

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA

Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla)



TESIS DOCTORAL

Campylobacter coli: Sensibilidad antibiótica, bases moleculares de la resistencia y epidemiología molecular.

Ana Ruiz Castillo

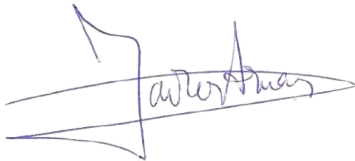
Sevilla, 2019

El Dr. Javier Aznar Martín, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), la Dra. María José Torres Sánchez, Catedrática del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

Certifican:

Que la tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla y que lleva por título "*Campylobacter coli*: Sensibilidad antibiótica, bases moleculares de la resistencia y epidemiología molecular" ha sido realizada por D^a Ana Ruiz Castillo bajo su supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Sevilla, a 12 /9 / 2019



Fdo: Dr. Javier Aznar Martín



Fdo: Dra. María José Torres Sánchez

A mis hijos, Claudia y Mario

Agradecimientos

Lo cierto es que, en primer lugar, me gustaría agradecer a María José Torres su apoyo en una tesis que ha durado más de lo debido y mucho más de lo esperado. Gracias infinitas por no juzgarme y por tener siempre una palabra de aliento, por creer que podría hacerlo y, sobre todo, acabarlo. Por cogerme el teléfono incontables veces y soportar mis grandes y pequeñas pifias. Gracias por tus revisiones en papel en esa mesa de madera donde hemos hablado un rato de la tesis y mucho rato de otras cosas importantes de verdad y más aún, de pamplinas varias. Por tu cariño a pesar de todas las circunstancias, nunca podré agradecértelo lo suficiente.

Gracias, Javier, por darme la oportunidad de hacer este trabajo. Por darme el soporte para hacerlo y por creer que estas cosas son importantes y porque al final, uno acaba sintiéndose orgulloso. Por no desistir y seguir leyendo las páginas de esta tesis tras muchos meses. Gracias.

Gracias también a todas las personas, tanto del ámbito sanitario como fuera de él que han escuchado mis lamentos interminables, improperios y blasfemias sobre este proceso tan largo. Por haberme insistido, por haberme apoyado, por haberme dado ánimos en lugar de una bofetá con la mano abierta que seguro era lo que estaban pensando. Así que gracias porque cada gota de motivación ha sido necesaria y muy bien recibida.

A Carlos, por los años y años de papeleos y agobios compartidos. Porque si pudiera él mismo se habría puesto conmigo a hacerla. Por cariño y por no escucharme más, pero ¡qué más da!. Por ser la persona que tiene también la losa sobre los hombros de este trabajo, por acordarse de él en las vacaciones y decir que es el tercer hijo de esta familia. Si no me hubiera alentado tanto, confiado en que un día se acabaría y que sacaría provecho de todo esto, dudo mucho que hubiera permanecido a lo largo del tiempo. Y tampoco habría acabado si no me hubiera llevado los papeles a la burocracia infernal del plan de doctorado en los últimos días de los plazos, para no perder la costumbre. Millones de gracias.

A mis hijos, que con sus llegadas se interrumpió la realización de esta tesis en muchas y largas ocasiones pero que a la vez me dan la energía necesaria, porque a pesar del cansancio, ellos están ahí, siempre con sus sonrisas y sus preguntas absurdas y deliciosas. Y con su luz inagotable. Quiero que vean que las cosas se terminan y que el esfuerzo, en general, suele tener su recompensa.

Y, por supuesto, a mis padres. Porque sencillamente sin ellos, nada de esto habría sido posible y yo no sería quien soy. No existen palabras para todo lo que os debo.

Os quiero mucho, y a vivir.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	13
Características del microorganismo.....	14
Aislamiento del microorganismo	14
Identificación	18
❖ Identificación bioquímica.....	18
❖ Identificación molecular	19
Importancia clínica.....	19
❖ Manifestaciones gastrointestinales.....	19
❖ Manifestaciones extraintestinales.....	21
Tipificación molecular	22
Mecanismos de resistencia antibiótica de <i>Campylobacter</i>	24
❖ Quinolonas	24
❖ Macrólidos	25
Tasas de resistencias antibióticas en cepas animales y procedentes de alimentos	27
Uso veterinario de antimicrobianos.....	29
Epidemiología	32
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	37
MATERIAL	40
Microorganismos.....	41
❖ Muestras y aislamientos	41
❖ Cepa patrón.....	41
Productos químicos y biológicos.....	41
Agentes antimicrobianos.....	42
❖ Tiras de gradiente antibiótico (bioMérieux)	42
❖ Microdilución en caldo (Sensititre® TREK Diagnostic Systems)	43
Medios de cultivo	43
Soluciones para ECP (Electroforesis en campo pulsado).....	44
Cebadores	46

MÉTODOS	48
Estudio de los datos clínicos	49
Procesamiento de las muestras clínicas	49
Pruebas de identificación	49
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	51
❖ Método de difusión con tiras de gradiente antibiótico	51
❖ Método de microdilución en caldo.....	52
Técnicas moleculares para la identificación clonal	56
❖ Electroforesis en gel con campo pulsado (ECP)	56
❖ PCR – RFLP del gen <i>flaA</i>	60
Técnicas moleculares para la identificación de mecanismos de resistencia	63
❖ Detección de mutaciones en el gen <i>gyrA</i> mediante protocolo de MAMA-PCR.....	64
❖ Secuenciación de la región QRDR del gen <i>gyrA</i>	65
❖ Detección de mutaciones en el gen ARNr 23S mediante protocolo de MAMA-PCR...	67
❖ Detección de mutaciones en el gen ARNr 23S mediante PCR-RFLP.....	68
❖ Detección del gen <i>ermB</i> mediante PCR	71
RESULTADOS	73
Aspectos demográficos y clínicos.....	74
Sensibilidad antibiótica	77
❖ Ciprofloxacino	79
❖ Eritromicina.....	80
❖ Tetraciclina.....	80
❖ Clindamicina.....	81
Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino.	92
Mecanismos moleculares de resistencia a eritromicina.	94
Epidemiología molecular.....	95
DISCUSIÓN	104
Aspectos clínicos y demográficos	105
Resistencia a antimicrobianos	107

Comparación entre los métodos de microdilución en caldo y difusión con tiras de gradiente
antibiótico.....112
Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina.....118
Epidemiología molecular126

CONCLUSIONES..... 137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Campylobacter</i> y su importancia clínica. Adaptado de Kaakoush y colaboradores(4).....	15
Tabla 2. Características diferenciales de <i>Campylobacter</i> y especies relacionadas. Adaptado de Mandell y colaboradores(1).	18
Tabla 3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo.....	46
Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias para la lectura interpretada del antibiograma de <i>C. coli</i>	55
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para amplificación del gen <i>flaA</i>	62
Tabla 6. Componentes de la mezcla de digestión	62
Tabla 7. Componentes de las mezclas de reacción de MAMA-PCR gen <i>gyrA</i>	65
Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR de la región QRDR del gen <i>gyrA</i>	66
Tabla 9. Componentes de la mezcla de reacción MAMA-PCR ARNr23S.....	68
Tabla 10. Componentes de la reacción de PCR para la técnica PCR-RFLP gen ARNr23S.	69
Tabla 11. Componentes mezcla de digestión con enzima <i>BceAI</i>	70
Tabla 12. Componentes mezcla de digestión con enzima <i>BsaI</i>	70
Tabla 13. . Componentes de la mezcla de reacción para PCR del gen <i>ermB</i>	71
Tabla 14. Distribución por grupos de edad y sexo de las infecciones por <i>C. coli</i>	74
Tabla 15. Características clínicas y demográficas de los pacientes ingresados con infección por <i>C. coli</i>	75
Tabla 16. Resultados globales de las pruebas de sensibilidad antibiótica de las 95 cepas estudiadas mediante microdilución en caldo (MDC) y tiras de gradiente antibiótico (GA).....	77
Tabla 17. Sensibilidad antimicrobiana y categorización clínica de 95 cepas de <i>C. coli</i> por microdilución en caldo (MDC) y tiras de gradiente antibiótico (GA).....	78
Tabla 18. Concordancia entre las técnicas de microdilución en caldo y tiras de gradiente antibiótico.	79
Tabla 19. Concordancia esencial entre ambos métodos de sensibilidad utilizados.....	83
Tabla 20. Resistencia antibiótica entre las cepas resistentes y sensibles a eritromicina mediante ambos métodos.	88
Tabla 21. Patrones de multirresistencia de interés (E: eritromicina, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, GM: gentamicina, TOB: tobramicina, AUG: amoxicilina-clavulánico).....	89
Tabla 22. Porcentajes de resistencia a diversos antimicrobianos en cada uno de los años del estudio.....	90

Tabla 23. Mutaciones detectadas tras la secuenciación de la región QRDR de 8 cepas resistentes a ciprofloxacino.	93
Tabla 24. Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina detectados en la colección de cepas.	95
Tabla 25. Grupos de cepas establecidos mediante ECP y distribución temporal de las mismas.	96
Tabla 26. Grupos de cepas establecidos por PCR-RFLP del gen <i>flaA</i> y distribución temporal de las mismas.	97
Tabla 27. . Posibles brotes detectados por ECP y PCR-RFLP del gen <i>flaA</i> aplicando el criterio temporal de 11 días.	98
Tabla 28. Grupos de cepas y posibles brotes obtenidos por ECP con un criterio temporal de 2 meses.	99
Tabla 29. Grupos de cepas y posibles brotes obtenidos por PCR-RFLP del gen <i>flaA</i> con un criterio temporal de 2 meses.	100
Tabla 30. Distribución de las cepas mediante ECP y PCR-RFLP del gen <i>flaA</i> y posibles brotes detectados según el criterio temporal utilizado (11 días versus 2 meses)	101
Tabla 31. Pulsotipos y tipos <i>flaA</i> de las cepas sensibles y resistentes a todos los antimicrobianos considerados	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfotipos característicos del género <i>Campylobacter</i>	17
Figura 2. Ventas de antimicrobianos para animales de consumo en 29 países Europeos en 2014(73).	30
Figura 3. Relación entre el consumo de antimicrobianos en veterinaria y tasas de resistencia (74).	31
Figura 4. . Incidencia y prevalencia de campilobacteriosis (4).	33
Figura 5. Línea temporal de los brotes de campilobacteriosis (2007 – 2013)(4).	34
Figura 6. Esquematación de las vías de transmisión de <i>Campylobacter</i> (2).	35
Figura 7. Espectro obtenido de una cepa de <i>C. coli</i> por espectrometría de masas.....	51
Figura 8. Proceso del ECP (https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/ECP.html)	57
Figura 9. Heterorresistencia de la cepa 59 detectada mediante tira de gradiente de eritromicina.	80
Figura 10. Distribución de CMI (% de cepas) de eritromicina mediante ambos métodos (Rojo: microdilución en caldo; azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).	84
Figura 11. Distribución de CMI (% de cepas) de tetraciclina mediante ambos métodos (Rojo: microdilución en caldo, azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).	84
Figura 12. Distribución de CMI de tobramicina mediante tiras de gradiente antibiótico (% cepas).	85
Figura 13. Distribución de CMI de gentamicina mediante microdilución en caldo (% cepas). ...	85
Figura 14. Distribución de CMI de amoxicilina – ácido clavulánico mediante tiras de gradiente antibiótico (% cepas).	86
Figura 15. Distribución de CMI de imipenem mediante microdilución en caldo (% cepas).	86
Figura 16. Distribución de CMI (% de cepas) de clindamicina mediante ambas técnicas (Rojo: microdilución en caldo, azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).	87
Figura 17. Evolución de la resistencia a ciprofloxacino y eritromicina en el periodo 2011 – 2014.	90
Figura 18. Evolución de la resistencia a tetraciclina y tobramicina en el periodo 2011 – 2014. ..	90
Figura 19. Evolución de la resistencia a amoxicilina – ácido clavulánico y clindamicina en el periodo 2011 – 2014.	91
Figura 20. Evolución conjunta de la resistencia a los antibióticos en el periodo 2011 – 2014. ...	91

INTRODUCCIÓN

Características del microorganismo

Campylobacter se aisló originalmente de abortos en ovejas en 1909, considerándose como subespecies de *Vibrio fetus*. Sin embargo, debido a que estos microorganismos no fermentaban los azúcares y diferían en el contenido de guanina y citosina (G + C) de los verdaderos miembros del género *Vibrio*, se creó el nuevo género *Campylobacter* (1).

Campylobacter pertenece a la clase épsilon de las proteobacterias, en el orden de los Campylobacterales, el cual incluye otros dos géneros, *Helicobacter* y *Wolinella*. Los miembros de estos géneros tienen genomas pequeños (1.6–2.0 megabases) y pueden establecer asociaciones de largo tiempo con sus hospedadores, a veces con consecuencias patógenas (2).

Las células del género *Campylobacter* son bacilos con forma curvada, en forma de S o espiral, de entre 0,2 a 0,8 µm de ancho y de 0,5 a 5 µm de largo. Son gram negativos y no forman esporas. Son típicamente móviles, con un movimiento característico en sacacorchos realizado gracias a un flagelo polar sin vaina en uno o ambos extremos de la célula. Algunas especies del género no son móviles (*C. gracilis*) o tienen múltiples flagelos (*C. showae*)(3).

Campylobacter y los microorganismos relacionados crecen mejor en una atmósfera que contiene entre un 5% y un 10% de oxígeno; por lo que se consideran microaerófilos y tiene un metabolismo respiratorio quimioorganotrófico. Obtienen la energía de los aminoácidos y de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; pero no de la oxidación ni fermentación de los hidratos de carbono. La actividad oxidasa está presente en todas las especies salvo en *C. gracilis* (3).

Aislamiento del microorganismo

No existe un método común para el aislamiento de todas las especies de *Campylobacter* de las muestras clínicas (4).

Todos los *Campylobacter* crecen a 37°C, sin embargo *C. jejuni* y *C. coli* lo hacen de forma óptima a 42°C. Al tratarse de las principales especies causantes de enfermedad, los laboratorios utilizan esta termotolerancia para optimizar su aislamiento, a costa de otras muchas especies como *C. upsaliensis* (1). De hecho, la prevalencia e importancia del resto de

especies están mucho menos estudiadas. En la tabla 1 podemos ver las especies de *Campylobacter* y su asociación con la clínica humana.

Tabla 1. Especies de *Campylobacter* y su importancia clínica. Adaptado de Kaakoush y colaboradores(4).

Especie de <i>Campylobacter</i>	Manifestaciones clínicas
<i>C. coli</i>	Patógeno establecido en gastroenteritis; bacteriemia, meningitis y colecistitis aguda.
<i>C. concisus</i>	Patógeno emergente asociado con gastroenteritis y EII ^a (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); con esofagitis de Barrett, en bacteriemia y absceso cerebral.
<i>C. curvus</i>	Encontrado en gastroenteritis, colitis ulcerosa, esofagitis de Barrett, sangre, hígado y absceso bronquial.
<i>C. fetus</i>	Asociado a bacteriemia, gastroenteritis, absceso cerebral, aspirado de absceso epidural, LCR ^b , celulitis, endocarditis, aneurisma micótico de la aorta abdominal y peritonitis.
<i>C. gracilis</i>	Potencial patógeno periodontal, asociado a EII ^a , infección de cabeza y cuello y absceso cerebral.
<i>C. hominis</i>	Encontrado en sangre y EII ^a (posiblemente se trate de un comensal intestinal).
<i>C. helveticus</i>	Gastroenteritis
<i>C. hyointestinalis</i>	Gastroenteritis y bacteriemia.
<i>C. insulaenigrae</i>	Gastroenteritis y bacteriemia.
<i>C. jejuni</i>	Patógeno establecido en gastroenteritis y posible agente predisponente en EII ^a , síndrome de intestino irritable postinfeccioso y enfermedad celíaca. La infección puede dar lugar a secuelas como el síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de Miller Fisher, parálisis de Bell y artritis reactiva. Encontrado en bacteriemia, miocarditis, meningitis, colecistitis aguda, ITU ^c y cuadro febril agudo asociado a leucopenia o trombocitopenia.
<i>C. lari</i>	Gastroenteritis y bacteriemia.
<i>C. mucosalis</i>	Gastroenteritis.
<i>C. rectus</i>	Potencial patógeno periodontal, gastroenteritis, EII ^a , absceso vertebral,

	bacteriemia e infección necrotizante de partes blandas.
<i>C. showae</i>	EII ^a , absceso intraorbitario y sangre.
<i>C. sputorum</i>	Gastroenteritis, absceso axilar y bacteriemia.
<i>C. upsaliensis</i>	Patógeno emergente en gastroenteritis; también encontrado en absceso de mama, bacteriemia y placenta.
<i>C. ureolyticus</i>	Gastroenteritis y EII ^a ; también encontrado en abscesos orales, perianales y de partes blandas, infecciones óseas y úlceras o lesiones gangrenosas de las extremidades inferiores.

^a EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

^b LCR: Líquido cefalorraquídeo.

^c ITU: Infección del Tracto Urinario.

La mayoría de estas especies tienen condiciones de crecimiento diferentes a las de *C. jejuni* y *C. coli*. En el caso de *C. concisus* se ha encontrado con igual frecuencia que *C. jejuni* y *C. coli* en heces de casos de diarrea humana, y podría ser una posible explicación de un porcentaje de casos de diarrea sin diagnóstico etiológico (5).

Las células de *Campylobacter* se multiplican más lentamente que el resto de microbiota intestinal habitual, por lo que su aislamiento requiere de medios selectivos. Las técnicas habituales utilizan medios selectivos basados en sangre con antibióticos. Los más comunes son el medio de Skirrow, el medio de Butzler y el medio Campy-BAP, así como sus modificaciones. Los dos últimos contienen cefalotina, la cual inhibe *C. fetus* y otras muchas especies pero mejora el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli*.

Un método más robusto, el protocolo de Cape Town (4), requiere de la filtración y homogeneización de las muestras clínicas a través de filtros de 0.45- a 0.65- μm por los que pasan las células de *Campylobacter*, pudiéndose usar de esta manera medios libres de antibióticos. El uso de filtros, medios no selectivos y enriquecidos como el agar chocolate y una temperatura de incubación de 37°C permitiría el aislamiento de *C. jejuni* y de las otras especies menos habituales. Este método se ha utilizado con éxito en el aislamiento de una gama de especies de *Campylobacter* de muestras fecales, biopsias intestinales y saliva (1,4,6).

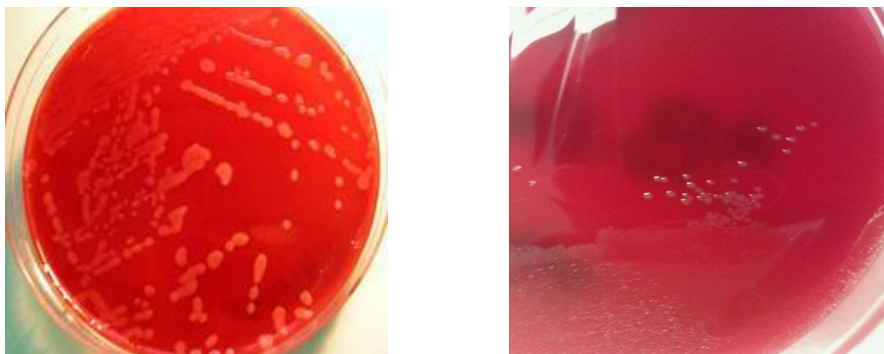
Habitualmente no se usan los medios de enriquecimiento debido a la alta carga bacteriana excretada en las heces de una persona enferma, del orden de $10^6 - 10^9$ unidades formadoras

de colonia por gramo de heces (1). No obstante, el enriquecimiento de biopsias intestinales homogeneizadas en el medio de Ham F-12 suplementado con vancomicina, seguido de incubación a 37°C durante dos días junto con el protocolo de Cape Town, ha sido eficaz en el aislamiento de una serie de especies de *Campylobacter* de pacientes con gastroenteritis crónica y EII (4).

Las colonias generalmente se observan entre 24 y 48 horas tras la inoculación. Ocasionalmente se necesitan de 72 a 96 horas de incubación, sobre todo para las especies menos frecuentes. Las bacterias de cultivos jóvenes tienen el típico aspecto vibrioide, pero las células de cultivos viejos forman cuerpos esféricos o cocoides, consideradas como un estado degenerado más que como una forma durmiente del microorganismo (1,3).

En agar sangre, así como en el medio Skirrow las colonias *Campylobacter* pueden mostrar dos tipos morfológicos (figura 1). En el primero, las colonias presentan más de 1 mm. de diámetro, tendiendo a adquirir un aspecto de huso, cuyo eje mayor se orienta en el sentido de la siembra, que incluso puede hacer que en las zonas de cultivo más densas de la placa las colonias tiendan a tocarse unas a otras. Este morfotipo se debe al movimiento activo de este agente; por lo cual, en un medio fresco las bacterias nadan alejándose del centro de la colonia lo que hace que éstas tengan ese aspecto que algunos autores describen como gotas de agua o aceite. El segundo morfotipo se caracteriza colonias convexas e incoloras de aproximadamente 1mm de diámetro (3).

Figura 1. Morfotipos característicos del género *Campylobacter*.



Identificación

❖ Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas permiten diferenciar las especies de *Campylobacter* de otros géneros relacionados y la identificación a nivel de especie. Lastovica y colaboradores (6) consideran como pruebas necesarias para ésta, el crecimiento con o sin suplementación de H₂, crecimiento en agar McConkey, el indoxil acetato, hipurato, aril sulfatasa y producción de H₂S. Además, la detección de la actividad L- alanina aminopeptidasa se puede usar para diferenciar entre *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* así como otras bacterias gram-negativas.

La única prueba bioquímica que permite distinguir *C. jejuni* de *C. coli*, las dos especies de mayor relevancia clínica, es la hidrólisis del hipurato, siendo positiva en *C. jejuni* y negativa en *C. coli*, aunque también existen cepas de *C. jejuni* con hidrólisis negativa. (4). En la tabla 2 podemos ver las características diferenciales entre las especies de *Campylobacter* más frecuentemente asociadas a patogenicidad en humanos y otras especies relacionadas.

Tabla 2. Características diferenciales de *Campylobacter* y especies relacionadas. Adaptado de Mandell y colaboradores(1).

Especie	Crecimiento			Reducción nitrato	Producción H ₂ S		Hidrólisis de hipurato	Sensibilidad (Disco 30 µg)		Reducción ácidos grasos C-19
	25°C	37°C	42°C		TSI	Papel de acetato		Cefalotina	Ácido nalidíxico	
<i>C. jejuni</i>	-	+	+	+	-	+	+ ^a	R	S	+
<i>C. coli</i>	-	+	+	+	V	+	-	R	S	+
<i>C. lari</i>	-	+	+	+	-	+	-	R	R	+
<i>C. fetus subsp. Fetus</i>	+	+	V	+	-	V	-	S	R	-
<i>C. hyointestinalis</i>	V	+	V	+	+	+	-	S	R	+
<i>Helicobacter cinaedi</i>	-	+	-	+	-	+	-	S	S	-
<i>C. upsaliensis</i> ^b	-	+	+ ^c	+	-	+	-	S	S	-
<i>H. fennelliae</i>	-	+	-	-	-	+	-	S	S	-

^a Aproximadamente 5% - 10% de las cepas de *C. jejuni* son hipurato negativas.

^b Catalasa negativa o débil

^c Ocasionalmente no crecen a 42°C

V: variable (algunas cepas presentan la característica), R: resistente, S: sensible

❖ Identificación molecular

Los genes del ARNr 16S se han usado ampliamente en la detección e identificación rápida de muchas bacterias, incluyendo las especies de *Campylobacter*. Sin embargo, debido a la similitud de las secuencias, esta técnica no se puede usar para diferenciar especies estrechamente relacionadas como *C. jejuni* y *C. coli*. Los genes que codifican para el ARNr 23S y el espaciador transcrito interno (ITS), localizado entre los genes del ARNr 23S y 16S, también se han usado para diferenciar especies de *Campylobacter*.

Además existen numerosos ensayos de PCR con diferentes genes diana (gen de la aspartoquinasa, *cadF*, *ceuE*, gen de la hipuricasa, *glyA*, etc.), que permiten identificar las dos especies más frecuentes de *Campylobacter* (7).

Existen también varios enzimoimmunoensayos disponibles para la detección de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras clínicas que parecen haber demostrado una sensibilidad superior al cultivo. Asimismo podemos encontrar técnicas de PCR en tiempo real capaces de detectar varias especies a la vez, como *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

La secuenciación genómica se ha convertido en algo rutinario en laboratorios de investigación y probablemente en el futuro será también una práctica común en los laboratorios clínicos (4). Otra técnica molecular recientemente aplicada a la identificación de estas especies es la espectrometría de masas o MALDI-TOF (Matrix associated laser desorption ionization time of flight) (8,9), la cual destaca en rapidez y coste. Utilizando colonias de microorganismos sólo se necesitan escasos minutos para obtener una identificación precisa, así como detectar resistencias antibióticas y las toxinas producidas (10).

Importancia clínica

❖ Manifestaciones gastrointestinales

Gastroenteritis

C. jejuni y *C. coli* son causantes de diarrea en humanos. Las manifestaciones clínicas de las infecciones por todas las especies de *Campylobacter* que causan enfermedad entérica parecen

ser idénticas, siendo el prototipo la producida por *C. jejuni*. La enteritis aguda es la presentación más frecuente.

Suele haber un periodo prodrómico con fiebre, cefalea, mialgia y decaimiento de 12 a 24 horas antes del comienzo de los síntomas intestinales. Los pacientes infectados pueden presentar desde heces sueltas a una gran diarrea acuosa o sanguinolenta; pudiendo presentar cualquier paciente todo el espectro, fiebre, pérdida de peso y calambres abdominales que duran, de media, 6 días, aunque pueden variar de un día a más de una semana. (1,4).

Los síntomas generalmente comienzan a las 24 – 72 horas tras la ingestión de alimentos contaminados, aunque puede tardar más si la dosis infectiva ha sido baja. El momento álgido puede durar de 24 a 48 horas, incluyendo dolor abdominal similar a una apendicitis y más de 10 movimientos intestinales.

Generalmente se trata de un cuadro autolimitado con una resolución gradual de los síntomas a lo largo de los días. En un 10%-20% de los casos que requieren atención médica la enfermedad dura más de una semana y la recaída se observa en un 5%-10% de los pacientes que no reciben tratamiento.

En las heces se pueden observar leucocitos polimorfonucleares (PMN) Y sangre (macro o microscópica); así como una colitis inflamatoria difusa en las biopsias de colon (1,4).

Aunque la infección puede ocurrir a cualquier edad, es más frecuente en los niños pequeños de 1 a 4 años, así como en los adultos jóvenes (de 15 a 24 años). En el trabajo realizado por Bessède y colaboradores (11) donde comparan las características de los pacientes infectados por tres especies de *Campylobacter*, encuentran que hay un mayor riesgo de infectarse por *C. coli* en personas ligeramente mayores (34,6 años), en comparación a *C. jejuni* (27,5 años), así como el haber viajado al extranjero en las dos semanas previas. La infección suele ser más común en los meses de verano y *C. coli*, aunque es menos prevalente que *C. jejuni*, puede suponer hasta el 25% de las gastroenteritis causadas por especies de *Campylobacter*.

En los casos de gastroenteritis por *C. concisus* u otras especies emergentes generalmente los síntomas son más leves, probablemente correlacionándose con unos niveles fecales de calprotectina más bajos que los encontrados en los casos de infección por *C. jejuni* o *C. coli*.

Otras manifestaciones gastrointestinales

En la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, la interrelación entre la microbiota intestinal, la inmunidad del hospedador y otros factores genéticos y ambientales son clave para la etiología multifactorial de la EII. El impacto de patógenos incluyendo *Campylobacter* en la EII sigue actualmente en debate (12). Varios estudios recientes han encontrado una relación entre varias especies de *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni* y *C. concisus*, y estas patologías (13–17). Un reciente metaanálisis que incluye a 80.000 individuos reveló que la infección por *C. concisus* o *C. showae*, comensales de la cavidad oral, incrementa el riesgo de desarrollo de EII (12).

Las dos alteraciones más importantes de la función gastrointestinal son el síndrome del intestino irritable y la dispepsia funcional, que son formas post-infecciosas que se desarrollan *de novo* a pesar del aclaramiento del agente causal, y el mecanismo por el que se produce es desconocido (4,12). Según un reciente metaanálisis (18) el 8,64% de los pacientes infectados por *Campylobacter* sufrían alteraciones gastrointestinales post-infecciosas en estudios prospectivos.

Otras manifestaciones gastrointestinales en que se está encontrando relación con ciertas especies de *Campylobacter* son el reflujo gastroesofágico, la esofagitis de Barrett (4,19,20), la gingivitis crónica, periodontitis y otras enfermedades de la cavidad bucal (4,21) así como una posible relación aún en estudio entre el cáncer colorrectal y determinados perfiles bacterianos de la microbiota fecal entre los que se incluye *Campylobacter* (4,22,23).

❖ Manifestaciones extraintestinales

La bacteriemia y la septicemia son las manifestaciones extraintestinales más frecuentes, asociados con *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*, y que a menudo están infradiagnosticadas (4). La incidencia de bacteriemia por *Campylobacter* en relación a la incidencia de enteritis es del 0,1% al 1% (24). La mayoría de los casos se dan en pacientes de edad avanzada o inmunodeprimidos con una o más patologías subyacentes, incluyendo cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas, neoplasias o infección por VIH. Entre estos pacientes, la mortalidad a los 30 días es del 10 al 15% (4,25,26).

Otras manifestaciones extraintestinales incluyen meningitis y complicaciones cardiovasculares como son la endocarditis, miocarditis, pericarditis y miopericarditis, así como complicaciones reproductivas con distintas especies de *Campylobacter* implicadas hasta la fecha (4). Otros síndromes relacionados principalmente con *C. jejuni* son el síndrome de Guillain – Barré (SGB), el síndrome de Miller-Fisher y la artritis reactiva (4,12,18,27–32).

Tipificación molecular

Los principales usos de la epidemiología molecular son la detección de brotes así como la confirmación de las posibles fuentes de los casos de campilobacteriosis humana (7). En la década de 1980 se desarrollaron dos métodos serológicos de tipificación que en la actualidad ya no se utilizan debido a su bajo poder de discriminación. Los esquemas de tipificación basados en plásmidos no han resultado útiles en *Campylobacter*.

En la actualidad se emplean los métodos basados en PCR como amplificación de secuencias repetitivas (REP – PCR), amplificación de número variable de repeticiones en tándem (VNTR), y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del gen *flaA* (flaA-RFLP). Aunque algunos son de bajo coste, tienen un escaso poder de discriminación, no están automatizados y algunos de ellos no están estandarizados, lo que limita la reproducibilidad de la técnica (7,33).

La electroforesis de campo pulsante (ECP) se ha convertido en una importante herramienta de tipificación de los sistemas de vigilancia a nivel mundial. En este método todo el genoma de un organismo es cortado por enzimas de restricción de baja frecuencia, y los fragmentos generados se separan según tamaño. Lo que distingue a esta técnica de otras basadas también en la electroforesis es la separación de fragmentos grandes, lo cual se consigue por cambios bruscos del campo eléctrico, de forma que las moléculas de ADN sufren reorientaciones antes de que puedan moverse a través del gel. Esta técnica puede separar moléculas de hasta 12 Mb, y se ha convertido en un método muy importante para tipificar patógenos alimentarios, en especial *C. jejuni* y *C. coli* (7).

El método de ECP es válido para establecer relaciones clonales entre cepas a corto plazo y existen varios protocolos estandarizados, siendo utilizados por PulseNet. La gran variabilidad

en los perfiles de ECP de *C. jejuni* y *C. coli* hace que no se pueda utilizar en estudios a largo plazo.

Para estudios epidemiológicos a largo plazo se ha usado con éxito el MLST o tipificación multilocus de secuencias, basado en la amplificación y secuenciación de varios genes (genes conservados) distribuidos a lo largo del genoma. A cada secuencia única se le asigna un número de alelo y la combinación de todos esos alelos se le denomina secuenciotipo (ST). Las cepas que tienen cuatro o más alelos iguales en comparación al genotipo central se asignan al mismo complejo clonal o linaje. La principal ventaja es que la información obtenida en los diferentes laboratorios se puede comparar fácilmente. Sin embargo, existen varios inconvenientes. Uno de ellos es que, dada la gran variabilidad genética de este microorganismo, los genotipos más infrecuentes no amplifican con los cebadores habituales; otro inconveniente es que, a menudo, esta técnica no es suficientemente discriminatoria en los estudios a corto plazo, como las investigaciones de brotes. Se ha desarrollado una modificación de esta técnica conocida como MLST extendida (eMLST) que incorpora las regiones cortas variables (SVR) de los genes *flaA* y *flaB* y del gen *porA*, mejorando así el poder de discriminación.

En los últimos años se han puesto a punto métodos de secuenciación masiva (WGS) a bajo coste, lo que ha supuesto un cambio en la forma de tipificación de los patógenos alimentarios. De hecho, para bacterias con genoma pequeño como *Campylobacter*, la WGS es comparable en precio a un MLST tradicional. Del WGS podemos obtener mucha más información, también para la tipificación, como variaciones de la técnica del MLST (Rmlst, cgMLST, wgMLST), determinación de polimorfismos de un solo nucleótido o diferencias en la presencia de genes accesorios (34–40).

El estudio de cientos de cepas requiere un método rápido, automatizable y barato como es la comparación de la huella genómica (CGF), basado en la identificación de 40 genes de *Campylobacter* mediante PCR múltiple. A diferencia del ECP y de los métodos de secuenciación, CGF no necesita un equipamiento especializado. Presenta un poder discriminatorio comparable a las técnicas de MLST extendidos (41,42).

La selección del método más apropiado dependerá de una serie de factores, incluyendo el número de cepas a analizar, el propósito del estudio (epidemiología de un intervalo corto o de

un intervalo largo), la necesidad de comparar los resultados con bases de datos públicas y, por supuesto, la disponibilidad de los recursos para realizarlas. WGS es la técnica que más información da en la tipificación de *Campylobacter* y la información generada se puede comparar fácilmente tanto en estudios epidemiológicos a largo o a corto plazo (7).

Mecanismos de resistencia antibiótica de *Campylobacter*

❖ Quinolonas

El amplio espectro de acción de estos antibióticos frente a microorganismos gram-negativos y gram-positivos ha determinado su uso masivo en todo el mundo, aunque actualmente se intenta reservar su utilización como segunda línea, cuando otros antibióticos de menor espectro han fallado, con el objetivo de salvaguardar su eficacia (43).

Las topoisomerasas de clase II (ADN girasa y topoisomerasa IV) son los enzimas diana de las quinolonas. Estos antibióticos se unen al enzima cuando éste se ha unido al ADN y, por dos vías diferentes, provocan la fragmentación del ADN cromosómico y finalmente la muerte celular (44). Asimismo inducen la respuesta SOS, que, en *E. coli*, resulta en una regulación al alza de varios genes de respuesta al estrés que aumentan la capacidad de reparación del ADN, formándose células filamentosas debido a la inhibición de la división celular (45).

La resistencia se produce principalmente por sustituciones de aminoácidos en la región QRDR (Región Determinante de Resistencia a Quinolonas), la cual se localiza en el dominio de unión al ADN de estos enzimas. En *Campylobacter* solo encontramos la ADN girasa, y las mutaciones se encuentran en la subunidad GyrA.

La mutación más frecuentemente encontrada es la C257T del gen *gyrA*, que lleva a la sustitución aminoacídica Thr86Ile, y que confiere alto nivel de resistencia (46,47). Se han encontrado otras mutaciones puntuales con sus consecuentes sustituciones aminoacídicas: Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Val, Asp90Tyr Pro104Ser y Thr86Ala, esta última confiriendo alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico pero de bajo nivel a ciprofloxacino (46,48,49). Asimismo se han informado mutaciones dobles del gen *gyrA* combinando Thr86Ile con Asp85Tyr, con Asp90Asn o con Pro104Ser(48).

Por tanto, en *C. jejuni* y *C. coli*, la ausencia de una diana secundaria (topoisomerasa IV) para las fluorquinolonas determina que una única modificación de la subunidad GyrA de la ADN girasa sea suficiente para producir un fenotipo de resistencia a estos antimicrobianos (46,47).

Por otro lado, la bomba de eflujo multifármaco CmeABC se ha descrito como el principal mecanismo de eflujo causante de resistencia a antimicrobianos, incluidos las fluorquinolonas y los macrólidos (50,51). Esta bomba está codificada por un operón de 3 genes, *cmeA*, *cmeB* y *cmeC*; los cuales codifican para una proteína periplásmica de fusión, un transportador en la membrana interna y una proteína externa respectivamente (50). Principalmente este sistema está regulado por CmeR y, secundariamente, por CosR; los cuales se unen a la región promotora del operón *cmeABC* funcionando como represores de la transcripción (52,53). Es el principal sistema de eflujo existente en *Campylobacter* y se ha asociado a resistencia a fluorquinolonas en asociación con las mutaciones en el gen *gyrA*. CmeABC es importante tanto para la resistencia intrínseca como adquirida a los antibióticos; sin embargo, la sobreexpresión de esta bomba sólo confiere un incremento modesto de las CMI de los antibióticos en relación a la expresión basal de dicha bomba (53,54).

Recientemente se ha descubierto una variante de esta bomba de expulsión conocida como RE – *cmeABC* (Resistance–enhancing *cmeABC*) (55), la cual es muy eficiente en la expulsión de diversos antibióticos, principalmente florfenicol y fluorquinolonas, y promueve la aparición de mutantes resistentes. Además se transfiere de forma horizontal y se ha detectado un aumento en la prevalencia de esta bomba en *C. jejuni*, sugiriendo una posible ventaja o mejora en la eficacia biológica bajo presión antibiótica. Típicamente, las cepas con mutaciones en *gyrA* tienen un rango de CMI de 4 a 32 µg/ml. Estos autores afirman que CMI extremadamente altas (≥256 µg/ml) son debidas a la acción sinérgica entre las mutaciones en *gyrA* y la variante RE–*cmeABC*.

❖ Macrólidos

Los macrólidos inhiben la síntesis proteica uniéndose a la unidad 50S del ribosoma de la bacteria. Los nucleótidos en las posiciones 2058 y 2059 son la clave de unión de los macrólidos (46). Esta unión da lugar a un cambio conformacional en el ribosoma que termina la elongación del péptido en curso (56).

