



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Aplicación del análisis de los polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa y resistotipo para identificar potenciales brotes de campilobacteriosis no diagnosticados en España[☆]

David Pérez-Boto*, José Antonio López-Portolés, Cristina Simón y María Aurora Echeita

Unidad de Enterobacterias, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de abril de 2013

Aceptado el 16 de julio de 2013

On-line el 17 de octubre de 2013

Palabras clave:

Campylobacter

Brotes no diagnosticados

flaA

Electroforesis en campo pulsante

Secuenciación de múltiples *locus* de genes

constitutivos

RESUMEN

Introducción: Los brotes detectados de campilobacteriosis son poco frecuentes y, por lo general, cursan con un bajo número de pacientes, aunque se estima que muchos más permanecerían sin diagnosticar. Las técnicas de investigación de brotes más exitosas en *Campylobacter* spp. (PFGE, MLST) tienen el inconveniente de ser laboriosas y no estar disponibles en muchos laboratorios.

Métodos: Durante el año 2008 se recibieron 352 aislados de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de 16 hospitales. Todas las cepas fueron tipificadas genotípicamente mediante RFLP-PCR-*flaA* (tipo *flaA*) y fenotípicamente con su resistotipo. Se estableció que aquellas cepas de la misma especie procedentes del mismo hospital, aisladas en un periodo de hasta 11 días, con valores de CMI de ± 1 dilución y con el mismo tipo *flaA*, podrían pertenecer a un brote. Las cepas que cumplieren con estos criterios serían posteriormente tipificadas mediante *KpnI*-PFGE y MLST.

Resultados: Veintitrés de los 352 aislados, en 10 grupos, cumplían con los criterios de pertenencia a posibles brotes no diagnosticados. En 8 grupos los pulsotipos (PFGE) de los aislados de cada grupo tenían una semejanza entre ellos mayor del 95%. En 7 de ellos los secuenciotipos (MLST) eran coincidentes.

Conclusiones: El uso de 2 marcadores sencillos (resistotipo y RFLP-PCR-*flaA*) puede detectar aislados que probablemente formen parte de un brote de campilobacteriosis no diagnosticado. Para su confirmación se requieren otros marcadores moleculares y los datos epidemiológicos de cada aislado. El estudio apunta a que, como en otros países, el número de brotes de campilobacteriosis en España está probablemente infraestimado.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Application of restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction-*flaA* and resistotype to identify potential undiagnosed outbreaks of campylobacteriosis in Spain

ABSTRACT

Introduction: Outbreaks of campylobacteriosis are infrequent and usually involve a low number of patients, although it is estimated that many more remain undiagnosed. The most successful techniques for outbreak investigation in *Campylobacter* spp. (PFGE, MLST) have the drawback of being laborious and not available in many laboratories.

Methods: During the year 2008, 352 isolates of *C. jejuni* and *C. coli* from 16 hospitals were received in our laboratory. All strains were genotyped by RFLP-PCR-*flaA* (*flaA* type) and phenotyped with their resistotype. It was established that the strains of the same species from the same hospital, isolated over a period of up to 11 days, with MIC values of ± 1 dilution with the same *flaA* type could belong to an outbreak. Strains that met these criteria would be later subtyped by *KpnI*-PFGE and MLST.

Keywords:

Campylobacter

Undiagnosed outbreaks

flaA

Pulse field gel electrophoresis

Multi-locus sequence typing

[☆] Actualmente, el primer autor posee una beca en la "Sección de Microbiología Alimentaria". Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Madrid, España.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dperez@externos.msssi.es (D. Pérez-Boto).

