



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΠΜΣ ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ – ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΖΩΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ / ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΑΣ ΕΞΕΛΙΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ
ΧΗΛΙΚΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΙΑ
ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ
*Campylobacter jejuni***



ΕΙΡΗΝΗ ΜΑΝΙΩΤΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΠΜΣ ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ – ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΖΩΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ / ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΑΣ ΕΞΕΛΙΓΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ
ΧΗΛΙΚΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΚΟΤΟΠΟΥΛΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΙΑ
ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ
*Campylobacter jejuni***



ΕΙΡΗΝΗ ΜΑΝΙΩΤΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της παρούσης Μεταπτυχιακής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως (Ν. 5343/1932. Άρθρο 202, παρ.2)»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Αθηνά Τζώρα

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 849 / 14 – 12 - 2018

Θέμα: « Προκαταρκτική μελέτη της αποτελεσματικότητας μιας εξελιγμένης μορφής χηλικού σιδήρου σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του *Campylobacter jejuni*»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

1. Αθηνά Τζώρα, καθηγήτρια Τμήματος Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Ιωάννης Σκούφος, καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Ελευθέριος Μπόνος, αναπληρωτής καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής με βαθμό: «Άριστα (10)»

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Ζωή - Βαλεντίνα Βαμβέτσου

Στους γιους μου

Χρήστο και Ευάγγελο – Γεώργιο

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ΔΠΜΣ «Αγροχημεία – Εφαρμογές στη Ζωική και Φυτική Παραγωγή / Φαρμακευτικά Φυτά» του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγείας των Ζώων, Υγιεινής και Ποιότητας Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κας Τζώρα Αθηνάς, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω. Της εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου τόσο για τη φιλοξενία μου στο Εργαστήριο όσο και για την πολύτιμη βοήθειά της στην οργάνωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, την ακούραστη παρακολούθησή της, τις συνεχείς υποδείξεις και διορθώσεις της αλλά και την υπομονετική καθοδήγηση και αμέριστη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια συγγραφής της μελέτης.

Θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα τον καθηγητή κ. Σκούφο Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του στη διεξαγωγή του πειράματος αλλά και το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του Εργαστηρίου για την καλή και φιλική συνεργασία που είχαμε σε όλο το διάστημα εκπόνησης της παρούσας μελέτης αλλά και την πολύτιμη εμπειρία που αποκόμισα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Σπουδών, τους διδάσκοντες και όλους τους συμμετέχοντες στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Αγροχημεία – Εφαρμογές στη Ζωική και Φυτική Παραγωγή / Φαρμακευτικά Φυτά» του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συμβολή τους στην επιτυχή ολοκλήρωση εκ μέρους μου του Κύκλου Σπουδών του παραπάνω Προγράμματος.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τα άτομα που στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου συνεχώς σε κάθε βήμα της ζωής μου και με στηρίζουν στις αποφάσεις μου με αγάπη και υπομονή. Αναφέρομαι στην οικογένειά μου, το σύζυγό μου Κωνσταντίνο και τα παιδιά μου Χρήστο και Ευάγγελο – Γεώργιο, τους οποίους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ΚΑΙ	
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	4
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Campylobacter</i>	4
1.2. Πηγές μόλυνσης του καμπυλοβακτηριδίου στον άνθρωπο	6
1.3. Κλινική εικόνα και επιπλοκές της καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο ..	9
1.4. Συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ΣΕ ΣΜΗΝΗ	
ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ	16
2.1. Το κοτόπουλο ως πηγή μόλυνσης για τα είδη <i>Campylobacter spp</i>	16
2.2. Παράγοντες κινδύνου σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής που σχετίζονται με τον επιπολασμό του <i>Campylobacter jejuni</i> σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων	17
2.3. Συχνότητα εμφάνισης του <i>Campylobacter jejuni</i> σε εντατικώς εκτρεφόμενα σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΚΤΡΟΦΗΣ	23
3.1. Μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας	23
3.2. Στρατηγικές ανοσοποίησης	25
3.3. Διατροφικές στρατηγικές	27
3.3.1. Χορήγηση προσθετικών στο πόσιμο νερό	27
3.3.2. Προσθήκη Λιπαρών οξέων και Οργανικών οξέων στην τροφή	29
3.3.3. Βακτηριοσίνες	31
3.3.4. Βακτηριοφάγοι	32
3.3.5. Προβιοτικά	33
3.3.6. Πρεβιοτικά – Συμβιωτικά	34
3.3.7. Αιθέρια έλαια	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
4. Στόχοι πειραματικού μέρους της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής	41

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
5.1. ΥΛΙΚΑ	43
5.1.1. Κρεοπαραγωγή ορνίθια	43
5.1.2. Διατροφικές αγωγές χηλικού σιδήρου	44
5.1.3. Χορηγούμενα σιτηρέσια	46
5.1.4. Δείγματα κοπράνων, στρωμνής και τυφλών εντέρων ορνιθίων για καλλιέργεια, καταμέτρηση και ποσοτικοποίηση του <i>Campylobacter jejuni</i>	49
5.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	50
5.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός – Περιγραφή των παραμέτρων που καταγράφηκαν	50
5.3. ΜΕΘΟΔΟΙ	52
5.3.1. Προσδιορισμός ζωοτεχνικών δεικτών	52
5.3.2. Προσδιορισμός ποσοστού θνητότητας κατά τη διάρκεια της εκτροφής ...	53
5.3.3. Σκορ διαρροιών κατά τη διάρκεια του πειράματος	55
5.3.4. Έλεγχος της στρωμνής των κελιών για παρουσία διαρροιών στο τέλος της εκτροφής και νεκροτομική εξέταση ορνιθίων	56
5.3.5. Πρώτοκολλα αναλύσεων	56
5.3.6. Στατιστική ανάλυση	57
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	86
10. ABSTRACT	87
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88
11.1. Βιβλιογραφία ελληνική	88
11.2. Βιβλιογραφία ξενόγλωσση	89

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επί δεκαετίες τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν ευρέως στη ζωική παραγωγή σε παγκόσμια κλίμακα. Προστίθονταν σε μικρές δόσεις στο σιτηρέσιο των παραγωγικών ζώων με σκοπό την πρόληψη ασθενειών. Εξαιτίας όμως του γεγονότος ότι μέσω της τροφικής αλυσίδας αναπτύχθηκαν μικρόβια ανθεκτικά σε αντιβιοτικά που χορηγούνταν για τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους («μικροβιακή αντοχή»), υπάρχει πλέον μια πίεση σε παγκόσμιο επίπεδο για περιορισμό της χρήσης τους ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές (Thanner et al, 2016; Vender et al, 2017). Η Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2006 κατήργησε τη χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στα φυράματα των ζώων και έκτοτε επέβαλε σημαντικούς περιορισμούς σε ότι αφορά τη θεραπευτική τους εφαρμογή (Lagha et al, 2017). Σε Η.Π.Α. και Καναδά, οι μεγάλες βιομηχανίες τροφίμων έχουν στρέψει πλέον την προσοχή τους σε πρωτοποριακές και πιο φυσικές μεθόδους διαχείρισης της ζωικής παραγωγής αποκλείοντας τη χορήγηση αντιβιοτικών παραγόντων, ώστε να ικανοποιήσουν τις επιτακτικές απαιτήσεις των καταναλωτών για παραγωγή περισσότερο «φυσικών και οργανικών» τροφίμων ζωικής προέλευσης (Gaucher et al, 2015). Ειδικά σε ότι αφορά την πτηνοτροφία κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης, λόγω της εντατικοποίησής της, βακτήρια που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα στον άνθρωπο (food-borne diseases) είναι δυνατό να αποικίσουν τον εντερικό σωλήνα των κοτόπουλων, να επιβιώσουν στην αλυσίδα παραγωγής ορνίθιου κρέατος και να επιμολύνουν το σφάγιο, θέτοντας σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή (Hermans et al, 2011; Humprey et al, 2014).

Η καμπυλοβακτηριδίωση αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια (και σε ορισμένες περιοχές του πλανήτη το συχνότερο) τροφιμογενούς, βακτηριακής αιτιολογίας, εντερίτιδας στον άνθρωπο (NNDSS 2016; ESR 2016; CDC 2017; Hansson et al, 2018). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση πάνω από εννέα εκατομμύρια περιπτώσεις κλινικής εκδήλωσης του νοσήματος εκτιμάται ότι λαμβάνουν χώρα σε ετήσια βάση (Meunier et al, 2015). Ο χειρισμός, η προετοιμασία και η κατανάλωση κρέατος κοτόπουλου ευθύνεται για το 20% - 30% των κρουσμάτων του νοσήματος στον άνθρωπο, ενώ το κοτόπουλο ως δεξαμενή του *Campylobacter jejuni* στο σύνολό του σχετίζεται με το 50% - 80% των κρουσμάτων (EFSA 2011). Δεδομένου του γεγονότος αυτού, οι αρχές που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων αναζητούν αποτελεσματικούς και οικονομικά αποδεκτούς τρόπους παρέμβασης στην αλυσίδα παραγωγής ορνίθιου

κρέατος με στόχο τη μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού σε επίπεδο εκτροφής, η οποία με τη σειρά της θα οδηγήσει στον περιορισμό του τόσο στο σφάγιο, όσο και στο τελικό προϊόν. Άλλωστε τέτοιου είδους στρατηγικές επηρεάζουν όχι μόνο τη μεταφορά του μέσω του κρέατος αλλά και άλλων (περιβαλλοντικών) οδών μετάδοσης, και είναι περισσότερο αποδεκτές από τους καταναλωτές σε σύγκριση με παρεμβάσεις στα επόμενα στάδια της αλυσίδας παραγωγής (σφαγή, λιανική πώληση), όπως η χημική απολύμανση που δυνητικά είναι αποτελεσματική ή η χρήση ακτινοβολίας, η οποία μπορεί να εξαλείψει το μικροοργανισμό από το σφάγιο (EFSA 2011).

Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η μείωση του αποικισμού του εντερικού σωλήνα του κοτόπουλου από το *C.jejuni* φαίνεται να είναι ο καλύτερος τρόπος ελέγχου του νοσήματος στον άνθρωπο, αλλά ταυτόχρονα αποδεικνύεται ιδιαίτερα δύσκολος, αν ληφθεί υπόψη η συμβιωτική συμπεριφορά του μικροοργανισμού. Σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής διαπιστώθηκε τα τελευταία χρόνια, ότι μία πολυεπίπεδη στρατηγική παρεμβάσεων, η οποία περιλαμβάνει μέτρα βιοασφάλειας, προσθετικά στην τροφή ή στο νερό με αποδεδειγμένα αντι-Campylobacter δράση, όπως προβιοτικά, πρεβιοτικά, αιθέρια έλαια, βακτηριοσίνες, βακτηριοφάγοι και μέτρα ανοσοποίησης είτε παθητικής είτε ενεργητικής είναι δυνατό να αποφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα στον έλεγχο του μικροοργανισμού (Thormar et al, 2006; Thibodeau et al, 2015). Στόχος όλων αυτών είναι να μειωθεί με «φιλικό τρόπο» και χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών παραγόντων, το φορτίο του *C. jejuni* που εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα και φτάνει στον καταναλωτή (Wagenaar et al, 2013). Ο πιο ενδεδειγμένος και εφικτός στόχος θα ήταν μια μείωση του αποικισμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων κατά 3 log₁₀units, με συνέπεια τον περιορισμό εκδήλωσης της νόσου στον άνθρωπο έως και 76% (Rosenquist et al, 2003).

Το θεωρητικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αναφέρεται σε θέματα που σχετίζονται με την κλινική εκδήλωση του νοσήματος στον άνθρωπο και τις ενδεχόμενες επιπλοκές, το κοτόπουλο ως πηγή μόλυνσης του *C. jejuni*, τους παράγοντες σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής που σχετίζονται με τον επιπολασμό του μικροοργανισμού σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων, και φυσικά στρατηγικές για τον βιο – έλεγχο του σε επίπεδο εκτροφής, με ιδιαίτερη έμφαση στις διατροφικές παρεμβάσεις.

Στα πλαίσια της αναζήτησης εναλλακτικών διατροφικών προϊόντων με ενδεχόμενη αντι – *Campylobacter* δράση αποτελεί η δοκιμή σε επίπεδο εκτροφής μιας εξελιγμένης μορφής χηλικού σιδήρου, ως προσθετικό στη διατροφή σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής (broilers), με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς του. Ειδικότερα ο πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώθηκε στην ευεργετική επίδραση του δραστικού συστατικού ferric tyrosine chelate στην υγεία των ορνιθίων, στις ζωοτεχνικές αποδόσεις, όπως και στην αποτελεσματικότητά του για μείωση του φορτίου του *C. jejuni* στον εντερικό σωλήνα των εξεταζόμενων ορνιθίων.

Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της παρούσης πειραματικής μελέτης ευελπιστούμε να διευρύνει τους ορίζοντες σε ότι αφορά την αναζήτηση καινοτόμων φυσικών προσθετικών στη διατροφή των κοτόπουλων με εξειδικευμένους μηχανισμούς δράσης, μη αντιβιοτικής προέλευσης, ικανών να περιορίσουν τον αποικισμό του εντέρου των ορνιθίων από το *C. jejuni*, γεγονός που με τη σειρά του θα οδηγήσει σε περιορισμό της εκδήλωσης του νοσήματος της καμπυλοβακτηριδίου στον άνθρωπο.

1. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Campylobacter*

Το γένος *Campylobacter* ανήκει στην οικογένεια Campylobacteraceae, στην οποία επίσης περιλαμβάνονται τα γένη Arcobacter και Helicobacter (Fitzgerald and Nackamkin 2011). Αποτελείται από τουλάχιστον 29 είδη, πέντε από τα οποία διαιρούνται σε 11 υποείδη, ωστόσο συνεχώς αυξάνεται ο αριθμός τους λόγω της ταυτοποίησης νέων ειδών (Hansson et al, 2018). Το *Campylobacter jejuni* αποτελεί το σημαντικότερο αίτιο γαστρεντερίτιδας του ανθρώπου. Περιλαμβάνει δύο υποείδη, το *C. jejuni subsp. jejuni* και *C. jejuni spbsp. doylei*, τα οποία ελάχιστα διαφέρουν μεταξύ τους, ενώ άλλα σημαντικά είδη είναι το *C. coli* και το *C. lari* (Tresse et al, 2017). Τα τρία αυτά είδη μαζί με κάποια στελέχη του *C. upsaliensis* είναι γνωστά και ως θερμόφιλα (thermophilic), κι αυτό γιατί τα συγκεκριμένα είδη έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 41,5°C (που είναι η εσωτερική θερμοκρασία του σώματος του κοτόπουλου) και μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες μεταξύ 30°C και 45°C (Robyn et al, 2015). Εξαιτίας της απουσίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την προσαρμογή τους στις χαμηλές θερμοκρασίες (cold shock proteins genes), τα είδη αυτά γενικά δεν μπορούν να αναπτυχθούν κάτω των 30°C (Silva et al, 2011). Αναφορικά με τους ορότυπους του *C. jejuni*, ο συχνότερος σε παγκόσμιο επίπεδο είναι ο O:19, ενώ έχουν αναφερθεί οι O:1, O:2, O:57, O:23, O:41, O:44 (Nachamkin 1995).

Τα είδη του γένους *Campylobacter* είναι μη σπορογόνοι, αρνητικοί κατά gram βάκιλλοι με σχήμα ελικοειδές ή κυρτό (η ετυμολογία της λέξης προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «καμπυλωτό» και «βακτηρίδιο»), ενώ το μήκος του κυττάρου κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 5μm και το πλάτος από 0,2 έως 0,9μm κατά τη λογαριθμική φάση του πολλαπλασιασμού τους (Vandamme et al, 2006). Τα μικροβιακά κύτταρα στα άκρα τους φέρουν μία βλεφαρίδα (single polar flagellum), με εξαίρεση το μη κινήτο *C. gracilis* και το *C. showae* με πολλαπλό αριθμό βλεφαρίδων (Facciola et al, 2017). Η παρουσία της βλεφαρίδας (ή πολικού μαστιγίου) προσδίδει στο μικροοργανισμό μια χαρακτηριστική ταχεία κινητικότητα και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εκδήλωση της παθογένειάς του (Λάζου 2014). Τα είδη

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

του γένους *Campylobacter* είναι μικροαερόφιλα, δηλαδή αναπτύσσονται μόνο σε περιεκτικότητες οξυγόνου μικρότερες από εκείνη της ατμόσφαιρας (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), σε pH μεταξύ 6,5 και 7,57 και με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 37°C και 42°C (Davis and DiRita 2017).

Εργαστηριακά έχει διαπιστωθεί ότι στις νωπές καλλιέργειες ο μικροοργανισμός εκδηλώνει χαρακτηριστική κοχλιοειδή κίνηση, ενώ όταν εκτεθεί στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο μετασχηματίζεται σε κοκκώδη μορφή και παραμένει ακίνητος. Η μορφή αυτή δεν αναπτύσσεται (Crushel et al, 2004). Ουσιαστικά πρόκειται για ένα αδρανές στάδιο, στο οποίο εισέρχονται τα είδη *Campylobacter* που ονομάζεται «Βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα» (VBNC, viable but non culturable cells). Κατά το στάδιο αυτό, αναστέλλεται η δυνατότητα ανάπτυξης στα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά κανόνα για την καλλιέργειά τους, και η μεταβολική τους δραστηριότητα διατηρείται σε οριακό επίπεδο. Ωστόσο τα VBNC των καμπυλοβακτηριδίων μπορούν να αναπτυχθούν ξανά σε θρεπτικά υποστρώματα μετά από αναζωογόνησή τους (Oliver 2010). Επομένως σε πολλές μελέτες επισημαίνεται το γεγονός ότι η μορφή VBNC διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του μικροοργανισμού και στη διάρκεια παραμονής του στο εξωτερικό περιβάλλον (Magajna and Schraft 2015).

Τα είδη του *Campylobacter spp.* είναι ευαίσθητα σε περιβάλλοντα με χαμηλό συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w). Απουσία ανάπτυξής τους παρατηρείται σε υποστρώματα με τιμές a_w μικρότερες από 0,987 καθώς είναι ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) μεγαλύτερες από 2% w/w. Άριστη ανάπτυξη παρατηρείται σε υποστρώματα με τιμή συντελεστή ενεργού ύδατος κατά προσέγγιση 0,997 (Silva et al, 2011). Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή η συσκευασία υπό κενό δεν επηρεάζουν την επιβίωση του μικροαερόφιλου από τη φύση του μικροοργανισμού. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε δείγματα κρέατος ορνιθίων, βοοειδών και χοίρων που συντηρήθηκαν σε ψύξη, δηλαδή στους 4°C, σε τέτοιου είδους συνθήκες (Balamurugan et al, 2011).

Τα είδη του γένους *Campylobacter* είναι ευαίσθητα σε συνθήκες ξηρασίας, επίδρασης UV ακτινοβολίας, απολυμαντικών και ακραίων τιμών pH (Hansson et al, 2018). Η διαδικασία της κατάψυξης μειώνει τον πληθυσμό του μικροοργανισμού, χωρίς ωστόσο να τον εξαλείφει εντελώς στις μολυσμένες τροφές. Καμπυλοβακτηρίδια

έχουν ανιχνευθεί σε τεμάχια σφάγιων ορνιθίων ακόμη και μετά την παρέλευση 3 μηνών συντήρησης στους -20°C (Boysen et al, 2013). Εντούτοις, ο μικροοργανισμός αδρανοποιείται εύκολα με τη θερμική επεξεργασία, όπως για παράδειγμα κατά τις συνηθισμένες πρακτικές παστερίωσης του γάλακτος. Ο θερμικός «τραυματισμός» του *C. jejuni* σημειώνεται στους 46°C και η θερμική αδρανοποίησή του στους 48°C (Stern and Line 2000). Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα είδη *C. jejuni* και *C. coli* δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 30°C με αποτέλεσμα να μην πολλαπλασιάζονται κατά το χειρισμό και τη συντήρηση των τροφίμων. Ωστόσο, η επιβίωσή τους σε συνθήκες ψύξης (4°C) είναι παρατεταμένη (Balamurugan et al, 2011).

Λόγω των μικροαερόφιλων απαιτήσεών του, δεξαμενή του *C. jejuni* αποτελούν τα θερμόαιμα ζώα, συμπεριλαμβανομένων παραγωγικών (κοτόπουλα, βοοειδή, χοιρινά, πρόβατα), των κατοικιδίων και ζώων της άγριας πανίδας. Ωστόσο μπορεί να επιβιώσει σε περιβάλλοντα προστατευμένο από την ξηρασία, όπως υδάτινες επιφάνειες μολυσμένες από κοπριά ζώων, όπου ο μικροοργανισμός παραμένει για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών (EFSA 2011). Αυτό συμβαίνει, διότι το *C. jejuni* έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει βιοϋμένια (biofilms) αποτελούμενα αποκλειστικά από δικά του βακτηριακά κύτταρα ή να συνυπάρχει με βακτήρια όπως *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* (Ica et al, 2012). Σε περιβάλλοντα με απουσία ή χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών στους 4°C , στελέχη του *C. jejuni* μετασχηματίστηκαν σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε κύτταρα VBNC όταν συμμετείχαν σε βιοϋμένια σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή των ίδιων βακτηρίων (Magajna et Schraft 2015). Ουσιαστικά η προστατευτική στην τοξική επίδραση παραγόντων, λειτουργία του μικροπεριβάλλοντος του βιοϋμένιου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα ενός στελέχους να επιβιώνει σε δυσμενείς συνθήκες (Svensson et al, 2008; Keto-Timonen et al, 2016)).

1.2. Πηγές μόλυνσης του καμπυλοβακτηριδίου στον άνθρωπο

Η καμπυλοβακτηριδίωση στον άνθρωπο απαντάται συνήθως ως σποραδικά κρούσματα ή ως επιδημίες «κλειστού τύπου», δηλαδή αφορούν άτομα της ίδιας οικογένειας ή άτομα που συμμετείχαν σε ένα κοινό γεύμα. Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί με στόχο τον προσδιορισμό των πιθανών

πηγών μόλυνσης από το *Campylobacter*. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το νόσημα οφείλεται σε κατανάλωση πουλερικών, μη παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων και μολυσμένου νερού (Doorduyn et al, 2010; EFSA 2014).

Η κατανάλωση κοτόπουλου και των υποπροϊόντων του έχει τις τελευταίες δεκαετίες αυξηθεί, εξαιτίας της χαμηλής τιμής του, της ιδιαίτερης γεύσης του αλλά και του μικρού χρόνου που απαιτείται για την προετοιμασία και το μαγείρεμά του. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης οξείας καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο σε παγκόσμιο επίπεδο, κυρίως σε παιδιά, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι συνηθέστεροι τρόποι μόλυνσης του ανθρώπου σχετίζονται: με μη σωστό χειρισμό ωμού ορνίθιου κρέατος, διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ ωμού κρέατος και άλλων τροφίμων καθώς και κατανάλωση ατελώς μαγειρεμένου κρέατος πουλερικών (Boysen et al, 2014; Osimani and Clementi 2016). Σύμφωνα με πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη το ορνίθιο κρέας αποτελεί την κύρια πηγή μετάδοσης καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 65% και 69% (Ravel et al, 2017).

Επιπλέον η πρόκληση καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση πάστας (paté) συκωτιού κοτόπουλου σε Ευρώπη (EFSA 2013), Αμερική (Williams et al, 2015) και Αυστραλία (Moffatt et al, 2016). Το μη παστεριωμένο αγελαδινό γάλα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση καμπυλοβακτηριδίωσης (Modi et al, 2015). Η κατανάλωση μη χλωριωμένου νερού σχετίζεται με επιδημίες του νοσήματος (ESR 2016; Kuhn et al, 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι το καλοκαίρι του 2009 δηλώθηκε για πρώτη φορά στις υπηρεσίες υγείας της Ελλάδας επιδημία γαστρεντερίτιδας από *Campylobacter* στην Κρήτη με 54 καταγεγραμμένα περιστατικά. Τα αποτελέσματα της επιδημιολογικής διερεύνησης συνηγορούν υπέρ της υδατογενούς αιτιολογίας της (Karagiannis et al, 2010).

Η άμεση επαφή με παραγωγικά ζώα (βοοειδή, χοιρινά, αρνιά) όπως και η κατανάλωση κρέατός τους (και εντοσθίων) έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως τρόπος πρόκλησης καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο (Facciola et al, 2017; NSW 2018). Επίσης μολυσμένα οστρακοειδή έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση του νοσήματος. Πιθανή αιτία της μόλυνσης είναι τα μολυσμένα από το μικροοργανισμό νερά, απ' όπου αλιεύονται τα οστρακοειδή (Rincé et al, 2018). Επιπλέον κατοικίδια ζώα έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν ξενιστές του καμπυλοβακτηριδίου. Το *C. jejuni*,

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ CAMPYLOBACTER JEJUNI
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

έχει απομονωθεί σε δείγματα κοπράνων σκύλων και κυρίως κουταβιών (Westermarck 2016; CDC 2018).

Στον πίνακα 1, καταγράφονται οι κυριότερες κατηγορίες τροφίμων και ζωικών ειδών που σχετίζονται με το *Campylobacter* και που έχουν αναφερθεί σε κράτη-μέλη και μη κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το έτος 2017 (EFSA 2018). Όπως προκύπτει, το κρέας από κοτόπουλο φέρει το μεγαλύτερο φορτίο του μικροοργανισμού και αποτελεί την κυριότερη δεξαμενή μόλυνσης στον άνθρωπο.

*Πίνακας 1: Οι κυριότερες κατηγορίες τροφίμων και ζωικών ειδών που σχετίζονται με τον επιπολασμό του *Campylobacter* στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2017 (EFSA Journal 2018)*

Κατηγορία τροφίμου	Είδη ζώων	Αριθμός ελεγχόμενων δειγμάτων	Ποσοστό (%) των θετικών δειγμάτων
Φρέσκο κρέας	Κοτόπουλο	13,445	37,4
	Γαλοπούλες	1,028	31,5
	Λοιπά πουλερικά	1,425	27,7
	Χοιρινά	843	6,9
	Βοοειδή	1,456	1,4
Προϊόντα κρέατος (έτοιμα για κατανάλωση, readytoeat)	Ορνίθιο κρέας	101	0,0
	Γαλοπούλες	11	0,0
	Χοιρινό	178	1,1
	Βοοειδών	16	0,0
	Μη καθορισμένο	74	0,0
Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	Γάλα	1,554	1,9
	Τυρί	522	0,5

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ CAMPYLOBACTER JEJUNI
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Ζώα	Κρεοπαραγωγή ορνίθια	10,077	12,3
	Γαλοπούλες	0,0	0,0
	Γουρούνια	3,817	17,6
	Βοοειδή	9,147	6,9
	Σκύλοι και γάτες	1,176	29,3
	Άλλα είδη ζώων	5,817	6,3

1.3. Κλινική εικόνα και επιπλοκές της καμπυλοβακτηριδίων στον άνθρωπο

Η καμπυλοβακτηριδίων έχει πλέον αναγνωριστεί ως ένα από τα κυριότερα αίτια διαρροϊκής, βακτηριακής αιτιολογίας - λοίμωξης σε παγκόσμιο επίπεδο (Fitzerald 2015). Μπορεί να είναι υποκλινικής μορφής ή να προκαλέσει διαφορετικής σοβαρότητας συμπτωματολογία. Το νοσολογικό φάσμα της εντερίτιδας ποικίλει από υδαρή, μη αιμορραγική και μη φλεγμονώδη διάρροια, σε σοβαρή φλεγμονώδη που συνοδεύεται από υψηλό πυρετό και κοιλιακό άλγος (Teunis et al, 2018). Άλλες κλινικές εκδηλώσεις είναι η μειωμένη όρεξη, η καταβολή των δυνάμεων, η ναυτία, οι μυαλγίες και οι έμετοι (Dasti et al, 2010). Τα συμπτώματα εμφανίζονται 2-5 ημέρες μετά την έκθεση στο λοιμογόνο παράγοντα και διαρκούν συνήθως μία εβδομάδα. Κλινικά, η λοίμωξη από *Campylobacter* spp. είναι μη διαφοροδιαγνώσιμη από οξείες γαστρεντερικές λοιμώξεις που προκαλούνται από άλλα βακτηριακά παθογόνα, όπως *Salmonella*, *Shigella* και *Yersinia*, επομένως η εργαστηριακή μικροβιολογική επιβεβαίωση είναι απαραίτητη.

Παρόλο που η βακτηριαμία είναι σπάνια επιπλοκή της λοίμωξης και μπορεί να αφορά κυρίως ανοσοκατεσταλμένα άτομα, άτομα με υποκείμενα νοσήματα, όπως κακοήθειες νεοπλασίες ή ηλικιωμένους, το βακτήριο δύναται να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και να προκαλέσει πολύ σοβαρή λοίμωξη απειλητική για τη ζωή του ατόμου (Tribble et al, 2010). Η άμεση διασπορά από τη γαστρεντερική οδό είναι δυνατό να οδηγήσει σε χολοκυστίτιδα, περιτονίτιδα, παγκρεατίτιδα, μαζική γαστρεντερική αιμορραγία, μηνιγγίτιδα ή και ενδοκαρδίτιδα. Ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας από το *C. jejuni* ακολουθούνται από το σύνδρομο της

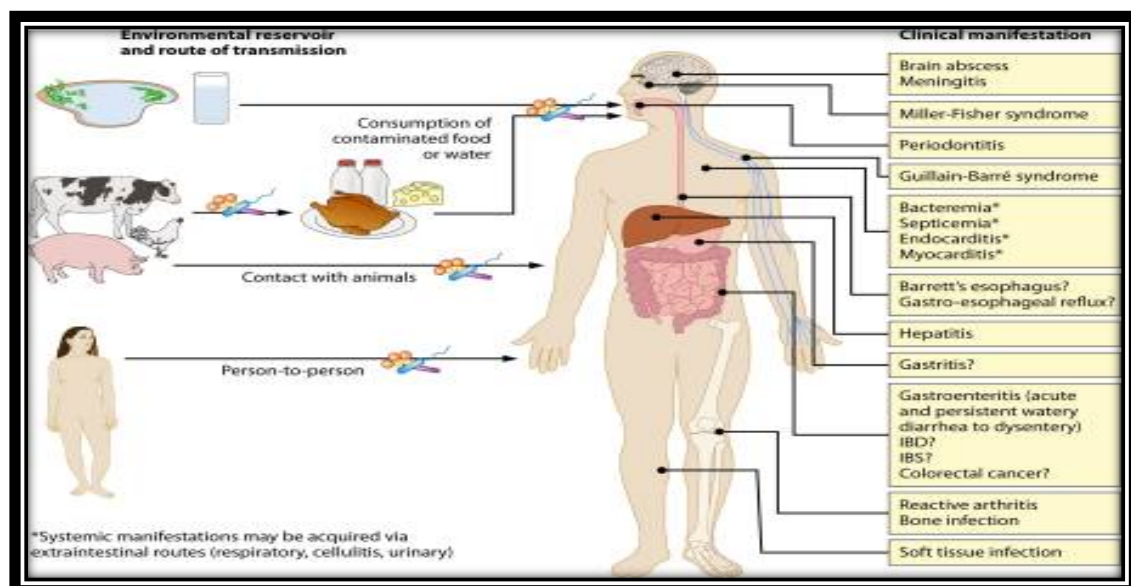
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ CAMPYLOBACTER JEJUNI
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

αντιδραστικής αρθρίτιδας ή σύνδρομο Reiter, όπου προσβάλλονται αρθρώσεις όπως αυτές των γονάτων, των αστραγάλων και των καρπών (Hannu et al, 2004).

Επιπλέον στις επιπλοκές της καμπυλοβακτηριδίδωσης στον άνθρωπο συμπεριλαμβάνονται το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, λειτουργικές γαστρεντερικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου, η χρόνια φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και η νόσο του Crohn (Kaakoush et al, 2015; Facciola et al, 2017). Στις εκτός γαστρεντερικού σωλήνα επιπλοκές της λοίμωξης από το *Campylobacter jejuni* συμπεριλαμβάνονται δύο σύνδρομα, που σχετίζονται με διαταραχές στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου: το σύνδρομο Guillain-Barré (αυτοάνοση διαταραχή του περιφερειακού νευρικού συστήματος) και το σύνδρομο Miller Fischer (σπάνια παραλλαγή του συνδρόμου Guillain-Barré).

Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται οι κυριότεροι τρόποι μετάδοσης του νοσήματος στον άνθρωπο και οι πιθανές κλινικές εκδηλώσεις του (πηγή: Kaakoush et al, 2015).

Εικόνα 1: Τρόποι μετάδοσης του Campylobacter και κλινικές εκδηλώσεις του νοσήματος (με ερωτηματικό αναφέρονται οι περιπτώσεις που πιθανόν ο μικροοργανισμός να εμπλέκεται, άλλα δεν έχει αποδειχτεί ακόμα με απόλυτη βεβαιότητα).



Τα υποστηρικτικά μέτρα, όπως η χορήγηση υγρών και ηλεκτρολυτών για την αποκατάσταση της οξεοβασικής ισορροπίας αποτελούν το βασικό θεραπευτικό σχήμα που εφαρμόζεται στους ασθενείς με ήπια έως μέτριας σοβαρότητας συμπτωματολογία. Σε περιπτώσεις όπου η αντιβιοθεραπεία κρίνεται απαραίτητη, όπως σε αυτούς με υψηλό πυρετό, με αιμορραγικές διαρροϊκές κενώσεις, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, σε ασθενείς με σηψαιμία ή σε αυτούς που τα συμπτώματά τους επιδεινώνονται ή επιμένουν περισσότερο από μία εβδομάδα μετά τη διάγνωση, η ερυθρομυκίνη και οι φλουοκινολόνες αποτελούν τα φάρμακα εκλογής. Ωστόσο ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι αυξάνεται με ταχύτατους ρυθμούς ο αριθμός των στελεχών του καμπυλοβακτηριδίου που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Gharst et al, 2013).

Συγκεκριμένα τα είδη *C. jejuni* και *C. coli* είναι ήδη ανθεκτικά στις πενικιλίνες πρώτης και δεύτερης γενιάς, στις κεφαλοσπορίνες, στην τριμεθοπρίμη, τη ριφαμπικίνη, τη σουλφαμεθοξαζόλη και τη βανκομυκίνη εξαιτίας την ευρείας χρήσης αντιβιοτικών παραγόντων στη διατροφή των ζώων τις προηγούμενες δεκαετίες (Luangtongkum et al, 2009; Ushanov 2018). Επιπλέον σε επιδημιολογικές μελέτες έχει ήδη αποδειχτεί η ανάπτυξη στελεχών του *C.jejuni* ανθεκτικών στα μακρολίδια και στις φλουοκινολόνες, που αποτελούν και τα φάρμακα εκλογής στον άνθρωπο για τη θεραπεία του νοσήματος (Shen et al, 2017). Η ανάπτυξη στελεχών καμπυλοβακτηριδίου ανθεκτικών σε ευρεία κλίμακα αντιμικροβιακών παραγόντων (multi drug resistant campylobacter) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με τη δημόσια υγεία.

1.4. Συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η συχνότητα εμφάνισης της καμπυλοβακτηριδίωσης στον άνθρωπο αυξάνει σταθερά σε παγκόσμιο επίπεδο (WHO 2012; EFSA 2014). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority) και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (European Centre for Disease Prevention and Control), η λοίμωξη αποτελούσε από το 2005 το συχνότερο βακτηριακό αίτιο της οξείας γαστρεντερίτιδας και το πιο συχνό απομονωθέν παθογόνο στις καλλιέργειες

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ CAMPYLOBACTER JEJUNI
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

κοπράνων υπερβαίνοντας τη σαλμονέλα. Συγκεκριμένα μετά από μια περίοδο συνεχούς αύξησης των κρουσμάτων από το 2008, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση του αριθμού των καταγεγραμμένων περιστατικών για τα έτη 2013-2017, τα οποία εκδηλώθηκαν κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Διαπιστώθηκε μια μεγάλη διαφοροποίηση στον αριθμό των κρουσμάτων μεταξύ των κρατών, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό επίπεδο ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης, στα συστήματα παρακολούθησης και καταγραφής και στις μικροβιολογικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την ταυτοποίηση του καμπυλοβακτηριδίου.