Campylobacter posee tres copias en su cromosoma del gen ARNr23S. Las sustituciones en las posiciones 2074 y 2075 del residuo de adenina son las principales mutaciones que confieren resistencia a eritromicina. Las mutaciones A2074C, A2074G y A2075G confieren alto nivel de resistencia a macrólidos (CMI de eritromicina > 128 µg/ml) en *C. jejuni* y *C. coli*. La resistencia a eritromicina suele dar resistencia cruzada con otros macrólidos como azitromicina y claritromicina así como con otros antibióticos relacionados como las lincosamidas

(clindamicina) y los grupos de estreptograminas (46,57). Generalmente las tres copias del gen están mutadas, aunque algunas cepas con CMI más bajas pueden presentar dos copias mutadas, sugiriendo un efecto de dosis (58).

La resistencia puede estar causada también por modificaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22, que posiblemente se asocian a resistencia de nivel bajo o intermedio (57). Sin embargo, el papel exacto de las modificaciones en L4 y L22 (mutaciones, inserciones y deleciones) no está del todo claro (46).

Recientemente se ha descrito la presencia del gen *ermB* como causa de resistencia de alto nivel a macrólidos. La primera cepa en la que se encontró fue un *C. coli* de un cerdo en China en 2014 (59). El enzima dimetila una única adenina en ARNr23S, provocando una menor unión de los macrólidos (60).

Los estudios posteriores han encontrado que la mayoría de las cepas que contienen este gen lo expresan de forma constitutiva, y que casi siempre se debe a una deleción en la región reguladora del mismo. Otras cepas, sin embargo, son inicialmente sensibles, pero tras una preincubación con eritromicina o clindamicina, estas cepas presentaban CMI tan altas como aquellas con expresión constitutiva. Posiblemente los genes con el represor mutado sean el resultado de una exposición reiterada a macrólidos, siendo su uso en animales de producción una causa muy probable (61).

El gen se encuentra en una MDRGI (Isla Genómica de Multirresistencia) cromosómica, con múltiples ORFs (Fragmentos Abiertos de Lectura) de los cuales una buena proporción corresponden a determinantes de resistencia a antibióticos (59). El gen *ermB* asociado a la MDRGI presentó un 100% de similitud al de bacterias gram – positivas como *Streptococcus suis*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* (62).

Posteriormente se han descrito otros casos de cepas con estos genes (63–65), las cuales presentan, en su mayoría, altos niveles de resistencia a macrólidos, con CMI superiores a 512 µg/ml y cepas con mutaciones en el ARNr23S además del gen *ermB* (62,65).

La detección de este gen, sin embargo, es rara fuera de China, habiéndose detectado adicionalmente en España (63) y en Estados Unidos, con un solo caso durante el año de estudio y procedente de un viaje a Malasia (66). La aparición del gen *ermB* en *Campylobacter* podría deberse al gran consumo de antibióticos en China en relación a otros países (67).

Con respecto a la bomba de expulsión CmeABC, se han encontrado cepas con bajo nivel de resistencia (CMI 8 – 16 µg/ml) que no presentaron mutaciones en el gen ARNr23S, siendo esta bomba la responsable de dicha resistencia. Esta bomba actúa de forma sinérgica junto a las mutaciones en el gen *diana*, de forma que en cepas con alto nivel de resistencia (CMI > 128 µg/ml), la inhibición de la bomba supuso un descenso de 4 a 8 veces el valor de CMI (46,58). La aparición y aumento en la incidencia de cepas con RE-CmeABC, descrito en el apartado anterior, es preocupante y parece ser que es más frecuente en *C. jejuni* que en *C. coli* (62).

Tasas de resistencias antibióticas en cepas animales y procedentes de alimentos

Un reciente estudio europeo (68) ha monitorizado las resistencias a antibióticos de interés clínico en bacterias procedentes de animales destinados a alimentación humana (pollos, ganado vacuno y cerdos) causantes de patología humana como *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp; así como en bacterias comensales como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* y *E. faecalis*, en el periodo 2003 - 2005. En nuestro país los niveles de resistencia a ácido nalídixico y a ciprofloxacino de *C. coli*, son del 93,1% y 89,7% respectivamente en pollos y del 92,7% para ambos antibióticos en cerdos. En cuanto a eritromicina, hay un 62,5% de cepas resistentes provenientes de cerdos y un 24,1% de cepas resistentes provenientes de pollos. Aunque en España las cepas de *C. coli* de cerdos son las que presentan porcentajes mayores de resistencia a quinolonas, en general en el resto de países europeos, las cepas de ganado vacuno y de pollos suelen ser más resistentes; ocurriendo lo contrario con eritromicina, donde las cepas porcinas son más resistentes. No hay datos en nuestro país de *C. coli* en vacas. En el trabajo de Wagner y colaboradores (69), las tasas de resistencia a ciprofloxacino en cepas humanas son muy similares a las que han obtenido en cepas de pollos de la misma temporada en cuatro mataderos. No ocurre lo mismo, por ejemplo, en el estudio realizado en Suiza (70) por Kittl y colaboradores en 2008; donde encontraron una mayor proporción de resistencia a ciprofloxacino en las cepas clínicas (37,5%) que en las de pollos (18,9%); dando como posible explicación los viajes al extranjero como una fuente de las cepas clínicas resistentes.

Los niveles de resistencia a gentamicina en las cepas de animales son muy bajas, aunque España presenta los niveles más altos, con un 16,7% de resistencia de las cepas porcinas y un 6,9% en las de pollos. En cuanto a tetraciclina, los porcentajes de resistencia son muy altos, destacando los de España y Francia. En cerdos, el 100% de las cepas españolas fueron resistentes, así como el 93,1% de las cepas de pollos. En este trabajo concluyen que

generalmente, los antimicrobianos más usados y más antiguos son aquellos donde se encuentran más resistencias, como son las tetraciclinas, penicilinas, sulfonamidas y macrólidos; y que las resistencias son inferiores en aquellos antibióticos más recientes y con menor uso como las fluorquinolonas y las nuevas cefalosporinas. No obstante, también inciden en las diferencias entre unos países y otros, y España es, claramente, un país donde las resistencias alcanzan los valores más altos.

En el año 2014, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) publicó un informe (71) de las resistencias en bacterias zoonóticas y comensales en humanos, animales y productos alimenticios de cepas recogidas en 2012 en países comunitarios y extracomunitarios de la Comunidad Económica Europea.

En el caso de los pollos, los niveles de resistencia en *C. coli* fueron extremadamente altos para ácido nalidíxico (75,7%), ciprofloxacino (78,4%) y tetraciclina (73,1%). La resistencia a eritromicina y gentamicina fue moderada (11,2%) y baja (4,1%) respectivamente. Los datos recogidos referentes a España indican además que tenemos las resistencias más altas en todos los antimicrobianos analizados; siendo dichas tasas las siguientes: ciprofloxacino, 96,3% y ácido nalidíxico 90,7%; tetraciclinas, 98,1%, eritromicina, 22,2% y gentamicina, 16,7%.

Analizando también las tendencias en la resistencia a los antimicrobianos, en este estudio se recoge que en España se ha observado un aumento significativo en las resistencias a quinolonas, eritromicina, gentamicina y tetraciclinas a lo largo del periodo 2006-2012. De hecho, se han observado tasas de más del 40% de resistencia a eritromicina en algún punto de este periodo y es el único país (de los que han presentado sus datos), donde la resistencia a gentamicina supera el 10%.

En nuestro país, un 55,6% de las cepas fueron multirresistentes, así como un 22,2% fueron corresponsables a ciprofloxacino y eritromicina. De los cuatro países con los que se pudieron obtener estos datos, España y Suiza fueron los que tuvieron las mayores tasas de resistencia y en España solo el 1,9% de las cepas fueron sensibles a todos los grupos de antimicrobianos.

En el caso de la carne de pollo también fueron extremadamente altos los niveles de resistencia a quinolonas (82,7% a ciprofloxacino, 81,0% a ácido nalidíxico), muy altos a tetraciclinas (57,3%); moderados a eritromicina (16,5%) y bajos a gentamicina (1,7%).

En el caso del ganado porcino, los niveles de resistencia fueron de muy altos a extremadamente altos para ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclinas, siendo los valores

de 32,0%, 31,6% y 76,8% respectivamente. La resistencia fue alta para eritromicina (23,9%) y baja para gentamicina (2,9%). Las cepas procedentes de España superan las tasas de resistencia generales; obteniéndose niveles cercanos al 100% para ácido nalidíxico, ciprofloxacino y tetraciclinas; un 79,5% de cepas resistentes a eritromicina y un 17,8% de resistencia a gentamicina. Al analizar las tendencias de este periodo de tiempo (2006 – 2012); en España se produce un aumento significativo tanto para quinolonas como para eritromicina y gentamicina.

La multiresistencia en este caso varió de manera espectacular según los países, desde un 3,9% hasta un 97,3% (España), así como la co-resistencia, que fue baja en algunos países (2,9% - 9,4%) y extremadamente alta en uno de ellos (76,7%), siendo de nuevo España el país afectado.

En el estudio realizado en una granja de pollos en Córdoba en 2015 (72), analizaron las resistencias antibióticas de las cepas de los productos cárnicos. Encontraron un 100% de cepas resistentes a tetraciclinas en *C. jejuni* y un 100% de cepas resistentes a ciprofloxacino en *C. coli*. Siguiendo con *C. coli*, presentaron unas tasas muy altas de resistencia a eritromicina, con el 73,3% de cepas resistentes, porcentaje mucho más alto que en el caso de *C. jejuni* (10%); así como a tetraciclina, con un 96,7%. Para gentamicina, obtuvieron un 16,7% de resistencia, y similar a lo detectado en *C. jejuni* (13,3%). Llama la atención el alto porcentaje de resistencia a eritromicina de *C. coli*; porque, volviendo a recurrir al informe de la EFSA de 2014, aunque no había datos de España de carne de pollo, sí los había de cepas de pollos y la resistencia a eritromicina era del 22,2%. Las altísimas tasas de resistencia a ciprofloxacino y tetraciclina que se encuentran en este estudio, con respecto a otros países de Europa, pueden deberse, según los autores, a una alta tasa de infecciones aviarias por *E. coli* y *Mycoplasma gallisepticum* en esta zona que hacen necesario el uso de antibióticos durante el periodo de cría. Además, comentan que el 83,3% de las cepas de *C. coli* fueron multiresistentes, con el criterio de resistencia a 3 ó más antibióticos.

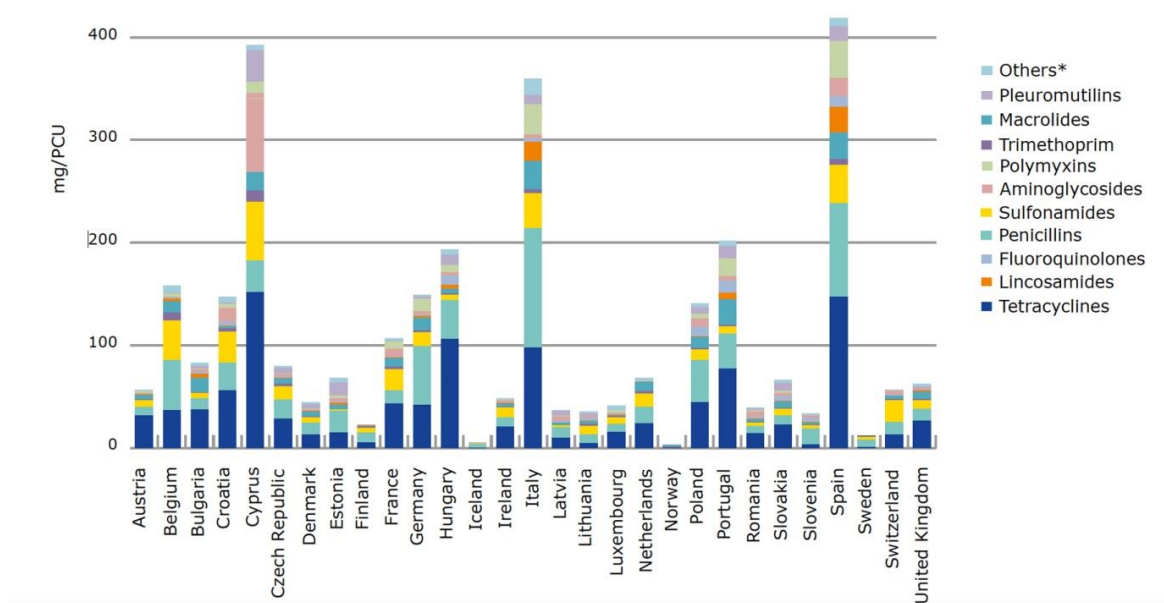
Uso veterinario de antimicrobianos

Los niveles de resistencia antibiótica están muy relacionados con el uso veterinario de los antibióticos como promotores del crecimiento (aunque este uso fue prohibido a nivel europeo en 2006) y profilaxis de infecciones, donde se suelen usar a dosis subterapéuticas; así como a dosis terapéuticas en caso de tratamiento de infecciones. El ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) es un proyecto puesto en marcha en 2009 por la

Agencia Europea de Medicamentos (EMA) a petición de la Comisión Europea para recoger y evaluar de datos sobre venta y consumo de antimicrobianos en los diferentes países, en el que participa España desde 2011. La Agencia Europea de Medicamentos publicó en octubre de 2016 (73) el último informe ESVAC, que recoge los datos de 2014. El informe se centra en los animales de producción: bovino, porcino, aves, ovino, caprino, peces y caballos; aunque también muestra datos del consumo de antimicrobianos en comprimidos, utilizados en los animales de compañía. Podemos comprobar en el mismo una gran diferencia entre los 3,1 mg/PCU (mg/Unidad de Corrección de la Población) consumidos en Noruega y los 418,18 mg/PCU consumidos en España.

Según el estudio, los antimicrobianos más consumidos en 2014 en el conjunto de los 29 países participantes fueron tetraciclinas (33,4%), penicilinas (25,5%) y sulfonamidas (11,0%). En relación con los agentes antimicrobianos de “importancia crítica” para los seres humanos según la OMS, las ventas en animales de producción fueron cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (0,2%), fluoroquinolonas (1.9 %) y macrólidos (7,5%). Las ventas de polimixinas supusieron el 6,6% del total de ventas, representando la colistina más del 99% de las ventas de las polimixinas. En la figura 2 podemos ver de forma representativa el consumo de las diferentes clases de antibióticos de uso veterinario para animales de producción en 29 países europeos, incluido España.

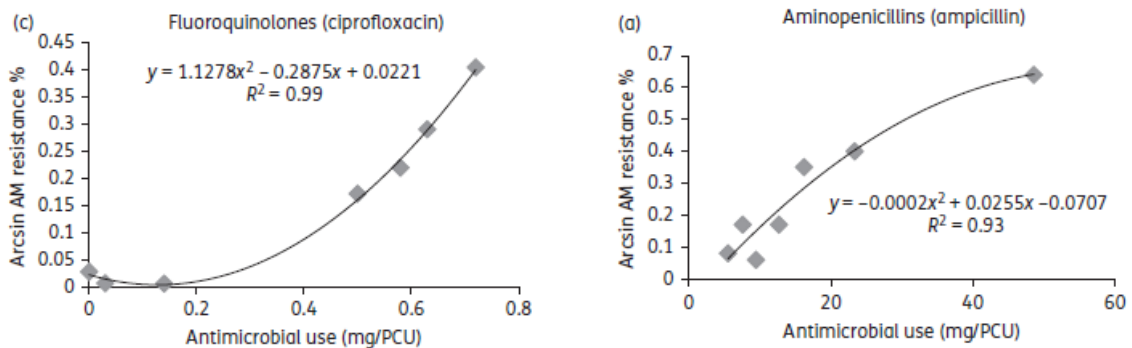
Figura 2. Ventas de antimicrobianos para animales de consumo en 29 países Europeos en 2014(73).



Aunque existen factores que pueden influenciar el consumo de antimicrobianos, como la composición del ganado, los sistemas de producción, la variabilidad en las dosis y formulaciones así como la duración de los tratamientos, estos solo pueden justificar parcialmente las diferencias de consumo observadas entre países.

Con respecto a las fluorquinolonas en España, sólo supusieron un 2,9% del total de antimicrobianos consumidos; y, en general, no son uno de los grupos de mayor consumo. Sin embargo, como podemos ver en un estudio reciente que evalúa la relación entre el consumo de antibióticos en veterinaria y las tasas de resistencia en *E.coli* en la Unión Europea (74), indica que, aunque para la mayoría de las clases de antibióticos existe una correlación con forma de curva asintótica en la que, a partir de un determinado nivel de uso del antibiótico, no se genera un aumento en el porcentaje de resistencia; en el caso de las fluorquinolonas, así como de los anfenicoles y cefalosporinas de amplio espectro; la curva obtenida es exponencial, de forma que pequeños aumentos en el consumo suponen grandes aumentos en las tasas de resistencia (figura 3).

Figura 3. Relación entre el consumo de antimicrobianos en veterinaria y tasas de resistencia (74).



En este estudio además, han encontrado una correlación positiva entre el uso de antimicrobianos y la aparición de resistencias para todos los antimicrobianos estudiados; así como entre las tasas de resistencia y los niveles de consumo de antimicrobiano en los países incluidos (Bélgica, Holanda, Suiza, Austria, Dinamarca, Noruega y Suecia).

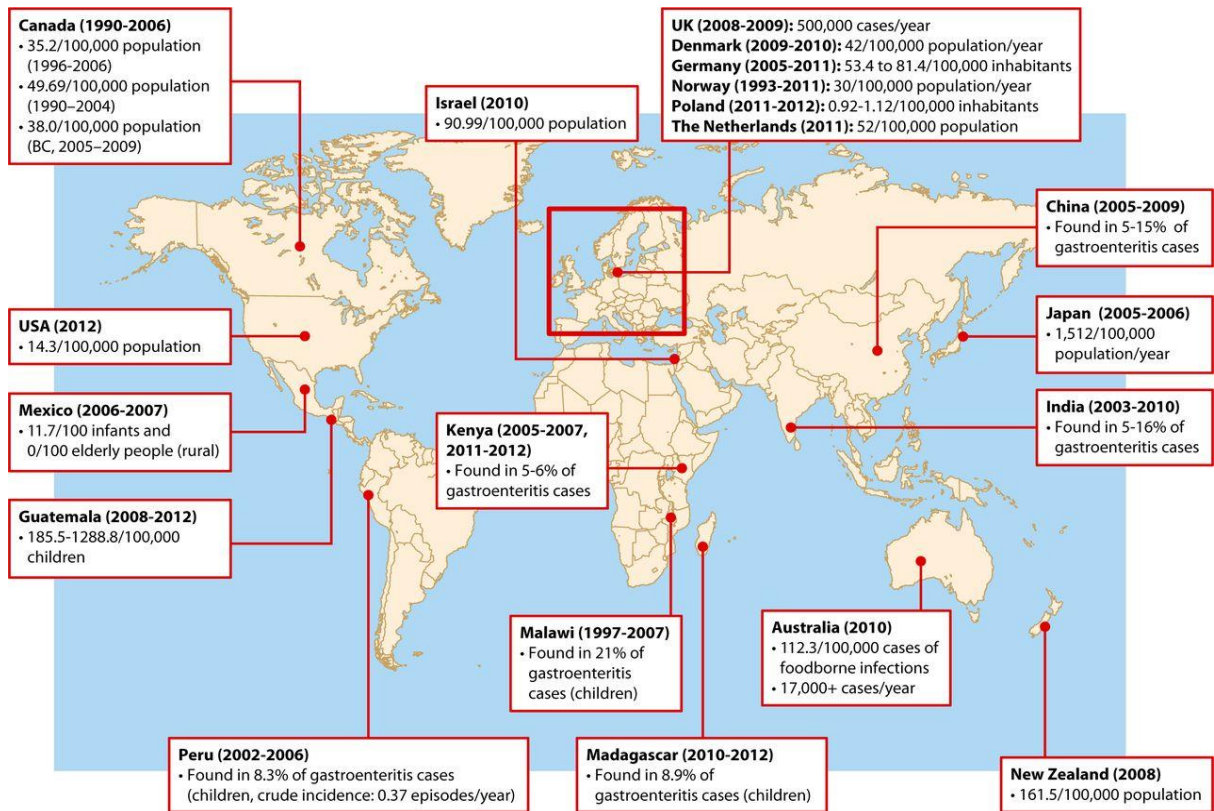
Epidemiología

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que ha aumentado su incidencia global en la pasada década. El número de casos ha aumentado en Norte América, Europa y Australia. Y, aunque los datos son incompletos, la infección por *Campylobacter* sigue siendo endémica en las regiones de África, Asia y Oriente Medio (4).

En Europa concretamente, la incidencia de infección varía desde 29,9 hasta 13.500 casos por cada 100.000 habitantes. Esto equivale a 9.2 millones de casos en 2009, comparado con los 6,2 millones de casos de salmonelosis (4).

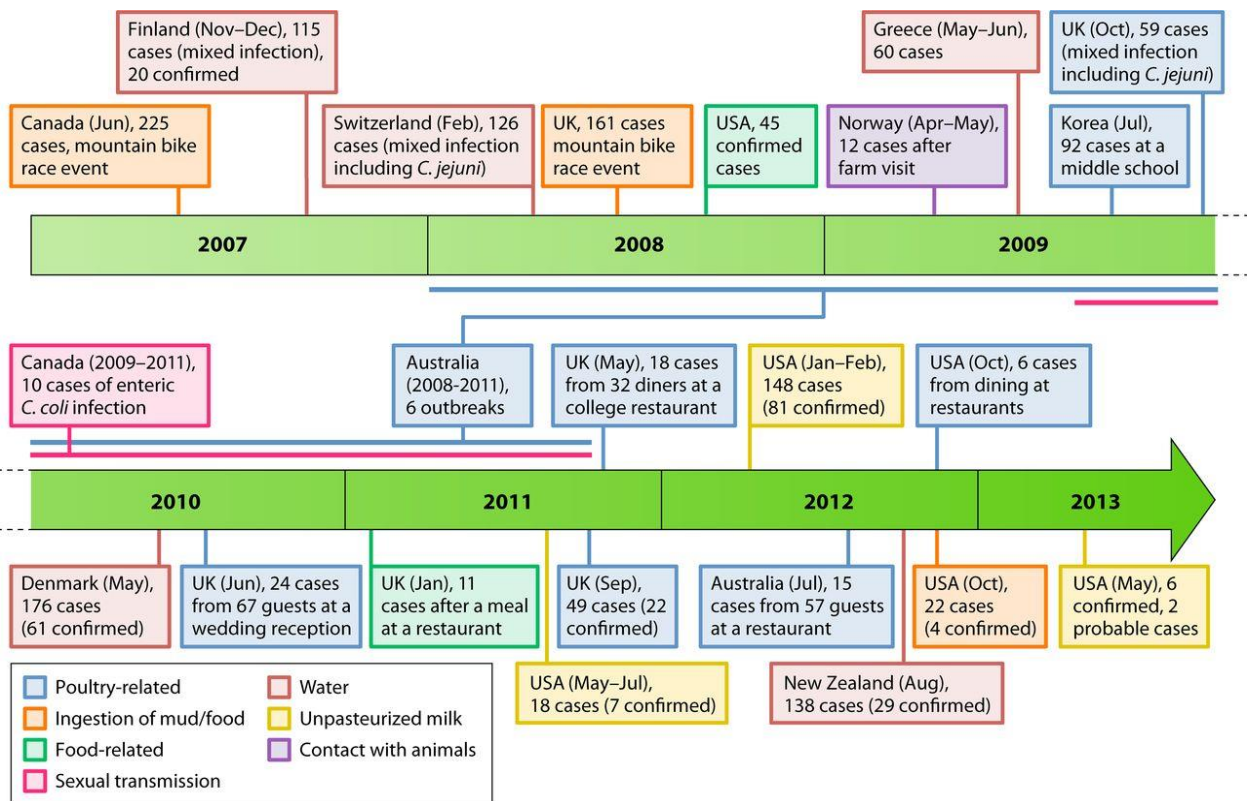
Existen diferencias sustanciales en la incidencia y el número de casos comunicados en diversas zonas de los mismos países, lo cual se deba, probablemente, a diferencias en la sensibilidad de los métodos de detección, área, población y alcance de los estudios; así como a diferencias en los protocolos de biocontrol, sesgos de vigilancia, prácticas culinarias y la disponibilidad de los reservorios naturales de *Campylobacter* en estas regiones. Además es muy probable que los casos documentados de infección estén infradiagnosticados. Otro factor que también puede influenciar las diferencias de prevalencia son los niveles de inmunidad en la población. En los países en desarrollo donde *Campylobacter* es endémico, la infección se suele limitar a la infancia, con tasas decrecientes de enfermedad, sugiriendo que la exposición en las primeras etapas de la vida puede dar lugar a una inmunidad protectora y a infecciones y excreción del microorganismo asintomáticas, lo cual tiene su impacto en la transmisión de las infecciones en estos países. La excreción asintomática también se da en los países desarrollados (4). En la figura 4 podemos ver un mapa del mundo con ejemplos representativos de la incidencia y prevalencia de la infección por *Campylobacter* en las diferentes zonas geográficas.

Figura 4. . Incidencia y prevalencia de campilobacteriosis (4).



Aunque la mayoría de los casos suelen ser aislados, también se producen brotes de campilobacteriosis. El CDC (Centers for Disease Control and Prevention) define un brote alimentario como la aparición de más casos de lo esperado en un área en particular o entre un grupo específico de personas durante un periodo concreto, generalmente con una causa común, siendo las fuentes más comunes la carne de pollo y el agua. Desde 2007, el número de individuos incluidos en brotes publicados de campilobacteriosis varía desde 10 a más de 100 y se han correlacionado con el tipo de evento y la fuente ambiental de infección (4). La figura 5 que vemos a continuación nos permite visualizar gráficamente los brotes de campilobacteriosis en el periodo comprendido entre los años 2007 y 2013 en distintos países a nivel mundial.

Figura 5. Línea temporal de los brotes de campilobacteriosis (2007 – 2013)(4).

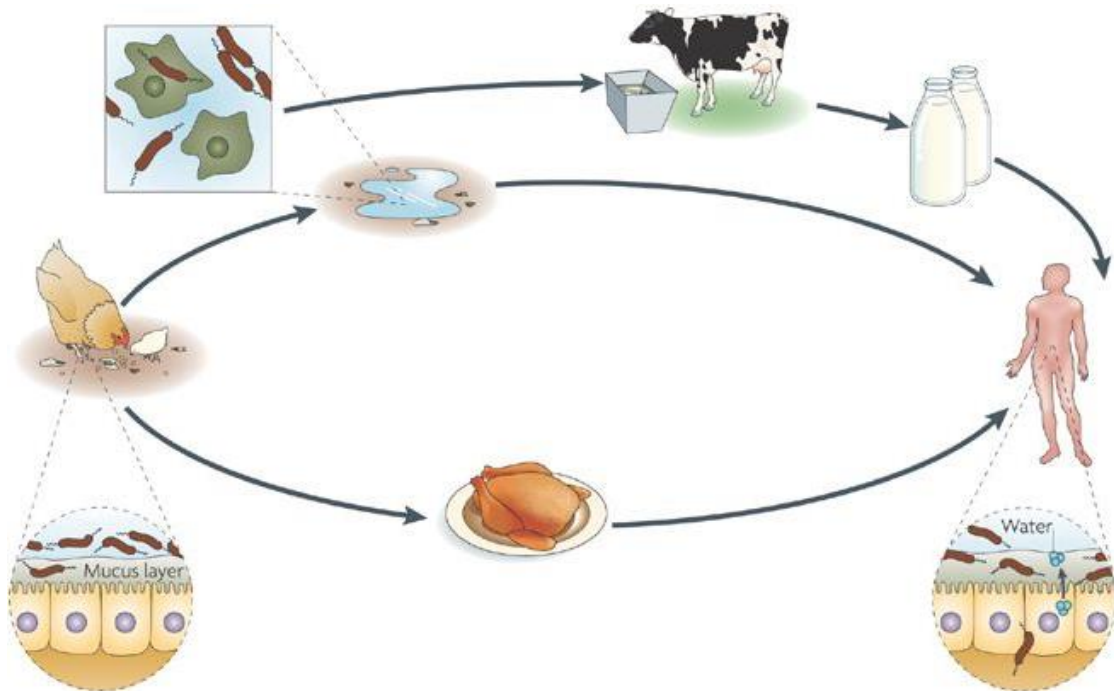


La adquisición primaria de las especies de *Campylobacter* ocurre a menudo en las etapas tempranas de la vida de los animales y puede dar lugar a morbimortalidad, pero en la mayoría de los animales colonizados da lugar a un estado de portador de por vida (1).

El amplio reservorio animal es la fuente para la mayoría de los casos de infecciones humanas. Los productos alimenticios procedentes de los animales colonizados se suelen contaminar con el contenido intestinal durante el procesamiento en el matadero. Un reciente estudio europeo (74) de monitorización de resistencias a antibióticos de interés clínico en cepas de diversos géneros procedentes de animales destinados a alimentación humana (pollos, ganado vacuno y cerdos) indicó que la NARMS (Sistema Nacional de Monitorización de la Resistencia Antimicrobiana) ha dejado de evaluar los aislamientos de *Campylobacter* de carne de cerdo al por menor y de la carne picada debido a que la presencia de *C. coli* es extremadamente baja y no se considera una fuente significativa para la campilobacteriosis humana. Otros estudios europeos parecen haber obtenido similares resultados. De hecho, en la revisión sistemática realizada por Domingues y colaboradores (75), los factores de riesgo más importantes para la adquisición de una infección por *Campylobacter* spp., que encuentran son los viajes, comer

carne de pollo poco cocinada, la exposición a través de vías medioambientales (beber agua contaminada, actividades acuáticas recreativas), contacto directo con animales de granja y tener una enfermedad crónica preexistente. La carne de cerdo, por su parte, no supone un factor de riesgo a tener en cuenta. En la figura 6 se esquematizan las vías más importantes de infección por *Campylobacter*.

Figura 6. Esquemática de las vías de transmisión de *Campylobacter*(2).



En un estudio realizado en Suiza con cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de pollo recogidas en el matadero y en el producto final, así como procedentes de infección humana, Kittl y colaboradores (76) observan que desde el matadero hasta el producto final se mantienen las proporciones encontradas de ambas especies, mientras que en las cepas humanas la proporción de *C. coli* disminuye, pudiéndose deber a una diferente capacidad entre ambas especies para causar infección y no a una pérdida de viabilidad en la cadena alimenticia.

Estos autores, además, tipifican las cepas de los 3 orígenes detectando un solapamiento importante entre las cepas de los mataderos y las carnes así como con las cepas humanas en ambas especies, confirmando la importancia de la carne de pollo como fuente de infección humana.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la incidencia de esta bacteria a lo largo del proceso de producción, así como en el producto final. Colles y colaboradores (77) detectaron que un 72% de cepas eran las mismas antes y después del procesado, indicando que la principal fuente de contaminación de los productos para el ser humano son los propios pollos vivos.

En un estudio realizado en 2015 (72), se recogieron muestras a lo largo de todo el proceso de producción procedentes de los pollos, las carcasas, los equipos y del agua de escaldado. La prevalencia general de *Campylobacter* fue del 68,8% (40.2% de *C. coli* y 28.5% de *C. jejuni*) y se aisló de todas las áreas. En otros estudios españoles y europeos también se detectó en todas las áreas (78,79); sin embargo la mayor prevalencia de una especie frente a la otra variaba según el estudio, encontrándose que *C. coli* fue la más prevalente en los mataderos de España, Italia y Bulgaria (80). En otros estudios determinaron que esto variaba según el matadero analizado(80). De esta forma, vemos cómo *C. coli* es la especie más aislada y además va aumentando su prevalencia a medida que avanza la cadena, de forma que casi duplica su porcentaje con respecto a *C. jejuni* en el producto final (64,6% vs. 35,4%). La resistencia a las condiciones ambientales (como las altas temperaturas, el pH o el oxígeno) en el género *Campylobacter* varía con la cepa y el genotipo; por lo que el incremento relativo de *C. coli* durante el procesado en este estudio español puede estar relacionado con estas diferencias.

En un reciente estudio realizado en China, Wang y colaboradores (81) determinan la prevalencia y la resistencia antibiótica de cepas de *Campylobacter* encontradas en granjas de pollos y cerdos así como mataderos durante el periodo 2008 – 2014. El dato a destacar de este estudio es el cambio en el predominio de las especies en las muestras de pollos, de forma que *C. jejuni* pasa de un 75,6% de los aislamientos en 2008 a un 29,9% del total en 2014. De forma contraria, *C. coli* pasó de un 19,3% en el año 2008 a un 70,1% en 2014. Es decir, *C. coli* se ha convertido en la especie dominante en los años más recientes.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La campilobacteriosis es una causa fundamental de gastroenteritis con una alta incidencia en todo el mundo. Aunque en la mayoría de los casos el tratamiento antibiótico no es necesario, en las edades extremas de la vida, pacientes inmunodeprimidos o con un proceso grave o de larga duración, este tratamiento está indicado, así como en las bacteriemias por *C.coli*.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un tema actual de gran preocupación por el abuso y utilización inapropiados de los mismos tanto en salud humana como veterinaria. Los datos de resistencias en *C. coli* son dispares según la localización geográfica que se esté considerando y el aumento de las mismas suponen un problema de salud pública dada la elevada prevalencia de gastroenteritis por este microorganismo y las posibles complicaciones que de él pueden derivarse.

Aunque según la bibliografía disponible la mayoría de los casos se produzcan de forma esporádica, es interesante investigar más profundamente las infecciones de nuestro medio con objeto de averiguar si existen conexiones o no entre casos y a lo largo del tiempo que nos pudiera orientar a orígenes comunes de las infecciones por este microorganismo en nuestro medio.

Por todo ello, en el presente trabajo planteamos la consecución de los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1. Determinar la distribución demográfica de las infecciones por *C. coli* en nuestro medio, con respecto a la edad y el sexo, así como establecer las características y sintomatología de los pacientes afectados por el mismo que requieren de ingreso hospitalario.
2. Determinar la sensibilidad de las cepas aisladas de *C. coli* a los antibióticos de elección para su tratamiento.
3. Comparar las técnicas de microdilución en caldo (MDC) y difusión en agar con tiras de gradiente antibiótico (GA) y determinar la distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los distintos antimicrobianos estudiados por ambos métodos.

4. Conocer la frecuencia de los diferentes patrones de resistencia y su evolución temporal durante el periodo de estudio.
5. Estudiar los mecanismos moleculares que subyacen en la resistencia a ciprofloxacino y eritromicina.
6. Evaluar dos técnicas moleculares de tipificación molecular como son la electroforesis en gel de campo pulsante (ECP, o en inglés, PFGE), y el análisis de los fragmentos de restricción tras digestión del gen *flaA* (PCR-RFLP), para establecer la relación clonal en las cepas estudiadas y su posible aplicación al estudio de la epidemiología de estas infecciones.
7. Establecer la posible relación clonal entre las cepas con similares patrones de resistencia.

MATERIAL

Microorganismos

❖ Muestras y aislamientos

Las muestras de las que se obtuvieron las 95 cepas que componen este estudio se reciben y procesan en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla durante el periodo 2010 – 2014.

Todos los aislamientos fueron recuperados de muestras de heces salvo un caso que se aisló de un hemocultivo. 67 pertenecían a pacientes pediátricos y 28 a adultos. Tres pacientes contaron con dos cepas cada uno separadas en el tiempo.

❖ Cepa patrón

Como cepa patrón se utilizaron *C. coli* ATCC33559 y *Salmonella braenderup* H9812.

Productos químicos y biológicos

- Ácido bórico (Pharmacia Biotech)
- Agarosa para ECP (Pulsed Field Certified Agarose, Bio – Rad)
- Agua destilada o desionizada
- Agua oxigenada
- Bromuro de etidio (Roche Molecular Biochemicals)
- Campygen[®] (Oxoid)
- Campyloset[®] (bioMérieux)
- Cristal violeta (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Decolorizador (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- dNTP (desoxinucleótidos trifosfato) (Submedic)
- EDTA Na₂ o ácido etilendiaminotetracético disódico (Sigma)
- Enzima de restricción *BceAI* (New England BioLabs_{inc})
- Enzima de restricción *BsaI* (New England BioLabs_{inc})
- Enzima de restricción *DdeI* (Roche Diagnostics)
- Enzima de restricción *SmaI* (Roche Diagnostics)
- Enzima de restricción *XbaI* (Roche Diagnostics)
- Fucsina (Francisco Soria Melguizo S.A.)

- Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega)
- Hipurato sódico BBL Taxo (BD)
- Lauril sulfato sódico (Sigma)
- Marcador de peso molecular Lambda Ladders (PREG MJ)
- MgCl₂ (Sigma)
- Ninhidrina
- Oxalato de p-aminodimetilanilina (Oxidasa®, Bio – Rad)
- Proteinasa K (Sigma – Aldrich)
- QIAamp Mini Kit® (Qiagen)
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, USA)
- Reactivos MALDI-TOF (Brucker Daltonic)
- Safranina (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Bio – Rad)
- Taq DNA Polymerase (Roche)
- Tris – clorhídrico (Roche Molecular Biochemicals)
- Yodo (Francisco Soria Melguizo S.A.)

Agentes antimicrobianos

En la realización de las pruebas de sensibilidad de las cepas estudiadas se emplearon los siguientes antimicrobianos:

❖ Tiras de gradiente antibiótico (bioMérieux)

- Ciprofloxacino
- Eritromicina
- Tetraciclina
- Tobramicina
- Amoxicilina – clavulánico
- Clindamicina
- Imipenem

❖ Microdilución en caldo (Sensititre® TREK Diagnostic Systems)

- Azitromicina
- Ciprofloxacino
- Eritromicina
- Gentamicina
- Tetraciclina
- Florfenicol
- Ácido nalidíxico
- Telitromicina
- Clindamicina

Medios de cultivo

- Agar sangre (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Agar Mueller – Hinton con sangre (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Agar Salmonella – Shigella (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Caldo selenito (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Agar Skirrow modificado → En un matraz Erlenmeyer disolver 40 g/l de agar sangre en agua desionizada. Tapar el matraz con un tapón de algodón y autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Sacar y dejar enfriar a 45 – 50 °C. Añadimos un 5 – 7% de sangre desfibrinada y los viales de Campyloset[®] (vancomicina: 2 mg, polimixina: 50 µg, trimetoprim: 1 mg) una vez reconstituidos con 2 ml de agua destilada estéril. Distribuir el medio en placas de Petri directamente del matraz y dejar solidificar (pH: 7,3 ± 0,2).
- Medio de conservación de cepas de *Campylobacter*. Pesar 0,5 g de glucosa (Sigma[®]), 2 g de leche en polvo maternizada y medir 3 ml de caldo tripticasa – soja (Oxoid[®]), 10 ml de glicerol y 100 ml de agua destilada o desionizada. Mezclar en un matraz y agitar vigorosamente para dispersar el glicerol. Dispensar en criotubos de 2 ml, a razón de un 1 ml por cada tubo. Colocar los tapones a los tubos ligeramente y autoclavar durante 10 minutos. Dejar enfriar y cerrar los tapones completamente. Sembrar en una placa de agar sangre y de forma aleatoria dos tubos de cada lote preparado para realizar así un control de esterilidad. Conservar en frigorífico por una duración de 3 o 4 meses.