Results: A total of 23 out of 352 isolates, distributed in 10 groups, met the criteria for being associated with putative undiagnosed outbreaks. The similarity of the PFGE-profiles in 8 groups was greater than 95% among the isolates from each group. In 7 of the groups, the sequence types (MLST) were coincident. **Conclusions:** The use of 2 easy markers (resistotype and RFLP-PCR-*flaA*) may detect isolates probably belonging to an undiagnosed outbreak of campylobacteriosis. Accurate diagnosis requires other molecular markers and epidemiological data of each isolate. The study suggests that, as in other countries, the number of outbreaks of campylobacteriosis in Spain is probably underestimated.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las especies termofílicas del género *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni* junto con *C. coli*) son la principal causa de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial¹. Se estima que debido a las características de la infección, con una sintomatología en ocasiones leve, la mayoría de los datos de campilobacteriosis están infraestimados². El consumo o manipulación de la carne de pollo es contemplado como el principal factor de riesgo en la adquisición de la infección, aunque la mayoría de los casos son esporádicos³. A diferencia de otros patógenos alimentarios, como *Salmonella enterica* o *Staphylococcus aureus*, los brotes de campilobacteriosis se notifican de forma infrecuente y, por lo general, implicando un número reducido de casos⁴. Salvo algunos incidentes documentados en la literatura científica, los brotes con mayor número de casos se asocian principalmente al consumo de agua⁵, como por ejemplo 442 casos en Finlandia durante el verano del año 1998⁶, 105 en Noruega⁷ o 71 en Japón⁸.

La investigación de brotes en patógenos alimentarios se basa en la comparación de diferentes marcadores fenotípicos y genotípicos, junto con los datos epidemiológicos preexistentes, para establecer si las cepas investigadas tienen un origen común. Generalmente se considera que la técnica de tipificación molecular de elección en investigación de brotes es la *pulse field gel electrophoresis* (PFGE, «electroforesis en gel de campo pulsante») ^{9,10}, aunque en los últimos años se empiezan a utilizar otras como la tipificación por *multi-locus sequence typing* (MLST, «secuenciación de múltiples locus de genes constitutivos») ¹¹. En *Campylobacter* la investigación de brotes puede ser complicada por la posible coexistencia de más de una cepa dentro de un brote individual¹², esto es más evidente en los brotes originados por consumo de carne de pollo, frecuentemente colonizada por más de una cepa diferente¹³. Otra característica que dificulta el estudio de dichos brotes es la inestabilidad genética que se le atribuye a *Campylobacter*¹⁴, que hace que los perfiles moleculares puedan variar entre los aislados de un mismo brote.

Se estima que los brotes de campilobacteriosis deben ser en realidad mucho más frecuentes de lo informado, debido al bajo número de casos implicado³ y al diferente periodo de incubación que pueden tener los pacientes comprendidos en el brote, de hasta 11 días¹⁵.

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar posibles brotes de campilobacteriosis no diagnosticados, basándonos en 2 métodos de tipificación sencillos como son el perfil de resistencia de las cepas frente a antimicrobianos (valores de las concentraciones mínimas inhibitorias [CMI]) y la determinación del tipo *flaA* mediante polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR-*flaA*). Los datos que proporcionan ambos marcadores permiten preseleccionar grupos de aislados que deben ser confirmados como parte de un mismo brote mediante la aplicación de otros marcadores complementarios, junto con los datos epidemiológicos existentes.

Métodos

Origen e identificación de los aislados

Durante el año 2008 se recibieron en el Laboratorio de *Campylobacter*, perteneciente al Centro Nacional de Microbiología, 352 aislados de *Campylobacter* spp. procedentes de 16 hospitales españoles. En este periodo solo se remitió de forma específica un brote que implicaba 8 aislados de *C. jejuni*, siendo la relación entre el resto de aislados desconocida, aunque teóricamente corresponderían a casos esporádicos. En todos los aislados recibidos se determinó la especie a la que pertenecían mediante técnicas de PCR^{16–18} o de secuenciación de diferentes genes diana (ADNr 16S, *cpn60*)^{19,20}.

Test de sensibilidad a antimicrobianos y resistotipo de las cepas

Para todos los aislados de *Campylobacter* recibidos en el laboratorio se realizaron tests de sensibilidad frente a los siguientes antimicrobianos: ciprofloxacino, eritromicina, gentamicina, amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, cloranfenicol y tetraciclina (codificación según WHONET)²¹ mediante tiras E-test (bioMérieux, España). Se siguieron las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* tanto en la realización del método (turbidez del inóculo, medio de cultivo y cepa ATCC 33560 de *C. jejuni* como control de calidad), como en los puntos de corte de las CMI para diferenciar poblaciones sensibles y resistentes.

