCCDA (Oxoid) y posteriormente incubadas a 42°C por 48 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se tomaron a lo menos 8 colonias de cada muestra positiva y fueron cultivadas en agar tripticasa de soya 5% v/v sangre de cordero. Posteriormente, se analizó la morfología de las bacterias por microscopía¹⁰ y aquellas seleccionadas se cultivaron en agar tripticasa de soya 5% v/v sangre de cordero para posteriores análisis. Las colonias obtenidas en esta etapa son denominadas aislados y se almacenaron a -80°C en caldo Brucella 30% v/v de glicerol.

Identificación de cepas de C. jejuni

Las cepas de *C. jejuni* fueron identificadas a través de la prueba de hidrólisis del hipurato y confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹¹. Con el fin de establecer que las colonias correspondían a cepas diferentes se realizó un RAPD (del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*) usando el primer AP4¹². Los perfiles electroforéticos fueron analizados utilizando el programa GelJ v 2,0.¹³ La identificación de cepas se realizó por el coeficiente de correlación de Dice y el algoritmo de *clustering* UPGMA (del inglés

Unweighted Pair-Group Method with Averages) con una tolerancia de optimización de 5%. Aquellos aislados que tenían un perfil de RAPD particular y distinto a otros fueron denominados cepa.

Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

Se analizó la susceptibilidad a los antibióticos mediante dilución en agar para los antibióticos cloranfenicol y eritromicina, epislometría (E-test) para azitromicina, ampicilina y eritromicina y sensidiscos para ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina y ácido nalidíxico. Los puntos de corte para definir una cepa susceptible, resistente o intermedia se definieron según lo descrito anteriormente^{14,15}. Se utilizó el método sensidiscos y E-test por su fácil implementación, además, E-test es cuantitativo. En el caso de eritromicina se utilizó, también, dilución en agar para confirmar los resultados obtenidos con otros métodos.

Análisis de PCR de genes de virulencia

Un total de 16 parejas de partidores fueron utilizados para evaluar la presencia de genes de virulencia: adhesión y colonización (*flaA*, *flaC*, *cadF*, *dnaJ*, *cbrR*), invasión y virulencia (*virB11*, *ciaB*, *pldA*), sobrevivencia (*racR*, *sodB*, *htrA*, *clpA*), producción de toxina (*cdtA*, *cdtC*) y transportadores de sideróforos (*ceuE*) y *wlaN* por mimetizar a los gangliosidos¹⁶. En este estudio no fue incluido el gen *cdtB*, debido a que no fue posible estandarizar su amplificación. Como control positivo se utilizó ADN (ácido desoxirribonucleico) de las cepas de referencias de *C. jejuni* ATCC33560, NCTC13367 y ATCC43430. Como control negativo se utilizó ADN de *Escherichia coli* ATCC25922.

Resultados

Identificación de cepas de C. jejuni

Los resultados indican que 63,3% de las muestras de carne resultaron positivas para *Campylobacter*, las cuales provienen de carnicería (8) y supermercados (11). Además, 20% de las muestras de heces fueron positivas (Tabla 1).

A partir de cada muestras positivas para *Campylobacter* se seleccionaron entre 8 y 20 colonias y se analizaron por PCR con el fin de determinar la especie¹¹. En esta etapa cada una de las colonias fue tratada en forma independiente y corresponden a un aislado. Posteriormente, y con el fin de

determinar perfiles genéticos distintos e identificar cepas se realizó RAPD (Figura 1). Así, colonias obtenidas de una misma muestra con perfiles de RAPD diferentes corresponde a cepas distintas. De esta forma se obtuvo 151 aislados, de los cuales 75 provienen de heces y 76 de carne de pollo. Luego del análisis de RAPD, se determinó que 145 eran cepas distintas, pues poseían un perfil genético distinto. En la muestra 7 (heces provenientes de Talagante) se obtuvo un total de 17 aislados, de las cuales, 13 de ellas se encontraban muy cercanas en el árbol filogenético (dato no mostrado). Por otro lado, de los 5 aislados obtenidos en la muestra 47 (carne proveniente de supermercado) se observaron 3 cepas distintas molecularmente, aunque muy cercanas. Esta observación indica que una muestra de carne o de heces puede estar contaminada por más de una cepa de *C. jejuni*.