Soluciones para ECP (Electroforesis en campo pulsado).

- Solución EDTA Na₂ 0,5M (pH 8)

- EDTA Na₂ : 18,61g
- Hidróxido sódico: 2g
- Agua destilada: 80ml

Disolver el EDTA Na₂ en el agua destilada a 60°C en agitación. Añadir el hidróxido sódico ajustando el pH. Completar con agua destilada hasta 100 ml. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

- Solución TRIS (1M)

- Tris: 121,1 g
- Agua destilada: 800 ml

Ajustar la solución para que tenga pH8 con HCl concentrado. Completar con agua destilada hasta 1000 ml. Esterilizar en el autoclave durante 20'. Conservar a temperatura ambiente.

- Tampón Tris – EDTA (TE) 10X pH 8

- 0,5 ml TRIS (2M)
- 0,5 ml EDTA (0,5M)
- 999 ml agua destilada.

- Solución de lauril sulfato sódico o sarcosina (SDS) al 30% (p/v)

- SDS: 30g
- Agua destilada: 80 ml
- Disolver a 65°C durante 20 minutos. Completar con agua destilada hasta 100 ml. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

- Tampón de lisis

- 50 mM TRIS (1M) pH8
- 50 mM EDTA (0,5M) pH8

- 1% Sarcosina (laurilsulfato) (30% p/v)
- 0,1 mg/ml proteinasa K (5 mg/ml)
- Para cada cepa elaboraremos 2 ml de solución de lisis. Multiplicamos por el número de cepas que vamos a digerir y preparamos en exceso. Hacemos los cálculos mediante factores de conversión para saber los volúmenes de las soluciones madre que debemos tomar.
- Tampón TBE (Tris – Borato – EDTA) 0,5X (pH 8)
 - Solución TBE 10X comercial
 - Agua destilada
 - Elaboramos 1 litro de solución TBE 0,5X añadiendo 50 ml de la solución comercial concentrada y 950 ml de agua destilada. Hacemos uso según necesidad.
- Solución de bromuro de etidio (EtBr₂)
 - 50 µl EtBr₂
 - 500 ml agua destilada

Cebadores

Tabla 3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo

Cebador	Gen	Secuencia (5' – 3')	Referencia
FlaA1	<i>flaA</i>	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC	Harrington y colaboradores (82)
FlaA2	<i>flaA</i>	CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG	Harrington y colaboradores (82)
GyrA1	<i>gyrA</i>	TTTTAGCAAAGATTCTGAT	Zirstein y colaboradores, Payot y colaboradores (83,84)
GyrA4	<i>gyrA</i>	CAGTATAACGCATCGCAGCG	Zirstein y colaboradores(84)
GyrWT	<i>gyrA</i>	TAAGGCATCGTAAACAGCTG	Payot y colaboradores(85)
GyrMUT	<i>gyrA</i>	TAAGGCATCGTAAACAGCTA	Payot y colaboradores(85)
Ccoli3F	QRDR	TATGAGCGT TAT TATCGGTC	Zirstein (2000) y colaboradores (86)
Ccoli4R	QRDR	GTCCATCTACAAGCTCGT TA	Zirstein (2000) y colaboradores (86)
23SFwd	ARNr23S	GTAAACGGCGGCCGTA ACTA	Payot y colaboradores (85)
23SRev	ARNr23S	GACCGAACTGTCTCACGACG	Payot y colaboradores (85)

23SWT	ARNr23S	AAAGGTCCACGGGGTCAT	Payot y colaboradores (30)
23SMUT	ARNr23S	AAAGGTCCACGGGGTCAC	Payot y colaboradores (30)
ermB-F	<i>ermB</i>	GGGCATTTAACGACGAAACTGG	Wang y colaboradores(87)
ermB-R	<i>ermB</i>	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	Wang y colaboradores(87)

MÉTODOS

Estudio de los datos clínicos

Los datos clínicos y demográficos del estudio se obtuvieron mediante la revisión de la historia clínica.

Procesamiento de las muestras clínicas

Las cepas de *Campylobacter* estudiadas en este trabajo fueron aisladas a partir de muestras clínicas siguiendo los Protocolos Normalizados de Trabajo (PNT) de la sección de coprocultivos del Servicio de Microbiología y Parasitología Clínicas del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Todas las muestras se sembraron en los siguientes medios: agar sangre, agar *Salmonella-Shigella*, agar Skirrow modificado y caldo selenito. Se incubaron a 37º durante 24 horas, a excepción del medio Skirrow modificado que se incubó a 42ºC durante 48 horas en atmósfera microaerófila (Campygen® OXOID). Tras las primeras 24 h, se les dio un pase del caldo Selenito al medio selectivo *Salmonella-Shigella*.

A las 48 horas de incubación se observan las placas del medio Skirrow y se procede a identificar las colonias sospechosas de pertenecer al género *Campylobacter*.

Pruebas de identificación

❖ Tinción de Gram modificada

Para la identificación presuntiva de género *Campylobacter*, a las colonias que presentan alguno de los dos morfotipos descritos, se les realiza la tinción de Gram modificada, en la cual el colorante de contraste safranina debe cambiarse por fucsina, pues de lo contrario el contraste es muy pobre y es difícil visualizar la bacteria (88).

Para realizar esta técnica, se recoge una colonia del microorganismo con ayuda de una asa estéril desechable y se deposita en un portaobjetos junto a una gota de suero salino estéril (0.85% NaCl). Se fija con calor y se procede a la tinción de Gram siguiendo los siguientes pasos:

1. Cubrir el portaobjetos con el colorante bacteriológico cristal violeta durante 2 minutos.
2. Lavar con abundante agua.
3. Cubrir el portaobjetos con el colorante bacteriológico Lugol (solución de Yodo PVP) durante 1 minuto.
4. Lavar con abundante agua.

5. Decolorar con alcohol-acetona durante 30 segundos.
6. Lavar con abundante agua.
7. Cubrir el portaobjetos con el colorante bacteriológico Fuchina fenicada durante 5 minutos.
8. Lavar con abundante agua y secar al aire.

Una vez realizada la tinción se observa al microscopio óptico depositando una gota de aceite mineral en el portaobjetos y empleando el objetivo de inmersión 100x. Si se observan formas gram negativas, delgadas y curvas o en forma de coma, podemos afirmar que pertenecen al género *Campylobacter*.

❖ Prueba de la oxidasa

En la prueba de la oxidasa se recoge una colonia del microorganismo con ayuda de un asa estéril desechable y se deposita sobre un disco de papel con oxalato de para-aminodimethylanilina (OXIDASE, BIO-RAD). La prueba se interpreta como positiva si aparece una coloración azul en un tiempo inferior a un minuto (88).

❖ Prueba de la catalasa

La actividad catalasa se detectó añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno en un tubo y con ayuda de un asa estéril desechable se tomaron 3-4 colonias de la placa y se sumergieron en el tubo. La producción de burbujas indica la presencia del enzima catalasa (88).

❖ Hidrólisis del hipurato

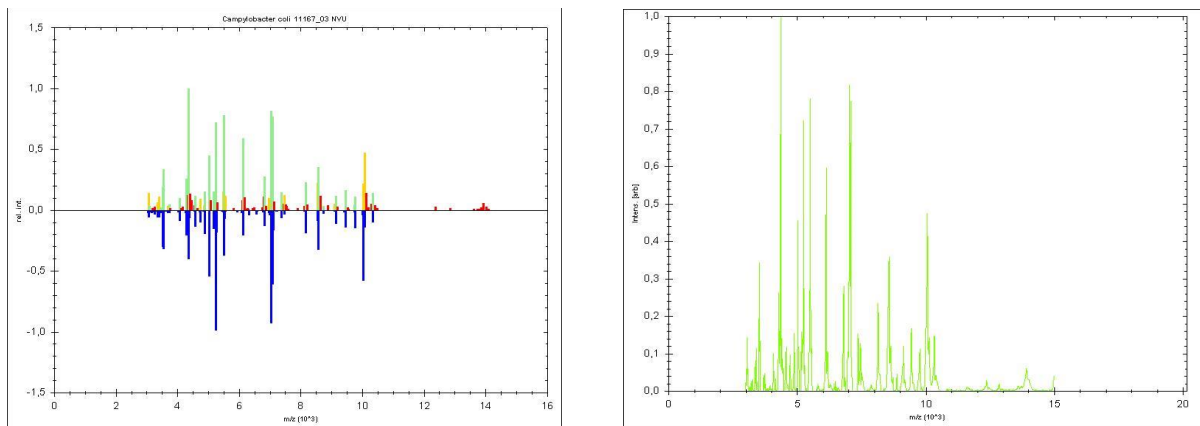
Para la observación de la hidrólisis del hipurato se suspenden varias colonias en una solución de hipurato y se incuba 24 horas. Transcurrido dicho periodo de tiempo se añaden 2 ó 3 gotas de ninhidrina. Si la hidrólisis se ha producido, la glicina originada reacciona con la ninhidrina y la solución pasa de ser transparente e incolora a tener una coloración púrpura. Un resultado positivo en esta prueba nos indica que la cepa pertenece a la especie *Campylobacter jejuni*. Las cepas de *Campylobacter coli* dan un resultado negativo en dicha prueba (88).

❖ Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Independientemente de la identificación mediante pruebas fenotípicas, se procede a la confirmación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)(8,9) según el protocolo elaborado por el fabricante.

Los picos azules que aparecen en la primera gráfica de cada especie son aquellos característicos del microorganismo en cuestión. Según el grado de coincidencia con dichos picos de la cepa problema que queremos identificar obtendremos una puntuación o *score* mayor o menor que nos indicará el grado de certeza de la identificación obtenida. En la figura 7 vemos un ejemplo del espectro obtenido con una cepa de *C. coli*.

Figura 7. Espectro obtenido de una cepa de *C. coli* por espectrometría de masas



Conservación de las cepas

Una vez identificadas las cepas como pertenecientes a la especie *Campylobacter coli*, se procede a su introducción en un medio líquido de conservación para microorganismos de difícil recuperación elaborado en el Laboratorio de Microbiología, a partir de un cultivo puro en medio de Skirrow modificado o en medio de agar sangre. Para ello se toma una gran cantidad de colonias y se suspenden en dichos viales, los cuales se conservan a -70° C hasta su utilización.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

❖ Método de difusión con tiras de gradiente antibiótico

El antibiograma de *C. coli* se realizó por el método de difusión con tiras de gradiente antibiótico siguiendo las recomendaciones publicadas en el documento de la Sociedad Francesa de Microbiología (89).

- Preparación del inóculo: Recoger varias colonias del microorganismo, con ayuda de una asa estéril desechable de la placa de aislamiento de agar sangre, y se resuspenden en un tubo de suspensión médium (Biomérieux®) de 2 ml. Agitar

hasta la completa disolución de las colonias y ajustar, con la ayuda de un turbidímetro a la concentración de 0.5 McFarland. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

- Preparación de las placas: Extraer de la nevera las placas de medio Müller-Hinton con sangre para que se encuentren a temperatura ambiente en el momento de su utilización. Se inoculan las placas de Müller-Hinton completamente sin dejar ninguna zona libre, deslizando el escobillón por la superficie del agar con ayuda de un rotor donde se coloca la placa. Se deja secar de 3 a 5 minutos antes de depositar las tiras de antibiótico.
- Dispensación de las tiras de antibiótico: Depositar las tiras manualmente con la ayuda de un dispensador. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidas de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Las tiras de E-test® utilizadas fueron aquellas con los siguientes antibióticos: ciprofloxacino, eritromicina, amoxicilina-clavulánico, tetraciclina, tobramicina, clindamicina e imipenem.
- Lectura: Las placas se incuban a 42º C en atmósfera microaerófila durante 24 horas o a la temperatura de 37ºC durante 48 horas. Tras este periodo se observa el crecimiento del microorganismo y se establece la CMI determinando a qué concentración del antibiótico queda inhibido el crecimiento del microorganismo.
- Interpretación: Según los valores de CMI obtenidos para cada antibiótico la cepa puede categorizarse dentro de las categorías clínicas de sensible o resistente, siguiendo los criterios de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (90) así como de la CASFM (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie) (89).

❖ Método de microdilución en caldo

La microdilución en caldo requiere la utilización de un caldo Mueller-Hinton ajustado y suplementado con 2,5–5 % de sangre lisada de caballo. Las condiciones de incubación fueron 48 horas a 36–37ºC en atmósfera microaerófila.

- Preparación de las cepas

- Descongelar las cepas.
 - Dar un pase a agar sangre de cada cepa.
 - Incubar en atmósfera microaerófila durante 24 horas a 42°C
 - Se empleó como cepa de control de calidad *C. coli* ATCC 33559
- Preparación del inóculo
 - Picar 1 ó 2 colonias de la placa de agar sangre e inocular en un tubo de caldo Sensititre® CAMHBT (Caldo Mueller-Hinton con tampón TES con cationes ajustados) de 5 ml y ajustar a una turbidez de 0,5 McFarland haciendo uso del nefelómetro Sensititre®. Mezclar.
 - Transferir 100 µl al caldo Sensititre® CAMHBT + LHB (Sangre lisada de caballo) de 11 ml para conseguir un inóculo de 5×10^5 UFC/ml. Mezclar.
- Inoculación de las placas
 - Sustituir el tapón del tubo de caldo por un Sensititre® “dose head”.
 - Inocular la placa de microdilución con 100 µl del caldo siguiendo las instrucciones del autoinoculador.
 - Retirar el tubo del caldo en los 30 segundos tras inocular la placa y eliminar.
 - Cubrir los pocillos con la lámina adhesiva perforada.
- Incubación de las placas
 - Introducir las placas en campanas de incubación con un sobre generador de atmósfera microaerófila (Oxoid®)
 - La incubación ha de hacerse durante 24 horas a 42°C. Se recomienda mantener un ambiente húmedo para evitar la evaporación del contenido de los pocillos.
- Lectura de los resultados
 - No es necesario retirar el adhesivo que cubre las placas.
 - El crecimiento aparece como una turbidez o como un depósito de células en el fondo del pocillo.
 - La CMI se determina como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe visiblemente el crecimiento.

- El pocillo de control de crecimiento debe leerse en primer lugar. Si no muestra crecimiento, no se pueden validar los resultados.
- Según los valores de CMI obtenidos para cada antibiótico la cepa puede categorizarse dentro de las categorías clínicas de sensible o resistente, siguiendo los criterios de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (90) así como de la CASFM (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie) (89).
- Alteraciones a tener en cuenta:
 - Disminución gradual del crecimiento: algunas combinaciones de microorganismo/antimicrobiano pueden producir una disminución gradual del crecimiento a lo largo de 2 ó 3 pocillos. En estos casos el punto final es aquél en el que el crecimiento está visiblemente inhibido.
 - Contaminación: se produce cuando en un pocillo se aprecia crecimiento y éste está rodeado por pocillos sin crecimiento. Si esto se produce en muchos pocillos debe repetirse el ensayo.
 - Saltos: son aquellos pocillos sin crecimiento rodeados de pocillos con crecimiento. Un único salto puede ignorarse. Para asegurar la eficacia de la terapia antimicrobiana nunca debe leerse el pocillo con salto como CMI, sino aquel pocillo sobre el cuál no hay de forma consistente más crecimiento.
 - Cultivos mixtos: si aparecen crecimientos diferentes o puntos finales diferentes, debe comprobarse la posibilidad de que sean dos poblaciones bacterianas, y en tal caso, los resultados no se pueden validar.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias para la lectura interpretada del antibiograma de *C. coli*.

Antibiótico	CMI (mg/L)	
	Sensible	Resistente
Ciprofloxacino ^a	≤ 0,5	> 0,5
Eritromicina ^a	≤ 8	> 8
Tetraciclina ^a	≤ 2	> 2
Tobramicina ^b	≤ 2	> 4
Gentamicina ^b	≤ 2	> 2
Amoxicilina-clavulánico ^b	≤ 4/2	> 16/2
Clindamicina ^c	≤ 1	> 1
Imipenem ^b	≤ 1	> 1

^a: Puntos de corte clínicos para *Campylobacter coli* según las guías EUCAST 2017 (90).

- Con respecto a eritromicina, existen puntos de corte diferentes según se trate de *C. coli* o de *C. jejuni*. En el trabajo de Sifré y colaboradores (92), comentan que en el caso de CLSI existe un único punto de corte para ambas especies, y llegan a la conclusión después de su estudio que se puede usar un mismo valor para ambas especies y que además eritromicina alcanza niveles muy altos a nivel intestinal que superan con creces los valores de CMI, de forma que un fracaso terapéutico es altamente improbable aunque se use el mismo punto de corte para *C. jejuni* y *C. coli*.

^b: Puntos de corte clínico para *Campylobacter* spp. según CASFM 2017 (89).

- Con respecto a imipenem, la sociedad francesa establece puntos de corte para ertapenem como proposición del Centro Nacional de Referencia de *Campylobacter*.
- Tobramicina ya no aparece en la última versión pero sí se recogía este antibiótico en versiones previas de la interpretación del antibiograma (93).

°: Puntos de corte epidemiológico (ECOFFs) para *C. coli* según EUCAST (<https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=32834>).

Técnicas moleculares para la identificación clonal

❖ Electroforesis en gel con campo pulsado (ECP)

La capacidad para diferenciar con precisión y rapidez los aislamientos relacionados entre sí es esencial para la vigilancia epidemiológica.

De forma general, la técnica de ECP se basa en la separación de grandes fragmentos de ADN en geles de agarosa mediante la alternación periódica del ángulo de la dirección del campo eléctrico. Estos macrofragmentos se generan por la acción de endonucleasas con sitios de reconocimiento de seis o más pares de bases (“cortadores de baja frecuencia”); de forma que dan lugar a menos de 30 fragmentos, generalmente entre 20 y 600 kbp.

Existen múltiples cambios genéticos que afectan a los patrones de ECP que se obtienen, como son las mutaciones puntuales (en los sitios de reconocimiento enzimático), inserciones (pequeños elementos móviles y grandes fagos), deleciones (pequeños elementos móviles y grandes fagos), plásmidos (ganancia o pérdida) y reordenamientos. Estos cambios pueden ocurrir tanto in vivo (persona a persona, persona al ambiente y de nuevo a otra persona) o in vitro (por los pases de laboratorio). Un único evento genético puede resultar en 0 – 3 bandas de diferencia.

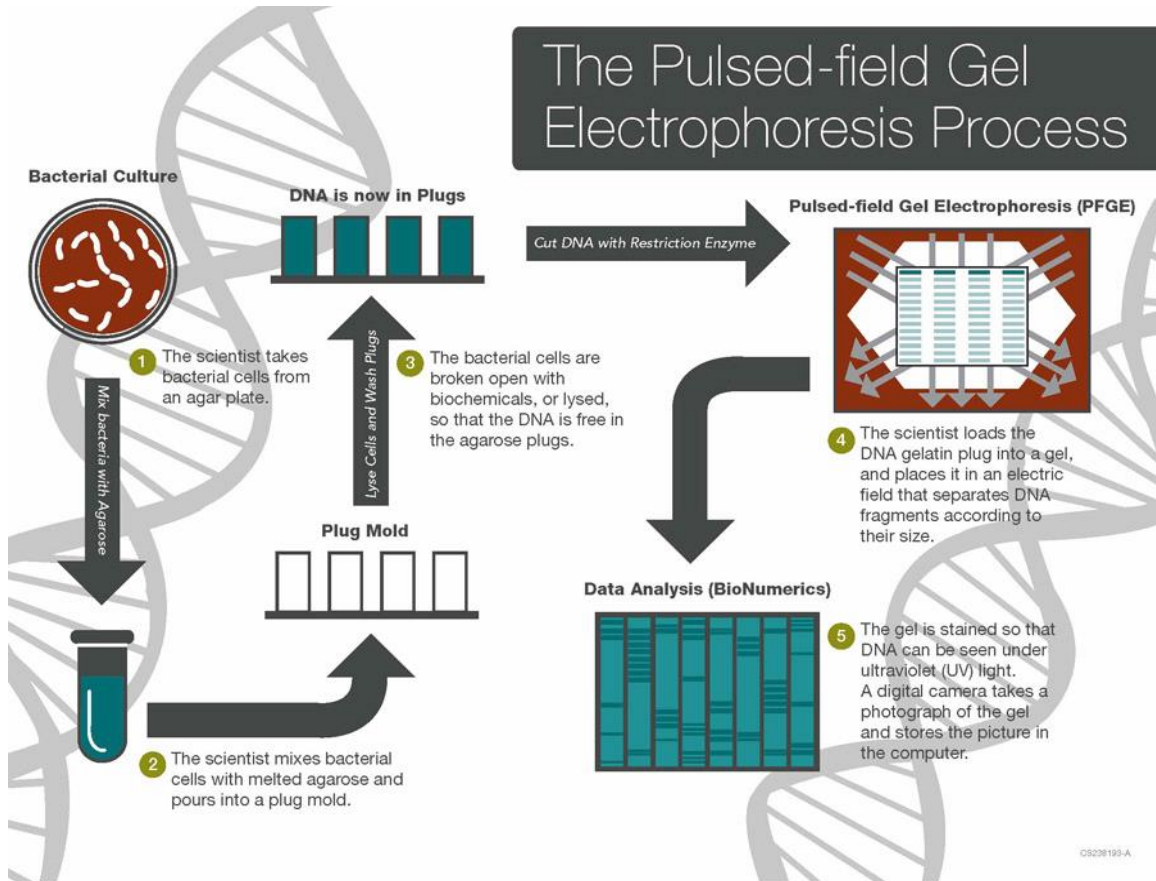
La técnica de ECP tiene un gran poder discriminatorio y una gran reproducibilidad, y se ha convertido en un método ampliamente utilizado. A través de una cuidadosa estandarización se obtienen buenos niveles de reproducibilidad interlaboratorio, lo cual ha llevado a la creación y mantenimiento de bases de datos internacionales, con PulseNet como principal representante. Se considera que la técnica de ECP es el método de referencia para la tipificación de *Campylobacter*. Sin embargo, se necesitan entre 2 y 4 días para obtener resultados, así como un equipo relativamente caro para realizar la técnica. Además los métodos basados en restricción son más subjetivos que los basados en la secuenciación, y los geles se deben analizar cuidadosamente a pesar del desarrollo digital y tecnológico (94–97).

Aunque en algunos trabajos *KpnI* se ha utilizado como enzima de digestión en ECP (98–107), hemos usado el enzima *SmaI*, ya que internacionalmente los datos generados por ECP de *Campylobacter* se han realizado usando el enzima *SmaI* y además es un enzima que produce

resultados más reproducibles. *Sma*I es generalmente suficiente para demostrar la diferencia entre dos cepas (108).

En la figura 8, tomada de la web de PulseNet, vemos de forma ilustrativa el proceso que se desarrolla en esta técnica de tipificación.

Figura 8. Proceso del ECP (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/ECP.html>)



En la web de PulseNet del CDC podemos encontrar asimismo una guía de resolución de problemas durante el procedimiento, así como algunos consejos y directrices para interpretar correctamente los patrones de bandas obtenidos. Esto supone la mayor complejidad de esta técnica (97).

A continuación se detallan los pasos a seguir en la realización del ECP para nuestras cepas de *C. coli* (109,110).

- Preparación de los bloques de agarosa.
 - En primer lugar, se da un pase a las cepas congeladas a agar sangre. Estas placas se incuban durante 24 horas a 42°C en atmósfera microaerófila.
 - En tubos de plástico de 5 ml vertemos 2 ml de PBS para resuspender las colonias y medir la absorbancia a 610 nm. La absorbancia requerida ha de estar entre los

valores 0.570 y 0.820.

- Rotular tubos eppendorf de 1,5 ml para transferir a ellos:
 - 400 μ l de la suspensión de cada microorganismo
 - 25 μ l de Proteinasa K (20mg/ml)
- Mezclar por inversión de 2 a 4 veces.
- Preparar una solución al 1,2% de agarosa SeaKem Gold® en tampón TE (Tris-EDTA 10X pH8) y añadimos 400 μ l de esa solución de agarosa a la mezcla anterior. Mezclamos suavemente con la pipeta y dispensamos en los moldes hasta que sobresalga un poco de la superficie.
- Dejar solidificar a Tª ambiente durante 10-15 minutos o a 4º C durante 5 minutos.
- Lisis de las células.
 - Preparar el tampón de lisis
 - 50 mM TRIS (1M)
 - 50 mM EDTA (0,5M)
 - 1% Sarcosina (laurilsulfato) (30%p/v)
 - 0,1 mg/ml Proteinasa K (5mg/ml)
 - Transferir los bloques una vez solidificados a tubos de 10 ml que contienen 2 ml de solución de lisis.
 - Incubar los bloques a 54ºC en el baño de agua con agitación constante y vigorosa durante al menos 30 minutos.
- Lavados (eliminar solución de lisis y restos celulares).
 - Introducimos los bloques en tubos Falcon.
 - Lavar 1 vez con agua destilada a 54ºC en el baño de agua durante 20 minutos.
 - Lavar 3 veces con TE pH8 a 54ºC en el baño de agua durante 20 minutos/lavado.
- Digestión del ADN.
 - Se procede a cortar los bloques de agarosa obtenidos. Para ello usamos un portaobjetos marcado mediante rotulador indeleble con dos líneas transversales separadas aproximadamente entre sí unos 5 mm que nos servirán de guía para obtener el tamaño de bloque deseado.
 - Se coloca sobre el portaobjetos un gel, lo secamos cuidadosamente y lo ponemos sobre la marca que hemos hecho. Cortamos el gel con un cubre de forma que nos quedemos con un tamaño aproximado al que hemos establecido.
 - Se pasa el bloque cortado a un tubo eppendorf de 1,5 ml rotulado.
 - Si la digestión no se va a realizar inmediatamente podemos añadir TE hasta cubrir los

- bloques y almacenarlos refrigerados.
- Añadimos a cada bloque 100 µl de tampón al 1x del enzima *Sma*I y los dejamos a Tª ambiente durante 10' – 15'.
 - Una vez transcurrido el tiempo eliminamos el tampón con una pipeta.
 - Elaboramos la solución del enzima de digestión *Sma*I.
 - Añadimos 200 µl de la solución a cada bloque.
 - Se necesitan 40 UI (4 µl) del enzima *Sma*I para la digestión del ADN de cada cepa.
 - Como referencia de pesos moleculares utilizamos una cepa de *Salmonella braenderup* debido a que el peso molecular de las diferentes bandas obtenidas se encuentra dentro del rango de las bandas que se obtienen con la mayoría de los patógenos alimentarios. La digestión del ADN de dicha cepa se realiza mediante el enzima *Xba*I siguiendo el mismo proceso(111).
 - Condiciones de incubación
 - *Campylobacter spp*: 23-26º C al menos 2 horas.
 - *Salmonella spp*: 37º C durante toda la noche.
 - Retiramos la solución del enzima y añadimos 200 µl de TBE 0,5X (Tampón Tris-Borato-EDTA).
 - Preparación del gel de agarosa
 - Preparamos un gel de agarosa al 1,2% (p/v).
 - Pesamos 1,8 g de agarosa para ECP.
 - Se disuelve la agarosa en 150 ml de TBE. Para ello la llevamos hasta ebullición usando el microondas y luego la mantenemos en el baño a 55ºC con agitación durante 30 minutos para que se enfríe.
 - Montaje del gel de agarosa
 - Se colocan las piezas del soporte
 - Secamos cuidadosamente con papel de filtro cada uno de los bloques de agarosa.
 - Colocamos los bloques en cada uno de los dientes del peine y los dejamos durante 5 minutos para que queden adheridos a los mismos.
 - Vertemos la solución de agarosa previamente preparada.
 - Una vez que el gel se ha enfriado procedemos a retirar el peine, de forma que los bloques quedan incluidos en el gel de agarosa.
 - Vertemos 2 litros de TBE 0,5X en la cubeta donde se va a realizar la

electroforesis y colocamos a continuación el gel.

- Encendemos el equipo de la electroforesis y programamos las siguientes condiciones:
 - Temperatura: 14º C
 - Voltaje: 6V/cm con un ángulo de 120º C.
 - Intensidad: 110-120 mA.
 - Pulsos: gradiente entre 6,8 y 38,4 segundos.
 - Tiempo: 18 horas.
- La bomba de recirculación del tampón de electroforesis debe programarse a una velocidad aproximada de 1l/minuto.
- Tinción del gel con bromuro de etidio
 - Preparamos la solución de bromuro de etidio
 - 500 ml de H₂O destilada
 - 50 µl EtBr₂
 - Balancear la bandeja hasta la completa mezcla de los componentes.
 - Sumergir el gel y dejarlo durante 30 minutos.
 - Visualizar el resultado mediante fotografía usando el sistema informático de Bio-Rad®.

❖ PCR – RFLP del gen *flaA*

La tipificación del gen *flaA* se basa en la amplificación por PCR de parte del *locus* de la flagelina, seguido por una digestión con enzimas de restricción con el fin de generar patrones de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

El locus de la flagelina en *C. jejuni* y *C. coli* consiste en dos genes tándem altamente homólogos, *flaA* y *flaB*. Cualquiera o ambos pueden usarse para la PCR inicial y existen técnicas de tipificación que utilizan uno o ambos genes para tal propósito. *Ddel* se utiliza como enzima de restricción(82).

A continuación, se detallan los pasos a seguir para la realización de esta técnica.

- Extracción del ADN mediante QIAamp Mini Kit® (Qiagen)
 - Realizar una suspensión del microorganismo en 1 ml de PBS. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5'
 - Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 180 µl de ATL (Tissue Lysis Buffer).

- Añadir 20µl de proteinasa K. Mezclar con el vórtex.
 - Incubar durante 30' como mínimo a 56°C.
 - Sacar del baño y dar un pulso de centrifuga (para recuperar de las paredes lo evaporado)
 - Añadir 200 µl de AL (Lysis Buffer).
 - Incubar 10' a 70°C.
 - Sacar del baño y añadir 200 µl de EtOH. Mezclar con el vórtex durante 15".
 - Rotular las columnas. Colocar tras cada columna 3 tubos.
 - Pasar el contenido de cada tubo eppendorf a la columna correspondiente.
 - Centrifugar a 8.000 rpm durante 1' (Programa 1)
 - Sacar las columnas y tirar el tubo que las contiene. Colocar las columnas en el interior de un tubo nuevo.
 - Añadir a la columna 500 µl de AW1.
 - Centrifugar a 8.000 rpm durante 1'.
 - Sacar las columnas y eliminar el tubo que las contiene. Colocar las columnas en el interior de un tubo nuevo.
 - Añadir a la columna 500 µl de AW2
 - Centrifugar a 8.000 rpm durante 1'.
 - Centrifugar a 12.000 rpm durante 1' (para secar de EtOH completamente las columnas)
 - Sacar las columnas y tirar el tubo que las contiene.
 - Rotular nuevos tubos eppendorf.
 - Introducir las columnas en los tubos eppendorf correspondientes.
 - Añadir 200 µl de AE (Elution Buffer). Dejar a Tª ambiente durante 3' – 5'.
 - Centrifugar a 8.000 rpm durante 1'.
 - Guardar el ADN extraído en el congelador.
- Amplificación del gen *flaA* mediante PCR
 - Sacar de la nevera los ADN extraídos anteriormente.
 - Rotular tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para las muestras correspondientes.
 - Preparar de la mezcla de reacción.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para amplificación del gen *flaA*.

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón (5X)	5 µl
Magnesio (MgCl ₂ , 25mM)	5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Taq polimerasa (5U/ µl)	0,25 µl
Cebador 1 : <i>flaA1</i> (20µM)	1 µl
Cebador 2: <i>flaA2</i> (20µM)	1 µl
H ₂ O	10,75 µl

- A cada tubo eppendorf añadimos 24 µl de la mezcla de reacción y 1 µl de la muestra correspondiente.
- Introducimos los tubos eppendorf en el termociclador.
- Secuencia de la reacción de PCR:
 - 94°C 1'
 - 35 ciclos con las siguientes condiciones
 - 94°C 15"
 - 45°C 45"
 - 72°C 90"
 - 72°C 5'
 - 4°C indefinidamente.
- Digestión del gen *flaA* mediante el enzima de restricción *DdeI*
 - Realizar la mezcla de los componentes.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de digestión

COMPONENTE	VOLUMEN
Producto de PCR	5 µl
Tampón del enzima (10x)	2 µl (1x)
Enzima <i>DdeI</i> (10U/µl)	1 µl
H ₂ O	12 µl
Volumen total	20 µl

- Añadir 15µl de dicha mezcla y 5µl de producto de PCR en tubos eppendorf rotulados para las cepas correspondientes.
- Dejamos la mezcla incubando durante toda la noche a 37°C.
- Electroforesis del producto de digestión
 - Montar el soporte del gel de agarosa.
 - Preparar el gel de agarosa al 1,3% en TBE (0,5X).
 - Verter la solución de agarosa en el molde y esperar a que solidifique.
 - Retirar el peine e introducir el gel en el recipiente para la electroforesis, el cual contiene una solución de TBE(0,5X) que debe cubrir el gel por completo.
 - Cargar el gel de agarosa.
 - Pipetear 5µl del producto de digestión y mezclar con el tampón de carga.
 - Introducir la mezcla en uno de los pocillos del gel de agarosa.
 - La escalera de peso molecular sigue el mismo proceso que el producto de digestión y se coloca en las posiciones del gel que se consideren más convenientes.
 - Conectar el aparato estableciendo un voltaje de 100 V.
 - Dejar correr el gel durante 1hora y 30 minutos.
 - Retirar el gel de la cubeta de electroforesis y realizar la foto correspondiente usando el sistema informático de Bio-Rad®.
 - Apagar los equipos y desechar el gel.

Técnicas moleculares para la identificación de mecanismos de resistencia

Ciprofloxacino y eritromicina se han considerado los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Campylobacter* hasta hace relativamente poco tiempo, con una tendencia al alza de la resistencia a la quinolona. En las bacterias gram-negativas este hecho ocurre fundamentalmente por mutaciones puntuales que llevan a sustituciones aminoacídicas en la región QRDR del gen *gyrA*. En *Campylobacter*, el polimorfismo genético C257T, que origina el cambio Thr86Ile, es el más frecuentemente observado (112–116). En nuestro país existe una alta tasa de resistencia a ciprofloxacino (117,118), aunque la mayoría de estudios que comprenden cepas de *C. coli* son trabajos realizados en animales o productos alimentarios (72,116,119,120). Con respecto a la eritromicina, la resistencia se mantiene baja

en *C. jejuni* pero en *C. coli* las tasas entran en la categoría de alta según la EFSA (European Food Safety Authority) (71), lo cual es preocupante ya que como comunicó este organismo en diciembre de 2015, tanto la listeriosis como la campilobacteriosis no han dejado de aumentar año tras año desde 2008 (121). Por todo ello hemos querido comprobar si las mutaciones que confieren resistencia a estos antibióticos están ampliamente extendidas también en las cepas humanas de nuestro medio haciendo uso de varias técnicas moleculares que se detallarán a continuación.

❖ Detección de mutaciones en el gen *gyrA* mediante protocolo de MAMA-PCR

MAMA-PCR (Mismatch amplification mutation assay) consiste en un protocolo de detección de mutaciones puntuales alélicas. Se realiza una primera PCR de una región conservada del gen en cuestión como control positivo y posteriormente se realizan dos PCR adicionales, una para detectar la secuencia salvaje y otra para detectar la secuencia mutante, que se diferencian en una única base en el extremo 3', lo cual confiere una alta especificidad.

En este caso vamos a detectar la mutación puntual que da lugar al cambio aminoacídico Thr – 86 – Ile, la cual es la que con más frecuencia confiere resistencia al ciprofloxacino (83,116,122–125).

Todas las PCR del control positivo deben amplificar correctamente, generándose un fragmento de 368 pares de bases (84). La presencia de la mutación Thr-86-Ile supone que no se amplifica el gen salvaje pero sí se amplifica el gen mutante, generándose un producto de 265 pb (83). En caso de que la cepa sea salvaje para esta mutación supondrá la amplificación de un fragmento de igual peso molecular pero correspondiente a la secuencia salvaje.

A continuación, detallamos los pasos a seguir para la realización de esta técnica:

- Rotular 3 tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para cada muestra, uno para la secuencia salvaje o “wild-type”, otro para la secuencia mutante y otro para el control positivo.
- En este protocolo hay que preparar, por tanto, tres mezclas de reacción, las cuales se diferencian en los cebadores utilizados.

Tabla 7. Componentes de las mezclas de reacción de MAMA-PCR gen *gyrA*.

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón (10x)	5 µl (1X)
dNTP (10mM)	1 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0,5 µl
Cebador 1: GyrA1 (20µM)	0,5 µl
Cebador 2:GyrA4/GyrWT/GyrMUT (20µM)	0,5 µl
H ₂ O	37,5 µl

- A cada tubo eppendorf añadimos 45 µl de la mezcla de reacción correspondiente y 5 µl de la muestra.
- Una vez preparada las PCR se introducen los tubos eppendorf en el termociclador.
- Programa de PCR:
 - 94°C 5'
 - 30 ciclos:
 - 94°C 30"
 - 50°C 30"
 - 72°C 1'
 - 4°C indefinidamente.
- Electroforesis del producto de PCR
 - El gel de agarosa se ha de elaborar al 2% en TBE (0,5X)
 - Dejar correr el gel durante 90 minutos.

❖ Secuenciación de la región QRDR del gen *gyrA*

La región QRDR es la zona del gen *gyrA* en la que se concentran las mutaciones que darán lugar a la resistencia a quinolonas por alteración de la secuencia aminoacídica cercana al sitio activo del subunidad GyrA de la ADN girasa (112,126,127). Realizamos una PCR para amplificar la región en cuestión (fragmento de 505 pares de bases) en una serie seleccionada de nuestras cepas con objeto de revisar la secuencia de dicho fragmento y hallar mutaciones y polimorfismos implicados o no en dicha resistencia (84,86).

