



## Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo

### Salmonellosis and campylobacteriosis, the most prevalent zoonosis in the world

Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo\* Leopoldo Henri Paasch Martínez\*  
Norma Leticia Calderón Apodaca\*

---

#### Abstract

Nowadays salmonellosis and campylobacteriosis are the most prevalent diseases transmitted to humans through contaminated food of animal origin in developed countries. Propagation of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium has increased since the second half of the twentieth century, derived from two changes in the epidemiology of salmonellosis that occurred worldwide: the emergence of human infections caused by *Salmonella* Enteritidis, and the multiple resistances against antibiotics of *Salmonella* Typhimurium strains. Most retrospective studies suggest an epidemiological relationship between human infections and poultry products. Modernization of poultry industry and exportation of progenitor stock birds have played an important role disseminating *Salmonella* Enteritidis. Campylobacteriosis is the most frequent enteric bacterial diseases in developed countries. *Campylobacter jejuni* is the most frequent cause of acute infectious diarrheas, and the sources of infection are mainly poultry products. The present review includes relevant taxonomic and pathogenic aspects of these organisms; and stresses the problematic of diagnosis and detection, analyzing techniques that permit rapid detection of animal carriers. Finally, some preliminary findings, not yet published, suggest that a prevalence of salmonellosis and campylobacteriosis in Mexican poultry farms must be similar to that found in other countries with massive poultry production; therefore, epidemiological studies to determine the frequency of human infections, derived from poultry consumption, are recommended.

**Key words:** *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI*, EPIDEMIOLOGY, ZONOSIS.

#### Resumen

En la actualidad, la salmonelosis y la campilobacteriosis son las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados, debido a la contaminación de alimentos de origen animal. La propagación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium va en aumento a partir de la segunda mitad del siglo XX, cuando ocurrieron dos cambios mundiales en la epidemiología de la salmonelosis: el surgimiento de infecciones en humanos por *Salmonella* Enteritidis, y la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella* Typhimurium. La mayoría de los análisis retrospectivos sugieren que existe relación epidemiológica entre las aves y los humanos: La modernización de la avicultura y las exportaciones de aves progenitoras son de importancia en la diseminación de *Salmonella* Enteritidis. La campilobacteriosis es la enfermedad entérica bacteriana más común en países desarrollados. *Campylobacter jejuni* es la causa más frecuente de diarreas infecciosas agudas, y las fuentes de esta infección son principalmente productos avícolas. En la presente revisión se incluyen aspectos relevantes de taxonomía y patogenia de estos organismos, y se hace hincapié en la problemática del diagnóstico y detección, analizando las técnicas para detectar rápidamente la existencia de animales portadores. Finalmente, se discuten hallazgos preliminares aún no publicados que sugieren que la prevalencia de salmonelosis y campilobacteriosis en granjas avícolas mexicanas debe ser semejante a la de otros países que tienen avicultura tecnificada, y se recomiendan los estudios epidemiológicos para determinar la frecuencia de estas infecciones en humanos, derivadas del consumo de alimentos de origen aviar.

**Palabras clave:** *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI*, EPIDEMIOLOGÍA, ZONOSIS.

---

Recibido el 25 de octubre 2006 y aceptado el 6 de diciembre de 2007.

\*Departamento de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

## Introduction

Food of animal origin is a common source of human disease. The risk, although unknown, is still in global assessment progress.<sup>1</sup> Nowadays, salmonellosis and campylobacteriosis are the most prevalent zoonosis in developed countries. In the United States, Canada; Great Britain; Norway, and Denmark, among other countries, outbreaks of salmonellosis transmitted by food have been corroborated.

It has been estimated that salmonellosis in the United States is responsible for more than 18 000 hospitalizations and 500 deaths per year.<sup>2</sup> In Denmark the cost of human infections is estimated in 15.5 million dollars yearly. In this country, a program for the eradication and control of the infection in animals for human consumption has been implemented with an annual cost of 14.1 million dollars, however, the program has been considered cost effective considering the reduction in medical treatments and in the lost of labor days with an estimated cost of 25.5 million dollars.<sup>3</sup> In developing countries, the estimated costs of food transmitted diseases are generally not calculated nor published.<sup>3</sup>

During two decades between 1980 and 2000, salmonellosis has increased twenty times in several countries, and despite that some of them have managed to limit and even reduce these increments, generally speaking, there is a worldwide increase in the dissemination of *Salmonella enterica*, serotype Enteritidis and *Salmonella enterica*, serotype Typhimurium.<sup>4</sup>

In Norway a retrospective study of salmonellosis between 1966 y 1996 suggests an epidemiological relationship between poultry products and human infections.<sup>5</sup> An increase between June and August of salmonellosis and campylobacteriosis has been reported in the United Kingdom. The most frequent infections are thought to derive from the delay in refrigeration of food coincidentally with the rise of environmental temperature and also from the traditional barbecues during the summer, when the meat is not sufficiently cooked.<sup>2</sup>

During the last decade, the number of salmonellosis cases reported in Sweden increased 100%, mainly because of the rise in number of infections with *Salmonella* Enteritidis. In that country, during 2001, 60% of diagnosed cases were caused by four serotypes: *Salmonella* Typhimurium (22.1%), *Salmonella* Enteritidis (17.7%), *Salmonella enterica* serotype Newport (10%) and *Salmonella enterica* serotype Heidelberg (5.9%).<sup>6</sup>

In France, during 2005, more than 70% of human salmonellosis was caused by three serotypes: *Salmonella* Enteritidis (33%), *Salmonella* Typhimurium (32%) and *Salmonella* Hadar (6%).<sup>7</sup>

In Mexico, the most frequently isolated serotypes

## Introducción

Los alimentos de origen animal son fuente de importante número de infecciones en humanos. El riesgo, aunque es conocido, aún está en vía de caracterización y cuantificación a nivel global.<sup>1</sup> En la actualidad, la salmonellosis y la campylobacteriosis son las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados. En Estados Unidos de América, Canadá, Inglaterra, Noruega y Dinamarca, entre otras naciones, se han comprobado brotes de salmonellosis transmitida por alimentos.

