

Détection de *Campylobacter* spp thermophile associé à l'hépatite vibrionique/foie marbré dans un élevage de poulet fermier

Y. BIDOUDAN¹, M. MOUAHID²

(Reçu le 23/03/2021; Accepté le 27/03/2021)

Résumé

Durant le mois de Juillet 2020, 5 poulets fermiers âgés de 44 jours (cas 2) et 2 autres âgés de 71 jours (cas 1) provenant de deux bâtiments différents du même élevage ont été référés pour cause de diarrhées et une augmentation du nombre des mortalités. À l'autopsie, une péricardite, une périhépatite fibrineuses, une entérite, des ulcères au niveau du gésier, et de multiples foyers de nécrose (1 mm~) au niveau du foie associés à une hépatomégalie, et une splénomégalie avec congestion de la rate ont été relevées. Un sujet du cas 2 a présenté nombreux petits foyers jaunâtres (granulomes) de 1-2 mm de diamètre. Des calques de foie et de la bile ont été réalisés sur des cartes FTA pour une PCR en temps réel, ensuite des prélèvements du cœur, du foie, la rate et la moelle osseuse du fémur ont été prélevés stérilement pour la bactériologie. Des sections du foie, de la rate, et des reins ont été mis dans une solution de formol 10 % phosphaté pour l'histopathologie. Des colonies d'*Escherichia coli* non-typable ont été présentes chez les sujets du cas 2. L'histopathologie a révélé une hépatite nécrosante, une déplétion lymphoïde sévère au niveau de la rate, et des colonies bactériennes basophiles denses ont été relevées au niveau du foie et de la rate du sujet avec les granulomes, les vaisseaux sanguins des organes prélevés étaient remplis d'amas de fibrine et de thrombocytes. La PCR a révélé la présence de *Campylobacter* spp thermophile.

Mots clés: *Campylobacter* spp, hépatite vibrionique, Spotty liver disease, poulet fermier

Detection of campylobacter spp related to liver granulomas/spotty liver disease in a flock of backyard chickens in Morocco

Abstract

In July 2020, 5 dead birds aged 44 days (case 2) and 2 others aged 71 days (case 1) from two rearing units of the same flock of backyard chickens were presented for diagnostic. The birds manifested diarrhea and an elevated mortality rate. At necropsy, fibrinous pericarditis and perihepatitis, enteritis, gizzard ulcers, and multiple small (1 mm~) grey necrotic foci were present in the liver, along with hepatomegaly, splenomegaly and congestion, one bird in case 2 presented multiple liver granulomas. Samples of the liver, spleen, bone marrow, and heart were taken in a sterile manner for bacteriology. Specimens of the liver, spleen, and kidney were fixed in a solution of 10 % buffered formalin for histopathology. The liver presented necrotic hepatitis, and multiple granulomas with a center of dense deeply basophilic bacterial colonies, surrounded by a slim fibrous sheath in a bird of case 2. Severe lymphoid depletion was noted in the spleen. The blood vessels of these organs and the kidney were filled with thrombi of fibrin and platelets. Bacterial cultures on the samples showed positive results for *Escherichia coli* non-typable in case 2 and Real-time PCR carried out on samples taken on FTA card of the liver and bile revealed positive results for thermophilic *Campylobacter* spp.

Key words: *Campylobacter* spp, vibrionic hepatitis, spotty liver disease, backyard chickens

INTRODUCTION

Campylobacter spp appartient à la famille des campylobacteriaceae superfamille VI. Une bactérie gram négatif, non sporulée, ayant une morphologie incurvée (en S) se transformant en forme de cocci face à des conditions délétères comme un milieu riche en oxygène (Alexander *et al.*, 2003; Skirrow, 1994; Skirrow, 2006). Elles sont connues par leurs exigences de croissance particulièrement fastidieuses, une durée d'incubation assez longue (de 3 à 7 jours) dans une ambiance microaérophilique. *Campylobacter*spp a été décrit pour la première fois en 1886 par Theodor Escherich à partir du colon des enfants atteints de cholera infantile (Van *et al.*, 2016). En 1905 Mcfadyean a décrit la même bactérie durant ses investigations concernant des épizooties d'avortements infectieux chez un troupeau de brebis en Angleterre (Macfadyean et Stockman, 1913 cité par Skirrow, 2006). En 1919, Smith et Taylor ont isolé la bactérie pour la première fois chez des troupeaux de bovins manifestant des avortements aux Etats Unis (Smith and Taylor, 1919); Ils ont nommé l'agent isolé *vibrio fetus*. Sebald et Veron ont remarqué que cette bactérie microaérophilique constitue un genre distinct des «vibrioses», et ils l'ont renommé *campylobacter fetus* en 1963 (Sebald and Veron, 1963; Véron and Chatelain, 1973). L'infection à *campylobacter fetus* chez l'Homme