Ο μέσος όρος επιβεβαιωμένων κρουσμάτων του νοσήματος ήταν 64,8 ανά 100.000 κατοίκους για το 2017, δηλαδή διαπιστώθηκε μια μικρή μείωση σε σχέση με την προηγούμενη χρονιά του 2016 (66,3 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανά 100,000 κατοίκους). Τα πιο υψηλά ποσοστά εκδήλωσης του νοσήματος διαπιστώθηκαν σε Τσεχία (230 περιπτώσεις ανά 100,000), Σλοβακία (127,8 / 100,000), Σουηδία (106,1 ανά 100,000 κατοίκους) και Λουξεμβούργο (103,8 / 100,000 κατοίκους). Τα χαμηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν σε Βουλγαρία, Κύπρο, Πολωνία, Πορτογαλία και Ρουμανία. Στον πίνακα 2 εμφανίζονται περιληπτικά τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης αναφορικά με την καμπυλοβακτηριδίωση στον άνθρωπο για τα έτη 2013 – 2017 (EFSA 2018).

Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία για τα έτη 2013 – 2017 στην Ευρωπαϊκή Ένωση που αφορούν την καμπυλοβακτηριδίωση στον άνθρωπο (προσαρμόστηκε από EFSA 2018)

	2017	2016	2015	2014	2013	Πηγή πληροφοριών
Στον άνθρωπο						
Συνολικός αριθμός επιβεβαιωμένων περιστατικών	246,158	246,917	232,134	236,818	214,710	ECDC
Αριθμός επιβεβαιωμένων περιστατικών ανά 100,000	64,8	66,3	62,9	66,5	61,4	ECDC

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

κατοίκους						
Αριθμός κρατών μελών που συμμετείχαν στο πρόγραμμα παρακολούθησης	27	27	27	26	26	ECDC
Αριθμός σχετιζόμενων με το μικροοργανισμό επιδημιών	1,445	4,655	1,488	2,082	1,836	EFSA
Συνολικός αριθμός επιδημιών	395	476	399	454	417	EFSA

Στις Η.Π.Α., το *Campylobacter* ως αίτιο οξείας γαστρεντερίτιδας εκτιμάται ως ένας από τους σημαντικότερους βακτηριακούς αιτιολογικούς παράγοντες τροφιμογενούς νοσήματος. Μέσω των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) και του Δικτύου Ενεργούς Επιτήρησης τροφιμογενών νοσημάτων (FoodNet, Foodborne Diseases Active Surveillance Network) διαπιστώθηκε ότι το έτος 2018, η συχνότητα των εργαστηριακά επιβεβαιωμένων κρουσμάτων καμπυλοβακτηριδίου στον άνθρωπο ακολουθώντας αυξητική τάση συγκριτικά με την προηγούμενη τριετία 2015 – 2017, προσδιορίστηκε στα 19,5 κρούσματα ανά 100.000 κατοίκους (FoodNet 2018). Εκτιμάται ότι στις Η.Π.Α., πάνω από 1,3 εκατομμύρια ανθρώπων εκδηλώνουν το νόσημα σε ετήσια βάση, ενώ το οικονομικό κόστος υπολογίζεται μεταξύ 1,3 και 6,8 δισεκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο (Hansson et al, 2018). Στον Καναδά το 2018, διαπιστώθηκε ότι 24,8 άτομα ανά 100.000 κατοίκους (συνολικά 3.459 περιπτώσεις, στις 159 από αυτές απαιτήθηκε νοσοκομειακή περίθαλψη) προσβλήθηκαν από καμπυλοβακτηριδίου, αναδεικνύοντας το νόσημα ως το συχνότερο αίτιο γαστρεντερίτιδας τροφιμογενούς προέλευσης (Public Health Ontario 2017).

Στις οικονομικά «αναπτυσσόμενες» χώρες το *Campylobacter* ενδημεί και η λοίμωξη περιορίζεται σε παιδιά κάτω των δύο ετών και ιδιαίτερα στα βρέφη (Platts-Mills et al,

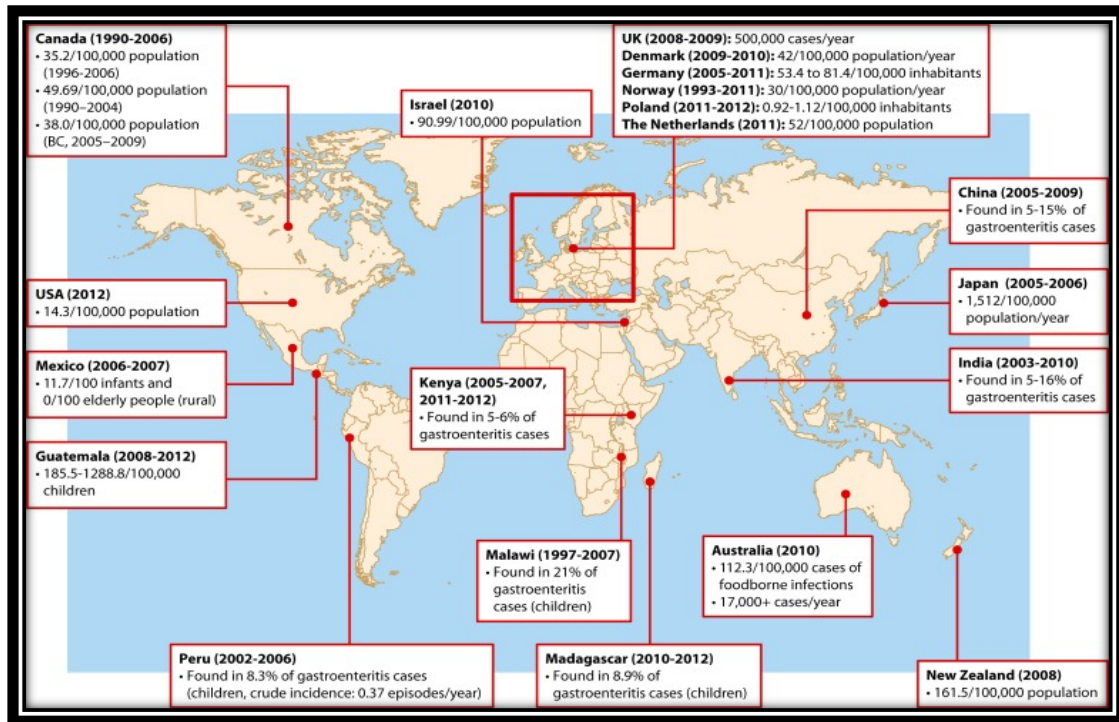
2014). Αντίθετα στις οικονομικά «αναπτυγμένες» χώρες, νοσούν άτομα όλων των ηλικιών και η μεγαλύτερη συχνότητα του νοσήματος εμφανίζεται στα παιδιά κάτω των πέντε ετών και στους νεαρούς ενήλικες. Τα κρούσματα είναι αυξημένα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Ιούλιο – Αύγουστο) στις εύκρατες χώρες (Strachan et al, 2013). Αντίθετα σε χώρες όπως η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία και αυτές με τροπικό κλίμα δεν παρατηρείται αύξηση κρουσμάτων του νοσήματος που να σχετίζεται με την εποχικότητα (Mason et al, 2013). Παρά το γεγονός ότι αρκετές χώρες παρουσιάζουν αξιοσημείωτα επαναλαμβανόμενο εποχιακό επιδημικό πρότυπο κατά έτος, η εποχική διακύμανση διαφοροποιείται μεταξύ των χωρών (Djennad et al, 2019). Γενικά αυτές με ηπιότερους χειμώνες παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα του νοσήματος νωρίτερα στη διάρκεια του έτους (Lake 2017). Σε παγκόσμιο επίπεδο η συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος ποικίλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων χωρών και είναι σε σημαντικό βαθμό άγνωστη στις περισσότερες των περιπτώσεων (WHO 2013).

Αναφορικά με την Ελλάδα, τα επιδημιολογικά δεδομένα για την καμπυλοβακτηριδίαση στον άνθρωπο δεν είναι επαρκή. Ωστόσο το *Campylobacter* συμπεριλαμβάνεται στο αναδιοργανωμένο Σύστημα Εργαστηριακής Επιτήρησης (ΣΕΕ), το οποίο λειτουργεί πιλοτικά με συνεχώς αυξανόμενο αριθμό σημείων ελέγχου. Το σύστημα αυτό συντονίζεται από το Γραφείο Εργαστηριακής Επιδημιολογικής Επιτήρησης του ΚΕΕΛΠΝΟ. Σε μελέτη το 2014, ο αριθμός των θετικών καλλιιεργειών για *Campylobacter* ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αριθμό για σαλμονέλα και σιγκέλα στα ίδια σημεία επιτήρησης για το ίδιο χρονικό διάστημα. Το είδος που απομονώθηκε ήταν το *C. jejuni*, το οποίο επικράτησε με 100% συχνότητα (ΚΕΕΛΠΝΟ 2014). Τα αποτελέσματα αυτά για γη χώρα μας έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των λοιπών ευρωπαϊκών χωρών.

Στην εικόνα 2, παρουσιάζονται επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τη συχνότητα εμφάνισης καμπυλοβακτηριδίασης στον άνθρωπο (*C. jejuni/C. coli*) σε παγκόσμιο επίπεδο (πηγή: : Kaakouch et al, 2015).

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΚΕΦ. 1: ΤΟ ΕΙΔΟΣ CAMPYLOBACTER JEJUNI
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Εικόνα 2: Συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος της καμπυλοβακτηριδίδωσης στον άνθρωπο σε παγκόσμιο επίπεδο



Αξίζει να τονιστεί ότι οι πραγματικές επιπτώσεις της λοίμωξης, όπως άλλωστε συμβαίνει με τα περισσότερα τροφιμογενή νοσήματα, είναι κατά πολύ μεγαλύτερες από αυτές που προσδιορίζονται ή εκτιμώνται μέσω των διαφόρων συστημάτων επιτήρησης. Λόγω της ηπιότητας των συμπτωμάτων, οι ασθενείς δεν προσφεύγουν στις υπηρεσίες υγείας, ενώ και αν ακόμα ζητηθεί ιατρική βοήθεια δεν διερευνάται ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου πλήρως. Επομένως οι καταγεγραμμένες περιπτώσεις εκδήλωσης καμπυλοβακτηριδίδωσης στον άνθρωπο σε παγκόσμιο επίπεδο από το *C. jejuni* φαίνεται να αποτελούν την κορυφή του παγόβουνου (Wagenaar et al, 2013).

2. ΤΟ CAMPYLOBACTER JEJUNI ΣΕ ΣΜΗΝΗ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ

2.1. Το κοτόπουλο ως πηγή μόλυνσης για τα είδη *Campylobacter* spp.

Ο πεπτικός σωλήνας του κοτόπουλου αποτελεί άριστο περιβάλλον (θερμοκρασία 41°C - 42°C) για τον πολλαπλασιασμό του *Campylobacter jejuni*. Τα πτηνά παραμένουν υγιή και λειτουργούν ως φυσιολογικές δεξαμενές του βακτηρίου, χωρίς να εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα, δηλαδή ουσιαστικά το βακτήριο είναι συμβιωτικό (commensal). Σπανιότερα ο μικροοργανισμός φαίνεται να σχετίζεται με καταστροφή του βλεννογόνου του εντέρου, αυξημένα ποσοστά θνητότητας και χαμηλές ζωοτεχνικές αποδόσεις (Williams et al, 2013; Humphrey et al, 2014). Μετά την εκκόλαψη οι νεοσσοί θεωρούνται απαλλαγμένοι από *Campylobacter* μιας και έχει αποδειχτεί ότι η μητρική ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο για τις δύο πρώτες εβδομάδες της ζωής τους (Han et al, 2016). Το επίπεδο των μητρικών αντισωμάτων προοδευτικά μειώνεται και τελικά εκμηδενίζεται στο τέλος της τρίτης εβδομάδας περίπου. Ο αποικισμός του πεπτικού σωλήνα του κοτόπουλου από το καμπυλοβακτηρίδιο (κυρίως στο τυφλό και παχύ έντερο) λαμβάνει χώρα τη χρονική αυτή περίοδο, μετά την έκθεση σε ζωντανά μικρόβια του περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ο μικροοργανισμός εξαπλώνεται ταχύτατα με τα μολυσμένα κόπρανα από πτηνό σε πτηνό μέσα στο σμήνος και μπορεί να φτάσει έως και 10⁹ CFU / gram στο τυφλό τους έντερο (Hermans et al, 2011; Thibodeau et al, 2015). Ο πληθυσμός του *C. jejuni* στο τυφλό αυξάνει εντός λίγων ημερών από την έναρξη του αποικισμού και μπορεί να παραμείνει μέχρι τη σφαγή, περίπου δηλαδή στις 42 ημέρες στα συμβατικά συστήματα παραγωγής (van Gerwe et al, 2009). Σε ότι αφορά την κάθετη μετάδοση του μικροοργανισμού, δεν θεωρείται τόσο σημαντική όσο η οριζόντια (Calicott et al, 2006; Agunos et al, 2014).

Ο αποικισμός του εντέρου κατά τη διάρκεια της εκτροφής είναι υπεύθυνος για τη μόλυνση του σφάγιου και του εξοπλισμού ενός πτηνοσφαγείου (Silva et al, 2011). Κατά τη διάρκεια της σφαγής, ο εντερικός σωλήνας μπορεί να διανοιγεί και το περιεχόμενό του να επιμολύνει το σφάγιο (Habib et al, 2012). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα στάδια του ζεματίσματος, της αποπτίλωσης και της απεντέρωσης. Ο μικροοργανισμός σχηματίζοντας μια μεμβράνη πάνω στο δέρμα, παγιδεύεται σε ρωγμές και πτυχές. Ειδικά κατά τη διάρκεια του ζεματίσματος,

ανοίγουν οι θύλακες των φτερών και παραμένουν ανοιχτοί σε όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας ως την ψύξη. Όταν κλείσουν συγκρατούν τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι λόγω των μικροαερόφιλων απαιτήσεών τους εξασφαλίζουν ένα ευνοϊκότατο περιβάλλον για την επιβίωσή τους. Διασταυρούμενη επιμόλυνση των σφαγέντων σμηνών μπορεί να λάβει χώρα μέσω των επιμολυσμένων επιφανειών, του εξοπλισμού, του νερού και του αέρα του πτηνοσφαγείου (Althaus et al, 2017). Με τη ψύξη το *Campylobacter jejuni* επιβιώνει (Maziero and de Oliveira 2010). Επομένως μείωση του φορτίου του βακτηρίου στο εντερικό περιεχόμενο θα οδηγήσει σε περιορισμό της επιμόλυνσης του σφάγιου (Hue et al, 2011).

2.2. Παράγοντες κινδύνου σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής που σχετίζονται με τον επιπολασμό του *Campylobacter jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων

Διάφοροι παράγοντες σχετίζονται με την είσοδο του *Campylobacter jejuni* σε μια πτηνοτροφική εκμετάλλευση, καθιστώντας δύσκολο να παραμείνουν τα σμήνη ελεύθερα του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια εκτροφής τους. Το εξωτερικό περιβάλλον αλλά και οι διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται θεωρείται ότι συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό στη μόλυνση των σμηνών. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου είναι οι ακόλουθοι:

Πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχουν κατά καιρούς αποδείξει τη σύνδεση της εποχικότητας με το αυξημένο φορτίο του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων (Chowdhury et al, 2012; Taylor et al, 2013; Sandberg et al, 2015; Friedrich et al, 2016; Smilth et al, 2016; Georgiev et al, 2017). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ένταση της βροχόπτωσης, η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η διάρκεια ηλιοφάνειας επηρεάζουν τόσο τον πληθυσμό όσο και την ικανότητα επιβίωσης του μικροοργανισμού στο περιβάλλον του πτηνοτροφείου (Prachantasena et al, 2017). Αξιοσημείωτη αύξηση του φορτίου του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των ορνιθίων διαπιστώθηκε κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καμπυλοβακτηριδίων στον άνθρωπο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Williams et al, 2015; Skarp et al, 2016). Η ηλικία των πουλιών έχει αποδειχτεί ότι σχετίζεται με τον επιπολασμό του *C. jejuni* (Williams et al, 2015). Σε μελέτη διαπιστώθηκε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η ηλικία

των κοτόπουλων που λήφθηκαν τα δείγματα, τόσο σε πιο υψηλά επίπεδα κυμαίνονταν ο πληθυσμός του μικροοργανισμού στα τυφλά τους έντερα (Torralbo et al, 2014). Το καμπυλοβακτηρίδιο δεν απομονώθηκε σε ορνίθια ηλικίας 7 και 14 ημερών, ωστόσο εντοπίστηκε σε ηλικίες 35 και 42 ημερών (Perez-Arnedo and Gonzalez-Fandos 2019).

Τα άγρια πτηνά αποτελούν μια ενδεχόμενη πηγή του *C. jejuni*. Το 2016 στη Δανία μελετήθηκε η παρουσία του μικροοργανισμού σε άγρια πουλιά που απαντούν στο εξωτερικό περιβάλλον των θαλάμων. Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης διαπιστώθηκε σε «τσίχλες» (*Turdus merula*) και σπουργίτια (*Passer domesticus* και *Passer montanus*). Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ο αποικισμός του εντερικού σωλήνα των άγριων πτηνών είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από το χειμώνα. Η τάση αυτή της εποχικότητας παρατηρείται τόσο στον επιπολασμό του μικροοργανισμού στον εντερικό σωλήνα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής όσο και στη συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος στον άνθρωπο (Hald et al, 2016).

Το *Campylobacter jejuni*, όπως έχει αποδειχτεί πειραματικά, μπορεί να αποικίσει τον εντερικό σωλήνα των τρωκτικών. Ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί σε δείγματα κοπράνων ποντικών πλησίον πτηνοτροφείων και μάλιστα ίδια στελέχη που αποίκιζαν το πεπτικό τους σύστημα, ταυτοποιήθηκαν και στα δείγματα κοπράνων των ορνιθίων (Torralbo et al, 2014). Σε επιδημιολογικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι η παρουσία αρουραίων και ποντικών σε ένα πτηνοτροφείο αυξάνει τον επιπολασμό του *C. jejuni* στα σμήνη, αλλά δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου σε εκμεταλλεύσεις με επαρκή προγράμματα ελέγχου των τρωκτικών (Sommer et al, 2013).

Επίσης έντομα, όπως οι μύγες φαίνεται να λειτουργούν ως μηχανικοί μεταφορείς στη μετάδοση του *Campylobacter jejuni* στα κοτόπουλα μέσω του συστήματος εξαερισμού κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες που η δραστηριότητά τους είναι αυξημένη (Sibanda et al, 2018). Αν και η θερμοκρασία του σώματος των εντόμων δεν μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη του καμπυλοβακτηριδίου, τα έντομα προσελκύονται από περιττώματα ζώων μολυσμένα από το μικροοργανισμό, τον οποίον με τις πτήσεις τους μεταφέρουν μηχανικά σε διάφορες τοποθεσίες του πτηνοτροφείου. Σε μελέτη στη Δανία εκτιμήθηκε ότι 30,000 μύγες εισέρχονται σε ένα θάλαμο κατά τη διάρκεια μίας εκτροφής αποτελώντας έναν υψηλό παράγοντα κινδύνου για τη μετάδοση του *Campylobacter* στην εκμετάλλευση (Hald et al, 2008).

Επίσης ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί σε σκαθάρια προερχόμενα από το περιβάλλον της πτηνοτροφικής μονάδας (Hald et al, 2000).

Η παρουσία διαφόρων ειδών παραγωγικών ζώων, κυρίως βοοειδών, χοιρινών και προβάτων αλλά και κατοικίδιων ζώων, όπως σκύλοι και γάτες στα πτηνοτροφεία ή σε μικρή απόσταση από αυτά αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την αύξηση του επιπολασμού του καμπυλοβακτηριδίου στα κοτόπουλα, αφού λειτουργούν ως δεξαμενές του μικροοργανισμού χωρίς να εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα (Torralbo et al, 2014). Βέβαια τέτοια ζώα είναι απίθανο να εισέλθουν στο θάλαμο, ωστόσο αποβάλλουν με τα κόπρανα τους το μικροοργανισμό διασπείροντάς τον στο περιβάλλον. Η παρουσία χοιροτροφικών επιχειρήσεων σε απόσταση μικρότερη των 2 Km, προβάτων και βοοειδών που εκτρέφονται πλησίον των πτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης του *Campylobacter* στα σμήνη των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Lyngstad et al, 2008; Sommer et al, 2016).

Η έλλειψη μέτρων βιοασφάλειας σε επίπεδο εκτροφής καθώς επίσης και το χαμηλό επίπεδο υγείας - ευζωίας του σμήνους αυξάνουν το φορτίο του *Campylobacter jejuni* στο σμήνος. Η εφαρμογή αυστηρότατων μέτρων βιοασφάλειας είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μείωση του επιπολασμού του μικροοργανισμού στα κοτόπουλα από το 80% στο 40% (Newell et al, 2011). Πρακτικές όπως ο έλεγχος στις μετακινήσεις του προσωπικού και των επισκεπτών, οι αυστηροί κανόνες υγιεινής όπως το πλύσιμο των χεριών από τους εργάτες πριν εισέλθουν στο θάλαμο, η απολύμανση των υποδημάτων, η σωστή εφαρμογή των πρωτοκόλλων απολύμανσης στους θαλάμους αλλά και στον περιβάλλοντα χώρο του πτηνοτροφείου φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματικά στον έλεγχο του *Campylobacter* σε επίπεδο εκτροφής (Sahin et al, 2015; Borck Hog et al, 2016).

Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η μεγάλη πυκνότητα πτηνοτροφείων σε μια περιοχή, το έτος κατασκευής τους (θάλαμοι άνω των 5 ετών), η διάρκεια που ο θάλαμος παραμένει κενός μεταξύ των εκτροφών, η απουσία ξεχωριστού χώρου υποδοχής των επισκεπτών, όπου θα μπορούν να προετοιμαστούν πριν την είσοδό τους στο θάλαμο, ο αυξημένος αριθμός θαλάμων σε ένα πτηνοτροφείο, ο τρόπος λειτουργίας του συστήματος εξαερισμού καθώς και το μέγεθος του σμήνους αποτελούν παράγοντες κινδύνου που αυξάνουν τον επιπολασμό του *Campylobacter jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Agunos et al, 2014; Natsos et al, 2016; Sommer et al,

2016). Σε θαλάμους με περισσότερα από 25,000 πουλιά, σε εκτροφές ελευθέρως βοσκής καθώς και σε βιολογικές εκτροφές, η συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού στο σμήνος διαπιστώθηκε ότι είναι πολύ υψηλότερη (Näthel et al, 2009).

Επίσης εμπόδιο στον έλεγχο του *Campylobacter jejuni* στα πτηνοτροφεία είναι η πρακτική της «αραίωσης», μια τεχνική που συνεπάγεται είσοδο ανθρώπων και εξοπλισμού πιθανόν μολυσμένων από το μικροοργανισμό μέσα στο θάλαμο. Μέσω της τεχνικής αυτής έχει αποδειχτεί η είσοδος του μικροοργανισμού από το εξωτερικό περιβάλλον στο θάλαμο του πτηνοτροφείου αλλά και από μολυσμένες σε μη μολυσμένες εκτροφές (Koolman et al, 2014). Ειδικά τα κιβώτια μεταφοράς ζωντανών πουλιών συμβάλλουν στη διασπορά του μικροοργανισμού εντός του θαλάμου ή είναι υπεύθυνα για την επιμόλυνση κατά τη μεταφορά των πουλιών στο σφαγείο (Hastings et al, 2011; Agunos et al, 2014). Οι ημέρες που μεσολαβούν (συνήθως 1-7 ημέρες) από την αρχική μείωση του πληθυσμού ως την τελική απομάκρυνση του σμήνους για σφαγή φαίνεται να σχετίζονται με την επιμόλυνση των ορνιθίων. Εάν το χρονικό διάστημα είναι μικρό, τότε οποιαδήποτε εισαγωγή του *Campylobacter* κατά την αραίωση στο θάλαμο δεν επηρεάζει σημαντικά τον επιπολασμό του μικροοργανισμού στο σμήνος που θα σφαγεί τελικά.

Μία πιθανή πηγή του *Campylobacter jejuni* είναι το προηγούμενο θετικό σμήνος ενός θαλάμου. Στη Φινλανδία σε συνεχόμενες εκτροφές θετικές στο μικροοργανισμό στο ίδιο πτηνοτροφείο, απομονώθηκαν τα ίδια στελέχη καμπυλοβακτηριδίου (Llarena et al, 2015). Σε μελέτη στη Βόρεια Ιρλανδία, μεταξύ των υπολοίπων παραγόντων κινδύνου, διαπιστώθηκε ότι η μεταφορά του μικροοργανισμού από το ένα σμήνος στο επόμενο στον ίδιο θάλαμο είναι περιορισμένη εφόσον το πρωτόκολλο καθαρισμού, απολύμανσης και προετοιμασίας για την επόμενη εκτροφή ακολουθηθεί αυστηρά (McDowell et al, 2008). Επιπλέον ο επιπολασμός του καμπυλοβακτηριδίου σχετίζεται με το χρονικό διάστημα που ο θάλαμος παραμένει κενός μεταξύ των εκτροφών. Μελέτες αποδεικνύουν ότι όταν παραμένει κενός για λιγότερο από 9 ημέρες, τότε η πιθανότητα μεταφοράς του μικροοργανισμού στην επόμενη εκτροφή αυξάνει σημαντικά (Battersby et al, 2016). Ωστόσο αν ο κενός χρόνος παραταθεί, ο κίνδυνος εισόδου του καμπυλοβακτηριδίου στο θάλαμο παραμένει χαμηλός εφόσον τα επίπεδα βιοασφάλειας και υγιεινής διατηρηθούν στο βέλτιστο βαθμό (Georgiev et al, 2017).

Σε γενικές γραμμές το νερό αποτελεί έναν σχετικά μικρότερης σημασίας παράγοντα κινδύνου που συνδέεται με τον επιπολασμό του *Campylobacter jejuni* στο σμήνος. Η μόλυνση του νερού συνήθως ακολουθεί και σπανιότερα προηγείται του αποικισμού του εντερικού σωλήνα των πτηνών από το καμπυλοβακτηρίδιο. Οι ποτίστρες γίνονται θετικές στο μικροοργανισμό περίπου την ίδια στιγμή που το σμήνος καθίσταται θετικό (Newell and Fearnley 2003). Επιπλέον μολυσμένο από το μικροοργανισμό νερό σε νερόλακους και λακούβες πλησίον των θαλάμων συμβάλει στην οριζόντια μετάδοση (Messens et al, 2009).

Το σύστημα παροχής νερού σε ένα πτηνοτροφείο θεωρείται μια σημαντική πηγή εισόδου του καμπυλοβακτηριδίου στην εκτροφή και ιδιαίτερα το χαμηλής υγιεινής ποιότητας νερό προερχόμενο από πηγάδια και γεωτρήσεις (Jonsson et al, 2012). Επιπλέον σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν πρωτόζωα στο νερό, όπως το *Tetrahymena pyriformis*, το οποίο λειτουργεί ως δεξαμενή του *C. jejuni* (Newell et al, 2011). Τέλος τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC – viable but non culturable cells) και τα βιοϋμένια (biofilms) αποτελούν μορφές που είναι δυνατό να σχηματίσει το *C. jejuni* κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες σε υδάτινα συστήματα, όπως στους σωλήνες υδροδότησης ενός πτηνοτροφείου, ειδικά όταν ο καθαρισμός και η απολύμανση είναι ανεπαρκής και να αποτελέσουν δυνητικά πηγή μόλυνσης του σμήνους (Teh et al, 2016; Götz et al, 2018).

2.3. Συχνότητα εμφάνισης του *Campylobacter jejuni* σε εντατικώς εκτρεφόμενα σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων

Ο επιπολασμός, δηλαδή η συχνότητα εμφάνισης του *C. jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων διαφέρει μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στην Ευρώπη το 2015 σε Συνέδριο για την Πρόληψη και τον Έλεγχο του *Campylobacter* στην αλυσίδα παραγωγής πουλερικών, μεταξύ των άλλων επιβεβαιώθηκε ότι κατά προσέγγιση το 71,2% των σμηνών κρεοπαραγωγών ορνιθίων σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής και το 75,8% των σφάγιων κοτόπουλων, αποικίζονταν από βακτήρια του γένους *Campylobacter spp.* Τα ποσοστά μεταξύ των κρατών μελών διέφεραν σημαντικά και κυμαίνονταν από 2,0% έως 100,0% για τα

πτηνοτροφεία και από 4,9% έως 100% σε επίπεδο πτηνοσφαγείου. Στα 2/3 των εξετασθέντων δειγμάτων απομονώθηκε το *C. jejuni* και στο 1/3 το *C. coli* (EFSA 2015). Στα κράτη μέλη της βόρειας Ευρώπης ο επιπολασμός του μικροοργανισμού ήταν γενικά χαμηλός και οφείλεται στα προγράμματα ελέγχου που εφαρμόζονται σε αυτές τις χώρες. Όπως προκύπτει και από άλλες μελέτες τόσο σε ευρωπαϊκό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, ο μέσος όρος συχνότητας εμφάνισης του *C. jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, μεταξύ 60% και 80% (Schets et al, 2017; Wiseman et al, 2017; Carron et al, 2018).

Σε ότι αφορά τη χώρα μας το 2014 στα πλαίσια εφαρμογής του «προγράμματος παρακολούθησης της αντοχής των ζωνοοσογόνων και συμβιωτικών βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες» (σύμφωνα με την υπ.αριθ. 1571 / 72152 ΚΥΑ, ΦΕΚ Β' 1464), πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε ένα σύνολο 494 σμηνών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης, τα οποία είχαν σφαγεί σε μεγάλα σφαγεία πουλερικών των περιφερειακών ενοτήτων (ΠΕ) Ευβοίας και Ιωαννίνων και ο επιπολασμός του *Campylobacter spp.* βρέθηκε 81% (ΥΠΑΑΤ 2016).

Το *C. jejuni* είναι το κύριο είδος που απομονώνεται σε δείγματα κοπράνων κρεοπαραγωγών ορνιθίων και ακολουθούν το *C. coli* και το *C. lari* που ανιχνεύονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει διαπιστωθεί σε μελέτη πως διαφορετικοί ορότυποι εμφανίζονται στα κράτη μέλη. Σε κράτη μέλη της Νότιας Ευρώπης φαίνεται ότι *C. coli* κυριαρχεί, ενώ στα κράτη μέλη της Βόρειας Ευρώπης το *C. jejuni* είναι το μόνο είδος που απομονώνεται (EFSA 2010). Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελέτης στη χώρα μας του 2016, που έδειξαν ότι το είδος *Campylobacter coli* ανιχνεύθηκε στο 59,2% των δειγμάτων και το *Campylobacter jejuni* στο 40,8% (ΥΠΑΑΤ 2016). Οι κλιματικές συνθήκες, οι οργανισμοί του περιβάλλοντος που λειτουργούν ως δεξαμενές του καμπυλοβακτηριδίου, οι συνθήκες ενσταυλισμού και η ηλικία σφαγής που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των χωρών της Βόρειας και Νότιας Ευρώπης μπορούν να εξηγήσουν εν μέρει τη διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

3. ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ CAMPYLOBACTER JEJUNI ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΚΤΡΟΦΗΣ

3.1. Μέτρα βιοασφάλειας και υγιεινής

Ως βιοασφάλεια ορίζεται το σύνολο των φυσικών και διαχειριστικών μέτρων, τα οποία αποσκοπούν στη μείωση του κινδύνου εισαγωγής, ανάπτυξης και διασποράς ενός μικροβιακού παράγοντα από, προς και εντός ενός ζωικού πληθυσμού ή μιας εκτροφής, περιοχής, μέσων μεταφοράς ή οποιασδήποτε άλλης εγκατάστασης και τοποθεσίας (ΥΠΑΑΤ 2018). Έχει αποδειχθεί σημαντικό μέτρο για τον έλεγχο του *C. jejuni*, διότι όταν ο μικροοργανισμός εισέλθει στην εκτροφή, μέσω της οριζόντιας μετάδοσης εξαπλώνεται ταχύτατα και σε διάστημα λιγότερο της μίας εβδομάδας όλο το σμήνος έχει προσβληθεί (Battersby et al., 2016). Επομένως στόχος είναι να εμποδιστεί ο αποικισμός του εντερικού σωλήνα του πρώτου κοτόπουλου του σμήνους, από το οποίο στη συνέχεια μέσω της κοπροφαγικής δραστηριότητας, του μολυσμένου νερού και της τροφής γρήγορα ο μικροοργανισμός διασπείρεται. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε θεωρητικά να επιτευχθεί με τη συνεχή εφαρμογή αυστηρών μέτρων υγιεινής και βιοασφάλειας. Στην πράξη όμως, είναι σχεδόν ακατόρθωτο να αποτρέψεις τη μεταφορά από το εξωτερικό στο εσωτερικό περιβάλλον του θαλάμου, διότι το *C. jejuni* είναι ευρύτατα διαδεδομένο τόσο στο περιβάλλον του πτηνοτροφείου όσο και σε πληθώρα ξενιστών γύρω από αυτό (Hansson et al, 2018).

Προστατευτικοί φραγμοί υγειονομικής σημασίας στην είσοδο των θαλάμων αποτελούν σημαντικό τμήμα των μέτρων βιοασφάλειας της εκτροφής και έχουν ως στόχο το διαχωρισμό του εξωτερικού «βρώμικου» περιβάλλοντος από το εσωτερικό «προστατευμένο» περιβάλλον του θαλάμου (EFSA 2011). Η διέλευση από ποδόλουτρο απολύμανσης πριν την είσοδο στο θάλαμο μειώνει τον κίνδυνο προσβολής του σμήνους από το *C. jejuni* (Borck Hog et al, 2016). Τα απολυμαντικά θα πρέπει να αντικαθίστανται σε εβδομαδιαία βάση ή όταν η αραίωσή τους έχει μειωθεί παράδειγμα λόγω βροχής, ή εάν άφθονη οργανική ύλη παραμένει στον πυθμένα του δοχείου. Διαφορετικά το ποδόλουτρο αντί να λειτουργήσει ως προστατευτικός φραγμός, είναι δυνατό να αυξήσει τον κίνδυνο μεταφοράς του μικροοργανισμού μεταξύ των θαλάμων μιας πτηνοτροφικής εκμετάλλευσης. Η αυστηρή χρήση των προστατευτικών φραγμών έχει αποδειχτεί ότι είναι δυνατό να

μειώσει τον κίνδυνο εισόδου του μικροοργανισμού έως και 50% (Evans and Sayers, 2000).

Η συμπεριφορά του ανθρώπινου παράγοντα αποτελεί εξέχουσας σημασίας τρόπο μεταφοράς και διασποράς του *C. jejuni* εντός της εκμετάλλευσης. Τακτικά προγράμματα εκπαιδεύσεων σε όλο το προσωπικό, ώστε να κατανοήσουν τη σημασία της προσωπικής υγιεινής αλλά και τους τρόπους με τους οποίους ο μικροοργανισμός μεταδίδεται (κυρίως με τα χέρια, τον ιματισμό και τον εξοπλισμό) πρέπει να λαμβάνουν χώρα. Παράλληλα σε μελέτες έχει αποδειχτεί ότι η χρήση καθαρού ιματισμού και υπόδησης διαφορετικού σε κάθε θάλαμο, η ελαχιστοποίηση του αριθμού των οχημάτων που εισέρχονται εντός της εκμετάλλευσης με υποχρεωτική απολύμανση των τροχών τους, ο περιορισμός του αριθμού των επισκέψεων στον απολύτως απαραίτητο, αποτελούν κλειδιά για τον επιτυχή έλεγχο του *C. jejuni* σε επίπεδο εκτροφής (Dale et al, 2015; Cerda-Cuellar et al, 2015; Georgiev et al, 2017; Van Limbergen et al, 2018).