Se ha calculado que en Estados Unidos de América, la salmonellosis causa más de 18 mil hospitalizaciones y 500 defunciones anuales.<sup>2</sup> En Dinamarca, el costo de la infección en humanos se calcula en 15.5 millones de dólares anuales, en ese país se ha implementado un programa de control y erradicación de la infección en animales destinados al consumo, con costo anual de 14.1 millones de dólares que, sin embargo, se considera redituable en la medida en que se estima una reducción de 25.5 millones de dólares por concepto de las pérdidas ocasionadas por incumplimiento laboral y tratamientos médicos.<sup>3</sup> Los datos relacionados con el costo de las enfermedades transmitidas por alimentos, por lo general no son calculadas ni publicadas en los países en desarrollo.<sup>3</sup>

En algunos países, los problemas de salmonellosis han aumentado 20 veces entre las décadas de 1980 y 1990, y aunque existen ejemplos de países que han logrado limitar y aun revertir estos incrementos, en general la propagación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium va en aumento.<sup>4</sup>

Un análisis retrospectivo de casos de salmonellosis llevado a cabo en Noruega entre 1966 y 1996 sugiere que existe relación epidemiológica entre las aves y los humanos.<sup>5</sup> En el Reino Unido se comprobó que la salmonellosis y campylobacteriosis se incrementan entre junio y agosto, lo que se atribuye a que los alimentos no son almacenados oportunamente en refrigeración justamente cuando la temperatura ambiental se eleva y también debido a la costumbre de consumir barbacoa durante el verano, ya que la carne no se cuece adecuadamente.<sup>2</sup>

Durante la década pasada, el número de casos de salmonellosis registrado en Suecia se ha duplicado debido al aumento en el número de casos causados por *Salmonella* Enteritidis. En ese país, durante 2001, 60% de los casos detectados fueron causados por cuatro serotipos: *Salmonella* Typhimurium (22.1%), *Salmonella* Enteritidis (17.7%), *Salmonella enterica* serotipo Newport (10%) y *Salmonella enterica* serotipo Heidelberg (5.9%).<sup>6</sup>

En Francia, en 2005, más de 70% de casos en huma-

between 1972 and 1999 were, in decreasing order, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Agona and *Salmonella* Anatum.<sup>8</sup>

In humans, infection caused by *Salmonella* Enteritidis, generally produces clinical signs of colitis during five days. The incubation takes from 8 to 72 hours and the most common symptoms are watery diarrhea and abdominal pain. Most patients recover without antibiotic treatment; however, if the diarrhea is severe, hospitalization may be required. Children, elderly and patients with immunodeficiency are more susceptible to infection. In the latter, infection may extend from the intestines to the circulating blood and produce seeding of bacteria in other organs and those cases may be fatal if the infection is not controlled by an effective antibiotic therapy.<sup>9</sup>

In a wide range of animal species, especially in birds, *Salmonella* Enteritidis may cause silent infections of the intestine. *Salmonella* Enteritidis also infects ovaries of apparently healthy laying hens contaminating the eggs before the egg shell is formed. In chickens of less than 2 weeks, the infection with *Salmonella* Enteritidis may be the cause of acute disease with high mortality rates.<sup>7</sup>

Campylobacteriosis is even more frequent than salmonellosis and is considered the most common intestinal disease in developed countries. *Campylobacter jejuni* has been demonstrated as the most common cause of acute diarrhea; therefore, is more frequently isolated than *Salmonella* spp and *Shigella* spp.<sup>10</sup>

The sources of this infection are oftentimes associated with food of animal origin, especially avian products.<sup>11</sup> In England and Wales, food of avian origin is the main culprit of campylobacteriosis.<sup>12</sup> In Denmark, consumption of insufficiently cooked poultry meat is considered an important risk factor for infection.<sup>13</sup> In Mexico, the reports of campylobacteriosis in animals are scarce and the public health impact is unknown.

### **Characterization of salmonellosis**

The genus *Salmonella* is representative of the family Enterobacteriaceae, characterized by gram-negative non spore forming rods that exhibit three types of antigens: somatic O, flagellar H and capsular Vi, that confer agglutinating characteristics that permit the classification of 2 500 serotypes. New serotypes are added each year to the Kauffmann-White list.<sup>14</sup>

The genus *Salmonella* has only two species, namely, *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica*. The latter is divided in six subspecies: entericae, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae and indica. Serotypes of the subspecies entericae, cause 99% of salmonella infections in humans and higher animals.<sup>15</sup> For practical diagnostic and epidemiologic purposes, nomen-

nos fueron ocasionados por tres serotipos: *Salmonella* Enteritidis (33%), *Salmonella* Typhimurium (32%) y *Salmonella* Hadar (6%).<sup>7</sup>

En México los serotipos más frecuentemente aislados entre 1972 y 1999, son, en orden decreciente, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Agona y *Salmonella* Anatum.<sup>8</sup>

En humanos, la forma clínica de la infección por *Salmonella* Enteritidis generalmente se manifiesta como un episodio de enterocolitis autolimitante, con síntomas que se resuelven en cinco días. El periodo de incubación es generalmente de 8 a 72 horas, los síntomas más comunes son diarrea acuosa y dolor abdominal. La mayoría de las personas se recuperan sin recibir tratamiento con antibióticos. Sin embargo, la diarrea puede ser severa y la persona puede requerir hospitalización. La susceptibilidad es mayor en niños, ancianos y personas inmunodeficientes. En estos pacientes, la infección puede diseminarse desde los intestinos hacia el torrente sanguíneo y de allí hacia otros sitios y puede causar la muerte, a menos de que la persona sea tratada inmediatamente con antibióticos.<sup>9</sup>

