





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Estructura poblacional
y mecanismos de resistencia a antibióticos en
Campylobacter jejuni
aislados en humanos y aves**

Yaidelys Iglesias Torrens

TESIS DOCTORAL



**Directores
Dr. Ferran Navarro
Dr. Elisenda Miró**

**Departamento Genética y Microbiología
Facultad de Biociencias.
Barcelona, Julio 2018**

UAB
**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Universitat Autònoma
de Barcelona

**Estructura poblacional y mecanismos de resistencia a
antibióticos en *Campylobacter jejuni* aislados en
humanos y aves**

Tesis doctoral

Yaidelys Iglesias Torrens

Directores

Dr. Ferran Navarro

Dra. Elisenda Miró



Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biociencias

Barcelona,

Junio, 2018



Universitat Autònoma
de Barcelona

**Estructura poblacional y mecanismos de resistencia a
antibióticos en *Campylobacter jejuni* aislados en
humanos y aves**

Tesis doctoral presentada **por Yaidelys Iglesias Torrens** para optar al grado de doctor en Ciencias en el programa de Doctorado de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universidad Autònoma de Barcelona bajo la dirección de los doctores en ciencias **Dr. Ferran Navarro** y **Dra. Elisenda Miró** y la tutoría del **Dr. Ferran Navarro**.

Barcelona, 2018

El **Dr. Ferran Navarro Risueño**, facultativo adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y profesor asociado del Departamento de Microbiología y Genética de la facultad de biociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona como director y tutor de la tesis y la **Dra. Elisenda Miró Cardona**, técnico de laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau como directora de la tesis

Certifican que:

La memoria titulada “Estructura poblacional y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Campylobacter jejuni* aislados en humanos y aves” presentada por **Yaidelys Iglesias Torrens** para obtener el grado de doctor en Microbiología, se ha realizado bajo sus direcciones y tutoría.

Para que así conste, y para los efectos oportunos firman el presente documento en Barcelona, 22 de junio de 2018.

Dr. Ferran Navarro Risueño

Dra. Elisenda Miró Cardona

Director y tutor

Directora

Yaidelys Iglesias Torrens

Doctoranda

A mi familia

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos tres años de trabajo duro, adaptaciones rápidas, de manera muy brusca y contando solo con un pedacito de mi familia cerca, quisiera agradecer a:

Mis directores de tesis, el Dr. Ferran Navarro y la Dra. Elisenda Miró, por el conocimiento brindado y el tiempo dedicado a mi aprendizaje así como por lograr que acogiera con vivo interés el fascinante mundo de la biología molecular. Además de brindarme siempre su ayuda en todos los aspectos, tanto en la parte laboral con las revisiones, las ideas nuevas, las líneas para siempre ampliar y desarrollar la investigación en curso, así como las tantas correcciones en todos los documentos presentados para lograr siempre el mejor de los resultados. También gracias por ayudarme en el aspecto personal, ya que vivieron conmigo los buenos y malos momentos, siempre dándome apoyo y mucho ánimo.

Al jefe del Servicio de Microbiología, el Dr. Pere Coll, por su ayuda en todas las sesiones investigativas, donde con su amplio conocimiento siempre me incitaba a una mejor preparación.

Al Dr. Carlos Balsalobre y la Dr. Cristina Madrid del Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la UB, por permitirme ser parte del proyecto y ayudarme siempre en los documentos que enviábamos a congresos y a revistas para publicación, mostrando una detallada y constructiva revisión.

A Carmen Muñoz, por ser parte del proyecto y siempre ayudarme en las revisiones de los documentos enviados a congresos y el interés mostrado por el curso de la investigación. También le agradezco por haberme acogido durante semanas en la lectura de copros en el laboratorio de microbiología, lo cual hacía siempre con una sonrisa.

A Teresa Llovet, por su tiempo dedicado en enseñarme en la elaboración de los antibiogramas, la diferenciación de especies en *Campylobacter* y por haberme brindado serenidad y fe en que los cultivos crecerían hasta el último momento.