A partir de estos resultados se seleccionaron 40 cepas: 14 cepas obtenidas desde heces y 26 desde carne de pollo.

Resistencia antibióticos de cepas de *C. jejuni*.

A las cepas antes seleccionadas, se evaluó la resistencia a los antibióticos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico, azitromicina, ampicilina y cloranfenicol.

Los resultados indican que 27% de las cepas, todas obtenidas de carne, eran resistentes a todos los antibióticos analizados, excluyendo azitromicina (Figura 1 y Tabla 2). Por otro lado, ninguna de las cepas obtenidas desde heces fue resistente a cloranfenicol (MIC \geq 32), y mostraban MIC (concentración inhibitoria mínima) que variaban

Tabla 1. Muestras contaminadas con *C. jejuni*

	n de muestras	Positivas	% Positivas
Heces	40	8	20
Carne de pollo	30	19	63,3
Total	70	27	38,6

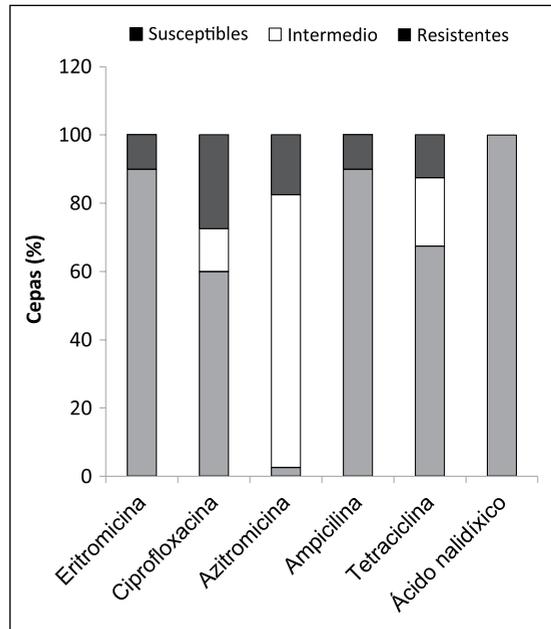


Figura 1. Distribución de las cepas de *C. jejuni* respecto a su susceptibilidad a los antibióticos. Clasificación de las 40 cepas analizadas para los antibióticos. En negro: cepas susceptibles, en blanco: cepas con susceptibilidad intermedia, en gris: cepas resistentes.

Tabla 2. Resultados de susceptibilidad a los antibióticos de cepas de *C. jejuni* analizados por dilución en agar, E- test o sensidiscos

Antibiótico	% R (MIC)	% R (E-test)	Distribución de los resultados se sensidiscos (%)		
			S	I	R
Eritromicina	87,5	90,0	2,5	10	87,5
Tetraciclina	77,1	ND	17,5	12,5	70
Cloramfenicol	55,3	ND	ND	ND	ND
Ciprofloxacina	ND	ND	27,5	12,5	60
Ácido nalidíxico	ND	ND	30,0	0	70
Ampicilina	ND	90,0	ND	ND	ND
Azitromicina	ND	2,5	ND	ND	ND

ND: No determinado, S: Susceptible, I: Intermedio, R: Resistente.

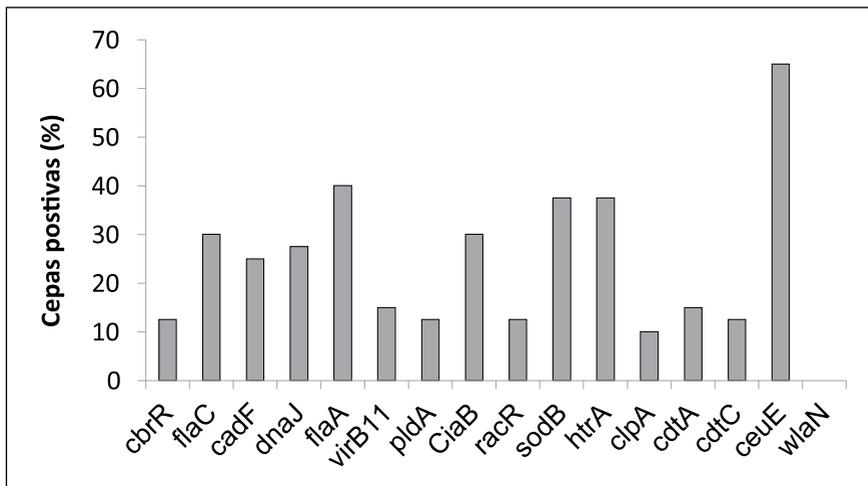


Figura 2. Presencia de genes relacionados con virulencias de *C. jejuni*. En las 40 cepa seleccionadas y mediante PCR se analizó la presencia de 16 genes importantes para la virulencia de *C. jejuni*.

entre 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo cual se clasificaron en el rango intermedio (entre 0,12 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, 77% de las cepas obtenidas desde carne fueron resistentes a este antibiótico.