Puesto que en el *Clinical and Laboratory Standards Institute* solo están disponibles los puntos de corte para eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacino²², para el resto de antimicrobianos los puntos de corte fueron seleccionados del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (disponibles en http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (consultada 4/04/2013).

Siguiendo criterios ya publicados, consideramos a un aislado como multirresistente cuando era resistente frente a 3 o más grupos de antimicrobianos²³.

Reacción en cadena de la polimerasa. Tipificación por polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción-reacción en cadena de la polimerasa-*flaA* y secuenciación de múltiples locus de genes constitutivos. Asignación de tipos *flaA* y secuenciotipos

Para todas las PCR necesarias en el estudio se utilizó el kit de extracción de ADN genómico InstaGene Matrix (Bio-Rad, España) y el kit de amplificación de ADN Ready-To-Go System (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

El análisis de RFLP-PCR-*flaA* se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Nachamkin et al.²⁴. En resumen, se digieren 5 µl del producto de amplificación obtenido mediante PCR con 6 unidades de enzima de restricción *DdeI* (FastDigest®, Fermentas GmBH, Madrid, España) a 37 °C. Los fragmentos generados en la digestión se separaron en una electroforesis en agarosa (2,5% peso/volumen) tipo MS-8 (Pronadisa, España) en buffer TAE 1X.

Tabla 1
Tabla resumen con los datos epidemiológicos más relevantes de los aislados dentro de cada supuesto brote, los porcentajes de semejanza entre los pulsotipos obtenidos con la enzima *KpnI*, así como el secuenciotipo

N.º de brote	Hospital	N.º de casos	Periodo entre aislados (días)	Especie	Tipo fla	Resistotipo	Porcentaje de semejanza <i>KpnI</i> -PFGE	MLST (ST)
1	H7	2	3	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	100	ST464
2	H2	2	10	<i>C. coli</i>	Tipo 47	Cip ^R TCY ^R	82,76	ST827/ST6510 ^a
3	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 13	Cip ^R	100	ST429
4	H2	4	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 18	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	100	ST21
5	H2	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R Amx ^R TCY ^R	62,43	ST464/ST883
6	H2	3	9 ^b	<i>C. jejuni</i>	Tipo 4	Pansusceptible	95,65/100 ^b	ST48
7	H2	2	4	<i>C. coli</i>	Tipo 54	Cip ^R TCY ^R	96,97	ST829
8	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 1	Cip ^R TCY ^R	100	ST464
9	H7	2	0	<i>C. jejuni</i>	Tipo 35	Cip ^R TCY ^R	100	ST227
10	H7	2	3	<i>C. jejuni</i>	Tipo 30	Cip ^R TCY ^R	82,75	ST523/ST6511 ^a

^a ST6510 y ST6511 han sido descritos por primera vez en este trabajo. Las secuencias y datos han sido depositados en la base de datos internacional de MLST de *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

^b De los 3 aislados que constituirían este posible brote, 2 de ellos se aislaron con 9 días de diferencia (95,65% de semejanza entre ellos), mientras que entre los 2 aislados con un 100% de semejanza, la diferencia de aislamiento fue de un día.

De forma rutinaria, cada cepa de *C. jejuni*/*C. coli* que es remitida a nuestro laboratorio es tipificada mediante la técnica de RFLP-PCR-*flaA*. El patrón de bandas generado se compara con los ya existentes por medio del software InfoQuest FP Software (Bio-Rad, España) mediante el índice de Dice (optimización 1% y tolerancia 1%) y a cada patrón nuevo (al menos una banda de diferencia) se le asigna un nuevo tipo *flaA*.

Para la técnica de MLST se utilizaron los primers y el programa de PCR disponible en la página web: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>, amplificándose fragmentos de los 7 genes constitutivos seleccionados para *C. jejuni*/*C. coli*: *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*. Los productos de PCR se purificaron usando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos purificados se realizó con un kit comercial (Big Dye Ready Reaction Mix version 3.1, Applied Biosystems, EE. UU.). Se asignaron los tipos de alelos correspondientes a cada secuencia de cada gen por comparación con los de la base de datos de MLST, disponibles en: <http://pubmlst.org/campylobacter/>. Los secuenciotipos (ST), combinación de los 7 alelos de cada aislado, se asignaron de igual modo de acuerdo con los resultados obtenidos tras la comparación de estos en la base de datos de MLST.