En una amplia variedad de especies animales, *Salmonella* Enteritidis causa infección intestinal sin signos, especialmente en aves. *Salmonella* Enteritidis infecta silenciosamente los ovarios de gallinas en apariencia sanas y contamina los huevos antes de que el cascarón sea formado. En pollos menores de dos semanas de edad pueden ocurrir brotes de enfermedad clínica con alta mortalidad.<sup>7</sup>

La campilobacteriosis es aún más frecuente que la salmonelosis y se calcula que es la enfermedad entérica bacteriana más común en los países desarrollados; se ha confirmado que, en particular, *Campylobacter jejuni* ha sido la causa más frecuente de diarreas infecciosas agudas, que supera incluso a las infecciones causadas por *Salmonella* spp y *Shigella* spp.<sup>10</sup>

Las fuentes de esta infección se relacionan generalmente con alimento de origen animal, principalmente los productos avícolas.<sup>11</sup> En Inglaterra y Gales, los alimentos de origen aviar son los que con mayor frecuencia se asocian con brotes de campilobacteriosis.<sup>12</sup> Asimismo, en Dinamarca se ha encontrado que el consumo de carne de pollo insuficientemente cocida es un factor de riesgo importante para contraer la infección.<sup>13</sup> En México, son escasos los informes sobre la campilobacteriosis en animales para abasto, y se desconoce su impacto en la salud.

### **Caracterización de la salmonelosis**

El género *Salmonella* es representativo de la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos que no forman esporas y que en este género en particular

clature is based in the serotypes of the subspecies, for example, *Salmonella enterica*, subspecies entericae, serotype Enteritidis, is abbreviated as *Salmonella* Enteritidis.<sup>16</sup>

For more detailed studies on taxonomy and pathogenesis, serotypes are further classified by determination of biotypes and phagotypes. The biotype refers to the biochemical variation between organisms belonging to the same serotype, while the phagotype refers to the variation in susceptibility to lyses by bacteriophages between organisms of the same serotype.

Among serotypes there are different degrees of adaptation and pathogenic potential for humans and animals, for instance, *Salmonella enterica* serotype Typhi and *Salmonella enterica* serotype Paratyphi cause, respectively, septic syndrome and typhoid fever in humans; however, both serotypes are non pathogenic for animals. On the other hand, serotypes *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Abortus-ovis are, respectively, the cause of avian typhoid and infectious abortion of sheep, but only occasionally produce non or mild symptomatic infections in humans. There are also serotypes as *Salmonella* Choleraesuis that cause severe disease in swine, but also systemic disease in humans. Serotypes *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium infect humans and animals, however, in the latter and specially in birds, infections are non symptomatic.<sup>15,17</sup> Regarding global epidemiology of salmonellosis, two relevant changes occurred during the second half of the XX century; namely, the appearance of infections in humans caused by food contaminated with *Salmonella* Enteritidis and the resistance of *Salmonella* Typhimurium against many antibiotics.

Causes for the increase of infections with *Salmonella* Enteritidis in birds have not been completely clarified and it is important to stress the difficulty to detect infection in apparently healthy flocks. It has been proven that *Salmonella* Enteritidis cause asymptomatic infections in many animals, especially in domestic birds, but an acute outbreak with significant mortality has never been reported.<sup>16</sup> However, apparently healthy carriers are able to disseminate infection through fecal contamination of meat and eggs. Detection of *Salmonella* Enteritidis is particularly difficult when there are less than nine bacterial organisms per piece examined.<sup>18</sup>

Massive growth of the avian industry and the frequent exports of grandparent stock genetic lines of birds, undoubtedly have played an important roll in disseminating *Salmonella* Enteritidis in the world. In the United States, for instance, it is quite common to force the molt of laying hens by suppressing feed and causing an intentional loss of body weight.

Despite that this method accelerates the molt, it also makes the hens more susceptible to infection with

presentan tres tipos de antígenos: somático O, flagelar H y capsular Vi, cuyas propiedades de aglutinación se emplean para diferenciar a más de 2 500 serotipos. Cada año se aumentan nuevos serotipos a la lista de Kauffmann-White.<sup>14</sup>

El género *Salmonella* consta de sólo dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última se divide en seis subspecies: entericae, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica. Los serotipos de la subespecie entericae causan 99% de las salmonelosis en humanos y animales superiores.<sup>15</sup> Para fines prácticos de diagnóstico y epidemiología, la nomenclatura se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie, por ejemplo *Salmonella enterica*, subespecie entericae, serotipo Enteritidis, se abrevia como *Salmonella* Enteritidis.<sup>16</sup>

Para la realización de estudios más detallados de taxonomía y patogenia, los serotipos pueden subdividirse mediante el establecimiento de biotipos y fagotipos. El biotipo es la variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo, mientras que el fagotipo expresa la diferente susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos de organismos del mismo serotipo.<sup>16</sup>

