

ANALISI GENOMICA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLATI DA ORGANI PARENCHIMATOSI DI POLLI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE CON LESIONI RICONDUCEBILI AD *AVIAN VIBRIONIC HEPATITIS/SPOTTY LIVER DISEASE*

Laconi A.¹, Drigo I.², Palmieri N.³, Carraro L.¹, Tonon E.², Franch R.¹, Bano L.², Piccirillo A.¹

¹Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD);

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Treviso - Vicolo G. Mazzini, 4 - 31020 Villorba (TV);

³University Clinic for Poultry and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, 1210, Austria.

Summary

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* have commonly been considered harmless commensal inhabitants of the chicken gut; however, these *Campylobacter* spp. are known to be able to multiply in the gut and invade other tissues, negatively affecting host health and performance. In this study, fourteen *Campylobacter* spp. were isolated from chickens showing foci of necrosis on the liver surface resembling lesions observed in cases of avian vibronic hepatitis/spotty liver disease. Whole genome sequences of the fourteen isolates were analysed and their virulomes compared to those of *Campylobacter* reference sequences, aiming to investigate the possible association between virulence genes and the observed disease. Nine *C. jejuni* and five *C. coli* were studied. These *Campylobacter* shared twelve virulence factors with other isolates originated from chicken livers and proved to host a higher number of virulence-associated genes in comparison to the reference genomes, including genes encoding for factors involved in adherence to and invasion of the intestinal epithelial cells. Our findings seem to point out that these twelve common virulence-associated genes, together with the presence of a high number of virulence factors involved in adherence, invasion and motility, might be responsible for the extra-intestinal spreading of our isolates and the colonization of parenchymatous tissues, resulting in the development of the disease.

INTRODUZIONE

Campylobacter termofili, in particolare *C. jejuni* e *C. coli*, sono batteri ben adattati alle specie aviari in cui colonizzano il tratto gastroenterico, frequentemente senza causare malattia (Sahin et al., 2017). Tuttavia, diversi studi riportano come anche nelle specie aviari *Campylobacter* termofili siano in grado di lasciare l'intestino, invadendo e danneggiando la mucosa intestinale e conseguentemente di colonizzare organi parenchimatosi, tra cui il fegato (Sanyal et al., 1984; Van Deun et al., 2007). L'abilità di *C. jejuni* e *C. coli* di colonizzare il fegato del pollo pone dei dubbi rispetto al concetto che vede *Campylobacter* quale commensale in questa specie e, al tempo stesso, solleva interrogativi di sicurezza alimentare legati a casi di campilobatteriosi umana riconducibile al consumo di fegato di pollo (Cox et al., 2007; Crawshaw et al., 2015; Jennings et al., 2011; O'Leary et al., 2009). *C.*

jejuni è stato isolato da fegato di polli affetti da Epatite vibriónica aviaria (AVH), una condizione caratterizzata da inspessimento e opacizzazione della glissoniana e incostante presenza di flebili lesioni necrotiche multifocali disseminate, associata ad un calo nella produzione di uova di circa il 10-25% e a un aumento della mortalità che può raggiungere il 15% (Crawshaw & Young, 2003; Grimes & Reece, 2011; Hofstad et al., 1958; Sevoian et al., 1958). Tuttavia, non è stato possibile riprodurre sperimentalmente la malattia impiegando ceppi di *C. jejuni* derivati dal pollame (Jennings et al., 2011), suggerendo che tale microorganismo possa causare AVH solo in presenza di fattori predisponenti (es. condizioni di stabulazione sfavorevoli, stress, stati d'immunodepressione dell'ospite, ecc). Una condizione simile all'AVH, chiamata *Spotty liver disease* (SLD), è comparsa a partire dagli anni 2000 (Crawshaw & Young, 2003). Una nuova specie di *Campylobacter* termofilo, denominato *C. hepaticus* (Crawshaw et al., 2015; Van et al., 2016), è stato isolato da focolai di SLD e si è dimostrato in grado di riprodurre la malattia in studi d'infezione sperimentale, causando le classiche lesioni macroscopiche e microscopiche osservate in casi di SLD (Crawshaw et al., 2015; Van et al., 2017). Nel presente studio, riportiamo la caratterizzazione molecolare dell'intero genoma di nove isolati di *C. jejuni* e cinque isolati di *C. coli* ottenuti da fegato e milza di polli da carne, galline ovaiole e capponi che mostravano lesioni macroscopiche simili a quelle riscontrate in casi di AVH / SLD. In particolare, mediante un'analisi genomica comparativa dei quattordici isolati, dieci ceppi di riferimento di *C. jejuni*, dieci di *C. coli* e uno di *C. hepaticus*, è stata investigata la presenza di fattori di virulenza potenzialmente associati alla malattia osservata.