Electroforesis en gel de campo pulsante

La preparación del ADN genómico de cada aislado se realizó siguiendo el método estandarizado para *Campylobacter*²⁵. La digestión del ADN genómico se hizo utilizando la enzima *KpnI* (FastDigest[®] Fermentas, ThermoFisher, España). Los geles de agarosa se prepararon al 0,9% de concentración (peso/volumen) en TBE 0,5X y las condiciones de electroforesis fueron las previamente establecidas por On et al. para la enzima *KpnI*²⁶.

Los perfiles de bandas generados en la técnica de PFGE (pulsotipos) se analizan definiéndose patrones de bandas para cada aislado y se comparan con los ya existentes por medio del software InfoQuest FP Software (Bio-Rad, España), en las mismas condiciones (optimización y tolerancia) que en el caso de RFLP-PCR-*flaA*. Los árboles de semejanzas entre pulsotipos (dendrogramas) se construyen usando el método *unweighted pair group method with arithmetic mean*.

Resultados

Durante el año 2008, se recibieron 352 aislados del género *Campylobacter*, procedentes de 16 hospitales en España. De ellos, 282 fueron identificados como *C. jejuni*, y 52, como *C. coli*, mientras que en 12 aislados había coinfección de más de una

especie. De forma minoritaria se identificaron otras especies: *C. lari* (n = 1), *C. fetus* sbsp. *fetus* (n = 4), *C. curvus* (n = 1). A todos los aislados identificados como *C. jejuni* o *C. coli* (n = 334) se les realizó un antibiograma frente a 7 antimicrobianos y se tipificaron molecularmente mediante la técnica RFLP-PCR-*flaA*. Esto generó una base de datos con los valores de CMI de cada cepa (y sus perfiles de resistencia) y el tipo de patrón de bandas que se generó por la digestión del fragmento amplificado del gen *flaA* (tipo *flaA*).

Del total de cepas recibidas en el año 2008, se encontraron 51 tipos *flaA* diferentes, destacando como más abundantes: tipo *flaA* 1 (39 cepas), tipo *flaA* 54 (27 cepas), tipo *flaA* 5 (20 cepas), tipo *flaA* 4 (18 cepas), tipo *flaA* 7 (18 cepas) y tipo *flaA* 11 (17 cepas). Aunque debemos resaltar que la mayoría de los tipos *flaA* descritos solo están representados por un número muy bajo de cepas e incluso en muchos casos, por una sola cepa.

En la base de datos se realizó una búsqueda de posibles brotes no diagnosticados en base al siguiente criterio: 2 o más aislados procedentes del mismo hospital, pertenecientes a la misma especie, en los que coincidiese el tipo *flaA* y el resistotipo (máximas variaciones permitidas en la CMI de ± 1 dilución), y con fechas de aislamiento entre ellos de hasta 11 días. Siguiendo este criterio se seleccionaron 10 grupos de aislados (ver tabla 1), de los que 8 estaban compuestos por 2 aislados, mientras que los 2 restantes lo estaban por 3 y 4, respectivamente.

En nuestro estudio, el análisis de los perfiles de bandas generados mediante PFGE con la enzima *KpnI* (ejemplos de perfiles de bandas en la figura 1) reveló un porcentaje de semejanza entre aislados del 100% para los supuestos brotes 1, 3, 4, 6, 8 y 9, siendo en ellos el ST coincidente (ver tabla 1).

En todos los casos con una semejanza mayor del 95% en el perfil de PFGE el ST también era coincidente, mientras que en el caso de valores inferiores al 95% había también variaciones en los alelos MLST (tabla 1).