Los diversos serotipos tienen diferentes grados de adaptación y patogenicidad para los humanos y las especies animales; por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Typhi y *Salmonella enterica* serotipo Paratyphi causan enfermedades severas en humanos, conocidas como síndrome septicémico y fiebre tifoidea, pero estos serotipos no son patógenos para los animales. Asimismo, los serotipos *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Abortus-ovis son, respectivamente, causantes de la tifoidea aviar y de abortos infecciosos en las ovejas, pero sólo ocasionalmente producen infecciones leves o asintomáticas en humanos. Existen, sin embargo, serotipos como *Salmonella* Choleraesuis que causa enfermedad severa en su principal portador, que es el cerdo, pero también puede causar enfermedad sistémica grave en humanos. Los serotipos *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium infectan tanto a humanos como a animales, pero en éstos, principalmente en los pollos, producen infecciones asintomáticas.<sup>15,17</sup> En la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis en el mundo; en primer lugar, el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* Enteritidis, y en segundo, la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de *Salmonella* Typhimurium.<sup>7</sup>

Los factores responsables del incremento en el número de infecciones por *Salmonella* Enteritidis en aves no han sido completamente dilucidados, por lo que es difícil detectar la infección en pollos aparentemente sanos. Se ha comprobado que *Salmonella* Enteritidis causa infecciones sin signos clínicos apa-



*Salmonella* Enteritidis, and once infected, excretion of bacteria in the feces will render eggs more prone to contamination.<sup>19</sup> Contamination of eggs with *Salmonella* Enteritidis may be fecal, however, eggs may also be infected in the ovary at ovulation.<sup>20</sup> Research work performed in Holland has demonstrated that laying hens get infected by contact with the contaminated environment of the farm;<sup>21</sup> however, other sources of infection have to be considered, for instance, the outbreak in the United Kingdom in 1980, has been traced to imports of grandparent stock bird lines infected with *Salmonella* Enteritidis, bearing phagotype 4.<sup>22</sup>

Several authors have suggested that *Salmonella* Enteritidis may be introduced by rodents into flocks, and indeed mice are so highly susceptible to infection to the point that induced infection has been used as pest control.<sup>23,24</sup> *Salmonella* Enteritidis used in 1940 for rodent elimination in the United Kingdom was phagotype 6,<sup>24,25</sup> however phagotypes 4 and 6 are prone to interchange by the plasmid IncX.<sup>26</sup>

The significant increase of human infections since 1980 in Europe with *Salmonella* Enteritidis phagotype 4, suggests the acquisition of new genes of virulence.<sup>27</sup>

Comparative genomic studies of microorganisms carried out in recent years have shed light on the mutational frequency. Recombination is estimated as an important source of genetic change because it is associated with the lost or acquisition of entire regions carrying several genes. Horizontal exchange of DNA material may occur through plasmids, genomic islands, bacteriophages, transposons and insertion sequences. These moving elements may provide microorganisms with adaptation advantages and infective power for particular cells.<sup>28</sup> Virulence associated genes, also known as pathogenic islands, are originated outside bacteria as moving elements. Pathogenic islands contribute to the virulent nature of bacteria for containing gene groups that increase the microorganism virulence and may transform a non pathogenic organism into a virulent one. Up until now, 12 pathogenic islands have been described for *Salmonella* spp, some are present in particular serotypes but others are present in all of them.<sup>7</sup>

It has been proven that *Salmonella* Gallinarum is capable of inducing immunity in a flock against *Salmonella* Enteritidis, serotype 09. As a consequence from the aforementioned immunological cross protection, it has been suggested that eradication of *Salmonella* Gallinarum through vaccination and elimination of infected birds may have favored the dissemination of *Salmonella* Enteritidis.<sup>7,29</sup> In the United Kingdom the use, since 1997, of a live *Salmonella* Enteritidis, serotype 09 vaccine instead of the formalin inactivated bacterin, reduced 50% infection with *Salmonella*

rentes, en una amplia gama de especies animales, especialmente en las aves domésticas, en las que no se han identificado brotes agudos con mortalidad.<sup>16</sup> Sin embargo, estos portadores sanos pueden diseminar la infección por la contaminación fecal de la carne y huevo. Resulta particularmente difícil detectar *Salmonella* Enteritidis cuando el número de bacterias presentes es menor a nueve por pieza.<sup>18</sup>

La modernización de la avicultura y las exportaciones de aves progenitoras son importantes en la diseminación de *Salmonella* Enteritidis en el mundo. En Estados Unidos de América, por ejemplo, es común forzar la muda de las gallinas ponedoras retirando el alimento para producir una pérdida de peso intencional en las aves, este método acelera la muda, pero hace más susceptibles a las gallinas a la infección por *Salmonella* Enteritidis, y una vez infectadas excretan el microorganismo en las heces en concentraciones significativamente altas, ello aumenta el riesgo de contaminación del huevo.<sup>19</sup> Para el caso específico de *Salmonella* Enteritidis, los huevos pueden contaminarse con heces o infectarse en el ovario al momento de la ovulación.<sup>20</sup> Investigaciones realizadas en Holanda indican que las parvadas de gallinas ponedoras se infectan principalmente por contacto directo con el ambiente contaminado de la granja;<sup>21</sup> sin embargo, la epidemia ocurrida en Reino Unido a principios de la década de 1980, se atribuye a la introducción de líneas de aves progenitoras infectadas con el fago tipo 4.<sup>22</sup>

Varios autores han sugerido que *Salmonella* Enteritidis puede ser introducida en las parvadas por roedores, los cuales son susceptibles a la infección, al grado que se llegó a usar la infección intencional para destruir ratones.<sup>23,24</sup> La *Salmonella* Enteritidis usada en Reino Unido como pesticida en 1940 fue fago tipo 6;<sup>24,25</sup> sin embargo, se ha comprobado que la adquisición del plásmido IncX convierte las cepas fago tipo 4 en fago tipo 6.<sup>26</sup>

El dramático incremento de infección por *Salmonella* Enteritidis fago tipo 4 en humanos en Europa desde 1980, sugiere que la bacteria ha adquirido recientemente nuevos genes de virulencia.<sup>27</sup>

En años recientes se han secuenciado y comparado un mayor número de genomas microbianos, lo que ha permitido estimar la frecuencia de mutaciones. Una importante fuente de evolución son los mecanismos de recombinación que están implícitos en el proceso de replicación mediante la adquisición o pérdida de regiones que portan genes. Además, la transmisión horizontal de fragmentos de ADN puede ocurrir mediante plásmidos, islas genómicas, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción. Estos elementos móviles pueden proveer a los microorganismos, de ventajas para adaptarse e infectar a determinadas

*lla* Enteritidis in poultry farms.<sup>22</sup> For practical uses, in terms of transmittable zoonosis control, vaccination of birds against salmonellosis might be useful for public health programs even if *Salmonella* Gallinarum has been eradicated.