También quisiera agradecer a los chicos del laboratorio de enfermedades infecciosas del ISS, Roma, Italia; en especial a la Dr. Ida Luzzi por aceptar mi estancia y a la Dr. Alesandra Carattoli, la cual se responsabilizó de mi estancia al retiro de Ida. Agradecer a Aurora, mi apoyo en el idioma, en lo personal y en lo laboral durante mi paso por el ISS, que a pesar de sus pocas horas de contrato siempre buscaba un hueco para explicarme procedimientos, responder mis inquietudes y enseñarme cuanta técnica o

procedimiento me podría servir para el futuro. A Saverio, por enseñarme el mundo de la serotipificación de *Salmonella* y hablarme en italiano siempre, aunque no lo entendiera. También agradecer a Ana María, Ildo, Claudia, Sergi, Laura y Daniela.

A Maria Josep Mas, del departamento de Gestión de Microbiología de la UAB, por apoyarme desde que estaba en Cuba, y aún sin conocerme, me brindó su apoyo, información y solidaridad.

A Alba Rivera por ayudarme con el lector de placas cuando este se cansaba de mis tantas lecturas, además de enseñarme tanto de antibióticos y estar siempre dispuesta a ayudarme en las nuevas técnicas que se nos ocurrían.

También agradecer a Pedro Girado, de la UB, del cual necesité su ayuda en cuanto a la colección de cepas y nunca dudó en brindármela. Además, agradecer a todo el personal de rutina de microbiología del Hospital Sant Pau, los cuales me ayudaron en mi paso por sus instalaciones.

También quisiera agradecer a mis compis del Pavellón 17!!! Los que han vivido cada día conmigo mis resultados, frustraciones, logros y parte importante de mi vida personal, como lo fue mi boda.

Gracias a Paula, Ely, Laura, Montse, Ana, Marc, Judith y Alba por esa increíble, cálida y divertida despedida de soltera, por los regalos, los pica picas compartidos, las salidas a comer churros con chocolates, a las comidas de fin de navidad y a las sobremesas de cada día después de comer.

Gracias a mi amiga Paula, con la cual me sentí identificada desde el inicio, por ser de mi misma zona, por brindarme siempre su apoyo, consejos y amistad sobretodo. Por darme siempre una palabra de apoyo en los momentos difíciles y además por haber tenido la suerte de contar con su compañía en Italia, donde las dos nos sentíamos solas en un país ajeno.

Gracias a Ely, que siempre la molestaba al llegar al laboratorio, sobre las 8 de la mañana, allí compartíamos momentos de trabajo, de la vida y de sueños que ya hoy se han hecho realidad.

Gracias a Montse, mi compañera después de las 18 horas en el laboratorio, por su incondicional ayuda con cualquier técnica, equipo, material, ordenador y por sentarse

siempre a mi lado a la hora de comer, por estar dispuesta en todo momento a brindarme su apoyo.

Gracias a Laurita, que me enseñó todo desde que llegué, los procedimientos, las mañan con los equipos, además de estar siempre al tanto de los primeros resultados. También agradecerle por sus conversaciones conmigo y sus chistes locos y graciosos.

Gracias a Marc, por ayudarme tanto con Bionumerics al inicio de todo, por su disposición siempre.

Gracias a Ana, por su nobleza y sinceridad ante todo.

Gracias a Alba, por los momentos compartidos en el laboratorio y fuera de él en las salidas del grupo.

Gracias a Judith, por sus ocurrencias a la hora de comer y hacer amena la tarde.

También quiero agradecer a mi amigo Tomás, sin su apoyo no hubiese sido posible continuar esta carrera de tantos obstáculos. Siempre con un mensaje de ánimo desde la distancia, fue una de las gotas que tanto me ayudó a seguir hacia delante.

Por último y no menos importante a mi familia, a mi hermano por sus consejos, apoyo y por hacer que no me sintiera sola ni desamparada. A mi cuñada, por la inmensa ayuda brindada en todos los sectores, haciéndome partícipe de su casa como otra hermana más. A mi bella sobrina, tan dulce y noble, la cual cada día me esperaba detrás de la puerta con una sonrisa y un abrazo para su *tita yaide*. Gracias por permitirme formar parte de sus vidas durante casi tres años.

A mis padres, que aunque estén en Cuba siempre han estado a mi lado, con su corazón y pensamiento, al tanto de cada detalle, siempre con palabras de ánimos y con la esperanza más vigente y firme que la mía propia.