Discusión

Durante el periodo 1994-2003, en España se notificaron 36 brotes de campilobacteriosis en el Boletín Epidemiológico Semanal (<http://www.isciii.es/htdocs/pdf/InformedeBrotosalimentarios.pdf>; consultada 8/04/2013), cifra muy baja en comparación con los 301 provocados por *Staphylococcus aureus* o los 2.568 por *Salmonella enterica* en el mismo periodo. En el año de estudio, 2008, en el Laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología se recibió un solo brote de campilobacteriosis, causado por *C. jejuni*, con 8 casos, que fue confirmado mediante marcadores como el perfil de resistencia a antimicrobianos, RFLP-PCR-*flaA*, PFGE y MLST.

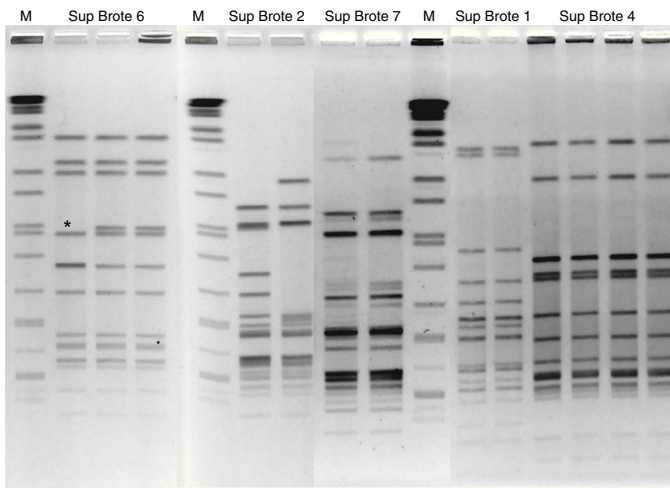


Figura 1. Composición a partir de 3 gels diferentes de electroforesis en gel de campo pulsante, donde podemos apreciar pulsotipos idénticos en algunas cepas (Supuestos Brotes 1 y 4), así como otros en los que hay variación en algunas de las bandas, como en el Supuesto Brote 5, donde se ha marcado con un asterisco la banda de diferencia. También se muestra alguno como el Supuesto Brote 6, en el que se aprecian diferencias en varias bandas.

M: marcador de peso molecular (*Salmonella* serotipo Braenderup H9812, digerido con *Xba*I).

Como algún estudio ha apuntado¹⁵, es posible que haya muchos más brotes de campilobacteriosis sin diagnosticar que los notificados. Las técnicas moleculares recomendadas para la investigación de los supuestos brotes, como PFGE y MLST, son costosas y laboriosas. PFGE requiere un equipamiento que no se encuentra de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica, mientras que la técnica de MLST conlleva la realización de un alto número de PCR (7 por cepa) y de reacciones de secuenciación.

Nuestro objetivo fue intentar buscar en nuestra base de datos posibles brotes no diagnosticados, mediante el empleo de marcadores sencillos, utilizados en la mayoría de los laboratorios que trabajan con *Campylobacter* spp.

En la utilización del perfil de resistencias frente a una selección de antimicrobianos se ha tenido en cuenta que en el transcurso de un brote no debería haber variaciones en los valores de CMI entre los aislados, ya que la presión antibiótica habría sido igual para todos ellos. Aunque los pacientes hubieran recibido tratamiento antibiótico, teóricamente no habría el tiempo suficiente para que se desarrollara una resistencia de la bacteria frente al antibiótico o una variación significativa de los valores de CMI, si bien en el caso de las quinolonas, la resistencia se sabe que se desarrolla de forma muy rápida²⁷.

Para *Campylobacter*, RFLP-PCR-*flaA* es un marcador con alto poder de discriminación, como evidencian los 51 tipos *flaA* diferentes identificados entre las cepas de *Campylobacter* spp. recibidas en el año 2008. Sin embargo, tanto nuestra experiencia, como la de otros autores^{28–30}, indica que es un marcador que permanece invariable a lo largo de un brote de campilobacteriosis.