- Amplificación de la región QRDR
 - Sacar de la nevera los ADN extraídos anteriormente correspondientes a las cepas resistentes a eritromicina según los métodos fenotípicos estudiados.
 - Rotular tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para las muestras correspondientes.
 - Preparación de la mezcla de reacción

Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR de la región QRDR del gen *gyrA*

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón (10x)	5 µl (1X)
dNTP (10mM)	1 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0,5 µl
Cebador 1: Ccoli3F(20µM)	0,5 µl
Cebador 2: Ccoli4R (20µM)	0,5 µl
H ₂ O	37,5 µl

- A cada tubo eppendorf añadimos 45 µl de la mezcla de reacción y 5 µl de la muestra.
- Una vez preparada la PCR se introducen los tubos eppendorf en el termociclador.
- Secuencia de la reacción de PCR
 - 94°C 3'
 - 30 ciclos:
 - 94°C 1'
 - 50°C 1'
 - 72°C 1'
 - 72°C 5'
 - 4°C indefinidamente.
- Electroforesis del producto de PCR
 - El gel de agarosa se ha de elaborar al 2% en TBE (0,5X)
 - Dejar correr el gel durante 1 hora.
- Purificación del producto de PCR.

La purificación del producto de PCR en la mezcla de reacción se realizó con el kit E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, USA) siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante. Así, la banda de ADN de interés se separa del gel o bien, se parte del producto total de PCR, que se disuelve en un tampón de unión y se transfiere a una columna HiBind® DNA Mini. Después de tres etapas de lavado rápido, el ADN se eluye con el tampón de elución y de este modo queda listo para secuenciar.

- Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias

Los productos de PCR purificados se enviaron a Macrogen (Korea) para su secuenciación, haciendo uso de los mismos cebadores utilizados en la amplificación. En todos los casos se analizaron las dos hebras de ADN, a una concentración de 10 µM.

- La identificación de las especies se llevó a cabo mediante un análisis de búsqueda BLAST en la base de datos genómica NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- ❖ Detección de mutaciones en el gen ARNr 23S mediante protocolo de MAMA-PCR

Con esta técnica vamos a aplicar el mismo procedimiento que en el epígrafe anterior a la detección de la principal mutación que confiere resistencia a eritromicina, el cambio A2075G en el gen que codifica para el ARNr23s (85,128,129). La presencia de una mutación en la posición 2075 supone que no se amplifica el gen salvaje pero sí se amplifica el gen mutante, generándose un producto de 200 bp.

- Rotular dos tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para cada muestra, uno para la secuencia salvaje y otro para la secuencia mutante.
- En este protocolo hay que preparar dos mezclas de reacción, una para detectar la secuencia salvaje y otra para detectar la secuencia mutante. La diferencia entre ambas son los cebadores utilizados.

Tabla 9. Componentes de la mezcla de reacción MAMA-PCR ARNr23S

COMPONENTE	VOLUMEN
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,5 μ l
Cebador 1: 23SFwd (20 μ M)	0,5 μ l
Cebador 2: 23SWT / 23SMUT (20 μ M)	0,5 μ l
H ₂ O miliq	37,5 μ l
Tampón (10x)	5 μ l (1X)
dNTP (10mM)	1 μ l

- A cada tubo eppendorf añadimos 45 μ l de la mezcla de reacción correspondiente y 5 μ l de la muestra.
- Una vez preparada la PCR se introducen los tubos eppendorf en el termociclador.
 - Secuencia de la reacción de PCR
 - 94°C 5'
 - 30 ciclos:
 - 94°C 30"
 - 50°C 30"
 - 72°C 1'
 - 72°C 1'
 - 4°C indefinidamente.
- Electroforesis del producto de PCR
 - El gel de agarosa se ha de elaborar al 2% en TBE (0,5X)
 - Dejar correr el gel durante 1 hora.

❖ Detección de mutaciones en el gen ARNr 23S mediante PCR-RFLP.

Además de la técnica de MAMA-PCR podemos aplicar también una PCR-RFLP con la que confirmar la mutación previamente detectada en la posición 2075 así como identificar una nueva mutación en la posición 2074. Uno de los cebadores usados es el mismo que en el proceso anterior y se añade un nuevo cebador, originando un producto de PCR que se someterá a digestión enzimática. Los enzimas a utilizar son *Bsa*I, que en caso de mutación en la posición 2075 dará lugar a dos fragmentos de 157 y 557 pares de bases en lugar de un solo

fragmento, y *BceAI*, que en caso de mutación en la posición 2074, dará lugar a tres fragmentos de 21, 153 y 540 pares de bases en lugar de dos fragmentos de 21 y 693 pares de bases (85).

- Amplificación del gen ARNr 23S mediante PCR
 - Sacar de la nevera los ADN extraídos anteriormente correspondientes a las cepas resistentes a eritromicina según los métodos fenotípicos estudiados.
 - Rotular tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para las muestras correspondientes.
 - Preparación de la mezcla de reacción cada tubo eppendorf añadimos 45 μ l de la mezcla de reacción y 5 μ l de la muestra correspondiente.

Tabla 10. Componentes de la reacción de PCR para la técnica PCR-RFLP gen ARNr23S.

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón (10x)	5 μ l (1X)
dNTP (10mM)	1 μ l
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,5 μ l
Cebador 1: 23SFwd (20 μ M)	0,5 μ l
Cebador 2: 23SRev (20 μ M)	0,5 μ l
H ₂ O	37,5 μ l

- Una vez preparada la PCR se introducen los tubos eppendorf en el termociclador.
- Secuencia del programa de la PCR
 - 94°C 5'
 - 30 ciclos:
 - 94°C 30"
 - 50°C 30"
 - 72°C 1'
 - 72°C 1'
 - 4°C indefinidamente.

- Digestión del gen ARNr 23S mediante el enzima de restricción *BceAI*.

Tabla 11. Componentes mezcla de digestión con enzima *BceAI*.

COMPONENTE	VOLUMEN
Producto de PCR	15 μ l
Tampón del enzima (10x)	2 μ l (1x)
Enzima <i>BceAI</i> (2U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	2,5 μ l
Volumen total	20 μ l

- Realizar la mezcla de los componentes.
- Añadir 5 μ l de dicha mezcla y 15 μ l de producto de PCR en tubos eppendorf rotulados para las cepas correspondientes.
- Dejamos la mezcla incubando durante toda la noche a 37°C.

- Digestión del gen ARNr 23S mediante el enzima de restricción *BsaI*

Tabla 12. Componentes mezcla de digestión con enzima *BsaI*

COMPONENTE	VOLUMEN
Producto de PCR	15 μ l
Tampón del enzima (10x)	2 μ l (1x)
Enzima <i>BsaI</i> (10U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	2,5 μ l
Volumen total	20 μ l

- Realizar la mezcla de los componentes.
- Añadir 5 μ l de dicha mezcla y 15 μ l de producto de PCR en tubos eppendorf rotulados para las cepas correspondientes.
- Dejamos la mezcla incubando durante toda la noche a 50°C.

- Electroforesis del producto de digestión
 - El gel de agarosa se ha de elaborar al 2% en TBE (0,5X)
 - Dejar correr el gel durante 1 hora y 30 minutos.

❖ Detección del gen *ermB* mediante PCR

Hay descritos tres tipos de mecanismos de resistencia a los macrólidos: modificación de la diana por mutación o metilación, inactivación del fármaco y el eflujo activo de antibiótico. Los genes *erm* codifican unas enzimas que metilan el ribosoma, confiriendo resistencia a los macrólidos en múltiples especies bacterianas, pero hasta hace poco tiempo estas enzimas no se habían detectado en *Campylobacter*. Sin embargo hay cepas que no llevan mutaciones en el gen codificante del ARNr23S ni en las proteínas ribosomales y aun así presentan resistencia de alto nivel a eritromicina. Las bombas de eflujo no son suficientes para tal hecho y Qin y colaboradores descubrieron la presencia del gen *ermB* en esta especie (59,61,64,87).

Los cebadores utilizados fueron diseñados en base a las regiones conservadas del gen *ermB* encontrado en *C. coli* ZC113, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae* y *Lactobacillus reuteri* (87). La presencia en una cepa del gen *ermB* supone la amplificación de un producto de 421pb.

- Seleccionar los ADN extraídos anteriormente correspondientes a las cepas categorizadas como resistentes a eritromicina según los métodos fenotípicos estudiados.
- Rotular tubos eppendorf de PCR (0,5 ml) para las muestras correspondientes.

Tabla 13. . Componentes de la mezcla de reacción para PCR del gen *ermB*.

COMPONENTE	VOLUMEN
Tampón (10x)	5 µl
dNTP (10mM)	1 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0,5 µl
Cebador 1: <i>ermB</i> -F (20µM)	0,5 µl
Cebador 2: <i>ermB</i> -R (20µM)	0,5 µl
H ₂ O	37,5 µl

- A cada tubo eppendorf añadimos 45 μ l de la mezcla de reacción y 5 μ l de la muestra correspondiente.
- Una vez preparada la PCR se introducen los tubos eppendorf en el termociclador.
- Secuencia del programa de la PCR:
 - 94°C 5'
 - 35 ciclos:
 - 94°C 30"
 - 60°C 30"
 - 72°C 1'
 - 72°C 7'
 - 4°C indefinidamente.
- Electroforesis del producto de PCR
 - El gel de agarosa se ha de elaborar al 2% en TBE (0,5X)
 - Dejar correr el gel durante 1 hora.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se llevó a cabo con ayuda del programa IBM SPSS Statistics Version 22.0 (IBM Armonk, Nueva York, Estados Unidos), para el cálculo de la U de Mann Whitney con el fin de detectar diferencias estadísticamente significativas en la mediana de las CMI de los antibióticos estudiados.

La aplicación web disponible en: (<http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Tool>) ha sido utilizada para el cálculo del Índice de Simpson así como los índices de Rand y Wallace en la evaluación y comparación de las técnicas de epidemiología molecular aplicadas.

RESULTADOS

Aspectos demográficos y clínicos

Se estudiaron 95 cepas de 92 pacientes, ya que en tres de ellos (A, B, y C) se aislaron dos cepas en cada uno. Los pacientes A y C tienen cepas separadas más de once días y en el paciente B se aislaron dos cepas el mismo día. Observamos un predominio del sexo masculino (63% de los casos) así como dos grupos de edad con un mayor número de casos de infección por *C. coli*: niños de entre 1 y 5 años (43,5%) y adultos con más de 40 años (17,4%). La media de edad fue de 6 años (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución por grupos de edad y sexo de las infecciones por *C. coli*.

Mujeres (%) (N=34)	Hombres (%) (N= 58)	Grupos de edad	General (%) (N=92)	Hospitalización (%) (N=15)
2 (5,8)	4 (6,8)	< 1 año	6 (6,5)	0 (0)
12 (35,3)	28 (48)	1 – 5 años	40 (43,5)	2 (13,3)
7 (20,6)	5 (8,6)	5 - 10 años	12 (13)	0 (0)
1 (3)	5 (8,6)	10 - 20 años	6 (6,5)	2 (13,3)
5 (14,7)	3 (5)	20 – 40 años	8 (8,7)	3 (20)
4 (11,7)	12 (21)	>40 años	16 (17,4)	8 (53,3)
3 (8,8)	1 (2)	Desconocido	4 (4,3)	0 (0)

Quince (16,3%) pacientes estuvieron hospitalizados, y el 53,3% de estos se incluía en el grupo de más edad. Además, la mayoría de estos pacientes padecía alguna enfermedad de base importante como neoplasia, trasplante, enfermedad autoinmune o enfermedad renal crónica. (Tabla 15). Los síntomas que presentaron estos pacientes fueron diarrea (86,7%), dolor abdominal (53,3%), fiebre (66,7%), vómitos y náuseas (26,7% cada uno) y diarrea sanguinolenta (6,7%).

En 9 de los 15 casos, en el juicio clínico de los pacientes no aparece como diagnóstico la infección por *C. coli*. En 3 de estos casos el diagnóstico es una gastroenteritis aguda (GEA) sin filiar; en otros 3 casos el cuadro abdominal es atribuido a tratamientos del paciente, como el micofenolato de mofetilo (MMF), el hierro y otros fármacos inmunosupresores. En otros tres casos los síndromes clínicos fueron una apendicitis aguda, una colecistitis aguda con recidiva

de adenocarcinoma y un posible debut de enfermedad de Crohn. Además, en otro de los casos no hay información al respecto.

En cuanto al tratamiento, 10 de los 15 pacientes (66,7%) ingresados fueron tratados. De estos diez casos, 5 de ellos fueron tratados con antibióticos dirigidos a *Campylobacter*; pues se utilizó la azitromicina en 4 casos, eritromicina en 1 caso y ciprofloxacino en 3 casos. Estos tres casos de uso de ciprofloxacino fueron suspendidos y sustituidos por macrólidos. Los otros cinco pacientes con tratamiento recibieron antibioterapia no especificada en 3 casos, en otro caso se prescribió cotrimoxazol, puesto que se trataba de un paciente con trasplante renal y que se diagnosticó de una diarrea asociada al consumo de hierro; por lo que el aislamiento de *C. coli* no se tuvo en cuenta. Finalmente, el otro paciente con antibioterapia recibió ceftriaxona y teicoplanina.

En el resto de los pacientes no se utilizó tratamiento antibiótico. Se aplicaron medidas de rehidratación y otras medidas específicas para el paciente según su patología de base.

Tabla 15. Características clínicas y demográficas de los pacientes ingresados con infección por *C. coli*.

Paciente	Edad	Sexo	Condiciones subyacentes	Síntomas clínicos	Juicio clínico	Tratamiento
1	1	Femenino	Situación de abandono Fallo de medro	Diarrea Vómitos Febrícula Diuresis disminuída	GEA* Deshidratación grave IR prerrenal	Rehidratación
2	48	Femenino	EII Linfoma células del manto TASPE	Diarrea Náuseas Vómitos Dolor abdominal	Toxicidad intestinal grado I*	Antibioterapia empírica
3	49	Masculino	Trasplante renal	Diarrea Fiebre Náuseas Dolor abdominal	GEA por <i>Campylobacter coli</i>	Ciprofloxacino Azitromicina
4	61	Masculino	Trasplante renal VHB	Diarrea intensa Náuseas Fiebre Deshidratación	GEA por <i>Campylobacter coli</i> FRA prerrenal	Ciprofloxacino Azitromicina
5	54	Femenino	Amiloidosis 1ª Trasplante cardiaco TASPE	Diarrea	Toxicidad intestinal por micofenolato de mofetilo* (MMF)	Reducción MMF

6	81	Masculino	Estenosis aórtica severa Válvula protésica	Sin referencias	Sin referencias	Sin referencias
7	3	Masculino	Enfermedad de Hirschprung (Inteención quirúrgica a los tres meses de edad)	Fiebre Diarrea Dolor abdominal	Apendicitis aguda* Absceso/plastrón apendicular	Antibióterapia IV Apendicectomía
8	14	Masculino	ERC Hipomagnesemia Familiar	Diarrea Vómitos Fiebre Empeoramiento función renal	GEA*	Rehidratación
9	84	Masculino	Adenocarcinoma de ciego	Dolor abdominal, diarrea, fiebre	Colecistitis subaguda Recidiva adenocarcinoma con sobreinfección*	Antibióterapia IV no especificada
10	21	Femenino	Ninguna	Dolor abdominal, diarrea, vómitos y falta de apetito	GEA por <i>Campylobacter coli</i> Dispepsia gástrica funcional	Eritromicina Omeprazol Cinitaprida
11	67	Masculino	Trasplante renal	Diarrea	Diarrea de etiología asignada al hierro*	Suspensión Ferrogradumet Seprin (protocolo)
12	34	Femenino	Trasplante renal	Diarrea, febrícula, dolor abdominal, MEG inespecífico	Síndrome diarreico sin etiología asignada*	Tratamiento empírico con teicoplanina y ceftriaxona.
13	38	Femenino	Ninguna	Dolor abdominal intenso, náuseas, fiebre y sudoración	Posible debut enfermedad de Crohn*	No tratamiento
14	86	Femenino	Alzheimer	Diarrea sanguinolenta, fiebre, falta de apetito.	GEA por <i>Campylobacter coli</i> FRA prerrenal	Ciprofloxacino Azitromicina Transfusiones CH
15	12	Masculino	Ninguna	Dolor abdominal un año de evolución, diarrea y fiebre intermitente	GEA por <i>Campylobacter coli</i> Batería pruebas digestivas normales	Azitromicina

* Pacientes donde no se menciona el aislamiento microbiológico de *Campylobacter coli* en el juicio clínico del síndrome desarrollado por el paciente.

Sensibilidad antibiótica

Se determinó la sensibilidad a ciprofloxacino, eritromicina, tetraciclina y clindamicina mediante los métodos microdilución en caldo y difusión con tiras de gradiente antibiótico. Además, la sensibilidad a azitromicina y gentamicina se realizó sólo por microdilución en caldo y para tobramicina, amoxicilina-ácido clavulánico e imipenem con la difusión mediante tiras de gradiente antibiótico. Los resultados globales se recogen en las tablas 16 y 17. En la columna “Límite de CMI superior para comparar ($\mu\text{g/ml}$)” establecemos la CMI superior que vamos a considerar para poder comparar ambas técnicas, ya que las CMI superiores no siempre son coincidentes entre las mismas. Finalmente, hemos calculado la mediana de las CMI de los antibióticos para poder detectar diferencias estadísticamente significativas a través de la aplicación del test U de Mann Whitney.

Tabla 16. Resultados globales de las pruebas de sensibilidad antibiótica de las 95 cepas estudiadas mediante microdilución en caldo (MDC) y tiras de gradiente antibiótico (GA).

Antibiótico	Punto de corte resistenc. (mg/l)	Método	Rango concentración antibiótica ($\mu\text{g/ml}$)	RangoCMI ($\mu\text{g/m}$)	Límite CMI superior para comparar ($\mu\text{g/ml}$)	Mediana ($\mu\text{g/ml}$)
Ciprofloxacino	> 0,5	MDC	0,015 – 64	0,03 – 64	64	8
		GA	0,02- 32	0,125 - >32	64	64
Eritromicina	> 8	MDC	0,03 – 64	0,12 - >64	128	0,5
		GA	0,016 - 256	0,12 - >256	128	1,5
Azitromicina	> 0,5	MDC	0,015 – 64	< 0,015 - >64	-	0,06
Tetraciclina	> 2	MDC	0,06 – 64	<0,06 - >64	128	64
		GA)	0,016 - 256	0,047 - >256	128	128
Tobramicina	> 4	GA	0,016 - 256	0,5 - >256		2
Gentamicina	> 4	MDC	0,12 – 32	0,25 – 32	-	0,5
Amoxicilina-clavulánico	> 16/2	GA	0,016 – 256	0,12 - >256		4
Imipenem	> 8	GA	0,02 - 32	0,03 – 0,75		0,19
Clindamicina	> 1	MDC	0,03 – 16	0,016 ->16	32	0,25
		GA	0,016 - 256	0,04 - >256	32	0,5

Tabla 17. Sensibilidad antimicrobiana y categorización clínica de 95 cepas de *C. coli* por microdilución en caldo (MDC) y tiras de gradiente antibiótico (GA)

Antibiótico	CMI ₅₀		CMI ₉₀		S (%)		I (%)		R (%)	
	GA	MDC	GA	MDC	GA	MDC	GA	MDC	GA	MDC
Ciprofloxacino	>32	8	>32	32	5 (5,3)	5 (5,3)	-	-	90 (94,7)	90 (94,7)
Ác. nalidíxico	-	-	-	-	-	5 (5,3)	-	-	-	90 (94,7)
Eritromicina	1,5	0,5	>256	>64	72 (75,8)	73 (76,8)	-	-	23 (24,2)	22 (23,2)
Azitromicina	-	0,06	-	>64	-	73 (76,8)	-	-	-	22 (23,2)
Tetraciclina	>256	64	>256	>64	21 (22,1)	18 (18,9)	-	-	74 (77,9)	77 (81,1)
Tobramicina	2	-	6	-	55 (57,9)	-	28 (29,5)	-	12 (12,6)	-
Gentamicina	-	0,5	-	1	-	92 (96,8)	-	-	-	3 (3,2)
Amoxicilina-clavulánico	4	-	>256	-	55 (57,9)	-	15 (15,8)	-	25 (26,3)	-
Imipenem	0,19	-	0,38	-	95 (100)	-	-	-	0 (0)	-
Clindamicina	0,5	0,25	6	4	74 (77,9)	76 (80)	-	-	21 (22,1)	19 (20)

Analizamos tanto los resultados como las diferencias obtenidas mediante las dos técnicas realizadas en el caso de los antibióticos ciprofloxacino, eritromicina, tetraciclina y clindamicina que se recogen en tabla 18. Se observa el grado de concordancia entre ambos métodos a través del porcentaje de acuerdo, del índice Kappa así como la significación estadística de estas diferencias.

Tabla 18. Concordancia entre las técnicas de microdilución en caldo y tiras de gradiente antibiótico.

Antimicrobiano	Nº de aislamientos con el siguiente resultado de clasificación				% Acuerdo	Índice Kappa**	Test U Mann-Whitney (valor p)
	a*	b*	c*	d*			
Ciprofloxacino	5	0	0	90	100	1	< 0,001
Eritromicina	72	1	0	22	98,9	0,97	0,023
Tetraciclina	18	0	3	74	96,8	0,89	0,108
Clindamicina	74	2	0	19	97,9	0,93	0,022

*a: es el número de aislamientos sensibles por ambos métodos

*b: es el número de aislamientos sensibles por el método 1 (MDC) y resistentes por el método 2 (GA)

*c: es el número de aislamientos resistentes por el método 1 (MDC) y sensibles por el método 2 (GA)

*d: es el número de aislamientos resistentes por ambos métodos

** Los valores del índice Kappa indican el nivel de concordancia:

- <0,01, sin correlación
- 0,1 a 1,40, correlación débil
- 0,41 a 0,60, clara correlación
- 0,61 a 0,80 correlación alta
- 0,81 to 1,00, correlación casi completa o completa.

❖ Ciprofloxacino

La microdilución en caldo tiende a obtener unas CMI mucho más bajas siendo 8 µg/ml la mediana obtenida por este método y 64 µg/ml la obtenida mediante tiras de gradiente antibiótico. Como podemos ver en la tabla 18, ambas técnicas clasificaron a las cepas en las mismas categorías clínicas, con 90 cepas (94,7%) resistentes a ciprofloxacino. Por tanto, la concordancia entre ambos métodos fue del 100% y el índice kappa (K=1) indicó la completa concordancia en los resultados de ambas pruebas. Sin embargo, el parámetro de la U de Mann–Whitney mostró diferencias significativas entre ambos métodos (p < 0,001), lo cual podemos explicar por las diferencias en los valores de CMI obtenidos, teniendo en cuenta que

este parámetro determina si existen diferencias significativas entre las medianas de los métodos.

❖ Eritromicina

Aunque los valores de CMI obtenidos para este antimicrobiano por ambos métodos no son muy diferentes, sí hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,023$) en la mediana, que por microdilución en caldo fue de $0,5 \mu\text{g/ml}$ y por tiras de gradiente antibiótico, de $1,5 \mu\text{g/ml}$. Setenta y dos (75,8%) cepas son sensibles mediante la tira de gradiente antibiótico, mientras que por microdilución en caldo son sensibles 73 cepas (76,8%). Esto es debido a que la cepa 59 es heterorresistente, ya que podemos encontrar colonias dentro de la elipse de inhibición (figura 9), hecho que no fue detectado mediante la microdilución en caldo. Sin embargo, en el caso de la azitromicina sí pudimos observar que había crecimiento en pocillos no consecutivos (CMI: $0,25 \mu\text{g/ml}$; $4 \mu\text{g/ml}$ y $16 \mu\text{g/ml}$).

El porcentaje de acuerdo entre las técnicas fue del 98,9%, y el índice kappa ($K=0,97$) indicó una correlación casi completa.

Figura 9. Heterorresistencia de la cepa 59 detectada mediante tira de gradiente de eritromicina.



❖ Tetraciclina

La microdilución en caldo identificó más cepas resistentes (77 aislamientos) que las tiras de gradiente antibiótico (74 aislamientos). La concordancia entre ambos métodos fue del 96,8% y

el índice kappa ($K= 0,89$) indicó una correlación casi completa; sin embargo, el valor de este índice fue el más bajo entre todos los antimicrobianos que hemos comparado. Las medianas por microdilución en caldo y por tiras de gradiente antibiótico son $64 \mu\text{g/ml}$ y $128 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, y no había diferencias significativas entre ambos métodos ($p= 0,108$).

❖ Clindamicina

El método de tiras de gradiente antibiótico identificó dos cepas resistentes más que el método de microdilución en caldo, 21 aislamientos frente a 19. La concordancia entre ambas técnicas fue del 97,9% y la índice kappa ($K= 0,93$) estableció una correlación casi completa entre ellas. Las medianas obtenidas fueron de $0,25 \mu\text{g/ml}$ para microdilución en caldo y de $0,5 \mu\text{g/ml}$ para tiras de gradiente antibiótico. La U de Mann–Whitney mostró diferencias significativas entre ambos métodos ($p= 0,022$).

La comparación de ambos métodos se ha hecho mediante la concordancia categórica y esencial; un método comúnmente usado para comparar diferentes métodos de sensibilidad antibiótica.

La concordancia categórica se basa en las categorías clínicas de sensible, intermedio y resistente establecidas por los puntos de corte. Un error muy grave se define como una cepa resistente por el método de referencia y sensible por el método en comparación. Un error grave sería si la cepa es sensible por el método de referencia y resistente por el otro método en cuestión. Un error leve se define como un resultado de resistente o sensible por el método de referencia e intermedio por el método que se compara o viceversa.

La concordancia esencial se basa en el número de CMI más/menos una dilución doble ($\pm \log_2$) con respecto al método de referencia. La Food and Drug Administration (FDA) requiere $> 90\%$ de concordancia categórica y esencial, definiendo como: $< 1,5\%$ de errores muy graves, $<3\%$ de errores graves y $<10\%$ de errores leves (130).

En el caso de ciprofloxacino, no hay errores graves ni leves. En el caso de eritromicina, hay un error grave; el ya comentado en el apartado correspondiente y que se trata de la cepa heterorresistente. De esta forma, sólo tenemos un 1,05% de errores graves en eritromicina. En tetraciclina es donde encontramos mayores discrepancias; existiendo 3 cepas resistentes por microdilución y sensibles por tira de gradiente antibiótico. De esta forma, obtenemos un 3,16%

de errores muy graves, no cumpliendo con las exigencias de la FDA. Con respecto a clindamicina, encontramos un 2,11% de errores graves.

En cuanto a la distribución de los aislamientos según el número de \log_2 de diferencia entre ambas técnicas hay que tener en cuenta ciertos aspectos debido a las limitaciones en nuestra metodología. Estos aspectos son:

- Los valores concretos de concentración de antibióticos no son iguales entre ambas técnicas comerciales. Por este motivo, para poder compararlas y determinar las diferencias en el número de logaritmos entre ellas, hemos establecido que:
 - Son CMI iguales si coinciden las CMI entre ambas técnicas o no son exactamente las mismas (hecho inherente a las diferentes concentraciones establecidas por los fabricantes) pero no llegan a tener un logaritmo de diferencia.
 - Para determinar el número de logaritmos que diferencian unas CMI de otras, en el caso de que no sean múltiplos exactos de 2, nos quedamos con la diferencia menor.
- Se han excluido aquellas cepas con CMI fuera de rango. Por ejemplo, en el caso de eritromicina, se trata de aquellas cepas cuyas CMI son $> 256 \mu\text{g/ml}$ por tiras de gradiente antibiótico y $>64 \mu\text{g/ml}$ por microdilución en caldo; ya que no es posible determinar el número de logaritmos de diferencia entre ellas.
- En el caso de ciprofloxacino, mediante tiras de gradiente antibiótico la inmensa mayoría presentaban una CMI $> 32 \mu\text{g/ml}$. En este caso hemos decidido establecer la CMI como $64 \mu\text{g/ml}$ para poder dar una idea del grado de concordancia con la microdilución en caldo.

Así, teniendo en cuenta todo esto, el grado de concordancia en cuanto a valores de CMI se refiere, son los que presentamos en la siguiente tabla 19.

Tabla 19. Concordancia esencial entre ambos métodos de sensibilidad utilizados.

AB	Nº cepas	Nº de aislamientos con el mismo o diferente resultado de CMI por los métodos de microdilución en caldo y tiras de gradiente antibiótico expresado en número de log ₂ de diferencia.												% Concordancia	
		≤5	5	4	3	2	1	Igual	1	2	3	4	5		≥5
Eritromicina	73					2	6	27	17	19	2				68,49
Ciprofloxacino	95						2	5	24	12	36	10	6		32,63
Tetraciclina	52	3				1	4	14	16	6	7	1			65,38
Clindamicina	95				1	2	7	54	21	7	2	1			86,32

Vemos que teniendo en cuenta las CMI obtenidas, los grados de concordancia son menores. De hecho, para ciprofloxacino es tan sólo del 32,63%; cuyo valor p de significación estadística que obteníamos mediante la U de Mann Whitney ($p < 0,001$), refleja las diferencias entre las medianas por ambas técnicas. El resto de los porcentajes de concordancia de CMI obtenidas no son tan bajos como con ciprofloxacino. Nos llama la atención que, para clindamicina, el porcentaje de concordancia sea del 86,32% y, sin embargo, la estadística encontrara diferencias significativas.

En cuanto a los demás antibióticos probados hemos encontrado que con respecto a los aminoglucósidos las cepas son mucho más sensibles a gentamicina (96,8%, microdilución en caldo) que a tobramicina (57,9%, tiras de gradiente antibiótico). Solo el 57,9% de las cepas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico y todas ellas lo fueron a imipenem.

En las siguientes figuras podemos observar de forma gráfica la distribución de CMI para cada antimicrobiano. En el caso de ser un antibiótico para el que se han realizado ambas técnicas, la distribución por cada una de ellas se representa con distintos colores.

Figura 10. Distribución de CMI (% de cepas) de eritromicina mediante ambos métodos (Rojo: microdilución en caldo; azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).

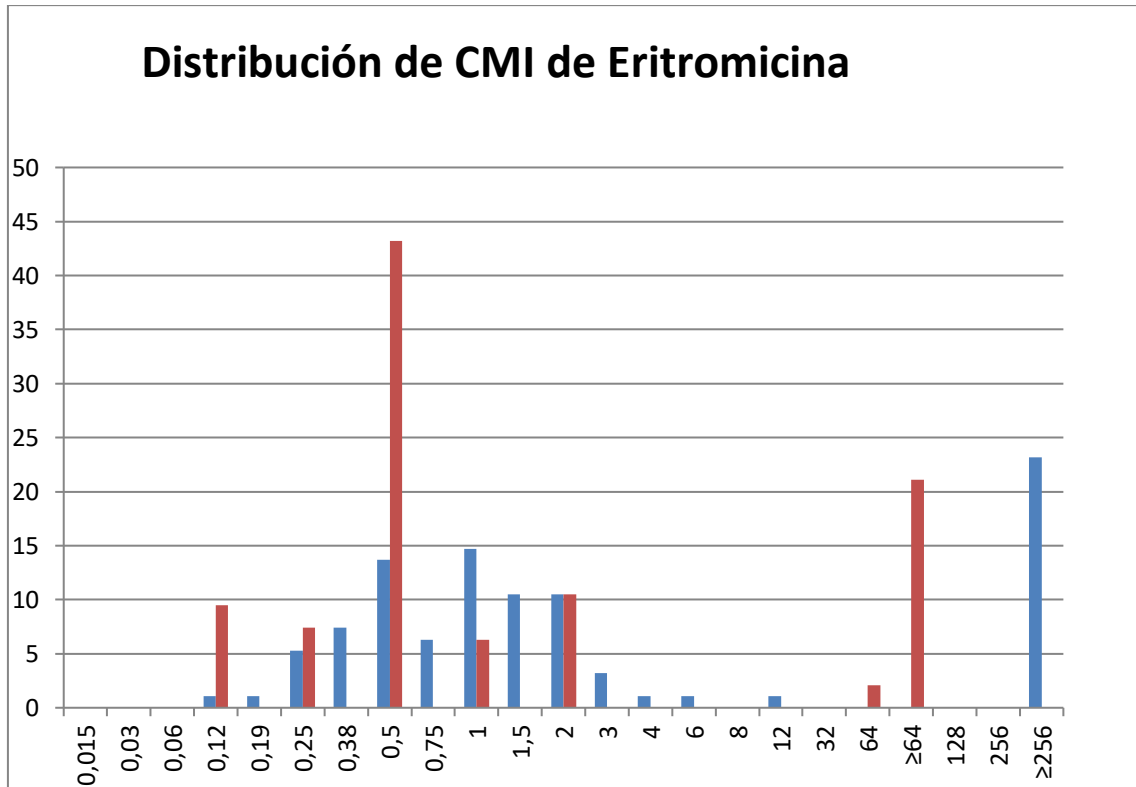


Figura 11. Distribución de CMI (% de cepas) de tetraciclina mediante ambos métodos (Rojo: microdilución en caldo; azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).

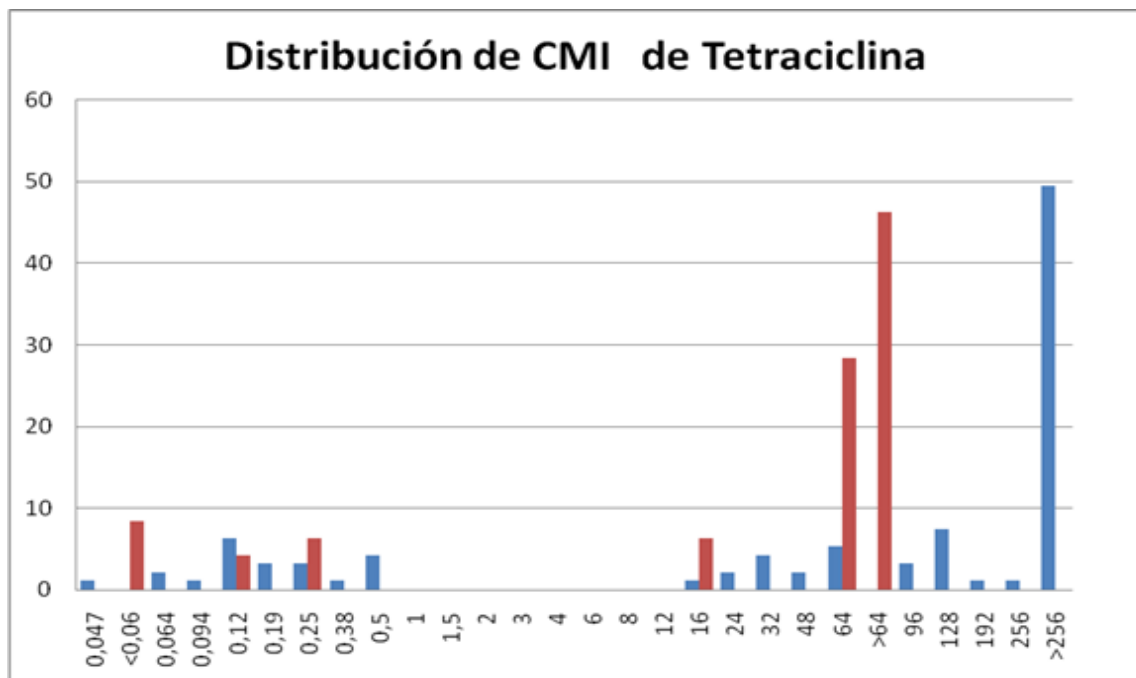


Figura 12. Distribución de CMI de tobramicina mediante tiras de gradiente antibiótico (% cepas).

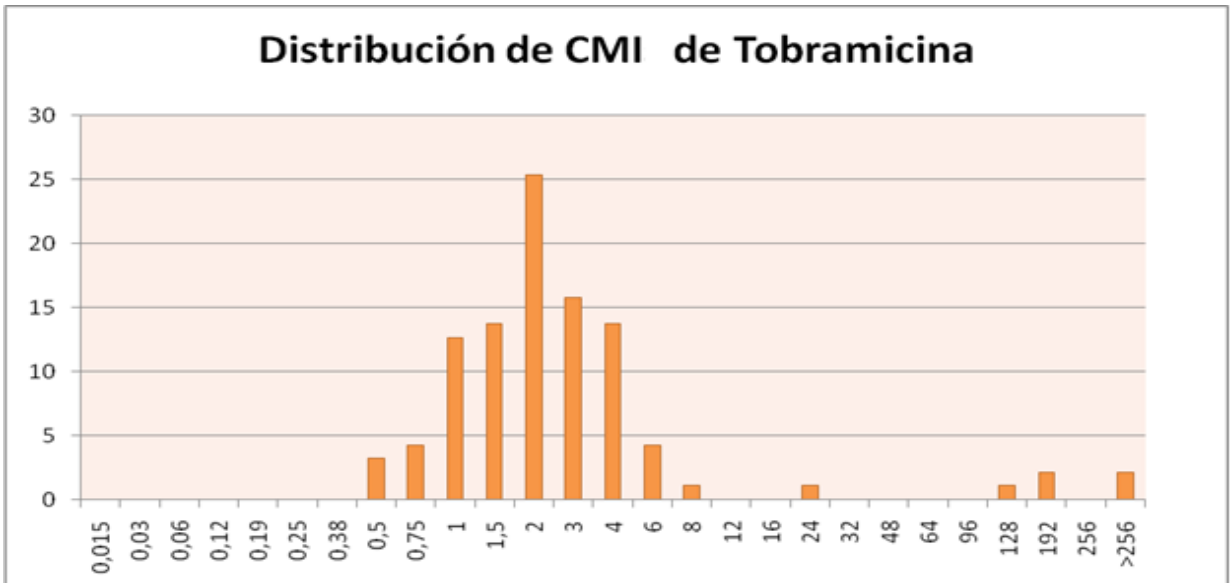


Figura 13. Distribución de CMI de gentamicina mediante microdilución en caldo (% cepas).