Στην Ιρλανδία μελετήθηκε μία σειρά κριτηρίων βιοασφάλειας και πώς αυτά επηρεάζουν τον επιπολασμό του *C. jejuni* στα πτηνοτροφεία, όπως, χώροι στάθμευσης από τσιμέντο, ξεχωριστός χώρος διατήρησης των εργαλείων, ύπαρξη λωρίδων από χαλίκι ελεύθερων βλάστησης γύρω από τους θαλάμους, περίφραξη ύψους 2 μέτρων, επισκευές των θαλάμων σε τακτά χρονικά διαστήματα, αυστηρά πρωτόκολλα απολύμανσης μεταξύ των εκτροφών, ύπαρξη προθαλάμου σε κάθε θάλαμο, απουσία κατοικίδιων (σκύλοι, γάτες) και παραγωγικών (βοοειδή) ζώων εντός του πτηνοτροφείου, απουσία υδάτινων συλλογών (λίμνες, ρέματα) σε απόσταση 0,5 Km από την εκμετάλλευση (Smith et al, 2016). Διαπιστώθηκε υψηλού βαθμού συσχέτιση μεταξύ εφαρμογής αυστηρού πρωτοκόλλου μέτρων βιοασφάλειας και χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης *Campylobacter*-θετικών κοτόπουλων στο σφαγείο και μικρότερων πληθυσμών του μικροοργανισμού στα τυφλά έντερα των θετικών πουλιών. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να είναι ποτέ επαρκή όταν δεν εφαρμόζονται σωστά και συνεχώς, ακόμα και σε έκτακτες περιπτώσεις από το προσωπικό. Επιπρόσθετα το κόστος εφαρμογής τους είναι υψηλό (Battersby et al, 2016).

Τα τρωκτικά είναι σημαντικός φορέας για τη μετάδοση του καμπυλοβακτηριδίου εντός της πτηνοτροφικής εκμετάλλευσης. Τα προγράμματα τρωκτικοκτονίας

μειώνουν τον επιπολασμό του μικροοργανισμού σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Αυτό διαπιστώθηκε σε μελέτη, όπου χωρίς έλεγχο των τρωκτικών το 92% των σμηνών ήταν θετικά, ποσοστό που περιορίστηκε στο 66% μετά την εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων ελέγχου (Allain et al, 2014). Το πρόγραμμα θα πρέπει να τηρείται σχολαστικά, να αξιολογείται η αποτελεσματικότητά του κάθε χρόνο και αν χρειάζεται να αναθεωρείται. Επίσης η τοποθέτηση σιτών εμποδίζει τα έντομα να εισέλθουν στο θάλαμο, τα οποία λειτουργούν ως μηχανικοί μεταφορείς του καμπυλοβακτηριδίου κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Στη Δανία η τοποθέτηση προστατευτικού (σίτες) στους θαλάμους πειραματικά, μείωσε τον επιπολασμό του *C. jejuni* στα εξεταζόμενα σμήνη κατά τη σφαγή στο 10,3% σε σχέση με τους μάρτυρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, που η δραστηριότητα των εντόμων ήταν ιδιαίτερα αυξημένη (Bahrndorff et al, 2013). Γενικά ο έλεγχος των εντόμων, των τρωκτικών, άγριων ζώων και πουλιών είναι σημαντικός για τον περιορισμό εισόδου του καμπυλοβακτηριδίου στους θαλάμους ενός πτηνοτροφείου (Sommer et al, 2013).

3.2. Στρατηγικές ανοσοποίησης

Στις στρατηγικές ανοσοποίησης περιλαμβάνονται η χορήγηση έτοιμων αντισωμάτων (παθητική ανοσοποίηση) και ο εμβολιασμός (ενεργητική ανοσοποίηση) με σκοπό να μειωθεί ή ακόμα και να εμποδιστεί ο αποικισμός του εντερικού σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων από το *Campylobacter jejuni*, ώστε να περιοριστεί το φορτίο του μικροοργανισμού που εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα, με επακόλουθο τη μειωμένη πιθανότητα προσβολής και εκδήλωσης του νοσήματος στον άνθρωπο.

Πειραματικά χορηγήθηκε *peros* ειδική για το *Campylobacter* ανοσοσφαιρίνη τύπου Y (IgY) σε ορνίθια, με αποτέλεσμα σημαντική μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού για σύντομο χρονικό διάστημά όσο διήρκεσε η χορήγηση. Μετά τη διακοπή αυτής, τα προ της θεραπείας επίπεδα αποικισμού του μικροοργανισμού επανήλθαν (Tsubokura et al, 1997). Δεν υπάρχουν μελέτες που να αποδεικνύουν τις μακροπρόθεσμες θετικές επιδράσεις της παθητικής ανοσοποίησης και το χρονικό διάστημα για το οποίο αυτή είναι αποτελεσματική. Πιθανόν θα μπορούσε να εφαρμοστεί λίγες μόνο ημέρες πριν τη σφαγή με σκοπό τη μείωση των επιπέδων του

C. jejuni στο σφάγιο, ωστόσο εκτιμάται ότι το κόστος εφαρμογής της είναι πολύ υψηλό.

Πολλές πειραματικές μελέτες που αφορούν στην ενεργητική ανοσοποίηση με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς της στη μείωση του επιπολασμού του καμπυλοβακτηριδίου στα κρεοπαραγωγά ορνίθια έχουν λάβει χώρα. Χρησιμοποιήθηκαν ολοκυτταρικά εμβόλια (WCV, Whole-cell vaccines) είτε νεκρά - αδρανοποιημένα είτε εξασθενημένα - μειωμένης λοιμογόνου δύναμης. Αδρανοποιημένο με φορμόλη στέλεχος του *C. jejuni* F1BCB μείωσε το φορτίο του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο έως και 93% και αύξησε τον τίτλο της ανοσοσφαιρίνης A (IgA) στον ορό του αίματος στις εμβολιασμένες ομάδες συγκριτικά με τη μη εμβολιασμένη ομάδα (Rice et al, 1997). Ωστόσο η πειραματική χρήση τέτοιου τύπου εμβολιακών στελεχών δεν είχε πάντοτε τα επιθυμητά αποτελέσματα (Ziprin et al, 2002).

Στα εμβόλια υπομονάδων (subunit vaccines) αντί ολόκληρου του μικροοργανισμού με στόχο την πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ένα τμήμα αυτού για να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα. Σε πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο η φλατζελίνη (flagellin), η οποία αποτελεί βασικό συστατικό του μαστιγίου του *C. jejuni*, σε συνδυασμό με διάφορα ανοσοενισχυτικά. Ανιχνεύθηκαν υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων τόσο στον ορό του αίματος (IgY) όσο και στο βλεννογόνο του εντέρου (IgA) καθώς και μείωση του βαθμού αποικισμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ομάδων έως και 3 log₁₀CFU/g σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (Huang et al, 2010; Neal – Mc Kinney et al, 2014). Άλλο αντιγόνο που έχει δοκιμαστεί είναι η πρωτεΐνη CjaA, γνωστή ως πρωτεΐνη πρόσδεσης, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στο επίπεδο αποικισμού του εντερικού σωλήνα του πτηνού από το *C. jejuni* (Buckley et al, 2010). Επίσης πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMP, outer membrane proteins) του στελέχους 81-176 περικλειόμενες σε κάψα με νανοσωματίδια (ως ανοσοενισχυτικό) χορηγήθηκαν σε δύο δόσεις υποδόρια και διαπιστώθηκε μείωση του αποικισμού του τυφλού εντέρου κάτω από το ανιχνεύσιμο επίπεδο καθώς και ισχυρότατη ανοσολογική ανταπόκριση (Annamalai et al, 2013). Ωστόσο οι πειραματισμοί με εμβόλια υπομονάδων δεν οδήγησαν πάντοτε σε μείωση του φορτίου του

μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των ορνιθίων και περαιτέρω ενδελεχώς διερεύνηση απαιτείται (Neal – Mc Kinney et al, 2014; Chintoan-Uta et al, 2016).

Τα τελευταία χρόνια τα εμβόλια με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA κερδίζουν συνεχώς έδαφος. Γονίδια αντιγόνων του *C. jejuni* (όπως η CjaA πρωτεΐνη και οι παράγοντες ACE393, Omp18/CjaD, Peb1A, Dsp) ενσωμάτωθηκαν σε μειωμένης λοιμογόνου δύναμης στελέχη *Salmonella enteritidis* και *Salmonella typhimurium*. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραματικών εμβολιασμών ήταν ενθαρρυντικά με μείωση του επιπολασμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο και αξιοσημείωτη αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, τόσο στον ορό του αίματος, όσο και στον εντερικό βλεννογόνο (Layton et al, 2011; Theoret et al, 2012). Επιπλέον ωοκύστες της *Eimeria tenella* χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την έκφραση αντιγόνων του *C. jejuni* (Clark et al, 2012). Ωστόσο για τους μειωμένης λοιμογόνου δύναμης φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στους παραπάνω πειραματικούς σχεδιασμούς υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να γίνουν παθογόνοι ξανά στα εμβολιασμένα πουλιά, ειδικά τα είδη *Salmonella* και *Eimeria* που είναι εξαιρετικά παθογόνα για τα ορνίθια (Meunier et al, 2015).

3.3. Διατροφικές στρατηγικές

3.3.1. Χορήγηση προσθετικών στο πόσιμο νερό

Πληθώρα πειραμάτων έχει διεξαχθεί με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας διαφόρων προσθετικών στο πόσιμο νερό για τη μείωση της πιθανότητας ενός σμήνους κρεοπαραγωγών ορνιθίων να καταστεί *Campylobacter*-θετικό. Πρέπει να τονιστεί ότι η προσθήκη οποιουδήποτε συμπληρώματος στο πόσιμο νερό δεν θα πρέπει να επηρεάζει την πρόσληψη της τροφής και την ανάπτυξη των κοτόπουλων. Το γαλακτικό οξύ προστέθηκε στο νερό (τελική τιμή pH περίπου 3) σε εφτά εμπορικές εκμεταλλεύσεις κατά τη διάρκεια της δεκάωρης απόσυρσης της τροφής προ της σφαγής. Διαπιστώθηκε ότι συγκριτικά με τα σμήνη – μάρτυρες των ίδιων εκμεταλλεύσεων περιορίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του *Campylobacter* στον πρόλοβο και στο προ ψύξης σφάγιο σε ποσοστά 20% και 15% αντίστοιχα (Byrd et al, 2001). Το PWT, ένας εμπορικός οξινοποιητής προστέθηκε στο νερό τις πρώτες εφτά ημέρες της εκτροφής, δύο ημέρες πριν και μετά την αλλαγή του σιτηρεσίου και 24 ώρες πριν τη σφαγή. Έγινε καταμέτρηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού στο

εντερικό περιεχόμενο. Γενικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των ορνιθίων που έλαβαν το νερό με τον οξινοποιητή (τιμή pH 3.5) και των ορνιθίων μαρτύρων (Haughton et al, 2013).

Όσον αφορά τα οξέα καπρικό και καπρυλικό, έχει αποδειχτεί in vitro ότι αποτελούν αναστολείς της ανάπτυξης του *C. jejuni* (Molatová et al., 2010). Σε επίπεδο πραγματικής εκτροφής, προστέθηκε μίγμα λιπαρών οξέων με μεσαίου μήκους αλυσίδα (MCFA, medium chain fatty acids) και συγκεκριμένα το καπροϊκό, το καπρυλικό, το καπρικό και το λαυρικό οξύ. Το μίγμα αυτό εφαρμόστηκε ως γαλάκτωμα στο πόσιμο νερό (τελική τιμή pH 5,4) σε μια προσπάθεια ενίσχυσης του φραγμού του ανώτερου πεπτικού συστήματος στον αποικισμό από το *C. jejuni*. Διαπιστώθηκε ότι όταν χορηγήθηκε από την 1^η ημέρα της εκτροφής, τα λιπαρά οξέα με μεσαίου μήκους αλυσίδα, επιτυχώς θανάτωσαν τα στελέχη του μικροοργανισμού στο πόσιμο νερό, με αποτέλεσμα λιγότερα ορνίθια επιμολυσμένα τη 15^η ημέρα της εκτροφής. Ωστόσο αξιοσημείωτη μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων δε διαπιστώθηκε (Hermans et al, 2011). Επίσης μείωση του φορτίου του *C. jejuni* της τάξης των 1 – 2 log₁₀ CFU/g στο τυφλό έντερο κρεοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας 36 ημερών που φυσικά επιμολύνθηκαν από το μικροοργανισμό επιτεύχθηκε με την προσθήκη 0,24% μονοκαρπίνης (μονογλυκερίδιο του καπροϊκού οξέως) και 0,04% polysorbate (σορβικό οξύ) στο πόσιμο νερό αλλά και στην τροφή και έχει προταθεί για χρήση 2 με 3 ημέρες πριν τη σφαγή (Hilmarsson et al, 2006).

Εκτός από τη χρήση οργανικών και λιπαρών οξέων στο πόσιμο νερό για τον έλεγχο του *C. jejuni*, στις στρατηγικές παρεμβάσεων περιλαμβάνεται και η χλωρίωση του νερού. Θεωρείται ως μια καίριας σημασίας στρατηγική για το μετριασμό του φορτίου του μικροοργανισμού σε επίπεδο εκτροφής (Facciola et al, 2017; Wales et al, 2019). Ωστόσο σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής, προσθήκη 2 έως 5 ppm χλωρίου στο νερό δεν είχε σημαντικά αποτελέσματα (Stern et al, 2002). Η αναποτελεσματικότητα αυτή θα μπορούσε εν μέρει να εξηγηθεί από την παρουσία υδατογενών πρωτοζώων, τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενές του μικροοργανισμού στο σύστημα υδροδότησης ενός πτηνοτροφείου, μειώνοντας την ευαισθησία του καμπυλοβακτηριδίου στο χλώριο αλλά και στη δράση άλλων απολυμαντικών, όπως άλλωστε έχει in vitro αποδειχθεί (Snelling et al, 2005).

Το οξινοποιημένο κατόπιν ηλεκτρόλυσης νερό αποτελεί ένα πρωτοποριακό απολυμαντικό με ευρεία χρήση στη βιομηχανία τροφίμων και αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων, όπως *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* και *Yersinia enterocolitica* (Klein et al, 2015; Rahman and Murshed 2019). Χρησιμοποιήθηκε ως προσθετικό στο πόσιμο νερό σε δύο πτηνοτροφεία φυσικώς επιμολυσμένα από το *C. jejuni* για τρεις συνεχόμενες εκτροφές. Διαπιστώθηκε ότι το χορηγούμενο νερό ήταν απαλλαγμένο από το μικροοργανισμό σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής. Ωστόσο η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής δεν εμπόδισε την επιμόλυνση του σμήνους από το καμπυλοβακτηρίδιο. Τα θετικά επιχρίσματα από την κλοάκη των εξεταζόμενων ορνιθίων ήταν πολύ λιγότερα την 35^η ημέρα της εκτροφής και το φορτίο του μικροοργανισμού μειώθηκε στα προ ψύξης σφάλγια. Επομένως φαίνεται ότι το οξινοποιημένο κατόπιν ηλεκτρόλυσης νερό μπορεί να εφαρμοστεί για να εμποδίσει τη μετάδοση του καμπυλοβακτηριδίου εντός του σμήνους ή τουλάχιστον να καθυστερήσει τον αποικισμό του εντερικού σωλήνα των κοτόπουλων από το μικροοργανισμό (Bügener et al, 2014).

3.3.2. Προσθήκη Λιπαρών οξέων και Οργανικών οξέων (fatty and organic acids) στην τροφή

Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι τα λιπαρά και οργανικά οξέα έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι μιας ευρείας κατηγορίας παθογόνων μικροοργανισμών, αποδεδειγμένα ενισχύουν τις ζωοτεχνικές αποδόσεις των ορνιθίων τροποποιώντας το pH του γαστρεντερικού σωλήνα και μεταβάλλοντας τη σύνθεση του μικροβιώματος. Παράλληλα ασκούν ευεργετική επίδραση στη μορφολογία και φυσιολογία του γαστρεντερικού συστήματος και έχουν ανοσοδιεγερτικές ικανότητες (Dittoe et al, 2018). Η προσθήκη καπρυλικού οξέως, ενός λιπαρού οξέως με μεσαίου μήκους αλυσίδα – C8, στην τροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων εκτιμήθηκε για να διαπιστωθεί η αντι – *Campylobacter* δράση του, ωστόσο τα αποτελέσματα παρουσίαζαν σημαντική απόκλιση. Σε πειραματικό σχεδιασμό που διήρκησε 10 ημέρες, προστέθηκε καπρυλικό οξύ στην τροφή και ακολούθησε επιμόλυνση από το *C. jejuni* (5 στελέχη απομονωθέντα από τον εντερικό σωλήνα κοτόπουλων) που οδήγησε σε μείωση του αποικισμού του τυφλού από το καμπυλοβακτηρίδιο κατά 2 log₁₀ CFU/g σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Solis de Los Santos et al, 2008). Οι

ίδιοι ερευνητές απέδειξαν τη θεραπευτική δράση του καπρυλικού οξέως σε ορνίθια εμπορεύσιμης ηλικίας χορηγώντας το στην τροφή 3 με 7 ημέρες πριν τη σφαγή, όπου διαπιστώθηκε περιορισμός του πληθυσμού του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων την 42^η ημέρα (Solis de Los Santos et al, 2010). Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω προτείνεται να προτιμάται η προσθήκη λιπαρών οξέων με μεσαίου μήκους αλυσίδα στην τροφή 2 με 3 ημέρες προ της σφαγής (Robyn et al, 2015).

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA – short chain fatty acids) είναι γνωστά για τις αντιβακτηριδιακές τους ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στην ικανότητά τους να διαχέονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου, προκαλώντας σε αυτήν μη αντιστρεπτές μεταβολές (Sun and O’Riordan 2016). Πέντε εμπορικά σκευάσματα που περιελάμβαναν λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, δοκιμάστηκαν σε συγκριτική μελέτη με άλλες κατηγορίες προσθετικών στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων για να διαπιστωθεί η αντι – *Campylobacter* δράση τους. Χρησιμοποιήθηκαν ομάδες των 45 κοτόπουλων, στα οποία χορηγήθηκαν τα διαφορετικά προσθετικά στην τροφή σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής (42 ημέρες) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιριών. Τη 14^η ημέρα τα κοτόπουλα επιμολύνθηκαν με στελέχη του *C. jejuni*. Κανένα διατροφικό σχήμα δεν κατάφερε να εμποδίσει τον αποικισμό των τυφλών εντέρων των εξεταζόμενων ορνιθίων από το μικροοργανισμό και διαπιστώθηκε ποικίλου βαθμού επιμόλυνση μεταξύ των πτηνών. Τη 14^η ημέρα της εκτροφής, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου μείωσαν το επίπεδο του επιπολασμού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Την 42^η ημέρα ένα μόνο προσθετικό με SCFA (συγκεκριμένα το Adimix® Precision που περιείχε βουτυρικό οξύ σε επικαλυμμένη μορφή) προκάλεσε μείωση στον πληθυσμό του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο (της τάξης των $1 - 2 \log_{10}$ CFU/g). Αντίστοιχα μείωση παρατηρήθηκε αλλά σε μικρότερο βαθμό και με το διατροφικό σκεύασμα Excential Butycoat (παρόμοιο με το προηγούμενο σκεύασμα διαφορετικής εταιρίας) αλλά σε μικρότερο βαθμό (Guyard-Nicodème et al., 2016).

Σε ότι αφορά τα οργανικά οξέα, η προσθήκη σε συνδυασμό φορμικού και σορβικού οξέως (1,5 - 2% και 0,1% αντίστοιχα) σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού μείωσε τον πληθυσμό του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων κάτω του ανιχνεύσιμου επιπέδου (Skanseng et al, 2010). Μίγμα οργανικών οξέων και αιθέριου

ελαίου περικλειόμενα σε κάψα (φορμικό και σορβικό οξύ μαζί με θυμόλη) προστέθηκαν στην τροφή από την πρώτη μέρα της εκτροφής. Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη *C. jejuni* για την πρόκληση επιμόλυνσης τη 2^η εβδομάδα και ακολούθησε σφαγή των ορνιθίων 1, 2 και 3 εβδομάδες μετά. Το φορτίο του καμπυλοβακτηριδίου στο σφάγιο ήταν σημαντικά μειωμένο μόνο την 3^η εβδομάδα. Εκτιμάται ότι στα διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν να οφείλονται οι διακυμάνσεις στα αποτελέσματα μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων ορνιθίων (Thibodeau et al, 2014).

3.3.3. Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες συντίθενται στα ριβοσωμάτια του μικροβιακού κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων ουσιών που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχει ταυτοποιηθεί. Η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται στη μείωση του pH και στην παραγωγή ουσιών όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, το γαλακτικό οξύ και άλλων μεταβολιτών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται και οι βακτηριοσίνες, οι οποίες ποικίλουν όσον αφορά τον τρόπο δράσης, το μοριακό τους βάρος, τη γενετική τους προέλευση και τις βιοχημικές τους ιδιότητες (Metaxopoulos et al, 2002; Robyn et al, 2013). Συνήθως έχουν στενό αντιμικροβιακό φάσμα δράσης, το οποίο έγκειται στην παρεμπόδιση της αύξησης στελεχών του ίδιου είδους ή συγγενών στελεχών.

Ένας σημαντικός αριθμός βακτηριοσινών έχει ταυτοποιηθεί από συμβιωτικά βακτήρια του εντερικού σωλήνα των κοτόπουλων και διερευνηθεί η ικανότητά τους να ελέγχουν το *C. jejuni* σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής τα τελευταία χρόνια. Σε μελέτη η βακτηριοσίνη L – 1077 από το *Lactobacillus salivarius* μείωσε τον πληθυσμό του καμπυλοβακτηριδίου στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων πάνω από 4 log₁₀ CFU/g σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων χορηγούμενη στην τροφή (Svetoch and Stern 2010). Επιπλέον η αποτελεσματικότητα τριών ακόμα βακτηριοσινών δοκιμάστηκε, η OR-7 από το *Lactobacillus salivarius* και οι E-760 και E50-52 από τον *Enterococcus faecium* (Hoang et al, 2011). Η χορήγησή τους σε κρεοπαραγωγά ορνίθια οδήγησε σε δραματική μείωση της τάξης των 5 έως 8 log₁₀ CFU/g του φορτίου του μικροοργανισμού. Η E50-52 του στελέχους *Enterococcus*

faecium NRRLB-30746 προστέθηκε στο νερό 1-3 ημέρες πριν τη σφαγή σε κοτόπουλα φυσικώς επιμολυσμένα και παρατηρήθηκε μείωση του επιπολασμού του *C. jejuni* κάτω του ανιχνεύσιμου επιπέδου, δηλαδή ήταν πολύ αποτελεσματική σε ορνίθια κοντά στην εμπορεύσιμη ηλικία (Svetoch et al, 2008). Σε ότι αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του καμπυλοβακτηριδίου στις βακτηριοσίνες, σε *in vitro* μελέτες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα περιορισμένη (Kaakoush et al, 2015).

3.3.4. Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι ή απλά φάγοι είναι ιοί, οι οποίοι εξειδικευμένα μολύνουν και προκαλούν λύση στο βακτήριο ξενιστή. Στη κυριολεξία βακτηριοφάγος σημαίνει "αυτός που καταλύει βακτήρια". Πρόκειται για υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα, τα οποία για να πολλαπλασιαστούν απαιτούν έναν εξειδικευμένο ξενιστή. Αποτελούν κυρίαρχη μορφή στη βίοςφαιρα, παρουσιάζουν υψηλού βαθμού εξειδίκευση, αυτό – αναπαράγονται στο βακτηριακό κύτταρο - στόχος και δεν επηρεάζουν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του περιβάλλοντος όπου εφαρμόζονται (Labrie et al, 2010). Τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της παγκόσμιας έξαρσης παθογόνων βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των φάγων για την κατανόησή τους και τη χρήση τους ως παράγοντες βιο - ελέγχου των βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *C. jejuni* στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Upadhyay et al, 2019).

Μιας και ο εντερικός σωλήνας των κοτόπουλων αποτελεί την κύρια δεξαμενή του *C. jejuni*, στις περισσότερες μελέτες οι φάγοι απομονώθηκαν από στέλεχη του μικροοργανισμού του γαστρεντερικού τους σωλήνα. Η διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού βακτηριοφάγων, η χρήση των οποίων δεν επηρεάζει ούτε τροποποιεί το μικροβίωμα του εντέρου έχει περιγραφεί (Nowaczek et al, 2019). Πειραματισμοί έχουν διεξαχθεί χορηγώντας μεμονωμένους φάγους, όπως τους CP8, CP34, CP220 και το στέλεχος 71 (Atterbury et al, 2005; Loc Carrilo et al, 2005; El-Shibiny et al, 2009). Σε κάποιες περιπτώσεις διαπιστώθηκε μείωση του πληθυσμού του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων έως και 2 log₁₀ CFU/g τις πρώτες ημέρες μετά τη χορήγηση.

Το 2013 σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής, χορηγήθηκε στο πόσιμο νερό μίγμα φάγων (NCTC 12673, NCTC 12674, NCTC 12678, NCTC 12672) σε φυσικώς

επιμολυσμένα από το *C. jejuni* κοτόπουλα τις τελευταίες ημέρες της εκτροφής και παρατηρήθηκε σε μία περίπτωση σημαντική μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού τόσο σε δείγματα κοπράνων όσο και στο τυφλό έντερο των πουλιών της τάξης των $3 \log_{10}$ CFU/g (Kittler et al, 2013). Γενικά οι μίξεις δεν ήταν τόσο αποτελεσματικές όσο η εφαρμογή μεμονωμένων φάγων, ωστόσο ήταν περισσότερο κατάλληλες για τον έλεγχο μεγαλύτερου αριθμού στελεχών του καμπυλοβακτηριδίου. Κι ενώ τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι ενθαρρυντικά, παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί του βακτηρίου επανέρχονταν στα προ της χορήγησης φάγων επίπεδα σε σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ανάπτυξη στελεχών ανθεκτικών στη θεραπεία (Hermans et al, 2011). Λαμβάνοντας υπόψη αυτό, μια καλή προσέγγιση θα ήταν να περιοριστεί η χορήγησή τους στη μία μέρα πριν τη σφαγή των πουλιών (Kaakoush et al, 2015).

3.3.5. Προβιοτικά

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή (Hill et al, 2014). Η χρησιμότητά τους έγκειται στο ότι μπορούν να τροποποιήσουν το μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα προάγοντας την ευνοϊκή μικροχλωρίδα, αυξάνουν την αφομοίωση και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες που αναστέλλουν τα παθογόνα, μειώνουν τις τοξικές ουσίες που έχουν δυσμενή επίδραση στον οργανισμό, ανταγωνίζονται τα παθογόνα στους υποδοχείς προσκόλλησης και διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Chiang and Pan, 2012; FAO 2016). Σε ότι αφορά τα κρεοπαραγωγά ορνίθια, είδη όπως *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* και *Pediococcus* έχουν ευρύτατα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα και διαπιστώθηκε ότι επιδρούν στην πρόσληψη της τροφής και πρόσκτησης βάρους, διορθώνουν διαταραχές της εντερικής μικροχλωρίδας εξισορροπώντας την προς όφελος του πτηνού, προάγουν την ανοσολογική προστασία στο επιθήλιο του εντέρου, βελτιώνουν ζωοτεχνικούς δείκτες (όπως μέση ημερήσια αύξηση και δείκτη μετατρεψιμότητας) και αναβαθμίζουν την ποιότητα του παραγόμενου κρέατος (Getachew 2016; Sugiharto et al, 2018; Slizewska et al, 2019).

Το 2010 δοκιμάστηκε το στέλεχος *Bifidobacterium longum* PCB133 που οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού του *C. jejuni* στον εντερικό σωλήνα των κοτόπουλων κατά $1 \log_{10}$ CFU/g (Santini et al, 2010). Το Primilac® ως πρόσθετο στην τροφή χορηγήθηκε από την 1^η ημέρα σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής, ακολούθησε πειραματική μόλυνση με το στέλεχος *C. jejuni* ATCC 33291 την 21^η ημέρα και διαπιστώθηκε περιορισμός του φορτίου του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των ορνιθίων, βελτιωμένη ανοσολογική ανταπόκριση και θετική επίδραση στο ύψος των εντερικών λαχνών (Gharib Naseri et al, 2012). Το Poultry Star® sol, ένα μίγμα προβιοτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το έντερο πτηνών, χορηγήθηκε από την 1^η ημέρα στο πόσιμο νερό, ακολούθησε πειραματική μόλυνση με στέλεχος καμπυλοβακτηριδίου και διαπιστώθηκε περιορισμός του φορτίου του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου της τάξης των $6 \log_{10}$ CFU/g την 15^η ημέρα του πειράματος (Ghareeb et al, 2012).

Μίγμα λακτοβακίλλων (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. Lactis* Y και *L. Lactis* Foa) προερχόμενα από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, προστέθηκε στην τροφή την τελευταία εβδομάδα πριν τη σφαγή σε φυσικώς μολυσμένα από το καμπυλοβακτηρίδιο κοτόπουλα και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη των προβιοτικών αυτών βακτηρίων μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις στον εντερικό βλενογόνο των κοτόπουλων και να περιορίσουν την ικανότητα του *C. jejuni* να αποικίζει το εντερικό τους σύστημα. Αντίθετα η χορήγηση του παραπάνω μίγματος στην αρχή της εκτροφής δεν είχε ευεργετική επίδραση (Cean et al, 2015). Η ικανότητα στελεχών προβιοτικών βακτηρίων ανθρώπινης προέλευσης να προσκολλώνται σε θέσεις του εντερικού βλεννογόνου καταλαμβάνοντάς τες και μειώνοντας την πρόσδεση του *C. jejuni* σε αυτές έχει αποδειχτεί και σε παλαιότερη μελέτη (Ganan et al, 2013).

3.3.6. Πρεβιοτικά – Συμβιωτικά

Τα πρεβιοτικά αρχικά το 1995 ορίστηκαν ως «μη εύπεπτα συστατικά των τροφίμων, τα οποία ασκούν θετική επίδραση στον οργανισμό ξενιστή επιδρώντας επιλεκτικά είτε στην ανάπτυξη ήδη υπάρχοντων ευεργετικών βακτηριακών ειδών είτε στην δραστηριότητά τους στο παχύ έντερο, με αποτέλεσμα την βελτίωση της υγείας του

οργανισμού» (Gibson and Roberfroid 1995). Στις μέρες μας η αυξημένη γνώση σχετικά με τον τρόπο δράσης των πρεβιοτικών, οδήγησε στο να συμπεριληφθούν σε αυτά μια μεγάλη ποικιλία μη εύπεπτων ολιγοσακχαριτών με διαφόρου μήκους αλυσίδα άνθρακα (Gibson et al., 2017; Ricke 2018). Τα πρεβιοτικά αποδομούνται από το μικροβίωμα του εντερικού σωλήνα και διεγείρουν την ανάπτυξη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των προβιοτικών, με τρόπο που είναι ωφέλιμος για τον οργανισμό ξενιστή. Προϊόντα αποδόμησής τους είναι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Οι δύο πιο σημαντικές ομάδες πρεβιοτικών είναι οι φρουκτο - ολιγοσακχαρίτες (FOS, fructo – oligosaccharides) και οι γαλακτο – ολιγοσακχαρίτες (GOS, galacto – oligosaccharides). Θεωρείται ότι αποτελούν έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους ενίσχυσης των ωφέλιμων βακτηρίων του μικροβιώματος του γαστρεντερικού σωλήνα σε πολλά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων των κοτόπουλων, καθώς επίσης και ισχυρό όπλο στον περιορισμό παθογόνων του εντερικού συστήματος (Micciche et al, 2018; Ricke 2018). Αναφορικά με τη χρήση τους ως προσθετικά στην τροφή ή στο νερό για τον έλεγχο του *C. jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η πλειονότητα των πειραμάτων αφορά συνδυασμούς πρεβιοτικών με προβιοτικά. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ο όρος συμβιωτικά (Markowiak and Śliżewska 2018).

Σε πειράματα έχει εξεταστεί η επίδραση των πρεβιοτικών ως προσθετικών στην τροφή για τον βιο – έλεγχο του πληθυσμού του *C. jejuni* στο γαστρεντερικό σωλήνα των κοτόπουλων. Η πλειονότητα των in vivo μελετών απέδειξε περιορισμό του φορτίου του μικροοργανισμού (Arsi et al., 2015; Guyard-Nicodeme et al, 2016), ενώ σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή (Rezaei et al, 2015; Park et al, 2017). Δοκιμάστηκαν περικλειόμενα σε κάψα στελέχη του *Bifidobacterium longum* και ο γαλακτο - ολιγοσακχαρίτης CUP Oligo P ως πρόσθετο στην τροφή. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, διαπιστώθηκε μείωση του φορτίου του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων 14 και 21 ημέρες μετά τη χορήγηση (Baffoni et al, 2012). Σε άλλη μελέτη προστέθηκε στην τροφή των κοτόπουλων ένα συμβιωτικό προϊόν που περιελάμβανε στέλεχος του *Bifidobacterium longum* και ξυλο – ολιγοσακχαρίτη. Μια μικρή αλλά όχι αξιοσημείωτη μείωση του πληθυσμού του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο παρατηρήθηκε την 39^η ημέρα του πειράματος στα

κοτόπουλα, τα οποία την 1^η ημέρα είχαν επιμολυνθεί από το μικροοργανισμό και ακολούθως λάμβαναν το συμβιωτικό προϊόν με την τροφή (Baffoni et al, 2017).

Η επίδραση διαφόρων συνδυασμών συμβιωτικών που περιελάμβαναν προβιοτικά στελέχη απομονωθέντα από υγιή κοτόπουλα και πρεβιοτικά σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.125, 0.25 ή 0.5% φρουκτο – ολιγοσακχαρίτη ή 0.04, 0.08 ή 0.16% μάνναν – ολιγοσακχαρίτη) δοκιμάστηκαν στη διατροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ατομικές χορηγήσεις στην τροφή είτε προβιοτικού είτε πρεβιοτικού δεν οδήγησαν σε ανιχνεύσιμο περιορισμό του πληθυσμού του καμπυλοβακτηριδίου. Ωστόσο ο συνδυασμός τους και κυρίως του *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* με 0.04% ολιγοσακχαρίτες της μαννάνης στην τροφή οδήγησε σε μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού της τάξης των 3,3 log₁₀ CFU/g σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Arsi et al, 2015).

Οι μελέτες που έχουν λάβει χώρα τα τελευταία χρόνια και αφορούν την αποτελεσματικότητα των πρεβιοτικών ως προσθετικών στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων για το βιο – έλεγχο του *C. jejuni*, αποδεικνύονται υποσχόμενες. Ωστόσο πολλά πρέπει ακόμα να γίνουν, ώστε σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής να μπορεί να ενισχυθεί η ευρεία χρήση τους ως συμπληρώματα στη διατροφή. Παράλληλα η επίδραση των πρεβιοτικών στις ζωοτεχνικές αποδόσεις των πτηνών και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατός τους είναι αναγκαίο να ελεγχθούν παράλληλα με την αντι – *Campylobacter* δράση τους. Τα πρεβιοτικά ως μια σημαντική εναλλακτική στρατηγική ελέγχου του μικροοργανισμού θα πρέπει να αναπτυχθεί ταυτόχρονα με την σε βάθος αντίληψη και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικροβιώματος του γαστρεντερικού σωλήνα των πουλιών και των στελεχών του *Campylobacter* που λειτουργούν ως συμβιωτικά βακτήρια. Κάτι τέτοιο θα απαιτούσε μια περισσότερη «omics» προσέγγιση, ώστε όχι μόνο να επιτευχθεί η χαρτογράφηση αλλά και το μεταβολικό προφίλ του μικροβιώματος σε συνδυασμό με ανοσολογικές αντιδράσεις του ξενιστή (Kim et al, 2019).