Termino agradeciendo a la persona que empezó este duro proceso siendo mi novio, el cual ahora es mi esposo y sin el cual no hubiese tenido fuerzas para seguir. Desde la distancia fue mi motor impulsor, mi amigo, mi confidente, mi consejero, siempre con palabras de apoyo aunque la situación se tornara difícil. Gracias amor, por nunca cansarte de mis coletillas durante los primeros meses en España. Convencida estoy que juntos lograremos más cosas de lo que hasta ahora hemos logrado.

Este estudio fue financiado por el Instituto de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (otorgado AGL2013-45339R).

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
SUMMARY	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El género <i>Campylobacter</i>	3
1.1.1 Taxonomía	3
1.1.2 Características Generales	3
1.1.3 Identificación	5
1.2. Campilobacteriosis	6
1.2.1 Infecciones causadas por especies de <i>Campylobacter</i>	6
1.2.2 Epidemiología de la campilobacteriosis	7
1.2.3 Reservorios	9
1.2.4 Vías de transmisión	13
1.2.5 Factores de virulencia asociados a <i>Campylobacter</i>	14
1.3. Tratamiento de las gastroenteritis provocadas por <i>Campylobacter</i> . Papel de los antimicrobianos en la cadena de producción alimentaria	19
1.4. Epidemiología molecular de <i>Campylobacter</i>	21
1.5. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>Campylobacter</i>	25
1.5.1 Betalactámicos	28
1.5.2 Tetraciclinas	31
1.5.3 Quinolonas	32
1.5.4 Aminoglucósidos	34
1.5.5 Macrólidos	36
1.5.6 Fenicoles	37
1.5.7 Fosfomicina	39
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos específicos	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Cepas del estudio	47
3.1.1 Aislamiento e identificación	48

3.2. Estudio de la sensibilidad	48
3.3. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	49
3.3.1 Preparación de insertos, lisis y lavado	51
3.3.2 Digestión con enzimas de baja frecuencia de corte, condiciones de corrida del gel de electroforesis.....	52
3.3.3 Tinción, visualización y análisis	53
3.4. <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	53
3.4.1 Extracción del ADN genómico	54
3.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	54
3.4.3 Purificación y secuenciación de los amplificados.....	57
3.4.4 Análisis de datos.....	58
3.5. Detección molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos	58
3.5.1 Detección de genes de resistencia mediante PCR.....	58
3.5.2 Localización de los genes de resistencia	58
3.5.2.1 PFGE con endonucleasa S1	58
3.5.2.2 Transferencia e hibridación	63
3.6. <i>Whole genome sequence</i> (WGS)	67
3.7. Análisis estadístico	73
4. RESULTADOS	75
4.1 Cepas de estudio	77
4.2. Determinación de la relación clonal y filogenética entre las cepas de <i>C. jejuni</i> obtenidas de los tres ámbitos de estudio	78
4.2.1 Análisis de la clonalidad mediante la técnica de campo pulsado (PFGE)	78
4.2.2 Análisis de la estructura poblacional mediante la técnica de MLST	84
4.3. Perfil de sensibilidad y detección de genes de resistencia a antibióticos en muestras aisladas de humanos, pollos y aves salvajes.....	91
4.3.1 Estudio de la sensibilidad antimicrobiana.....	91
4.3.2 Detección de los mecanismos de resistencia.....	95
4.3.2.1 Resistencia a ampicilina	95
4.3.2.2. Resistencia a tetraciclina	98
4.3.2.3 Resistencia a aminoglucósidos	100
4.3.2.4 Resistencia a quinolonas.....	101
4.4. Secuenciación masiva (WGS) en una selección de cepas aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes	102

4.4.1 Resistencia a antibióticos	109
4.4.2 Identificación de plásmidos y genes de virulencia mediante las web <i>PlasmidFinder</i> , <i>VirulenceFinder</i> y <i>vfdb</i> respectivamente	114
4.4.3 Comparación de los resultados entre las técnicas convencionales y el <i>WGS</i>	115
5. DISCUSIÓN.....	119
6. CONCLUSIONES.....	141
6. CONCLUSIONS	145
7. REFERENCIAS	149
8. ANEXOS.....	179
Anexo 1: Características de las cepas aisladas de muestras de pacientes atendidos en el Hospital de la Santa Creu I Sant Pau en el año 2014 según la edad y el género. .	181
Anexo 2: Características de las cepas aisladas de muestras de pollos según su ubicación en granjas y lugar de procesamiento.	182
Anexo 3: Características de las cepas aisladas de muestras de aves salvajes según la especie y el sitio de aislamiento.....	183
Anexo 4: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE Sma-KpnI de las cepas aisladas de muestras de humanos.	184
Anexo 5: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE Sma-KpnI de las cepas aisladas de muestras de pollos.	185
Anexo 6: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE Sma-KpnI de las cepas aisladas de muestras de aves salvajes.	186
Anexo 7: Population structure, antimicrobial resistance and virulence-associated genes in <i>Campylobacter jejuni</i> isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers and wild birds.	187