reste rare *Campylobacter fetus* (Skirrow, 2006). Cependant, les campylobacters associés à la gastro-entérite aiguë chez l'Homme appartiennent à un groupe distinct désigné «thermophile» qui fait allusion à leur température optimale de croissance (42°C- 43°C) comparativement aux autres campylobacters. Ce groupe représente un véritable risque pour la santé publique dépassant les salmonelles (Asmai *et al.*, 2019). Les quatre espèces les plus redoutables sont *C. jejuni* et *C. coli* et à moindre degré *C. lari* et *C. upsaliensis*, appelées aussi couramment «la bactérie de la volaille». De plus l'infection à *Campylobacter* chez l'Homme est à l'origine du syndrome Guillain-Barré, une maladie auto-immune post infectieuse (Swayne *et al.*, 2013).

Les espèces aviaires, notamment la volaille domestique, sont considérées comme des porteurs asymptomatiques du pathogène, le portage est généralement intestinal avec ou sans manifestations cliniques (Alexander *et al.*, 2003; Jennings *et al.*, 2011; Skirrow, 1994) Swayne *et al.*, 2013). Peu d'importance a été accordée à l'étude de la pathogénicité de la bactérie chez le poulet jusqu'aux années 1950s, une hépatite nécrosante fut attribuée à *Campylobacter jejuni* et a été rapportée dans plusieurs pays (Peckham, 1958), la pathologie fut appelée l'hépatite vibrionique. Les rapports de la maladie ont disparu vers les années 1970s. Depuis les années 2000, plusieurs auteurs ont décrit la ré-émergence

¹ Cabinet vétérinaire privé, Témara, Maroc

² Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaires, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Rabat, Maroc

de la maladie (Crawshaw and Young, 2003) connue actuellement sous le nom spotty liver disease SLD (foie marbré). Nous rapportons dans cet article une hépatite nécrosante et des granulomes au niveau du foie, avec cliniquement une diarrhée dans un élevage de poulet fermier au Maroc, associés aux campylobacters thermophiles. Le cas présente son importance de deux facteurs: (1) La bactérie mise en évidence a des répercussions sur la santé publique et (2) ce type d'élevage constitue actuellement une tendance lourde comme niche pour les investisseurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Historique du cas

Les poulets examinés proviennent d'un élevage multi-âge, semi-extensif de poulet fermier. La sortie sur le parcours extérieur durant la journée commence vers l'âge de 3 semaines. Le site comprend plusieurs petits bâtiments insérés dans une rotation avec une mise en place chaque semaine de sorte qu'il n'y a jamais de vide sanitaire complet de la ferme. Les bâtiments affectés comprenaient environ 1300 sujets chacun. Depuis Juillet 2020 le bâtiment du cas 2 (âge de 71 jours) a enregistré des diarrhées et une élévation du nombre des mortalités (8 sujets par jour pendant 4 jours) et le bâtiment du cas 1 (âge de 44 jours) a enregistré les mortalités suivantes: 2-6-5-11 sujet/ jour.

Analyse microbiologique

Des échantillons de foie, de la rate, du cœur, de la grappe ovarienne, et de la moelle osseuse du fémur provenant de 3 sujets du cas 2, et de 2 sujets du cas 1 ont été prélevés de manière stérile, et acheminés ensuite à l'unité de bactériologie. Une recherche d'*Escherichia coli* pathogène et de *salmonella* a été réalisée en utilisant le milieu EMB (Eosin Methylene Blue), XLD (Xylose lysine Désoxycholate), et le vert brillant suivant les normes marocaines en vigueur NM 08.0.133 et NM 08.0.550 pour *E. coli* et *salmonella* respectivement. Les prélèvements ont été aussi étalés sur les milieux TSA (Tryptase Soy agar), la gélose au sang, et le milieu Chapman (Oxoid, France) pour la recherche des pasteurelles et des staphylocoques respectivement.