3.3.7. Αιθέρια έλαια

Αρωματικά φυτά καλούνται τα φυτά από τα οποία, με διάφορες μεθόδους λαμβάνονται οι πτητικές, αρωματικές τους ουσίες, τα αιθέρια έλαια (Hardin et al, 2010). Φαρμακευτικά καλούνται τα φυτά, που τα δραστικά τους συστατικά έχουν

ιδιότητες φαρμάκου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών. Κοινό γνώρισμα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι η ύπαρξη αιθέριων ελαίων (EOs - essential oils) που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή φαρμακευτικών ουσιών. Η βιοδραστικότητα των φυτικής προέλευσης συστατικών, τα οποία είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτικού μεταβολισμού (κυρίως τερπένια, αλκαλοειδή, φαινολικά συστατικά), δεν εξαρτάται μόνο από το είδος του φυτού αλλά και άλλους παράγοντες όπως το κλίμα, το υψόμετρο της περιοχής, το έδαφος και το γενότυπο. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μια αυξανόμενη τάση χρήσης των Αρωματικών - Φαρμακευτικών φυτών στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και αρωμάτων, τροφίμων, αγροχημικών και ζωοτροφών.

Τα αιθέρια έλαια, τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των φυτοβιοτικών (phytobiotics) αναγνωρίζονται γενικά ως «ασφαλή» (GRAS – Generally Recognized as Safe) από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων, είναι λιγότερο τοξικά και περισσότερο ελεύθερα καταλοίπων σε σύγκριση με τα συνθετικά αντιβιοτικά (FDA 2018). Εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές, όπως απόσταξη με χρήση ατμού (steam distillation), υδρόξυ - απόσταξη (hydrodistillation) και εκχύλιση με διαλύτη (solvent extraction), όπου παραλαμβάνεται ένα είδος συμπυκνώματος πτητικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων τερπενοειδών και φαινυλοπροπανοειδών (Raut and Karuppayil 2014). Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών σε ένα μίγμα EOs ποικίλει σημαντικά και απαιτούνται εξειδικευμένες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους (Benavides et al, 2012). Έχουν απομονωθεί πάνω από 3,000 αιθέρια έλαια από τα οποία τα 300 περίπου έχουν χρησιμοποιηθεί σε εμπορική βάση (Diaz – Sanchez et al, 2015). Σε ότι αφορά την κτηνοτροφική τους χρήση, EOs έχουν δοκιμαστεί ως μικροβιοκτόνα και φυσικοί αυξητικοί παράγοντες που δημιουργούν ευεξία στα ζώα και αυξάνουν τη ζωική παραγωγή, ως εναλλακτικά της χρήσης αντιβιοτικών (Micciche et al, 2019).

Στο τομέα της πτηνοτροφείας, τα EOs έχουν δοκιμαστεί για τη μη – αντιμικροβιακή τους δράση. Η ρίγανη, το θυμάρι και η κανέλα είναι γνωστά ως βελτιωτικά της γεύσης (Wang et al, 2013). Η πεπτικότητα της τροφής αποδείχτηκε ότι αυξάνεται με την προσθήκη EOs. Εμπορικό σκεύασμα με θυμόλη, ευγενόλη και πιπερίνη χρησιμοποιήθηκε ως φυσικό προσθετικό στην τροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων και οδήγησε σε βελτίωση της δράσης των παγκρεατικών ενζύμων αμυλάση, τρυψίνη και

μαλτάση (Jang et al, 2007). Τα επίπεδα απορρόφησης αμινοξέων, όπως η θρεονίνη, η σερίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη αυξήθηκαν με την προσθήκη φυτικού εκχυλίσματος (που περιείχε καρβακρόλη, καπσαϊκίνη και σιναμαλδεΰδη) στην τροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Jamroz et al, 2003). Η βελτίωση στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και στην πεπτικότητα είχε σαν αποτέλεσμα καλύτερες ζωοτεχνικές αποδόσεις στα κοτόπουλα, όπως στο δείκτη μετατρεψιμότητα της τροφής και στη μέση αύξηση σωματικού βάρους (Basmacioğlu et al, 2010). Βέβαια δεν αποδείχτηκε η ευεργετική μη – αντιμικροβιακή και αυξητική επίδραση των αιθέριων ελαίων σε όλους τις πειραματικές μελέτες (Micciche et al, 2019). Παράγοντες που φαίνεται να σχετίζονται με τις αποκλίσεις αυτές είναι η σύνθεση της τροφής, ο τύπος του μίγματος των αιθέριων ελαίων που προστέθηκε σε αυτή, ο διαφορετικός τρόπος μεταβολισμού των συστατικών του μίγματος, το ίδιο το μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα του κοτόπουλου, το οποίο διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία (Stanley et al, 2014; Wilkinson et al, 2016).

Οι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί δράσης των αιθέριων ελαίων διακρίνονται σε άμεσους (direct) και έμμεσους (indirect) που σχετίζονται με τη μείωση του φορτίου του *Campylobacter* αλλά και άλλων παθογόνων σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Παρότι δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται ότι τα EOs ως προσθετικά στην τροφή επιδρούν άμεσα στον αποικισμό του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων, είτε βελτιώνοντας την απορρόφηση των αμινοξέων στον ειλεό με αποτέλεσμα να στερείται ο μικροοργανισμός των αναγκαίων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξή του, είτε διεγείροντας το ανοσοποιητικό σύστημα που με τη σειρά του οδηγεί σε περιορισμό του πληθυσμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των ορνιθίων (Diaz-Sanchez et al, 2015). Η περαιτέρω βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης των EOs στο ανοσοποιητικό σύστημα των κοτόπουλων θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα για την εφαρμογή τους ως διευρυμένη στρατηγική ελέγχου του καμπυλοβακτηριδίου σε επίπεδο εκτροφής (Connerton et al, 2018). Αναφορικά με τους άμεσους μηχανισμούς αντι – μικροβιακής δράσης, έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν το πρωτέωμα και τη μορφολογία του βακτηριακού κυττάρου. Αξιοσημείωτες μορφολογικές διαφορές στο κυτταρικό μέγεθος μικροβίων έχουν προκληθεί *in vitro* από το δυόσμο, τη θυμόλη και τη σιναμαλδεΰδη (O'Bryan et al, 2015). Άλλος προτεινόμενος άμεσος μηχανισμός δράσης (κυρίως με τα φαινολικά

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**ΚΕΦ. 3: ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ
ΤΟΥ CAMPYLOBACTER JEJUNI ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΚΤΡΟΦΗΣ**

συστατικά καρβακρόλη, θυμόλη, 1,8 κινεόλη, p-cymene) σε βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του *Campylobacter* είναι ότι διαταράσσουν την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, προκαλώντας τροποποιήσεις στη γλυκοπρωτεϊνικής της δομή και οδηγούν σε έναρξη κυτταρικής λύσης (De Sousa et al, 2012; O'Bryan et al, 2015). In vitro έχει διαπιστωθεί η αντι – μικροβιακή δράση έναντι του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο κρεοπαραγωγών ορνιθίων της θυμόλης, ευγενόλης, καρβακρόλης και σιναμοaldeΐδης (Kollanoor – Johnny et al, 2010). In vivo το Sangrovit[®], εμπορικό σκεύασμα φυτικής προέλευσης, προστέθηκε στην τροφή από την 1^η ημέρα σε νεοσσούς και την 21^η ακολούθησε πειρατική μόλυνση με στέλεχος καμπυλοβακτηριδίου. Διαπιστώθηκε περιορισμός του φορτίου του μικροοργανισμού την 42^η (μείωση σε δείγματα κοπράνων κατά 0,7 log₁₀ CFU/ml) και 49^η ημέρα (μείωση σε δείγματα τυφλών εντέρων >1 log₁₀ CFU/ml) καθώς επίσης ισχυρότατη ανοσολογική ανταπόκριση (Gharib Naseri et al, 2012). Η θυμόλη, η καρβακρόλη και οι πιθανοί συνδυασμοί τους δοκιμάστηκαν ως προσθετικό στην τροφή για να διαπιστωθεί η ικανότητά τους να εμποδίσουν τον αποικισμό του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των ορνιθίων (Arsi et al, 2014). Η θυμόλη σε συγκέντρωση 0,25% μείωσε τον πληθυσμό του *Campylobacter* κατά 0,6 log₁₀ CFU/mL περιεχομένου τυφλού εντέρου, ενώ σε συγκέντρωση 2% στην τροφή οδήγησε σε περιορισμό της τάξης των 2 log₁₀ CFU/mL. Το αιθέριο έλαιο της κανέλας και συγκεκριμένα συστατικό αυτής η σιναμοaldeΐδη στην τροφή νεοσσών δεν αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στον περιορισμό του *C. jejuni* (Hermans et al, 2011). Τα αποτελέσματα πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι η σιναμοaldeΐδη αποδομείται στο ανώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως άλλωστε έχει διαπιστωθεί σε μελέτη στα χοιρινά (Michiels et al, 2008). Επιπλέον η θυμόλη μείωσε το φορτίο του καμπυλοβακτηριδίου στον πρόλοβο ορνιθίων αλλά όχι στο τυφλό έντερο, αποδεικνύοντας ότι δεν έφτασε στον εντερικό σωλήνα σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις (Erps et al, 2015).

Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών προσθετικών στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και συνδυασμοί αυτών έχουν δοκιμαστεί για να διαπιστωθεί η αντι – *Campylobacter* δράση τους. Το σκεύασμα Excential Alliin Plus (με αλισίνη σκόρδου και κανέλα) που προστέθηκε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, περιόρισε το φορτίο του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο κατά 1

$\log_{10}$ CFU/g την 11^η ημέρα της εκτροφής, αλλά δεν είχε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα την 35^η ή την 42^η ημέρα (Guyard-Nicodème et al, 2016). Σε άλλη μελέτη, εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα της προσθήκης του συνδυασμού θυμόλης, ευγενόλης, πιπερίνης και βενζοϊκού οξέως στην τροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Μικρή και όχι στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε όσον αφορά τον πληθυσμό του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων στο τέλος του πειράματος. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν στην ίδια μελέτη με τη χρήση εκχυλίσματος σκόρδου ως προσθετικού στη διατροφή (Gracia et al, 2016).

Επίσης σημαντικός είναι ο ανασταλτικός ρόλος των αιθέριων ελαίων στο σχηματισμό βιοϋμενίων. Τα βιοϋμένια (biofilms) αποτελούν κύριο πρόβλημα στα πτηνοτροφεία και πρόκειται για συσσωματώματα παθογόνων βακτηρίων, τα οποία εύκολα σχηματίζονται και προσκολλώνται σε διάφορες επιφάνειες (Donlan and Costerton 2002; Srey et al, 2013). Τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται στα πτηνοτροφεία είναι πολύ δύσκολο να τα απομακρύνουν. Το *Campylobacter jejuni* είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε αυτούς τους σχηματισμούς. Το έλαιο του κοριάνδρου (coriander oil) και το αντιμικροβιακό του κλάσμα λιναλοόλη (linalool) αποδείχτηκε ότι έχει ισχυρή ανασταλτική δράση στο σχηματισμό biofilms από το καμπυλοβακτηρίδιο (Duarte et al, 2016).

Γενικά η επίδραση των αιθέριων ελαίων ως διατροφικού προσθετικού στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων από το *C. jejuni* δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και περαιτέρω πειραματικές προσπάθειες απαιτούνται για τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης τους. Με πάνω από 300 εμπορικά διαθέσιμα ΕΟς κάτι τέτοιο μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα δύσκολο (Bajraí et al, 2012). Η ενδεχόμενη ικανότητά τους να βελτιώνουν την απορρόφηση των αμινοξέων στον ειλεό φαίνεται να οδηγεί στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος στο γαστρεντερικό σωλήνα ακατάλληλου για τον πολλαπλασιασμό του καμπυλοβακτηριδίου στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων (Micciche et al, 2019).

4. ΣΤΟΧΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής έχει διαπιστωθεί τα τελευταία χρόνια, ότι μια πολυεπίπεδη στρατηγική παρεμβάσεων είναι δυνατό να αποφέρει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα στον έλεγχο του μικροοργανισμού. Αυτή περιλαμβάνει μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας (ώστε να αποφευχθεί ή αν αυτό δεν καταστεί δυνατό να μετριαστεί η προσβολή του σμήνους), ανοσοποίησης (παθητικής, ενεργητικής) και προσθετικά στη διατροφή με αντι - *Campylobacter* δράση. Απώτερος σκοπός όλων των παραπάνω παρεμβάσεων είναι η μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού στον εντερικό σωλήνα των κοτόπουλων, που με τη σειρά της θα οδηγήσει στον περιορισμό του επιπολασμού του *C. jejuni* στην αλυσίδα παραγωγής ορνίθιου κρέατος και τελικά σε μείωση της συχνότητας εκδήλωσης του νοσήματος στον άνθρωπο.

Στα πλαίσια του ΔΠΜΣ «Αγροχημεία – Εφαρμογές στη Ζωική και Φυτική Παραγωγή / Φαρμακευτικά Φυτά», το πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έχει ως στόχο να μελετήσει και να αξιολογήσει σε επίπεδο εκτροφής την αποτελεσματικότητα μιας εξελιγμένης μορφής χηλικού σιδήρου (ως προσθετικό στη διατροφή) σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής (broilers), τα οποία με φυσικό τρόπο εκτέθηκαν στο *Campylobacter jejuni*, για τον έλεγχο του μικροοργανισμού. Το παρόν πείραμα σχεδιάστηκε προκειμένου να μελετήσει τα εξής:

- ζωοτεχνικοί δείκτες: σωματικά βάρη εξεταζόμενων ορνιθίων σε συγκεκριμένες ημέρες της εκτροφής (1^η, 21^η και 42^η ημέρα), μέση ημερήσια αύξηση, μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής και δείκτης μετατρεψιμότητας σε τρεις συγκεκριμένες περιόδους της εκτροφής (1^η έως 21^η, 21^η έως 42^η και 1^η έως 42^η ημέρα),
- σκορ διαρροιών (καταγραφή έντασης διαρροιών στη στρωμή των κελιών),
- παθολογοανατομικά ευρήματα του εντερικού συστήματος κατά τη νεκροτομή των κοτόπουλων στο τέλος της εκτροφής και
- μικροβιολογικές μετρήσεις του *Campylobacter jejuni* σε συγκεκριμένα δείγματα (δείγματα στρωμνής και τυφλών εντέρων κοτόπουλων) που λήφθηκαν συγκεκριμένες ημέρες του πειραματισμού.

Τα κύρια ερωτήματα που τέθηκαν πριν την εκπόνηση της παρούσας μελέτης και στα οποία έπρεπε να δοθούν απαντήσεις ήταν τα εξής: «Η συγκεκριμένη εξελιγμένη μορφή χηλικού σιδήρου είναι αποτελεσματική στον έλεγχο του *Campylobacter jejuni* σε επίπεδο εκτροφής; Μετά την εφαρμογή του σκευάσματος ως προσθετικό στη διατροφή θα παρατηρηθεί μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων; Θα είναι ευεργετική η επίδρασή του στις ζωοτεχνικές αποδόσεις, στην ένταση και σοβαρότητα των διαρροιών αλλά και στην εικόνα του εντερικού σωλήνα των κοτόπουλων στο τέλος της εκτροφής από παθολογοανατομικής άποψης; Θα είναι επομένως αποτελεσματικό και σε ποια συγκέντρωση στο σιτηρέσιο για να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες στρατηγικές παρεμβάσεις στον περιορισμό και έλεγχο του *C. jejuni* σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων;».

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. ΥΛΙΚΑ

5.1.1. Κρεοπαραγωγά ορνίθια

Ο πειραματισμός έλαβε χώρα σε πτηνοτροφείο της περιοχής Κωστακιών Άρτας.

- Είδος ζώου που μελετήθηκε: κρεοπαραγωγά ορνίθια, υβρίδιο Ross 308.
- Παραγωγική κατεύθυνση: αναπτυσσόμενα / παχυνόμενα κρεοπαραγωγά ορνίθια
- Προέλευση: εκκολαπτήριο νεοσσών κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης.
- Φύλο: αρσενικό.
- Φυσική κατάσταση: υγιείς νεοσσοί.
- Ηλικία νεοσσών κατά την έναρξη του πειράματος: νεοσσοί μίας ημέρας.
- Βάρος αρχικό: περίπου 46 γραμμάρια.
- Ηλικία ορνιθίων κατά τον τερματισμό του πειράματος: 42 ημερών.
- Βάρος τελικό: περίπου 2,2 κιλά.
- Διάρκεια εκτροφής: 42 ημέρες.

Τριακόσιοι ογδόντα τέσσερις αρσενικοί νεοσσοί τοποθετήθηκαν τυχαία σε 24 κελιά (διαστάσεων 2 X 1 m) σε θάλαμο πτηνοτροφικής εκμετάλλευσης (διαστάσεων 100 X 12 m). Στο εκκολαπτήριο νεοσσοί εμβολιάστηκαν για τη νόσο Marek (Marek disease), «σεξαρίστηκαν» και επιλέχθηκαν οι αρσενικοί. Επιπλέον κατά τη δεύτερη εβδομάδα της ζωής τους εμβολιάστηκαν έναντι των νοσημάτων: Ψευδοπανώλη (Newcastle disease), Λοιμώδη Βρογχίτιδα (Infectious Bronchitis) και Gumboro,. Κάθε κελί περιείχε 16 νεοσσούς. Στη δεξιά πλευρά της πειραματικής κατασκευής υπήρχε διάδρομος πλάτους 0,5m για διευκόλυνση των εργασιών και παρακολούθησης των πουλιών. Στον υπόλοιπο θάλαμο τοποθετήθηκαν ορνίθια κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης που δε συμμετείχαν στον πειραματισμό.

Στο θάλαμο εφαρμόζονταν πρόγραμμα τεχνητού φωτισμού, με 23 ώρες φως/ημέρα για τις πρώτες δύο ημέρες, 16 ώρες φως/ημέρα από την 3^η έως την 14^η και 21 ώρες φως/ημέρα από τη 15^η έως το τέλος της εκτροφής (42^η ημέρα). Η τροφή καταναλώνονταν κατά βούληση, όπως επίσης και το νερό. Η θερμοκρασία και η υγρασία ελέγχονταν, καταγράφονταν και παρακολουθούνταν ανάλογα με την ηλικία και τις απαιτήσεις του ορνιθίων (αρχική θερμοκρασία θαλάμου 33°C, με προοδευτική

μείωση κατά 3°C ανά εβδομάδα μέχρι τους 20-22°C, όπου και παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος της εκτροφής, ενώ η υγρασία κυμαίνονταν μεταξύ 55-65%). Η εκτροφή ολοκληρώθηκε σε 42 ημέρες από την έναρξή της, που όλα τα πουλιά σφαγιάστηκαν. Η διαχείριση των ορνιθίων έγινε σε συμμόρφωση με την ισχύουσα Εθνική Νομοθεσία και τους Κανονισμούς για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς. Στην εικόνα 1, παρουσιάζονται τα ορνίθια στα κελιά τους (από το αρχείο του πειράματος).



Εικόνα 1: Διάταξη των κελιών του πειράματος

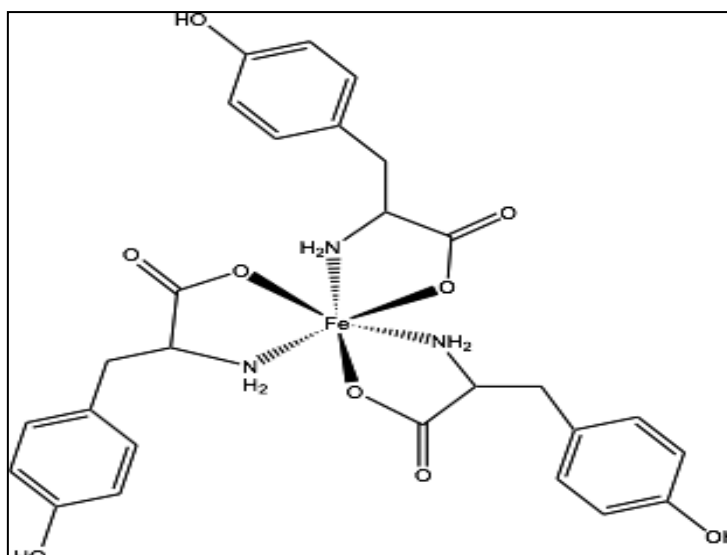
5.1.2. Διατροφικές αγωγές (Treatments) χηλικού σιδήρου

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές διατροφικές αγωγές (treatments): T1 μάρτυρες (δεν περιείχε χηλικό σίδηρο), T2 (περιείχε χηλικό σίδηρο σε συγκέντρωση 0,02 g/kg τροφής), T3 (χηλικός σίδηρος σε δοσολογία 0,05 g/kg τροφής) και T4 (χηλικός σίδηρος σε δοσολογία 0,2 g/kg τροφής). Η κάθε αγωγή χηλικού σιδήρου χορηγήθηκε σε έξι κελιά (έξι επαναλήψεις), όπως φαίνεται στον πίνακα 1. Το σκεύασμα χηλικού σιδήρου που προστέθηκε στην τροφή είχε εμπορικό όνομα TYPLEX® Chelate.

Πίνακας 1: Σχηματική απεικόνιση των κελιών και διάταξη πειραματικών χορηγήσεων χηλικού σιδήρου στα κρεοπαραγωγά ορνίθια

ΚΕΛΙ 24 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	ΔΙΑΔΡΟΜΟΣ ΠΛΑΤΟΥΣ 0,5 m
ΚΕΛΙ 23 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 22 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 21 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΚΕΛΙ 20 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	
ΚΕΛΙ 19 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 18 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 17 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΚΕΛΙ 16 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	
ΚΕΛΙ 15 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 14 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 13 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΚΕΛΙ 12 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	
ΚΕΛΙ 11 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 10 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 9 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΚΕΛΙ 8 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	
ΚΕΛΙ 7 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 6 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 5 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΚΕΛΙ 4 / ΑΓΩΓΗ 4 (T4)	
ΚΕΛΙ 3 / ΑΓΩΓΗ 3 (T3)	
ΚΕΛΙ 2 / ΑΓΩΓΗ 2 (T2)	
ΚΕΛΙ 1 / ΑΓΩΓΗ 1 (T1)	
ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ 2m X 1m	ΕΙΣΟΔΟΣ

Το σκεύασμα που εφαρμόστηκε στη διατροφή TYPLEX® Chelate είναι ένα εξειδικευμένο σύμπλοκο «χηλικής μορφής σιδήρου συνδεδεμένου με το αμινοξύ L-tyrosine», έχει χημική ονομασία «Iron, tris (L-tyrosinato-κN,κO^α) και μοριακό τύπο C₂₇H₃₀FeN₃O₉. Η χημική δομή της χηλικής μορφής του σιδήρου που περιέχονταν παρουσιάζεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Χημική δομή ferric tyrosine chelate

Το TYPLEX®Chelate σύμφωνα με την εταιρεία παρασκευής του είναι μία ανοιχτού καφέ χρώματος σκόνη, άοσμη, με ελάχιστη συγκέντρωση του συμπλόκου Fe(III)Tyr_3 90%, ελάχιστη περιεκτικότητα σε σίδηρο 8.4%, σε άζωτο 6.0%, μέγιστη υγρασία 1,76% και μέγιστη περιεκτικότητα σε τέφρα 15%. Στην παρούσα μελέτη το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε βρίσκονταν σε συμμόρφωση με τις απαιτήσεις ποιότητας της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με την εφαρμογή διατροφικών προσθετικών σε πειραματικούς σχεδιασμούς.

5.1.3. Χορηγούμενα σιτηρέσια

Σε ότι αφορά τα χορηγούμενα σιτηρέσια (έναρξης και ανάπτυξης-πάχυνσης), αυτά δεν περιείχαν συμπληρώματα σιδήρου, κοκκιδιοστατικά και χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Για την κατάρτισή τους ελήφθησαν υπόψη οι διατροφικές ανάγκες των κοτόπουλων τόσο στο σιτηρέσιο έναρξης (1-21 ημέρες) όσο και σε αυτό της ανάπτυξης-πάχυνσης (22-42 ημέρες), την οποία επέβλεψε το Εργαστήριο Διατροφής της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η σύσταση των σιτηρεσίων αλλά και τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης αυτής (που επίσης διεξήχθηκε στο ανωτέρω Εργαστήριο Διατροφής) παρουσιάζεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Σύσταση της τροφής και αποτελέσματα χημικής ανάλυσης αυτής

Συστατικά (%)	Σιτηρέσιο έναρξης, 1-21 ημέρες	Σιτηρέσιο ανάπτυξης- πάχυνσης, 22-42 ημέρες
Wheat	63,992	64,714
Barley	-	3,000
Soybean meal, 48% CP	28,000	25,000
Sodium Bicarbonate	0,130	0,220
Soy protein concentrate 66%	2,500	-
Soy oil	2,000	4,000
L-LYSINE HCl	0,128	0,175
DL-methionine	0,123	0,164
Choline chloride	0,067	0,067
Dicalcium phosphate	0,500	0,500
Calcium carbonate	1,900	1,500
Sodium chloride	0,160	0,160
Minerals and vitamins*	0,500	0,500
Total	100,000	100,000
Calculated analyses		
ME Broiler, Kcal/kg	2,981	3,100
Crude protein %	21,430	19,000
Crude fibre, %	3,250	3,220
Ash %	6,000	5,410
Moisture, %	12,300	12,150
Crude fat, %	3,470	5,320
Lysine, %	1,174	1,110
Methionine, %	0,476	0,455
Methionine +Cystine, %	0,593	0,529
Threonine, %	0,794	0,700
Tryptophan, %	0,262	0,241
Calcium, %	0,939	0,775
Sodium, %	0,143	0,167

* Προστέθηκαν ανά kg: Vit. A: 12,000 IU; Vit D3: 2,400 IU; Vit. E: 30 mg; Vit. K3: 3 mg; Vit. B1: 2,2mg; Vit. B2: 8 mg; Vit. B6: 5 mg; Vit. B12: 11 µg; Folicacid: 1.5 mg; Biotin: 150 µg; Capantothenate: 25 mg; nicotinicacid: 65 mg; ethoxyquin: 150 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Δενπροστέθηκεσίδηρος.

Η χηλική μορφή σιδήρου «TYPLEX®Chelate» (T2 – T4) χορηγήθηκε με την τροφή, όπως φαίνεται στον πίνακα 3. Ένα σακί τροφής κατά τη διάρκεια της χρήσης του τοποθετήθηκε μπροστά από κάθε κελί και αναγνωρίζονταν με το δικό του αριθμό. Στο TYPLEX®Chelate είχε αρχικά προστεθεί μικροανιχνευτής κόκκινου χρωματισμού, ώστε να είναι δυνατή και εύκολη η επιβεβαίωση της παρουσίας του προϊόντος στο σιτηρέσιο οπτικά, αλλά και να διευκολύνεται η ομοιόμορφη ανάμειξή του με τα συστατικά της τροφής.

Πίνακας 3: Χηλική μορφή σιδήρου (TYPLEX®Chelate) που χορηγήθηκε με την τροφή κατά τη διάρκεια του πειραματισμού

Διατροφική Αγωγή (Treatment)	Σιτηρέσια έναρξης και αναπτυξης	Χηλική μορφή σιδήρου σε g/kg τροφής	Αριθμός επαναλήψεων	Χηλική μορφή σιδήρου με μικροανιχνευτή σε g/kg τροφής
T1 Control	Βασικό μείγμα τροφής	0,00	6	0,000
T2 TYPLEX® Chelate		0,02	6	0,022*
T3 TYPLEX® Chelate		0,05	6	0,055*
T4 TYPLEX® Chelate		0,20	6	0,220*
Αριθμός αγωγών: 4, Επαναλαμβανόμενα κελιά ανά αγωγή: 6, Συνολικός αριθμός κελιών: 24				
Αριθμός ορνιθίων ανά κελί: 16 (μέγιστη πυκνότητα φόρτισης εδάφους σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Ε.Ε.), Αριθμός ορνιθίων ανά αγωγή: 96, Συνολικός αριθμός ορνιθίων: 384				
* Μικροανιχνευτής (κόκκινου χρώματος) σε ποσοστό 10% στο TYPLEX Chelate				

5.1.4. Δείγματα κοπράνων, στρωμνής και τυφλών εντέρων ορνιθίων για καλλιέργεια, καταμέτρηση και ποσοτικοποίηση του *Campylobacter jejuni*

Για την καλλιέργεια, καταμέτρηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του *Campylobacter jejuni*, έγινε λήψη δειγμάτων την 25^η και 42^η ημέρα του πειραματικού σχεδιασμού. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Υγείας των Ζώων, Υγιεινής και Ποιότητας Τροφίμων (Laboratory of Animal Health, Food Hygiene and Quality) του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για μικροβιολογικές εξετάσεις. Τα είδη των δειγμάτων που ελήφθησαν και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν σε αυτά, παρουσιάζονται στον πίνακα 4 που ακολουθεί.

Πίνακας 4: Δείγματα για καλλιέργεια, καταμέτρηση και ποσοτικό προσδιορισμό του *Campylobacter jejuni*

Δείγματα κοπράνων που λήφθηκαν με βαμβάκοφορο στυλεό	25η ημέρα	4 ορνίθια επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε κελί (συνολικά 24 δείγματα)	Νωπά δείγματα κοπράνων καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και ελέγχθηκαν για ταυτοποίηση του <i>Campylobacter jejuni</i> με την τεχνική PCR.
Δείγματα στρωμνής	25η ημέρα	Δείγμα στρωμνής (200g) από κάθε κελί (24 δείγματα συνολικά). Καλλιέργεια σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Η PCR εφαρμόστηκε για να διαπιστωθεί η παρουσία του <i>Campylobacter jejuni</i> .	Τα δείγματα στρωμνής καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο για ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i> , ενώ η PCR εφαρμόστηκε για έλεγχο της παρουσίας του μικροοργανισμού.

Δείγματα τυφλών εντέρων	42η ημέρα	6 ορνίθια επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε κελί (144 δείγματα συνολικά). Τα τυφλά αφαιρέθηκαν. Καλλιέργεια σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για απομόνωση και ποσοτικό προσδιορισμό του μικροοργανισμού.	Τα δείγματα από τα τυφλά καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο για ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i> σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Η PCR εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού.
Δείγματα στρωμνής	42η ημέρα	Δείγμα στρωμνής (200g) από κάθε κελί (24 δείγματα συνολικά). Καλλιέργεια σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για ποσοτικό προσδιορισμό και PCR για ταυτοποίηση του μικροοργανισμού.	Τα δείγματα στρωμνής καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο για ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i> , ενώ η PCR εφαρμόστηκε για ταυτοποίηση του μικροοργανισμού.

5.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

5.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός – Περιγραφή των παραμέτρων που καταγράφηκαν

- ❖ Εκτίμηση υγείας νεοσσών την 1^η ημέρα έναρξης του πειράματος. Μη υγιείς νεοσσοί ή χαμηλού σωματικού βάρους (< 42 g) δεν συμπεριλήφθηκαν.
- ❖ Μέσος όρος σωματικού βάρους ανά κελί (mean pen body weight, BW) την 1^η 21^η και 42^η ημέρα της εκτροφής. Η μέση ημερήσια αύξηση (ADG, mean daily gain), η μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής (ADFI, mean daily feed intake) και ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR, feed/gain) υπολογίστηκαν για τις περιόδους 1-21 ημέρες, 21-42 ημέρες και 1-42 ημέρες του πειραματισμού.

- ❖ Καθημερινή παρακολούθηση και καταγραφή της υγείας των ορνιθίων (daily health records), σκορ διαρροιών ανά κελί σε ημερήσια βάση (daily pen diarrhea score), ποσοστά θνητότητας και διερεύνηση πιθανών αιτιών (mortality, probable causes).
- ❖ Την 20^η ημέρα του πειραματισμού επιμολύνθηκαν τα εξεταζόμενα ορνίθια με το *Campylobacter jejuni*.
- ❖ Δείγματα κοπράνων που λήφθηκαν με βαμβακοφόρο στυλεό (faecal swabs) την 25^η μέρα του πειραματισμού από ζωντανά κοτόπουλα, δείγματα στρωμνής και τυφλών εντέρων την 42^η (στο τέλος της εκτροφής) που τα πουλιά θανατώθηκαν, λήφθηκαν για εντοπισμό (detection – presence) του *Campylobacter jejuni* με την τεχνική PCR.
- ❖ Δείγματα στρωμνής την 25^η και 42^η ημέρα και δείγματα τυφλών τη 42^η ημέρα λήφθηκαν για απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό του *Campylobacter jejuni*. Εφαρμόστηκε τεχνική καλλιέργειας του μικροοργανισμού (selective *C. jejuni* culture).
- ❖ Νεκροτομικά ευρήματα από τον έλεγχο του εντέρου στο τέλος του πειραματικού σχεδιασμού από 6 πουλιά που τυχαία επιλέχθηκαν από κάθε κελί (συνολικά νεκροτομήθηκαν 144 πουλιά).
- ❖ Παρατήρηση παρουσίας ή απουσίας διαρροιών στο δάπεδο κάθε κελιού στο τέλος της εκτροφής.

Οι παραπάνω παράμετροι που μελετήθηκαν εμφανίζονται σχηματικά στον πίνακα 5 που ακολουθεί.