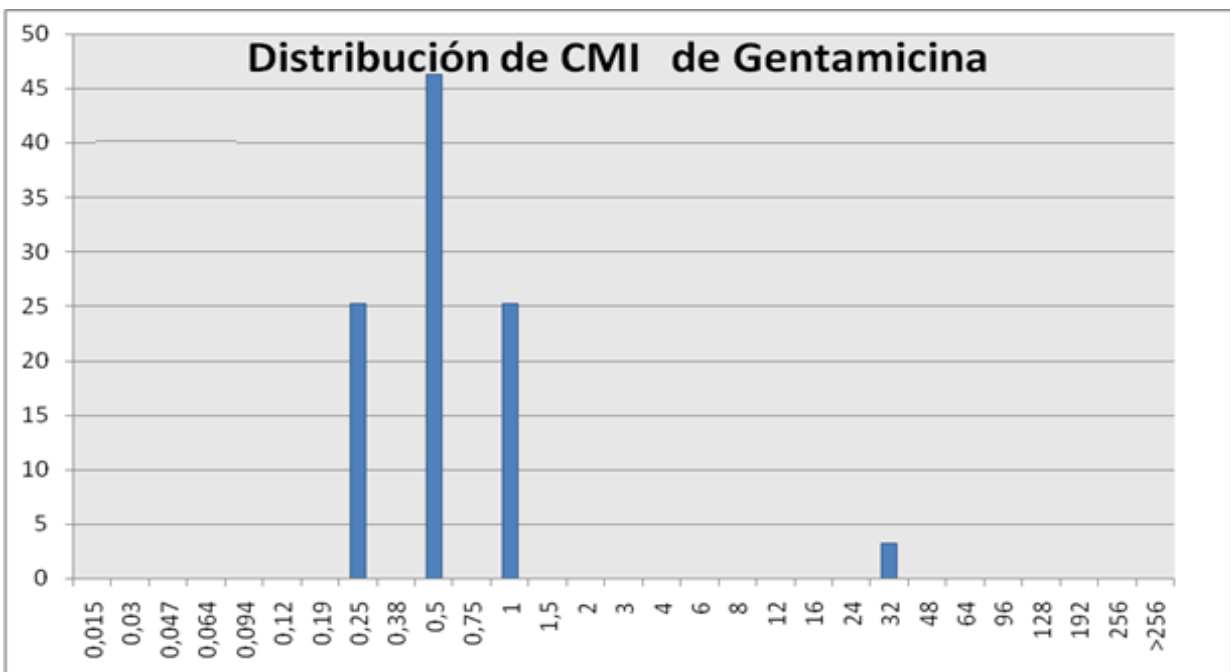


Figura 14. Distribución de CMI de amoxicilina-ácido clavulánico mediante tiras de gradiente antibiótico (% cepas).

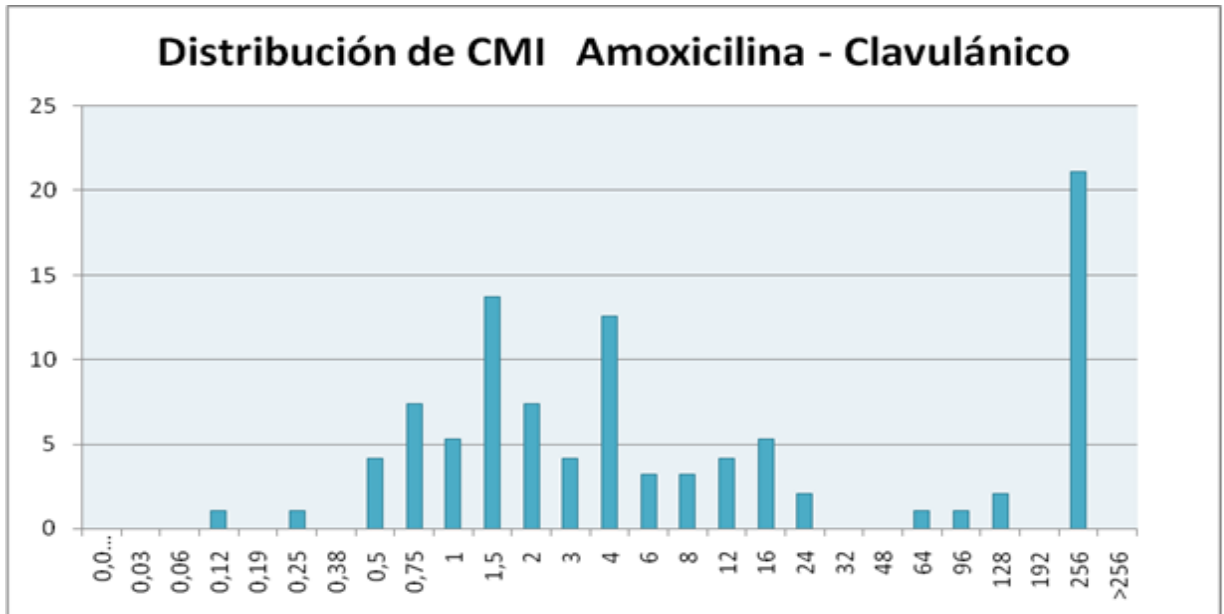


Figura 15. Distribución de CMI de imipenem mediante microdilución en caldo (% cepas).

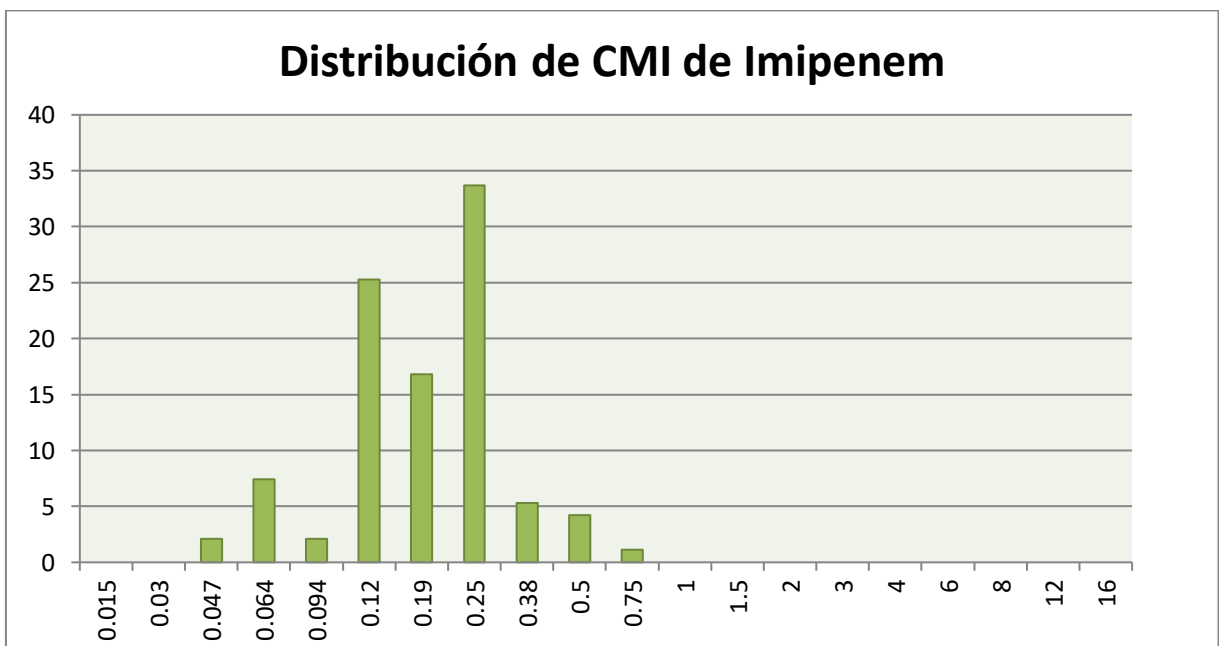
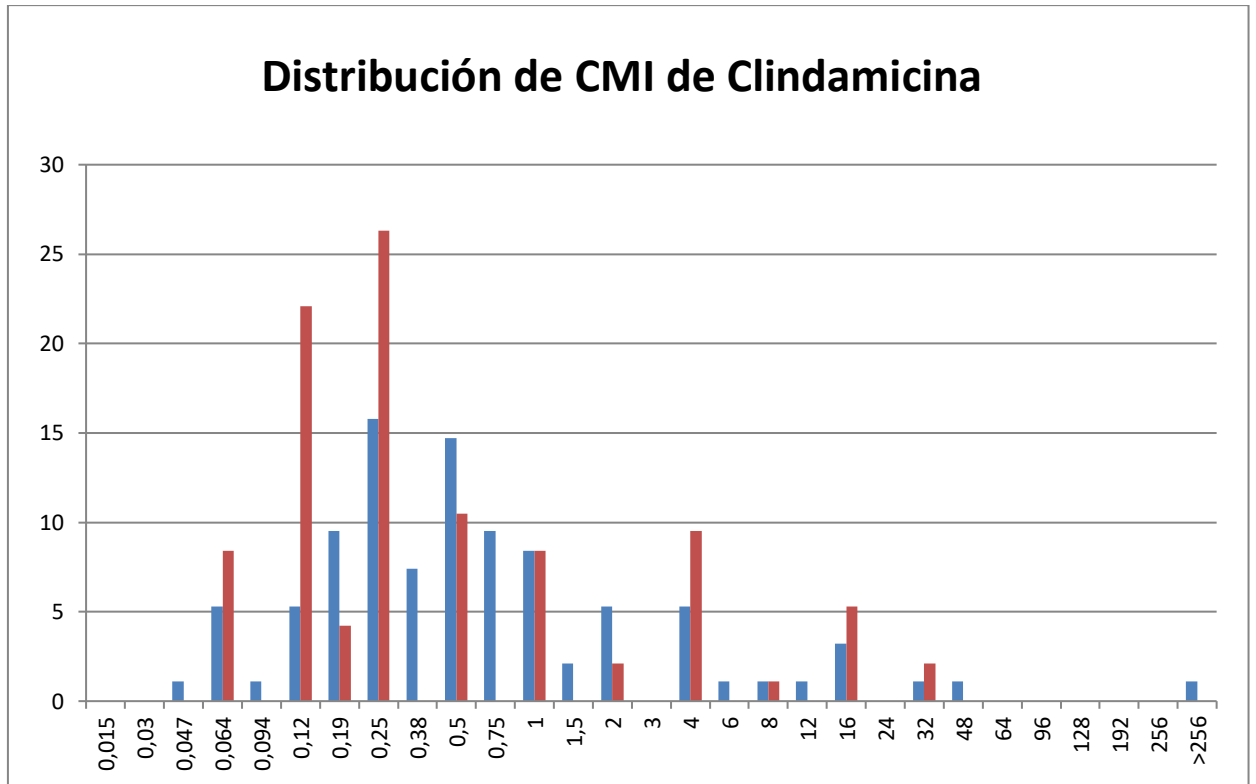


Figura 16. Distribución de CMI (% de cepas) de clindamicina mediante ambas técnicas (Rojo: microdilución en caldo, azul: difusión con tiras de gradiente antibiótico).



En la Tabla 20, se observa que las cepas resistentes a eritromicina presentan también niveles de resistencia mayores a varios antimicrobianos. Estas diferencias son estadísticamente significativas en los casos de tetraciclina, tobramicina, gentamicina y clindamicina.

Tabla 20. Resistencia antibiótica entre las cepas resistentes y sensibles a eritromicina mediante ambos métodos.

Antimicrobiano	Cepas sensibles a eritromicina		Cepas resistentes a eritromicina		Valor p (X ²)	
	No sensible (%)		No sensible (%)			
	GA (N= 72)	MDC (N=73)	GA (N=23)	MDC (N=22)	GA	MDC
Ciprofloxacino	67 (93,1)	68 (93,2)	23 (100)	22 (100)	0,182	0,194
Tetraciclina	52 (72,2)	55 (75,3)	22 (95,7)	22 (100)	0,014	0,008
Tobramicina	25 (34,7)	-	14 (60,9)	-	0,051	-
Gentamicina	-	0 (0)	-	3 (13,6)	-	0,002
Amoxicilina – clavulanico	27 (37,5)	-	14 (60,9)	-	0,042	-
Imipenem	0 (0)	-	0 (0)	-	-	-
Clindamicina	2 (2,8)	0 (0)	19 (82,6)	19 (86,4)	<0,001	<0,001
Multirresistencia	36 (50)	0 (0)	23 (100)	22 (100)	<0,001	<0,001

Las cepas resistentes a eritromicina son significativamente más resistentes a todos los antibióticos probados, excepto con ciprofloxacino por la nula actividad del mismo sobre todas las cepas estudiadas.

En la siguiente tabla (tabla 21) podemos observar los diferentes patrones de resistencia más importantes obtenidos mediante ambos métodos de evaluación de sensibilidad antibiótica. El patrón más frecuente es el de la asociación ciprofloxacino y tetraciclina, con un porcentaje superior al 70%.

Tabla 21. Patrones de multirresistencia de interés (E: eritromicina, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, GM: gentamicina, TOB: tobramicina, AUG: amoxicilina-clavulánico).

Antimicrobiano						MDC	GA
E	CIP	TET	GEN	TOB	AUG	N (%)	N (%)
R	R					22 (23,2)	23 (24,2)
R	R	R				22 (23,2)	22 (23,2)
R	R	R	R			3 (3,2)	
R	R	R		R			14 (14,7)
R	R	R	R		R	-	7 (7,4)
	R	R				76 (80)	73 (76,8)
	R	R	R			3 (3,2)	
	R	R		R			32 (33,7)
	R	R	R		R	-	15 (15,8)
R		R				22 (23,2)	22 (23,2)
R		R	R			3 (3,2)	14 (14,7)
R		R	R		R	-	7 (7,4)

En la tabla 22 y figuras 17-20 se recoge la evolución anual de los datos de resistencia a los diferentes antimicrobianos excluyendo el año 2010 en que se recogieron muy pocas cepas.

Tabla 22. Porcentajes de resistencia a diversos antimicrobianos en cada uno de los años del estudio.

Año	Porcentaje de resistencia						
	Ciprofloxacino	Eritromicina	Tetraciclina	Tobramicina	Amoxicilina-clavulánico	Clindamicina	Multirresistencia
2011 (N=28)	100	25	78,6	21,4	57,1	17,9	67,9
2012 (N=16)	87,5	6,25	87,5	62,5	37,5	6,25	68,8
2013 (N=30)	90	26,7	70	53,3	40	23,3	60
2014 (N=16)	100	31,3	87,5	37,5	37,5	37,5	56,3

Figura 17. Evolución de la resistencia a ciprofloxacino y eritromicina en el periodo 2011–2014.

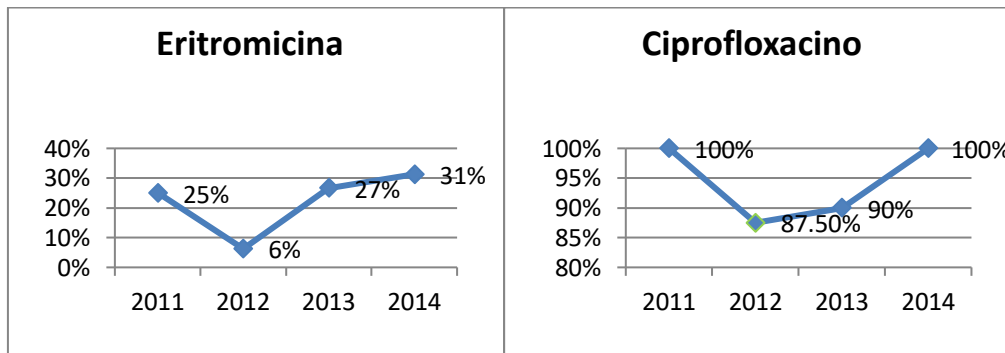


Figura 18. Evolución de la resistencia a tetraciclina y tobramicina en el periodo 2011–2014.

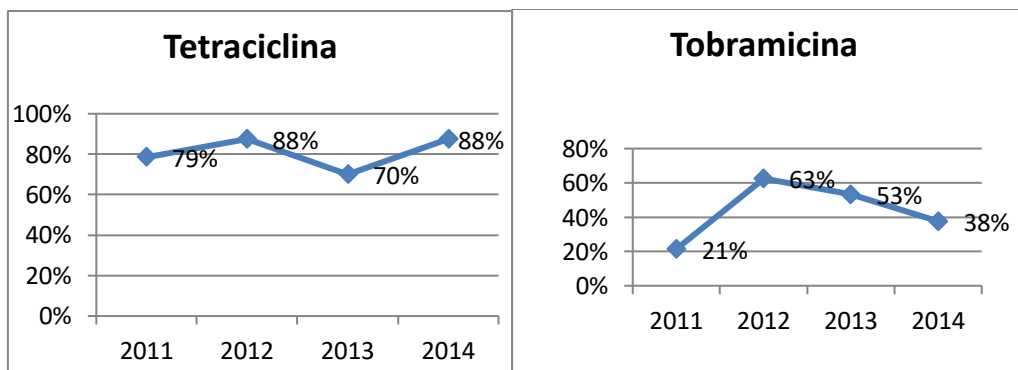


Figura 19. Evolución de la resistencia a amoxicilina–ácido clavulánico y clindamicina en el periodo 2011–2014.

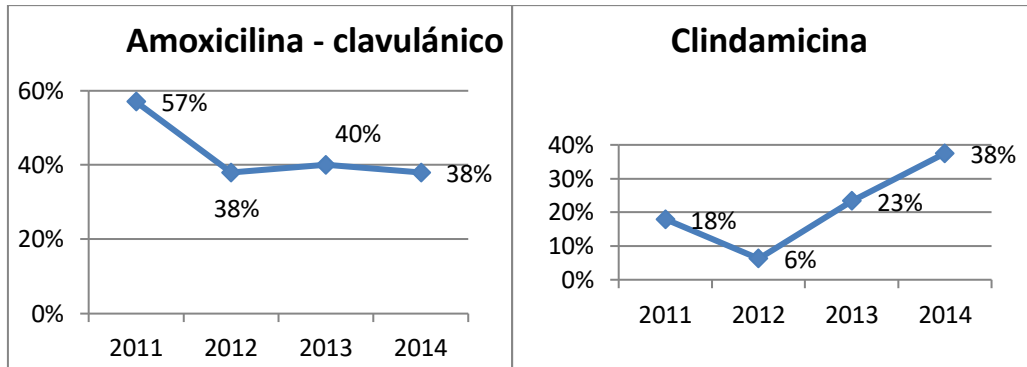
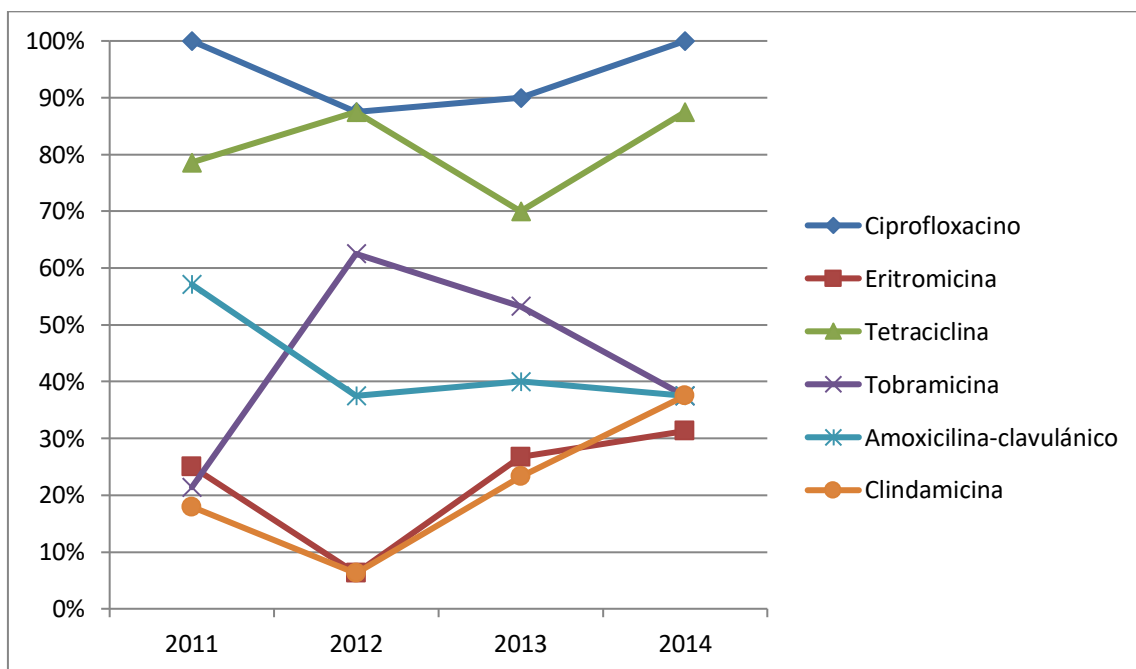


Figura 20. Evolución conjunta de la resistencia a los antibióticos en el periodo 2011–2014.



Como podemos ver las tendencias son diferentes según el antimicrobiano de que se trate. Tanto ciprofloxacino como eritromicina y clindamicina muestran una tendencia ascendente a partir del año 2012. En cambio, tobramicina y amoxicilina – ácido clavulánico muestran una tendencia al descenso, aunque no muy acusada en este último. Con respecto a tetraciclina se observan picos sucesivos de aumento y descenso, siempre dentro de un porcentaje alto de resistencias.

Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino.

La técnica de MAMA-PCR permite detectar la mutación en el gen *gyrA*, sustitución aminoacídica Thr86Ile, responsable de la resistencia a ciprofloxacino. Ochenta y cuatro de las cepas (93,3%) resistentes a ciprofloxacino presentan la modificación Thr86Ile en GyrA.

Sin embargo, 6 cepas, correspondiente al 7%, no presentaban la mutación según los resultados de esta técnica, ni tampoco el alelo correspondiente a la forma salvaje (WT, wild type) del gen. Secuenciamos la región QRDR con la intención de detectar otras posibles mutaciones que justificaran la resistencia a ciprofloxacino en estas 6 cepas y dos que habían presentado una amplificación débil del gen mutante. Todas las cepas presentaron la sustitución Thr86Ile que confiere resistencia a quinolonas (tabla 23), por lo que detectamos 6 falsos negativos en esta técnica. Además, en tres cepas (25, 52 y 108) se asoció también con la sustitución Asp90Asn que confiere resistencia moderada, pero todas estas cepas al presentar la mutación doble, desarrollaron un alto nivel de resistencia: CMI de 32 µg/ml .

Adicionalmente se detectaron otras mutaciones como Phe99Phe (7/8 cepas) y Ser157Ser (7/8 cepas) que no dan lugar a resistencia.

Tabla 23. Mutaciones detectadas tras la secuenciación de la región QRDR de 8 cepas resistentes a ciprofloxacino.

Cepa	Mutación puntual	Sustitución aminoacídica	Repercusión funcional
18	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
25	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	GAT → AAT	Asp90Asn	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
52	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	GAT → AAT	Asp90Asn	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
69	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
70	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
99	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	AGC → AGT	Ser157Ser	No
104	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
108	ACT → ATT	Thr86Ile	Resistencia a quinolonas
	GAT → AAT	Asp90Asn	Resistencia a quinolonas
	TTT → TTC	Phe99Phe	No
	AGC → AGT	Ser157Ser	No

Mecanismos moleculares de resistencia a eritromicina.

La técnica de MAMA-PCR permite detectar la presencia de la mutación A2075G en el gen del ARNr23S, que es responsable de resistencia a eritromicina. Esta mutación estaba presente en 21 (91,3%) de las 23 cepas resistentes. En las cepas 59 y 75 la amplificación del gen salvaje demostró que las tres copias del gen no están mutadas. Las CMI de las cepas 59 y 75 son 12 µg/ml y ≥ 256 µg/ml respectivamente mediante el método de difusión con tiras de gradiente antibiótico.

Se confirmaron mediante el método de PCR-RFLP todos los casos de mutación A2075G, y en las dos cepas que no tenían todas las copias del gen mutadas encontramos también la secuencia correspondiente al gen salvaje. No encontramos la mutación en la posición 2074 en nuestras cepas.

En dos cepas resistentes a eritromicina no hemos encontrado ninguna de las mutaciones que estudiamos y, aunque se realizó una PCR para detectar el gen *ermB* en todas las cepas con fenotipo de resistencia, no lo hemos hallado en ninguno de nuestros aislamientos.

Finalmente, en la tabla 24 se resumen los mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina que hemos encontrado.

Tabla 24. Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina detectados en la colección de cepas.

Categoría	MAMA-PCR	MAMA-PCR	PCR-RFLP	PCR-RFLP	N
	WT	MUT	BsaI	BceAI	
Sensible a ciprofloxacino (N=5)	+	-			5
Resistente a ciprofloxacino (N=90)	-	+			84
	-	-			6 ^a
Sensible a eritromicina (N=72)	+	-			71
	-	-			1 ^b
Resistente a eritromicina (N=23)	-	+	+	-	19
	+	+	+	-	2 ^c
	+	-	-	-	2 ^d

^a Estas cepas se secuenciaron y todas presentaron la sustitución Thr86Ile.

^b Este caso corresponde a la cepa 42. No se detectó ni el gen salvaje ni el mutante, posiblemente debido a una inhibición de la reacción de amplificación.

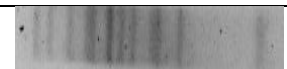

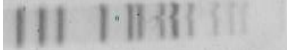









^c Cepas 59 y 75 presentan ambos genes, salvaje y mutante.

^d Cepas 10 y 34.

Epidemiología molecular

La técnica de ECP se realizó en 95 cepas, de las cuales fueron tipificables 94 (98,9%), ya que la cepa 12 no produjo ningún patrón de bandas tras tres intentos de tipificación. Las cepas presentaron una elevada diversidad genética detectándose 33 pulsotipos distribuidos en 21 pulsotipos únicos y 12 con un número cepas entre 2 y 12 (tabla 25), al aplicar un punto de corte de similitud igual o superior al 80% (95,131). Los grupos A–D presentaron diez o más cepas cada uno.

Tabla 25. Grupos de cepas establecidos mediante ECP y distribución temporal de las mismas.

Grupo	Pulsotipo	Imagen del gel	Distribución temporal					Total
			2010	2011	2012	2013	2014	
A	Sma15		-	-	6	6	-	12
B	Sma2		1	5	1	3	-	10
C	Sma9		-	5	-	-	6	11
D	Sma1		1	4	1	4	-	10
E	Sma7		1	4	2	-	-	7
F	Sma14		-	-	1	-	1	2
G	Sma17		-	-	1	3	-	4
H	Sma23		-	-	1	4	-	5
I	Sma6		1	1	-	2	-	4
J	Sma29		-	-	-	-	3	3
K	Sma21		-	-	-	2	1	3
L	Sma5		-	2	-	-	-	2
			4	21	13	24	11	73

La técnica de PCR-RFLP del gen *flaA* también permitió tipar 94 de las 95 cepas, siendo esta vez la cepa 64 la que no originó ningún patrón de bandas. Esta técnica clasificó a las cepas en 50 tipos, de los cuales 30 pertenecían a cepas individuales y los otros 20 tipos agrupaban a 64 cepas en grupos de entre 2 y 8 aislamientos con un punto de corte de similitud del 100% (tabla 26). Los tipos Dde2 y Dde27 aparecieron en 6 y 8 cepas respectivamente.

Tabla 26. Grupos de cepas establecidos por PCR-RFLP del gen *flaA* y distribución temporal de las mismas.

Grupo	Tipo (PCR-RFLP <i>flaA</i>)	Imagen	Distribución					Total
			2010	2011	2012	2013	2014	
I	Dde27		-	-	2		6	8
II	Dde2		-	2	2	2	-	6
III	Dde5		1	1	-	3	-	5
IV	Dde36		-	-	1	3	-	4
V	Dde35		-	-	-	4	-	4
VI	Dde11		-	4	-	-	-	4
VII	Dde25		-	-	1	2	-	3
VIII	Dde4		-	1	1	-	1	3
IX	Dde29		-	-	2	1	-	3
X	Dde10		1	-	-	2	-	3
XI	Dde17		1	2	-	-	-	3
XII	Dde46		-	-	-	-	2	2
XIII	Dde43		-	-	-	1	1	2
XIV	Dde37		-	-	-	1	1	2
XV	Dde6		-	2	-	-	-	2
XVI	Dde9		-	2	-	-	-	2
XVII	Dde14		1	1	-	-	-	2
XVIII	Dde28		-	-	1	1	-	2
XIX	Dde7		-	2	-	-	-	2
XX	Dde40		-	-	1	1	-	2
			4	17	11	21	11	64

A la hora de detectar posibles brotes, no hacemos referencia a criterio espacial alguno ya que todas las cepas pertenecen a pacientes del distrito sanitario Sevilla, hemos aplicado dos criterios temporales, 11 días y 2 meses entre las fechas de aislamiento de las cepas.

Al considerar el criterio temporal de 11 días, observamos en la tabla 27 una relación de los posibles brotes detectados mediante ECP y mediante PCR-RFLP del gen *flaA*, incluyendo los

porcentajes de similitud y los resistotipos, donde las cepas pueden tener una diferencia en un antibiótico como máximo, según el criterio utilizado por Pérez Boto (98) en su trabajo.

Tabla 27. Posibles brotes detectados por ECP y PCR-RFLP del gen *flaA* aplicando el criterio temporal de 11 días.

Brotos ECP	% de similitud	Brotos PCR - RFLP <i>flaA</i>	% de similitud	Resistotipo
1, 7	80,14	No agrupadas	62,35	Ery ^S Cip ^R Tet [*] Tob ^I Amx ^S
No agrupadas	56, 21	2, 7	100	Ery ^S Cip ^R Tet ^R Tob ^S Amx [*]
Cepa 12 no tipificable	-	12, 20	100	Ery ^R Cip ^R Tet ^R Tob [*] Amx ^R
33, 35	100	33, 35	100	Ery ^S Cip ^R Tet ^S Tob ^S Amx ^S
72, 73	100	72, 73	100	Ery ^S Cip ^R Tet ^S Tob ^I Amx ^S
100, 101	88,89	100, 101	100	Ery ^R Cip ^R Tet ^R Tob ^I Amx ^S
109, 111	80,83	109, 111	100	Ery ^S Cip ^R Tet ^R Tob ^S Amx [*]
114, 115	87,25	114, 115	100	Ery ^S Cip ^R Tet ^R Tob ^S Amx ^S

*: El asterisco indica que existe una discrepancia con respecto al antibiótico en cuestión entre las cepas que conforman el posible brote.

Mediante ECP vemos que aparecen 6 posibles brotes con dos cepas en cada uno de ellos. Por tanto, del total de las 73 cepas relacionadas genéticamente, tras la aplicación de los criterios de selección solamente quedaron 12, lo cual supone una reducción del 83,6%. Siete posibles brotes, con dos cepas cada uno, se detectaron con PCR-RFLP del gen *flaA*. Por tanto, sólo 14 de las 64 cepas relacionadas genéticamente, cumplían los criterios de selección, lo que supone una reducción del 78,1%.

Es de destacar que ambas técnicas han identificado 5 brotes con las mismas cepas incluidas.

El segundo criterio temporal de dos meses podría ser el más adecuado para detectar posibles fuentes de contaminación de alimentos asociadas a una manipulación deficitaria de los mismos, en lugar de relacionar casos que se han infectado en el mismo día y lugar y a través del mismo medio.

Así, mediante ECP y utilizando este criterio obtendríamos 20 posibles brotes que incluyen a 49 cepas, y la reducción de las cepas genéticamente relacionadas sería de un 32,9% (tabla 28). Sin embargo, mediante PCR-RFLP del gen *flaA* encontramos 12 posibles brotes que involucran a 30 cepas (Tabla 29). De esta forma la reducción de cepas al seleccionar los posibles brotes sería

de un 53,1%. En las tablas 28 y 29 aparecen sombreadas las cepas incluidas en brotes por ambas técnicas.

Tabla 28. Grupos de cepas y posibles brotes obtenidos por ECP con un criterio temporal de 2 meses.

Grupo	Nº cepas (Pulsotipo)	Posibles brotes
		Nombre y cepas
A	12 (Sma15)	A.1: 46, 53 y 50
		A.2: 52, 62 y 82
		A.3: 59 y 69
		A.4: 55 y 56
B	10 (Sma2)	B.1: 22 y 25
		B.2: 32 y 34
		B.3: 2 y 39
		B.4: 85 y 92
C	11 (Sma9)	C.1: 18 y 36
		C.2: 23 y 30
		C.3: 105, 109, 111, 114, 115, 116
D	10(Sma1)	D.1: 1, 6 y 7
		D.2: 65, 68 y 70
E	7 (Sma7)	E.1: 11 y 14
		E.2: 33 y 35
		E.3: 37 y 40
F	2 (Sma14)	NO
G	4 (Sma17)	G.1: 60 y 61
H	5 (Sma23)	H.1: 72 y 73
		H.2: 89 y 90
I	4 (Sma6)	NO
J	3 (Sma29)	J.1: 100, 101 y 110
K	3 (Sma21)	NO
L	2 (Sma5)	NO

Tabla 29. Grupos de cepas y posibles brotes obtenidos por PCR-RFLP del gen *flaA* con un criterio temporal de 2 meses.

Grupo	Nº de cepas (Tipo)	Posibles brotes
		Nombre y cepas
I	8 (Dde27)	I.a: 105, 109, 111, 114, 115 y 116
II	6 (Dde2)	II.a: 2 y 7
		II.b: 46 y 47
III	5 (Dde5)	III. a: 55 y 93
IV	4 (Dde36)	NO
V	4 (Dde35)	V. a: 61, 71, 72 y 73
VI	4 (Dde11)	VI.a: 14 y 36
VII	3 (Dde 25)	VII.a: 68 y 70
VIII	3 (Dde4)	NO
IX	3 (Dde29)	IX. a: 51 y 63
X	3 (Dde10)	NO
XI	3 (Dde17)	XI.a: 33 y 35
XII	2 (Dde46)	XII.a: 100 y 101
XIII	2 (Dde46)	NO
XIV	2 (Dde37)	NO
XV	2 (Dde6)	NO
XVI	2 (Dde9)	XVI.a: 12 y 20
XVII	2 (Dde14)	NO
XVIII	2 (Dde28)	NO
XIX	2 (Dde7)	XIX.a: 9 y 30
XX	2 (Dde40)	NO

Los posibles brotes comunes con el criterio temporal de 11 días (ver tabla 27) también lo son con el de dos meses; aunque dos de los posibles brotes se agrupan para formar uno solo (cepas 105, 109, 111, 114, 115 y 116) y además aparece otro posible brote común formado por las cepas 68 y 70. Finalmente, la cepa 12 forma parte de un brote junto a la cepa 20 mediante tipificación del gen *flaA*; pero la cepa 12 no fue tipificable por ECP.

La relación entre las cepas a través de la tipificación molecular debería completarse con los datos epidemiológicos clásicos (108), ya que sin una conexión entre los casos que determine un origen común (un restaurante, un trabajo, un supermercado, etc...), es difícil establecer de

forma inequívoca un brote. En nuestro caso no fue posible realizar entrevistas a los pacientes con el objeto de recoger datos específicos, y en las historias clínicas estos estaban ausentes.

Hemos calculado el Índice de Simpson (SID) para ambas técnicas. Este índice permite cuantificar el poder discriminativo de una técnica y se define como la probabilidad promedio de que el marcador utilizado clasifique en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón (131). Los resultados son los que aparecen en la tabla 30. La diferencia en los valores para ambas técnicas ($p < 0.001$) se debe al diferente punto de corte de similitud que hemos utilizado para considerar a dos cepas como del mismo tipo; siendo del 80% para ECP y del 100% para PCR-RFLP del gen *flaA*. Por este motivo podría parecer que la técnica de tipificación del gen *flaA* tiene mayor poder de discriminación.

De hecho, si los grupos incluyeran únicamente cepas idénticas (100% de similitud), mediante la técnica de ECP, aparecerían 73 tipos distintos de 94 cepas totales y 12 grupos de entre 2 y 5 cepas que aúnan 33 casos. Si calculamos el índice de Simpson en estas condiciones, el valor que obtenemos es de 0,992 (CI 95%= 0,987 - 0,997) (Datos no incluidos en la tabla). Por tanto, en igualdad de condiciones, ECP tiene mayor poder de discriminación que la PCR-RFLP del gen *flaA* con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,007$).

Tabla 30. Distribución de las cepas mediante ECP y PCR-RFLP del gen *flaA* y posibles brotes detectados según el criterio temporal utilizado (11 días versus 2 meses)

Técnica	Condiciones	SID (CI 95%)	Nº de tipos	Tipos únicos	Grupos (cepas)	Posibles brotes
ECP	1%Op.1.5%Tol (punto de corte 80%)	0.941 (0.923 - 0.960)	33	21	12 (73)	11 días: 6 2 meses: 20
PCR-RFLP del gen <i>flaA</i>	1%Op.1.5%Tol (punto de corte 100%)	0.978 (0.969 - 0.988)	50	30	20 (64)	11 días: 7 2 meses: 12

Los índices obtenidos nos indican que esta bacteria se caracteriza por una gran heterogeneidad genética y el alto poder de discriminación de ambas técnicas. En la práctica el índice de Simpson debe tener un valor de entre 0.90 y 0.95 para que un método se considere robusto (96,131–133).

La concordancia entre ambos métodos se determinó calculando los coeficientes de Rand y Wallace. El coeficiente ajustado de Rand se usa para evaluar el grado de concordancia entre dos métodos de tipificación y el coeficiente de Wallace es una estimación sobre cuánta

información nueva se obtiene con un método en comparación con otro (96). Un valor de 1 significaría que los métodos son totalmente congruentes. Un valor de 0 indica que todos los individuos no diferenciados por el primer método son completamente diferenciados en grupos distintos por el segundo método; es decir, son totalmente incongruentes (134). Es decir, este coeficiente nos dice, una vez realizado una técnica de tipificación concreta, cuánta información nueva se obtiene de otro método de tipificación diferente. Un valor alto de este coeficiente indica que las separaciones definidas por un método se podrían haber predicho de los resultados del primero, sugiriendo que ambas metodologías son redundantes (133). La concordancia entre los dos métodos aplicados fue baja, con un coeficiente ajustado de Rand de 0,164 (95% CI = 0,048 – 0,284), un coeficiente de Wallace para la combinación ECP/PCR-RFLP *flaA* de 0,111 (95% CI= 0,038 – 0,184) y el mismo para la combinación PCR-RFLP *flaA*/ECP de 0,318 (95% CI= 0,128 – 0,519). A pesar de que estos valores nos indican una baja congruencia entre los métodos aplicados, y que por tanto no son redundantes, existen coincidencias en los posibles brotes encontrados, sobre todo cuando aplicamos el criterio temporal más restrictivo de 11 días, donde existen 5 brotes coincidentes. Sin embargo, cuando aplicamos el criterio de 2 meses aparecen 20 posibles brotes por ECP y solo 12 mediante PCR-RFLP *flaA*. Por ambos métodos aparecen brotes que no son coincidentes y tal vez esto es un reflejo de la falta de concordancia entre los métodos.