Examen histopathologique

Des portions du foie, de la rate, et des reins prélevés sur 3 sujets ont été prélevés et mis dans une solution de formol 10 % neutralisé pour l'examen histopathologique. Une coloration à l'hématoxyline-Eosine (H&E) a été effectuée. Le logiciel Liteview® a été utilisé pour ajuster la qualité des images, mais aucune modification n'a été apportée.

PCR en temps réel

Des calques du foie et de la bile ont été prélevés sur des cartes FTA (Flinders Technology Associates). L'extraction de l'ADN a été réalisée moyennant un Kit KYLT® (AniCon, RFA) conformément aux directives du fabricant. L'amplification a été effectuée dans les conditions suivantes: 95°C pendant 10 min, suivi de 42 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, et finalement l'hybridation/extension à 60°C pendant 1 min. La révélation est basée sur la technologie Taqman, l'ADN de *Campylobacter* est marqué par le FAM et le contrôle interne par le HEX. Un échantillon est considéré positif lorsque le Ct (cycle de Threshold) est inférieur à 42.

RÉSULTATS

Autopsie

Les oiseaux reçus ont été désinfectés puis ouverts pour l'examen nécropsique soit un total de deux poulets du cas 2 et 5 autres du cas 1, les lésions observées sont présentées au niveau du tableau 1.

Tableau 1: Lésions macroscopiques relevées à l'autopsie

	Cas 1	Cas 2
Coeur	RAS (Rien à signaler)	Péricardite fibrineuse
Gésier et proventricule	RAS	Ulcère du gésier Hémorragie au proventricule
Intestin	Entérite mucoïde	Entérite mucoïde
Foie	Hépatomégalie Multiples foyers de nécrose	Congestion Foyers de nécrose focaux (1-2 mm) Périhépatite fibrineuse Granulomes
Rate	Splénomégalie Congestion	RAS

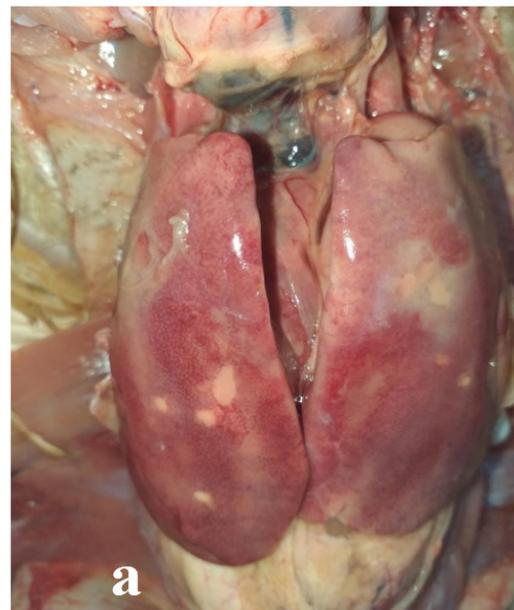


Figure 1: (a) présente des foyers de nécrose de 3 mm~ au niveau du foie d'un sujet du cas 1, (b) Congestion et splénomégalie chez le même sujet