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos incluidos en este estudio.
- Tabla 2:** Mecanismos de resistencia a antibióticos descritos en cepas de *C. jejuni* y genes involucrados.
- Tabla 3:** Antibióticos testados por difusión en agar mediante la técnica de disco difusión y puntos de cortes según los criterios de CLSI y EUCAST.
- Tabla 4:** Relación de cebadores utilizados para la amplificación por PCR-*MLST* según pubMLST.org/campylobacter/
- Tabla 5:** Relación de cebadores utilizados para la reacción de secuenciación de los siete genes *housekeeping* según pubMLST.org/campylobacter/
- Tabla 6:** Mecanismos de resistencia a antibiótico estudiados.
- Tabla 7:** Relación de cebadores utilizados en el estudio.
- Tabla 8:** Reactivos utilizados en el kit DIG para la realización de las sondas.
- Tabla 9:** Cepas analizadas por *WGS*.
- Tabla 10:** Clones presentes en las 146 cepas digeridas con la enzima *SmaI* y con la combinación de las enzimas *SmaI-KpnI*.
- Tabla 11:** Distribución de secuencia tipo (ST) y complejos clonales por cada población estudiada.
- Tabla 12:** Relación de secuencias tipos (ST), complejo clonal y *Singletons* (S) según la procedencia de las muestras aisladas de ciego de pollo.
- Tabla 13:** Relación de secuencias tipos (ST), complejo clonal y *Singletons* (S) según la procedencia de las muestras aisladas de aves salvajes.
- Tabla 14:** Frecuencia de los distintos perfiles de sensibilidad encontrados en las 150 cepas de *C. jejuni*.
- Tabla 15:** Complejos clonales, Secuencias tipos (ST), *Singletons* y perfil de resistencia a antibióticos en las 150 cepas aisladas de muestras de humanos, de pollos y de aves salvajes.
- Tabla 16:** Frecuencia del gen *bla_{OXA}* en las 150 cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos (H), pollos (B) y aves salvajes (W).
- Tabla 17:** Presencia de los genes *tetO* y *tetA* en las 50 cepas de *C. jejuni* aisladas de aves salvajes.
- Tabla 18:** Localización del gen *tetO* en las cepas de *C. jejuni* aisladas de humanos y aves salvajes.
- Tabla 19:** Presencia de los genes *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia* en cepas de *C. jejuni* resistentes a aminoglucósidos.
- Tabla 20:** Parámetros de calidad obtenidos en las cepas analizadas mediante *WGS*.
- Tabla 21:** Diferencias en la numeración de los alelos y ST al comparar los resultados obtenidos de la técnica de *MLST* convencional con los obtenidos mediante *WGS*, los cuales se analizaron a través de la utilización del software BioNumerics v7.6.3.