Finalmente hemos evaluado la posible existencia de una relación clonal entre las cepas pansensibles así como de las cepas panresistentes y como se puede observar en la tabla 31, no existe relación alguna.

Tabla 31. Pulsotipos y tipos *flaA* de las cepas sensibles y resistentes a todos los antimicrobianos considerados

Cepa pansensible	ECP*	PCR-RFLP gen <i>flaA</i> **
68	P1	X24
80	P23	X40
Cepa panresistente ^a	ECP*	PCR-RFLP gen <i>flaA</i> **
20	P11	X9
21	P6	X13
61	P17	X35
75	P25	X38
89	P23	X36
92	P2	X43
96	P28	X42

* (1%Op.1.5%Tol. Punto de corte de similitud: 80%)

** 1%Op.1.5%Tol (Punto de corte de similitud: 100%)

^aCepas panresistentes excepto para imipenem (la sensibilidad es una constante).

DISCUSIÓN

Aspectos clínicos y demográficos

En primer lugar hemos analizado las características demográficas de los 95 pacientes de nuestro estudio así como la sintomatología y otros aspectos clínicos relevantes de los pacientes hospitalizados.

Michaud y colaboradores (135) en 2001 encuentran que la media de edad de los pacientes fue de 25 años (rango: 10 meses a 85 años), presentando la mayor proporción en los grupos de 20–24 años y 45–64 años, con un 17% en ambos rangos de edad. En comparación con nuestros pacientes, aquellos presentan una edad mucho más avanzada, ya que nuestra media de edad son 6 años y el mayor porcentaje de pacientes se da en niños de entre 1 y 5 años, con el 43,5% de todos los casos, aunque sí coincidimos en que uno de los grupos con mayor porcentaje de pacientes es también el de más de 40 años con un 17,4% de los casos.

En nuestro caso, la sintomatología es similar a lo previamente descrito, diarrea (92%), dolor abdominal (86%) y fiebre (60%), así la diarrea la presentaron el 86,7% de los pacientes, el dolor abdominal el 53,3% y la fiebre el 66,7%. No obstante, sólo uno de los pacientes presentó diarrea sanguinolenta (6,7%), mientras que en el estudio de estos autores el porcentaje fue del 25%. Un 12% de los pacientes estuvo ingresado más de 24 horas, mientras que nuestros pacientes ingresados supusieron un 16,3% del total. Según el metaanálisis de Domingues y colaboradores (75), la existencia de una enfermedad crónica subyacente es un factor de riesgo en los casos esporádicos de campilobacteriosis.

El 47% de los pacientes de su estudio fueron tratados con antibióticos, mientras que, en nuestros pacientes hospitalizados, 10 (66,7%) recibieron antibioterapia, probablemente por tratarse mayoritariamente de pacientes con patología subyacente.

Un estudio de 2003 del servicio inglés de vigilancia epidemiológica de *Campylobacter* (136) encuentra un rango de edad desde menos de un mes hasta los 94 años, con una media de 39. En nuestro caso, el rango de edad también va desde un bebé de 20 días hasta un anciano de 86 años, y la media de edad es de 6 años. La diarrea (96%), el dolor abdominal (86%) y la fiebre (81%) fueron también los síntomas más comunes, tal como ocurre en nuestros pacientes. Sin embargo, también en este trabajo los casos de diarrea sanguinolenta fueron el 28% del total; mientras que sólo el 6,7% (correspondiente a un paciente) de nuestros casos hospitalizados lo padecieron. En este estudio el 10% de los pacientes estuvieron hospitalizados, un porcentaje ligeramente menor que el nuestro. El rango de duración de la enfermedad fue de 0 a 701 días.

En nuestro trabajo no tenemos este dato; pero en uno de los casos el dolor abdominal era de un año de evolución, con diarrea y fiebre intermitente. Además, encontramos también una paciente no hospitalizada que cuenta con dos cepas separadas 4 meses y que, como enfermedad subyacente, padecía una inmunodeficiencia primaria.

En 2011 en un trabajo sobre un brote de campilobacteriosis relacionado con el consumo de guisantes contaminados (137), con resultados similares a los nuestros, destacan que el rango de duración de diarrea fue desde 1 a 74 días, con una media de 9 días. Por tanto, volvemos a encontrar casos que se prolongan durante meses, al igual que en nuestro trabajo. Solamente 5 de los pacientes fueron hospitalizados (5,1%), en comparación a nuestro 16,3% de ingresos y se detectó un caso de síndrome de Guillain-Barré.

Niederer y colaboradores (138) realizan un trabajo donde estudian las características genotípicas y la sensibilidad antibiótica de cepas de *C. jejuni* diferenciando entre casos adquiridos en el extranjero y casos autóctonos. Encuentran una mayor prevalencia de casos en hombres (57,2%), muy cercana a la nuestra, y aunque aún no se sabe a ciencia cierta a qué se debe, se ha especulado que puede haber diferencias entre los géneros con respecto a los hábitos de cocinado y manejo de las carnes. Sin embargo, esta teoría no se confirma debido a que estas diferencias se presentan también en niños menores de un año. En nuestro estudio, aunque el número de pacientes en este rango de edad es escaso, en los niños menores de un año también hay una ligera prevalencia del género masculino. En el siguiente grupo etario, niños entre 1 y 5 años, la diferencia es más evidente, ya que el 70% son varones. Sin embargo, a partir de esta edad las diferencias no son tan obvias hasta llegar al grupo de mayores de 40 años, donde el 75% de los pacientes son hombres. Por tanto, la campilobacteriosis es más prevalente en el género masculino, especialmente en la niñez temprana y en la etapa adulta.

Volvemos a encontrar unas medias de edad muy superiores a las nuestras, con 30 años en el grupo de las infecciones adquiridas en el extranjero y 38 años en las adquiridas localmente. Probablemente esto tenga que ver con los hábitos y costumbres diferentes según los países donde se estudia. En el metaanálisis de Domingues y colaboradores (75) sobre las fuentes atribuidas a los casos de campilobacteriosis, comentan que en la población infantil el contacto directo con el pelaje contaminado, las heces de los animales de granja o los alrededores por ejemplo durante una visita con el colegio, puede suponer un factor de riesgo diferente al de la población general, además del hecho del menor cuidado con la higiene de manos durante y después de las visitas. Sin embargo, sólo tres estudios han evaluado este fenómeno, y no

encontraron diferencias significativas en el impacto de otras vías de transmisión de la enfermedad en niños y en la población general.

En 2013, Lévesque y colaboradores (107) realizan un estudio de enteritis por *Campylobacter* adquiridas localmente en una región de Quebec y encuentran que la mediana de edad fue de 34 años, con rango entre 9 meses y 85 años similar al nuestro, pero la mediana es mucho más alta. Observaron que la incidencia de campilobacteriosis varía considerablemente con la edad y el sexo. En general, la incidencia entre los niños de 0 a 4 años fue significativamente mayor a la de la población general, tanto en la rural como en la urbana. Además, en el caso de la población rural, hubo dos grupos de edad en que también la incidencia era mayor: la etapa de 15 a 34 años y en los mayores de 75 años. Con respecto a nuestros resultados, que corresponden a áreas urbanas, sí vemos cómo el grupo etario de entre 1 y 5 años es el que mayor porcentaje de casos presenta. Sin embargo, también el grupo de edad de más de 40 años representa un porcentaje importante de los casos.

Bessède y colaboradores (11) comparan las características de los pacientes infectados por *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*, y tras un análisis multivariante los pacientes con infecciones por *C. coli* eran significativamente mayores que aquellos infectados por *C. jejuni* y la infección por *C. coli* se asociaba a los viajes al extranjero. Encuentran que *C. jejuni*, a diferencia de *C. coli*, tiene una marcada estacionalidad, con una incidencia que casi se dobla durante la temporada de verano, debido a un aumento de la población de *C. jejuni* en la comida, especialmente en el pollo, así como a diferentes hábitos culinarios (barbacoas, menos cocción o contaminación cruzada en ensaladas). En nuestro caso, en el periodo estival (mayo hasta septiembre) se aislaron un 33,8% de las cepas.

Resistencia a antimicrobianos

En el año 2014, la EFSA (European Food Safety Authority) publicó un informe (71) donde realiza un análisis de las tendencias durante el periodo 2006 – 2012 en países comunitarios y extracomunitarios.

Los mayores niveles de resistencia de *C. coli* en humanos en el año 2012 fueron a ácido nalidíxico (69,9%; N=1.002) y ciprofloxacino (69,0%; N=1.322); seguidos de tetraciclina (49,7%; N=328) y ampicilina (36,0%; N=926). Concretamente, en los datos referentes a España, las tasas de resistencia fueron: ácido nalidíxico, 95,5%; ciprofloxacino, 86,4%; tetraciclina, 79,5%; eritromicina, 27,3% y gentamicina, 13,6%. Si comparamos estos datos globales de

España con los obtenidos en nuestro trabajo, encontramos que la resistencia a ciprofloxacino es ligeramente más baja, a tetraciclina y eritromicina es muy similar, a gentamicina, algo inferior mientras que a tobramicina, la tasa es más alta. En cuatro de los seis países, hubo una correlación muy alta entre la resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacino, tal y como ocurre en nuestro trabajo. En otros dos países, la resistencia a ácido nalidíxico fue superior. En cuanto a las tendencias en resistencias, respecto a ciprofloxacino se observó un descenso en 2011 en varios países incluido España (78,4%; N=51), aunque en nuestro trabajo las cepas recogidas en 2011 suponen un 29,5% del total y todas ellas fueron resistentes a ciprofloxacino mientras que en el año 2012 las tasas de resistencia a ciprofloxacino fueron más bajas (87,50%). En cuanto a eritromicina, hubo un pico de resistencia en 2011 en varios países de Europa, siendo España el país con el pico más sobresaliente, aunque sólo se testaron 10 cepas en ese año. De hecho, en nuestro análisis de tendencias, hemos excluido el año 2010, ya que solo incluimos 5 cepas y un número tan bajo podría distorsionar los resultados. En nuestro trabajo, si observamos las tendencias en las gráficas presentadas, vemos cómo en el año 2011, un 25% de las cepas fueron resistentes a eritromicina, cifra similar a la tasa global, y seguida de un descenso notable en el año 2012.

En cuatro de los países participantes habían evaluado al menos 10 cepas para toda la batería de antibióticos, entre ellos España. En nuestro país, hubo un 0% de cepas sensibles a todos los antibióticos y un 50% de cepas multirresistentes. La resistencia conjunta a ciprofloxacino y eritromicina fue del 25%, siendo los valores más altos de los cuatro países valorados. En nuestras cepas, de manera global, la multirresistencia es del 62,1% si tenemos en cuenta la batería de antibióticos testados por difusión con tira de gradiente antibiótico y del 23,2% si tenemos en cuenta la batería por microdilución, que como ya expusimos en los resultados, no contienen antibióticos betalactámicos, como la amoxicilina-clavulánico, y en lugar de tobramicina, se prueba gentamicina; como también ocurre en este estudio y que puede justificar las diferencias. En el caso de la resistencia conjunta a ciprofloxacino y eritromicina, obtuvimos un porcentaje del 24,2%, muy similar a los encontrados en este estudio.

En los Emiratos Árabes Unidos, Sonnevend y colaboradores (113) evalúan las tasas de resistencia en 41 cepas clínicas de *C. jejuni* aisladas de hospitales infantiles, y encuentran unos niveles de resistencia a ciprofloxacino bastante próximos a los nuestros, mientras que todas las cepas fueron sensibles a eritromicina. En otro trabajo realizado en Teheran (Irán) por Feizabadi y colaboradores (139), detectan un 61,7% de resistencia a ciprofloxacino en sus cepas de *Campylobacter*; aunque si distinguimos por especie, en el caso de *C. coli* esta

resistencia llega al 80%, niveles también muy altos y próximos a los encontrados en nuestro trabajo. Globalmente, un 2,9% de las cepas fueron resistentes a eritromicina y ninguna de las cepas de *C. coli* lo fue, lo cual puede deberse al escaso número de cepas estudiadas. Sí nos resulta sorprendente que tampoco ninguna de las cepas de *C. coli* fuera resistente a tetraciclina y que la tasa global fuera del 20,5%, teniendo en cuenta los altos niveles de resistencia a ciprofloxacino y que, en general, suelen ser los dos antibióticos con mayores tasas de resistencia en esta especie. No se detectaron resistencias a gentamicina ni imipenem, similar a lo encontrado en nuestro trabajo.

Moore y colaboradores (122) hacen una revisión en 2006 de la epidemiología de las resistencias en *Campylobacter* spp. en todo el mundo, encontrando tasas superiores de resistencia en *C. coli* y un aumento de estas tasas a lo largo del tiempo en ambas especies, relacionadas en muchas ocasiones con el uso veterinario de antibióticos. En general, las resistencias a quinolonas se mantienen a unos niveles muchos menores que los encontrados en nuestras cepas, desde el 100% de sensibilidad hasta más del 60% de resistencia en cepas clínicas y además, en países como Nueva Zelanda y Australia, los escasos casos de resistencia a quinolonas procedían de cepas adquiridas en el extranjero. En macrólidos es, tal vez, donde se encuentran mayores diferencias entre ambas especies.

En un estudio realizado en Suiza en 2012, Niederer y colaboradores (138) estudian, entre otros aspectos, las tasas de resistencia de cepas de *Campylobacter* (425 *C. jejuni* y 42 *C. coli*), diferenciando entre casos autóctonos y adquiridos en el extranjero. Las tasas de resistencia a ciprofloxacino fueron más altas en las cepas adquiridas en el extranjero (56%) que en las cepas de casos autóctonos (39,4%), siendo estas diferencias significativas en aquellos casos adquiridos fuera de los países de la Unión Europea, principalmente Asia. Aunque España pertenezca a la Unión Europea, nuestras cepas tienen unas tasas muy altas de resistencia a fluorquinolonas, por lo que creemos que un viaje a nuestro país también supondría un riesgo para adquirir estas cepas resistentes. En las cepas del estudio sólo una fue resistente a eritromicina. No hubo diferencias significativas entre las dos especies de *Campylobacter*.

Gaudreau y colaboradores (140) obtienen un 50% y 18,4% de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina respectivamente en los aislamientos de *C. coli* obtenidos desde 2002 hasta 2013 en Quebec. Los niveles de resistencia a eritromicina son similares a los obtenidos en nuestro trabajo; pero los de ciprofloxacino permanecen en un nivel muy inferior. De hecho señalan que las cepas adquiridas en el extranjero son más resistentes a quinolonas, aunque no a eritromicina y tetraciclina.

Mukherjee y colaboradores realizan un estudio con cepas de *C. jejuni* en un hospital de la India en 2014 (128), donde hacen referencia a las elevadas tasas de resistencia a ciprofloxacino que se da en todo el país (más del 85%, como ocurre con nuestras cepas y también con las cepas de *C. jejuni* aisladas de casos clínicos en España: 84,1% en 2012 según el estudio de la EFSA). Sin embargo, con los macrólidos parecen darse importantes variaciones según la región del país de que se trate, llegando a alcanzar valores del 22,2% en 2013 en el Norte de la India, y manteniéndose en valores bajos del 0,7% desde 2008 a 2010 en el Este del país. No obstante, en este trabajo con 166 cepas de *C. jejuni*, un 4% fueron resistentes a azitromicina. Los autores comentan que la azitromicina ha sido aprobada recientemente para el tratamiento de numerosas infecciones en adultos y niños, y que además los antibióticos en la India están disponibles sin prescripción médica, lo que probablemente llevará a un uso indiscriminado de estos fármacos y la aparición de resistencias. Con respecto a nuestro trabajo, vemos como las cepas de *C. jejuni* del norte de la India tienen valores similares a nuestro nivel de resistencia a eritromicina.

Otro estudio realizado en India en el año 2014 (123), muestra unas tasas de resistencia del 100% a ciprofloxacino en 28 cepas de *C. jejuni* tanto humanas como de animales, alertando de la subida de las resistencias con respecto a un estudio anterior realizado por el mismo grupo. Estos niveles son incluso más altos que los obtenidos en nuestro trabajo. No obstante, teniendo en cuenta que en la India los antibióticos no necesitan prescripción médica, es de suponer que la regulación sobre los animales sea aún más laxa y que las bacterias resistentes sean un verdadero problema.

El grupo canadiense de Riley y colaboradores ha publicado en 2015 los datos de resistencia del periodo comprendido entre 2011 y 2013 en Ontario (141). En este estudio, los niveles de resistencia fueron similares para ambas especies estudiadas, algo superiores para *C. coli*. Aun así, las tasas de resistencia fueron del 41%, 12,8% y 53,8% para ciprofloxacino, eritromicina y tetraciclina respectivamente; tasas inferiores que las encontradas en nuestras cepas. Además, han encontrado una disminución significativa de las resistencias a lo largo de los 3 años del estudio. En nuestro trabajo encontramos una disminución en el año 2012 de las tasas de resistencia a ciprofloxacino y a eritromicina; no obstante, en 2014 los niveles se recuperaron y para eritromicina fueron superiores a los años anteriores. En el caso de tetraciclina, los niveles de resistencias se mantuvieron más o menos estables durante todo el periodo.

En un estudio publicado por Lehtopolku y colaboradores (142) en 2010 en Finlandia, detectan una resistencia global a eritromicina del 1,1%, siendo de adquisición extranjera casi el 90% de

ellas. En la colección final y separando por especies, la resistencia a eritromicina fue significativamente más frecuente en *C. coli* que en *C. jejuni*. Las cepas de *C. coli* presentan un 83,3% de resistencia a ciprofloxacino, ligeramente inferior a nuestros valores. Además *C. coli* fue más resistente también a otros antimicrobianos como, por ejemplo, clindamicina (50%) y tetraciclina (66,7%). Clindamicina presenta una mayor tasa de resistencia que en nuestro trabajo, al contrario de lo que ocurre con tetraciclina. No obstante, es de reseñar que, de las 238 cepas que conforman su colección bacteriana, sólo 18 son *C. coli*, por lo que el tamaño muestral puede estar condicionando estos resultados. Los autores comprueban que las cepas resistentes a eritromicina presentan niveles superiores de resistencia a otros grupos de antimicrobianos y mayores tasas de multirresistencia, como ocurre en nuestro trabajo, detectando diferencias significativas en la resistencia a tetraciclina, aminoglucósidos, amoxicilina-clavulánico y clindamicina, así como en las tasas de multirresistencia.

Ge y colaboradores (143) recogen en su revisión las tendencias de las resistencias de *Campylobacter* tanto en EEUU como en Canadá y Europa. Según los datos recogidos por la NARMS (FDA/CDC/USDA) del periodo 2007-2011, en el caso de *C. coli* las resistencias fueron de un 2,7% para macrólidos, y se mantuvieron casi sin variación durante todo el periodo recogido. En el caso de ciprofloxacino hubo un aumento desde el 28,6% en 2007 hasta el 35,8% en 2011, y en tetraciclina de 41,91% hasta un 50,7%. En cualquier caso, son resistencias muy inferiores a las nuestras. Sin embargo, en el caso de los informes emitidos por el organismo europeo (EFSA/ECDC) en cepas humanas, los valores más altos de resistencia se obtuvieron frente a ciprofloxacino (44,4%) y ácido nalidíxico (47,8%), seguidos de ampicilina (35,3%) y tetraciclina (30,5%). Los niveles de resistencia frente a eritromicina y gentamicina fueron bajos, de 3,5% y 0,4% respectivamente. Vemos cómo estos valores, aunque inferiores también, están más cercanos a los recogidos en nuestro trabajo, principalmente en lo que a ciprofloxacino se refiere. Asimismo, en los datos recogidos en México en un periodo algo anterior (2003–2006), un 61,9% de resistencia a ciprofloxacino y un 42,9% de resistencia a tetraciclina se detectaron en las cepas clínicas.

Sifré y colaboradores (92), con las recomendaciones de EUCAST, estudian 419 cepas humanas de *C. coli* aisladas entre enero de 2014 y septiembre de 2015 en Francia. *C. coli*, presentó un 9,3% de resistencia a eritromicina, un 64,44% a ciprofloxacino y un 70,17% a tetraciclina, tasas de resistencia menores que las nuestras. Nos llama la atención la ausencia de resistencia a amoxicilina-clavulánico, ya que en nuestro trabajo encontramos un 26,3% de resistencia y un 15,8% de sensibilidad intermedia.

En un estudio japonés (144) donde analizan las resistencias antibióticas de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de alimentos y humanas se encontró un 41,2% de resistencia a ciprofloxacino siendo todas estas cepas multiresistentes, hecho similar al nuestro. Destacan que las cepas humanas son más resistentes que las encontradas en los alimentos y que además eran resistentes a uno o más antimicrobianos.

Por tanto, podemos concluir que las cepas de *C. coli* presentan una alta tasa de resistencia a antibióticos como ciprofloxacino y tetraciclina. La resistencia a eritromicina también es mayor en las cepas de nuestro trabajo, y en España en general, que en la mayoría de los países europeos, así como la resistencia conjunta a ciprofloxacino y eritromicina, antibióticos de primera línea en el tratamiento de las diarreas.

Comparación entre los métodos de microdilución en caldo y difusión con tiras de gradiente antibiótico.

Aunque hay pocos estudios en la literatura que recojan las diferencias entre ambos métodos, Ge y colaboradores (145) evalúan dos métodos de estudio: E-test y dilución en agar, utilizando para ello 81 cepas de *C. jejuni* y 54 de *C. coli* obtenidas de productos cárnicos recogidos del área de Washington D.C. en 1999. Este estudio analiza los resultados obtenidos mediante ambos métodos de forma similar al nuestro, donde se definió como concordancia o acuerdo entre ambos métodos los valores iguales de CMI o $CMI \pm 1 \log_2$, sin embargo utilizan los puntos de corte de enterobacterias del CLSI así como los de la NARMS para eritromicina y azitromicina; siendo estos generalmente más altos que los empleados en nuestro trabajo. Las CMI obtenidas por E-test para cada antimicrobiano, fueron siempre una o dos diluciones inferiores con respecto a las obtenidas por dilución en agar en los extremos sensibles de los rangos de CMI, mientras que tendían a dar CMI mucho más altas en el extremo resistente de los rangos de CMI. A menudo se producían diferencias de dos a cuatro logaritmos en los valores de CMI obtenidos por ambos métodos, y, sin embargo, los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para tetraciclina y gentamicina se correlacionaron bien. Es decir, que tal y como vemos en nuestro trabajo, existen diferencias en las CMI obtenidas según el método empleado. Estos investigadores obtuvieron una concordancia general del 61,9%; variando desde el 21,4% para ácido nalidíxico hasta un 92,6% para gentamicina. La concordancia para ciprofloxacino fue del 85,2%, muy superior a la que encontramos en nuestras cepas. Además, las diferencias se concentran en los valores más altos de CMI por E-test en las cepas resistentes; en el caso de las cepas sensibles, 4 de las 5 fueron concordantes entre ambos métodos, observación que

coincide con la realizada por estos autores. Por ello, dado que en nuestro trabajo la gran mayoría de las cepas son resistentes, es posible que ésta sea la explicación para la baja concordancia entre los métodos, ya que en las cepas de este estudio americano sólo un 20,7% eran resistentes a ciprofloxacino. Aun así, todas las cepas se incluyen en la misma categoría clínica por el método de difusión y el de dilución. Por su parte, la concordancia en el caso de eritromicina fue similar tanto en este trabajo como en el nuestro y ligeramente inferior en el caso de tetraciclina.

En este trabajo se encuentran grandes discrepancias de CMI (más de 4 diluciones) entre ambos métodos en varios de los antibióticos probados, incluyendo ácido nalidíxico, ciprofloxacino, doxiciclina y tetraciclina. En los cuatro antibióticos comparados en nuestro trabajo, salvo en el caso de eritromicina, también encontramos estas discrepancias.

A pesar de ello, los autores concluyen que existe una buena concordancia en general y que el método de E-test es recomendable para la sensibilidad antibiótica en *Campylobacter*, con valores de concordancia general de hasta un 82,9%. Sin embargo, también indican que la concordancia varía mucho según el antimicrobiano de que se trate (y no según la especie), tal y como encontramos en nuestro trabajo, y que el E-test necesita de una mayor estandarización para ciertos antimicrobianos.

En 2003, Luber y colaboradores (146) comparan los métodos de E-test, microdilución en caldo y dilución en agar para la evaluación de la sensibilidad antibiótica en *C. jejuni* y *C. coli*. En este estudio determinan tanto el grado de concordancia de las CMI entre los métodos probados como el índice kappa, que se calcula no con los valores de CMI, sino con la clasificación en categorías clínicas de las cepas; tal y como hemos hecho nosotros. La microdilución en caldo tiende a dar valores de CMI a ciprofloxacino ligeramente superiores (la moda es un logaritmo de diferencia) e identificó una cepa resistente más que el E-test, y las mismas que la dilución en agar. Esto difiere de nuestros resultados aunque hay que tener en cuenta que los autores tienen una tasa de resistencia mucho más baja a ciprofloxacino, y como comentábamos en el artículo anterior, la difusión con tiras de gradiente antibiótico da CMI más bajas en el extremo sensible y más altas en el extremo resistente en comparación con la microdilución en caldo. En nuestro caso ya hemos comentado que la mayoría de las cepas son resistentes, por lo que la difusión con tiras da CMI más altas que la microdilución en caldo. Aun así, la concordancia en la identificación de cepas resistentes entre E-test y microdilución en caldo fue del 99% y el índice kappa indica correlación casi total, como ocurre en nuestro caso, donde el valor de este índice es de 1, ya que todas las cepas se clasificaron de la misma forma.

Estos autores obtienen valores de CMI a eritromicina inferiores con el método de microdilución en caldo, y aunque presentaban diferencias significativas en el grado de concordancia, estas diferencias eran menores entre microdilución en caldo y E-test ($p < 0,05$). No obstante, existió una alta correlación entre los tres métodos, y un grado de concordancia de CMI del 71,8% entre la microdilución en caldo y el E-test. En nuestras cepas también ocurre que la microdilución en caldo da valores menores de CMI que la difusión con tiras de gradiente antibiótico; siendo en nuestro caso la moda de 2 logaritmos superiores para el método de difusión. Obtenemos una concordancia de CMI ligeramente inferior, del 68,49% y además también encontramos que hay diferencias significativas. Sin embargo, tal y como les ocurre también a estos autores, el índice kappa es muy alto, siendo de 1 para ellos y de 0,97 en nuestro estudio.

En tetraciclina no encontraron diferencias significativas entre microdilución en caldo y E-test, con un 95,1% de correlación de CMI, bastante superior a nuestro resultado (65,38%). Sin embargo, hubo dos cepas con resultados diferentes en cuanto a categoría clínica, y un 98% de concordancia en cuanto a identificación de cepas resistentes. En nuestro caso, 3 cepas fueron clasificadas como resistentes por microdilución en caldo y sensibles por tiras de gradiente antibiótico, por lo que el porcentaje de acuerdo fue del 96,8% y el índice kappa, del 0,89; el más bajo de los que obtenemos, al igual que les ocurre a estos autores (sin tener en cuenta el ácido nalidíxico). También vemos este efecto en la comparación que hacen los autores entre microdilución en caldo y dilución en agar, donde, aunque la concordancia de CMI es de un 91,4%, el índice kappa es de 0.79, ya que hay 4 cepas categorizadas de forma diferente. Aun así, las técnicas se correlacionan bastante bien.

También en 2003 se publica un trabajo donde Oncul y colaboradores (147) comparan los métodos de E-test y dilución en agar en 50 cepas clínicas de *C. jejuni* recogidas durante el año 1998 en Turquía. Los autores comprueban que las cepas eran muy sensibles a los antimicrobianos probados y los mayores niveles de resistencia se obtuvieron con tetraciclina y ciprofloxacino. De nuevo aquí encontramos que, en el caso de ciprofloxacino, ambos métodos detectan el mismo número de cepas sensibles y resistentes, mientras que en el caso de la tetraciclina, por E-test detectaron un 12% de cepas resistentes y por dilución en agar, un 16%, al igual que ocurre en nuestro trabajo, donde el método de dilución (microdilución en caldo) establece como resistentes 3 cepas más que el método de difusión. La concordancia entre los métodos se evaluó según las diferencias encontradas en las CMI (\log_2). Las mayores discrepancias, con 2 o más \log_2 de diferencia entre ambos métodos, se encontraron en

cloranfenicol (48%), ampicilina-sulbactam (44%), claritromicina (40%) y tetraciclina (40%). En nuestro caso, también encontramos un porcentaje similar con tetraciclina, pero no en el caso de clindamicina. En el caso de eritromicina, el 34% de las cepas de este estudio estuvieron fuera del rango aceptado, y, en nuestro caso, este porcentaje fue del 31,5%; obteniendo así resultados similares. La concordancia general que obtienen estos autores es del 66,6% para diferencias de 1 dilución (en nuestro caso este porcentaje es del 63,20%); y del 85,5% si se consideran diferencias de 2 diluciones. Si calculamos este último dato, en nuestro caso el porcentaje sería del 79,29%. El acuerdo entre ambos métodos con respecto a las categorías clínicas fue del 94,4%.

En 2005, Halbert y colaboradores (148) hicieron una comparación entre la dilución en agar y un método automatizado de microdilución en caldo. Aunque este estudio no es adecuado para comparar nuestros resultados, ya que se trata de dos métodos de dilución, podemos comentar cómo también encuentran discrepancias entre ambos métodos y que éstas dependen del antimicrobiano de que se trate. En este caso, el mayor porcentaje de concordancia lo obtuvieron con ciprofloxacino, y la menor concordancia con ampicilina y eritromicina.

En 2007, Luangtongkum y colaboradores (149) comparan la técnica de dilución en agar con la difusión en disco con cepas provenientes de pollos vivos, utilizando los puntos de corte de la NARMS para enterobacterias. En estos puntos de corte, la sensibilidad a eritromicina corresponde a un valor de CMI $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$, y los valores de CMI comprendidos entre 1 y 4 $\mu\text{g/ml}$ se consideraban de sensibilidad intermedia, aunque hoy sabemos que estas cepas son sensibles en *C. coli* gracias a los estudios moleculares que establecen el punto de corte epidemiológico en 8 mg/l. En este trabajo, las cepas con valores de CMI de clindamicina entre 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ se consideraron intermedias, aunque el punto de corte epidemiológico se sitúa en 1 mg/l; de forma que las cepas con una CMI mayor se consideran resistentes. Estos autores, encuentran los mejores resultados en el caso de las quinolonas y los aminoglucósidos. La concordancia es del 94,46% y el índice kappa es del 0,88 para ciprofloxacino, (según indican en el artículo, un índice superior a 0,8 es una concordancia casi perfecta). Al analizar detalladamente los resultados, hay 20 cepas categorizadas como sensibles por dilución en agar y resistentes por difusión en disco; y otras 5 cepas en las que ocurre lo contrario. En nuestro caso, el índice kappa fue de 1; ya que todas las cepas fueron categorizadas de la misma forma. Los autores concluyen que el método de difusión en disco es un buen método para la sensibilidad a quinolonas y aminoglucósidos. Los porcentajes de concordancia con tetraciclina, eritromicina y clindamicina fueron del 82,76%, 39,52% y 59,43% y los valores del índice kappa

fueron del 0,62, 0,25 y 0,41 respectivamente. Todos estos valores, sobre todo aquellos correspondientes a la eritromicina y clindamicina, son mucho más bajos que los que obtenemos en nuestro trabajo; pero los autores comentan que esto se debe mayoritariamente al problema del numeroso grupo de cepas que se categorizan como intermedias, y que el aumento en el valor de los puntos de corte para estos antimicrobianos mejoraría mucho el resultado. En el caso de la tetraciclina, hubo 50 cepas categorizadas como resistentes por dilución en agar que se establecieron como sensibles por difusión en disco, y otras 14 cepas en las que ocurrió lo contrario, por lo que no se obtiene un índice kappa tan bueno como en el caso de las quinolonas y los aminoglucósidos. De hecho, es en este antibiótico donde nosotros encontramos las 3 cepas de discrepancia, siendo también el método de dilución el que las detectó como resistentes y el método de difusión como sensibles.

Valdivieso-García y colaboradores (150) estudian 103 cepas de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidas de muestras de carne de pollo de supermercados de Ontario, Canadá, en el año 2009, y evalúan las técnicas de E-test y dilución en agar con 8 antimicrobianos. Los puntos de corte que usan son aquellos definidos por el CLSI y la NARMS para enterobacterias. Las diferencias de CMI de 1 y 2 \log_2 se usaron para calcular los porcentajes de concordancia. A diferencia de nuestro trabajo, encontraron que las CMI obtenidas por E-test para los 8 antibióticos eran más bajas. Probablemente eso es debido al alto número de cepas resistentes que hay en nuestra colección y, como ya señalaban Ge y colaboradores (145), el E-test tiende a dar CMI más altas en los rangos de resistencias. De hecho, en el caso de tetraciclina, que es el antibiótico donde se detectan más cepas resistentes, con un total de 33 cepas por ambos métodos, es donde hay un mayor porcentaje de cepas con CMI por E-test superior a las obtenidas por microdilución, en comparación con los demás antibióticos que prueban. La dilución en agar clasificó un mayor número de cepas como resistentes a ampicilina, clindamicina y eritromicina; aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, al ser el número de cepas resistentes a estos antimicrobianos muy bajo. Por otro lado, los dos métodos identificaron el mismo porcentaje de aislamientos resistentes a ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclina. Es uno de los pocos artículos revisados hasta el momento donde hay una congruencia total para tetraciclina.

La concordancia global fue del 72,6% ($\pm 1 \log_2$) para los 8 antimicrobianos; siendo en nuestro caso un poco más baja, para nuestros cuatro antibióticos comparados. Sin embargo, las tasas más bajas se obtuvieron para clindamicina (26,3%), seguida de ciprofloxacino (51,5%), eritromicina (52,5%), tetraciclina (82,6%) y otros antibióticos que no están incluidos en nuestro

estudio. Si comparamos estos porcentajes con los nuestros, obtenemos mejores valores en el caso de clindamicina (86,32%) y eritromicina (68,49%) y valores un poco más bajos en ciprofloxacino (32,63%) y tetraciclina (65,38%). La concordancia general entre dos diluciones de diferencia fue del 95,7%, comparado con el 79,29% en nuestro caso.

Estos autores hacen una reflexión acerca de la degradación química de los antibióticos y del material en general en ambas técnicas. Comentan que en el caso de la dilución en agar; especialmente cuando se utilizan placas comerciales preparadas que se almacenan a temperatura de unos 4°C durante periodos largos, se pueda evaporar parte del agua del agar, aumentando así las concentraciones de los antimicrobianos que contienen. Por otro lado, la degradación química de los antibióticos es más probable que ocurra a esas temperaturas que a las temperaturas de congelación, normalmente de unos -30°C, a las que se conservan las tiras de E-test. Por tanto concluyen que debería hacerse un estudio sobre estos aspectos ya que podrían ser las CMI obtenidas por E-test más exactas y reproducibles que las obtenidas por el *gold standard*.

Ge y colaboradores (143) en 2013 publican una revisión sobre los métodos de medida de la sensibilidad antibiótica en *Campylobacter*, así como de las comparaciones y variaciones encontradas entre los distintos métodos según los organismos implicados (CLSI, EUCAST, CA-SFM, BSAC...). En los trabajos donde se compara el E-test con dilución en agar obtienen porcentajes de concordancia muy variables y concluyen que con el E-test se obtienen valores más bajos de CMI, sobre todo en las cepas sensibles. Estos artículos son mucho más numerosos que aquellos que comparan E-test con microdilución en caldo, técnica utilizada en nuestro trabajo. Comentan un par de artículos publicados al respecto, el realizado por Luber y colaboradores (146), previamente comentado en esta tesis; y otro algo más reciente de van der Beek y colaboradores, donde los valores de CMI ($\pm 1 \log_2$) entre ambos métodos resultaron comparables. Estos autores explican que el CLSI, tras finalizar la patente de E-test, está considerando realizar la estandarización de los métodos de difusión con tiras de gradiente antibiótico como medio de determinación de las CMI.

En España, Sanz-Rodríguez y colaboradores (151) evalúan, en 2013, la sensibilidad de 90 cepas clínicas (categoría clínica) de *C. jejuni* frente a eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina mediante E-test y microdilución en caldo. Obtienen un 100% de concordancia para eritromicina, 97% ($\kappa= 0,94$) para ciprofloxacino y 98% ($\kappa= 0,95$) para tetraciclina. No detectaron errores graves o muy graves. Los valores que obtienen estos autores son muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a los niveles de concordancia, aunque con nuestras

cepas sí que hemos detectado algunos errores graves y muy graves, siendo especialmente importante en el caso de la tetraciclina, con un 3,16% de errores muy graves. Al igual que nosotros, describen que el E-test tiende a producir CMI más altas que el método de microdilución en caldo. Si consideramos que la concordancia de CMI (concordancia esencial) se encuentra entre $\pm 1 \log_2$, vemos que sus resultados son de un 70% para eritromicina, 56,7% para ciprofloxacino y 84,4% para tetraciclina. En el caso de eritromicina, la concordancia es muy similar a la nuestra (68%), mientras que para ciprofloxacino (32,6%) y tetraciclina (65,4%), obtenemos valores inferiores. Estos autores concluyen que el método de E-test puede constituir una alternativa sencilla y práctica.

Finalmente en 2018, Azrad y colaboradores (152) realizan un estudio con 66 cepas clínicas, 50 *C. jejuni* y 16 *C. coli*. Comparan los métodos de E-test y microdilución (Sensititre®) para los antibióticos ciprofloxacino, eritromicina y tetraciclina, usando los puntos de corte de EUCAST. El porcentaje de acuerdo lo calculan con el porcentaje de cepas que tienen la misma categoría clínica así como con el índice Kappa. Los valores que obtienen son muy similares a los que obtenemos en nuestro trabajo, con porcentajes de acuerdo cercanos al 100% para los tres antimicrobianos evaluados.