MATERIALI E METODI

Campioni

I quattordici ceppi di *Campylobacter* analizzati nel presente studio sono stati isolati presso la sezione di Treviso dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), fra il 2013 ed il 2017 da episodi di malattia riconducibile ad AVH/SLD verificatisi in allevamenti commerciali di polli da carne e galline ovaiole e capponi (Piccirillo et al., 2018). L'identificazione di specie è stata eseguita sia tramite MALDI-TOF MS che end-point multiplex PCR; nove campioni sono risultati *C. jejuni* e cinque *C. coli*, mentre nessun isolato è stato identificato come *C. hepaticus* (Piccirillo et al., 2018).

Sequenziamento del genoma completo degli isolati tramite next generation sequencing

Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto da singole colonie pure utilizzando il *MiniKit Invisorb Spin tissue* (Strattec Molecular GmbH, Birkenfeld, Germania). Le librerie sono state costruite utilizzando 1 ng di gDNA con il kit *Nextera XT* (Illumina, Inc., San Diego, CA) e sequenziate presso la MacroGen (Corea) utilizzando la piattaforma *NextSeq 500* (Illumina) che genera sequenze paired-end da 150 bp.

Assemblaggio delle sequenze e annotazione dei genomi

Le sequenze grezze sono state assemblate utilizzando il software *St. Petersburg genome assembler* (SPAdes) v. 3.11.1 (impostazioni, dimensioni k-mer 21, 33, 55 e 77), mentre il software *Quality Assessment Tool for Genome Assemblies*

(QUAST) è stato utilizzato per determinare la qualità dell'assemblaggio del genoma. L'annotazione dei genomi è stata effettuata utilizzando il server RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>).

Caratterizzazione dei genomi ed analisi filogenetica degli isolati

Il *sequence type* (ST), basato su sette loci, e il *core genome sequence type* (cgST), basato su 1.343 loci, sono stati determinati utilizzando il server PubMLST (<https://pubmlst.org/campylobacter/>). Per l'analisi filogenetica, 143 sequenze di *C. jejuni* caratterizzate da genomi con un singolo cromosoma completo sono state scaricate dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), insieme a tutte le sequenze genomiche disponibili di *C. coli* (n = 29), al genoma del ceppo *C. hepaticus* HV10 (accesso NZ_CP031611), nonché al genoma di un ceppo di *C. rectus* (accession GCA_003859865.1), che essendo geneticamente distante dalle altre tre specie è stato incluso nell'analisi come *outgroup*. L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il pacchetto *Microbial Genomics Module* all'interno del software *CLC Genomics Workbench 12* (<https://digitalinsights.qiagen.com>), mentre l'albero filogenetico è stato visualizzato usando il software *Interactive Tree of Life* (iTOL) (<https://itol.embl.de/itol.cgi>).

