

Descripción de un brote de gastroenteritis por *Campylobacter jejuni* y caracterización molecular de la cepa implicada

Juan Carlos Sanz^a, Rosa de los Ríos^b, José Antonio López-Portolés^c, José Antonio Taveira^b, Cristina Simón^c y María Aurora Echeita^c

^aLaboratorio Regional de Salud Pública. Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. ^bServicio de Salud Pública del Área 4. Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid. ^cLaboratorio de *Campylobacter*. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. El objetivo de este trabajo es describir el estudio de un brote de diarrea por *Campylobacter jejuni* en una escuela infantil.

MÉTODOS. Se obtuvieron coprocultivos en 5 pacientes. La tipificación molecular se realizó mediante (RFLP-PCR *flaA*), electroforesis en campo pulsante (PFGE) y secuenciación de genes metabólicos (MLST).

RESULTADOS. Se aisló *Campylobacter jejuni* en los 5 enfermos. Sólo pudieron recuperarse para la tipificación 2 cepas. La tipificación mediante los 3 métodos resultó indistinguible en ambos aislamientos.

CONCLUSIÓN. Estos resultados sugieren una identidad común de la cepa causal.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*. Brote. Investigación epidemiológica. Tipificación molecular.

Description of an outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis and molecular characterization of the implicated strain

INTRODUCTION. The aim of this study is to describe an outbreak of diarrhea caused by *Campylobacter jejuni* in a primary school.

METHODS. Stool samples from five patients were cultured. Molecular typing of the isolated strains was performed using PCR-RFLP-*flaA*, PFGE and MLST.

RESULTS. *Campylobacter jejuni* was isolated from all five patients. Two of the five strains were available for typing. The DNA patterns of the two isolates were indistinguishable.

CONCLUSION. The results suggest that the causal strain had a common identity.

Key words: *Campylobacter jejuni*. Outbreak. Epidemiological investigation. Molecular typing.

Correspondencia: Dr. J.C. Sanz.
Laboratorio Regional de Salud Pública.
General Orta, 15. 28006 Madrid. España.
Correo electrónico: juan.sanz@madrid.org

Manuscrito recibido el 17-2-2005; aceptado el 13-4-2005.

Introducción

Campylobacter constituye, junto con *Salmonella* la principal causa de diarrea bacteriana en países desarrollados. Este microorganismo se transmite generalmente a través de alimentos de origen animal como aves de corral¹. Otros vehículos de transmisión pueden ser los vegetales contaminados de forma cruzada a partir de productos cárnicos². Los cuadros de gastroenteritis por *Campylobacter* suelen presentarse como casos aislados. No obstante, esporádicamente pueden surgir brotes³. El objetivo de este estudio es describir un brote de diarrea por *Campylobacter jejuni* en el que, además de los marcadores fenotípicos de serotipificación y determinación del patrón de resistencias, se realizó una tipificación molecular mediante análisis de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por el análisis de los fragmentos de restricción PCR (RFLP-PCR *flaA*), análisis del ADN cromosómico mediante digestión con las enzimas de restricción *SmaI* y *KpnI* de baja frecuencia de corte y electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE) y análisis de las secuencias de diversos genes implicados en el metabolismo general de la bacteria (MLST).

Materiales y métodos

Ante la notificación en junio de 2001 de varios casos de gastroenteritis entre los alumnos de una escuela de educación infantil de Madrid se inició una investigación epidemiológica bajo la sospecha de un brote. Se realizó un estudio de cohortes retrospectivo de los alumnos (54 niños). Se definió como caso a todo alumno que hubiera presentado diarrea o vómitos entre el 28 de mayo y el 4 de junio. No se lograron recuperar para su estudio microbiológico muestras de los alimentos incluidos en los menús de la escuela durante ese periodo. Se obtuvieron 5 muestras de heces de 5 pacientes en las que se realizaron coprocultivos siguiendo una metodología estándar. Las cepas se conservaron congeladas a -20 °C hasta su caracterización fenotípica y genotípica. La concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a eritromicina, ciprofloxacino, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina se determinó por el método de E-test (Biodisk). La serotipificación se llevó a cabo mediante hemaglutinación pasiva. La caracterización mediante RFLP-PCR se realizó amplificando el gen *flaA* siguiendo el protocolo propuesto por CampyNet⁴. Los amplificados de ADN se digirieron con la enzima de restricción *DdeI* (Roche). La tipificación mediante PFGE se efectuó según el protocolo impulsado por el Center for Disease Control and Prevention (CDC)⁵ empleando por separado las enzimas de restricción *SmaI* y *KpnI* (Takara). En la realización del MLST se siguió el protocolo propuesto por www.mlst.net. Cada uno de los 7 genes estudiados (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* y *uncA*) fue amplificado por PCR utilizando los iniciadores recomendados en <http://pubmlst.org/campylo>