Los resultados de MIC mediante el método de dilución en agar para eritromicina mostraron un alto porcentaje de cepas resistentes (87,5%). Para confirmar esta observación se realizó el análisis de susceptibilidad de las cepas mediante sensidiscos y E-test, observando que entre 87,5 y 90% de las cepas eran resistentes a eritromicina. Las cepas Cj123 y Cj48 resultaron con MIC de $\leq 0,125$ y $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, mediante el método de dilución en agar. Sin embargo, en el ensayo de E-test su MIC fue de ≥ 256 y $64 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, y por sensidiscos no presentaban halo de inhibición, por lo cual fueron clasificadas como resistentes.

Por otro lado, 60% de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina, todas provenientes de carne de pollo. Las cepas obtenidas desde heces presentaban halos de inhibición que variaban entre 21 y 40 mm, por lo tanto se clasificaron como susceptible o intermedio. Respecto a ácido nalidíxico, solo una cepa proveniente de carne de pollo resultó susceptible. Sin embargo, en cepas provenientes de heces se observó más variedad, observando 3 cepas resistentes: la cepa Cj32 no presentaba halo de inhibición y las cepas Cj61 y Cj36 presentaban un halo de 14 mm. Por otro lado, las cepas provenientes de heces resistentes a ácido nalidíxico fueron de susceptibilidad intermedia a ciprofloxacina.

En cuanto a azitromicina, del total de muestras 2 cepas fueron resistentes, con un MIC de 64 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, para ampicilina, todas las cepas de carne fueron resistentes y en cepa de heces, 4 cepas resultaron susceptibles.

Factores de virulencia

Se evaluó la presencia de genes relacionados con virulencia en las cepas obtenidas observando que el gen más frecuente fue *ceuE* (en 62,5% de las cepas). Por otro lado, ninguna cepa presentó el gen *wlnA*. Las cepas Cj22, Cj28, Cj29 y Cj32, provenientes de heces, fueron las que presentaron mayor número de genes (14 de 16). Además, estas cepas fueron las más susceptibles a los antibióticos, excepto la cepa Cj22 que fue resistente a azitromicina. Por otro lado, la cepa Cj119 fue la cepa proveniente de carne que mostró mayor presencia de genes de virulencia (10 de 16). Además, 9 cepas no presentaron ninguno de los genes evaluados, 5 cepas de heces y 4 de carne (Figura 2).

Discusión

C. jejuni es una bacteria que se encuentra en alta concentración en el tracto digestivo de las aves de corral y, en consecuencia, una alta cantidad de carcasas de pollos se contaminan^{17,18}.

En este estudio se observó que nuestro país no es la excepción. Así, 63,3% de las muestras de carne de pollo resultaron positivas para esta bacteria. Estudios anteriores indican que durante

la evisceración se produce la mayor contaminación, alcanzando 54% de carcasas contaminadas, aunque el proceso de congelamiento disminuye la cantidad de bacterias, el número de carcasas contaminadas se mantiene¹⁹. Este porcentaje de carne contaminada es similar a lo reportado en otros países: en Canadá, 62% de las muestras de carne de pollo resultaron positivas para *Campylobacter*²⁰, 49,5% en España²¹ y en 83,3% en el Reino Unido²². En América del Sur, la situación es similar: en Argentina²³ 87,8% de las carnes de pollo presenta *C. jejuni*, 68,8% en Brasil²⁴ y en Chile, entre 54 y 90%¹⁹. Asimismo, 92,9% de hígados de pollo reportan la presencia de *Campylobacter*²⁵.