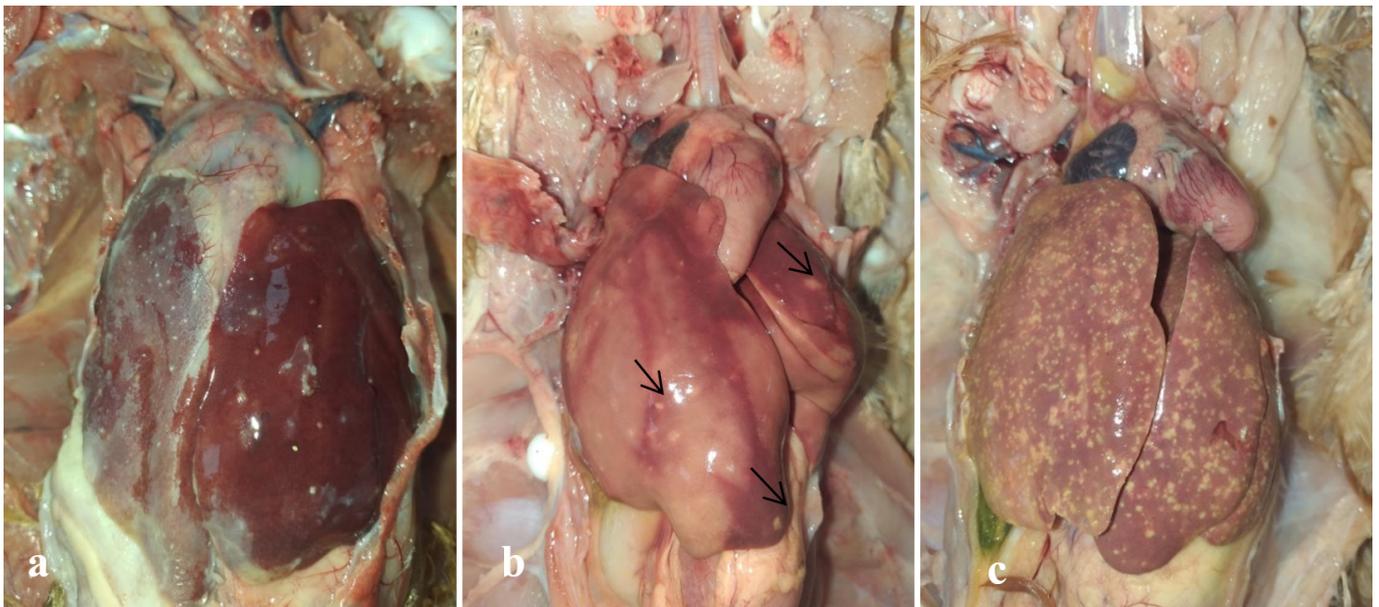


Figure 2 (a, b, c): Des foies de 3 sujets provenant du cas 2, (a) montre des petits foyers de nécrose, grisâtres en tête d'épingle avec périhépatite fibrineuse et péricardite fibrineuse, (b) les foyers de nécrose sont plus grands comparativement au sujet fig 2a (flèches noires) avec des plages de décoloration, (c) multiples granulomes jaunâtres (comparer avec la nécrose de fig 2 a et fig 2 b)

Analyses microbiologiques

La recherche de salmonelles sur les foies et rates prélevés des deux casa été négative sur culture directe et après 24 H d'enrichissement. La culture bactérienne des foies du cas 2 a révélé des colonies compatibles avec *E. Coli* sur le milieu EMB. Le sérotypage a révélé une *E. Coli* non typable. Les autres cultures bactériennes utilisées pour la détection de pasteurelle et de *Staphylococcus* ont été négatives.

Examen histopathologique

Les lésions que nous avons relevées sont présentées dans le tableau 2 et la figure 3.

La PCR en temps réel

La PCR en temps réel réalisée sur les calques du foie et la bile a révélé la présence de *Campylobacter* spp thermophile avec des CT de 28,9 et 23,3 pour le cas 1 et cas 2 respectivement.

Tableau 2: résultats de l'examen histopathologique des organes

Organes	Cas 1	Cas 2
Foie	<p>Phlébites avec présence de colonies bactériennes attachées à la paroi vasculaire.</p> <p>Zones diffuses de nécrose des hépatocytes.</p> <p>Présence de colonies bactériennes basophiles au centre de quelques foyers de nécrose.</p>	<p>Des foyers de nécrose des hépatocytes oblitération des veines (portes et Centro-lobulaires) par des thrombus de fibrine et des thrombocytes, quelques vaisseaux contiennent des colonies bactériennes. Infiltration périvasculaires par les hétérophiles et les lymphocytes.</p> <p>Présence de multiples granulomes centrés par des masses denses basophiles (colonies bactériennes) encapsulées par une fine lame fibreuse et un anneau de nécrose hépatocytaire chez le sujet manifestant des granulomes à l'autopsie</p>
Rate	<p>Déplétion lymphoïde sévère et prolifération des cellules réticulaires</p> <p>Petites colonies bactériennes basophiles</p>	<p>Déplétion lymphoïde sévère avec une nécrose fibrinoïde</p> <p>Accumulation de la fibrine, des thrombocytes, et des macrophages au niveau des vaisseaux sanguins.</p> <p>Granulomes multiples ayant la même organisation que ceux du foie et résorption de certains par des macrophages (cellules géantes) et présence de petits amas de fibrine adjacents.</p>
Reins	Thrombus de fibrine au niveau des vaisseaux sanguins	Thrombus de fibrine au niveau des vaisseaux sanguins