- Tabla 22:** Distancia genética obtenida por *WGS*.
- Tabla 23:** Relación de genes de resistencia adquiridos identificados mediante *ResFinder*.
- Tabla 24:** Cepas con genes de resistencia a antibióticos identificados mediante *ResFinder* y discrepantes a las identificadas o no mediante PCR.
- Tabla 25:** Mecanismos de resistencia a antimicrobianos detectados por *ResFinder* mediante *WGS*.
- Tabla 26:** Genes de virulencia identificados mediante la web *VirulenceFinder* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>).
- Tabla 27:** Número de cepas que concuerdan o no en la información resultante de las técnicas convencionales y la obtenida mediante la utilización de la información de todo el genoma.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Microscopía electrónica de *C. jejuni*.
- Figura 2:** Incidencia y prevalencia de campylobacteriosis provocado por *C. jejuni/C. coli*.
- Figura 3:** Vías de transmisión y reservorios de *Campylobacter spp.*
- Figura 4:** Interacción de la célula con algunos factores de patogenicidad presentes en cepas de *C. jejuni*.
- Figura 5:** Flujo de procesos dentro de la técnica de transferencia e hibridación.
- Figura 6:** Flujo de trabajo de la técnica de *WGS*.
- Figura 7:** Dendograma de los patrones de *SmaI* de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes.
- Figura 8:** Dendograma de los patrones de *Sma* y *KpnI* de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes.
- Figura 9:** Distribución de complejos clonales según la edad de los pacientes que sufrieron gastroenteritis
- Figura 10:** Diagrama de Venn y *Minimum spannig tree* según la distribución de las tres poblaciones del estudio.
- Figura 11:** Perfil de resistencia a antibióticos en las cepas de *C. jejuni* estudiadas.
- Figura 12:** Alineamiento de las secuencias *bla_{OXA-61}* (H01) y *bla_{OXA-184}* (W09).
- Figura 13:** PFGE-S1 hibridación con sonda *tetO* de algunas de las cepas de *C. jejuni* aisladas digeridas con la enzima S1.
- Figura 14:** PFGE-S1 hibridación con sondas *aph(3')-IIIa* (A) y *ant(6)-Ia* (B) en cepas resistentes a aminoglucósidos digeridas con la enzima S1.
- Figura 15:** Agrupación de las 48 cepas analizadas mediante *WGS*.
- Figura 16:** *Minimum Spanning Tree* de las 48 cepas estudiadas.

ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
AMC:	amoxicilina-ácido clavulánico
AME:	enzimas modificadoras de aminoglucósidos
AMP:	ampicilina
APC:	antimicrobiano promotor del crecimiento
<i>aspA:</i>	aspartasa
ASPB:	Agencia de Salud Pública de Barcelona
ATB:	antimicrobiano
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLEE:	Betalactamasas de Espectro Extendido
CDC:	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CDT:	citotoxinas de distension
CFA:	Campy Food Agar
CGE:	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
<i>cgMLST:</i>	<i>core genome MLST</i>
CHL:	cloranfenicol
CIP:	ciprofloxacina
CLSI:	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
CReSA:	Centro de Investigación de Salud Animal
dNTP:	Deoxynucleotide tri-phosphate
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
ERY:	eritromicina
EUCAST:	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FOS:	fosfomicina
G:	gentamicina
<i>glnA:</i>	glutamina sintetasa
<i>gltA:</i>	citrato sintetasa
<i>glyA:</i>	serina hidrometil transferasa
IMP:	imipenem
K:	kanamicina
LOS:	lipooligosacáridos
mCCDA:	<i>modified Charcoal Cefoperaxone Deoxycholate Agar</i>
MDR:	multidrogorresistencia
MLST:	<i>MultiLocus Sequence Typing</i>
MST:	<i>Minimum spanning tree</i>
NAL:	ácido nalidixico
NGS:	<i>Next Generation Sequencing</i>
NTA:	<i>Non-therapeutical antimicrobial</i>
ORF:	<i>Open Reading Frame</i>
PBP:	<i>Penicillin binding proteins</i>

PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PFGE:	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
<i>pgm:</i>	fosfoglucomutasa
PRA:	perfil de resistencia antimicrobiana
QRDR:	<i>quinolone-resistance determining region</i>
RND:	<i>resistance nodulation-cell division</i>
RPP:	<i>ribosomal protection protein</i>
S:	estreptomicina
<i>S:</i>	<i>Singletons</i>
ST:	Secuencia Tipo
TA:	temperatura de hibridación
TBE:	Tris-Borate-EDTA
TET:	tetraciclina
<i>tkt:</i>	Transcetolasa
UE:	Unión Europea
<i>uncA:</i>	subunidad alfa de la ATP sintasa
<i>wgMLST:</i>	<i>whole genome MLST</i>
<i>WGS:</i>	<i>Whole Genome Sequencing</i>

RESUMEN

Campylobacter jejuni es considerado uno de los principales patógenos que causan gastroenteritis, sobre todo en países industrializados. Para el control de las infecciones causadas por este patógeno y debido a la prevalencia de las cepas multirresistentes, las cuales están aumentando, se precisa un seguimiento de los clones predominantes, pues algunos de ellos están relacionadas con la multiresistencia antibiótica. Es por ello que en nuestro estudio, a partir de 150 cepas aisladas de muestras humanas, pollos de engorde y aves salvajes, se definieron los siguientes objetivos: determinar la estructura poblacional mediante el campo pulsado (PFGE) y *multilocus sequence typing* (MLST); determinar la sensibilidad de estas cepas a diferentes antibióticos mediante la técnica de disco-difusión y detectar los mecanismos de resistencia descritos para estos antimicrobianos mediante PCR y secuenciación Sanger. Además, se evaluó la técnica de secuenciación masiva (*WGS*), a partir de la selección de 48 cepas, como técnica substitutiva de las mencionadas anteriormente.