Por otro lado, 20% de las muestras de heces fueron positivas para *C. jejuni*, estos resultados son similares a los reportados en el sur de Chile, en donde 34% de las heces de aves presentan *C. jejuni*²⁶ y 25,7% de heces de gallinas presentan *Campylobacter sp.*²⁷ y entre 45% y 100% en otras aves²⁸. Respecto al tipo de crianza de las aves, se ha observado una mayor prevalencia de *Campylobacter sp.* en crianza doméstica, respecto a aves de poblaciones confinadas²⁹.

Por otro lado, se ha descrito que las carcasas de pollo pueden estar contaminadas con más de una cepa de *C. jejuni*³⁰, lo cual fue confirmado con nuestros resultados, pues muestras de heces y de carne tienen más de una cepa, según el patrón molecular observado por RAPD. Así, 50% de las muestras positivas de heces tiene 2 cepas distintas y 89,5% de las muestras positivas de carne tienen 2 o 3 cepas distintas. Esto último puede ser reflejo de una contaminación cruzada en las vitrinas de venta de pollo a granel. Esta coexistencia de cepas ha sido observada en biopelículas³¹ y en pacientes con Guillian Barré³².

Por otro lado, los resultados muestran un porcentaje alto de cepas resistentes a ciprofloxacina en cepas obtenidas desde carne de pollo, similar a lo observado anteriormente^{35,36}. Esto se relaciona con un aumento de las cepas resistentes a este antibiótico en pacientes. En Chile se ha descrito un aumento en las cepas resistentes a este antibiótico obtenidas coprocultivos de pacientes en Santiago (32,4% durante el año 2008)³⁷, lo que difiere de lo observado años atrás en el sur de Chile, en donde el 100% de los aislados clínicos eran susceptibles a este antibiótico³⁸. De manera similar en Beijing, China, se describió la resistencia a antibióticos de aislados clínicos desde el año 1994 al 2010,

observando un aumento en la resistencia a ciprofloxacina en el tiempo, esto mismo se observó con tetraciclinas y, en forma menos importante, con macrólidos³⁹. Nuestros resultados muestran una alta cantidad de cepas resistentes a eritromicina, preferentemente en cepas obtenidas de carne de pollo (92,6%), lo que difiere a lo reportado anteriormente en nuestro país^{26,37}, aunque, en los últimos años se ha reportado un aumento en las cepas resistentes a eritromicina³⁹. Una posible explicación de esto es el pequeño número de muestras analizadas y la posibilidad de que las muestras de carne provengan de un mismo faenador. A pesar de ser adquiridos en distintos locales, todas las muestras provienen de comunas cercanas. Además, se ha descrito que la resistencia a macrólidos está determinada por varios polimorfismos ubicados en distintos genes (rARN 23S, L4, L22, bomba CmeABC), en este sentido, son varios los blancos que pueden producir una cepa resistente a este antibiótico. Incluso se ha descrito nuevos genes, como el gen *erm* que codifica para rARN metilasa⁴⁰ que podría participar en la resistencia a macrólidos³⁹. Finalmente, es importante destacar que en países como Perú⁴¹ e India⁴² se ha descrito un aumento en las cepas de *C. jejuni* resistentes a eritromicina en los últimos años. Por otro lado, solo 2 cepas resultaron resistentes a azitromicina (5% de las cepas). De igual forma, se han reportado diferentes perfiles de resistencia de cepas obtenidas en aislados clínicos y carne de pollo en distintas partes del mundo^{12,15,43,44,41}. Estas diferencias podrían ser producto por las diferentes estrategias de control biológico usadas en la producción primaria y en salud pública.

Mediante técnicas de secuenciación masiva, se ha observado que existe una alta variabilidad entre las cepas en cuanto a la presencia de genes relacionados con virulencia^{12,16}. Así, se ha observado que algunas cepas carecen de genes involucrados en la biosíntesis de flagelo y lipopolisacáricos, captura de hierro, modificación del ADN, etc. Esto muestra una alta plasticidad genética^{33,34}, lo que facilita la adaptación de esta bacteria a nichos distintos, convirtiéndolo en un patógeno difícil de controlar.