Analisi comparativa dei genomi

Il viruloma dei ceppi inclusi nello studio, è stato comparato con quello di dieci ceppi di riferimento di *C. jejuni*, dieci ceppi di riferimento di *C. coli*, selezionati sulla base dell'analisi filogenetica, e con quello del ceppo di riferimento di *C. hepaticus* HV10. La presenza di fattori di virulenza nei quattordici isolati e nei ceppi di riferimento è stata valutata utilizzando due *web-tool*, il *Bacterial Whole Genome Sequence Typing Database* (BacWGSTdb) (<http://bacdb.org/BacWGSTdb>) e il *Virulence Factor Database* (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Nelle analisi successive sono stati considerati solo i geni di virulenza identificati da entrambi gli strumenti web. Per indagare il potenziale genetico dei nostri isolati nel causare la malattia osservata, i ceppi oggetto del presente studio e i ceppi di riferimento sono stati clusterizzati sulla frequenza di ciascun gene di virulenza, valutato come dato binario (presente = 1, assente = 0), utilizzando il software *pHeatmap* v. 1.0.12 in R v. 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>). Inoltre, *one way analysis of variance* (ANOVA) con il test *post hoc di Tukey* è stata utilizzata per confrontare le differenze nel numero medio di geni di virulenza tra isolati e ceppi di riferimento, utilizzando *GraphPad Prism 8.4.0* (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Infine, per investigare un possibile collegamento tra geni specifici e la malattia osservata, si è valutata la presenza di geni presenti in tutti gli isolati e nei soli ceppi di riferimento isolati da fegato di pollo, nonché di geni presenti unicamente nei nostri isolati ed assenti nei genomi di riferimento.

RISULTATI

Tra i quattordici isolati sono stati identificati dodici diversi ST, di cui sette per *C. jejuni* (ST 354, 400, 880, 2116, 2274, 2314 e 2863) e cinque per *C. coli* (ST 855, 892, 1585, 4743 e 10568). Cinque ST per *C. jejuni* sono stati assegnati a tre complessi clonali (CC) 353, 354 e 1034, mentre due (ST 880 e 2274) appartenevano a CC non definiti. Tre ST identificati per *C. coli* sono stati assegnati al CC 828,

mentre il resto apparteneva a CC non definiti. Sono stati inoltre riconosciuti tredici diversi profili cgMLST, con solo due isolati di *C. jejuni* (Ca_11 e Ca_17) che condividono lo stesso cgST. I dettagli sono riportati in Tabella 1. L'analisi filogenetica ha evidenziato un'ampia diversità tra i nostri isolati, essendo sparsi in tutto l'albero e raggruppandosi con sequenze di *Campylobacter* sia di origine avicola che umana (Figura 1). Inoltre, solo uno degli isolati (Ca_18) clusterizzava con uno dei ceppi isolati da fegato di pollo inclusi nell'analisi. Un numero maggiore di geni di virulenza è stato osservato nei nostri isolati rispetto ai genomi di riferimento delle rispettive specie e per *C. jejuni* la differenza era significativa ($p = 0,000001$); dato confermato anche dalla clusterizzazione sulla base della frequenza dei geni di virulenza, in quanto era presente una netta separazione tra i nostri isolati ed i ceppi di riferimento (Figura 2). In dettaglio, i quattordici isolati presentavano un numero maggiore di geni codificanti per proteine coinvolte nei processi di mobilità, adesione ed invasione delle cellule epiteliali rispetto ai genomi di riferimento. Inoltre, sono stati identificati dodici geni di virulenza, coinvolti nei processi di motilità e adesione (*flgI*, *flgR*, *fliF*, *fliG*, *fliM*, *mreB*, *pglJ*, *pgp* e *rpoN*), biosintesi della capsula batterica (*kpsD* e *waaF*) e chemiotassi (*cheV*), comuni ai nostri isolati e ai ceppi di riferimento isolati da fegato di pollo. Infine, l'analisi comparativa ha evidenziato la presenza di sette geni in tutti i nostri isolati ed assenti nei genomi di riferimento codificanti per tossine (*cdtC*) e fattori coinvolti nei processi di chemiotassi (*cheW*), motilità (*fliE*, *fliN* e *flgB*), invasione (*fliQ*) e aderenza alle cellule epiteliali (*pglD*).