Πίνακας 5: Πειραματικός σχεδιασμός

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (STUDY DESIGN)	
T1 Control (δεν περιείχε χηλικό σίδηρο), T2 –T3- T4 (χηλικός σίδηρος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις)	
Κρεοπαραγωγή ορνίθια μίας ημέρας έως 42 ημερών	
1 - 21 ημέρες	22 - 42 ημέρες
Σιτηρέσιο έναρξης	Σιτηρέσιο ανάπτυξης

Παρατηρήσεις: κατάσταση υγείας νεοσσών που επιλέχθηκαν την πρώτη ημέρα
Πειραματική μόλυνση με φυσικώς μολυσμένη από <i>Campylobacter jejuni</i> στρωμνή την εικοστή ημέρα
Μέσος όρος σωματικού βάρους ανά κελί BW, μέση ημερήσια αύξηση ADG, μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής ADFI, δείκτης μετατρεψιμότητας FCR σε τρεις περιόδους: 1-21 ημέρα, 21-42 ημέρες, 1-42 ημέρες
Δείγματα κοπράνων την 25η ημέρα, δείγματα στρωμνής και τυφλών εντέρων ορνιθίων την 42η ημέρα για καλλιέργεια –απομόνωση και ταυτοποίηση του <i>Campylobacter jejuni</i> με PCR
Τεχνική καλλιέργειας για απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i> σε δείγματα στρωμνής (25η και 42η ημέρα)
Τεχνική καλλιέργειας για απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i> σε δείγματα τυφλών εντέρων (42η ημέρα)
Παθολογοανατομικά ευρήματα εντέρων πουλιών την 42η ημέρα
Παρακολούθηση για παρουσία ή απουσία διαρροιών στο δάπεδο κάθε κελιού
Παρακολούθηση και καταγραφή επιπέδου υγείας των εξεταζόμενων ορνιθίων, ημερήσιο σκορ διαρροιών ανά κελί, θνητότητα και πιθανά αίτια απωλειών

5.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.1. Προσδιορισμός ζωοτεχνικών δεικτών

Το πείραμα παρακολουθούνταν σε καθημερινή βάση σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής. Τα ορνίθια ζυγίστηκαν ανά κελί την 1^η, 21^η και 42^η ημέρα. Λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό βάρος ανά κελί και τον αριθμό των πουλιών που περιέχονταν σε αυτό, προσδιορίστηκε το μέσο σωματικό βάρος ανά κελί για τις παραπάνω ημέρες (μέσο σωματικό βάρος ανά κελί σε συγκεκριμένη ημέρα = συνολικό βάρος των πουλιών του κελιού τη δεδομένη ημέρα / αριθμό πουλιών που περιέχονται σε αυτό). Οι μετρήσεις καταγράφηκαν σε υπολογιστικό φύλλο εργασίας Excel και από αυτές μπορούσαμε να προσδιορίσουμε την αύξηση του σωματικού βάρους των ορνιθίων ανά κελί από την 1^η έως την 21^η ημέρα, από την 21^η έως την 42^η ημέρα και από την 1^η έως την 42^η ημέρα. Παράλληλα η ποσότητα της τροφής που προσφέρονταν ανά

κελί καταγράφονταν ημερησίως, ελέγχονταν η κατανάλωσή της και ζυγίστηκαν οι ποσότητες αυτής ανά κελί που δεν καταναλώθηκαν τις ημέρες 14, 21 και 42 του πειράματος.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι χορηγήθηκαν τέσσερις διαφορετικές διατροφικές αγωγές χηλικού σιδήρου (T1 Control – δεν περιείχε TYPLEX Chelate, T2 – 0.02g TYPLEX Chelate/kg τροφής, T3 – 0.05g TYPLEX Chelate/kg τροφής και T4 – 0,2g TYPLEX Chelate/kg τροφής) με 6 επαναλήψεις για κάθε αγωγή, ουσιαστικά **τα 24 κελιά ταξινομηθήκαν σε 4 ομάδες (T1, T2, T3 και T4)** ανάλογα με τη συγκέντρωση χηλικού σιδήρου που περιέχονταν στο σιτηρέσιό τους. Έτσι για κάθε ομάδα υπολογίστηκαν οι παρακάτω ζωοτεχνικοί δείκτες:

- ❖ Σωματικό βάρος ορνιθίου (BW, body weight) την 1^η ημέρα της εκτροφής σε γραμμάρια (g).
- ❖ Σωματικό βάρος ορνιθίου (BW, body weight) την 21^η ημέρα της εκτροφής σε γραμμάρια (g).
- ❖ Σωματικό βάρος ορνιθίου (BW, body weight) την 42^η ημέρα της εκτροφής σε γραμμάρια (g).
- ❖ Μέση ημερήσια αύξηση (ADG, average daily gain) για τις περιόδους 1^η έως 21^η, 21^η έως 42^η και 1^η έως 42^η ημέρα της εκτροφής.
- ❖ Μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής ανά κελί (ADFI, average daily feed intake) για τις περιόδους 1^η έως 21^η, 21^η έως 42^η και 1^η έως 42^η ημέρα της εκτροφής. Η μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής προσδιορίστηκε ως ο λόγος: Συνολική ποσότητα τροφής που καταναλώθηκε ανά κελί στη συγκεκριμένη περίοδο / (αριθμός ζωντανών πουλιών στο τέλος της περιόδου X αριθμό των ημερών).
- ❖ Δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR, feed conversion ratio, feed/gain) που υπολογίστηκε από τη συνολική ποσότητα πρόσληψης τροφής που καταναλώθηκε ανά κελί για συγκεκριμένη περίοδο διαιρούμενη με τη συνολική αύξηση του σωματικού βάρους ανά κελί στην περίοδο αυτή, λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση σωματικού βάρους των νεκρών πουλιών (απώλειες).

5.3.2. Προσδιορισμός ποσοστού θνητότητας κατά τη διάρκεια της εκτροφής

Κατά τη διάρκεια της εκτροφής παρατηρήθηκαν απώλειες (θάνατοι) στις ομάδες των εξεταζόμενων ορνιθίων. Τα νεκρά ορνίθια περισυλλέγησαν, ζυγίστηκαν (απαραίτητο

για τον προσδιορισμό του δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα) και νεκροτομήθηκαν, με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής αιτίας απώλειάς τους. Παράλληλα καταγράφονταν το κελί από το οποίο απομακρύνονταν και η ημερομηνία θανάτου. Στις εικόνες 3, 4 και 5 παρουσιάζεται ορνίθιο, ηλικίας 28 ημερών και τα ευρήματα από τη νεκροτομή του (από το αρχείο του πειράματος). Έτσι ανά κελί προσδιορίστηκε ο αριθμός των ζωντανών πουλιών (live birds) έως την 21^η της εκτροφής, ο αριθμός των ζωντανών πουλιών ως το τέλος της εκτροφής (42^η ημέρα), το συνολικό βάρος των νεκρών πουλιών (dead birds total weight), το ποσοστό θνητότητας ως το τέλος της εκτροφής (mortality) αλλά και το πιθανό αίτιο θανάτου αποτέλεσμα του νεκροτομικού ελέγχου (probable causes).



Εικόνα 3: Νεκρό ορνίθιο ηλικίας 28 ημερών (καταγράφηκε το κελί από το οποίο απομακρύνθηκε και το σωματικό του βάρος)



Εικόνα 4: Τυφλά έντερα του νεκρού ορνιθίου



Εικόνα 5: Αιμορραγικό περιεχόμενο τυφλού εντέρου μετά τη διάνοιξή του (κοκκιδίωση)

5.3.3. Σκορ διαρροιών κατά τη διάρκεια του πειράματος

Σε ημερήσια βάση ελέγχονταν η στρωμνή στο δάπεδο των κελιών για παρουσία διαρροιών και τα αποτελέσματα καταγράφονταν. Η ένταση των διαρροιών (diarrhea score) βαθμονομήθηκε ανάλογα με τη σοβαρότητά της από το 0 έως το 3. Συγκεκριμένα 0 = απουσία διάρροιας (no diarrhea), 1 = μικρής έντασης, υδαρής διάρροια (low score), 2 = μέσης έντασης με λίγο αίμα στα κόπρανα (average score), 3 = μεγάλης έντασης με αιμορραγικά κόπρανα (high score). Παραδείγματα βαθμονόμησης εμφανίζονται στις εικόνες 6 και 7 (από το αρχείο του πειράματος).



Εικόνα 6: Υδαρής διάρροια (low score -1)



Εικόνα 7: Διάρροια με αιμορραγικά κόπρανα (high score – 3)

5.3.4. Έλεγχος της στρωμνής των κελιών για παρουσία διαρροιών στο τέλος της εκτροφής και νεκροτομική εξέταση ορνιθίων

Την τελευταία ημέρα της εκτροφής (42^η ημέρα) ελέγχθηκαν τόσο τα ορνίθια πριν απομακρυνθούν για ευθανασία, όσο και η στρωμνή των κελιών για παρουσία διαρροιών. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν με ΝΑΙ = Διαπιστώθηκε διάρροια και ΟΧΙ = Δεν διαπιστώθηκε διάρροια. Στη συνέχεια τα κελιά εκκενώθηκαν και τα εξεταζόμενα ορνίθια μεταφέρθηκαν στο νεκροτομικό εργαστήριο. Έξι ορνίθια επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε κελί (144 συνολικά: 6 πουλιά X 24 κελιά) και έγινε έλεγχος του εντερικού τους σωλήνα (λεπτό και παχύ έντερο, τυφλά) για παρουσία παθολογοανατομικών ευρημάτων. Παράλληλα τα τυφλά έντερα λήφθηκαν για περαιτέρω μικροβιολογικό έλεγχο (απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό του *Campylobacter jejuni*). Τα ευρήματα του νεκροτομικού ελέγχου διαχωρίστηκαν σε φυσιολογικά (normal) και μη φυσιολογικά (abnormal).

Οι μη φυσιολογικές περιπτώσεις διακρίθηκαν σε Κοκκιδίωση (*Coccidia*), Αιμορραγική διάρροια (Bloody diarrhea) και Διάρροια (Diarrhea).

5.3.5. Πρωτόκολλα αναλύσεων

Η τεχνική που εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση του *Campylobacter jejuni* στα εξεταζόμενα δείγματα κοπράνων, στρωμνής και των τυφλών εντέρων ήταν η PCR στο εργαστήριο Υγείας των ζώων, Υγιεινής και Ποιότητας Τροφίμων.

Οι μικροβιολογικές τεχνικές για απομόνωση, ταυτοποίηση και καταμέτρηση του *Campylobacter jejuni* που εφαρμόστηκαν περιελάμβαναν τη χρήση Maximum

Recovery Diluent (MRD, Oxoid Basingstoke, UK) για την αραίωση της συγκεκριμένης ποσότητας δείγματος από τα τυφλά έντερα των πτηνών, με αραίωση 1:2 (w/v), ενώ οκτώ διαδοχικές αραιώσεις έως 1: 30 έγιναν σε MRD και 10 µl κάθε αραιώσης ενοφθαλμίστηκε σε CCDA and Brilliance Campy Count Agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Τα τρυβλία επώαστηκαν μικροαναερόβια σε 42°C για 48h και μετά ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη του *Campylobacter jejuni* και οι αποικίες καταμετρήθηκαν.

5.3.6. Στατιστική ανάλυση

Ο βασικός πειραματικός σχεδιασμός ήταν RCB (random complete block design) και το κελί θεωρήθηκε η πειραματική μονάδα μέτρησης όλων των παραμέτρων. Η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης που εφαρμόστηκε ήταν το ANOVA. Το IBMSPSS (έκδοση 20) χρησιμοποιήθηκε ως στατιστικό πρόγραμμα.

Συνοπτικά, το πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας παρουσιάζεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συνοπτική παρουσίαση πειραματικού μέρους

Προσθετικό στη διατροφή που χρησιμοποιήθηκε: TYPLEX® Chelate (ferrric tyrosine chelate)	
Αριθμός διατροφικών αγωγών που εφαρμόστηκαν: 4	
Συγκέντρωσεις προσθετικού στο σιτηρέσιο	
T1 - Control - 0	
T2 - Control + TYPLEX® Chelate σε 0,02 g/kg τροφής	
T3 - Control + TYPLEX® Chelate σε 0,05 g/kg τροφής	
T4 - Control + TYPLEX® Chelate σε 0,20 g/kg τροφής	
Είδος ζώου που μελετήθηκε: κρεοπαραγωγά ορνίθια, υβρίδιο Ross 308	Συνολικός αριθμός ορνιθίων του πειραματισμού: 384

Παραγωγική κατεύθυνση: αναπτυσσόμενα / παχυνόμενα κρεοπαραγωγά ορνίθια	Φύλο: Αρσενικό
Ηλικία νεοσσών κατά την έναρξη του πειράματος: νεοσσοί μίας ημέρας	Ηλικία νεοσσών στο τέλος της εκτροφής: 42 ημερών
Συνολικός αριθμός κελιών: 24	Επαναλαμβανόμενα κελιά ανά αγωγή: 6
	Αριθμός πουλιών ανά κελί: 16
Μέθοδος διατροφής: Κατά βούληση / Σιτηρέσια με τη μορφή μίγματος (mash)	Είδη σιτηρεσίων: έναρξης και ανάπτυξης - πάχυνσης
Την 20η ημέρα της εκτροφής πειραματική μόλυνση με φυσικώς μολυσμένη από <i>Campylobacter jejuni</i> στρωμνή	
Παράμετροι που μελετήθηκαν:	
Μέσος όρος σωματικού βάρους ανά κελί την 1η, 21η και 42η ημέρα. Κατανάλωση τροφής ανά κελί την 1η, 21η και 42η ημέρα της εκτροφής.	
Υπολογισμός ADG, ADFI, FCR για τις περιόδους 1-21, 21-42 και 1-42 ημέρες της εκτροφής	
Δείγματα κοπράνων την 25η ημέρα, δείγματα στρωμνής και τυφλών εντέρων ορνιθίων την 42η ημέρα για ανίχνευση του <i>Campylobacter jejuni</i> με PCR	
Δείγματα στρωμνής (25η και 42η ημέρα) και δείγματα τυφλών εντέρων (42η ημέρα) για ποσοτικό προσδιορισμό του <i>Campylobacter jejuni</i>	
Παρατήρηση για παρουσία ή απουσία διάρροιας σε στρωμνή κάθε κελιού και νεκροτομική εξέταση εντερικού συστήματος ορνιθίων την 42η ημέρα	
Μέθοδος στατιστικής ανάλυσης: ANOVA GLM (SPSS v. 20 programm)	

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους πίνακες 7, 8 και 9 παρουσιάζονται οι ζωοτεχνικές αποδόσεις που καταγράφηκαν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 7: Ζωοτεχνικοί δείκτες από την 1^η έως την 21^η ημέρα της εκτροφής

Αγωγή (Treatment)	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 1η, BW	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 21η, BW	Μέση ημερήσια αύξηση, ADG (g)	Μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής, ADFI	Δείκτης μετατρεψιμότητας, FCR
T1 Control	45,8	655,4	30,5	53,8	1,7687
T2 (0,02g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	45,9	652,6	30,3	54,0	1,7828
T3 (0,05g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	46,4	679,9	31,7	54,5	1,7261
T4 (0,20g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	45,8	658,9	30,7	54,9	1,7915
SEM	0,22	8,175	0,414	0,359	0,015
P (τιμή)	0,763	0,638	0,654	0,700	0,461
Αριθμός επαναλήψεων: 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή					
SEM= Σταθερό λάθος κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου (Standard error of mean)					
BW=Body weight, ADG= Average daily gain, ADFI= Average daily feed intake, FCR= Feed Conversion Ratio (feed/gain)					

Πίνακας 8: Ζωοτεχνικές αποδόσεις από 21^η έως 42^η ημέρα της εκτροφής

Αγωγή (Treatment)	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 21η, BW	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 42η, BW	Μέση ημερήσια αύξηση, ADG (g)	Μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής, ADFI	Δείκτης μετατρεψιμότητας, FCR
----------------------	--	--	--	---	-------------------------------------

T1 Control	655,4	2.141,80	70,8	142,1	1,9898
T2 (0,02g TYPELEX® Chelate / kg τροφής)	652,6	2.135,70	70,6	140,6	1,9781
T3 (0,05g TYPELEX® Chelate / kg τροφής)	679,9	2.172,70	71,1	140,5	1,9770
T4 (0,20g TYPELEX® Chelate / kg τροφής)	658,9	2.261,00	76,3	142,0	1,8561
SEM	8,175	25,249	1,091	1,734	0,020
P (τιμή)	0,638	0,299	0,226	0,981	0,085
Αριθμός επαναλήψεων: 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή					
SEM= Σταθερό λάθος κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου (Standard error of mean)					
BW=Body weight, ADG= Average daily gain, ADFI= Average daily feed intake, FCR= Feed Conversion Ratio (feed/gain)					

Πίνακας 9: Ζωοτεχνικοί δείκτες από την 1^η έως την 42^η ημέρα της εκτροφής

Αγωγή (Treatment)	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 1η, BW	Σωματικό βάρος (g), ημέρα 42η, BW	Μέση ημερήσια αύξηση, ADG (g)	Μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής, ADFI	Δείκτης μετατρεψιμότητας, FCR
T1 Control	45,8	2.141,80	51,1	100,6	1,9247
T2 (0,02g TYPELEX® Chelate / kg τροφής)	45,9	2.135,70	51,0	99,3	1,9203
T3 (0,05g TYPELEX® Chelate / kg τροφής)	46,4	2.172,70	51,9	100,0	1,8993

T4 (0,20g TYPLEX [®] Chelate / kg τροφής)	45,8	2.261,00	54,0	100,1	1,8383
SEM	0,22	25,249	0,616	1,051	0,015
P (τιμή)	0,763	0,299	0,297	0,977	0,167
Αριθμός επαναλήψεων: 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή					
SEM= Σταθερό λάθος κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου					
BW=Body weight, ADG= Average daily gain, ADFI= Average daily feed intake, FCR= Feed Conversion Ratio (feed/gain)					

Σε ότι αφορά τη θνητότητα κατά τη διάρκεια της εκτροφής, στον πίνακα 10 αναφέρονται με λεπτομέρειες πόσα ορνίθια από κάθε κελί απεβίωσαν, την ηλικία τους, το αίτιο θανάτου σύμφωνα με το νεκροτομικό έλεγχο, αλλά και το συνολικό ποσοστό απωλειών στη διάρκεια των 42 ημερών.

Πίνακας 10: Θνητότητα, πιθανά αίτια απώλειας εξεταζόμενων ορνιθίων

Αγωγή (Treatment)	Αριθμός κελιού	Ημερομηνία	Ηλικία ορνιθίου (ημέρες)	Αιτιολογία	Αριθμός ορνιθίων ανά αγωγή	%
T1 Control	T 1.3	21/12/2016	26	Κοκκιδίωση	2	
	T 1.3	23/12/2016	28	Κοκκιδίωση	1	
	T 1.6	23/12/2016	28	Κοκκιδίωση	1	
	T 1.6	25/12/2016	30	Κοκκιδίωση	1	
	Σύνολο				5	5,2
T2 (0,02g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	T 2.4	27/12/2016	32	Εντερίτιδα	1	
	T 2.5	24/12/2016	29	Εντερίτιδα	1	
	T 2.6	26/12/2016	31	Εντερίτιδα	1	
	Σύνολο				3	3,1
T3 (0,05 g TYPLEX [®] Chelate/kg	T 3.3	27/12/2016	32	Εντερίτιδα	1	

τροφής)	T 3.4	25/12/2016	30	Χαμηλό σωματικό βάρος λόγω διάρροιας	1	
	T 3.5	23/12/2016	28	Κοκκιδίωση	1	
	T 3.5	31/12/2016	36	Κολιβακίλλωση	1	
	T 3.6	28/12/2016	33	Χαμηλό σωματικό βάρος λόγω διάρροιας	1	
	Σύνολο				5	5,2
T4 (0,20g TYPLEX® Chelate/kg τροφής)	T 4.1	26/12/2016	31	Εντερίτιδα	1	
	T 4.3	25/12/2016	30	Χαμηλό σωματικό βάρος λόγω διάρροιας	1	
	Σύνολο				2	2,1
ΣΥΝΟΛΟ					15	3,90%
Αριθμός επαναλήψεων: 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή						

Στο τέλος της εκτροφής (42^η ημέρα) ελέγχθηκε η στρωμνή στο δάπεδο των κελιών για παρουσία διαρροιών. Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων αναφέρονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Παρουσία ή απουσία διάρροιας στη στρωμνή των κελιών την 42^η ημέρα της εκτροφής

	Επαναλήψεις κελιών (replicate pens)					
Αγωγή (Treatment)	1	2	3	4	5	6
T1 Control	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI	ΟΧΙ
T2 (0,02g TYPLEX® Chelate/kg τροφής)	ΟΧΙ	NAI	ΟΧΙ	ΟΧΙ	NAI	NAI

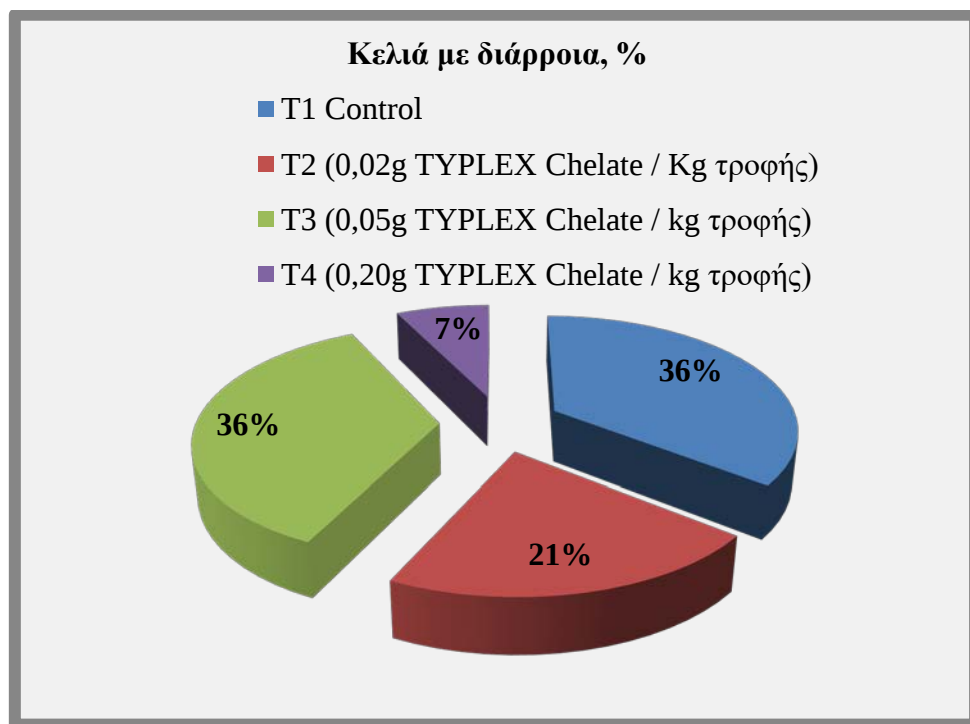
T3 (0,05g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	NAI	NAI	NAI	ΌΧΙ	NAI	NAI
T4 (0,20g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	NAI	ΌΧΙ	ΌΧΙ	ΌΧΙ	ΌΧΙ	ΌΧΙ
Αριθμός επαναλήψεων: 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή						
NAI= Διαπιστώθηκε διάρροια σε στρωμνή						
ΌΧΙ= Δεν διαπιστώθηκε διάρροια σε στρωμνή						

Στον πίνακα 12, εμφανίζονται τα ποσοστά (%) των κελιών στα οποία διαπιστώθηκε διάρροια στη στρωμνή ανά ομάδα επανάληψης των αγωγών με χηλικό σίδηρο την 42^η ημέρα της εκτροφής.

Πίνακας 12: Ποσοστά εμφάνισης διαρροιών στη στρωμνή των κελιών την 42^η ημέρα της εκτροφής

	Διάρροια στη στρωμνή των κελιών*
Αγωγή (Treatment)	Κελιά με διάρροια, %
T1 Control	83
T2 (0,02g TYPLEX [®] Chelate / Kg τροφής)	50
T3 (0,05g TYPLEX [®] Chelate / kg τροφής)	83
T4 (0,20g TYPLEX [®] Chelate / kg τροφής)	17
*Αριθμός επαναλήψεων = 6 κελιά των 16 αρσενικών ορνιθίων/αγωγή, % κελιών/ομάδα (T1-T4), που η διάρροια διαπιστώθηκε τουλάχιστον σε ένα ορνίθιο την 42η ημέρα πριν την ευθανασία (για παράδειγμα στην ομάδα T4 μόνο 1 στα 6 κελιά ήταν θετικό για διάρροια)	

Διάγραμμα 1: Γράφημα πίτας που παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης διαρροιών στη στρωμή των κελιών την τελευταία ημέρα της εκτροφής ανά αγωγή χηλικού σιδήρου



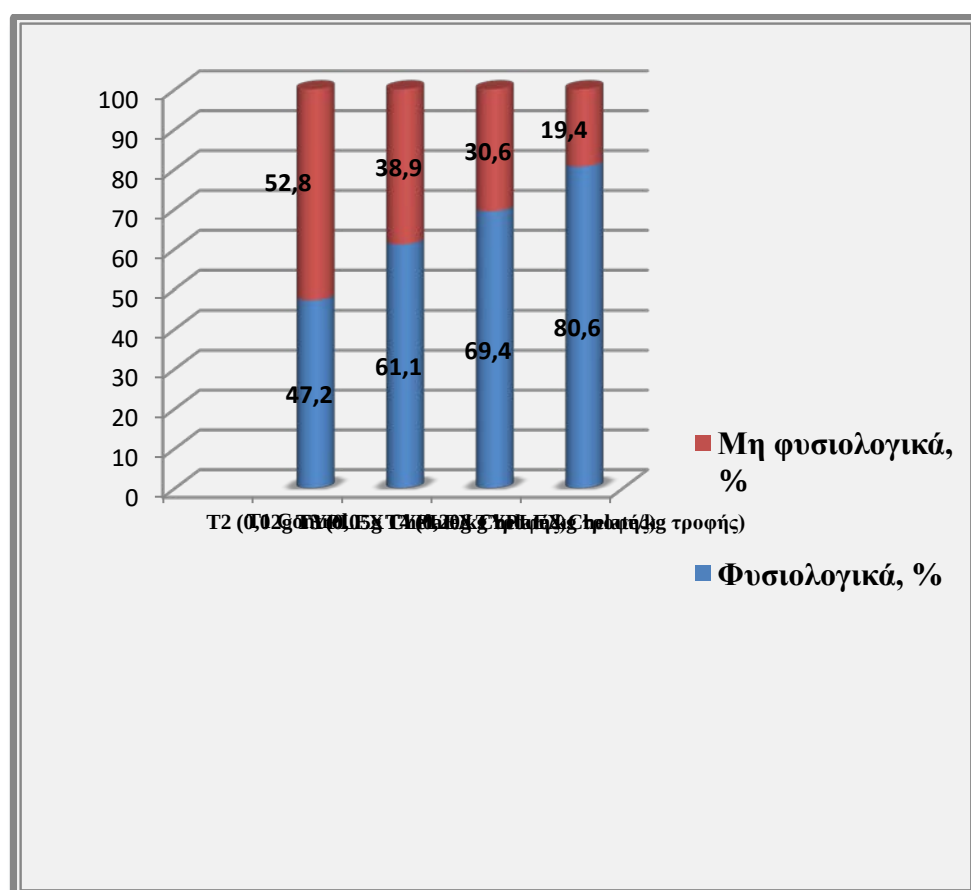
Πίνακας 13: Νεκροτομική εκτίμηση εντερικού σωλήνα ορνιθίων μετά τη νεκροτομή τους την 42^η ημέρα του πειράματος (τέλος της εκτροφής)

Παθολογοανατομικά ευρήματα του εντερικού σωλήνα μετά τη νεκροτομή των ορνιθίων*					
Αγωγή (Treatment)	Φυσιολογικά, %	Μη φυσιολογικά, %	Αποτελέσματα νεκροτομικά για τις μη φυσιολογικές περιπτώσεις		
			Κοκκιδίωση %	Διάρροια %	Αιμορραγική διάρροια %
T1 Control	47,2	52,8	25,0	5,6	22,2
T2 (0,02g TYPLEX® Chelate/kg τροφής)	61,1	38,9	27,8	0,0	11,1

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

T3 (0,05g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	69,4	30,6	22,2	2,8	5,6
T4 (0,20g TYPLEX [®] Chelate/kg τροφής)	80,6	19,4	11,1	2,8	5,6
* Αριθμός επαναλήψεων: 144 ορνίθια (έγινε ευθανασία σε 6 πουλιά ανά κελί ανά αγωγή: 24 κελιά X 6 πουλιά = 144 συνολικά)					

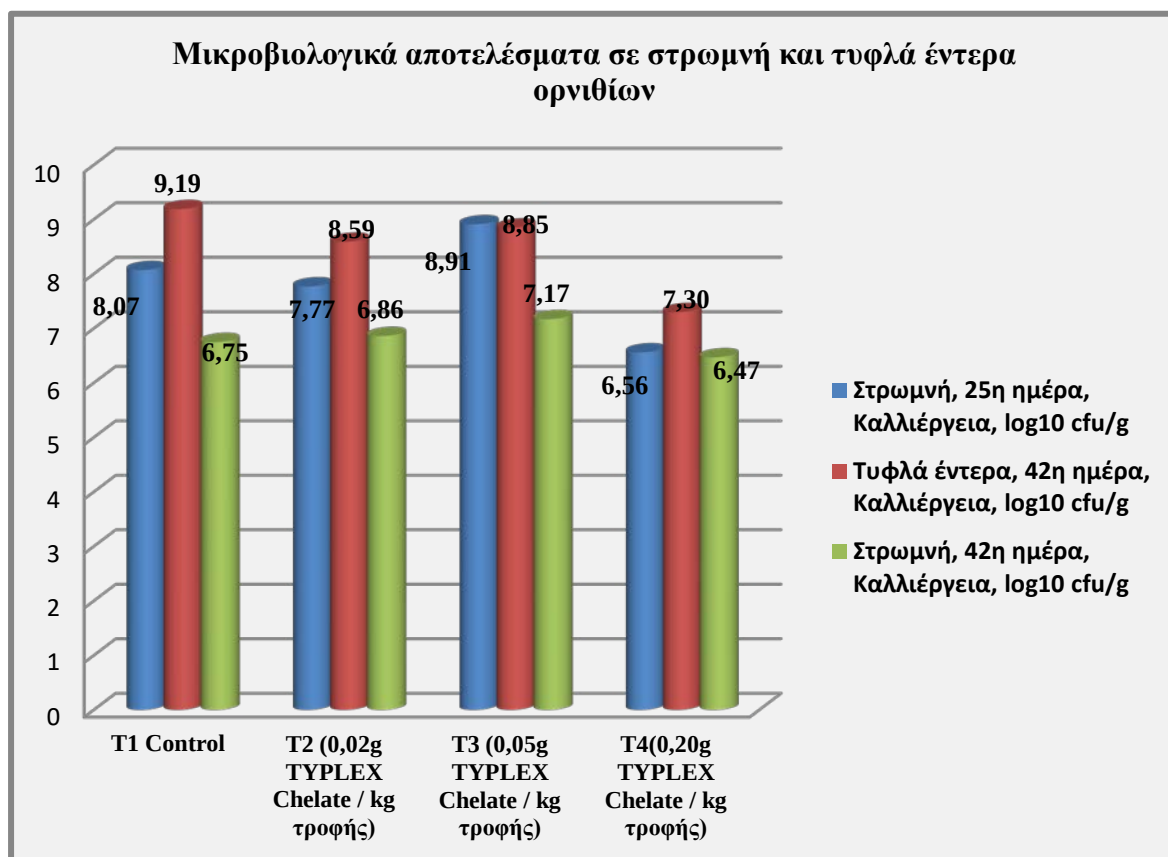
Διάγραμμα 2: Γράφημα στήλης που παρουσιάζονται τα ποσοστά φυσιολογικών και μη φυσιολογικών νεκροτομικών ευρημάτων ανά αγωγή (treatment) χηλικού σιδήρου



Πίνακας 14: Μικροβιολογικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού του *Campylobacter jejuni* σε στρωμνή και τυφλά έντερα ορνιθίων

Αγωγή (Treatment)	Στρωμνή, 25η ημέρα, Καλλιέργεια, log ₁₀ cfu/g	Τυφλά έντερα, 42η ημέρα, Καλλιέργεια, log ₁₀ cfu/g	Στρωμνή, 42η ημέρα, Καλλιέργεια, log ₁₀ cfu/g
T1 Control	8,07	9,19	6,75
T2 (0,02g TYPLEX® Chelate / kg τροφής)	7,77	8,59	6,86
T3 (0,05g TYPLEX® Chelate / kg τροφής)	8,91	8,85	7,17
T4(0,20g TYPLEX® Chelate / kg τροφής)	6,56	7,30	6,47
SEM	0,077	0,167	0,146
P (τιμή)	<0,001	0,004	0,404
Αριθμός δειγμάτων	24	144*	24
Αριθμός επαναλήψεων: 24 (6 κελιά ανά αγωγή). *Για τις καλλιέργειες των τυφλών εντέρων ισχύει: 6 πουλιά ανά κελί X 6 κελιά ανά αγωγή X 4 αγωγές = 144 πουλιά			
SEM= Σταθερό λάθος κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου (Standard error of mean)			

Διάγραμμα 3: Μικροβιολογικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού του *Campylobacter jejuni* σε στρωμνή (25^η ημέρα), σε τυφλά έντερα νεκροτομηθέντων ορνιθίων (42^η ημέρα) και στρωμνή (42^η ημέρα) σε διάγραμμα στήλης κυλίνδρου



7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η καμπυλοβακτηριδίαση αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες πρόκλησης γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο σε όλο τον κόσμο (Sibanda et al, 2018). Στις Η.Π.Α., τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) εκτιμούν ότι 1,3 εκατομμύρια κρούσματα του νοσήματος λαμβάνουν χώρα σε ετήσια βάση, ενώ για το 2015 διαπιστώθηκε ότι από τις 4.598 περιπτώσεις τροφιμογενών νοσημάτων για τα οποία απαιτήθηκε νοσοκομειακή περίθαλψη το *Campylobacter* απομονώθηκε στις 1.087 από αυτές (CDC 2018). Η επιβάρυνση για τη δημόσια υγεία είναι μεγάλη και ακολουθεί τη μόλυνση από *Salmonella* αναφορικά με τις βακτηριακής αιτιολογίας τροφιμογενείς λοιμώξεις στις Η.Π.Α. (Scallan et al, 2015). Σε συστηματική ανάλυση από το 1990 έως και το 2013, το καμπυλοβακτηρίδιο αναγνωρίστηκε ως ο τέταρτος σε συχνότητα εμφάνισης αιτιολογικός παράγοντας του «διαρροϊκού νοσήματος» στον άνθρωπο μετά από το ροταϊό, τον τυφοειδή πυρετό και την κρυπτοσποριδίαση (Murray et al, 2015). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2005, σύμφωνα με την επίσημη αναφορά της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων, το *Campylobacter* περιγράφεται ως το περισσότερο συχνά καταγεγραμμένο βακτηριακό παθογόνο πρόκλησης γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο (EFSA 2017). Το ίδιο ισχύει σε Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (Hansson et al, 2018). Γενικά η συχνότητα εμφάνισης της καμπυλοβακτηριδίασης έχει αυξηθεί δραματικά τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες του κόσμου κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών, ενώ πληροφορίες για την Αφρική, την Ασία και τη Μέση Ανατολή αποδεικνύουν ότι στις περιοχές αυτές το νόσημα εκδηλώνεται με την ενδημική του μορφή, ειδικά στα παιδιά (Kaakoush et al, 2015).

Σε ασθενείς με διάρροια που οφείλονταν σε αυτό το μικροοργανισμό, απομονώθηκε στο 95% των περιπτώσεων το *C. jejuni* (Friedman et al, 2004). Ο επιπολασμός του είδους αυτού σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων έχει αποδειχτεί ότι ξεπερνά το 70% (Ansari-Lari et al, 2011; Sahin et al, 2015). Εκτιμήθηκε ότι το 71% των περιπτώσεων εκδήλωσης καμπυλοβακτηριδίασης στη Σουηδία μεταξύ 2001 και 2012 σχετίζονταν με το κοτόπουλο ως δεξαμενή του μικροοργανισμού, ενώ γενικά το 50% έως 80% των κρουσμάτων στον άνθρωπο φαίνεται να σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με το ορνίθιο κρέας (Wei et al, 2014; Wales et al, 2019). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το κοτόπουλο είναι η κύρια πηγή τροφιμογενούς μετάδοσης του *C. jejuni* στον άνθρωπο,

το οποίο λειτουργεί ως δεξαμενή του μικροοργανισμού. Τα ορνίθια παραμένουν συνήθως υγιή και ασυμπτωματικά, ενώ ο εντερικός τους σωλήνας και κυρίως το τυφλό έντερο αποικίζονται από πολύ μεγάλο αριθμό στελεχών *Campylobacter*, της τάξης των $10^8 - 10^9$ CFU/gram (Hermans et al, 2011; Thibodeau et al, 2015; Kaakoush et al, 2015). Σε λίγες περιπτώσεις η μόλυνση από το καμπυλοβακτηρίδιο είναι δυνατό να προκαλέσει κλινική νόσο στα broilers, με αυξημένα ποσοστά θνητότητας και μειωμένες ζωοτεχνικές αποδόσεις (Humphrey et al, 2014). Κατά τη διάρκεια της εκτροφής αλλά και κατά τη σφαγή το κρέας επιμολύνεται, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μείωση του φορτίου του *C. jejuni* στα σμήνη των κρεοπαραγωγών ορνιθίων περιορίζει σε σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο για τον καταναλωτή (Thormar et al, 2006). Επιπρόσθετα ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε αφθονία στο πτηνοτροφείο και στον περιβάλλοντα χώρο, συμπεριλαμβανομένων του εδάφους, του νερού, των διαφόρων επιφανειών, του αέρα αλλά και πλήθος ζωικών οργανισμών που λειτουργούν ως δεξαμενές και μεταφέρουν το μικροοργανισμό εντός του θαλάμου (Ellis-Iversen et al, 2012).