Genomic islands with several antibiotic resistance genes are an important source of genomic variation;<sup>30</sup> therefore, an unavoidable consequence of using antibiotics is the emergence and dissemination of resistant bacteria. Some biotypes and phagotypes of *Salmonella* resistant to penicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamides, tetracycline and even fluoroquinolones, have mutations of gene *gyrA*.<sup>31</sup>

Considering the multiple sources of genetic transmission among related microbial agents that include genomic islands and plasmids, the use of antibiotics as feed additives may have an adverse effect on public health based on selection of resistant bacteria by antibiotics.<sup>7</sup>

### **Characterization of campylobacteriosis**

There are 16 recognized species of *Campylobacter*.<sup>32</sup> These microorganisms are spiral or curved gram-negative rods with flagella and are microaerophilic. There are three species of medical and veterinary significance: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *Campylobacter jejuni* has two subspecies: *Campylobacter jejuni jejuni*, referred shortly as *Campylobacter jejuni*, pathogenic for humans and *Campylobacter jejuni doylei*<sup>33</sup> that only infects humans sporadically.

Biochemically, *Campylobacter* are oxidase positive, reduce nitrates, are negative to metil red and Voges-Proskauer and do not hydrolyze gelatin. Most species are urea negative except some strains of *Campylobacter lari*. Prolonged water exposure of organisms produces forms that might not grow in cultures.<sup>34,35</sup> *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* are thermophilic; therefore, grow better between 42°C and 43°C and do not grow at all below 25°C. Two days are required for culture in selective media and two days more for the species confirming tests.<sup>36</sup>

Human infections are limited to the alimentary tract and generally produce diarrhea. The infection rarely causes neurological damage.<sup>37</sup> Many infections are associated with ingestion of poultry or pork. Besides *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* also produce gastroenteritis in humans; however, the latter of porcine origin, represents only 3% of isolations.<sup>10</sup>

### **Relevant pathogenic mechanism aspects**

*Salmonella* Enteritidis adheres to the intestinal mucosal surface and later invades epithelial cells. Adhe-

células.<sup>28</sup> Los genes asociados con virulencia, también llamados islas de patogenicidad, se originan fuera de las bacterias como elementos móviles. Las islas de patogenicidad adquiridas contribuyen a la naturaleza virulenta de las bacterias en la medida en que contienen grupos de genes que incrementan la virulencia del microorganismo y pueden transformar un organismo benigno en uno patógeno. Hasta ahora, se han descrito 12 islas de patogenicidad para *Salmonella* spp, algunas de ellas son conservadas por todos los serotipos del género, pero algunas son específicas de ciertos serotipos.<sup>7</sup>

Se ha comprobado que *Salmonella* Gallinarum puede generar inmunidad en la parvada contra el serotipo 09, o sea que presenta inmunidad cruzada con *Salmonella* Enteritidis. Como consecuencia de esta característica inmunológica, se ha sugerido que en la medida que *Salmonella* Gallinarum se ha eliminado mediante la vacunación y el sacrificio de las aves infectadas, su erradicación pudo haber permitido el establecimiento de *Salmonella* Enteritidis.<sup>7,29</sup> En forma inversa, en el Reino Unido, el descenso de 50% en infección por *Salmonella* Enteritidis en aves desde 1997, coincide con la introducción de nuevas vacunas vivas contra el serotipo 09, en sustitución de las vacunas con bacterias muertas en formalina.<sup>22</sup> Para fines prácticos, en términos de control de las zoonosis transmisibles, la vacunación de aves contra la *Salmonella* Enteritidis del serotipo 09, puede estar indicada aun en situaciones en las que se haya erradicado *Salmonella* Gallinarum.

Otra importante fuente de diversidad microbiana la constituyen los integrones, que generalmente llevan uno o más genes de resistencia a los antibióticos.<sup>30</sup> Un inevitable efecto del uso de antibióticos es el surgimiento y diseminación de bacterias resistentes. Existen algunos biotipos y fagotipos del género *Salmonella* que son resistentes a penicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclinas, e incluso a fluoroquinolonas, esta resistencia se atribuye a mutaciones puntuales del gen *gyrA*.<sup>31</sup>

Teniendo en cuenta que los genes resistentes a los antibióticos pueden propagarse por integrones, además de transposones, islas genómicas y plásmidos, el tratamiento con agentes antimicrobianos contribuye al aumento de la población de bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos relacionados entre sí, y por ello el uso de antimicrobianos en el alimento de los animales puede tener efectos adversos para la salud humana,<sup>7</sup> debido a su efecto de selección en la población bacteriana resistente.