DISCUSSIONE

L'analisi comparativa del viruloma effettuata nel presente studio ha rivelato che i quattordici isolati ottenuti da organi parenchimatosi di polli da carne e galline ovaiole con lesioni comparabili a quelle osservate in casi di AVH/SLD, non solo condividevano diversi fattori di virulenza coinvolti nei processi di motilità e di adesione alle cellule epiteliali con altri *Campylobacter* isolati da fegato di pollo, ma possedevano anche un numero maggiore di geni di virulenza coinvolti nei processi di adesione ed invasione delle cellule epiteliali intestinali rispetto ai genomi di riferimento, suggerendo che questi fattori potrebbero essere coinvolti nella diffusione extra-intestinale e, in determinate condizioni, nello sviluppo della patologia osservata. È infatti noto che l'adesione e l'invasione alle cellule epiteliali dell'intestino siano essenziali per la colonizzazione di altri organi (Hermans et al., 2011). Nel presente studio sono stati investigati unicamente i fattori genetici che potrebbero favorire la diffusione extra-intestinale di *Campylobacter*, tuttavia fattori ambientali e fattori predisponenti dell'ospite potrebbero contribuire non solo alla colonizzazione di altri organi da parte di *C. jejuni* e *C. coli*, ma anche allo sviluppo della patologia osservata. Infatti, *C. jejuni* è stato isolato sia da fegati apparentemente sani, che da organi caratterizzati da foci di necrosi (Cox et al., 2007; Jennings et al., 2011). L'infezione sperimentale con *C. jejuni* isolati da organi caratterizzati da lesioni simili a AVH/SLD non è stata possibile, tuttavia è stato osservato un significativo aumento di linfociti-T negli animali infetti rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che la risposta cellulo-mediata nelle fasi iniziali di infezione possa giocare un ruolo fondamentale nel prevenire lo sviluppo della malattia (Jennings et al., 2011). Diversi studi hanno dimostrato come fattori di stress ambientali possano influenzare la risposta immunitaria nelle specie avicole (Kout-

sos & Klasing, 2014; Niu et al., 2009), perciò è possibile che, a seguito di eventi in grado di ridurre la risposta immunitaria dell'ospite, la colonizzazione del fegato da parte di *C. jejuni* e *C. coli* possa portare ad una patologia simile a AVH/SLD. Oltre all'impatto sulla produzione avicola, la diffusione extra-intestinale di *Campylobacter* termofili rappresenta anche un possibile rischio per la salute pubblica legato al consumo di fegato di pollo: infatti, *C. jejuni* e *C. coli* presenti nel tessuto profondo del fegato hanno meno probabilità di essere distrutti durante il processo di cottura rispetto a quelli presenti sulla superficie a causa della contaminazione al macello durante la manipolazione della carcassa (Blankenship & Craven, 1982; Skelly & Weinstein, 2003).

CONCLUSIONI

Il presente studio riporta l'associazione tra *C. jejuni* e *C. coli* e casi sporadici di malattia simile a AVH / SLD. L'analisi comparativa del viruloma ha evidenziato come la presenza di un numero elevato di geni legati a processi di motilità, adesione ed invasione delle cellule epiteliali dell'intestino e di geni di virulenza comuni tra *Campylobacter* termofili potrebbe essere collegata alla diffusione extra-intestinale e allo sviluppo della malattia. Tuttavia, fattori predisponenti sembrano essere coinvolti sia nella diffusione extra-intestinale, che nello sviluppo della malattia e studi futuri dovrebbero puntare a chiarire il loro coinvolgimento soprattutto per le possibili implicazioni nell'ambito della salute pubblica.

Tabella 1. Ceppi di *Campylobacter* spp. isolati da organi parenchimatosi di polli da carne e galline ovaiole, fra il 2013 e il 2017.

ID	Campylobacter spp.	Ospite	Organo	Anno di isolamento	Lunghezza del genoma (bp)	Contenuto in GC (%)	No. di contig (RAST)	No. CDSs by RAST	No. Di sottostemi by RAST	Profilo MLST	Complesso clonale	Profilo egMLST
Ca_02	<i>C. coli</i>	Broiler	Milza	2014	1686970	31.4	49	1706	308	855	828	2588
Ca_09	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2017	1791945	30.3	170	1837	314	2274	none	22427
Ca_10	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2017	1750803	30.4	107	1792	316	400	353	19976
Ca_11	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2014	1620028	30.4	32	1638	304	2314	1034	19802
Ca_12	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2014	1812298	31.8	855	1777	313	892	828	14599
Ca_13	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2017	1706006	31.5	481	1735	290	10568	none	10311
Ca_14	<i>C. jejuni</i>	Capon	Fegato	2014	1742800	30.3	86	1784	316	400	353	20526
Ca_15	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2014	1717817	31.6	298	1733	312	1585	828	14352
Ca_16	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2013	1793191	30.3	224	1842	309	880	none	1308
Ca_17	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2014	1628806	30.5	120	1641	303	2314	1034	19802
Ca_18	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2014	1714209	30.4	96	1754	310	354	354	4713
Ca_19	<i>C. jejuni</i>	Laying hen	Fegato	2016	1750423	30.2	109	1777	313	2863	354	12198
Ca_27	<i>C. coli</i>	Laying hen	Fegato	2015	1859882	31.1	66	1933	315	4743	none	15992
Ca_29	<i>C. jejuni</i>	Broiler	Fegato	2016	1630894	30.5	267	1660	293	2116	353	23115