Η μετάδοση του *C. jejuni* μέσω των κοπράνων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους, αν όχι το σημαντικότερο, τρόπο επιμόλυνσης του σφάγιου και εισόδου του μικροοργανισμού στην αλυσίδα παραγωγής ορνίθιου κρέατος και επομένως στην τροφική αλυσίδα (Santini et al, 2010). Στις πραγματικές συνθήκες εκτροφής είναι πολύ δύσκολο, αν όχι ακατόρθωτο, ανεξάρτητα από το συνδυασμό των στρατηγικών παρεμβάσεων βιο – ελέγχου, να αποφευχθεί η επαφή των κοτόπουλων με το μικροοργανισμό (Hermans et al, 2011). Εξαιτίας αυτού, ακόμα και μια μερική μείωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος και του σφάγιου από το *C. jejuni* είναι σημαντική, λαμβάνοντας υπόψη τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα εκδήλωσης του νοσήματος στον άνθρωπο μπορεί να μειωθεί κατά 48%, 85% και 96%, εάν η επιμόλυνση του σφάγιου περιοριστεί κατά 1, 2 ή 3 $\log_{10}$ CFU/g αντίστοιχα (Messens et al, 2007). Επιπλέον σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων, περιορισμός του φορτίου του *Campylobacter* στον εντερικό σωλήνα του κοτόπουλου κατά 1, 2, 3 ή 6 $\log - units$, θα μείωνε σε ποσοστά 65%, 91%, 98% και 100% αντίστοιχα τα κρούσματα καμπυλοβακτηριδίων στον άνθρωπο (EFSA 2019; EFSA BIOHAZ Panel 2011).

Προσπάθειες να περιοριστεί ή να εξαλειφθεί ο αποικισμός του εντερικού σωλήνα του κοτόπουλου από το *Campylobacter jejuni* περιλαμβάνει μια σειρά από στρατηγικές

παρεμβάσεις με κυριότερες τα μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας, τον εμβολιασμό, τις αγωγές στο πόσιμο νερό και τα προσθετικά στην τροφή. Σε ότι αφορά τα μέτρα βιοασφάλειας αξίζει να τονιστεί ότι αυτά δεν είναι πάντοτε μια υπόθεση οικονομική. Σε μελέτη αξιολόγησης του κόστους των παρεμβάσεων για τον περιορισμό του *C. jejuni* σε επίπεδο εκτροφής διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή αυστηρών προστατευτικών φραγμών υγειονομικής σημασίας, η κατασκευή προθαλάμου, η χρήση ξεχωριστών εργαλείων και εξοπλισμού για κάθε θάλαμο με σκοπό τον περιορισμό της διασταυρούμενης επιμόλυνσης και κυρίως η κατάργηση της «αραίωσης» με εφαρμογή του συστήματος all-in / all-out στις 35 ημέρες περίπου, ήταν ιδιαίτερα κοστοβόρα σε βαθμό πολλές φορές απαγορευτικό (Lake et al, 2013; van Wageningen et al, 2016). Ωστόσο τα επαυξημένα μέτρα βιοασφάλειας και υγιεινής είναι εξέχουσας σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό αριθμό περιπτώσεων καμπυλοβακτηριδίων στον άνθρωπο. Εξαιτίας της πληθώρας των τρόπων μετάδοσης και εξάπλωσης του μικροοργανισμού, οι παράγοντες κινδύνου θα πρέπει να αντιμετωπιστούν ταυτόχρονα και με ποικίλες παρεμβάσεις. Η απουσία εκδήλωσης κλινικών συμπτωμάτων στα κρεοπαραγωγά ορνίθια και τα ανύπαρκτα ποσοστά θνητότητας έχουν ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει για τους πτηνοτρόφους κίνητρο να επενδύσουν στην εφαρμογή ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης. Η επίμονη και αδιάκοπη εφαρμογή μέτρων βιοασφάλειας θα πρέπει να υποστηρίζεται από τη συνεχή επιμόρφωση του προσωπικού και την παροχή οικονομικών κινήτρων στους πτηνοτρόφους (Sibanda et al, 2018; Wales et al, 2019).

Σε ότι αφορά την ενεργητική ανοσοποίηση, δοκιμάστηκαν σε πολλά πειράματα εμβόλια ολοκυτταρικά, υπομονάδων ή με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA κατά τη διάρκεια των είκοσι τελευταίων ετών και συνεχίζονται με συνεχώς υποσχόμενα αποτελέσματα. Ωστόσο έως σήμερα δεν υπάρχει στην αγορά διαθέσιμο εμβόλιο που να χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα για τα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Οι βασικές προδιαγραφές που θα πρέπει να πληρούνται είναι: αποτελεσματική επίδραση του εμβολίου στο ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα των ορνιθίων, ώστε να προκαλέσει επαρκώς γρήγορη ανοσολογική ανταπόκριση στην επιφάνεια του βλεννογόνου του εντέρου τις πρώτες 2 – 3 εβδομάδες μετά την εκκόλαψη, υψηλού επιπέδου προστασία έναντι των διαφόρων ορότυπων του *C. jejuni*, ευκολία στη χορήγηση, χαμηλό κόστος και ασφάλεια τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (de Zoete et al, 2007).

Εναλλακτικά αντιγόνα στηριζόμενα στην ανάλυση του γενόματος του *C. jejuni* και καινοτόμες προσεγγίσεις όπως ανοσοενισχυτικά ή κυτοκίνες για περαιτέρω ενεργοποίηση και ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος των ορνιθίων δοκιμάζονται τα τελευταία χρόνια με ενθαρρυντικά σε κάποιες περιπτώσεις αποτελέσματα (Nothhaft et al, 2016; Meunier et al, 2017; Kashoma et al, 2019). Τέλος ο συνδυασμός ανοσοποίησης και πρόσθετου στην τροφή, λόγω της αθροιστικής τους δράσης αλλά και των διαφορετικών μηχανισμών λειτουργίας, θα μπορούσε να οδηγήσει σε περιορισμό έως και 3 log units τη συγκέντρωση του μικροοργανισμού στο τυφλό, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τον κίνδυνο εκδήλωσης καμπυλοβακτηριδίων στον άνθρωπο έως και 90% (Romero-Barrios et al, 2013).

Η προσθήκη οργανικών οξέων στο πόσιμο νερό σε περιορισμένης κλίμακας πειραματικούς σχεδιασμούς φαίνεται να είναι αποτελεσματική εν μέρει στον περιορισμό αποικισμού του εντερικού σωλήνα των κοτόπουλων από το *C. jejuni*, ωστόσο οι εν λόγω μελέτες δεν παρουσιάζουν σταθερότητα (Wales et al, 2019). Το προϊόν Selco® 4Health, ένα μίγμα οργανικών οξέων και λιπαρών οξέων με μεσαίου μήκους αλυσίδα, προστέθηκε στο πόσιμο νερό (τελική τιμή pH 4 – 4.5) από την 1^η ημέρα έως και το τέλος της εκτροφής. Διαπιστώθηκε περιορισμός του πληθυσμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο την 35^η και 42^η ημέρα κατά 1,4 και 4,3 log₁₀ CFU/g αντίστοιχα (Jansen et al, 2014).

Τα αντιφατικά και με απόκλιση αποτελέσματα της δράσης των οξινοποιητών στο πόσιμο νερό, πιθανόν να οφείλονται σε αλλαγές στην απορρόφηση του προϊόντος από το πεπτικό σύστημα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων που με τη σειρά του οδηγεί σε αναποτελεσματικές συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών όταν φτάνουν στον εντερικό σωλήνα. Επιπλέον η μικροβιακή χλωρίδα ενδέχεται να αλληλοεπιδρά με το ενεργό συστατικό ή ακόμα και να το τροποποιεί, καθιστώντας το μη διαθέσιμο ή ανεπαρκές για να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού. Ωστόσο αυτό που γενικά είναι αποδεκτό είναι το γεγονός ότι η χρήση οξινοποιητών στο πόσιμο νερό το εξυγιαίνει και το περιορίζει ως παράγοντα κινδύνου για τη μετάδοση του μικροοργανισμού στο θάλαμο εντός πτηνοτροφείου (Meunier et al, 2015; Robyn et al, 2015).

Σε ότι αφορά τη χορήγηση λιπαρών και οργανικών οξέων στην τροφή, η προσθήκη καπρυλικού, καπρικού και λαυρικού οξέως (σκεύασμα Lodestar με MCFA - medium chain fatty acids C8 – C12) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο αριθμός των στελεχών

του καμπυλοβακτηριδίου που απαιτούνταν για τον αποικισμό του 50% των εξεταζόμενων ορνιθίων ήταν 200 φορές υψηλότερος, δηλαδή τα οξέα αυτά είχαν ευεργετική επίδραση στην καθυστέρηση του αποικισμού του τυφλού εντέρου από το μικροοργανισμό (Van Gerwe et al, 2010). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, το καπρυλικό οξύ ως προσθετικό στην τροφή χορηγήθηκε από την 1^η ημέρα του πειράματος, ακολούθησε επιμόλυνση με στελέχη του *C. jejuni* την 12^η και 35^η ημέρα, η οποία συνοδεύτηκε από παροδική καταστολή του πληθυσμού του μικροοργανισμού στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων (Honorkonà and Skrivanonà 2015). Διατροφικό προσθετικό που περιείχε μονογλυκερίδια μεσαίου μήκους αλυσίδας λιπαρών οξέων (C3, C4, C8, C10 και C12) χορηγήθηκε με την τροφή από την 3^η έως την 6^η εβδομάδα της εκτροφής και συνοδεύτηκε από περιορισμό του φορτίου του *C. jejuni* (της τάξης του 1 log₁₀ CFU/g) στο τέλος της εκτροφής (Gracia et al., 2016). Ωστόσο η προσθήκη λιπαρών οξέων με μεσαίου μήκους αλυσίδα στην τροφή δεν οδήγησε πάντοτε σε μείωση του φορτίου του καμπυλοβακτηριδίου. Σε ήδη επιμολυσμένα κοτόπουλα, μίγμα καπροϊκού, καπρυλικού και καπρικού οξέως χορηγούμενα στην τροφή (δόση 1%) 3 ημέρες πριν τη σφαγή δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στον περιορισμό του φορτίου του μικροοργανισμού είτε όταν τα οξέα ήταν επικαλυμμένα είτε όχι (Hermans et al, 2010).

Παρά το γεγονός ότι τα οργανικά και λιπαρά οξέα ως διατροφική στρατηγική για τον βιο - έλεγχο του *C. jejuni* σε επίπεδο εκτροφής φαίνεται να έχει κερδίσει έδαφος τα τελευταία χρόνια, σημαντικές ανακολουθίες μεταξύ των πειραματικών σχεδιασμών εξακολουθούν να υπάρχουν. Επιπρόσθετα η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μελετών αποδεικνύεται δύσκολη, μιας και πολυάριθμοι παράγοντες μεταξύ των οποίων το στέλεχος ή οι συνθήκες ανάπτυξης του σμήνους είναι διαφορετικοί και επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Παράλληλα επιπλέον οργανικά και λιπαρά οξέα θα πρέπει να δοκιμαστούν. Τέλος βαθύτερη και ουσιαστικότερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους αυτά επηρεάζουν το μικροβίωμα του κοτόπουλου και των τρόπων που αυτές οι αλλαγές επιδρούν στη συχνότητα εμφάνισης των παθογόνων είναι απαραίτητο να επιτευχθεί (Dittoe et al, 2018).

Η χρήση των βακτηριοσινών σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής έναντι του *Campylobacter jejuni* αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική με στόχο τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και την προστασία της δημόσιας υγείας (Svetoch and Stern 2010). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα ετών σε πολλές

μελέτες αναφέρεται ότι μεγάλος αριθμός βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *L. salivarius*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* παράγουν βακτηριοσίνες, οι οποίες ασκούν ανασταλτική δράση έναντι του καμπυλοβακτηριδίου (Lagha et al, 2017). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι κάποιες από αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικούς σχεδιασμούς, είναι ανθεκτικές στη θερμοκρασία και στο χαμηλό pH και δεν εκδηλώνουν τοξικότητα έναντι. Η βακτηριοσίνη E-760, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Enterococcus* sp. NRRL B-30745, προστέθηκε στην τροφή και μείωσε τα επίπεδα αποικισμού του εντερικού σωλήνα εξεταζόμενων ορνιθίων στο τέλος της εκτροφής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου τουλάχιστον κατά ένα εκατομμύριο φορές. Συγκεκριμένα σχετίστηκε η χορήγησή της ως διατροφικό προσθετικό με τον εντυπωσιακό περιορισμό του φορτίου του καμπυλοβακτηριδίου κατά $8 \log_{10}$ CFU/g (Line et al, 2008).

Επομένως οι βακτηριοσίνες χορηγούμενες λίγο πριν τη σφαγή, δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε περιορισμό του αποικισμού του τυφλού εντέρου των κοτόπουλων από το *C. jejuni* και σε μειωμένη επιμόλυνση του σφάγιου, αποτελώντας μια υποσχόμενη για το μέλλον εναλλακτική μέθοδο ελέγχου του μικροοργανισμού (Ben Lagha et al, 2017; Rabie et al, 2019). Ωστόσο ευρείας κλίμακας πειραματικές μελέτες θα πρέπει τώρα να διεξαχθούν για να διαπιστωθεί η πρακτικότητα εφαρμογής αυτής της διατροφικής στρατηγικής σε πραγματικό επίπεδο εκτροφής και όχι σε ελεγχόμενο περιβάλλον, όπως οι παραπάνω πειραματικοί σχεδιασμοί διεξήχθησαν. Άλλωστε η δυνατότητα και οικονομικότητα της παραγωγής σε ευρεία κλίμακα και του καθαρισμού των βακτηριοσινών εμφανίζεται δύσκολη και πολύπλοκη στην παρούσα τουλάχιστον φάση.

Η χορήγηση βακτηριοφάγων ως διατροφικό προσθετικό έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ότι είναι αρκετά αποτελεσματική έναντι του *C. jejuni*, οι φάγοι παρουσιάζουν εξειδίκευση με το βακτήριο ξενιστή (αναγνώριση ειδικών υποδοχέων της μεμβράνης), δεν επηρεάζουν το μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα του κοτόπουλου και τέλος το κόστος ανάπτυξης ενός συστήματος με βακτηριοφάγους είναι αρκετά χαμηλό (Richards et al, 2019). Το φάσμα δράσης τους, η χρήση μιγμάτων φάγων, η χρονική στιγμή χορήγησης αλλά και το υψηλό φορτίο του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους ως βιολογικό εργαλείο (Grant et al, 2016).

Στα μειονεκτήματα της χρήσης τους περιλαμβάνεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των βακτηριοφάγων με πιθανότητα πρόκλησης επαγωγής, μεταλλάξεων και οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, παράγοντας ανασταλτικός στην ευρύτερη εφαρμογή τους ως στρατηγική βιολογικού ελέγχου. Μειονέκτημα αποτελεί επίσης το γεγονός πως όλα τα βακτηριακά στελέχη πρέπει να έχουν πλήρως αναγνωριστεί, να παρακολουθείται συνεχώς το προφίλ των φάγων αλλά και η ευαισθησία σε αυτούς των στελεχών του *C. jejuni* που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων θεωρεί ότι η τεχνογνωσία για την εφαρμογή των βακτηριοφάγων ως βιολογικό εργαλείο ελέγχου βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο και επομένως όχι επαρκής για την καθιέρωση ευρείας χρήσης στην πρωτογενή παραγωγή, με κυριότερο ζήτημα την ανάπτυξη στελεχών του μικροοργανισμού ανθεκτικών και τις ενδεχόμενες συνέπειες (Fischer et al, 2013; Oechslin 2018).

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των προβιοτικών, μιας ακόμα σημαντικής κατηγορίας διατροφικού προσθετικού που συμπεριλαμβάνεται στις στρατηγικές βιο – ελέγχου του *C. jejuni*, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Φαίνεται ωστόσο, ότι αυτά λειτουργούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με το εντερικό μικροβίωμα και να το επηρεάζουν, να έρχονται σε επαφή με το επιθήλιο και το βλεννογόνο, επηρεάζοντας τον εντερικό φραγμό και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών ή να ανταγωνίζονται τα παθογόνα βακτήρια για την κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών (Robyn et al, 2015). Σε πρόσφατο ευρείας κλίμακας πείραμα δοκιμάστηκε το Lavipan® (μίγμα λακτοβακίλλων και ζύμης) στην τροφή σε σμήνος 18,000 κρεοπαραγωγών ορνιθίων σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής. Διαπιστώθηκε μείωση του φορτίου του *Campylobacter spp.* τόσο στα κόπρανα ($2 \log_{10}$ CFU/g), όσο και στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ($1 \log_{10}$ CFU/g) σε σύγκριση με σμήνη άλλων θαλάμων της ίδιας πτηνοτροφικής εκμετάλλευσης που δεν χορηγούνταν το προϊόν (Smialek et al, 2018).

Τα προβιοτικά ως πρόσθετο στις ζωοτροφές δεν οδήγησαν πάντοτε σε μείωση του επιπολασμού του *C. jejuni* στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Αυτό συμβαίνει διότι η μείωση του pH που επιτυγχάνεται από τη δράση των Bifidobacteria και Lactobacilli, μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων in vitro, δεν λειτουργεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο in vivo. Σε επίπεδο εκτροφής η κατάσταση είναι περισσότερο πολύπλοκη και πληθώρα παραγόντων καθορίζουν την έκφραση των γονιδίων (Martin Král et al,

2012). In vitro η επώαση για διάστημα 30 λεπτών του *C. jejuni* NCTC 11168 σε τιμή PH 3.75 όχι μόνο δε μείωσε, όπως θεωρητικά αναμένονταν, τη βιωσιμότητα του μικροοργανισμού, αλλά οδήγησε σε μη ρυθμισμένη έκφραση κάποιων «επιθετικών γονιδίων» όπως γονίδια του μαστιγίου, με αποτέλεσμα το στέλεχος να μεταπέσει σε «λειτουργία επιβίωσης» (Le et al, 2012). Εξαιτίας της οδού μετάδοσης, ο μικροοργανισμός περνάει από το στομάχι που επικρατεί χαμηλή τιμή PH (1.5-2.0) και όμως διατηρεί την ικανότητα να μολύνει τον ξενιστή. Πιθανολογείται ότι το ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον του στομάχου αυξάνει την επιθετικότητα κάποιων στελεχών του καμπυλοβακτηριδίου (Ushanov 2018).

Όσον αφορά τα πρεβιοτικά και τα συμβιωτικά, αξίζει να αναφερθεί ότι το 2015 αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα διαφόρων διαθέσιμων εμπορικών προσθετικών που περιελάμβαναν οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, μονογλυκερίδια, φυτικά εκχυλίσματα, συνθετικά πρεβιοτικά και προβιοτικά (Lacto-butylin[®], Biotronic[®] Top3 Campylostat, Admix[®] Precision, Excential Butycoat, Power Protexion[®], Excential Alliin Plus, Anta[®] Phyt, Calsporin[®], Ecobiol[®], PoultryStar[®], and Original XPC[™]). Στα κοτόπουλα χορηγούνταν τροφή control (δεν περιείχε κανένα προσθετικό) ή τροφές με τα παραπάνω προσθετικά (συνολικά 13 ομάδες) και οι πληθυσμοί του *C. jejuni* καταμετρήθηκαν στο τυφλό έντερο των ορνιθίων τη 14^η, 35^η και 42^η ημέρα. Το πρεβιοτικό σκεύασμα Original XPC[™], το οποίο μεταξύ των άλλων περιελάμβανε mannan – oligosaccharides και β – γλυκάνες, δεν οδήγησε σε σημαντική μείωση του φορτίου του μικροοργανισμού τη 14^η και 35^η ημέρα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ προκάλεσε περιορισμό του πληθυσμού της τάξης των 3,2 log₁₀ CFU/g στα πουλιά ηλικίας 42 ημερών. Το επίπεδο αυτό μείωσης του επιπολασμού του *C. jejuni* ήταν το μεγαλύτερο μεταξύ των 12 εξεταζόμενων προσθετικών. Επίσης μείωση της τάξης των 2,1 και 1,7 log₁₀ CFU/g αντίστοιχα παρατηρήθηκε με τα σκευάσματα Admix[®] Precision και Calsporin[®], ενώ η χορήγηση των υπολοίπων προσθετικών είχε αμελητέα αντι – Campylobacter δράση στα ορνίθια ηλικίας 42 ημερών (Guyard-Nicodeme et al., 2016).

Η χορήγηση μίγματος αιθέριων ελαίων στην τροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων οδήγησε σε περιορισμό του καμπυλοβακτηριδίου στο τέλος της εκτροφής σε πολλούς πειραματικούς σχεδιασμούς τα τελευταία χρόνια, γεγονός που με τη σειρά του σχετίστηκε με μείωση της συχνότητας εμφάνισης του νοσήματος στον άνθρωπο (Chapman et al, 2016). Ωστόσο περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται για την επίδραση

των ΕΟς στο μικροβίωμα του γαστρεντερικού σωλήνα του κοτόπουλου, με ιδιαίτερη έμφαση στο πως αυτά αυξάνουν συγκεκριμένα βακτήρια της μικροχλωρίδας, καθιστώντας της λιγότερο «κατάλληλη ή περισσότερο εχθρική» στον αρχικό αποικισμό της από το *C. jejuni* (Kaakoush et al, 2014).

Συνδυασμός οργανικών οξέων (ΟΑ) και αιθέριων ελαίων (ΕΟς) και συγκεκριμένα μίγμα σορβικού και φουμαρικού οξέως μαζί με θυμόλη χορηγήθηκε με την τροφή (Thibodeau et al, 2014). Το σορβικό οξύ είναι γνωστό ότι προκαλεί διαταραχές στο κυτταρικό τοίχωμα Gram-αρνητικών βακτηρίων και μειώνει το pH του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ το φουμαρικό άμεσα επιδρά στα εντερικά βακτηρίδια περιορίζοντας την τιμή του pH του στομάχου (Papatsiros et al, 2013; Dittoe et al, 2018). Λόγω του διαφορετικού μηχανισμού δράσης των οργανικών οξέων σε σχέση με τα αιθέρια έλαια μελετήθηκε η πιθανή συνεργιστική τους δράση. Στην τροφή προστέθηκαν 500 ppm του μίγματος ΕΟς – ΟΑ και χρησιμοποιήθηκαν για τεχνητή επιμόλυνση τέσσερα στελέχη *C. jejuni* με διαφορετικές ικανότητες προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο την 14^η ημέρα της εκτροφής. Στο πείραμα αυτό ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος στο τυφλό έντερο (της τάξης των $2 \log_{10}$ CFU/mL) 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση στα ορνίθια που επιμολύνθηκαν με την ομάδα των στελεχών με χαμηλότερη ικανότητα προσκόλλησης. Φάνηκε επομένως ότι τα αιθέρια έλαια επηρεάζουν σε κάποιο βαθμό το μηχανισμό πρόσδεσης του μικροοργανισμού στο εντερικό τοίχωμα, γεγονός σημαντικό για τον περιορισμό της εξάπλωσής του εντός της εκτροφής (Vidanarachchi et al, 2005).

Ένας από τους κυριότερους περιορισμούς που αφορά την ευρεία εμπορική χρήση των ΕΟς στην πτηνοτροφία αλλά και σε άλλους τομείς της ζωικής παραγωγής ως πρόσθετο στην τροφή, είναι το γεγονός ότι ταχύτατα απορροφώνται από το ανώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, κυρίως στο στομάχι και στο λεπτό έντερο (Arsi et al, 2014). Για να αντιμετωπιστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, έχει προταθεί η τεχνική “microencapsulation”, δηλαδή μικροενθυλάκωσης για τα ΕΟς (και όχι μόνο για αυτή την κατηγορία διατροφικών προσθετικών), με σκοπό να προστατευθούν οι δραστικές τους ουσίες από την ανεπιθύμητη απορρόφηση πριν φτάσουν στην «τοποθεσία – στόχος» εντός του γαστρεντερικού σωλήνα (Calo et al, 2015). Σε γενικές γραμμές, στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται πολυμερή συστατικά, όπως ζελατίνη (gelatin), αραβικό κόμμι (Arabic gum) και πολυακρυλικό οξύ (polyacrylic

acid) που περικλείουν τα συστατικά που πρέπει να προστατευθούν . Ωστόσο το κόστος παραγωγής τέτοιων προϊόντων είναι μια παράμετρος που χρειάζεται να ληφθεί υπόψη (Meunier et al, 2015).

Παρά τις όποιες προσπάθειες αναζήτησης ενός διατροφικού προσθετικού αποτελεσματικού στον έλεγχο και στην αντιμετώπιση του *Campylobacter jejuni* σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής, η καμπυλοβακτηριδίωση παραμένει ένα σημαντικό νόσημα που σχετίζεται με τη δημόσια υγεία. Στην παρούσα μελέτη, δοκιμάστηκε ένα πρωτοποριακό και καινοτόμο προϊόν ως διατροφικό προσθετικό και μελετήθηκε η ανασταλτική του επίδραση στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων από το μικροοργανισμό με στόχο τη μείωση της μόλυνσης του ορνίθιου κρέατος.

Σε ότι αφορά τους εξεταζόμενους ζωοτεχνικούς δείκτες (μέσος όρος σωματικού βάρους ανά κελί – mean pen BW την 1^η, 21^η και 42^η ημέρα της εκτροφής, μέση ημερήσια αύξηση – ADG, μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής – ADFI και δείκτης μετατρεψιμότητας - FCR για τις περιόδους 1 έως 21, 21 έως 42 και 1 έως 42 ημέρες) αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των τεσσάρων διατροφικών ομάδων (T1 – T4) δε διαπιστώθηκαν για καμία από τρεις εξεταζόμενες περιόδους. Σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής, τα πουλιά της ομάδας T4 παρουσίαζαν αριθμητικώς υψηλότερο σωματικό βάρος, αύξηση σωματικού βάρους και βελτιωμένο δείκτη μετατρεψιμότητας συγκριτικά με τα πουλιά των άλλων ομάδων (T1, T2 και T3). Ειδικά ο δείκτης μετατρεψιμότητας (FCR, feed conversion ratio, feed/gain) ήταν χαμηλότερος στην ομάδα T4 (με την υψηλότερη συγκέντρωση χηλικού σιδήρου στην τροφή) σε σχέση με τις άλλες ομάδες (T1 – T3) και στις τρεις εξεταζόμενες περιόδους. Επομένως οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το TYPLEX® Chelate στην τροφή στην υψηλότερη συγκέντρωση που προστέθηκε (0,20 g/kg) είχε ευεργετική επίδραση στο δείκτη μετατρεψιμότητας, δηλαδή στην ποσότητα της τροφής που πρέπει να καταναλώσει ένα ορνίθιο για να αυξήσει το σωματικό του βάρος.

Η γενική κατάσταση της υγείας των ορνιθίων ήταν καλή με χαμηλά ποσοστά θνητότητας. Συγκεκριμένα από την 1^η έως την 21^η ημέρα της εκτροφής δεν παρατηρήθηκε καμία απώλεια (δηλαδή κάθε κελί την 21^η ημέρα περιείχε 16 ορνίθια). Από την 21^η έως την 42^η ημέρα διαπιστώθηκαν απώλειες, οι οποίες τελικά

κυμάνθηκαν σε χαμηλά ποσοστά. Από τα 384 κοτόπουλα χάθηκαν 15, δηλαδή το ποσοστό θνητότητας άγγιξε συνολικά το 3,9%. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων (T1, T2, T3 και T4) δεν διαπιστώθηκαν, ωστόσο το ποσοστό θνητότητας ήταν χαμηλότερο στην ομάδα T4 (2,4%, όπου το TYPLEX® Chelate περιέχονταν στην υψηλότερη συγκέντρωση - 0,20 g/kg τροφής) συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες (όπου τα ποσοστά κυμάνθηκαν: για την T1 στο 5,2%, για την T2 στο 3,1% και για την T3 στο 5,2%).

Την 20^η ημέρα της εκτροφής, εκδήλωση κοκκιδίωσης παρατηρήθηκε στα ορνίθια των εξεταζόμενων κελιών που λάμβανε χώρα το πείραμα, λόγω της απουσίας κοκκιδιοστατικού στην τροφή αλλά και πιθανής μετάδοσης του παθογόνου παράγοντα *Eimeria* spp. από τη μολυσμένη με *C. jejuni* στρωμνή που εισήχθηκε και διασκορπίστηκε στα κελιά την ημέρα αυτή, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Αποτέλεσμα των παραπάνω ήταν η αύξηση της συχνότητας της διάρροιας σε όλα τα κελιά για τις επόμενες ημέρες, η οποία συνδέθηκε κυρίως με *Eimeria* spp. και *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα στα πρώτα δύο πουλιά που πέθαναν, νεκροτομήθηκαν και πήγματα αίματος διαπιστώθηκαν στα τυφλά τους έντερα. Ο εντερικός σωλήνας των πουλιών αυτών εξετάστηκε για παρουσία ωοκύστεων *Eimeria* spp. Μεγάλος αριθμός ωοκύστεων του πρωτοζώου *Eimeria tenella* παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στα δείγματα των εξεταζόμενων τυφλών εντέρων. Ο εντερικός σωλήνας των νεκρών πουλιών επίσης εξετάστηκε για *Campylobacter jejuni*, για να διαπιστωθεί αν υπήρχε μικτή μόλυνση (mixed infection).

Την 28^η και 29^η ημέρα της εκτροφής, κοκκιδιοστατικό κτηνιατρικό φαρμακευτικό προϊόν προστέθηκε στο πόσιμο νερό των ορνιθίων του πειράματος για τον έλεγχο και τη θεραπεία της κοκκιδίωσης (έναντι της *Eimeria tenella*). Χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Baycox® oral solution 2.5%, με δραστικό συστατικό Tortazuril 25mg/ml (σε δόση 1lit / 1000 lit πόσιμου νερού για 48 ώρες). Από την 28^η έως την 32^η ημέρα της εκτροφής, διαπιστώθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων στα εξεταζόμενα ορνίθια (11 από τους συνολικά 15 θανάτους σε ολόκληρη την εκτροφή), ενώ το σκορ διάρροιών κυμάνθηκε μεταξύ 2 και 3 (μέσης έντασης και μεγάλης έντασης). Ωστόσο ο αριθμός των πουλιών με αιμορραγική διάρροια σε όλα τα κελιά σταδιακά μειώθηκε μετά τη χορήγηση του αντικοκκιδιακού κτηνιατρικού φαρμάκου. Για το υπόλοιπο της εκτροφής, οι ρυθμοί ανάπτυξης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά (θεωρήθηκαν εντός

φυσιολογικού πλαισίου) και κανένα άλλο κλινικό σύμπτωμα ασθένειας δεν παρατηρήθηκε.

Από την ημέρα της μόλυνσης, το σκορ των διαρροιών ελέγχονταν στα κελιά σε ημερήσια βάση. Μεταξύ 26^{ης} και 29^{ης} ημέρας, διάρροια διαφορετικής σοβαρότητας και έντασης παρατηρήθηκε σχεδόν στο 50% των πουλιών και των τεσσάρων ομάδων (T1 –T4). Το σκορ των διαρροιών (diarrhea score) για το παραπάνω χρονικό διάστημα κυμαίνονταν κυρίως μεταξύ 1 και 2, χωρίς να αποκλείεται σε πολύ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης και το σκορ 3 (0 = απουσία διάρροιας, 1 = μικρής έντασης, υδαρής διάρροια, 2 = μέσης έντασης με λίγο αίμα στα κόπρανα, 3 = μεγάλης έντασης με αιμορραγικά κόπρανα). Αν και η διάρροια εμφανίστηκε ταυτόχρονα σε όλα τα κελιά και των τεσσάρων ομάδων, κλινικά ήταν ελαφρώς λιγότερο σοβαρή (όπως διαπιστώθηκε από τον έλεγχο του σκορ) στην ομάδα T4 (περιέχονταν στην υψηλότερη συγκέντρωση το εξεταζόμενο διατροφικό προσθετικό - 0,20g TYPLEX® Chelate/kg τροφής).

Την 25^η ημέρα της εκτροφής (5 ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση με φυσικώς μολυσμένη από *C. jejuni* στρωμή που διασκορπίστηκε ομοιόμορφα γύρω από τις ταΐστρες στο δάπεδο των κελιών) λήφθηκαν δείγματα στρωμνής από όλα τα κελιά, τα οποία ανευρέθηκαν θετικά στο *C. jejuni* (απομόνωση και ταυτοποίηση). Όλα τα κελιά ήταν μολυσμένα με το μικροοργανισμό, οι πληθυσμοί του οποίου ήταν ομοιόμορφα κατανομημένοι μεταξύ των κελιών. Στην ομάδα T4 (με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση TYPLEX® Chelate που προστέθηκε στην τροφή, 0,20 g/kg) το φορτίο του μικροοργανισμού ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερο συγκριτικά με τις άλλες ομάδες T1 – T3 (6,56 log₁₀ CFU/g έναντι 8,07 log₁₀ CFU/g, 7,77 log₁₀ CFU/g και 8,91 log₁₀ CFU/g αντίστοιχα). Στο τέλος της εκτροφής (42^η ημέρα) δε διαπιστώθηκε το ίδιο, δηλαδή οι διαφορές του πληθυσμού του καμπυλοβακτηριδίου στη στρωμή μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων (T1 - T4) δεν ήταν αξιοσημείωτα σημαντικές. Παρόλα αυτά, στην ομάδα T4 με την υψηλότερη συγκέντρωση TYPLEX® Chelate (0,20 g/kg τροφής) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν μειωμένος σε σχέση με τις άλλες ομάδες (T1 – T3, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του TYPLEX® Chelate στην τροφή). Αξίζει να αναφερθεί ότι στη στρωμή κανενός από τα εξεταζόμενα κελιά, ο

πληθυσμός του *Campylobacter jejuni* δεν ήταν αρνητικός ούτε την 25^η ούτε την 42^η της εκτροφής.

Σε ότι αφορά τα δείγματα των τυφλών εντέρων των 144 ορνιθίων που νεκροτομήθηκαν την 42^η ημέρα, το φορτίο του *C. jejuni* στην ομάδα T4 (με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση χηλικού σιδήρου) ήταν αξιοσημείωτα μικρότερο σε σχέση με τις άλλες ομάδες (T1 – T3). Επομένως προκύπτει ότι το προσθετικό TYPLEX[®] Chelate, στη μέγιστη δόση που εφαρμόστηκε 0,20 g/kg τροφής, μείωσε σημαντικά το φορτίο του καμπυλοβακτηριδίου στα τυφλά έντερα των εξεταζόμενων ορνιθίων κατά 2 log₁₀ CFU/g, συγκριτικά με την ομάδα T1 Control (p=0.004). Κανένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα των τυφλών εντέρων την 42^η ημέρα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όλα τα πουλιά εκτέθηκαν στην αρχική πειραματική μόλυνση της 20^{ης} ημέρας στον ίδιο περίπου βαθμό.