Con los criterios establecidos se seleccionaron 10 grupos de aislados que podrían pertenecer a brotes no diagnosticados. Para ratificar microbiológicamente si los aislados de un mismo grupo podían estar epidemiológicamente relacionados y formar parte de un brote, más allá de la coincidencia en sus valores de CMI y el tipo *flaA*, se estudiaron los marcadores complementarios: i) PFGE, que es considerada de elección en el estudio de brotes de patógenos alimentarios, y ii) MLST, que, a pesar de determinar secuencias de genes constitutivos muy conservados, tiene el suficiente poder de discriminación en *Campylobacter*. Estas técnicas, teóricamente, no deberían mostrar variación en las cepas que pertenezcan a un brote.

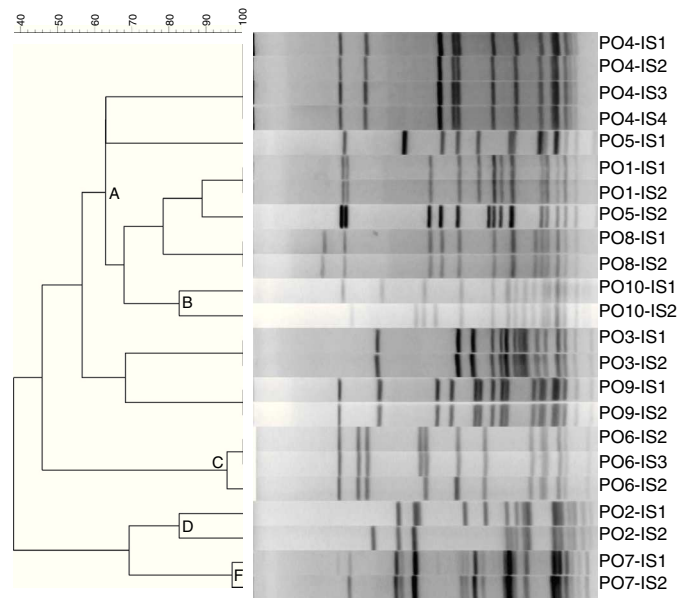


Figura 2. Dendrograma obtenido con el software Infoquest mediante la comparación de los pulsotipos generados por la enzima *Kpn*I en las distintas cepas de los supuestos brotes. A cada una de las cepas se le ha dado la nomenclatura PO*n*-IS*n*, del inglés *putative outbreak isolate*, por ejemplo: «PO1-IS1: putative outbreak 1-isolate 1, es decir, posible brote 1-aislado 1». Los valores de semejanza entre cepas de un supuesto brote (diferentes al 100%) señalados en el dendrograma son A: 68,65% (posible brote 5), B: 82,75% (posible brote 10), C: 95,65% (posible brote 6), D: 82,76% (posible brote 2) y F: 96,97% (posible brote 7).

Sin embargo, en el caso de PFGE, la variabilidad intrínseca de *Campylobacter* hace que pueda haber con alguna frecuencia variaciones en este marcador. Un ejemplo concreto es la observación de la variación en una banda del perfil de PFGE de un brote por movilización de un profago presente en el genoma de la cepa causante del brote³¹.

En el estudio de brotes se han utilizado de forma tradicional para PFGE los criterios elaborados por Tenover et al. en 1995¹⁰, en los que se considera que un solo evento genético (una mutación puntual) puede hacer que haya hasta 3 bandas de diferencia en el perfil de campo pulsado. Según estos criterios, dentro del contexto epidemiológico adecuado, aislados con una diferencia de hasta 6 bandas entre ellos podrían formar parte de un brote. Estos criterios deben ser considerados según las características propias del microorganismo que estemos estudiando.

En nuestro caso, siguiendo las recomendaciones de otros autores³², se ha usado la enzima *Kpn*I, que genera un número de bandas adecuado para ser suficientemente discriminador (más de 8 bandas, ver figura 1) y atribuye con mayor consistencia las cepas a su posible origen.