Los resultados de PFGE muestran una gran diversidad clonal. De las 146 cepas estudiadas se obtuvieron 137 pulsotipos, 4 de los cuales representaron clones que incluían entre 2 y 6 cepas. De los 4 clones, sólo se encontraron datos epidemiológicos que relacionaran las cepas en el clon 1, que corresponde a una contaminación de 6 cepas aisladas de pollos de engorde procesados en un mismo matadero.

Mediante el MLST, de las 150 cepas analizadas, se obtuvieron 64 secuencias tipo (ST), agrupadas en 21 complejos clonales y 12 *singletons*. En este estudio, se describieron por primera vez cinco nuevos alelos (*glnA*-619; *gltA*-526; *glyA*-690; *pgm*-859 y *uncA*-544), todos pertenecientes a la cepa W53, y seis nuevas secuencias tipos: ST-8479 en humanos, ST-8498 en pollos, y ST-8511, ST-8512, ST-8513 y ST-8514 en aves salvajes.

De las 64 secuencias tipo, 16 fueron exclusivamente encontradas en muestras aisladas de humanos, 14 en pollos y 21 en aves salvajes. Además, diez ST se identificaron en las cepas aisladas tanto de muestras de humanos como de pollos, y sólo tres fueron coincidentes en las tres poblaciones (ST-45, ST-48 y ST-354). Los ST más prevalentes (ST-21, ST-206, ST-353 y ST-607) fueron los identificados en las cepas aisladas de muestras de humanos y de pollos, mientras que los ST identificados en la mayoría de las cepas aisladas de aves salvajes (ST-179 y ST-1275) fueron diferentes a los identificados en estas dos poblaciones.

En *C. jejuni* se observó un 71.3% de resistencia a tetraciclina, un 67.3% a ciprofloxacina, un 64.6% a ácido nalidíxico y un 63.3% a ampicilina, así como casos esporádicos de resistencia a aminoglucósidos (7.3%). Las cepas aisladas de pollos fueron las más resistentes (74% a 98%), seguidas de las aisladas de humanos (78%-88%) y de las cepas aisladas de aves salvajes (16% a 36%). La multiresistencia también estuvo presente en un 58.2%, siendo el patrón más frecuentemente encontrado la resistencia a ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina.

El estudio de los mecanismos de resistencia mostró que los respectivos genes de resistencia a tetraciclina y ampicilina: *tetO/tetA* y *bla_{OXA}* no explican el fenotipo de resistencia o sensibilidad encontrado. La resistencia a ciprofloxacina se debe a la mutación Thr86Ile en el gen *gyrA*, y la resistencia a aminoglucósidos fue asociada, en la mayoría de los casos, a la presencia de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME).

Con la utilización de la información obtenida de *WGS* se logró profundizar en las relaciones epidemiológicas, tanto a través del *cgMLST* como del *wgMLST*, logrando establecer puntos de cortes que permitieron clasificar las cepas relacionadas de las no relacionadas epidemiológicamente. También, mediante la utilización de diferentes bases de datos se identificaron genes de resistencia a antibióticos y la presencia de mutaciones puntuales, las cuales en su conjunto nos permitieron confirmar la presencia de estos genes o mutaciones identificadas mediante el análisis por PCR y Secuenciación Sanger.

En conclusión, los datos de este estudio apoyan que la campilobacteriosis es causada en su mayoría por el consumo de carne de pollo contaminada y que la contaminación en este reservorio puede ocurrir, lejos de las granjas, en el manejo, tansportación y procesamiento de la carne en los mataderos. En el caso de las aves salvajes, cada especie presenta una relación específica hospedador y patógeno, y las que habitan cerca de ambientes urbanos o están en contacto estrecho con los humanos pueden actuar como transmisores potenciales de *Campylobacter* al ambiente y provocar la infección en humanos.