Σχετικά με την παρουσία διαρροιών στη στρωμή των κελιών την τελευταία ημέρα της εκτροφής, διαπιστώθηκε ότι μόνο σε 1 από τα 6 κελιά της ομάδας T4 (TYPLEX[®] Chelate - 0,20g/kg τροφής) παρατηρήθηκε διάρροια, ενώ στην ομάδα T1 Control (χωρίς TYPLEX[®] Chelate στην τροφή), η αναλογία ήταν κατά πολύ υψηλότερη (σε 5 από τα 6 κελιά παρατηρήθηκε διάρροια). Το ποσοστό παρουσίας διάρροιας στη στρωμή των κελιών για την ομάδα T4 υπολογίστηκε στο 17%, όταν για την ομάδα T1 Control κυμάνθηκε στο 83%. Επομένως προέκυψε ότι το TYPLEX[®] Chelate στην τροφή στην υψηλότερη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε επέδρασε ευεργετικά, μειώνοντας το ποσοστό εμφάνισης διαρροιών στο τέλος της εκτροφής. Το ίδιο αποδείχτηκε και από τα παθολογοανατομικά ευρήματα του εντερικού σωλήνα των 144 νεκροτομηθέντων κοτόπουλων. Δηλαδή, τα ποσοστά των φυσιολογικών ευρημάτων αυξάνονταν, όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του TYPLEX[®] Chelate στην τροφή. Έτσι στην ομάδα T4 (TYPLEX[®] Chelate 0,20 g/kg τροφής) το ποσοστό των κοτόπουλων με φυσιολογικό εντερικό σύστημα άγγιξε το 80,6%, ενώ στην ομάδα T1 Control αντιστοιχούσε ο μικρότερος αριθμός ορνιθίων με φυσιολογικό εντερικό σύστημα (ποσοστό 19,4%). Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι τα χαμηλότερα ποσοστά ευρημάτων κοκκιδίωσης και αιμορραγικής διάρροιας αντιστοιχούσαν στα νεκροτομηθέντα ορνίθια της ομάδας T4 με την υψηλότερη

συγκέντρωση TYPLEX® Chelate στην τροφή (11,1% και 5,6% για την ομάδα T4 έναντι 25,0% και 22,2% για την ομάδα T1 Control αντίστοιχα).

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, μη αναμενόμενη εκδήλωση κοκκιδίωσης παρατηρήθηκε, λόγω απουσίας κοκκιδιοστατικού. Τα συμπτώματα των ορνιθίων (αιμορραγική διάρροια) και ο ακολουθούμενος έλεγχος (νεκροτομική εξέταση και παρατήρηση εντερικών επιχρισμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) οδήγησαν στο συμπέρασμα μόλυνσης από το παράσιτο *Eimeria tenella* ως κύριο παθογόνο. Διαπιστώθηκε ότι οι ομάδες των κελιών, στις οποίες χορηγούνταν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις χηλικής μορφής σιδήρου (T4 και T3) είχαν χαμηλότερο σκορ διαρροιών και μικρότερα ποσοστά μη φυσιολογικού εντερικού συστήματος με αιμορραγικό περιεχόμενο (κατά τον νεκροτομικό έλεγχο στο τέλος της εκτροφής). Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδεικνύει ευεργετική επίδραση του χορηγούμενου προσθετικού στην τροφή έναντι του εντεροπαθογόνου παρασίτου, με ενδεχόμενο μηχανισμό δράσης που εμπλέκει την παραγωγή κυτοκινών από το ανοσοποιητικό σύστημα του μολυσμένου από κοκκίδια κοτόπουλου, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση μακροφάγων κυττάρων, τα προϊόντα (νιτρικά οξείδια) των οποίων με ισχυρή οξειδωτική δράση αντιδρούν με τα σιδηρούχα συστατικά του προσθετικού, καθιστώντας τα «τοξικά» για το παράσιτο (Allen 1997; Skoufos et al, 2019).

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, το προϊόν που προστέθηκε στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,02 g/kg, 0,05 g/Kg και 0,2 g/Kg τροφής) ήταν το TYPLEX® Chelate, ένα εξειδικευμένο σύμπλοκο «χηλικής μορφής σιδήρου συνδεδεμένου με το αμινοξύ L-tyrosine», που έχει χημική ονομασία «Iron, tris(L-tyrosinato-κN,κO^α) και μοριακό τύπο C₂₇H₃₀FeN₃O₉. Περιέχει κατόπιν προσδιορισμού, κατά ελάχιστο 82% συνολική τυροσίνη, 8.0% σίδηρο, 6.0% συνολικό άζωτο και μέγιστη περιεκτικότητα σε νερό 3.5% (EFSA 2019). Η L - Tyrosine (4 - hydroxyphenylalanine) είναι ένα αμινοξύ απαραίτητο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Chinevere et al, 2002; NCBI 2017). Είναι ευρύτατα διαδεδομένη στο φυσικό περιβάλλον και στις ζωικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος του κοτόπουλου. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εγκριθεί η χρήση της L-τυροσίνης ως προσθετικό στη διατροφή και μπορεί να προστεθεί στα σιτηρέσια των ζώων σε ποσοστό 0,5%, που είναι

ισοδύναμο με 5,0 g/Kg τροφής (EFSA 2013). Στην παρούσα πειραματική μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη χηλικής μορφής σιδηρούχου τυροσίνης (ferric tyrosine chelate) στα 0,20 g/Kg τροφής (ομάδα T4), είχε σαν αποτέλεσμα να βελτιώνει το δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι μπορεί να είναι αποτελεσματική στη βελτίωση των ζωοτεχνικών αποδόσεων των κοτόπουλων, αν και σημαντικές διαφορές στη μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής μεταξύ των τεσσάρων ομάδων (T1 – T4) δεν παρατηρήθηκαν.

Η αποτελεσματικότητα της χηλικής μορφής σιδηρούχου τυροσίνης ως προσθετικό στη διατροφή των κρεοπαραγωγών ορνιθίων για τον βιο – έλεγχο του *Campylobacter jejuni* έχει αποδειχτεί και σε άλλες μελέτες (Khattak et al, 2018; Currie et al, 2018). Στη μία που έλαβε χώρα στη Σκωτία, διαπιστώθηκε ότι το TYPLEX® Chelate ως πρωτοποριακό μη – αντιβιοτικής φύσεως προσθετικό στην τροφή των κοτόπουλων μπορεί να μειώσει τον επιπολασμό του μικροοργανισμού σε επίπεδο εκτροφής μέσω τεσσάρων διαφορετικών μηχανισμών: εμποδίζοντας το *C. jejuni* να σχηματίζει βιοϋμένια (biofilms), βελτιώνοντας τις ζωοτεχνικές αποδόσεις των ορνιθίων (μέση αύξηση σωματικού βάρους, μέση πρόσληψη τροφής και δείκτη μετατρεψιμότητας), μειώνοντας τον πληθυσμό του μικροοργανισμού και αυξάνοντας τη συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFA - volatile fatty acids) στο τυφλό έντερο των εξεταζόμενων ορνιθίων.

Συγκεκριμένα τα βιοϋμένια είναι συσσωματώματα μικροοργανισμών με περίβλημα (ECM – extracellular matrix) από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια, τα οποία προσκολλώνται σε βιολογικές αλλά και μη – βιοτικές επιφάνειες. Τροφιμογενή βακτηριακά παθογόνα συμπεριλαμβανομένου του *C. jejuni* είναι δυνατό να σχηματίσουν βιοϋμένια ή να ενσωματωθούν σε ήδη προσχηματισμένα (Stoodley et al, 2004; Kalmokoff et al, 2006;). In vitro αποδείχτηκε ότι το TYPLEX® Chelate είχε ανασταλτική επίδραση στην ικανότητα του καμπυλοβακτηριδίου να σχηματίζει αυτού του τύπου τα συσσωματώματα. Επιπλέον προσθήκη 0,20 g/Kg τροφής σε πειραματικό σχεδιασμό παρόμοιου πρωτοκόλλου με της παρούσας εργασίας, αύξησε κατά 19,6% τη μέση αύξηση σωματικού βάρους (AWG) και βελτίωσε κατά 5,7% το δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) στην ομάδα T4 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου T1. Επίσης στην μέγιστη χορηγούμενη συγκέντρωση στην τροφή (0,20 g/Kg) περιόρισε κατά 2,1 log₁₀ CFU/g τον πληθυσμό

του *C. jejuni* στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων της ομάδας T4 στο τέλος της εκτροφής. Το TYPLEX® Chelate αποδείχτηκε αποτελεσματικό και στον περιορισμό του *E. coli*. Τέλος η χηλική μορφή σιδηρούχου τυροσίνης αύξησε τη συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (οξικό, προπιονικό, n-βουτυρικό, ισο-βουτυρικό οξύ) στο τυφλό έντερο των κοτόπουλων των ομάδων T3 και T4 (Khattak et al, 2018). Είναι γνωστό ότι τα οξέα αυτά αποτελούν μηχανισμό ελέγχου των Enterobacteriaceae (gram – αρνητικά βακτήρια) στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα, ενώ έχει αναφερθεί ότι ο αποικισμός του *Campylobacter* σχετίζεται με μείωση του βουτυρικού, ισο-βουτυρικού, βαλεριακού και ισο-βαλεριακού οξέως στο τυφλό έντερο των ορνιθίων (Van Der et al, 2000; Awad et al, 2016).

Σε άλλη in vivo μελέτη αξιολόγησης της χηλικής μορφής σιδηρούχου τυροσίνης ως διατροφική στρατηγική βιο – ελέγχου του καμπυλοβακτηριδίου στα κοτόπουλα, διαπιστώθηκαν τα εξής: σε μικροβιολογικές αναλύσεις στο τέλος του πειραματικού σχεδιασμού (42^η ημέρα) υπήρξε περιορισμός του *Campylobacter spp.* της τάξης των $2 - 3 \log_{10}$ CFU/g και του *E. coli* της τάξης του $1 \log_{10}$ CFU/g σε δείγματα τυφλών εντέρων ορνιθίων που λάμβαναν το διατροφικό προσθετικό συγκριτικά με τη ομάδα ελέγχου. Επίσης παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή αξιοσημείωτη ευεργετική επίδραση στους ζωοτεχνικούς δείκτες (bird performance) κυρίως σε ότι αφορά την αύξηση του σωματικού βάρους, οδηγώντας και σε αυτή την περίπτωση στο συμπέρασμα ότι η χηλική μορφή σιδηρούχου τυροσίνης ως εναλλακτικό διατροφικό προσθετικό μειώνει τον κίνδυνο μεταφοράς του μικροοργανισμού από το σμήνος των κρεοπαραγωγών ορνιθίων στη διατροφική αλυσίδα (Currie et al, 2018).

Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρία του TYPLEX® Chelate, η χηλική σιδηρούχος τυροσίνη είναι ένα οργανικό μόριο σχεδιασμένο με στόχο να καταπολεμά παθογόνα βακτήρια, όπως το *Campylobacter jejuni*, τη *Salmonella spp.*, το *E. coli* και το *Clostridium perfringens*. Πρόκειται για ένα πρωτοποριακό μη αντιμικροβιακής προέλευσης διατροφικό προσθετικό. Η βασική διαφορά του από τα αντιβιοτικά είναι ότι αυτά δεν «ξεχωρίζουν» τα ωφέλιμα από τα μη επιθυμητά βακτήρια, σε αντίθεση με τη χηλική σιδηρούχο τυροσίνη, η οποία «ειδικά στοχεύει» στα παθογόνα. Δεν τα σκοτώνει αλλά απλά τα εμποδίζει να προσκολληθούν στο γαστρεντερικό σωλήνα των κοτόπουλων. Όταν τα παθογόνα βακτήρια προσδεθούν σε μια επιφάνεια, όπως στον εντερικό βλεννογόνο, σχηματίζουν βιοϋμένια που τους δίνουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν στις θέσεις πρόσδεσης και να αποικίσουν το γαστρεντερικό σύστημα. Η

κύρια λειτουργία της χηλικής σιδηρούχου τυροσίνης είναι ότι εμποδίζει τα στελέχη του *C. jejuni* να προσκολληθούν στους εξειδικευμένους υποδοχείς του εντερικού βλεννογόνου, τους οποίους η δραστική ουσία καταλαμβάνει. Έτσι ο μικροοργανισμός παραμένει στο εντερικό περιεχόμενο και απεκκρίνεται με τα κόπρανα. Παράλληλα προτείνεται η χρήση της χηλικής σιδηρούχου τυροσίνης σε συνδυασμό με άλλα καινοτόμα διατροφικά προσθετικά, ώστε να βελτιωθεί το εντερικό μικροβίωμα μέσω της ωφέλιμης βακτηριακής μικροχλωρίδας (Akeso Biomedical News 2017).

Αξίζει να αναφερθεί ότι το διατροφικό προσθετικό συμπλήρωμα TYPLEX® Chelate (ferric tyrosine chelate) που δοκιμάστηκε τόσο στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας όσο και στους προαναφερόμενους πειραματικούς σχεδιασμούς, πήρε έγκριση από την Ευρωπαϊκή Ένωση για χρήση σε κρεοπαραγωγά ορνίθια στη μέγιστη δόση των 200 mg/Kg πλήρους τροφής το έτος 2019. Η απόφαση αυτή ισχύει επιπλέον για ορνίθια εκτρεφόμενα για αυγοπαραγωγή, επεκτείνεται σε γαλοπούλες και άλλα είδη πουλερικών που προορίζονται για πάχυνση ή για αυγοπαραγωγή ή για αναπαραγωγή (EFSA 2019). Σύμφωνα με την επιστημονική γνωμοδότηση (scientific opinion) της Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA Panel) δεν αναμένεται καμία ανησυχία για την ασφάλεια του καταναλωτή από τη χρήση του συγκεκριμένου προσθετικού στην πτηνοτροφεία. Επιπλέον επισημαίνεται ότι απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση του από το χειριστή (ερεθιστικό για δέρμα, μάτια, βλεννογόνους, επικίνδυνο σε περίπτωση εισπνοής), δεν εγκυμονεί κινδύνους στην υγεία των ειδών των ζώων για τα οποία προορίζεται όταν χορηγείται σύμφωνα με τις προτεινόμενες συνθήκες εφαρμογής και είναι ασφαλές για το περιβάλλον. Σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητά του, η Επιτροπή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο διατροφικό προσθετικό χορηγούμενο στην ελάχιστη συνιστώμενη δοσολογία (20 mg/Kg τροφής) στα κρεοπαραγωγά ορνίθια μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση των ζωοτεχνικών τους παραμέτρων και να μειώσει το φορτίο του *Campylobacter spp.* στο τυφλό τους έντερο τουλάχιστον κατά 1 log₁₀ units, γεγονός με ευεργετική επίδραση στον περιορισμό του κινδύνου εκδήλωσης καμπυλοβακτηριδίου στον άνθρωπο.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής είναι:

- Οι ζωοτεχνικές αποδόσεις των ορνιθίων δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων εξεταζόμενων ομάδων (T1 – T4). Επομένως το TYPLEX® Chelate (χηλική μορφή σιδηρούχου τυροσίνης) δεν επηρέασε ευεργετικά αλλά ούτε και αρνητικά το μέσο όρο σωματικού βάρους, τη μέση ημερήσια αύξηση, τη μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής και το δείκτη μετατρεψιμότητας.
- Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας σε όλη τη διάρκεια της εκτροφής (3,9%) κυμάνθηκε εντός φυσιολογικών και αναμενόμενων ορίων παρά τη μόλυνση με το παράσιτο *Eimeria tenella*. Στην ομάδα T4, το TYPLEX® Chelate που χορηγήθηκε στη δόση των 0,20 g/Kg τροφής, μείωσε το ποσοστό θνητότητας και άσκησε θετική επίδραση στα αποτελέσματα της κοκκιδίωσης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες.
- Η χηλική μορφή σιδηρούχου τυροσίνης άσκησε ανασταλτική επίδραση στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων από το *Campylobacter jejuni*.
- Ο πληθυσμός του *Campylobacter jejuni* στη στρωμνή την 25^η ημέρα της εκτροφής ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα T4 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου T1.
- Το TYPLEX® Chelate (στη δόση των 0,20 g/Kg τροφής) μείωσε σημαντικά το φορτίο του *Campylobacter jejuni* στο τυφλό έντερο των ορνιθίων της ομάδας T4 (42^η ημέρα της εκτροφής) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου T1, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο το φορτίο του μικροοργανισμού που εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα.

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Campylobacter jejuni* είναι παγκοσμίως αναγνωρισμένο ως το κυριότερο αίτιο διαρροϊκής, βακτηριακής αιτιολογίας τροφιμογενές νόσημα. Η συχνότητα εμφάνισης της καμπυλοβακτηριδίωσης έχει αυξηθεί τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες κατά τη διάρκεια των τελευταίων δέκα ετών. Η δραματική αυτή αύξηση σε Β. Αμερική, Ευρώπη και Αυστραλία είναι πλέον ανησυχητική, ενώ δεδομένα από Ασία, Αφρική και Μέση Ανατολή αποδεικνύουν ότι το νόσημα σε αυτές τις περιοχές έχει ενδημικό χαρακτήρα, κυρίως στα παιδιά.

Η κατανάλωση και ο χειρισμός πλημμελώς μαγειρεμένου ή ωμού ορνίθιου κρέατος είναι η σημαντικότερη πηγή της ανθρώπινης καμπυλοβακτηριδίωσης. Τα κοτόπουλα μπορεί να είναι ασυμπτωματικά και υγιή, ενώ μεγάλος αριθμός *Campylobacter* αποικίζει τον εντερικό τους σωλήνα και κυρίως το τυφλό έντερο. Ο έλεγχος του μικροοργανισμού σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων είναι πολύ σημαντικός για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης του νοσήματος στον άνθρωπο. Στρατηγικές μείωσης ή εξάλειψης του αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα των κοτόπουλων περιλαμβάνουν μέτρα υγιεινής και βιοασφάλειας, εμβολιασμό, θεραπευτικές αγωγές στο πόσιμο νερό και χορήγηση διατροφικών προσθετικών. Παρά τις προσπάθειες, η καμπυλοβακτηριδίωση παραμένει σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα ενός πρωτοποριακού διατροφικού προσθετικού (χηλική μορφή σιδηρούχου τυροσίνης) σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, τα οποία με φυσικό τρόπο μολύνθηκαν από το *Campylobacter jejuni*. Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό αντικείμενα μελέτης είναι: ζωοτεχνικοί δείκτες (μέση ημερήσια αύξηση, μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής, δείκτης μετατρεψιμότητας), επίπεδο υγείας των εξεταζόμενων ορνιθίων, σκορ διαρροιών, παθολογοανατομικά ευρήματα του εντερικού συστήματος, μικροβιολογικές μετρήσεις του *C. jejuni* σε δείγματα στρωμνής και τυφλών εντέρων κοτόπουλων.

Λέξεις – κλειδιά: *Campylobacter jejuni*, χηλική σιδηρούχος τυροσίνη, κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, ζωοτεχνικοί δείκτες, σκορ διαρροιών, μικροβιολογικές μετρήσεις

10. ABSTRACT

Campylobacter jejuni is well recognized as the leading cause of bacterial foodborne diarrheal disease worldwide. The incidence and prevalence of campylobacteriosis have increased in both developed and developing countries over the last 10 years. The dramatic increase in North America, Europe and Australia is alarming and data from Asia, Africa and the Middle East indicate that campylobacteriosis is endemic in these areas, especially in children.

The eating and handling of improper cooked or raw broiler meat has been shown to be the most important source of human campylobacteriosis. Chickens can be asymptomatic and healthy when harboring high numbers of campylobacter in the intestinal content and especially in the ceasa. The control of *Campylobacter* in poultry seems crucial for the reduction of the disease in humans. Strategies to limit or eliminate gastrointestinal colonization include hygiene and biosecurity practices, vaccination, treatment of drinking water and use of feed additives. In spite of these endeavours, campylobacteriosis remains today a very serious health problem.

The aim of the present study is to evaluate the efficacy of a novel dietary product (ferric tyrosine chelate) in broilers exposed to natural *Campylobacter jejuni* challenge. Main study objects in this trial are: performance parameters (average daily gain, average daily feed intake, feed conversion ratio), health status of examined broilers, diarrhea score, intestinal health, microbiological analysis (counts of *C. jejuni* in samples of litter and ceasa).

Keywords: *Campylobacter jejuni*, ferric tyrosine chelate, broilers, performance parameters, diarrhea score, microbiological counts

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**11.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

- ΚΕΕΛΠΝΟ 2014. Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, Λοιμώξεις από *Campylobacter* spp, Ενημερωτικό Δελτίο, Ιούνιος 2014, Αρ. 41 / Έτος 4^ο, ISSN: 1792-9016, Διαθέσιμο στο : https://eody.gov.gr/Portals/0/Newsletter/2014/keelpno_newsletter_june-2014_gr.pdf
- Λαζου Θ. 2014. Διερεύνηση της συχνότητας παρουσίας και της δυνατότητας επιβίωσης των *Campylobacter* spp. στο κρέας της αίγας και του προβάτου. Διδακτορική Διατριβή, 2014. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών. Διαθέσιμο στο <http://hdl.handle.net/10442/hedi/40088>
- ΥΠΑΑΤ 2018. Υπουργεία Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Γενική Διεύθυνση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής και Κτηνιατρικής. Διεύθυνση Υγείας των ζώων. Μέτρα βιοασφάλειας για τη γρίπη των πτηνών. Διαθέσιμο στο: http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/poulerika/metra_bioasfalei_a_pthnon200217_new.pdf
- ΥΠΠΙΑΤ 2016. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης. Έκθεση αναφοράς των αποτελεσμάτων από τον πρώτο χρόνο του προγράμματος παρακολούθησης της αντοχής των ζωνοσογόνων και συμβιωτικών βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες, σύμφωνα με την υπ. Αριθ. 1571/72152 ΚΥΑ (ΦΕΚ Β'1464). Διαθέσιμο στο: http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/ktiniatrika_Farmaka/anafo-ra_AMR_2014.pdf

11.2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Akeso Biomedical News 2017.
https://www.akesobiomedical.com/News/AkesoAnimalPharmNews_170606.html
- Allain, V., Chemaly, M., Laisney, M.J., Rouxel, S., Quesne, S. and 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, 452–459.
- Allen, P.C. 1997. Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poultry Sci* 76, 810–813.
- 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.* 6:7097. 10.4081/ijfs.2017.7097.
- Annamalai, T., Pina-Mimbela, R., Kumar, A., Binjawadagi, B., Liu, Z., Renukaradhy, G. J., & Rajashekara, G., 2013. Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poultry Science*, 92 (8), 2201–2211.
<https://doi.org/10.3382/ps.2012-03004>
- Ansari-Lari, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., Abdollahi, M., and Berizi, E., 2011. Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.003>
- Arsi, K., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Kollanoor-Johny, A., Fanatico, A.C., Blore, P.J., et al., 2014. The efficacy of the natural plant extracts, thymol and carvacrol against *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *J. Food Saf.* 34, 321–325. <https://doi.org/10.1111/jfs.12129>
- Arsi, K., Donoghue, A.M., Woo-Ming, A., Blore, P.J., and Donoghue D.J., 2015. The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. 2015 Poultry Science Association Inc. 2015. *The Journal of Applied Poultry Research*, Volume 24, Issue 3, September, 2015, Pages 327–334, <https://doi.org/10.3382/japr/pfv032>

- Atterbury RJ, Dillon E, Swift C, Connerton PL, Frost JA, Dodd CE, Rees CE, Connerton IF., 2005. Correlation of Campylobacter bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. Appl Environ Microbiol 71:4885–4887. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4885-4887.2005>.
- Awad, W.A., Dublec, F., Hess, C., Dublec, K., Khayal, B., Aschenbach, J.R., and Hess, M., 2016. Campylobacter jejuni colonization promotes the translocation of Escherichia coli to extraintestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. Poult. Sci. 95:2259–2265. <https://doi.org/10.3382/ps/pew151>
- Baffoni, L., Gaggia, F., Di Gioia, D., Santini, C., Mogna, L. and Biavati, B., 2012. A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of C. jejuni along the poultry food chain. Int J Food Microbiol 157, 156–161.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Garofolo, G., Di Serafino, G., Buglione, E., Di Giannatale, E., & Di Gioia, D., 2017. Evidence of Campylobacter jejuni reduction in broilers with early synbiotic administration. International Journal of Food Microbiology, 251, 41 –47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.001>
- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., & Hald, B., 2013. Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced Campylobacter infection. Emerging Infectious Diseases, 19(3), 425–430. <https://doi.org/10.3201/eid1903.111593>
- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., and Kang, S. C., 2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. Food Res. Int. 45, 722–734. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.052
- Balamurugan S, Nattress FM, Baker LP, Dilts BD, 2011.. Survival of Campylobacter jejuni on beef and pork under vacuum packaged and retail storage conditions: examination of the role of natural meat microflora on C. jejuni survival. Food Microbiol 28(5), 1003-1010.
- Basmacioğlu Malayoğlu, H., Baysal, S., Misirlioğlu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., and Turan, N., 2010. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. Br.Poult.Sci.51,67–80. <https://doi.org/10.1080/00071660903573702>

- Battersby, T., Whyte, P., & Bolton, D. J., 2016. The pattern of Campylobacter contamination on broiler farms; external and internal sources. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1108–1118. <https://doi.org/10.1111/jam.13066>
- Ben Lagha, A., Haas B., Gottschalk M., and Daniel Grenier D., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary research*. 48:22. DOI 10.1186/s13567-017-0425-6
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., and Reyes, J.E., 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the cross linking degree and oregano essential oil concentration. *J. Food Eng.* 110, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>
- Borck Hog B., Sommer H. M., Larsen L.S., Sorensen A.I., David B., Hofshagen M., et al.. 2016. Farm specific risk factors for Campylobacter colonisation in Danish and Norwegian broilers. *Prev. Vet. Med.* 130, pp. 137–145. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.04.002.
- Boysen L., Rosenquist H., Larsson J. T., Nielsen E. M., Sørensen G., Nordentoft S., et al., 2014. Source attribution of human campylobacteriosis in Denmark. *Epidemiol. Infect.* 142 1599–1608. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002719>
- Boysen, L., Wechter, N. S., & Rosenquist, H., 2013. Effects of decontamination at varying contamination levels of Campylobacter jejuni on broiler meat. *Poultry Science*, 92, 1425–1429. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02889>.
- Buckley, A. M., Wang, J., Hudson, D. L., Grant, A. J., Jones, M. A., Maskell, D. J., & Stevens, M. P., 2010. Evaluation of live-attenuated Salmonella vaccines expressing Campylobacter antigens for control of C. jejuni in poultry. *Vaccine*, 28(4), 1094–1105. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.018>
- Bügener, E. M., Casteel, M., Kump, A. W. S., & Klein, G., 2014. Effect of electrolyzed oxidizing water on reducing Campylobacter spp. in broiler chicken at primary production. *Journal of Food Safety and Food Quality*, 65(1), 4–9. <https://doi.org/10.2376/0003-925X-65-4>
- Byrd JA, Hargis BM, Caldwell DJ, Bailey RH, Herron KL, McReynolds JL, Brewer RL, Anderson RC, Bischoff KM, Callaway TR, Kubena LF. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter

- feed withdrawal on Salmonella and Campylobacter contamination of broilers. Poult Sci 803:278–83.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., and Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems. –A review. Food Control 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
 - Carron, M., Chang, Y.M., Momanyi, K., Akoko, J., Kiiru, J., Bettridge, J., Chaloner, G., Rusthon, J., et al, 2018. *Campylobacter*, a zoonotic pathogen of global importance: Prevalence and risk factors in the fast-evolving chicken meat system of Nairobi, Kenya. Published: August 13, 2018. PLoS Negl Trop Dis 12(8): e0006658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006658>.
 - CDC 2018. Centers for Disease and Control Prevention. Multistate outbreak of Multidrug resistant Campylobacter infections linked to contact with pet store puppies. Διαθέσιμο στο: <https://www.cdc.gov/campylobacter/outbreaks/puppies-9-17/index.html>
 - CDC 2018. Centers for Disease Control and Prevention. Campylobacter (Campylobacteriosis). <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>
 - Cean, A., Stef, L., Simiz, E., Julean, C., Dumitrescu, G., Vasile, A., Pet, E., Drinceanu, D. et al., 2015. Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing Campylobacter jejuni colonization of poultry. Foodborne Pathog Dis 12, 122–130.
 - Cerda-Cuellar, M., Laureano, L., Ayats, T., Corujo, A., Hald, B., & Dolz, R., 2015. Efficacy of biosecurity measures in Spanish broiler farms to prevent thermophilic Campylobacter colonization. In Proceedings of the 18th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (pp. 89). Rotorua, New Zealand.
 - Chapman, B., Otten, A., Fazil, A., Ernst, N., and Smith, B. A. (2016). A review of quantitative microbial risk assessment and consumer process models for Campylobacter in broiler chickens. Microb. Risk Anal. 2, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2016.07.001m>
 - Chen L., Geys H., Cawthraw S., Havelaar A., and Teunis P., 2006. Dose response for infectivity of several strains of Campylobacter jejuni in chickens. Risk Anal. 26, 1613–1621. doi:10.1111/j.1539-6924.2006.00850.x

- Chiang, S.S. and Pan, T.M., 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 903–16. Corcoran BM, Stanton
- Chinevere, T.D., Sawyer, R.D., Creer, A.R., Conlee, R.K., Parcell, A.C., 2002. Effects of L-tyrosine and carbohydrate ingestion on endurance exercise performance. *J. Appl. Physiol.* 93, 1590–1597
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00625.2001>
- Chintoan-Uta, C., Cassady-Cain, R. L., & Stevens, M. P., 2016. Evaluation of flagellum-related proteins FliD and FspA as subunit vaccines against *Campylobacter jejuni* colonisation in chickens. *Vaccine*, 34(15), 1739–1743.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.052>
- Chowdhury S, Sandberg M, Themudo GE & Ersbøll AK, 2012. Risk factors for *Campylobacter* infection in Danish broiler chickens. *Poultry Sci* 91:2701-2709.
- Clark, J.D., Oakes, R.D., Redhead, K., Crouch, C.F., Francis, M.J., Tomley, F.M. and Blake, D.P., 2012. *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine* 30, 2683–2688.
- Connerton, P. L., Richards, P. J., Lafontaine, G. M., O’Kane, P. M., Ghaffar, N., Cummings, N. J., et al., 2018. The effect of the timing of exposure to *Campylobacter jejuni* on the gut microbiome and inflammatory responses of broiler chickens. *Microbiome* 6: 88. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0477-5>
- Currie, D., Green, M., Dufailu, O.A., Pitoulis, M., Soultanas, P., McCartney, E., Lester, H., Van Den Eede, L., Apajalathi, J., Mahdavi, J., 2018. Dietary supplementation with ferric tyrosine improves zootechnical performance and reduces caecal *Campylobacter* spp. load in broilers. *Br. Poult. Sci.*
<https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1507015>.
- Dale, E.L., Nolan, S.P., Berghaus, R.D., & Hofacre, C.L., 2015. On farm prevention of *Campylobacter* and *Salmonella*: Lessons learned from basic biosecurity interventions. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(2), 222–232. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv016>

- Davis, L., and DiRita, V., 2017. Growth and laboratory maintenance of *Campylobacter jejuni*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 10, 8A.1.1–8A.1.7. doi: 10.1002/ 9780471729259.mc08a01s10.
- De Sousa, J. P., de Araújo Torres, R., de Azerêdo, G. A., Figueiredo, R. C., da Silva Vasconcelos, M. A., and de Souza, E. L., 2012. Carvacrol and 1, 8 cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 9–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.008>
- de Zoete MR, van Putten JPM, Wagenaar JA. 2007. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. *Vaccine* 25:5548–57.
- Diaz-Sanchez, S., D’Souza, D., Biswas, D., and Hanning, I., 2015. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poult. Sci.* 94, 1419–1430. <https://doi.org/10.3382/ps/pev014>
- Dittoe, D.K., Ricke, S.C., and Kiess, A.S., 2018. Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease Article Review. *Frontiers in Veterinary Science*. September 2018, Volume 5, Article 216 <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00216>
- Djennad A., Lo Iacono G., Sarran C., Lane C., Elson R., Höser C., Lake I.R., Colón-González F.J., Kovats S., et al, 2019. Seasonality and effects of weather on *Campylobacter* infections. *BMC Infectious Diseases*. 2019, 19:255. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3840-7> [Πρόσβαση στις 09/07/2019].
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
- Doorduyn Y, Van den Brandhof W, Van Duynhoven Y, Breukink B, Wagenaar J & Van Pelt W., 2010. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidem and Infect* 138:1391–1404.
- Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., and Domingues, F. C., 2016. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control

- Campylobacter spp. Food Control 61, 115–122. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.09.033
- EFSA 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 Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). European Food Safety Authority. EFSA Journal 2011; 9(4):2105. Διαθέσιμο στο: <file:///D:/20-5-2019/EFSA%20BROILER%20MEAT%20PRODUCTION%202011.pdf>
 - EFSA 2013. EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 11; EFSA Journal 2013; 11(4):3129.
 - EFSA 2013. Scientific opinion on the safety and efficacy of L-tyrosine for all animal species. EFSA Journal 2013;11(7):3310. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3310>
 - EFSA 2014. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014;12(2):3547.
 - EFSA 2015. International Conference on PREVENTION AND CONTROL OF CAMPYLOBACTER IN THE POULTRY PRODUCTION SYSTEM, Milan, 31 August 2015. Campylobacter contamination levels in poultry meat in the EU and recommended reduction measures. Διαθέσιμο στο: http://www.izs.it/IZS/Engine/RAServeFile.php/f/Convegno/Campylobacter_Messens_EFSA_31_8_2015.pdf
 - EFSA 2017. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017; 15(12): 5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
 - EFSA 2019. Safety and efficacy of TYFER TM (ferric tyrosine chelate) as a zootechnical feed additive for chickens, turkeys and minor poultry species for fattening or reared for laying/breeding. EFSA Journal 2019; 17 (2): 5608. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5608>

- EFSA BIOHAZ Panel 2011. (EFSA Panel Biological Hazards). Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal 2011;9(4):2105, 141 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2105>
- EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. ,EFSA Journal 2018;16(12):5500, doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500. Διαθέσιμο στο: [file:///D:/15-4-2019/ECDC\)-2018-EFSA_Journal.pdf](file:///D:/15-4-2019/ECDC)-2018-EFSA_Journal.pdf)
- Ellis-Iversen, J, Ridley, A, Morris, V, Sowa, A, Harris, J, Atterbury, R, Sparks, N., Allen, V., 2012. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for Campylobacter in commercial poultry. Epidemiol Infect 140:916–924. <http://dx.doi.org/10.1017/S095026881100118X>
- El-Shibiny A, Scott A, Timms A, Metawea Y, Connerton P, Connerton I., 2009. Application of a groupie Campylobacter bacteriophage to reduce strains of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli colonizing broiler chickens. J Food Prot 72:733–740.
- Epps, S. V., Harvey, R. B., Byrd, J. A., Petrujkia, B. T., Sedej, I., Beier, R. C., et al., 2015. Comparative effect of thymol or its glucose conjugate, thymol-β-D-glucopyranoside, on Campylobacter in avian gut contents. J. Environ. Sci. Health Part B 50, 55–61. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.965634>
- Evans SJ., Sayers AR., 2000. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med. 2000 Aug 10;46(3):209-23.
- Facciola A., Riso R., Avventuroso E., Visalli G., Delia S.A., 2017. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. J Prev Med Hyg. 2017 Jun; 58(2): E79–E92. PMID: 28900347
- Facciola A., Riso R., Avventuroso E., Vissalli G., Dellia S.A., Laganà P., 2017. Campylobacter: from microbiology to prevention. Review, 2017. J PREV MED HYG 2017; 58(2): E79-E92.
- FAO 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in Animal Nutrition. Production, Impact and Regulation. Διαθέσιμο στο: <http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf> [Πρόσβαση στις 23/7/2019].