vaisseaux sanguins

vaisseaux sanguins

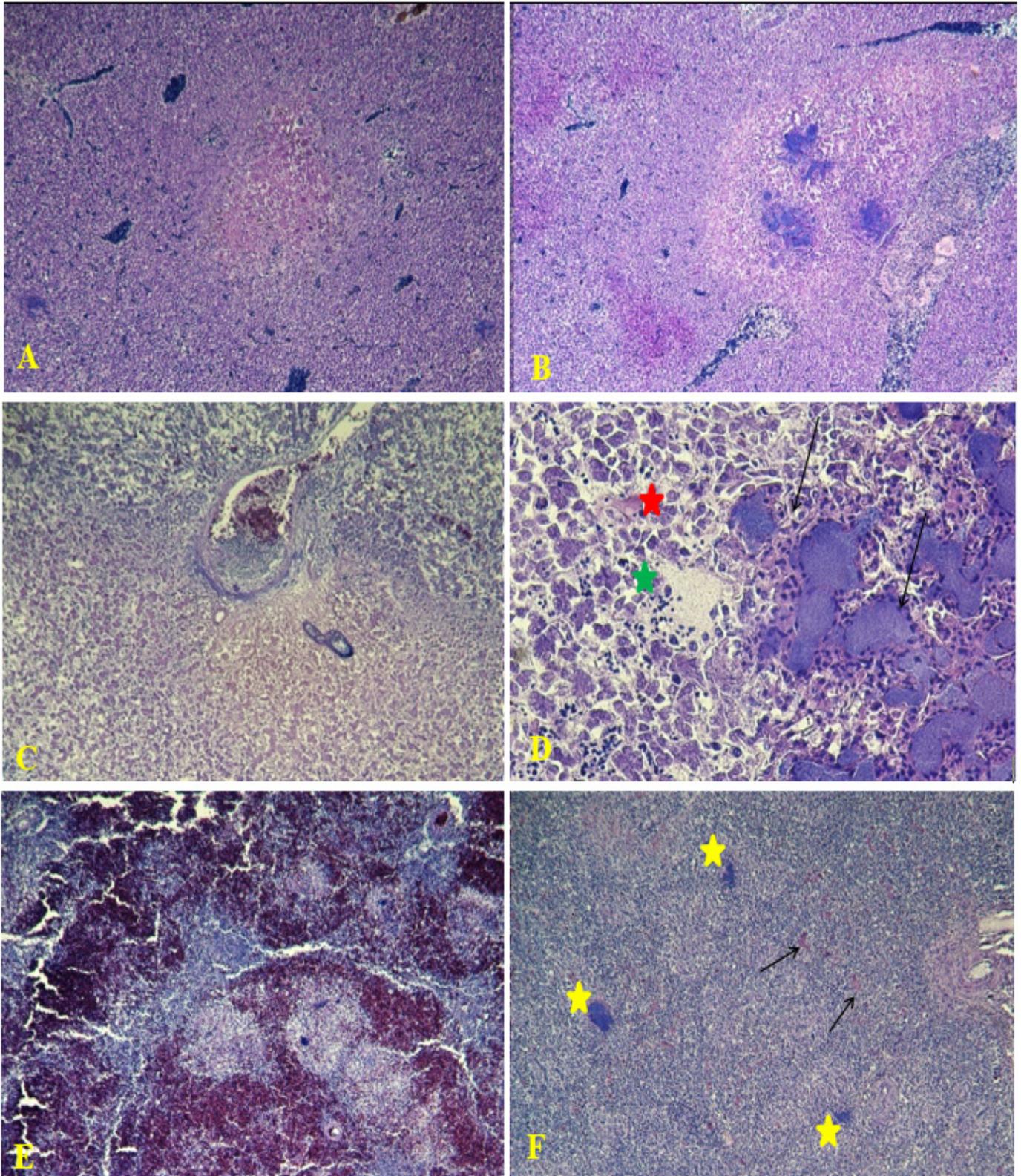


Figure 3: photomicrographie des foies et rates des sujets prélevées H&E. (A) montre un foyer de nécrose des hépatocytes d'un sujet du cas 2 (x 100). (B) montre une zone de nécrose hépatocytaire centrée par des colonies bactériennes denses basophiles entourées par une fine lame fibreuse et des macrophages (x100). (C) phlébite avec des colonies bactériennes associées à la paroi vasculaire, noter la nécrose des hépatocytes périvasculaires et l'oblitération de la veine par des globules rouges et des thrombocytes (x 100). (D) grossissement x4 00 montrant un granulome, noter la fine lame de fibroblastes entourant les colonies bactériennes (flèches), le dépôt de fibrine (étoile rouge) et un granulome résorbé (étoile verte). (E) déplétion lymphoïde sévère au niveau de la rate avec hémorragie et des colonies bactériennes (cas 1). (F) déplétion lymphoïde, dépôt de petits amas de fibrine (flèches) et des colonies bactériennes (étoiles)(x 100)

DISCUSSION

Les campylobacters thermophiles sont bien adaptés au tube digestif des oiseaux, ils sont normalement présents au niveau de l'intestin des espèces aviaires domestiques, notamment le poulet, la dinde, les canards, et les oies (Jennings *et al.*, 2011; Swayne, *et al.*, 2013). En outre, Skirrow (1994) a rapporté le taux de portage le plus élevé chez la volaille comparativement aux autres espèces (primates, équidés, ruminants, et porcins). La bactérie colonise extensivement le gros intestin sans répercussion clinique ou lésionnel, dans certains cas, elle peut être associée à une légère diarrhée, et une légère chute de ponte chez la poule pondeuse (Alexander *et al.*, 2003; Skirrow, 1994; Swayne *et al.*, 2013). Elle a aussi été détectée au niveau du foie et du sang des oiseaux cliniquement sains (Crawshaw, 2019; Lemos *et al.*, 2015; Skirrow, 1994). Le germe est également résistant à la bile, son isolement est même plus aisé sur celle-ci comparativement au foie (Crawshaw, 2019).