SUMMARY

Campylobacter jejuni is considered one of the main pathogens causing gastroenteritis, especially in industrialized countries. In the context of a growing prevalence of antimicrobial multidrug-resistance, the control of infections caused by this pathogen requires a monitoring of the predominant clones. In our study, 150 *C. jejuni* strains isolated from human, broiler and wild bird samples were analyzed as follows: the population structure was determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST); the susceptibility of these strains to different antibiotics was tested using disc-diffusion, and the antimicrobial resistance mechanisms described for these antimicrobials were analyzed by PCR and Sanger sequencing. In addition, Whole Genome Sequencing (WGS) was evaluated as a substitute of the aforementioned techniques on 48 selected strains.

The PFGE results revealed a high clonal diversity. From the 146 analyzed strains, 137 PFGE types were identified, 4 of which represented clones each with between 2 and 6 strains. The epidemiological data obtained, only related the strains of clone 1, which corresponds to a contamination of 6 broilers processed in the same slaughterhouse.

Using MLST, 64 sequences types (STs) were obtained from the 150 analyzed strains and these were grouped into 21 clonal complexes and 12 singletons. Described for the first time in this study 5 new alleles, all belonging to the W53 strain (glnA-619, gltA-526, glyA-690, pgm-859 and uncA-544), and six new STs: ST-8479 in humans, ST-8498 in broilers, and ST-8511, ST-8512, ST-8513 and ST-8514 in wild birds.

Among the 64 STs, 16 were exclusively found in samples isolated from humans, 14 from broilers and 21 from wild birds. In addition, 10 STs were identified in samples isolated from both humans and broilers, and only 3 were found in all three populations (ST-45, ST-48 and ST-354). The most prevalent STs (ST-21, ST-206, ST-353 and ST-607) were identified in strains isolated from human and broiler samples, whereas the most frequently found STs identified in strains from wild birds (ST-179 and ST-1275) were not identified in human and broiler populations.

In the *C. jejuni* isolates, the following resistances were found: 71.3% to tetracycline, 67.3% to ciprofloxacin, 64.6% to nalidixic acid and 63.3% to ampicillin, as well as sporadic cases of aminoglycoside resistance (7.3%). Strains isolated from broilers were the most resistant (74%-98%), followed by those isolated from humans (78%-88%) and

wild birds (16%-36%). Multiresistance was also present in 58.2% of all strains, being the most frequent pattern found, resistance to ampicillin, ciprofloxacin and tetracycline.

The study of resistance mechanisms showed that the respective tetracycline and ampicillin resistance genes: *tetO/tetA* and *bla_{OXA}* do not explain the phenotype of resistance or sensitivity found. Resistance to ciprofloxacin was mainly due to the Thr86Ile mutation in the *gyrA* gene, and resistance to aminoglycosides was associated, in most cases, with the presence of modifying enzymes (AME).

The information obtained from WGS, through both *cgMLST* and *wgMLST*, gave further insight into the epidemiological relationships of the isolated strains, and led to the establishment of cut-off points that allowed the classification of non-epidemiological related strains. Also, the use of different databases enabled the identification of antimicrobial resistance genes and point mutations, thus confirming the presence of genes and mutations identified by PCR-Sanger sequencing.

In conclusion, the data from this study support that campylobacteriosis is caused mostly by the consumption of contaminated broiler meat and that this contamination can occur, far from farms, in the handling, transportation and processing of meat directly in slaughterhouses. In the case of wild birds, each species has a specific host-pathogen relationship, and those that live near to urban environments or are in close contact with humans can act as potential transmitters of *Campylobacter* to the environment and cause infection in humans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Campylobacter*

1.1.1 Taxonomía

Las especies del género *Campylobacter* fueron originalmente asignadas al género *Vibrio*, perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, debido a su aspecto curvado. Y no fue hasta 1965 que se diferenció el género *Campylobacter*, perteneciente a la familia *Spirillaceae*, al comprobar que no utilizaban azúcares y tenían diferente contenido de G+C que el género *Vibrio* (Moore *et al.*, 2005).