Podemos concluir que en general existe una buena concordancia categórica entre ambos métodos aunque esto es variable según el antibiótico.

Mecanismos moleculares de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina

En 1999, Zirstein y colaboradores (153) describen la frecuencia de las mutaciones en el gen *gyrA* en cepas de *C. jejuni* (12 resistentes a ciprofloxacino y 13, sensibles) obtenidas de la NARMS en 1997. Describen un nuevo método (mismatch amplification mutation assay), que utiliza la tecnología de PCR para caracterizar y detectar las mutaciones específicas sin tener que realizar una secuenciación del ADN (MAMA-PCR).

Al secuenciar la región QRDR para buscar aquellas mutaciones que llevan a cambios en los aminoácidos de la proteína final (GyrA), comprueban que las 13 cepas resistentes a ciprofloxacino presentan una mutación puntual (ACA → ATA) que implica un cambio aminoacídico en la posición 86: de treonina a isoleucina. Además, una de las cepas presentó una mutación adicional el cambio de prolina a serina en la posición 104, y basados en estos datos desarrollaron el método de MAMA-PCR para detectar la mutación ACA → ATA en la posición aminoacídica 86.

En el año 2000, estos mismos autores (86) vuelven a realizar un trabajo similar pero en este caso con la especie *C. coli*, incluyendo 9 cepas sensibles a ciprofloxacino y 17 cepas resistentes. Secuencian la región QRDR y adaptan el protocolo de MAMA-PCR para *C. coli*. Encuentran que todas las cepas resistentes a ciprofloxacino tienen la mutación ACT → ATT que lleva al cambio aminoacídico Thr86Ile, detectándose por esta técnica. Aplicaron la técnica en otras 9 cepas procedentes del CDC y en todas ellas esta reacción identificó las cepas resistentes y ninguna de las cepas sensibles dio un resultado positivo para el gen mutante. En las cepas de nuestro trabajo que no dieron un resultado positivo o dieron un positivo débil para el gen mutante en el protocolo de MAMA-PCR y que fueron secuenciadas, todas tienen la misma mutación en el codón comentado. Además, en estas 8 cepas secuenciadas, detectamos la mutación Asp90Asn (producida por el cambio GAT → AAT) en 3 cepas, mutación que no está presente en ninguna de las cepas del trabajo que estamos comentando.

Bachoual y colaboradores(124) realizan en Francia un trabajo con 7 cepas clínicas resistentes a fluorquinolonas, 5 de *C. jejuni* y otras 2 de *C. coli*. Cinco de las siete cepas en estudio presentaban altos niveles de resistencia tanto a ácido nalidíxico (CMI: 128-256 µg/ml) como a ciprofloxacino (CMI: 32µg/ml), y todas ellas presentaron mutaciones en el gen *gyrA*. La sustitución Thr86Ile estaba presente en 4 de estas cepas y la sustitución Asp90Tyr en una. Esta última mutación no la hemos encontrado en las cepas secuenciadas de nuestra colección.

Otra de las cepas presentaba alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico (CMI: 64 µg/ml) y bajo nivel de resistencia a ciprofloxacino (CMI: 2 µg/ml), y encontraron otra mutación que lleva a la sustitución Thr86Ala. En nuestras cepas, según los valores de CMI obtenidos por microdilución en caldo, tenemos 54 cepas con CMI a ciprofloxacino de 2 -8 µg/ml, consideradas como bajo nivel de resistencia. En todos los casos las CMI a ácido nalidíxico fueron de 32 a mayor de 64 µg/ml. Sin embargo, todas estas cepas fueron positivas para la mutación Thr86Ile mediante MAMA-PCR, y de todas ellas, sólo 3 cepas tuvieron una CMI de 4 µg/ml por tiras de gradiente antibiótico. Por tanto, parece ser que, si tenemos en cuenta los resultados de CMI para ciprofloxacino por microdilución en caldo, la sustitución Thr86Ile no siempre supone un alto nivel de resistencia, o puede interpretarse también como que este método da valores bajos de CMI de ciprofloxacino en las cepas resistentes.

Finalmente, una cepa presentó sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia a ciprofloxacino, encontrando la sustitución Thr86Ile y ninguna explicación molecular para este patrón atípico.

En 2006, Sonnevend y colaboradores (113) realizaron un estudio con 41 cepas de *C. jejuni* con una tasa de resistencia a ciprofloxacino del 85,4%, y encuentran la sustitución Thr86Ile como única mutación.

Hanninen y Hannula investigaron en 2007 (126) la frecuencia de mutación espontánea en una serie de cepas sensibles a ciprofloxacino de *C. jejuni* y *C. coli*, así como las mutaciones en *gyrA* y las mutaciones en la región intergénica de la bomba CmeABC. Las conclusiones que obtuvieron es que las cepas van desde hipomutables hasta hipermutables y que ninguno de los fenotipos encontrados se relaciona con una mutación particular. Las mutaciones que encontraron en *gyrA* fueron las sustituciones Thr86Ile y Asp90Asn, y en un 21,5% de los casos no encontraron mutaciones relacionadas con la resistencia. Estos datos discrepantes se deben probablemente a que las cepas han sido creadas en el laboratorio.

En el año 2002, Payot y colaboradores (83) realizan varios experimentos con el fin de estudiar en profundidad los mecanismos de resistencia a fluorquinolonas en *Campylobacter*. Utilizan 6 cepas bien caracterizadas de *C. jejuni* procedentes tanto de casos clínicos como de animales. Estas cepas son sometidas a concentraciones crecientes de enrofloxacin para desarrollar y seleccionar mutantes resistentes. Determinan sus CMI a enrofloxacin y ciprofloxacino a los mutantes seleccionados, secuencian la región QRDR del gen *gyrA*, realizan una versión de MAMA-PCR derivada de la de Zirstein y colaboradores mencionada anteriormente (86) y evalúan la posible implicación de otros genes (*gyrB* y *parC*) así como el papel de las bombas de expulsión mediante el uso de dos inhibidores (EPI) y el nivel de expresión de determinadas porinas. Las dos mutaciones que encuentran son las sustituciones Thr86Ile y Asp90Asn que también encontramos nosotros. Estos autores relacionan el cambio Asp90Asn con bajo nivel de resistencia a ciprofloxacino y el cambio Thr86Ile, con alto nivel de resistencia, y a la combinación de ambas mutaciones con valores muy elevados de CMI (128 – 256 µg/ml). No obstante, consideran que el cambio Thr86Ile conduce a un amplio rango de CMI tanto en enrofloxacin como en ciprofloxacino, y en otro trabajo (154) también encontraban cepas con CMI a ciprofloxacino desde 16 a 64 µg/ml. En nuestro caso, mediante microdilución en caldo, obtenemos también un rango de CMI para aquellas cepas con el cambio Thr86Ile, aunque varias tienen CMI dentro de lo que se considera bajo nivel de resistencia. No obstante, esto no ocurre mediante el método de tiras de gradiente antibiótico. Hay que tener en cuenta que estos autores hacen las CMI por dilución en agar. Estos autores no encuentran otras posibles mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. Además comprueban el escaso efecto de los inhibidores de las bombas de eflujo, por lo que este mecanismo no se consideró de importancia, así como

su escasa efectividad en la reducción de la frecuencia de aparición de mutantes resistentes. Finalmente, no encontraron diferencias en los niveles de expresión de las porinas en las cepas resistentes frente a las sensibles.

En este mismo año, Piddock y colaboradores (114) estudian 208 cepas resistentes a ciprofloxacino, 127 cepas humanas de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, recogidas durante el periodo 1990 – 1995 en el Reino Unido y cepas procedentes de carne de pollo de diversas regiones europeas con el fin de investigar los cambios producidos en las topoisomerasas. En 173 de los 208 aislamientos se evidenció la presencia del cambio Thr86Ile, en una cepa el cambio Asp90Asn y en otra los cambios Thr86Ile y Pro104Ser. Solamente dos cepas resistentes a ciprofloxacino no presentaron mutaciones en *gyrA*, por lo que el desarrollo de resistencia a fluorquinolonas sin mutaciones en *gyrA* es muy poco frecuente. Los autores no encontraron ningún mecanismo alternativo que justificara la resistencia en las cepas sin mutaciones. Describen dos alelos diferentes para la región amplificada del gen *gyrA*, uno previamente publicado y otro que presenta tres mutaciones silenciosas, al igual que encontramos en las cepas secuenciadas en nuestro trabajo, como Phe99 y Ser157.

En este trabajo, las cepas con la sustitución Thr86Ile presentan un amplio rango de CMI, que va desde 2 µg/ml hasta >128 µg/ml, de forma que hay cepas con bajo nivel de resistencia a ciprofloxacino, igual que en nuestro caso cuando usamos la técnica de microdilución en caldo. Estos autores buscaron la presencia de la subunidad A de la topoisomerasa IV (gen *parC*); pero, al igual que otros autores previamente, no la detectaron y llegaron a la conclusión de la inexistencia de este gen en *Campylobacter*; y, aunque es muy importante en especies como *E. coli*, tampoco existe en otras bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* o *Helicobacter pylori*; donde la ADN girasa realiza todas las funciones.

En el trabajo de McIver y colaboradores (112) estudian un pequeño grupo de cepas de *C. jejuni*, clínicas y obtenidas en el laboratorio, encontrando en las 6 cepas clínicas el cambio Thr86Ile, y en las cepas de laboratorio otras modificaciones adicionales como Asp90Asn, Asp85Tyr y Thr86Ala. La mutación que implica el cambio Thr86Ile, presente en el 100% de nuestras 90 cepas resistentes, es la que se produce en el ambiente natural de desarrollo de resistencias en estas bacterias.

Estos autores ponen de manifiesto el efecto de las diferentes mutaciones en la CMI de las fluorquinolonas. En los mutantes con la sustitución Thr86Ile, la CMI frente a gatifloxacino y moxifloxacino (fluorquinolonas de tercera y cuarta generación, respectivamente), eran

ligeramente inferiores a ciprofloxacino, mientras que para grepafloxacino (tercera generación), eran superiores, fenómeno ya descrito también en gonococos y neumococos. Estos autores comprueban el aumento de la CMI en las segundas generaciones de mutantes resistentes sin mutaciones adicionales que pudieran justificarlo, sugiriendo otros mecanismos relacionados con las porinas o las bomba de eflujo.

Payot y colaboradores (85) publican en 2004 un artículo en el que evalúan las modificaciones en las dianas de quinolonas y macrólidos en cepas provenientes de animales de varias granjas francesas. Encontraron 38 cepas de *C. coli* co-resistentes a fluorquinolonas y eritromicina. Todas las cepas resistentes a ciprofloxacino presentaron la sustitución Thr86Ile, igual que en las nuestras. Sin embargo, en las cepas resistentes a eritromicina, sólo aquellas con CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ presentaban la mutación A2075G. Todas las cepas fueron homocigotas para la mutación salvo una de ellas con CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$, en la que dos de las tres copias del gen estaban mutadas. En nuestro caso, encontramos dos cepas de este tipo, con CMI de 12 $\mu\text{g/ml}$ y de más de 256 $\mu\text{g/ml}$. Los autores concluyen que dos copias del gen deben estar mutadas para generar resistencia. Al igual que en nuestro trabajo, no encontraron mutaciones en la posición 2074. Actualmente EUCAST (90) ha determinado que el punto de corte de sensibilidad para *C. coli* es 8 $\mu\text{g/ml}$, ya que las cepas con una CMI igual o inferior, no presentan mutaciones que confieran resistencia.

En el año 2005, Gibreel y colaboradores (155) estudiaron los mecanismos moleculares de resistencia a eritromicina en 23 cepas resistentes de *Campylobacter* procedentes de animales y humanos con un rango de CMI de entre 128 y >1024 $\mu\text{g/ml}$. En todas las cepas de *C. coli* encontraron la mutación A2059G (numeración correspondiente a *E. coli*; equivalente a la posición 2075); y en una de las cepas encontraron también la mutación A2058G (correspondiente a la posición 2074 de *Campylobacter*) en una de las copias del gen. En la mayoría de las cepas de *C. jejuni* encontraron también la mutación A2059G y, aunque también detectaron 4 cepas con mutaciones en la posición 2058, los autores comentan que éstas son mucho menos frecuentes y pueden deberse a pequeñas alteraciones en el funcionamiento del ribosoma que deducen de sus ensayos de crecimiento. En una de las cepas no encontraron ninguna mutación, incluso tras secuenciar un fragmento mayor del gen. Tampoco pudieron explicar la resistencia por modificaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22 ni por una posible hidrólisis del fármaco de forma extracelular. En nuestro trabajo tampoco hemos encontrado explicación molecular a la resistencia a macrólidos de la cepa 10.

En 2010, encontramos un estudio español (129) del Laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología realizado a partir de 678 cepas de *C. jejuni* y 119 de *C. coli* procedentes de 10 provincias y recogidas en el periodo 2006–2007. Tras estudiar la sensibilidad a eritromicina por E-test, en aquellas con alto nivel de resistencia se estudió el mecanismo molecular que lo justifique. Aunque la resistencia global a eritromicina es de un 3,8%, el 93% de las cepas resistentes son *C. coli*, lo que supone un 23,5% de resistencia en esta especie, muy similar al 24,2% que obtenemos por E-test. La CMI de todas las cepas era superior a 256 µg/ml, y, al igual que en nuestro trabajo, todas presentaron la mutación A2075G, salvo dos donde encontraron la mutación A2074G.

En cuanto a las proteínas ribosomales, no encontraron ninguna de las mutaciones que confieren resistencia a macrólidos en los genes *rpID* y *rpIV*, encontrando mutaciones puntuales y/o inserciones/delecciones en otras regiones no relacionadas. Finalmente, encuentran la sustitución C36T en una de las cepas de *C. coli*, relacionada con una desregulación del funcionamiento de la bomba, así como varios casos con polimorfismos alrededor de la zona IR (intergenic región) con un posible papel en la resistencia.

En 2011, Lehtopolku y colaboradores (156) estudian 76 cepas clínicas de *Campylobacter* recogidas de hospitales finlandeses en el periodo 2003–2007, y, de las 33 cepas resistentes a eritromicina, 30 (91%) presentaron la mutación A2059G (A2075G de *Campylobacter*). En dos cepas estaban mutados solo dos alelos y no encontraron mutaciones en la posición 2058 (2074 de *Campylobacter*), resultados muy similares a los nuestros. En una de las dos las cepas sin mutaciones en el gen ARNr23S encontraron una inserción de 5 aminoácidos en la proteína L22 entre los aminoácidos 73 y 74, y en la otra hallaron la sustitución Asp72Asn también en la proteína L22, posiciones prácticamente localizadas en la región del lazo tal como describía Pérez Boto (129). Los autores no encontraron diferencias significativas en las CMI de las cepas sensibles y resistentes en presencia o ausencia de inhibidores de la bomba.

Hao y colaboradores en un artículo realizado en 2013 (157), no solo estudian las bases moleculares de la resistencia a macrólidos, sino también el orden e intensidad en que se dan dichos procesos mediante la exposición a dosis crecientes de eritromicina o tilosina. En los estadios tempranos de la exposición al antibiótico se producen múltiples tipos de mutaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22, dando lugar a niveles intermedios de CMI, así como a una sobreexpresión de los genes codificantes de bombas de eflujo. Finalmente, en los estadios más avanzados de los experimentos es cuando aparecen mutaciones en los genes del ARNr23S, con CMI de alto nivel de resistencia, y una disminución en la actividad de las

bombas. Este hecho parece sugerir que la bacteria necesita aumentar la actividad de la bomba de eflujo para poder facilitar el desarrollo de los mutantes de alto nivel y estabilizar el fenotipo surgido. De nuevo, observamos que aparecen mutaciones en la posición 2074 con una frecuencia superior a lo que aparece en las cepas clínicas, ya que en nuestra colección no hemos hallado ninguna.

En un estudio publicado en 2014 por Mukherjee y colaboradores (128) con una colección de 166 cepas de *C. jejuni* procedentes de casos clínicos de diarreas infantiles en la India, encontraron que el 4% de las cepas fueron resistentes a azitromicina y todas ellas presentaron la mutación A2075G.

Pérez Boto y colaboradores (119) publican un nuevo trabajo en 2014 en el que estudian los mecanismos moleculares que determinan la resistencia a quinolonas, macrólidos y tetraciclinas de una colección de cepas aviares previamente caracterizadas. Estudian las bases moleculares de la resistencia a quinolonas de 22 *C. jejuni* y 4 *C. coli*, y en todos ellos encuentran la sustitución Thr86Ile, tal y como ocurre en nuestras cepas. Sólo encontraron resistencia a macrólidos en una población de *C. coli* de uno de los corrales estudiados y las tres cepas escogidas presentaban la mutación A2075G y ninguna de las mutaciones descritas en las proteínas ribosomales L4 y L22, resultados similares a los obtenidos en nuestras cepas clínicas.

Hormeño y colaboradores (116) presentan en 2015 una nueva técnica para detectar la mutación más frecuente en la resistencia de *Campylobacter* a ciprofloxacino (C257T). Se trata de una MAMA–DEG PCR, una PCR múltiple basada en oligonucleótidos degenerados, diseñada para no tener que identificar previamente la especie de que se trate. Para ello determinan la CMI mediante dilución en agar a ciprofloxacino, eritromicina y gentamicina de un total de 249 aislamientos de *Campylobacter* obtenidos de cepas clínicas y de animales (66 *C. coli*). Los autores detectan la mutación C257T en las cepas cuya CMI a ciprofloxacino es superior a 4 µg/ml. En 8 cepas con CMI entre 1 y 2 µg/ml no se detectó, a pesar de ser resistentes según el punto de corte epidemiológico y según EUCAST. Sin embargo, en nuestra colección hay 8 cepas con CMI de y 2 µg/ml que presentan la mutación C257T.

Recientemente en 2016, Ohno y colaboradores (158) encontraron una cepa procedente de un caso clínico de diarrea con un alto nivel de resistencia a eritromicina con la mutación A2074T, modificación muy poco frecuente y que, como dicen los autores en su artículo, sólo se había encontrado en casos de bajo nivel de resistencia a macrólidos y sin estar presente en todas las copias del gen. Este caso parece ser el primero en que la mutación se encuentra en todas las

copias y confiere resistencia de alto nivel, como después pudieron confirmar mediante un ensayo de transformación de una cepa isogénica sensible a eritromicina, aunque con una pérdida de eficacia biológica de la cepa resistente frente a la sensible.

En 2014 se publica (59) el primer caso de presencia del gen *ermB* en *C. coli*, que codifica una metilasa de ARN ribosómico, la cual disminuye la unión de los antibióticos al ribosoma confiriendo el fenotipo MLS_B de resistencia. Posteriormente, Wang y colaboradores (87) deciden investigar su presencia en una amplia colección de 1554 cepas de *C. coli* y *C. jejuni* procedentes de casos de diarrea en humanos (con un total de 75 cepas de *C. coli*) así como de animales destinados a la producción alimentaria. Encontraron el gen en 58 cepas, 57 *C. coli* y 1 *C. jejuni*; y de ellas, 10 eran humanas. Todos estos aislamientos eran resistentes a eritromicina, en su mayoría con una CMI superior a 512 µg/ml. El 38% de las cepas positivas para el gen *ermB*, presentaban la mutación A2075G en el gen del ARNr23S, sin presentar diferencias estadísticamente significativas en la CMI a eritromicina con aquellas cepas que no presentaron la mutación. Sin embargo, la presencia del gen *ermB*, no ha sido detectada en ninguna de nuestras cepas.

El gen *ermB* estaba presente en el cromosoma de 33 cepas de *C. coli*, y en 24, en plásmidos de diferente tamaño. 53 de los 57 casos eran del periodo 2010-2011, lo que sugiere una reciente aparición y dispersión de este determinante de resistencia en China. El gen formaba parte de una isla de multirresistencia (MDRGI) en el cromosoma y describen 6 tipos denominados I al VI, según el contenido y sus puntos de inserción en el cromosoma, siendo el tipo III el más frecuente. A pesar de estas diferencias, todos los MDRGI tienen su origen en bacterias gram positivas.

Finalmente, en un artículo español publicado en 2015 por Flórez Cuadrado y colaboradores (63), se seleccionaron 5 cepas de *C. coli* procedentes de pollos con CMI de eritromicina ≥ 1024 µg/ml para estudiar la posible presencia del gen *ermB*, las mutaciones en el gen del ARNr23S y de las proteínas ribosomales L4 y L22 así como el posible efecto de los inhibidores de la bomba de eflujo. Además determinaron la posición del gen *ermB* mediante el uso de la secuenciación masiva. De las cinco cepas, una de ellas presentó el gen *ermB* y ningún otro mecanismo de resistencia a macrólidos. En nuestro caso no hemos encontrado ninguna cepa de estas características, tal vez aún no se han dispersado a los humanos en nuestra zona. El gen que detectaron se ubicaba en el cromosoma de la cepa y formaba parte de un nuevo tipo de MDRGI que denominaron tipo VIII.

Epidemiología molecular

En el año 2000, Boer y colaboradores (159) evaluaron cuatro técnicas de tipificación molecular entre las que se encuentran las dos técnicas utilizadas por nosotros, PCR-RFLP y ECP.

Estas dos técnicas requieren asignar las bandas ya que su análisis se realiza mediante el coeficiente de Dice, el cual expresa la probabilidad de que la banda de una cepa esté también en otra. Se cuantifica como la relación entre el número de bandas coincidentes entre dos cepas con respecto al total de bandas, cuanto menor sea la distancia genética entre aislamientos, mayor será esta probabilidad. Utilizamos este coeficiente para ambas técnicas, al igual que los autores del trabajo, aunque su punto de corte fue del 90% de similitud tanto para ECP como para la tipificación por gen *flaA* y en nuestro caso fue del 100% para PCR-RFLP del gen *flaA* y un 80% en el caso del ECP. Estos autores obtienen un menor número de tipos diferentes por tipificación de *flaA* que por ECP, mientras que en nuestro trabajo ocurre lo contrario, debido a un punto de corte más restrictivo. De hecho, todas estas técnicas son muy dependientes de los ajustes que se hacen, y ajustes diferentes dan lugar a agrupaciones distintas. Al igual que en nuestro caso, hubo cepas que tenían el mismo tipo de gen *flaA* pero diferente pulsotipo y también les ocurre lo contrario, lo cual puede deberse a la recombinación del gen *flaA* por la alta ocurrencia de este fenómeno genético en *Campylobacter*(160).

Los autores concluyen que la ECP tiene mayor poder de discriminación, aunque en nuestro trabajo, según los índices de Simpson, la tipificación por gen *flaA* sería superior en poder de discriminación, sin embargo esto se debe a los diferentes puntos de corte utilizados.

No obstante, para los autores esto no quiere decir que el ECP sea la técnica de elección, puesto que existen otros factores que han de tenerse en cuenta. Esta técnica es de gran laboriosidad, y por tanto poco adecuada para una gran cantidad de cepas, y necesita de un equipamiento específico. Por su parte, la técnica de PCR-RFLP del gen *flaA* es barata, no necesita equipamiento específico y se puede realizar en cualquier laboratorio y según nuestros resultados ambas técnicas son métodos robustos y con alto poder de discriminación.

En 2001, Michaud y colaboradores (135), evaluaron el poder de discriminación de la ECP con los enzimas de restricción *SmaI* y *KpnI*, en 147 aislados de *C. jejuni*. Los fragmentos de restricción se analizaron visualmente, tal y como hacemos nosotros aunque el programa informático nos sugiera una serie de bandas, y establecieron una optimización y tolerancia de posición del 1%, en nuestro caso este último ajuste fue del 1,5% (133). La similitud entre los

patrones de bandas se determinó mediante el coeficiente de Dice y se generó el dendograma a partir de la matriz de los coeficientes obtenidos a través del método UPGMA, tal cual hicimos también en nuestro trabajo. Dos aislamientos se consideraron parte de un brote con un 90% de similitud entre los patrones de bandas (80% en nuestro trabajo), coincidencia geográfica y tiempo inferior a 3 meses entre los aislados. En nuestro caso, utilizando la técnica de tipificación por *flaA* con el 100% de similitud y como límite temporal 3 meses, obtendríamos 14 brotes. Mediante la técnica de ECP aparecerían 17 brotes que incluyen a 49 cepas, correspondiendo al 51,6% del total. Con nuestro criterio de los dos meses, también se agrupan 49 cepas pero en 20 brotes, ya que al ser 3 meses un periodo más largo para agrupar las cepas, hay cepas que se unen dentro del mismo brote que con el periodo más restrictivo de los 2 meses están en brotes separados.

Estos autores obtienen resultados similares a los nuestros con la restricción por *SmaI*, ya que detectan 19 brotes con 71 cepas agrupadas, un 48,3%, y al aplicar los criterios epidemiológicos espacio - temporales, eliminaron el 28% de las cepas agrupadas. En nuestro caso, según los criterios de estos investigadores, 24 cepas de las que aparecen agrupadas genéticamente no estarían epidemiológicamente relacionadas, es decir, eliminaríamos un 33% de las cepas. Pero si tenemos en cuenta nuestro criterio temporal de los 11 días entre aislamientos, entonces eliminamos el 83,6%. Aun así, tal y como comentan los autores, no hay verdaderos datos para poder asumir o rechazar los brotes obtenidos, ya que no tenemos información clínica ni datos epidemiológicos suficientes de cada caso ni tampoco la confirmación molecular de las posibles fuentes.

Los autores concluyen que *KpnI* posee un mayor poder de discriminación y que solo este enzima cumple el requisito de un procedimiento de tipificación molecular de distinguir el 95% o más de los aislamientos no epidemiológicamente relacionados. Esto puede ser debido a que los sitios de corte de *SmaI* se encuentren mayoritariamente localizados en genes altamente conservados en comparación con *KpnI* o a que ésta última genera sistemáticamente un mayor número de fragmentos de restricción. No obstante, en nuestro trabajo, el índice de Simpson del ECP mediante restricción con *SmaI* tiene un valor de 0,941, debiendo estar este índice entre 0,90 y 0,95 para considerar una técnica como robusta; por lo que este enzima es perfectamente válido.

El mismo grupo en 2004 (161) evaluó la utilidad de la ECP en 184 cepas aisladas de casos clínicos durante un estudio caso-control prospectivo a lo largo de 15 meses. Además incluyeron cepas obtenidas de productos cárnicos de pollo durante el mismo periodo con el

objeto de compararlas con las cepas clínicas. La técnica de ECP con el enzima *KpnI* no tipó una de las cepas y, en las 183 cepas restantes detectaron 29 grupos de 2 a 11 cepas cada uno, que agrupaban a un total de 101 cepas. Al incluir los criterios espacio-temporales, las cepas agrupadas se redujeron hasta 82 cepas en 30 grupos. En nuestro caso, si aplicamos el criterio temporal de 2 meses como máximo entre el aislamiento de las cepas, obtenemos 20 posibles brotes con 49 cepas. Al igual que en nuestro trabajo, encontraron cepas con patrones idénticos de ECP que sin embargo se recuperaban de casos alejados en el tiempo y por tanto, pertenecientes a diferentes grupos. Para los autores, esto puede deberse a que haya algunos genotipos particulares que tengan un mayor potencial para causar brotes, por una mayor dispersión en las diferentes fuentes de esta bacteria o porque tengan una mayor virulencia.

La mayoría de los casos de *Campylobacter* son casos esporádicos, y sólo una minoría se catalogó como brotes por la investigación epidemiológica clásica, y confirmados por ECP. Además, se detectaron muchos grupos pequeños de cepas (de 2 a 7 aislamientos) en los que no se pudo establecer la conexión epidemiológica, a pesar de hacerse a tiempo real, al ser los datos clínicos y epidemiológicos insuficientes. En nuestro caso, aun estando las cepas de los brotes muy próximas en el tiempo, tampoco tenemos más que los datos de nombre, edad, sexo y procedencia (todos ellos de la ciudad de Sevilla), salvo en aquellos pacientes que estuvieron hospitalizados, y sin embargo en la historia clínica de estos pacientes no se recogía ningún dato que pudiera orientar sobre el origen de la infección. Por tanto, parece que sólo podemos sugerir que los brotes pueden ser más frecuentes de lo que parece, teniendo en cuenta que incluyen un bajo número de pacientes y que la conexión real es difícil de establecer.

Finalmente, aunque los humanos y los pollos pueden estar infectados o colonizados, respectivamente, por genotipos relacionados; solo el 46% de los aislamientos de pollos estaban relacionados con uno o más de los aislamientos humanos, la relación temporal sólo se demostró en una minoría de casos y la mayoría de los genotipos causantes de enfermedad no se encontraron entre los aislamientos cárnicos, sugiriendo otras fuentes de campilobacteriosis humana.

En 2006, el grupo neozelandés de Gilpin y colaboradores (108) aplica la ECP con los dos enzimas de restricción, *SmaI* y *KpnI* a 183 cepas clínicas, 168 *C. jejuni* y 15 *C. coli*, siendo el periodo de recogida de cepas ocho semanas en primavera y otras ocho en otoño. Todas las cepas fueron tipificables con *SmaI* y obtuvieron 57 patrones diferentes, considerando que los patrones debían ser idénticos. En nuestro caso, con 80% de similitud, obtuvimos 33 patrones

diferentes de nuestras 94 cepas tipificables. Al combinar ambas enzimas, el total fueron 77 patrones de bandas. De estos, 49 fueron patrones únicos y el resto de aislamientos formaron grupos de entre 2 y 26 aislamientos. En nuestro trabajo obtuvimos 21 tipos únicos de los 33; y las 73 cepas restantes formaron 12 grupos de entre 2 y 12 aislamientos. En el trabajo de los autores, sólo 31 aislamientos correspondientes a 9 pulsotipos estuvieron presentes en las dos temporadas. Sin embargo, en nuestro trabajo las cepas que conforman cada grupo aparecen a lo largo de, como mínimo, dos años; es más, en los grupos B y D las cepas aparecen a lo largo de 4 años consecutivos, indicando la permanencia a lo largo del tiempo de determinados pulsotipos de *C. coli*. Incluso en el caso de los grupos C e I, aparecen cepas en años no consecutivos. De nuevo, la falta de datos específicos en las historias clínicas hizo que la conexión entre los casos agrupados fuera muy difícil, no encontrando además ninguna fuente común para los casos agrupados por ECP.

No obstante, encontraron una conexión temporal (menos de ocho semanas entre los casos) en la mayoría de los grupos, y dentro de los grupos de mayor tamaño hallaron algunos casos posiblemente relacionados

En el trabajo de Gardner y colaboradores (137) se presenta una serie de ítems relacionados con contactos ambientales así como con los alimentos consumidos muy útiles para el estudio epidemiológico convencional. Aun así, la multitud de exposiciones y fuentes potenciales para *Campylobacter* hace que conseguir información fidedigna y significativa sea complicado.

Thakur y colaboradores (100) aplican las técnicas de ECP y MLST a 70 cepas de *C. coli*, siendo 20 de ellas procedentes de casos clínicos. La técnica de ECP, tanto con el enzima *SmaI* como *KpnI*, resulta tener mayor poder de discriminación que el MLST, ya que en varias ocasiones cepas con igual secuenciotipo (ST) tenían diferentes patrones de bandas o pulsotipos. La ECP identificó el 81,4% de las cepas como tipos únicos, y el resto de ellas se distribuyeron en 4 grupos. Estos autores obtienen incluso mayor diversidad genética que nosotros, que puede explicarse por el uso de un punto de corte más restrictivo y al diferente origen de las cepas. Finalmente, estos autores encuentran que en cada patrón de resistencia antibiótica establecido, las cepas que se incluyen son genéticamente diversas, resultados similares a los nuestros.

En 2011, Behringer y colaboradores (96) comparan cuatro técnicas de tipificación molecular, entre las que encontramos las que hemos utilizado nosotros, con cepas de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de pollos vivos y de sus productos cárnicos. La tipificación por *flaA* fue la técnica

con mayor número de cepas no tipificables, dos de *C. jejuni* y tres de *C. coli*, sin embargo solo una cepa fue no tipificable en nuestro trabajo. Del conjunto de cepas seleccionadas para la tipificación, obtuvieron 19 tipos distintos de los cuales 7 fueron tipos únicos (un 36,8%) y 4 tipos contenían más de 10 cepas cada uno. Además, hubo 7 tipos compartidos por ambas especies de *Campylobacter*. En nuestro caso, de los 50 tipos encontrados, 30 fueron únicos, lo que supone un 60% y por tanto un mayor porcentaje de tipos únicos con respecto a los resultados de estos autores. Asimismo, no encontramos grupos que tuvieran 10 cepas o más como es su caso, siendo 8 cepas lo máximo en nuestro estudio. Hay que señalar que las condiciones establecidas por los autores del trabajo en el análisis de los patrones de bandas son ligeramente más laxas, ya que aplican un 2% de optimización y un 4% de tolerancia en la posición de las bandas; además de un punto de corte del 90% de similitud y tal vez por ello hay menos tipos únicos.

La técnica de tipificación por *flaA* tiene la limitación de que, debido a las continuas recombinaciones genéticas que se producen en y entre los dos locus de este gen, la técnica no puede ser utilizada en un estudio a lo largo del tiempo (162).

Por otro lado, la técnica de ECP tuvo una capacidad de tipificación del 96%, similar a nuestros resultados, y sin solapamiento entre especies. Sin diferenciar entre especies, de los 32 tipos obtenidos, 13 correspondieron a una sola cepa (40,6%) y dos de los tipos contenían más de diez. En comparación con nuestros resultados, con un 63,6% de tipos únicos (21 tipos de los 33 tipos totales), parece haber una menor heterogeneidad de las cepas. También en nuestro caso contamos con cuatro de los grupos (A, B, C y D) con 10 cepas o más.

En cuanto al índice de Simpson, sin diferenciar entre especies, el valor obtenido para la técnica de ECP por los autores y en nuestro trabajo son muy similares, aunque si miramos el caso de *C. coli* individualmente, los autores obtienen un valor de 0,91, algo inferior al nuestro. En cuanto a la PCR-RFLP del gen *flaA*, tanto los valores con respecto a ambas especies (SID: 0,90) como únicamente a *C. coli* (SID: 0,85), son más bajos que los obtenidos en nuestro caso (SID: 0,97), probablemente debido a los diferentes ajustes utilizados en el análisis del patrón de bandas y al punto de corte de similitud. Además encontraron 5 cepas (dos de ellas *C. coli*) que no produjeron ningún patrón de bandas, lo cual también afecta al resultado. Los autores también encontraron una baja concordancia entre los métodos probados. En cuanto a las dos técnicas que nos ocupan, el coeficiente ajustado de Rand que obtuvieron fue de 0,157; muy similar a nuestro valor de 0,164.

El trabajo de Gardner y colaboradores (137) es un claro ejemplo de la utilidad que puede tener la tipificación molecular de las cepas procedentes de campilobacteriosis a medida que van apareciendo, pero también es un reflejo de todos los recursos que deben estar disponibles y de la organización y colaboración de los diversos organismos a nivel estatal.

Desarrollan un estudio caso-control para encontrar la fuente de un brote y elaboran un cuestionario que realizan a los casos y los controles, recogiendo información demográfica, características de la enfermedad, historia de exposición a alimentos y medioambiental así como prácticas de cocinado. Encontraron que el consumo de guisantes crudos fue el único factor de riesgo estadísticamente significativo.

Rastrearon la procedencia de los guisantes hasta una granja, que estaba al lado de una zona de cría de grullas canadienses. Recogieron muestras ambientales. Todas las muestras de heces de grulla fueron positivas así como las muestras de guisantes. Al comparar los genotipos clínicos con los ambientales, 4 de los pulsotipos obtenidos de 15 personas fueron iguales que 4 de los pulsotipos de las muestras de guisantes y que 3 de los de heces de grulla. El 70% de los pulsotipos de las personas que no habían consumido guisantes estaban relacionados con los de las personas que sí los habían consumido, por lo que debe haber otros productos contaminados que hayan servido de fuente de infección. Este trabajo refleja que la tipificación molecular es útil para los casos de campilobacteriosis.

Los autores comentan que es muy probable que las personas se infecten con más de una cepa de *Campylobacter*, ya que los tractos digestivos de los reservorios tienen múltiples cepas, tal y como encontraron en su trabajo. Tres miembros de una familia, por ejemplo, estaban infectados por cepas diferentes. En nuestro trabajo, uno de los pacientes tenía dos cepas, una de *C. coli* incluida en el estudio y otra de *C. jejuni*, descartada. En este caso detectamos las dos cepas porque al hacer las pruebas de sensibilidad mediante tiras de gradiente antibiótico, una de ellas aparecía en el halo de inhibición y al hacer la identificación vimos que se trataban de dos especies de *Campylobacter*. Sin embargo, en la rutina diaria se selecciona una cepa de los cultivos clínicos, de forma que pueden perderse conexiones entre los casos humanos y las fuentes.

O' Leary y colaboradores(163) estudiaron 600 cepas de *Campylobacter*, 158 humanas y 442 procedentes de alimentos (carnes de pollo, cerdo, pato, pavo, cordero, puding de cerdo, quesos no pasteurizados, setas, marisco, vegetales...), con la técnica de ECP con *SmaI* y

obtuvieron una tipificación del 84,5%; bastante menor que el 98,9% obtenido en nuestro trabajo.

En el caso de *C. coli*, del total de las cepas tipificadas, sólo 26 eran de casos de gastroenteritis mientras que 190 eran de alimentos. De las 216 cepas de *C. coli* obtuvieron 95 tipos de ECP, siendo 61 tipos únicos (64%), valores muy similares a los nuestros. Teniendo sólo en cuenta las cepas humanas de *C. coli*, de las 26 cepas totales obtuvieron 17 pulsotipos diferentes, 13 de los cuales fueron únicos. Comentan los autores que, en términos temporales, había un periodo de 6 o más meses entre las fechas de aislamiento de las cepas dentro de cada grupo predominante. Esto nos ocurre también a nosotros, donde vemos cómo se distribuyen las cepas de los grupos a lo largo de varios años generalmente.

Al comparar las cepas de *C. coli* humanas y las obtenidas de alimentos, encuentran 8 grupos que contenían cepas humanas y de alimentos, acumulando un total de 74 cepas. Estos grupos contenían el 54% de las cepas humanas y los tipos de comida que contenían cepas con patrones compartidos con las cepas clínicas fueron pollo principalmente, y aislamientos únicos de ostras y carne de pato y pavo. Encontraron además que hubo varios genotipos compartidos que perduraron a lo largo de todo el periodo de estudio.