Dentro de los factores de virulencia, el más frecuentemente fue *ceuE*, que codifica para una lipoproteína involucrada en el transporte de enteroquelina^{8,45}, esencial para la infección. Algunos estudios coinciden con la alta frecuencia de este gen en distintas cepas⁴⁶, sin embargo, en otros

estudios este gen es menos abundante¹⁶. Por otro lado, *virB 11* se encuentra en 15% de las muestras, todas obtenidas desde carne de pollo, esto es ligeramente superior a lo reportado anteriormente en nuestro país (7,3% de las cepas)⁹. Otro gen que ha sido analizado en muestras chilenas, en otros trabajos, es *cdtB*, el cual estaba presente en 100% de las muestras⁹. Sin embargo, en este artículo no fue incluido. Finalmente, el gen *wlaN* no fue detectado en ninguna cepa, en forma similar a lo reportado anteriormente en nuestro país⁴⁷.

En resumen, la alta frecuencia de contaminación de carne de pollo con *C. jejuni* con cepas resistentes a uno o más antibióticos, sumado a la diversidad genética de las cepas en cuanto a la presencia de factores de virulencias confirman la importancia de vigilar, investigar y controlar *C. jejuni* en alimentos debido a su alto impacto en salud pública.

Agradecimientos: Proyecto financiado por Fondecyt 11130148 y Proyecto de inserción 791220024.

Referencias

1. Meunier M, Guyard-Nicodeme M, Dory D, Chemaly M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: Biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J Appl Microbiol* 2016; 120 (5): 1139-73.
2. Prado V. Epidemiología de la enteritis por *Campylobacter* en niños. *Rev Med Chile* 1984; 112: 1153.
3. Prado V, Martínez J, Reyes L, Ducheylard M, Bercovich M, Millán V, et al. Características de la infección intestinal por *Campylobacter jejuni* en lactantes chilenos. *Rev Med Chile* 1985; 113: 521-5.
4. Miller W, Mandrell R. *Campylobacter* in the food and water supply: Prevalence, outbreaks, isolation, and detection. In: Ketley J, Konkel M, editors. *Campylobacter jejuni: New perspectives in molecular and cellular biology*. 1st ed. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2004. p. 109-63.
5. Blaser M. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis* 1997; 176: 103-5.
6. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; 7 (1): 24-34.
7. Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (2): 590-4.
8. González I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (3): 759-63.
9. González-Hein G, Huaracan B, García P, Figueroa G. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. *Brazilian J Microbiol* 2013; 44 (4): 1223-9.
10. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. Chapter 7: *Campylobacter*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. 2012.
11. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, et al. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Society* 2002; 40 (12): 4744-7.
12. Di Giannatale E, Di Serafino G, Zilli K, Alessiani A, Sacchini L, Garofolo G, et al. Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors (Basel)* 2014; 14 (2): 3308-22.
13. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V. GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 210.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In: *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacterial; Approved Guideline-Second Edition* CLSI, Wayne, PA, Document M45-A2. 2010.
15. Mifflin JK, Templeton JM, Blackall PJ. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (4): 775-8.
16. Hanning I, Biswas D, Herrera P, Roesler M, Ricke S. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from pasture flock poultry. *J Food Sci* 2010; 75 (7): 496-502.
17. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. In: Risk assessment of *Campylobacter* spp in broiler chickens: Interpretative Summary Microbiological Risk Assessment Series No 11 Geneva 35pp. 2009.
18. Neimann J, Engberg J, Molbak K, Wegener H. A case-control study of risk factors for sporadic *campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 353-66.