Como puede observarse en el dendrograma generado por la comparación de los pulsotipos entre los aislados del estudio (fig. 2), en 5 de los grupos la semejanza era del 100% entre los aislados de un mismo grupo, en 2 más era superior al 95%, mientras que en 3 de ellos era inferior al 85%. En los grupos 6 y 7 hay variaciones de tan solo una o 2 bandas (fig. 1), por lo que según los criterios de Tenover et al. para investigación de brotes, los aislados probablemente formaban parte de 2 brotes distintos. Incluso en el grupo 2 (fig. 1), en el que los 2 aislados tienen 3 bandas de diferencia, no se podría descartar que ambos aislados pertenecieran al mismo brote. Para confirmar y apoyar los datos obtenidos mediante PFGE se ha seguido la tendencia actual en el estudio de brotes de *Campylobacter*, que es utilizar más de una técnica de tipificación molecular además del PFGE³³, es por ello que hemos utilizado una técnica basada en la secuenciación, como es la MLST.

En todos los casos, los aislados con semejanzas en PFGE superiores al 95% poseían el mismo ST, encontrando solo variaciones entre alelos en aquellos con porcentajes inferiores. En el caso del grupo 2, ambos aislados pertenecían a diferentes ST, si bien se diferencian en un solo alelo (*tkf*), y las diferencias entre las secuencias de estos eran mínimas (un solo nucleótido). Estos datos, más la escasa diferencia entre bandas de sus pulsotipos, nos hace pensar que ambas cepas podrían pertenecer a un mismo brote.

En cualquier estudio de brotes es necesario disponer de datos epidemiológicos de los pacientes para su confirmación³⁴. En nuestro caso, no disponer de estos datos para cada aislado, salvo los nombres de los pacientes, el hospital de procedencia y la fecha de aislamiento de los aislados, hace que no se pueda confirmar al 100% que las cepas de un mismo grupo pertenecían a un brote, más allá de que fueran indistinguibles o estuvieran estrechamente relacionadas desde el punto de vista microbiológico.

Sin embargo, en 2 de los supuestos brotes (3 y 9) los pacientes en cada uno de los grupos son hermanos, por lo que parece muy claro sospechar de un brote de tipo familiar. De hecho, se estima que dentro de los brotes de campilobacteriosis, los de tipo familiar serían los más frecuentes³⁵.

Es destacable cómo 3 de los posibles brotes están constituidos por cepas multirresistentes (1, 4 y 5), lo cual es de preocupación en Salud Pública. Afortunadamente, ninguna de las cepas estudiadas era resistente a macrólidos, antibiótico de elección en las campilobacteriosis severas²⁷. Con la excepción del brote 6, constituido por cepas pansusceptibles, todos los aislados eran resistentes al menos a ciprofloxacino, lo que resalta la idea del alto porcentaje de resistencia en las cepas patógenas aisladas en España y cómo se desaconseja el uso de ciprofloxacino u otras fluoroquinolonas en el tratamiento de las campilobacteriosis, como muestran varios autores³⁶.

En conclusión, hemos visto cómo mediante el estudio de los datos obtenidos por 2 técnicas asequibles en laboratorio (resistotipo y tipo *flaA*) podemos sospechar de la presencia de posibles brotes no diagnosticados de *Campylobacter*. Más aún, estos resultados podrían ser obtenidos en poco tiempo (48 h) tras el aislamiento de las cepas. Esta alerta temprana sería de gran ayuda para la investigación epidemiológica que permitiera hacer una búsqueda de la fuente de infección y/o de otros posibles casos implicados.

De los 10 posibles brotes encontrados, 8 parecen confirmarse como tales, aunque se requieren más datos epidemiológicos. Sin duda, como se muestra en otros países, el número de brotes de campilobacteriosis está también infraestimado en España. Finalmente, consideramos que este estudio puede ayudar a comprender mejor la epidemiología y características de 2 patógenos importantes en Salud Pública, como son *C. jejuni* y *C. coli*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Queremos agradecer especialmente a los diferentes hospitales españoles que durante el año 2008 enviaron aislados de *Campylobacter* spp. al CNM. Esta publicación hizo uso de la página web de MLST de *Campylobacter* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) desarrollada por Keith Jolley y alojada en la Universidad de Oxford (Jolley & Maiden 2010, *BMC Bioinformatics*, 11:595). El desarrollo de dicho sitio ha sido financiado por el Wellcome Trust. Agradecemos a la Unidad de Genómica del CNM por llevar a cabo la secuenciación de los alelos de la técnica MLST. También agradecemos a los doctores Silvia Herrera-León y Sergio Sánchez Prieto, de la Unidad de Enterobacterias del CNM, por su ayuda en el análisis de las secuencias de los alelos en la técnica de MLST.