### **Caracterización de la campylobacteriosis**

La clasificación del género ha sido objeto de revisio-

sion of *Salmonella* Enteritidis to the epithelial surface depends on fimbria and flagella. Fimbria of *Salmonella* Enteritidis are classified as SEF14, SEF17 and SEF21. The blind gut is the primary site of colonization of *Salmonella* Enteritidis in birds. Glycosphingolipid (GSL) GlcCer (N-1) and gangliosid GM3 (G-1) from the chicken intestinal mucosa of the small intestine, blind guts and rectum are receptors for fimbria SEF21 of *Salmonella* Enteritidis.<sup>38</sup>

If *Salmonella* Enteritidis is able to cross the epithelium and reaches the intestinal lamina propria, macrophages may be infected and since the organism is resistant to macrophage enzymes, it may spread, transported by these cells, to other organs, specially the liver.<sup>39</sup>

*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* live commensally in the intestinal mucosa of many animal species, including domestic birds. These organisms may survive in the environment at 4°C during several weeks.<sup>40</sup>

Many strains and specially those from *Campylobacter jejuni*, produce enteric toxins and cell toxins that produce digestive ailments in humans.<sup>33</sup>

Until recently, it was believed that transmission of *Campylobacter* in birds occurs horizontally through garbage, water, equipment, insects and feral animals, based on the findings that several attempts to culture *Campylobacter* from hatcheries or from new born chickens have failed;<sup>41,42</sup> however, several studies suggest that vertical transmission through the egg is possible based on the fact that *Campylobacter jejuni* has been found in all segments of the reproductive tract of hens and in semen samples from breeder cocks.<sup>43</sup>

### Limitations in diagnosis and detection

*Salmonella* and *Campylobacter* dwell in the intestine of birds where many other bacterial species grow; therefore, isolation of pathogenic species may be very difficult or impossible if the number of target organisms is proportionally too low compared to the total bacterial population. To avoid the aforementioned isolation difficulties, immunological and molecular biological procedures have been developed in order to be able to rapidly detect carrier animals. Isolation and identification of *Campylobacter* is particularly difficult because this organism grows slowly and mimics other bacteria such as *Arcobacter*. A further identification difficulty derives from the lack of metabolic activity of *Campylobacter* on the sugars that are usually employed to differentiate enteric bacteria. Thus, *Campylobacter* requires the evaluation of its growth under different atmosphere conditions of: temperature and antibiotic resistance, as well as hydrolysis of hypurate or indoxyl acetate are often necessary.<sup>44</sup>

nes y en la actualidad se aceptan 16 especies.<sup>32</sup> Estos microorganismos tienen forma de bastones espirales o curvados, son gramnegativos, poseen flagelos que les dan movilidad y son microaerofílicos. Las tres especies de importancia médica y veterinaria son: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari*. *Campylobacter jejuni* se divide en dos subespecies: *Campylobacter jejuni jejuni*, referido simplemente como *Campylobacter jejuni*, el cual es patógeno para humanos, y *Campylobacter jejuni doylei*, que sólo esporádicamente infecta a humanos.<sup>33</sup>

Bioquímicamente, los *Campylobacter* son oxidasa positivos, reducen nitratos, son negativos a rojo de metilo y Voges-Proskauer y no hidrolizan la gelatina. La mayoría de las especies son urea negativas, excepto algunas cepas de *Campylobacter lari*. La exposición prolongada al agua hace que los microorganismos adquieran forma de cocos, que son más difíciles de cultivar e incluso pueden no ser cultivables.<sup>34,35</sup> *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* son termofílicos, es decir, crecen bien entre 42°C y 43°C y no crecen a menos de 25°C. El cultivo en medios selectivos requiere dos días y se necesitan dos días más para realizar las pruebas confirmatorias a especie.<sup>36</sup>

La infección en humanos se limita al tracto alimentario y produce diversos tipos de diarrea. Raras veces la infección ocasiona trastornos neurológicos.<sup>37</sup> La mayoría de los casos se producen por la ingestión de carne de pollo y cerdo. Además de *Campylobacter jejuni*, también *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* producen gastroenteritis en humanos; sin embargo, este último, cuyo origen es porcino, representa sólo 3% de los aislamientos.<sup>10</sup>

### Aspectos relevantes de los mecanismos de patogenicidad

*Salmonella* Enteritidis inicia la infección adhiriéndose a la superficie de la mucosa intestinal y posteriormente invade las células epiteliales. La adherencia de *Salmonella* Enteritidis a la superficie del epitelio depende de las fimbrias y flagelos. Las principales fimbrias de *Salmonella* Enteritidis son SEF14, SEF17 y SEF21. El ciego es el sitio primario de colonización de *Salmonella* Enteritidis en las aves. Se ha investigado que el glucoesfingolípido (GSL) GlcCer (N-1) y el gangliósido GM3 (G-1) de la mucosa intestinal de los pollos, presentes en el intestino delgado, ciego y recto, son los receptores de la fimbria SEF21 de *Salmonella* Enteritidis.<sup>38</sup>

Cuando *Salmonella* Enteritidis atraviesa el epitelio y llega a la lámina propia intestinal, invade a los macrófagos y como es resistente a la acción de éstos, dichas células le sirven de vehículo para invadir otros órganos, principalmente el hígado.<sup>39</sup>

*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* viven como



PCR techniques have been developed for detection of *Salmonella* in food naturally and experimentally contaminated.<sup>45</sup> Sensible and specific PCR techniques for detection of *Campylobacter* spp have been developed, reducing time necessary for diagnosis to less than two days<sup>33</sup> with the advantage of being able to detect even minute amounts as one colony forming unit per milliliter of sample.<sup>46</sup>

### **Prospective for Mexico**

In a recent study performed in a broiler farm in Mexico, 10 from 30 sampled birds were positive, 8 for *Salmonella* Enteritidis and 2 for *Salmonella* Typhimurium. Without pretending to arrive to conclusions from data derived from a single farm, considering the standard management in modern poultry industry, these, not yet published preliminary data, suggest that prevalence of *Salmonella* in Mexico might be similar than that in other countries with massive production.