bacter/mlst-info/cjeuni/primers.htm y a continuación secuenciado en ambas direcciones.

Resultados

Se identificaron 16 casos de gastroenteritis, todos entre alumnos que habían hecho uso del comedor escolar, por lo que la tasa de ataque en expuestos fue del 34,8% (16/46). La edad de los afectados oscilaba entre los 2 y los 3 años. El 43,8% de los casos eran varones. La sintomatología fue diarrea (100%), dolor abdominal (62,5%), fiebre (56,3%), emisión de moco y sangre en heces (25%), vómitos (25%), náuseas (12,5%) y cefalea (6,3%). La duración de los síntomas varió entre 1 y 3 días. Todos los pacientes evolucionaron favorablemente con tratamiento sintomático y sin necesidad de hospitalización.

Al comparar los alumnos que almorzaron en el comedor escolar la semana del 28 de mayo al 1 de junio (46 expuestos) respecto a los que no lo hicieron (8 no expuestos), se estimó un riesgo relativo 3,54 veces superior de padecer gastroenteritis en los expuestos (IC 95%: 0,53-23,64). Para establecer el día más probable en el que se consumió el alimento posiblemente implicado, se tuvo en cuenta la curva epidémica (fig. 1) analizando las fechas de inicio de síntomas del primer y último caso y el rango del período de incubación típico para *Campylobacter* (2-5 días). Se estableció como fecha más probable el día 30 de mayo; en este día el

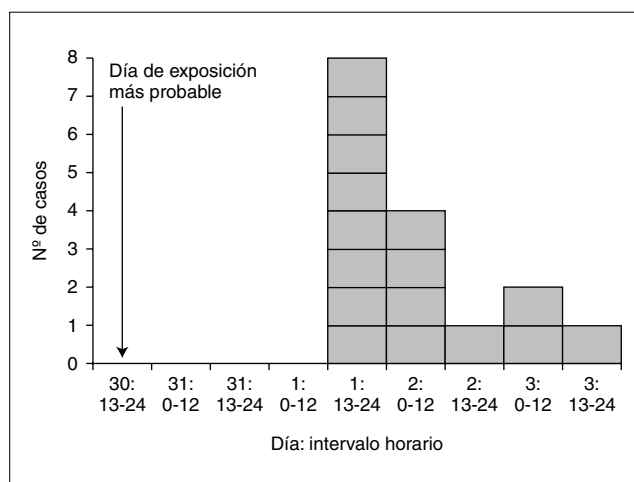


Figura 1. Curva epidémica. Distribución de los casos según fecha de inicio de los síntomas. Brote por *Campylobacter jejuni*.

TABLA 1. Resultados de la tipificación molecular de las 2 cepas estudiadas

RFLP*	PFGE*		MLS7T**						
<i>flaA</i>	<i>SmaI</i>	<i>KpnI</i>	<i>AspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>
22	51	56	7	17	2	15	74	3	12

*Numeración de genotipos según la base de datos del Laboratorio de *Campylobacter* (Centro Nacional de Microbiología).

**Numeración correspondiente a los perfiles multialélicos según la base de datos www.mlst.net

RFLP-PCR: análisis de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por PCR; PFGE: electroforesis en campo pulsante; MLST: secuenciación de genes implicados en el metabolismo general de la bacteria.

menú común consistió en crema de zanahorias, pollo asado y fruta. El coprocultivo demostró la presencia de *C. jejuni* en las 5 muestras de los 5 enfermos estudiados. Tras la congelación sólo pudieron recuperarse para su tipificación dos de estas cepas. Ambos aislamientos, pertenecían al serotipo Penner 37 y mostraron un perfil antibiótico similar (resistencia a ciprofloxacino y a amoxicilina y sensibilidad frente a eritromicina, amoxicilina-ácido clavulánico, gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina). La tipificación molecular mediante los 3 métodos empleados mostró una identidad común para las 2 cepas estudiadas (tabla 1).