- FDA 2018. GRAS Substances (SCOGS) Database. Διαθέσιμο στο: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>
- Fischer S, Kittler S, Klein G, Glunder G. 2013. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. PLoS One 8:e78543. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078543>.
- Fitzgerald, C. 2015. *Campylobacter*. Clin. Lab. Med. 35, 289–298.
- Fitzgerald, C., and Nachamkin, I., 2011. “*Campylobacter* and *Arcobacter*,” in Manual of Clinical Microbiology, eds J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. L. Landry, and D. W. Warnock (Washington, DC: ASM Press), 885–899.
- FoodNet 2018. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018. *Weekly* / April 26, 2019 / 68(16);369–373. Διαθέσιμο στο: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6816a2.htm?s_cid=mm6816a2_w
- *Foods*. 2019 Mar; 8(3): 111. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ffoods8030111>
- Friedman, C. R., Hoekstra, R. M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., et al., 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. Clin. Infect. Dis. 38(Suppl._3),S285–S296. <https://doi.org/10.1086/381598>
- Friedrich, A., Marshall, J. C., Biggs, P. J., Midwinter, A. C., and French, N. P., 2016. Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human campylobacteriosis in the Manawatu region. New Zealand. Epidemiol. Infect. 144, 820–828.
- Ganan M, Martinez-Rodriguez AJ, Carrascosa AV, Vesterlund S, Salminen S, Satokari R., 2013. Interaction of *Campylobacter* spp. and human probiotics in chicken intestinal mucus. Zoonoses Public Health. 2013 Mar 60 (2): 141-8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01510.x
- Gaucher, M.-L., Quessy, S., Letellier, A., Arsenault, J., Boulianne, M., 2015. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut

- health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult. Sci.* 94, 1791–1801. <https://doi.org/10.3382/ps/pev142>
- Getachew T. 2016. A Review on Effects of Probiotic Supplementation in Poultry Performance and Cholesterol Levels of Egg and Meat. March 25, 2016. Review Paper. *Journal. World Poultry. Research.* 6(1): 31-36, PII: S2322455X1600006-6.
 - Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnes M, Bohm J, Schatzmayr G., 2012. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poult Sci* 91:1825–1832. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02168>.
 - Gharib Naseri, K., Rahimi, S. and Khaki, P., 2012. Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on *Campylobacter jejuni* challenged broiler chickens. *J Agric Sci Technol* 14, 1485–1496.
 - Gharst G., Oyarzabal O.A., Hussain S.K., 2013. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods, *J. Microbiol. Meth.* 95 (1), 2013, 84–92.
 - Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. doi:10.1093/jn/125.6.1401
 - Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., et al., 2017. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14:491. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
 - Gölz G., Kittler S., Malakauskas M., Alter T., 2018. Survival of *Campylobacter* in the Food Chain and the Environment. *Foodborne Pathogens.* Διαθέσιμο στο: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40588-018-0092-z>
 - Gracia, M. I., Millan, C., Sanchez, J., Guyard-Nicodeme, M., Mayot, J., Carre, Y., Medel, P., 2016. Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period: Part B. *Poultry Science*, 95(4), 886–892. <https://doi.org/10.3382/ps/pev346>

- Grant, A., Hashem, F., & Parveen, S., 2016. Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. Food Microbiology, 53, Part B, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.008>
- Guyard-Nicodème, M., Keita, A., Quesne, S., Amelot, M., Poezevara, T., Berre, B. L., Chemaly, M., 2016. Efficacy of feed additives against Campylobacter in live broilers during the entire rearing period. Poultry Science, 95(2), 298–305. <https://doi.org/10.3382/ps/pev303>
- Habib I, Berkvens D, De Zutter L, et al, 2012. Campylobacter contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. Food Microbiol 2012; 29:105–12.
- Hald B, Rahbek C, Waino M, Chriel M, Nordentoft S, Madsen M, 2016. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms, 2016. Acta Vet Scand. 2016; 58: 11. Published online 2016 Feb 3. doi: [10.1186/s13028-016-0192-9](https://doi.org/10.1186/s13028-016-0192-9)
- Hald B., Skovgard H., Pedersen K., Bunkenborg H., 2008. Influxed Insects as Vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish Broiler Houses *Poultry Science*, Volume 87, Issue 7, July 2008, Pages 1428–1434, <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00301>.
- Hald, B., Wedderkopp, A., and Madsen, M., 2000. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathol.* 29, 123–131. doi:10.1080/03079450094153.
- Han Z., Pielsticker C., Gerzova L., Rychik I., Rautenchlein S., 2016. The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in broilers. *Developmental & Comparative Immunology*. Volume 62, September 2016, Pages 58-71.
- Hannu T, Kauppi M, Tuomala M, Laaksonen I, Klemets P, Kuusi M., 2004. Reactive arthritis following an outbreak of *Campylobacter jejuni* infection. *J Rheumatol* 2004, 31:528–530.
- Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman R., Engvall, E.O., 2018. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(Suppl. 1):30–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.12870>

- Hardin, A., Crandall, P.G., and Stankus, T., 2010. Essential oils and antioxidants derived from citrus by-products in food protection and medicine: an introduction and review of recent literature. *J. Agric. Food Inf.* 11, 99–122. doi:10.1080/10496501003680680
- Hastings R., Colles F.M., McCarthy N.D., Maiden M.C., and Sheppard S.K., 2011. *Campylobacter* genotypes from poultry transportation crates indicate a source of contamination and transmission. *J. Appl. Microbiol.* 110, 266–276. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04883.x.
- Haughton, P. N., Lyng, J., Fanning, S., & Whyte, P., 2013. Potential of a commercially available water acidification product for reducing *Campylobacter* in broilers prior to slaughter. *British Poultry Science*, 54(3), 319–324. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.786806>
- Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Rasschaert G, Heyndrickx M, Pasmans F., 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol* 152:219–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.010>.
- Hermans, D., Martel, A., Van Deun, K., Verlinden, M., VanImmerseel, F., Garmyn, A., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., and 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.* 89:1144–1155.
- Hermans, D., Van Deun, K., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Pasmans, F., 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent needfor intensified fundamental research. *Vet. Microbiol.* 152, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.010>
- Hilmarsson, H., Thormar, H., Thr´ainsson, J. H., & Gunnarsson, E., 2006. Effect of glycerol monocaprates (monocaprin) on broiler chickens: An attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection. *Poultry Science*, 85(4), 588–592. <https://doi.org/10.1093/ps/85.4.588>

- Hoang KV, Stern NJ, Lin J., 2011. Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter* spp. *J Appl Microbiol* 111: 1544 – 1550. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05163.x>.
- Hovorková, P., & Skrivanová, E., 2015. Use of caprylic acid in broiler chickens: Effect on *Campylobacter jejuni*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(8), 712–718. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.1978>
- <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Huang, J.L., Yin, Y.X., Pan, Z.M., Zhang, G., Zhu, A.P., Liu, X.F. and Jiao, X.A., 2010. Intranasal immunization with chitosan/pCAGGS-flaA nanoparticles inhibits *Campylobacter jejuni* in a White Leghorn model. *J Biomed Biotechnol*, doi: 10.1155/2010/589476 (Epub ahead of print).
- Hue O, Allain V, Laisney M, Le Bouquin S, Lalande F, Petetin I, Rouxel S, Quesne S, Gloaguen P, Picherot M, Santolini J, Bougeard S, Salvat G & Chemaly M., 2011. *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol* 28:862-868.
- Humphrey S., Chaloner G., Kemmett K., Davidson N., Williams N., Kipar A., Humphrey T. and Wigley P., 2014. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio* 5, 01364–01314.
- Ica T, Caner V, Istanbulu O, Nguyen HD, Ahmed B, Call DR., 2012. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78(4), 1033-1038.
- Jamroz, D., Orda, J., Kamel, C., Wiliczekiewicz, A., Wartecki, T., and Skorupska, J., 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.* 12, 583–596 <https://doi.org/10.22358/jafs/67752/2003>
- Jang, I. S., Ko, Y. H., Kang, S. Y., and Lee, C. Y., 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134, 304–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>

- Jansen, W., Reich, F., & Klein, G., 2014. Large-scale feasibility of organic acids as a permanent preharvest intervention in drinking water of broilers and their effect on foodborne *Campylobacter* spp. before processing. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6), 1676–1687. <https://doi.org/10.1111/jam.12490>
- Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M., 2015. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015 Jul; 28(3):687-720. <https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.00006-15>
- Kalmokoff, M., P. Lanthier, T. Tremblay, M. Foss, P. Lau, G. Sanders, J. Austin, J. Kelly, and C. M. Szymanski. 2006. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 188:4312–4320 <https://doi.org/10.1128/JB.01975-05>
- Karagiannis I, Sideroglou T, Gkolfinopoulou K, Tsiouri A, Lampousaki D, Velonakis E et al, 2010.. A waterborne *Campylobacter jejuni* outbreak on a Greek island. *Epidemiol Infect* 2010, 138:1726–1734.
- Kashoma, I., Srivastava, V., Rajashekara, G., 2019. Advances in Vaccines for Controlling *Campylobacter* in Poultry, Food Safety in Poultry Meat Production, pp 191-210.
- Khattak, F., Paschalis, V., Green, M., Houdijk, J., Soultanas, P., Mahdavi, J., 2018. TYPLEX, a novel feed additive, inhibits *Campylobacter jejuni* biofilm formation and caecal colonization in broiler chicken. *Poult. Sci.* 97, 1391–1399. <https://doi.org/10.3382/ps/pex413>
- Kim, S.Ae., Jang, M.J., Kim, S.Y., Yang Y., Pavlidis, H.O., and Ricke, S.C., 2019. Potential for Prebiotics as Feed Additives to Limit Foodborne *Campylobacter* Establishment in the Poultry Gastrointestinal Tract. *Frontiers in Microbiology*. January 2019 | Volume 10 | Article 91. Review Article. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00091>
- Kittler, S., Fischer, S., Abdulmawjood, A., Gluender, G., & Klein, G., 2013. Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7525–7533. <https://doi.org/10.1128/AEM.02703-13>
- Klein, G., Jansen, W., Kittler, S., Reich, F., 2015. Mitigation strategies for *Campylobacter* spp. in broiler at pre-harvest and harvest level. *Berliner und*

- Münchener Tierärztliche Wochenschrift 128, Heft 3/4 (2015), Seiten 132 – 140. <http://vetline.de/open-access/>
- Kollanoor-Johny, A., Darre, M. J., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., and Venkitanarayanan, K., 2010. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on Salmonella Enteritidis and Campylobacter jejuni in chicken cecal contents in vitro. J. Appl. Poult. Res. 19, 237–244. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00181>
 - Koolman L, Whyte P, Bolton DJ, 2014. An investigation of broiler caecal Campylobacter counts at first and second thinning. J Appl Microbiol 2014; 117: 876-81.
 - Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol 8:317–27.
 - Lagha, A.B., Haas, B., Gottschalk, M., Grenier, D., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. Vet. Res. 48, 22. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs13567-017-0425-6>
 - Lake I. 2017. Food-borne disease and climate change in the United Kingdom. *Environmental Health* 2017, 16 (Suppl 1): 117. Διαθέσιμο στο: <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-017-0327-0>
 - Lake RJ, Horn BJ, Dunn AH, Parris R, Green FT, McNickle DC. 2013. Cost-effectiveness of interventions to control Campylobacter in the New Zealand poultry meat food supply. J Food Prot 76:1161–1167. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-481>.
 - Lawes, J., Vidal, A., Clifton-Hadley, F., Sayers, R., Rodgers, J., Snow, L., Powell, L. et al, 2012. Investigation of prevalence and risk factors for Campylobacter in broiler flocks at slaughter: Results from a UK survey. *Epidemiology and Infection*, 140, 1725–1737. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000982>
 - Layton, S.L., Morgan, M.J., Cole, K., Kwon, Y.M., Donoghue, D.J., Hargis, B.M. and Pumford, N.R., 2011. Evaluation of Salmonella-vectored Campylobacter peptide epitopes for reduction of Campylobacter jejuni in broiler chickens. *Clin Vaccine Immunol* 18, 449–454.

- Le M.T., Porcelli I., Weight C.M., Gaskin D.J.H., Carding S.R., Vliet a.H.M., 2012. Acid shock of *Campylobacter jejuni* induces flagellar gene expression and host cell invasion, *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2 (1) (2012) 12–19.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1094–1100. doi: 10.1128/AAC.01569-06.
- Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF., 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 71:6554–6563. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C.M. and Zhang, Q., 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol* 4, 189–200.
- 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, 1987–1994.
- Magajna BA, Schraft H., 2015. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but nonculturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4°C more quickly than their planktonic counterparts. *Food Control* 50, 45-50.
- Markowiak, P., and Śliżewska, K., 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. Review. *Gut Pathog* (2018) 10:21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Martin Král Ľ.M., Angelovičová Mária, 2012. Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *Poultry Sci.* 45 (1) (2012) no. 2012.
- Mason J, Iturriza-Gomara M, O'Brien S, Ngwira B, Dove W, Maiden M et al, 2013. *Campylobacter* infection in children in Malawi is common and is frequently associated with enteric virus co-infections. *Plos One* 2013;8:e59663.
- Maziero M, de Oliveira T, 2010. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Braz J Microbiol* 42(2):501-505.

- McDowell S.W., 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.* 2008 May 15;84(3-4):261-76. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.12.010. Epub 2008 Feb 4.
- Messens W., Herman L., De Zutter L. and Heyndrickx M., 2009. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet Microbiol* 138, 120–131.
- Messens, W., Hartnett, E., Gellynck, X., Viaene, J., Halet, D., Herman, L., Grijspeerdt, K., 2007. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis through the consumption of chicken meat in Belgium. In: XVIII European Symposium on the Quality of Poultry Meat and The XII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg products. Prague, Czech Republic. pp. 167–168.
- Metaxopoulos J. Mataragas M., Drosinos E.H., 2002. Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action. (I), Review article. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2002,53(4): 335-344.
- Meunier, M., Guyard-Nicod`eme, M., Dory, D., & Chemaly, M., 2015. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: Biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1139–1173. <https://doi.org/10.1111/jam.12986>
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Vigouroux, E., Poezevara, T., Beven, V., Quesne, S., Chemaly, M., 2017. Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. *PLOS One*, 12(11), e0188472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188472>
- Micciche A. C., Foley S. L., Pavlidis H. O., McIntyre D. R., Ricke S. C., 2018. A review of prebiotics against *Salmonella* in poultry: current and future potential for microbiome research applications. *Front. Vet. Sci.* 5:191. 10.3389/fvets.2018.00191
- Micciche, A., Rothrock Jr., M.J., Yang, Y., and Ricke S.C., 2019. Essential Oils as an Intervention Strategy to Reduce *Campylobacter* in Poultry Production: A Review. *Frontiers in Microbiology* | www.frontiersin.org. May 2019 | Volume 10 | Article 1058. doi: 10.3389/fmicb.2019.01058

- Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P., and De Smet, S., 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2371–2381. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3358>
- Modi S., Brahmabhatt M.N., Chatur Y.A., and Nayak J.B., 2015. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Vet World* 2015, Jan; 8(1): 1–8. Published online 2015 Jan 2. doi: [10.14202/vetworld.2015.1-8](https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1-8)
- Moffatt CR, Greig A, Valcanis M, Gao W, Seemann T, Howden BP, Kirk MD, 2016.. A large outbreak of *Campylobacter jejuni* infection in a university college caused by chicken liver pâté, Australia, 2013. *Epidemiol Infect* 2016;144(14):2971-2978. Epub 2016 Jun 16.
- Molatová, Z., Skrivanová, E., Baré, J., Houf, K., Bruggeman, G., & Marounek, M., 2011. Effect of coated and non-coated fatty acid supplementation on broiler chickens experimentally infected with *Campylobacter jejuni*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(6), 701–706. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01100.x>
- Murray, C.J., Barber, R.M., Foreman, K.J., Ozgoren, A.A., Abd-Allah, F., Abera, S.F., et al., 2015. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet* 386, 2145–2191. [https://dx.doi.org/10.1016%2FS0140-6736\(15\)61340-X](https://dx.doi.org/10.1016%2FS0140-6736(15)61340-X)
- Nachamkin I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Nachamkin I. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, 1995, 483-491.
- Näther G., Alter T., Martin A. & Ellerbroek L., 2009. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poultry Sci* 88:1299–1305.
- Natsos G., Koutoulis K.C., Sossidou E., Chemaly M., Mouttotou N.K., 2016. *Campylobacter* spp. infection in humans and poultry. Review article. *J HELLENIC VET MED SOC* 2016, 67(2): 65-82.

- NCBI 2017. L-tyrosine. CID=6057. National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine>
- Neal-McKinney, J.M., Samuelson, D.R., Eucker, T.P., Nissen, M.S., Crespo, R. and Konkel, M.E., 2014. Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination. PLoS ONE 9, e114254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114254>
- Newell D.G. and Fearnley C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 2003 Aug;69(8):4343-51.
- Nothaft, H., Davis, B., Lock, Y. Y., Perez-Munoz, M. E., Vinogradov, E., Walter, J., Szymanski, C. M., 2016. Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. Scientific Reports, 6, Article 26511. <https://doi.org/10.1038/srep26511>
- Nowaczek, A., Urban – Chmiel, R., Dec, M., Puchalski, A., Marek, A., Pyzik, E., 2019. *Campylobacter* spp. and bacteriophages from broiler chickens: Characterization of antibiotic susceptibility profiles and lytic bacteriophages. Original Article. Microbiology Open 2019; 8: e784. Διαθέσιμο στο: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.784> [Πρόσβαση στις 22/7/2019].
- NSW 2018. NSW Food Authority. *Campylobacter* in meat and offal. Microbiological Quality of beef, lamb and pork meat cuts and offal. Διαθέσιμο στο: http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Documents/scienceandtechnical/campylobacter_in_meat_and_offal.pdf [Πρόσβαση στις 08/07/2019].
- O'Bryan, C.A., Pendleton, S.J., Crandall, P.G., and Ricke, S.C., 2015. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture – in vitro studies on antibacterial mode of action. Front. Vet. Sci. 2:35. <https://dx.doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>
- Oechslin, F., 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. Review. Viruses 2018, 10, 351; doi:10.3390/v10070351
- Oliver JD, 2010. Recent findings on the viable but non culturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 34(4), 415–425.

- Osimani A., Clementi F., 2016. The catering industry as a source of campylobacteriosis in Europe. A review. International Journal of Hospitality Management. Volume 54, April 2016, Pages 68-74.
- Papatsiros, V. G., Katsoulos, P. D., Koutoulis, K. C., Karatzia, M., Dedousi, A., and Christodouloupoulos, G., 2013. Alternatives to antibiotics for farm animals. CAB Rev. 8, 1–15. <http://hdl.handle.net/11615/31965>
- Park, S. H., Kim, S. A., Lee, S. I., Rubinelli, P. M., Roto, S. M., Pavlidis, H. O., et al., 2017. Original XPCTM effect on Salmonella typhimurium and cecal microbiota from three different ages of broiler chickens when incubated in an anaerobic in vitro culture system. Front. Microbiol. 8:1070. doi:10.3389/fmicb.2017.01070
- Perez-Armedo I. and Gonzalez-Fandow E. 2019. Prevalence of *Campylobacter* spp. in Poultry in Three Spanish Farms, A Slaughterhouse and A Further Processing Plant
- Platts-Mills J, et al. 2014, Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries, J. Clin. Microbiol. 52 (4) (2014) 1074–1080.
- Prachantasena S., Charununtakorn P., Muangnoicharoen S., Hankla L., Techawal N., Chaveerach P., Tuitemwong P., Williams N., et al, 2017. Climatic factors and prevalence of Campylobacter in commercial broiler flocks in Thailand. 2017 Poultry Science 96:980–985.
- Public Health Ontario 2017. Reportable disease trends in Ontario. Διαθέσιμο στο: <https://www.publichealthontario.ca/data-and-analysis/infectious-disease/reportable-disease-trends-annually#/8> [Πρόσβαση στις 09/07/2019].
- Rabie N.S., Amin Girh Z.M.S., and Zaki M.S., 2019. Control of Campylobacter in poultry. Researcher 2019;11(1):21-30]. ISSN 1553-9865 (print); ISSN 2163-8950 (online). <http://www.sciencepub.net/researcher.5>. doi: 10.7537/marsrsj110119.05
- Rahman S.M.E. and Murshed H.M., 2019. Application of Electrolyzed Water on Livestock. Springer Nature Singapore Pte Ltd. and Zhejiang University Press, Hangzhou 2019 T. Ding et al. (eds.), Electrolyzed Water in Food: Fundamentals and Applications, https://doi.org/10.1007/978-981-13-3807-6_8

- Raut, J. S., and Karuppayil, S. M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils.. Industrial Crops and Products Volume 62, December 2014, Pages 250-264
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Ravel A., Hurst M., Petrica N., David J., Mutscall S.K., Pintar K., Taboada E.N., Pollari F., 2017. Source attribution of human campylobacteriosis at the point of exposure by combining comparative exposure assessment and subtype comparison based on comparative genomic fingerprinting. Research article. PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183790> [Πρόσβαση στις 07/07/2019].
- Rezaei, S., Faseleh Jahromi, M., Liang, J.B., Zulkifli, I., Farjam, A.S., Laudadio, V., et al., 2015. Effect of oligosaccharides extract from palm kernel expeller on growth performance, gut microbiota and immune response in broiler chickens. Poult.Sci.94,2414–2420. doi:10.3382/ps/pev216
- Rice, B.E., Rollins, D.M., Mallinson, E.T., Carr, L. and Joseph, S.W., 1997. Campylobacter jejuni in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. Vaccine 15, 1922–1932.
- Richards, P.J., Connerton P.L., Connerton I.F., 2019. Phage Biocontrol of Campylobacter jejuni in Chickens Does Not Produce Collateral Effects on the Gut Microbiota. Frontiers in Microbiology. March 2019 | Volume 10 | Article 476. doi: 10.3389/fmicb.2019.00476
- Ricke, S. C. 2018. Impact of prebiotics on poultry production and food safety. Yale J. Biol. Med. 91, 151–159.
- Rincé A., Balière C., Hervio-Heath D., Cozien J., Lozach S., Parnaudeau S., Le Guyader F.S., Le Hello S., Giard J.S., Sauvageot N., Benachour A., Strubbia S., Gourmelon M., 2018. Occurrence of Bacterial Pathogens and Human Noroviruses in Shellfish-Harvesting Areas and Their Catchments in France. Original Research. Front. Microbiol., 11 October 2018, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02443>
- Robyn J., Rasschaert G., Heyndrickx M., Pasmans F., 2015. Thermotolerant *Campylobacter* during Broiler Rearing: Risk Factors and

- Intervention. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol.14, 2015. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12124>
- Robyn, J., Rasschaert, G., Hermans, D., Pasmans, F., & Heyndrickx, M., 2013. In vivo broiler experiments to assess anti-Campylobacter jejuni activity of a live Enterococcus faecalis strain. Poultry Science, 92(1), 265–271. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02712>
 - Robyn, J., Rasschaert, G., Pasmans, F., and Heyndrickx, M., 2015. Thermotolerant Campylobacter during Broiler Rearing: Risk Factors and Intervention. Vol.14,2015 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12124>
 - Romero-Barrios, P., Hempen, M., Messens, W., Stella, P. and Hugas, M., 2013. Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of food-borne zoonoses at the European level. Food Control 29, 343–349.
 - Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Nørrung, B., & Christensen, B. B., 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic Campylobacter species in chickens. International Journal of Food Microbiology, 83(1), 87–103. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00317-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00317-3)
 - Sahin, O., Kassem, I. I., Shen, Z., Lin, J., Rajashekara, G., and Zhang, Q., 2015. Campylobacter in poultry: ecology and potential interventions. Avian Dis. 59, 185–200. <https://doi.org/10.1637/11072-032315-Review>
 - Sandberg M., Sørensen L. L., Steenberg B., Chowdhury S., Ersbøll A.K., & Alban L. 2015. Risk factors for Campylobacter colonization in Danish broiler flocks, 2010 to 2011. Poultry Science, 94(3), 447–453. <https://doi.org/10.3382/ps/peu065> [Πρόσβαση στις 10/07/2019].
 - Santini, C., Baffoni, L., Gagia, F., Granata, M., Gasbarri, R., DiGioia, D., Biavatti, B., 2010. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni. Int. J. Food Microbiol. 141, S98–S108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039>
 - Scallan, E., Hoekstra, R.M., Mahon, B.E., Jones, T.F., and Griffin, P.M., 2015. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. Epidemiol. Infect. 143, 2795–2804. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003185>

- Schets, F.M., Jacobs-Reitsma, W.F., van der Plaats, R.Q.J., van Hoek, A.H.A.M., Hetty Blaak, H., et al, 2017. Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment, J Water Health (2017) 15 (6): 849-862. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.2166/wh.2017.119> [Πρόσβαση στις 10/07/2019].
- Shen Z., Wang Y., Zhang Q., Shen J., 2017. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. Microbiol Spectrum 6(2):ARBA-0013-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017.
- Sibanda, N., McKenna, A., Richmond, A., Ricke, S. C., Callaway, T., Stratakis, A. C., et al., 2018. A review of the effect of management practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms. Front. Microbiol. 9 : 2002. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02002>
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., and Teixeira P., 2011. *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: a review. Front. Microbiol. 2:200, 1-12. doi: [10.3389/fmicb.2011.00200](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200)
- Skanseng B., Kaldhusdal M., Moen B., Gjevre A.G., Johannessen G.S., Sekelja M., Trosvik P. and Rudi K., 2010. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. J Appl Microbiol 109, 1265–1273.
- Skarp C.P.A., Hänninen M.L., and Rautelin H.I.K., 2016. *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. Clin. Microbiol. Infect. 22, 103–109.
- Skoufos, I., Tzora, A., Giannenas, I., Bonos, E., Tsinas, E., McCartney E., Lester, H., Christaki E., Florou-Paneri, P., Mahdavi, J., Soultanas, P., 2019. Evaluation of in-field efficacy of dietary ferric tyrosine on performance, intestinal health and meat quality of broiler chickens exposed to natural *Campylobacter jejuni* challenge. Livestock science 221 (2019) pp 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.008>
- Slizewska K, Cukrowska B, Smulikowska S, Cielecka-Kuszyk J, 2019. The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B1. Received: 16 January 2019; Accepted: 10 February 2019; Published: 13 February 2019. [file:///C:/Users/USER/Downloads/toxins-11-00112.pdf](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00112)

- Smialek, M., Burchardt, S., & Koncicki, A., 2018. The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp. - Field study. *Research in Veterinary Science*, 118, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.03.009>
- Smith S., Messam L.L.M., Meade J., Gibbons J., McGill K., Bolton D., & Whyte P., 2016. The impact of biosecurity and partial depopulation on *Campylobacter* prevalence in Irish broiler flocks with differing levels of hygiene and economic performance. *Infection Ecology & Epidemiology*, 6(1). Article 31454. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.31454>
- Snelling WJ, McKenna JP, Lecky DM, Dooler JSG. 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborns protozoa. *Appl Environ Microbiol.* 71:5560–71.
- Solis de Los Santos, F., Donoghue, A.M., Venkitanarayanan, K., Dirain, M.L., Reyes-Herrera, I., Blore, P.J. and Donoghue, D.J., 2008. Caprylic acid supplemented in feed reduces enteric *Campylobacter jejuni* colonization in tenday-old broiler chickens. *Poult Sci* 87, 800–804.
- Solis de los Santos, F., Hume, M., Venkitanarayanan, K., Donoghue, A.M., Hanning, I., Slavik, M.F., Aguiar, V.F., Metcalf, J.H. et al., 2010. Caprylic acid reduces enteric *campylobacter* colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. *J Food Prot* 73, 251–257.
- Sommer, H. M., Heuer, O. E., Sørensen, A. I., & Madsen, M., 2013. Analysis of factors important for the occurrence of *Campylobacter* in Danish broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 111, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.04.004>
- Srey, S., Jahid, I. K., and Ha, S. D., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001
- Stanley, D., Hughes, R. J., and Moore, R. J., 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4301–4310. doi: 10.1007/s00253-0145646-2

- Stern NJ, Line JE, 2000. *Campylobacter*. In : Lund B, Baird-Parker T, Gould G (Ed.), *The microbiological safety and quality of food*, Vol II, An ASPEN Publication, Gaithersburg, Maryland, pp 1040-1056.
- Stern NJ, Robach MC, Cox NA, Musgrove MT. 2002. Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers. *Avian Dis* 46:401–4.
- Stoodley, L.H., Costerton, J.W., and Stoodley, P.L., 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Strachan N, Rotariu O, Smith-Palmer A, Cowden J, Sheppard S, O’Brien S et al, 2013. Identifying the seasonal origins of human campylobacteriosis. *Epidemiol Infect* 2013;141:1267-75.
- Sugiharto S., Isroli I., Yudiarti T. and Widiastuti E., 2018. The effect of supplementation of multistrain probiotic preparation in combination with vitamins and minerals to the basal diet on the growth performance, carcass traits, and physiological response of broilers. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/February-2018/25.pdf>
- Sun, Y., and O’Riordan M.X., 2013. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. *Adv. Appl. Microbiol.* 85:93–118.
- Svetoch EA and Stern NJ., 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. In poultry — A review. *Poult Sci* 89: 1763–1768. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2010-00659>
- Taylor, E.V., Herman, K.M., Ailes, E.C., Fitzgerald, C., Yoder, J.S., Mahon, B.E. et al, 2013. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. *Epidemiol. Infect.* 141(5), 987–996. doi: 10.1017/S095026881200 1744.
- Teunis P.F.M., Marinovic A.B., Tribble D.R., Porter C.K., Swart A., 2018. Acute illness from *Campylobacter jejuni* require high doses while infection occurs at low doses. *Epidemics*. Volume 24, September 2018, Pages 1-20. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2018.02.001> [Πρόσβαση στις 07/07/2019].
- Thanner, S., Drissner, D., Walsh, F., 2016. Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio* 7 e02227-15. <https://dx.doi.org/10.1128%2FmBio.02227-15>

- Theoret, J.R., Cooper, K.K., Zekarias, B., Roland, K.L., Law, B.F., Curtiss, R. 3rd and Joens, L.A., 2012. The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 19, 1426–1431.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Gauthier, R., Guévremont, E., Bergeron, N., Laurent Lewandowski, S., et al., 2014. Modification of *Campylobacter jejuni* broiler colonization by a feed additive composed of encapsulated organic acids and essential oils. *J.Agric. Sci. Technol.* A4, 853–864. DOI: [10.17265/2161-6256/2014.10.008](https://doi.org/10.17265/2161-6256/2014.10.008)
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L., and Letellier, A., 2015.. Chicken caecal microbiome modifications induced by *Campylobacter jejuni* colonization and by a non-antibiotic feed additive. *PLoS ONE* 10:e0131978. doi:10.1371/journal.pone.0131978
- Thormar, H., Hilmarsson, H., Bergsson, G., 2006. Stable concentrated emulsions of the monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 72, 522–526. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.522-526.2006>
- Torralbo, A., Borge, C., Allepuz, A., Garcia-Bocanegra, I., Sheppard, S. K., Perea, A., & Carbonero, A., 2014. Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 114(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.019>
- Tresse O., Alvarez-Ordóñez A., Connerton IF., 2017. Editorial: about the foodborne pathogen *Campylobacter*. *Front. Microbiol.* 8:1908. 10.3389/fmicb.2017.01908.
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M. and Hammarstrom, L. (1997) Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clin Exp Immunol* 108, 451–455.
- Upadhyay A., Arsi K., Upadhyaya I., Donoghue A.M., Donoghue D.J., 2019 Natural and Environmentally Friendly Strategies for

- Controlling *Campylobacter jejuni* Colonization in Poultry, Survival in Poultry Products and Infection in Humans. In: Venkitanarayanan K., Thakur S., Ricke S. (eds) Food Safety in Poultry Meat Production. Food Microbiology and Food Safety. pp 67-93 doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5_4
- Ushanov L., 2018. Reduction of *C. jejuni* may require complex approach. Annals of Agrarian Science 16 (2018), 422-426. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.07.001>
 - Van Der, W.P.W., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P. and Van Knapen, F., 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. Appl. Environ. Microbiol. 66:2536–2540.
 - van Gerwe Tjwm, Miflin, J, Templeton J, Bouma A, Wagenaar J, Jacobs-Reitsma W, Stegeman J & Klinkenberg D, 2009. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. Appl and Environm Microbiol 75:625-628.
 - van Gerwe, T., A. Bouma, A., Klinkenberg, D., Wagenaar, J.A., Jacobs-Reitsma, W.F. and Stegeman, A., 2010. Medium chain fatty acid feed supplementation reduces the probability of *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet. Microbiol. 143: 314–318.
 - Van Limbergen, T., Dewulf, J., Klinkenberg, M., Ducatelle, R., Gelaude, P., M'endez, J., Maes, D. et al, 2018. Scoring biosecurity in European conventional broiler production. Poultry Science, 97(1), 74–83. <https://doi.org/10.3382/ps/pex296>
 - van Wagenberg CPA., van Horne P. LM., Sommer HM., and Nauta MJ., 2016.. Cost-effectiveness of *Campylobacter* interventions on broiler farms in six European countries. Microbial Risk Analysis 2–3, pp. 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2016.05.003>
 - Vandamme, P., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., and On, S. L. W., 2006. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria (Part C), 2nd Edn, Vol. 2, eds G. Garrity, D. J. Brenner, J. T. Staley, N. R. Krieg, D. R. Boone, P. DeVos, et al. (Berlin: Springer Science & Business Media), 1147–1160.

- Vender, H., Henningsen, M.L., Begg, S.L., 2017. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. *Essays Biochem* 61, 1–10.
<https://dx.doi.org/10.1042%2FEBC20160053>
- Vidanarachchi, J. K., Mikkelsen, L. L., Sims, I. M., Iji, P. A., and Choct, H., 2005. Phytobiotics: alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds. *Recent Adv. Anim. Nutr.* 15, 131–144.
- Wagenaar JA, French NP, Havelaar AH. 2013. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clin Infect Dis* 57:1600–1606.
<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit555>
- Wales, A., Vidal, A.B., Rodger, J.D., Davies, R.H., 2019. Field Interventions Against Colonization of Broilers by *Campylobacter*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Volume 18. January 2019. Pages 167-188.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12397>
- Wales, A.D., , Vidal, A.B., Davies, R.H., and Rodgers, J.D., 2019. Field Interventions Against Colonization of Broilers by *Campylobacter*. Vol. 18, 2019. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. pp 167 – 188. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12397>
- Wang, Y. H., Avula, B., Nanayakkara, N. D., Zhao, J., and Khan, I. A., 2013. Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4470–4476.
<https://doi.org/10.1021/jf4005862>
- Wei, W, Schupbach, G, Held, L., 2014. Time - series analysis of *Campylobacter* incidence in Switzerland. *Epidemiol Infect* 2014: 1–8.
<https://doi.org/10.1017/S0950268814002738>
- WHO 2012. World Health Organization. The global view of *Campylobacteriosis*. Report of expert consultation. Utrecht Netherlands, 9 – 11 July 2012. Διαθέσιμο στο:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80751/9789241564601_eng.pdf?sequence=1 [Πρόσβαση στις 09/07/2019].
- WHO 2013. The global view of *campylobacteriosis*: report of an expert consultation. Utrecht, Netherlands 9-11 July 2012. WHO Report 2013:57p.
<http://www.who.int/iris/handle/10665/80751> [Πρόσβαση στις 15/07/2019].

- Wilkinson, N., Hughes, R.J., Aspden, W.J., Chapman, J., Moore, R.J., and Stanley, D., 2016. The gastrointestinal tract microbiota of the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4201–4209. doi:10.1007/s00253-0157280-z
- Williams L.K., Sait L.C., Trantham E.K., Cogan T.A. and Humphrey T.J., 2013. *Campylobacter* infection has different outcomes in fast- and slow-growing broiler chickens. *Avian Dis* 57, 238–241.
- Williams M, Golden N, Ebel E, Craey E, Tate H, 2015. Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their relationship to campylobacteriosis in the United States. *Int J Food Microbiol* 2015;208:114-21.
- Wiseman, A., Berman, E., Marantz, B., Masury, E., Maman, O. and Pirak, M., 2017. Baseline Survey on the Prevalence of *Campylobacter* in Broiler Intestines and on Broiler Carcasses in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, September 2017, Vol. 72 (3). Research Article. http://www.ijvm.org.il/sites/default/files/prevalence_of_campylobacter.pdf
- Ziprin, R.L., Hume, M.E., Young, C.R. and Harvey, R.B., 2002. Inoculation of chicks with viable noncolonizing strains of *Campylobacter jejuni*: evaluation of protection against a colonizing strain. *Curr Microbiol* 44, 221 – 223.