La pathogénicité des campylobacters thermophiles chez les oiseaux n'est pas bien élucidée, notamment en raison de leur importance économique négligeable, ils tirent leur importance du risque qu'ils constituent pour la santé publique (Swayne *et al.*, 2013). Toutefois, entre les années 1950s et 1970s, une hépatite nécrosante a été rapportée chez la volaille aux Etats Unis, au Canada, en Europe, et en Australie (Alexander *et al.*, 2003; Crawshaw, 2019; Peckham, 1958). La maladie a été associée à un microorganisme vibrio-like, d'où son nom l'hépatite vibrionique aviaire HVA (ou avian vibronic hepatitis AVH). L'étiologie n'a pas été établie notamment à cause de sa disparition après l'apparition des élevages en cage chez la pondeuse. Peckham (1958) a associé la maladie à *Campylobacter jejuni*. A partir des années 1980s, une pathologie similaire au AVH, nommée foie marbré (ou SLD spotty liver disease) est apparue en Australie, elle a aussi été rapportée en Angleterre, et en Écosse. Depuis, les termes AVH et SLD sont utilisés comme synonymes pour désigner une hépatite nécrosante focale à allure sporadique chez la volaille (Jennings *et al.*, 2011). Les deux maladies se ressemblent sur le plan clinique, lésionnel, et épidémiologique. Cependant, l'étiologie de l'AVH n'a pas été établie, pareillement l'étiologie du SLD est toujours discutée. Lam *et al.* (1992) ont effectué une infection expérimentale par *C. jejuni* isolés à partir des fientes de poulet et du foie de la dinde, les deux espèces ont été inoculées par leurs isolats respectivement, l'étude a conclu que le germe cause une mortalité embryonnaire chez le poulet et la dinde mais seul l'isolat de la dinde a pu reproduire la nécrose hépatique.