Discusión

A diferencia de otras bacterias como *Salmonella* spp., las características de *C. jejuni* (desarrollo microaerófilico y termofílico) dificultan su multiplicación en alimentos cocinados. En ocasiones se ha relacionado la manipulación y el troceado de carne de pollo con la posibilidad de contaminación cruzada³. Aunque son pocos los brotes en los que se ha encontrado una asociación con manipuladores enfermos esta posibilidad existe⁶. En este brote la detección de casos sólo entre los alumnos expuestos a la comida servida en el comedor escolar permitió estimar el riesgo relativo con respecto a los no expuestos. Sin embargo, debido al reducido número de alumnos no expuestos, no se logró establecer una diferencia estadísticamente significativa. Por otra parte, no se consiguieron obtener restos de alimentos para su estudio microbiológico. Tampoco se dispuso de información clínica (antecedentes de gastroenteritis) concerniente a los manipuladores de alimentos del comedor escolar y sólo fue posible señalar alimentos sospechosos sin poder descartar alguna forma de contaminación cruzada. No obstante, el antecedente de ingesta de pollo en un período compatible con el de incubación podría apuntar a este alimento como la fuente de la infección. La evolución de la enfermedad fue autolimitada y en ningún caso se administró tratamiento específico.

Existen diferentes esquemas de serotipificación de *Campylobacter*. Sin embargo, estos procedimientos no son demasiado discriminatorios y no todas las cepas son tipificables⁷. En la actualidad las técnicas más empleadas para la tipificación de *Campylobacter* son RFLP-PCR *flaA* y PFGE⁸. Esta última se ha mostrado muy útil en la investigación de brotes⁸ y ha sido propuesta como el método estándar para tipificación de *Campylobacter* spp.⁹. Una alternativa radica en el uso combinado de varios métodos, preferentemente uno que explore un único locus con otro que determine múltiples loci del genoma. En este sentido la utilización combinada de RFLP-PCR *flaA* con MLST aporta una discriminación equivalente a PFGE. La evaluación de estos marcadores en cepas españolas procedentes de casos esporádicos ha revelado que los tres presentan un alto índice de discriminación¹⁰. En este estudio sólo fue posible recuperar, para la realización de estudios fenotípicos y genotípicos, 2 cepas de 2 pacientes distintos. Estos 2 aislamientos presentaron el mismo serotipo y patrón antibiótico y mostraron idénticos perfiles mediante RFLP-PCR *flaA*, PFGE y MLST (este último perfil multialélico resultó único en la base de datos del laboratorio de *Campylobacter* del Centro Nacional de Microbiología). Considerando el alto poder de discriminación de estos

tres procedimientos, los resultados revelan una identidad común para ambas cepas.

Bibliografía

1. Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, et al. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis*. 2004;38 Suppl 3:285-96.
2. Bean NH, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. *MMWR CDC Surveill Summ*. 1996;25;45:1-66.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food-Oklahoma, 1996. *JAMA*. 1998;279:1341.
4. Harrington CS, Morán L, Ridley AM, Newell DG, Madden RH. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol*. 2003;95:1321-33.
5. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:382-9.
6. Olsen SJ, Hansen GR, Bartlett L, Fitzgerald C, Sonder A, Manjrekar R, et al. An outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with food handler contamination: the use of pulsed-field gel electrophoresis. *J Infect Dis*. 2001;183:164-7.
7. Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SL. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3800-10.
8. Llovo J, Mateo E, Muñoz A, Urquijo M, On SL, Fernández-Astorga A. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* isolates involved in a neonatal outbreak indicates nosocomial transmission. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3926-8.
9. Takkinen J, Ammon A. The 11th international workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related Organisms (CHRO), 2001. *Euro Surveill*. 2003;8:219-22.
10. López-Portolés JA, Galiano JV, Sanz JC, Simón C, Echeita A. Evaluation of molecular markers (PFGE, PCR-RFLP-flaA, MLST and PCR-RFLP-LG) in Spanish *C. jejuni* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11 Suppl 2:182.