Aunque el 42% de los patrones de las cepas de carne de pollo se relacionaban con una o más de los aislamientos humanos, existe una importante proporción de casos clínicos con patrones de bandas que no se han encontrado ni en el pollo ni en el resto de alimentos. Esto no quiere decir que estos alimentos no sean causa de campilobacteriosis, tal vez estaban contaminados por más de una cepa y solo tipificaron una por muestra. Asimismo, hay otros factores que contribuyen que no están recogidos en el estudio, como la exposición a mascotas, factores medioambientales, agua, comida de restaurante, etc.

Tal y como comentan Clark y colaboradores en su trabajo (134), se ha descrito que la tipificación sistemática aumenta el número de brotes detectados con origen común, como por ejemplo en un trabajo danés en que el 25% de los cultivos positivos formaban parte de grupos, sugiriendo esto fuentes comunes de infección. Si comparamos con nuestro trabajo, vemos como, según ECP hasta 73 de las 95 cepas clínicas de *C.coli* aparecen agrupadas, lo que supone un 76,8% de los cultivos positivos para esta especie, y mediante PCR-RFLP del gen *flaA*, son 64 cepas las que aparecen agrupadas, suponiendo un 67,4%. Ambos porcentajes son bastante más altos que en el trabajo de estos autores.

En este trabajo comparan 5 métodos de tipificación molecular, incluyendo un método novedoso denominado “impresión genómica comparativa” (CGF), basado en una PCR múltiple diseñada para detectar genes de *Campylobacter* con una alta variabilidad intraespecie. Según sus resultados este método es el que tiene mayor poder de discriminación, tanto solo, como en combinación con otra técnica de tipificación. Aun así, los datos obtenidos mediante ECP con *Sma*I son también muy buenos, pues obtienen un índice de Simpson de 0,98, sólo un poco por debajo del obtenido por CGF, de 1. Este valor es muy similar al que obtenemos nosotros si consideramos como punto de corte el 100% de similitud, aunque los autores no especifican qué corte utilizan ellos, salvo para la técnica de CGF.

Los autores comentan que cuando se usan los campos pulsados como método primario, los demás métodos, salvo CGF(100%), presentan niveles intermedios o altos de concordancia. En cambio, en nuestro trabajo, si calculamos el índice de Wallace con la técnica de ECP al 100% de similitud, nos da un valor de $W_{ECP100 \rightarrow PCR-RFLP\ flA100} = 0,299$ (CI 95% = 0,133 – 0,466). Esto quiere decir que si dos cepas están agrupadas por ECP, tienen un 30% aproximadamente de probabilidad de estar también agrupadas por PCR-RFLP de *flaA*. Si calculamos en el sentido inverso, nos sale que $W_{PCR-RFLP\ flA100 \rightarrow ECP100} = 0,109$ (CI 95% = 0,000 – 0,221), por lo que dos cepas agrupadas por PCR-RFLP de *flaA* tienen un 11% aproximadamente de posibilidad de estar agrupadas también por ECP, queriendo decir que ECP es una técnica con mayor capacidad de discriminación. De esta misma forma, en el trabajo comentado el ECP añadía mucha información a los demás métodos, salvo a CGF(100%). Los coeficientes de Rand y Wallace determinaron la poca coincidencia entre ambos métodos.

Los autores valoraron la utilidad de estas técnicas en un brote de campilobacteriosis en un campamento de verano en 2008. Varios de los métodos determinaron como idénticos las cepas que se relacionaron con el brote, aunque también un número abundante de casos no relacionados. Sin embargo, con la técnica CGF(100%), solamente dos casos no relacionados con el brote fueron del mismo tipo. Además, dentro de los casos del brote de campilobacteriosis no todas las cepas eran indistinguibles y los autores lo explican como un exceso de discriminación de la técnica, sin embargo pensamos, que las fuentes o reservorios de *Campylobacter* suelen contener diversos genotipos, y esta variedad genética puede llegar en mayor o menor medida hasta la población humana y por tanto aparecer cepas que no son 100% idénticas pero sí que estén relacionadas en un grado de similitud algo menor, como de hecho lo estaban esas cinco cepas que encuentran. También podría ocurrir que, debido a los frecuentes procesos de mutación y recombinación en *Campylobacter*, las cepas no sean

idénticas sino estrechamente relacionadas, teniendo el mismo origen. Es por ello que nosotros elegimos el corte del 80% y no del 100%. Por ejemplo, encontraron 6 cepas en muestras de alimentos y una en una muestra de agua de la zona centinela correspondiente a los dos años anteriores que estaban muy relacionadas con la del brote del campamento. Por ello deben ser tenidas en cuenta no sólo las cepas indistinguibles, sino también las que están muy relacionadas porque probablemente tengan un origen común. Los autores encontraron cepas relacionadas que permanecían a lo largo del tiempo, tal y como hemos encontrado en nuestro trabajo (tabla 25).

Estos autores comentan que según cuál sea el objetivo con que se aplique un método de tipificación molecular puede ser más útil uno u otro. Es decir, si lo que se pretende es asignar de forma inequívoca una cepa a un hospedador (humano o no humano) posiblemente el método CGF(100%), con su gran poder de discriminación, sea el mejor. Sin embargo, si lo que se pretende es mostrar qué fuentes pueden ser las responsables de la infección humana incluyendo cepas tanto humanas como de las posibles fuentes en un mismo tipo, entonces un método menos discriminatorio será de mayor utilidad. Por ello pensamos que tanto el ECP al 80% como la tipificación por *flaA* al 100% podrían ser un buen punto de partida, y en una futura investigación, teniendo en cuenta los datos epidemiológicos clásicos, determinar cuál de las dos técnicas permite detectar los brotes y sus posibles fuentes.

Gilpin y colaboradores (164) analizaron en 49 pacientes con infección por *Campylobacter*, las cepas aisladas en más de una muestra de heces de cada uno de ellos, concluyendo que todos los pacientes estaban infectados por una sola especie; mientras que en nuestro trabajo, aun tratándose de un hallazgo casual, encontramos una infección mixta por *C. jejuni* y *C. coli*. Los resultados de este trabajo son muy ilustrativos ya que de 12 pacientes, el 24%, presentaron dos o más pulsotipos diferentes. En 5 de los casos encontraron dos patrones diferentes pero relacionados y los otros 7 pacientes presentaron también varios pulsotipos pero no relacionados y uno de ellos tenía 3 patrones diferentes.

Por ello, los autores llegan a las mismas conclusiones que hemos planteado anteriormente, es posible encontrar varios tipos de cepas en un mismo paciente. Por un lado, el paciente puede haber sido infectado por una cepa, pero durante el curso de la infección se producen variaciones en esa cepa que originan diferentes pulsotipos, los cuales estarían estrechamente relacionados. Por otro lado, podría ocurrir que la fuente de infección presente varias cepas, que pueden ser muy similares o diferentes. Y, finalmente, aunque esto a nosotros nos parece menos probable, pueden adquirirse diversas cepas en diferentes momentos de infección,

como por agua contaminada, contacto repetido con animales o consumo de múltiples alimentos contaminados. Todo esto añade complejidad al estudio epidemiológico de *Campylobacter*. Por tanto, en casos clínicos con una aparente conexión epidemiológica y diferentes genotipos, probablemente no se hayan estudiado todos los genotipos presentes. Igualmente si rastreamos una posible fuente de contaminación y los genotipos de los casos y de la fuente no coinciden, puede deberse de nuevo a que no se han tipificado todas las cepas presentes.

En el trabajo ya mencionado de Pérez Boto y colaboradores (98) tratan de seleccionar grupos de cepas que compartan el tipo de *flaA* y el resistotipo en un conjunto de 352 aislados de *Campylobacter*. Como criterio temporal establecen un periodo máximo de 11 días entre las fechas de aislamiento de las cepas. Las cepas preseleccionadas se analizaron después con las técnicas de ECP con enzima *KpnI* y MLST.

Con respecto a la PCR-RFLP del gen *flaA*, encontraron 51 tipos diferentes en el total de las 334 cepas, encontrando varios tipos con un abundante número de cepas, con un máximo de 39 cepas en uno de los tipos. En nuestro trabajo, nuestros tipos de *flaA* comprenden un máximo de 8 cepas, aunque probablemente se deba al menor tamaño muestral. Comentan los autores que aun así, la mayoría de los tipos obtenidos pertenecen a grupos muy pequeños de cepas o a cepas únicas, tal y como encontramos también con nuestra colección.

Pensamos que los criterios utilizados para seleccionar las cepas candidatas a posibles brotes son restrictivos en exceso. Dada la naturaleza de las infecciones por *Campylobacter*, nos parece que es más conveniente que las condiciones sean más laxas para poder detectar casos relacionados y conectarlos con una posible fuente común. Aun utilizando estos criterios restrictivos encontraron 10 grupos de aislados, de los cuales 8 incluían dos cepas y los otros 2 grupos tenían tres y cuatro cepas respectivamente. En nuestro trabajo, siguiendo el mismo criterio temporal, encontramos 7 grupos de cepas, todos ellos formados por dos cepas. Si tenemos en cuenta nuestro menor tamaño muestral, el porcentaje de cepas incluidas en brotes es mayor.

Al hacer la técnica de ECP, 6 de los 10 posibles brotes presentaron un 100% de similitud. En nuestro caso, las coincidencias se dieron en 5 grupos de los 7, con porcentajes de similitud entre las cepas del 80 al 100%. Aunque los autores dicen que teóricamente no debe haber diferencias en las cepas de un brote, en ECP sí que aparecen con relativa frecuencia bandas de

diferencia debido a la variabilidad intrínseca de este microorganismo, como es el caso de nuestro trabajo.

En nuestro trabajo, en 4 de los 7 grupos, el resistotipo es idéntico. En los tres restantes, encontramos una diferencia, que afectó a amoxicilina-clavulánico y a tobramicina.

Estos autores pretenden detectar brotes de casos producidos a partir de la misma fuente en un mismo momento. En cualquier estudio de brotes se necesitan los datos epidemiológicos de los pacientes para su confirmación. Tanto los autores como nosotros carecemos de ellos. Sin embargo, en dos de los grupos detectados los aislados pertenecían a hermanos; en nuestro caso, de los 7 grupos uno de ellos también corresponde a dos hermanos; y tal y como comentan los autores, los brotes familiares son probablemente los más comunes.

En el trabajo de Kovac y colaboradores (165) realizan un estudio epidemiológico de 178 cepas de *C. jejuni* y evalúan la relación genética entre ellas, viendo que las cepas resistentes a ciprofloxacino están genéticamente muy relacionadas y proceden de un ancestro común con dispersión clonal. Sin embargo, en los países centroeuropeos las tasas de resistencia a ciprofloxacino son muy bajas en comparación a las tasas de nuestro país; de forma que en nuestro caso, la mayoría de cepas son resistentes a este antibiótico y están escasamente relacionadas entre sí.

Yamada y colaboradores realizan en 2015 un estudio con 67 cepas clínicas de *C. jejuni*, 62 procedentes de casos esporádicos y tres de ellas pertenecientes a un brote alimentario, con el objeto de comparar los resultados obtenidos mediante ECP y PCR binaria, un método de tipificación molecular que se basa en comprobar la presencia o ausencia de 18 elementos genéticos variables en el cromosoma de *Campylobacter*. De las 62 cepas de casos esporádicos, obtuvieron 40 tipos mediante *SmaI*, obteniendo un índice de Simpson de 0,975. En nuestro caso el índice de Simpson con el punto de corte del 80% fue del 0,941, sensiblemente menor debido al punto de corte más laxo. Sin embargo, si lo hacemos con el corte del 100% este índice sube hasta 0,992.

Por tanto, podemos concluir que, teniendo en cuenta las características de cada técnica y los recursos de que dispongamos en nuestro laboratorio, la epidemiología molecular de las cepas clínicas de *Campylobacter* puede resultar de utilidad si lo aplicamos en la rutina y en el contexto de un laboratorio de Microbiología en el que la epidemiología molecular sea considerada una herramienta fundamental. Teniendo en cuenta la prevalencia de esta infección en la población sería oportuno utilizar la metodología que mejor se ajuste a nuestras

necesidades con el objetivo de detectar posibles brotes y, en un escenario ideal, poder detectar también las fuentes de contaminación de esta bacteria.

CONCLUSIONES

1. Los niños de entre 1 y 5 años, así como las personas de más de 40 años son los principales grupos de edad afectados por la infección por *C. coli*. Un porcentaje importante requiere ingreso hospitalario, principalmente en personas mayores y con enfermedades de base. La diarrea, dolor abdominal y fiebre son los síntomas más frecuentes, seguidos de náuseas y vómitos. El género masculino es ligeramente predominante. No hay una estacionalidad marcada en la infección por *C. coli*, aunque sí un mayor número de casos en primavera.
2. Los antibióticos que mostraron mayor actividad frente a *C. coli* fueron imipenem y gentamicina, mientras que la resistencia a ciprofloxacino es prácticamente universal. Encontramos tasas de resistencia bastante altas en el resto de los antibióticos probados. Es destacable que el 24% de las cepas fueron resistentes a eritromicina, tratamiento de elección en estas infecciones.
3. Las cepas resistentes a eritromicina presentan niveles mayores de resistencia a los demás antimicrobianos, siendo estadísticamente significativo en el caso de tetraciclina, tobramicina, gentamicina y clindamicina.
4. El método de microdilución en caldo tiende a dar CMI más bajas que el de tiras de gradiente antibiótico con todos los antibióticos probados excepto con tetraciclina. Existe una alta concordancia categórica para los antibióticos probados por ambos métodos, sin embargo, la concordancia esencial es bastante menor, siendo estadísticamente significativa en el caso de ciprofloxacino, debido a los altos valores de CMI de nuestras cepas.
5. Nuestros resultados, en concordancia con la literatura, confirman que la mutación de resistencia a quinolonas más frecuente es la C257T (ACT → ATT), que conlleva el cambio aminoacídico Thr86Ile. Aunque esta sustitución se ha relacionado con altos niveles de resistencia a ciprofloxacino, en nuestro trabajo encontramos cepas con CMI por microdilución en caldo que corresponden a resistencia considerada de bajo nivel y todas ellas presentan la mutación mencionada. Además, existen mutaciones silenciosas que originan polimorfismos en la región QRDR del gen *gyrA*.
6. La mutación puntual A2075G en el gen que codifica el ARNr23S es la más frecuente y otorga alto nivel de resistencia a macrólidos. No hemos detectado la presencia del gen

ermB en la población de *C. coli* de nuestra zona y, por tanto, no contribuye a la resistencia a macrólidos. La secuenciación del gen del ARNr23S en las cepas resistentes sin las mutaciones estudiadas podrían identificar mutaciones en otras posiciones no detectadas hasta la fecha.

7. Las dos técnicas utilizadas para la tipificación clonal, ECP y PCR-RFLP del gen *flaA*, presentan un buen poder de discriminación y son robustas, aunque la técnica de ECP es mucho más laboriosa.
8. Las técnicas son poco coincidentes en la agrupación de cepas, sin embargo, en un mismo contexto espacio-temporal, la mayoría de los brotes son detectados por ambas técnicas y las cepas incluidas son las mismas. La validez y utilidad de estas técnicas han de establecerse en conjunción con los datos obtenidos de la epidemiología convencional.
9. Las cepas clínicas de *C. coli* presentan una elevada heterogeneidad genética. No obstante, las técnicas de tipificación molecular agrupan a un número relativamente amplio de cepas que se ve reducido tras la aplicación de los criterios temporales para identificar posibles brotes de campilobacteriosis. La magnitud de esta reducción depende de la exigencia de los criterios aplicados y, la selección de estos, del objetivo que se persiga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010.
2. Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(9):665–79.
3. Murray PR. Manual of clinical microbiology, 10 th edition. p. 937–41.
4. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell NM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(3):687–720.
5. Stephen LW. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? J Microbiol Methods. 2013; 95(1):3–7.
6. Lastovica AJ. Emerging *Campylobacter* spp.: The tip of the iceberg. Clin Microbiol Newsl. 2006; 28(7):49–56.
7. Oyarzabal OA, Carrillo CD. Isolation, identification, and typing of *Campylobacter* strains from food samples. En: Klein G, editor. *Campylobacter*: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease. Hannover. Elsevier: 2016 p. 61-83
8. Martiny D, Visscher A, Catry B, Chatellier S, Vandenberg O. Optimization of *Campylobacter* growth conditions for further identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). J Microbiol Methods. 2013; 94(3):221–3
9. Bessède E, Solecki O, Sifre E, Labadi L, Mégraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. 2011; 17: 1735–1739
10. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. Future Microbiol. 2010; 5(11):1733–54.
11. Bessède E, Lehours P, Labadi L, Bakiri S, Mégraud F. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol. 2014; 52(1):328–30.
12. Boehm M, Heimesaat MM. Human campylobacteriosis. En: Klein G, editor. *Campylobacter* : Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease. Hannover. Elsevier: 2017 p. 1-25.
13. Zhang L, Budiman V, Day AS, Mitchell H, Lemberg DA, Riordan SM, et al. Isolation and detection of *Campylobacter concisus* from saliva of healthy individuals and patients

- with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(8):2965–7.
14. Zhang L, Si MM, Day AS, Leach ST, Lemberg DA, Dutt S, et al. Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(2):453–5.
 15. Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. *Gastroenterology.* 2009; 137(2):495–501.
 16. O'Brien CL, Pavli P, Gordon DM, Allison GE. Detection of bacterial DNA in lymph nodes of Crohn's disease patients using high throughput sequencing. *Gut.* 2014; 63(10), 1596-606.
 17. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Day AS, Lemberg DA, Leach ST, Mitchell HM. *Campylobacter concisus* and exotoxin 9 levels in paediatric patients with Crohn's disease and their association with the intestinal microbiota. *J Med Microbiol.* 2013; 63:99–105.
 18. Keithlin J, Sargeant J, Thomas MK, Fazil A. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 11(2):79–95.
 19. Blackett KL, Siddhi SS, Cleary S, Steed H, Miller MH, MacFarlane S, et al. Oesophageal bacterial biofilm changes in gastro-oesophageal reflux disease, Barrett's and oesophageal carcinoma: Association or causality? *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 37(11):1084–92.
 20. Macfarlane S, Furrie E, Macfarlane GT, Dillon JF. Microbial colonization of the upper gastrointestinal tract in patients with Barrett's Esophagus. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(1):29–38.
 21. Lee HJ, Kim JK, Cho JY, Lee JM, Hong SH. Quantification of subgingival bacterial pathogens at different stages of periodontal diseases. *Curr Microbiol.* 2012; 65(1):22–7.
 22. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome.* 2013; 1:16.
 23. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol.* 2013; 66(2):462–70.
 24. Feodoroff B, Lauhio A, Ellström P, Rautelin H. A nationwide study of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteremia in Finland over a 10-year period, 1998-2007,

- with special reference to clinical characteristics and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis. 2011; 53(8):99–106.
25. Ruiz-Castillo A, González-Estrada A, Giráldez-Gallego A, Lepe-Jiménez J. Bacteriemia espontánea del cirrótico por *Campylobacter coli*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014; 32(7):469–75.
 26. Nielsen H, Hansen KK, Gradel KO, Kristensen B, Ejlertsen T, Østergaard C, et al. Bacteraemia as a result of *Campylobacter* species: A population-based study of epidemiology and clinical risk factors. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(1):57–61.
 27. Baker MG, Kvalsvig A, Zhang J, Lake R, Sears A, Wilson N. Declining Guillain-Barré syndrome after campylobacteriosis control, New Zealand, 1988-2010. Emerg Infect Dis. 2012; 18(2):226–33.
 28. Malik A, Sharma D, St Charles J, Dybas LA, Mansfield LS. Contrasting immune responses mediate *Campylobacter jejuni* induced colitis and autoimmunity. Mucosal Immunol. Nature Publishing Group; 2014; 7(4):802–17.
 29. Ahvonen P, Sievers K, Aho K. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* Infection. Acta Rheumatol Scand. 1969; 15(1–4):232–53.
 30. Batz MB, Henke E, Kowalczyk B. Long-term consequences of food borne infections. 2013; 27(3):599–617.
 31. Pope JE, Krizova A, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Ouimet JM. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. Semin Arthritis Rheum. 2017; 37(1):48–55.
 32. Ajene AN, Walker CLF, Black RE, Walker CLF. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* -associated reactive arthritis. 2013; 31:299–307.
 33. Oyarzabal OA, Kathariou S. DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens. Wiley; 2014.
 34. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, et al. Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology. 2012;158(4):1005–15.
 35. Maiden MCJ, Van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. Nat Rev Microbiol. 2013;11(10):728–36.

36. Cody AJ, McCarthy ND, Van Rensburg MJ, Isinkaye T, Bentley SD, Parkhill J, et al. Real-time genomic epidemiological evaluation of human *Campylobacter* isolates by use of whole-genome multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(8):2526–34.
37. Kovanen SM, Kivistö RI, Rossi M, Schott T, Kärkkäinen UM, Tuuminen T, et al. Multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome MLST of *Campylobacter jejuni* isolates from human infections in three districts during a seasonal peak in Finland. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(12):4147–54.
38. Biggs PJ, Fearnhead P, Hotter G, Mohan V, Collins-Emerson J, Kwan E, et al. Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27121
39. Kivistö RI, Kovanen S, Skarp-De Haan A, Schott T, Rahkio M, Rossi M, et al. Evolution and comparative genomics of *Campylobacter jejuni* ST-677 clonal complex. *Genome Biol Evol.* 2014; 6(9):2424–38.
40. Revez J, Llarena AK, Schott T, Kuusi M, Hakkinen M, Kivistö R, et al. Genome analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from a waterborne outbreak. *BMC Genomics.* 2014; 15:768.
41. Clark CG, Taboada E, Grant CCR, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, et al. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(3):798–809.
42. Carrillo CD, Kruczkiewicz P, Mutschall S, Tudor A, Clark C, Taboada EN. A framework for assessing the concordance of molecular typing methods and the true strain phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using draft genome sequence data. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:1–12.
43. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ V. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014; 22(8): 438–45.
44. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(2):385–92.
45. Piddock LJ, Walters RN. Bactericidal activities of five quinolones for *Escherichia coli* strains with mutations in genes encoding the SOS response or cell division. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(4):819–25.
46. Wiczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*.

47. Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 2006; 8(7):1967–71.
48. Ge B, Mcdermott PF, White DG. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(8):3347-3354
49. Wang Y, Huang W, Taylor DE. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(3):457–63.
50. Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(7):2124–31.
51. Pumbwe L, Piddock LJ. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 206:185–9.
52. Grinnage-Pulley T, Zhang Q. Genetic basis and functional consequences of differential expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni* isolates. *PLoS One.* 2015; 10(7):1–26.
53. Lin J, Akiba M, Sahin O, Zhang Q, Lin J, Akiba M, et al. CmeR Functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(3):1067–75.
54. Shen Z, Pu XY, Zhang Q. Salicylate functions as an efflux pump inducer and promotes the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* mutants. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(20):7128–33.
55. Yao H, Shen Z, Wang Y, Deng F, Liu D, Naren G, et al. Emergence of a potent multidrug efflux pump variant that enhances *Campylobacter* resistance to multiple antibiotics. *MBio.* 2016; 7(5):1–11.
56. Pfister P, Jenni S, Poehlsgaard J, Thomas A, Douthwaite S, Ban N, et al. The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23 S rRNA positions 2058 and 2059. *J Mol Biol.* 2004; 342(5):1569–81.
57. Hao H, Liu J, Kuang X, Dai M, Cheng G, Wang X, et al. Identification of *Campylobacter jejuni* and determination of point mutations associated with macrolide resistance using a multiplex TaqMan MGB real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2015; 118(6):1418–25.

58. Iovine NM. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*. 2013 ;4(3):230–40.
59. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhang M, Deng F, Shen Z, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene *ermB* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(4):964–8.
60. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(4):482–92.
61. Deng F, Shen J, Zhang M, Wu C, Zhang Q, Wang Y. Constitutive and inducible expression of the rRNA methylase gene *erm (B)* in *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(10):6661–4.
62. Bolinger H, Kathariou S. The current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp .: Trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83(12):1–9.
63. Florez-Cuadrado D, Ugarte-Ruiz M, Quesada A, Palomo G, Domínguez L, Porrero MC. Description of an *erm (B)*-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 71(3):841-3.
64. Deng F, Wang Y, Zhang Y, Shen Z. Characterization of the genetic environment of the ribosomal RNA methylase gene *erm (B)* in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 70(2):613-5.
65. Zhang A, Song L, Liang H, Gu Y, Zhang C, Liu X, et al. Molecular subtyping and erythromycin resistance of *Campylobacter* in China. *J Appl Microbiol*. 2016; 121(1):287–93.
66. Chen JC, Tagg KA, Joung J, Bennett C, Watkins F, Eikmeier D, et al. Report of *erm (B)**Campylobacter jejuni* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(6):3–5.
67. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; 112(18):5649–54.
68. De jong A, Thomas V, Simjee S, Godinho K, Schiessl B, Klein U, et al. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(3):638–51.
69. Wagner J, Jabbusch M, Eisenblätter M, Hahn H, Wendt C, Ignatius R. Susceptibilities of

- Campylobacter jejuni* isolates from Germany to ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, and tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(7):2358–61.
70. Kittl S, Kuhnert P, Hächler H, Korczak BM. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *J Appl Microbiol.* 2011; 110(2):513–20.
 71. EFSA. Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans , animals and food in the European Union in 2012. *EFSA J.* 2014; 12(3):1–336.
 72. Torralbo A, Borge C, García-Bocanegra I, Méric G, Perea A, Carbonero A. Higher resistance of *Campylobacter coli* compared to *Campylobacter jejuni* at chicken slaughterhouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015; 39:47–52.
 73. EMA. Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010: Second ESVAC report. EMA. 2014.
 74. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(3):827–34.
 75. Domingues a. R, Pires SM, Halasa T, Hald T. Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect.* 2012; 140(6):970–81.
 76. Kittl S, Korczak BM, Niederer L, Baumgartner A, Buettner S, Overesch G, et al. Comparison of genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on chicken retail meat and at slaughter. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(12):3875–8.
 77. Colles FM, McCarthy ND, Sheppard SK, Layton R, Maiden MCJ. Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *Int J Food Microbiol.* 2010; 137(2–3):259–64.
 78. Damjanova I, Jakab M, Farkas T, Mészáros J, Galántai Z, Turcsányi I, et al. From farm to fork follow-up of thermotolerant *Campylobacter* throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. *Int J Food Microbiol.* 2011; 150(2–3):95–102.
 79. Melero B, Juntunen P, Hänninen M, Jaime I, Rovira J. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed- field gel

- electrophoresis , and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol.* 2012; 32:124–8.
80. EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008. *EFSA J.* 2011; 9(2):2017
 81. Wang Y, Dong Y, Deng F, Liu D, Yao H, Zhang Q, et al. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008-14. *J Antimicrob Chemother.* 2015; (2008):1–4.
 82. Harrington C s., Moran L, Ridley A m., Newell D g., Madden R h. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(6):1321–1333.
 83. Payot S, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin. *Microb Drug Resist Epidemiol Dis.* 2002; 8(4):335–43.
 84. Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3276–80.
 85. Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23(5):468–72.
 86. Zirnstein G, Helsel L, Li Y, Swaminathan B, Besser J. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 190(1):1–7.
 87. Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(9):5405–12.
 88. Barrett TJ, Patton CM, Morris GK. Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization. *Lab Med.* 1988; 19(2):96–102.
 89. CASFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie - recommandations 2017.
 90. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables

- for interpretation of MICs and zone diameters. 2017.
91. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015.
 92. Sifré E, Salha BA, Ducournau A, Floch P, Chardon H, Mégraud F, et al. EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *J Microbiol Methods*. 2015; 119:206–13.
 93. CASFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie - recommandations 2015 Société Française de Microbiologie. 2013.
 94. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:1–46.
 95. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen P a., 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(9):2233–9.
 96. Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods*. 2011; 84(2):194–201.
 97. Freeman M. PFGE: Tips and tricks to success and interpretation of results for foodborne outbreak investigations. Proceedings of the BioNumerics Workshop for PulseNet Participants. 15 de abril de 2011; PulseNet USA.
 98. Pérez-Boto D, López-Portolés JA, Simón C, Echeita MA. Application of restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction-*flaA* and resistotype to identify potential undiagnosed outbreaks of campylobacteriosis in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(7):428–33.
 99. Perez-Boto D, Garcia-Peña FJ, Abad-Moreno JC, Echeita MA. Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: Persistent vs. transient strains. *Vet Microbiol*. 2012; 159(1–2):204-11.
 100. Thakur S, White DG, McDermott PF, Zhao S, Kroft B, Gebreyes W, et al. Genotyping of *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Appl Microbiol*. 2009; 106(5):1722–33.
 101. Thakur S, Zhao S, McDermott PF, Harbottle H, Abbott J, English L, et al. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and

- Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7(7):835–44.
102. Wang X, Zhao S, Harbottle H, Tran T, Blickenstaff K, Abbott J, et al. Antimicrobial resistance and molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from retail meats. J Food Prot. 2011; 74(4):616–21.
 103. Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S, Zhao S, Sippy RJ, Kwan P, et al. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. J Clin Microbiol. 2012; 50:680–7.
 104. Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, et al. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(5):1314–21.
 105. Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, et al. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. J Antimicrob Chemother. 2014;70(5):1314–21.
 106. Gaudreau C, Helferty M, Sylvestre J, Allard R, Pilon PA, Poisson M, et al. *Campylobacter coli* outbreak in men who have sex with men, Quebec, Canada, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 2013; 19(5):764-7.
 107. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. PLoS One. 2013; 8(12):e83731.
 108. 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(2):406-12
 109. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2001; 39(5):1889–94.
 110. Center for Disease Control (CDC). PulseNet. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Campylobacter jejuni*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/campylobacter-pfge-protocol-508c.pdf>
 111. Noormohamed A, Fakhr M. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from various retail meats by MLST and PFGE. Foods. 2014; 3(1):82–93.

112. McIver C, Hogan T, White P, Tapsall J. Patterns of quinolone susceptibility in *Campylobacter jejuni* associated with different gyrA mutations. Pathology. 2004; 36(2):166–9.
113. Sonnevend A, Rotimi VO, Kolodziejek J, Usmani A, Nowotny N. High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. J Med Microbiol. 2006; 55(11):1533–8.
114. Piddock LJ V, Ricci V, Pumbwe L, Everett MJ, Griggs DJ. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. J Antimicrob Chemother. 2003; 51:19–26.
115. Bolton D, Patriarchi A, Fox Á, Fanning S. A study of the molecular basis of quinolone and macrolide resistance in a selection of *Campylobacter* isolates from intensive poultry flocks. Food Control. 2013; 30(1):222–6.
116. Hormeño L, Palomo G, Ugarte-Ruiz M, Porrero MC, Borge C, Vadillo S, et al. Identification of the main quinolone resistance determinant in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by MAMA-DEG PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 84(3):236-9.
117. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, José M, Baquero F, Torres C, et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(2):267–71.
118. Kirkpatrick BD, Tribble DR. Update on human *Campylobacter jejuni* infections. Curr Opin Gastroenterol. 2011; 27(1):1–7.
119. Pérez-Boto D, Herrera-León S, García-Peña FJ, Abad-Moreno JC, Echeita M a. Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. Avian Pathol. 2014; 43(2):176–82.
120. Thakur S, Gebreyes W a. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Campylobacter coli* within individual pigs at farm and slaughter in the US. Zoonoses Public Health. 2010; 57 Suppl 1:100–6.
121. EFSA. ECDC. *Campylobacter* and *Listeria* infections still rising in the EU. 2015; v46(0):1–2. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu>
122. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, et al. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect. 2006; 8(7):1955–66.

123. Chatur YA, Brahmabhatt MN, Modi S, Nayak JB. Fluoroquinolone resistance and detection of topoisomerase gene mutation in *Campylobacter jejuni* isolated from animal and human sources. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014; 3(6):773–83.
124. Bachoual R, Ouabdesselam S, Mory F, Lascols C, Soussy CJ, Tankovic J. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist*. 2001; 7(3):257–61.
125. Hormeño L, Palomo G, Ugarte-ruiz M, Porrero MC, Borge C, Vadillo S, et al. Identification of the main quinolone resistance determinant in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by MAMA-DEG PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 84(3):236–9.
126. Hänninen M-L, Hannula M. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60(6):1251–7.
127. Zeitouni S, Guyard-Nicodème M, Kempf I. Comparison of adhesion, invasion, motility, and toxin production of *Campylobacter* strains and their resistant mutants. *Microb Drug Resist*. 2013; 19(2):130-7
128. Mukherjee P, Ramamurthy T, Mitra U, Mukhopadhyay AK. Emergence of high-level azithromycin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from pediatric diarrhea patients in Kolkata, India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(7):4248.
129. Pérez-Boto D, López-Portolés J a, Simón C, Valdezate S, Echeita M a. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(10):2083–8.
130. Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1153–7.
131. SEIMC. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. 2005. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
132. Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carriço J. Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(11):3997–4000.

133. Carriço J a, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, Pinto FR, de Lencastre H, Almeida JS, et al. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol. 2006; 44(7):2524–32.
134. Clark CG, Taboada E, Grant CCR, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, et al. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. J Clin Microbiol. 2012; 50(3):798–809.
135. Michaud S, Menard S, Gaudreau C, Arbeit RD. Comparison of *Sma*I-digested genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I : a population-based study. J Med Microbiol. 2001; 50:1075–81.
136. The Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. Point source outbreaks of *Campylobacter jejuni* infection – are they more common than we think and what might cause them? Epidemiol Infect. 2003; 130:367–75.
137. Gardner TJ, Fitzgerald C, Xavier C, Klein R, Pruckler J, Stroika S, et al. Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas. Clin Infect Dis. 2011; 53:26–32.
138. Niederer L, Kuhnert P, Egger R, Büttner S, Hächler H, Korczak BM. Genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from domestic and travel-associated human cases. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(1):288–91.
139. Feizabadi MM, Dolatabadi S, Zali MR. Isolation and drug-resistant patterns of *Campylobacter* strains cultured from diarrheic children in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2007; (15):217–9.
140. Gaudreau C, Boucher F, Gilbert H, Bekal S. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained in Montreal, Quebec, Canada, from 2002 to 2013. J Clin Microbiol. 2014; 52(7):2644–6.
141. Riley A, Eshaghi A, Olsha R, Allen VG, Patel SN. Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Ontario , Canada during 2011 – 2013. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 83(3):292–4.
142. Lehtopolku M, Nakari U-M, 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(3):1232–6.

143. Ge B, Wang F, Sjölund-Karlsson M, McDermott PF. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *J Microbiol Methods*. 2013; 95(1):57–67.
144. Oishi A, Murakami K, Etoh Y, Sera N, Horikawa K. Antimicrobial susceptibility and resistance mutations in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from human and meat sources. *Kansenshogaku Zasshi*. 2015; 89(2):244–53.
145. Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF, et al. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50(4):487–94.
146. Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution , E Test , and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(3):1062–8.
147. Oncul O, Zarakolu P, Oncul O, Gur D. Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: A comparison between Etest and agar dilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 45(1):69–71.
148. Halbert LW, Kaneene JB, Mansfield LS, Ruegg PL, Warnick LD, Wells SJ, et al. Comparison of automated microbroth dilution and agar dilution for antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy sources. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(4):686–91.
149. Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(2):590–4.
150. Valdivieso-García A, Imgrund R, Deckert A, Varughese BM, Harris K, Bunimov N, et al. Cost analysis and antimicrobial susceptibility testing comparing the E test and the agar dilution method in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 65(2):168–74.
151. Sanz-rodríguez N, Pérez-boto D. Precisión del método E-test para el estudio de la sensibilidad de *Campylobacter* spp. a eritromicina , ciprofloxacino y tetraciclina. *Rev Esp Quimioter*. 2013; 26(2):116–8.
152. Azrad M, Tkhawkho L, Isakovich N, Nitzan O, Peretz A. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: comparison between Etest and a broth dilution method. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018; 17(1):23

153. Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates : detection of *gyrA* resistance mutations by Mismatch Amplification Mutation Assay PCR and DNA sequence analysis. J Clin Microbiol. 1999;37(10):3276–80.
154. Wang Y, Huang W, Taylor DE. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations 1993;(21):457–63.
155. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Cathy A, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* : Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype . Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(7):2753-9.
156. Lehtopolku M, Kotilainen P, Haanperä-Heikkinen M, Nakari U-M, Hänninen M-L, Huovinen P, et al. Ribosomal mutations as the main cause of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(12):5939–41.
157. Hao H, Yuan Z, Shen Z, Han J, Sahin O, Liu P, et al. Mutational and transcriptomic changes involved in the development of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(3):1369–78.
158. Ohno H, Wachino J. A highly macrolide-resistant *Campylobacter jejuni* strain with rare A2074T mutations in 23S rRNA genes. Antimicrob Agents Chemother. 2016. 25; 60(4):2580-1.
159. Boer P De, Duim B, Rigter A, Plas J Van Der, Jacobs-reitsma WF, Wagenaar J. Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 2000; 38(5):1940-6.
160. Leblanc-Maridor M, Denis M, Chidaine B, Rossero A, Seegers H, Beaudeau F, et al. Genetic instability of *Campylobacter coli* in the digestive tract of experimentally infected pigs. Vet Microbiol. 2011; 154(1–2):171–9.
161. Michaud S, Ménard S, Arbeit RD. Role of real-time molecular typing in the surveillance of *Campylobacter* enteritis and comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles from chicken and human isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43(3):1105-11.
162. Harrington CS, Thomson-carter FM, Carter PE. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni* : implications for the flagellin gene typing scheme. J Clin Microbiol. 1997; 35(9):2386–92.

163. O'Leary AM, Whyte P, Madden RH, Cormican M, Moore JE, Mc Namara E, et al. Pulsed field gel electrophoresis typing of human and retail foodstuff *Campylobacters*: an Irish perspective. *Food Microbiol.* 2011; 28(3):426–33.
164. Gilpin B, Robson B, Lin S, Scholes P, On S. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of more than one clinical isolate of *Campylobacter* spp. from each of 49 patients in New Zealand. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(2):457–9.
165. Kovač J, Čadež N, Stessl B, Stingl K, Gruntar I, Ocepek M, et al. High genetic similarity of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* in central Europe. *Front Microbiol.* 2015; 6:1–7.
166. Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Eampokalap B, Chaicumpa W, et al. Isolation and characterization of *Campylobacter* strains from diarrheal patients in Bangkok and its suburb in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2015; 68(3):209-15