Figura 1. Albero filogenetico circolare delle sequenze dei genomi di *Campylobacter* spp.. *C. jejuni* sono evidenziati in verde, *C. coli* in viola e *C. hepaticus* HV10 in rosso. Gli isolati identificati nel presente studio sono riportati in grassetto, mentre i genomi di riferimento inclusi nelle analisi comparative sono evidenziati in corsivo. I clades che rappresentano isolati di *C. jejuni* ottenuti da feci umane sono stati collasati per facilitare la lettura dell'albero.

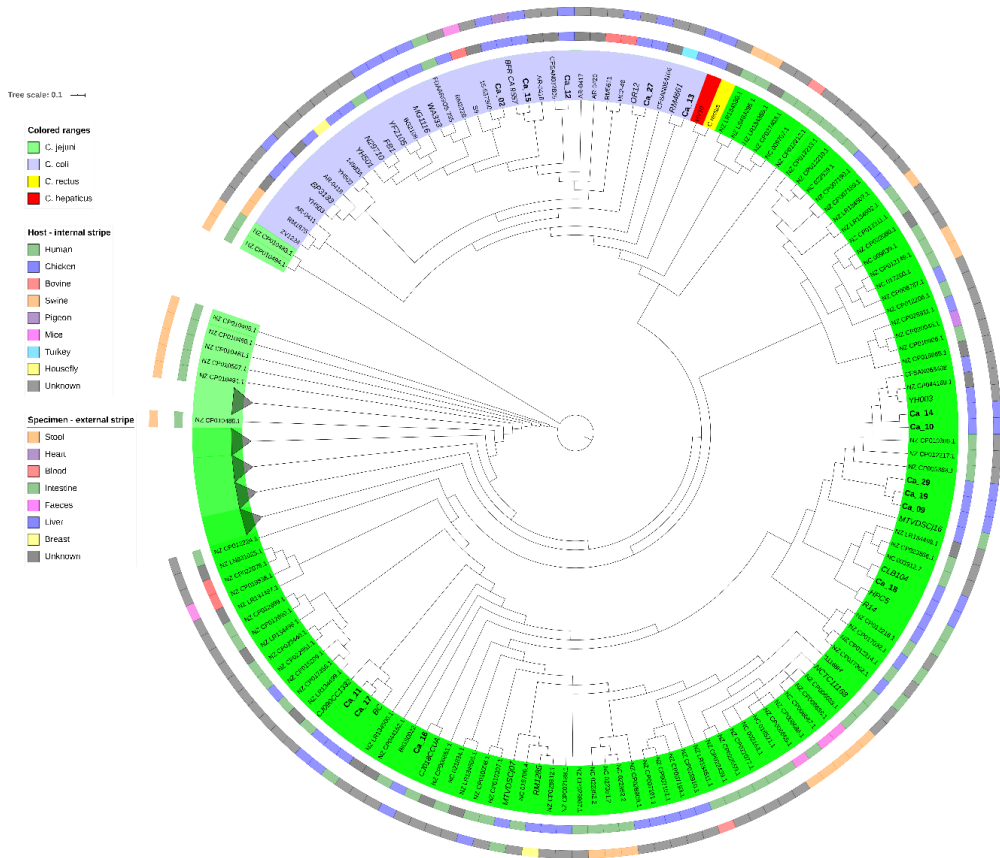
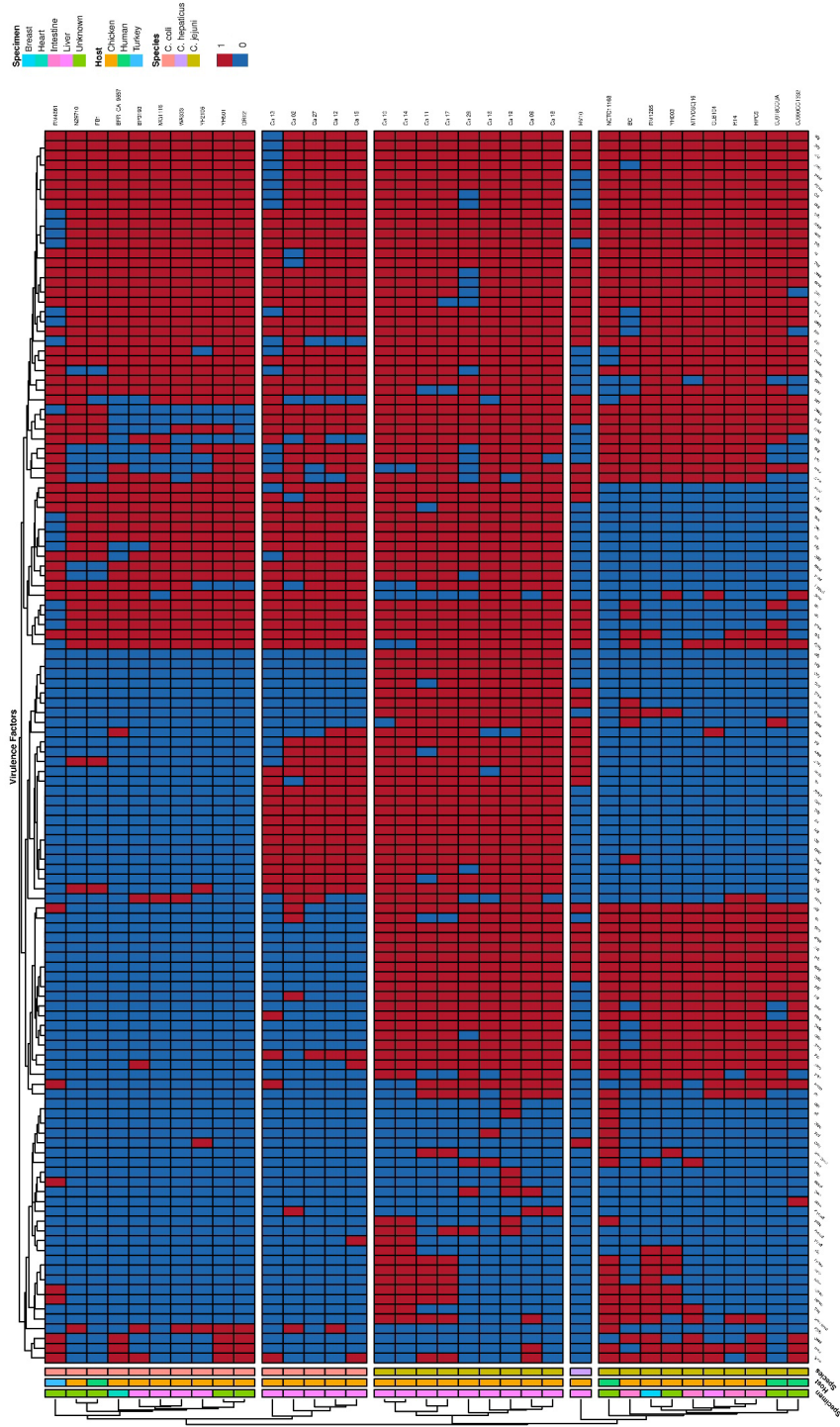


Figura 2. Analisi di *clustering* dei ceppi di *Campylobacter* spp. ($n = 35$) sulla base della presenza/assenza dei geni di virulenza variabili ($n = 126$). Rosso indica la presenza del gene, blu indica l'assenza.