In the aforementioned study and regarding *Campylobacter*, from 30 sampled birds, in nine *Campylobacter jejuni* and in two *Campylobacter coli* could be isolated. By the same token, it is probable that *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* dwell commensally in the intestine of broilers from commercial farms in Mexico. For this reason, it is necessary to perform future studies which involve representative segments of national poultry industry. *Campylobacteriosis* in humans must be frequently seen in Mexico, derived from poultry food consumption, that is why epidemiological studies must be a priority. Specificity and sensibility of PCR methods make them suitable to detect *Salmonella* and *Campylobacter* in animals, animal origin food and environment; thus, shed some light on the basic considerations to establish reliable epidemiological markers in Mexico.

### **Referencias**

1. Hinton MH. Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *Vet J* 2000; 159:124-138.
2. World Health Organization. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3:223-228.
3. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los alimentos. Nota de información INFOSAN 3/2005-*Salmonella*. 13 de abril de 2005. Unión Europea. Trends and sources of zoonotic agents 4. in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002. Serial online:2004 Sept 29. Cited: 2004 Oct 28. Available from: <http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/zoonoses>.
5. Kapperud G, Stenwig H, Lassen J. Epidemiology of

comensales en el tracto intestinal de muchos animales, incluyendo las aves domésticas. Pueden sobrevivir en el ambiente a 4°C durante varias semanas.<sup>40</sup>

Muchas cepas, principalmente de *Campylobacter jejuni*, producen enterotoxinas y citotoxinas, que son la causa principal de los síntomas digestivos en humanos.<sup>33</sup>

Hasta hace poco se pensaba que la principal fuente de transmisión de *Campylobacter* en las aves era horizontal a partir de basura, agua, insectos, equipo y fauna silvestre. Ante los fracasos en los intentos de cultivar *Campylobacter* de las incubadoras o de los pollitos recién nacidos,<sup>41,42</sup> en diversos estudios se sugiere la transmisión vertical a través del huevo, tomando en cuenta que *Campylobacter jejuni* se ha encontrado en todos los segmentos del tracto reproductivo de las gallinas y en el semen de gallos progenitores.<sup>43</sup>

### **La problemática del diagnóstico y detección**

El principal problema es que *Salmonella* y *Campylobacter* son habitantes del intestino de las aves y en ese medio crecen muchas especies de organismos bacterianos. Por ello, al intentar aislar alguna especie patógena, es posible que no se pueda detectar si el número es proporcionalmente muy bajo y se oculte por el crecimiento de los demás organismos. Por tal razón se ha recomendado el empleo de técnicas inmunológicas y de biología molecular que permiten detectar en poco tiempo la existencia de animales portadores. El aislamiento e identificación de *Campylobacter* es difícil porque es de lento crecimiento y se confunde fácilmente con bacterias del género *Arcobacter*, y el mayor inconveniente es que se trata de organismos inertes que no metabolizan los azúcares que se emplean tradicionalmente para diferenciar las enterobacterias. Por ello, *Campylobacter* requiere de la evaluación de su crecimiento bajo diferentes condiciones atmosféricas, de temperatura y de sensibilidad antimicrobiana, así como de la hidrólisis del hipurato y del acetato de indoxyl.<sup>44</sup>

Se han desarrollado técnicas de PCR para la detección de salmonelas en alimentos contaminados natural y experimentalmente.<sup>45</sup> También varios métodos de PCR, sensibles y específicos, se han desarrollado para la detección de *Campylobacter* spp, los cuales reducen el tiempo de diagnóstico a menos de dos días,<sup>33</sup> además de que detectan cantidades pequeñas de hasta una unidad formadora de colonia por mililitro de muestra.<sup>46</sup>

### **Prospectiva en México**

En un estudio reciente efectuado en pollo de engorda comercial de una granja convencional en México, de