Parallèlement en 2011, Jennings *et al.* ont prouvé que *C. jejuni* seul ne peut pas causer la maladie chez le poulet et que sa pathogénicité dépend d'un autre facteur intrinsèque à l'hôte. En 2015, Crawshaw *et al.* ont identifié une nouvelle espèce de campylobacters thermophiles, appelée *Campylobacter hepaticus* reconnue actuellement comme agent causal du foie marbré SLD chez la poule pondeuse élevée au sol. Toutefois, aucun prélèvement des cas déclarés de l'AVH n'a été conservé pour pouvoir extraire le matériel génétique de l'agent causal. La différence entre les deux maladies réside dans le fait que les cas de l'AVH ont rapporté des hémorragies sous capsulaires au niveau du foie (Crawshaw, 2019). Crawshaw *et al.*, (2015) ont émis l'hypothèse d'une possibilité d'erreur de diagnostic

puisque l'hémorragie sous capsulaire du foie est actuellement attribuée au syndrome du foie gras hémorragique ou l'hépatite E (HEV), ils ont aussi suspecté une probabilité de coinfection chez ces oiseaux. En effet (Crespo *et al.*, 2015) ont rapporté une forme atypique de l'hépatite E chez des poules pondeuses d'un élevage biologique. Les oiseaux ont manifesté des chutes de pontes d'environ 40 %, un taux de mortalité hebdomadaire de 1%, à l'autopsie des foyers de nécrose multifocaux similaires à ceux observées lors de l'hépatite vibrionique ont été notés. La PCR réalisée a révélé 50 % de cas positifs pour le gène de l'hélicase et 90 % pour le gène de la protéine de la capsid du virus de l'hépatite E et un cas positif de *Campylobacter* spp sur six prélèvements de foie testés (Crespo *et al.*, 2015).

Les poulets fermiers rapportés dans le présent article ont présenté une faible morbidité caractérisée par des diarrhées, des foyers de nécrose multifocaux avec périhépatite fibrineuse, une entérite mucoïde, et un cas de granulomes. Le tableau clinique et lésionnel est compatible avec ceux décrits lors de l'AVH/ SLD. En effet, La pathologie est caractérisée par des petits foyers de nécrose grisâtres de 1-2 mm de diamètre et une périhépatite fibrineuse avec occasionnellement une ascite, des points de nécrose coalescents en forme de chou-fleur ont aussi été rapportés (Burch, 2005; Crawshaw, 2019; Crawshaw and Young, 2003; Jennings *et al.*, 2011). Une entérite légère a aussi été décrite par Grimes and Reece (2011). Par ailleurs, les conditions de cet élevage concordent avec le contexte épidémiologique de l'apparition de la maladie. Effectivement, celle-ci touche principalement les pondeuses élevées au sol pendant le pic de ponte, les poulets élevés en extensifs, et plus rarement les pondeuses en cage, les reproducteurs, et les poulets de chair (Grimes and Reece, 2011). En outre, l'analyse bactériologique du cas 2 a révélé la présence d'une *E. coli* non typable, qui pourrait être à l'origine de la septicémie et aux inflammations fibrineuses de la capsule du foie et du péricarde. En effet, l'examen histopathologique a relevé des thrombus de fibrine et de thrombocytes intravasculaires au niveau du foie, de la rate et des reins associées à des colonies bactériennes au niveau des veines portes témoignant d'une septicémie bactérienne (Abdul-Aziz *et al.*, 2016; Fletcher, 2008).

Jennings *et al.* (2011) ont affirmé que le développement des lésions hépatique dépend de la charge bactérienne et du stress lié aux conditions d'élevage et aux infections ce qui entrave la réponse immunitaire cellulaire à *C. jejuni*, favorisant ainsi la manifestation de la maladie. Nous estimons que les poulets des deux cas étudiés ont développé des lésions sévères du fait de l'excrétion continue et de la charge bactérienne importante dans l'environnement favorisées par le non-respect du vide sanitaire associé au stress du climat. D'ailleurs en Australie, la pathologie est couramment appelée «hépatite de l'été» (Grimes and Reece, 2011). Également, le stress infectieux exacerbé par la présence de *E. coli* pourrait être l'origine de la sévérité des lésions rapportées, nous estimons aussi que la forte charge bactérienne dans l'environnement est à l'origine du développement des granulomes chez le sujet rapporté. En effet Skirrow (1994) a affirmé que l'excrétion de *Campylobacter* spp dans les fientes de volaille peut persister jusqu'à 3 mois, ce qui explique la prédisposition des élevages au sol à la maladie, contrairement à l'élevage en cage

ou les fientes sont systématiquement éliminées, d'ailleurs (Crawshaw, 2019) a lié la disparition de la AVH vers les années 1970s à l'élimination de la source d'exposition de l'environnement à savoir les élevages au sol. Effectivement, très récemment au Maroc, Asmai *et al.* (2020) ont isolé 75 souches de *Campylobacter* à partir de 105 écouvillons cloacaux de poulet de chair soit 73 % de positivité à *Campylobacter* spp., parmi lesquelles 42 souches se sont avérées être *C. coli*.