19. Figueroa G, Troncoso M, López C, Rivas P, Toro M. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiol* 2009; 9 (1): 94.
20. Bohaychuk VM, Gensler GE, King RK, Manninen KI, Sorensen O, Wu JT, et al. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *J Food Prot* 2006; 69 (9): 2176-82.
21. Dominguez C, Gomez I, Zumalacarregui J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *Int J Food Microbiol* 2002; 72 (1-2): 165-8.
22. Kramer JM, Frost J a, Bolton FJ, Wareing DR. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *J Food Prot* 2000; 63 (12): 1654-9.
23. Giacoboni G, Tellechea D, Agostini A. Pollos Camperos *Campylobacter Jejuni* in a Free-Range. *Analecta Vet* 2002; 22 (2): 42-7.
24. Kuana S, Santos L, Rodrigues L, Borsoi A, Moraes H, Salle C, et al. Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. *Avian Dis* 2008; 52 (4): 680-4.
25. Fernandez H, Pison V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *Int J Food Microbiol* 1996; 29 (1): 75-80.
26. Rivera N, Bustos R, Montenegro S, Sandoval M, Castillo J, Fernández H, et al. Microbiología. *Rev Chil Infectol* 2011; 28 (6): 555-62.
27. Fernández H, Torres N. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in three groups of hens of different geographic origin in Southern Chile. *Arch Med Vet* 2004; 32 (2): 241-4.
28. Fernandez H, Vera F, Villanueva MP. *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile. *Arch Med Vet* 2007; 39 (2): 163-5.
29. Tresierra-Ayala A, Fernández H, Bendayán M, Pereyra G, Bernuy A. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. *Rev Saude Publica* 1995; 29 (5): 389-92.
30. Jacobs-Reitsma1 WF, Van De Giessen2 AW, Bolder 'and NM, Mulder1 RWW. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol Infect* 1995; 114: 413-21.
31. Ica T, Caner V, Istanbulu O, Nguyen HD, Ahmed B, Call DR, et al. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (4): 1033-8.
32. Godschalk P, Gilbert M, Jacobs B, Kramers T, Tio-Gillen A, Ang C, et al. Co-infection with two different *Campylobacter jejuni* strains in a patient with the Guillain-Barré syndrome. *Microbes Infect* 2006; 8 (1): 248-53.
33. Dorrell N, Mangan J a, Laing KG, Hinds J, Linton D, Al-ghusein H, et al. Whole Genome Comparison of *Campylobacter jejuni* Human Isolates Using a Low-Cost Microarray Reveals Extensive Genetic Diversity. *Genome Res* 2001; 1706-15.
34. Leonard li EE, Takata T, Blaser MJ, Falkow S, Tompkins LS, Gaynor EC. Use of an Open-Reading Frame-Specific *Campylobacter jejuni* DNA Microarray as a New Genotyping Tool for Studying Epidemiologically Related Isolates. *J Infect Dis* 2003; 187: 691-4.
35. Zhang T, Luo Q, Chen Y, Li T, Wen G, Zhang R, et al. Molecular epidemiology, virulence determinants and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spreading in retail chicken meat in Central China. *Gut Pathog* 2016; 8 (48): 1-9.
36. Ngoc T, Nguyen M, Hotzel H, Njeru J, Mwituria J, El-adawy H, et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from small scale and backyard chicken in Kenya. *Gut Pathog* 2016; 8 (1-9).
37. García P, Valenzuela N, Rodríguez V, León E, Fernández H. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coproclívticos en Santiago de Chile. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (6): 511-4.
38. Fernández H, Mansilla M, González V. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* assessed by E-test and double dilution agar method in Southern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 247-9.
39. Zhou J, Zhang M, Yang W, Fang Y, Wang G, Hou F. A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. *Int J Infect Dis* 2016; 42: 28-33.
40. Deng F, Shen J, Zhang M, Wu C, Zhang Q, Wang Y. Constitutive and inducible expression of the rRNA Methylase gene *erm(B)* in *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (10): 6661-4.
41. Pollett S, Rocha C, Zepa R, Patiño L, Valencia A, Camiña M, et al. *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 1.
42. Mukherjee P, Ramamurthy T, Mitra U, Mukhopadhyay AK. Emergence of high-level azithromycin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from pediatric diarrhea patients in Kolkata, India. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (7): 4248.
43. Wimalarathna HML, Richardson JF, Lawson AJ, Elson R, Meldrum R, Little CL, et al. Widespread acquisition

- of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. *BMC Microbiol* 2013; 13 (1): 160.
44. Kashoma IP, Kassem II, Kumar A, Kessy BM, Gebreyes W, Kazwala RR, et al. Antimicrobial resistance and genotypic diversity of *campylobacter* isolated from pigs, dairy, and beef cattle in Tanzania. *Front Microbiol* 2015; 6 (1): 1240.
45. Park SF, Richardson PT. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* lipoprotein with homology to periplasmic siderophore-binding proteins. *J Bacteriol* 1995; 177 (9): 2259-64.
46. Bang DD, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K, Madsen M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Appl Microbiol* 2003; 94 (6): 1003-14.
47. Lapiere L, Gatica M, Riquelme V, Vergara C, Yañez J, San Martín B, et al. 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* 2016; 22 (5): 432-44.