BIBLIOGRAFIA

1. Blankenship, L. C., & Craven, S. E. (1982). *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 88 LP – 92. <http://aem.asm.org/content/44/1/88.abstract>
2. Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J., Northcutt, J. K., Bailey, J. S., Cray, P. F., & Hiatt, K. L. (2007). Recovery of *Campylobacter* and *Salmonella* Serovars From the Spleen , Liver and Gallbladder , and Ceca of Six- and Eight-Week-Old Commercial Broilers. *Poultry Science*, 16(4), 477–480. <https://doi.org/10.3382/japr.2006-00123>
3. Crawshaw, T. R., Chanter, J. I., Young, S. C. L., Cawthraw, S., Whatmore, A. M., Koylass, M. S., Vidal, A. B., Salguero, F. J., & Irvine, R. M. (2015). Isolation of a novel thermophilic *Campylobacter* from cases of spotty liver disease in laying hens and experimental reproduction of infection and microscopic pathology. *Journal of Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.008>
4. Crawshaw, T., & Young, S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. In *The Veterinary record* (Vol. 153, Issue 21, p. 664).
5. Grimes, T., & Reece, R. (2011). Spotty liver disease—an emerging disease in free-ranging layers in Australia. *Proceedings of the Sixtieth Western Poultry Disease Conference*, 53–56.
6. Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82>
7. Hofstad, M. S., McGehee, E. H., & Bennett, P. C. (1958). Avian Infectious Hepatitis. *Avian Diseases*, 2(3), 358–364. <https://doi.org/10.2307/1587535>
8. Jennings, J. L., Sait, L. C., Perrett, C. A., Foster, C., Williams, L. K., Humphrey, T. J., & Cogan, T. A. (2011). *Campylobacter jejuni* is associated with , but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.005>
9. Koutsos, E. A., & Klasing, K. C. (2014). Chapter 17 - Factors Modulating the Avian Immune System. In K. A. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser (Eds.), *Avian Immunology (Second Edition)* (Second Edi, pp. 299–313). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00017-0>
10. Niu, Z. Y., Liu, F. Z., Yan, Q. L., & Li, W. C. (2009). Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 88(10), 2101–2107. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00220>
11. O’Leary, M. C., Harding, O., Fisher, L., & Cowden, J. (2009). A continuous common-source outbreak of campylobacteriosis associated with changes to the preparation of chicken liver pâté. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 383–388. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001003>
12. Piccirillo, A., Zandonà, L., Carraro, L., Apostolakos, I., Bano, L., Università, V., & Pd, L. (2018). Identificazione di ceppi di *Campylobacter* spp . isolati da episodi di Epatite Vibronica Aviare (AVH) / Spotty Liver Disease (SLD) del broiler e della gallina ovaioia. *Atti Della Società Italiana Di Patologia Aviare 2018: LVII Convegno Annuale e III Simposio Scientifico, Parma, 14 Settembre 2018.*, 161–166.

13. Sahin, O., Terhorst, S. A., Burrough, E. R., Shen, Z., Wu, Z., Dai, L., Tang, Y., Plummer, P. J., Ji, J., Yaeger, M. J., & Zhang, Q. (2017). Key role of capsular polysaccharide in the induction of systemic infection and abortion by hypervirulent *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 85(6), 1–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00001-17>
14. Sanyal, S. C., Islam, K. M. N., Neogy, P. K. B., Islam, M., Speelman, P., & Huq, M. I. (1984). *Campylobacter jejuni* Diarrhea Model in Infant Chickens. 43(3), 931–936.
15. Sevoian, M., Winterfield, R. W., & Goldman, C. L. (1958). Avian Infectious Hepatitis. I. Clinical and Pathological Manifestations. *Avian Diseases*, 2(1), 3–18. <https://doi.org/10.2307/1587509>
16. Skelly, C., & Weinstein, P. (2003). *Review Pathogen Survival Trajectories : An Eco-Environmental Approach to the Modeling of Human Campylobacteriosis Ecology*. 111(1), 19–28. <https://doi.org/10.1289/ehp.5312>
17. Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., & Pasmans, F. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1284–1289. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47342-0>
18. Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Anwar, A., Scott, P. C., & Moore, R. J. (2017). Induction of spotty liver disease in layer hens by infection with *Campylobacter hepaticus*. *Veterinary Microbiology*, 199, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.033>
19. Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Scott, P. C., & Moore, R. J. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4518–4524. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001383>