CONCLUSION

La campylobacteriose est une pathologie ré-émergente posant un véritable danger pour la santé publique non seulement pour le consommateur mais aussi pour les professionnels du secteur, en effet, Lemos *et al.*, (2015) ont proposé l'usage des atteintes hépatiques comme outil d'épidémiologie-surveillance des campylobacters au niveau des abattoirs avicoles. En outre le portage asymptomatique chez la volaille de basse-cour, et l'excrétion de grande quantités du pathogène pourrait constituer un véritable danger pour les élevages avicoles structurés. L'infection chez la pondeuse en pic pourrait générer des pertes économiques directes liées aux chutes de ponte et aux mortalités. La mortalité est généralement étalée sur une période de 6 à 8 semaines (mortalité hebdomadaire de 1-4%). La chute de ponte peut être aiguë vers le pic de ponte (perte de 10 – 25 %) ou une chute répartie sur toute la période de production (10-15%). Les pondeuses autour du pic sont particulièrement sensibles au pathogène probablement en raison du changement hormonal et du stress lié à la production, ou suite à l'élévation du taux de fer dans le sang qui est un facteur de croissance important pour la bactérie (Crawshaw, 2019). De plus certaines espèces de campylobacters sont devenues résistantes à certains antibiotiques ce qui va entraver le contrôle de la bactérie à long terme (Asmai *et al.*, 2020).

RÉFÉRENCES

Abdul-Aziz T., Fletcher O.J., Barnes H.J., Shivaprasad H., Swayne D.E. (2016). Avian histopathology. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida.

Alexander, D., Saif, Y., Barnes, H., Glisson J., Fadly A., McDougald L., Swayne D., (2008). Diseases of poultry. Blackwell Pub. Professional, Ames, IA.

Asmai R., Karraouan B., Es-soucratti K., En-Nassiri H., Bouchrif B., Karib H., Triqui R. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter coli* isolated from broiler farms in the Marrakech Safi region, Morocco. *Veterinary World*, 13: 1892.

Asmai R., Triqui R., Karib H., Bouchrif B., Es-soucratti K., En-Nassiri H. (2019). *Campylobacter* spp. dans les produits alimentaires d'origine animale. *Revue Marocaine des sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 7: 463-471.

Burch D., (2005). Avian vibronic hepatitis in laying hens. *Veterinary record* 157: 528.

Crawshaw T. (2019). A review of the novel thermophilic *Campylobacter*, *Campylobacter hepaticus*, a pathogen of poultry. *Transboundary and emerging diseases*, 66: 1481-1492.

Crawshaw T., Young S., (2003). Increased mortality on a free-range layer site. *Veterinary Record*, 153.

Crawshaw T.R., Chanter J.I., Young S.C., Cawthraw S., Whatmore A.M., Koyle 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. *Veterinary microbiology*, 179: 315-321.

Crespo R., Opriessnig T., Uzal F., Gerber P.F. (2015). Avian hepatitis E virus infection in organic layers. *Avian diseases*, 59: 388-393.

Fletcher O.J. (2008). Avian histopathology.

Grimes T., Reece R. (2011). Spotty liver disease—an emerging disease in free range egg layers in Australia. In: Proc. 16th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA, 53-56.

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*, 149:193-199.

Lemos A., Morais L., da Conceição Fontes M., Pires I., Vieira-Pinto M. (2015). *Campylobacter* spp. isolation from infected poultry livers with and without necrotic lesions. *Food Control*, 50: 236-242.

McFadyean J., Stockman S. (1913). Abortion in sheep. Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and Fisheries to inquire into Epizootic abortion. HMSO, London, United Kingdom.

Peckham M. (1958). Avian vibronic hepatitis. *Avian Diseases*, 2: 348-358.

Sebald M., Veron M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. In Annales de l'Institut Pasteur, 897.

Skirrow M., (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of comparative pathology*, 111: 113-149.

Skirrow M.B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clinical infectious diseases*, 43: 1213-1217.

Smith T., Taylor M.S. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *The Journal of experimental medicine*, 30: 299-311.

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*, 66:4518-4524.

Véron M., Chatelain R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23:122-134.