- Salmonella* Typhimurium 0:4-1 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir. *Am J Epidemiol* 1998; 147:774-782.
6. Wierup M, Engström B, Engvall A, Wahlström H. Control of *Salmonella* Enteritidis in Sweden. *Food Microbiol* 1995; 25:219-226.
  7. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 2005; 36:267-288.
  8. Gutiérrez-Gogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* 2000; 42:490-495.
  9. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Discussion paper on risk management strategies for *Salmonella* spp in poultry; 2003 Jan 27-Febr 1; Orlando (Florida) USA. Orlando (Florida) USA: Joint FAO/WHO Food Standards Program Codex Committee on Food Hygiene. Third-fifth Session. 2003:11.
  10. Lamoureux M, Mackay A, Messier S, Fliss I, Blais BW, Holley RA *et al.* Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separations and microtitre hibridation. *J Appl Microbiol* 1997; 83:641-651.
  11. Nielsen EM, Nielsen NL. Serotypes and typability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry products. *Int J Food Microbiol* 1999; 46:199-205.
  12. Pearson AD, Greenwood MH, Feltham RK, Healing TD, Donaldson J, Jones DM *et al.* Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:4614-4620.
  13. Neimann J, Engberg J, Molbak K, Wegener, H.C. Risk Factors associated with sporadic campylobacteriosis in Denmark. 4th World Congress, Food borne Infections and intoxications; 1998 June 7-12; Berlin, Germany. Berlin, Germany: Federal Institute for Risk Assessment, 1998: 43-54.
  14. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (No. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2003; 154:173-174.
  15. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S *et al.* Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 229-255.
  16. Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol Infect* 1987; 99: 291-294.
  17. Duchet SM, Mompert F, Berthelot F, Beaumont C, Lechopier P, Pardon P. Differences in frequency, level and duration of cecal carriage between four outbreed chicken lines infected orally with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 1997; 41:559-567.
  18. Humphrey TJ. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. *Int J Food Microbiol* 1994; 21:31-40.
- 30 aves muestreadas ocho fueron positivas a *Salmonella* Enteritidis y dos a *Salmonella* Typhimurium. Sin pretender inferir comparaciones a partir del muestreo de una sola granja, dadas las condiciones homogéneas en las que se lleva a cabo la avicultura contemporánea, los hallazgos preliminares encontrados, aún no publicados, sugieren que la prevalencia en México de salmonelas en granjas avícolas es semejante a la de los demás países que tienen avicultura tecnificada.
- En el mismo estudio, de 30 aves muestreadas, en nueve de ellas se aisló *Campylobacter jejuni* y en dos *Campylobacter coli*. De acuerdo con estos resultados preliminares, es probable que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* vivan como comensales en el tracto intestinal del pollo de engorda en las parvadas comerciales en México, ello indica la utilidad, en el futuro inmediato, de realizar estudios que involucren segmentos representativos de la avicultura nacional. En México deben ser frecuentes las campilobacteriosis en humanos, derivadas del consumo de alimentos de origen aviar, por ello resultan prioritarios los estudios epidemiológicos al respecto. El empleo del método de PCR, dada su sensibilidad y especificidad, es indicado para detectar salmonelosis y campilobacteriosis en animales, en alimentos de origen animal y en el medio ambiente, con el fin de que se sustenten las bases para establecer marcadores epidemiológicos útiles en México.
- 
19. Holt PS. Molting and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: the problem and some solutions. *Poult Sci* 2003; 82:1008-1010.
  20. Mollenhorst H, Van Woudenberg CJ, Bokkers EGM, y Boer IJM. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens. *Poult Sci* 2005; 84: 1308-1313.
  21. Van de Giessen AW, Ament AJHA, Notermans SHW. Intervention strategies for *Salmonella* Enteritidis in poultry flocks: a basic approach. *International J Food Microbiol* 1994; 21:145-154.
  22. Ward LR, Therefall J, Smith HR, O'Brien SJ, Riemann H, Kass P *et al.* *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Science* 2000; 287:1753-1754.
  23. Henzler DJ, Opitz HM. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis* 1992; 36:625-631.
  24. Friedman CR, Malcom G, Rigau-Perez JG, Arambulo P, Tauxe RV. Public health risk from *Salmonella*-based rodenticides. *Lancet* 1996; 347:1705-1706.
  25. Guard PJ, Henzler DJ, Rahmann MM, Carlson RW. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:1588-1593.
  26. Threlfall EJ, Ridley AM, Ward LR, Rowe B. Assessment of health risk from *Salmonella*-based rodenticides. *Lancet* 1996; 348:616-617.

27. Helmuth R, Schroeter A. Molecular typing methods for *S. Enteritidis*. Int J Food Microbiol 1994; 21:69.
28. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 2000; 405:299-304.
29. Chacana PA, Terzolo HR. Protection Conferred by a Live *Salmonella* Enteritidis Vaccine Against Fowl Typhoid in Laying Hens. Avian Dis 2006; 50:280-283.
30. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imbereschts H *et al.* Complete nucleotide sequence of a 43 kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 and its identification in phage type DT 120 and serovar Agona. J Bacteriol 2002; 5725-5732.
31. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. Microb Drug Resist 2000; 6:77-83.
32. Petersen L, Nielsen EM, On SWL. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. Vet Microbiol 2001; 82:141-145.
33. Phillips, CA. Incidence, epidemiology and prevention of food borne *Campylobacter* species. Trends Food Sci Technol 1995; 6: 83-87.
34. Federighi M. *Campylobacter* et hygiène des aliments. Paris, France: Ed. Polytechnica, 1999.
35. Talibart R, Denis M, Castillo A, Cappelier JM, Ermel G. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. Int J Food Microbiol 2000; 55:263-267.
36. Wassenaar TM, Newell DG. The Genus *Campylobacter*. New York: Springer New York, 2007.
37. Barrow PA, Page K. Inhibition of colonization of the alimentary tract in young chickens with *Campylobacter jejuni* by pre-colonization with strains of *C.jejuni*. FEMS Microbiol Lett 2000; 182:87-91.
38. Kramer J, Visscher AH, Wagenaar JA, Jeurissen SHM. Entry and survival of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines. Vet Microbiol 2003; 91:147-155.
39. Asheg AA, Levkut M, Revajova V, Sevcikova Z, Kolodzieyski L, Pisl J. Dynamics of Lymphocyte Subpopulations in Immune Organs of Chickens Infected with *Salmonella* Enteritidis. Acta Vet Brno 2003; 72:359-364.
40. Brooks BW, Robertson RH; Henning D. Garcia MM. Production and Western blot characterization of monoclonal antibodies specific for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Rapid Methods Automation Microbiol 1995; 4:155-164.
41. Neil SD, Campell NJ, Greene JA. *Campylobacter* species in broiler chickens. Avian Pathol 1984; 13:777-785.
42. Clark AG, Bueschkens DH. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* in egg yolk and albumen. J Food Prot 1986; 49:135-141.
43. Cox NA, Hofacre CL, Bailey JS, Buhr RJ, Wilson JL, Hiett KL. Presence of *Campylobacter jejuni* in Various Organs One Hour, One Day, and One Week Following Oral or Intracoecal Inoculations of Broiler Chicks. Avian Dis 2005; 49:155-158.
44. Oyarzabal O, Murphy B. *Campylobacter* and Arcobacter. Int Food Hyg 1998; 9:29-30.
45. Bülte M, Jakob P. The use of PCR-generated invA probe for the detection of *Salmonella* spp in artificially and naturally contaminated foods. Int J Food Microbiol 1995; 26:335-344.
46. Skanseng B, Kaldhusdal M, Knut R. Comparison of chicken gut colonizations by pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. Mol Cell Probes 2006; 20:269-279.