Bibliografía

- De Haan CP, Kivisto RI, Hakkinen M, Corander J, Hanninen ML. Multilocus sequence types of Finnish bovine *Campylobacter jejuni* isolates and their attribution to human infections. *BMC Microbiol.* 2010;10:200.
- Toljander J, Dovarn A, Andersson Y, Ivarsson S, Lindqvist R. Public health burden due to infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Campylobacter* spp. as estimated by cost of illness and different approaches to model disability-adjusted life years. *Scand J Public Health.* 2012;40:294–302.
- Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. *Vet Res.* 2005;36:351–82.
- Doorduyn Y, van den Brandhof WE, van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: A case-control study. *Epidemiol Infect.* 2010;138:1391–404.
- Frost JA. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2001:855–955.
- Kuusi M, Nuorti JP, Hanninen ML, Koskela M, Jussila V, Kela E, et al. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. *Epidemiol Infect.* 2005;133:593–601.
- Jakopanec I, Borgen K, Vold L, Lund H, Forseth T, Hannula R, et al. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: The need to focus on distribution system safety. *BMC Infect Dis.* 2008;8:128.
- Abe T, Haga S, Yokoyama K, Watanabe N. An outbreak of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* infection via tap water. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61:327.
- Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS.* 2004;112:908–29.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–9.
- Rotariu O, Smith-Palmer A, Cowden J, Bessell PR, Innocent GT, Reid SW, et al. Putative household outbreaks of campylobacteriosis typically comprise single MLST genotypes. *Epidemiol Infect.* 2010;138:1744–7.
- Forbes KJ, Gormley FJ, Dallas JF, Labovitiadi O, MacRae M, Owen RJ, et al. *Campylobacter* immunity and coinfection following a large outbreak in a farming community. *J Clin Microbiol.* 2009;47:111–6.
- Camarda A, Newell DG, Nasti R, di Modugno G. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. *Avian Dis.* 2000;44:907–12.
- Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, Connerton IF. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Pathog.* 2007;3:e119.
- Gilpin B, Cornelius A, Robson B, Boxall N, Ferguson A, Nicol C, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. *J Clin Microbiol.* 2006;44:406–12.
- Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J.* 1997;75:827–31.
- Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5125–32.
- Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol.* 2005;54:1043–7.
- Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Kofer J, Zechner R, et al. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2537–46.
- Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL, Woodward DL, Price L, et al. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol.* 2006;55:393–9.
- Stelling JM, O'Brien TF. Surveillance of antimicrobial resistance: The WHONET program. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S157–68.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline—Second Edition. CLSI Document M45-A2 Vol. 30 No 18. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: In vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:1232–6.
- Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1531–6.
- Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2010;54:1889–94.
- On SL, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Validity of *Smal*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: Evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol Infect.* 1998;120:231–7.
- Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 2009;4:189–200.

28. Heuvelink AE, van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG, et al. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol.* 2009;134:70–4.
29. Sanz JC, de los Ríos R, López-Portolés JA, Taveira JA, Simón C, Echeita MA. Description of an outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis and molecular characterization of the implicated strain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:437–9.
30. Wardak S, Szych J, Sadkowska-Todys M. The first report on *Campylobacter coli* family outbreak detected in Poland in 2006. *Euro Surveill.* 2008;13.
31. Barton C, Ng LK, Tyler SD, Clark CG. Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:386–91.
32. Michaud S, Menard S, Gaudreau C, Arbeit RD. Comparison of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *KpnI*: A population-based study. *J Med Microbiol.* 2001;50:1075–81.
33. Sails AD, Swaminathan B, Fields PI. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4733–9.
34. Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis.* 2006;3:20–31.
35. Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T. Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1351–61.
36. Cody AJ, Clarke L, Bowler IC, Dingle KE. Ciprofloxacin-resistant campylobacteriosis in the UK. *Lancet.* 1987;376:2010.