Según la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vandamme P *et al.*, 2005) el género *Campylobacter* junto con *Arcobacter*, *Dehalospirillum* y *Sulfurospirillum* está incluido en la familia *Campylobacteraceae*, que unido a las familias *Helicobacteraceae*, *Nautiliaceae* e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden *Campylobacterales* y pertenecen a su vez a la clase *Epsilonproteobacterias*, subgrupo más pequeño de las *Proteobacterias*.

Durante los últimos años la taxonomía del género *Campylobacter* ha sufrido modificaciones y algunas de sus especies han pasado a pertenecer al género *Arcobacter* o *Helicobacter*. En la actualidad, el género *Campylobacter* comprende 38 especies y 16 subespecies (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>), (última actualización mayo 2018) entre las que se incluyen las siguientes especies: *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*. Todas ellas tienen la habilidad de crecer a 37°C. Además, las especies termófilas *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. helveticus* pueden crecer a 42°C. Desde su primera descripción el género *Campylobacter* se ha establecido como uno de los principales patógenos entéricos.

1.1.2 Características Generales

Los miembros del género *Campylobacter* son bacilos delgados, gramnegativos, no esporulados, catalasa y oxidasa positivos y ureasa negativos. Poseen forma curvada de S o en espiral. Cuando los cultivos son viejos o están bajo condiciones de estrés, *Campylobacter* puede adquirir forma cocoide o esférica. Tienen una medida entre 0,2 y 0,8 por 0,5 a 5µm.

Estos microorganismos son quimiorganotrofos, pero en lugar de utilizar las vías oxidativas de carbohidratos o su fermentación, usan aminoácidos y compuestos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como fuente de energía.

Campylobacter es, generalmente, un microorganismo microarófilo y suele crecer a una temperatura de 37°C, aunque algunas especies crecen a 42°C. Dentro del género hay especies aeróbicas como: *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. mucosalis*, *C. showae*, *C. gracilis*, y hasta cierto punto *C. hyointestinalis* y anaeróbicas como *C. fetus* (Carlone and Lascelles, 1982).

El tamaño del genoma de *Campylobacter* es relativamente pequeño, de 1,5 a 2,05Mb y contiene un bajo contenido de G+C, 29-44 %, comparado con el genoma de *Escherichia coli*, por ejemplo, que es de 4,6 Mb y contenido de G+C de 50.54% (Kwon *et al.*, 2017). El pequeño tamaño podría ser una manifestación de su delicada naturaleza, sus exigencias nutricionales y su baja actividad bioquímica (Vandamme P *et al.*, 2005).

Campylobacter jejuni, en particular, posee morfología espiral, oscilando sus dimensiones entre 0,2-0,9 µm de anchura y 0,5-5 µm de longitud (Figura 1).

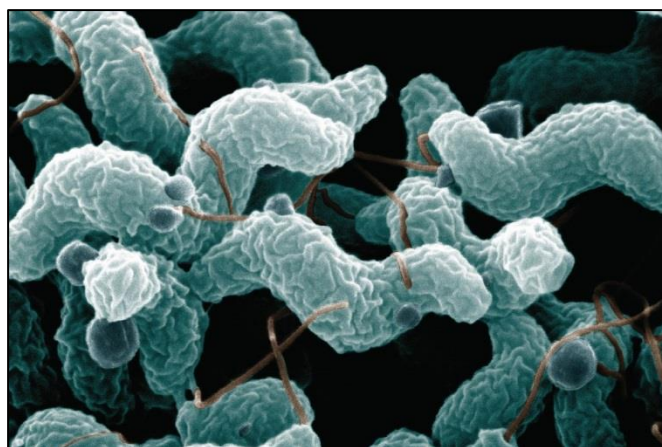


Figura 1. Microscopía electrónica de *C. jejuni*.
(<http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolsandcolleges/Microbial%20Sciences/bacteria-passport/campylobacter-jejuni-1>)

La especie comprende dos subespecies: *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*, las cuales se diferencian en la reducción del nitrito, en la producción de catalasa y en el crecimiento a 42°C (Steele and Owen, 1988). Bajo condiciones de estrés tiene tendencia a adquirir morfología esférica de aproximadamente 1 µm de diámetro. El

cromosoma consiste en una molécula circular simple de ADN con un bajo contenido en G+C (29-30 %). Su genoma posee un tamaño de entre 1,6-1,8 Mb.

C. jejuni es competente (estado en el cual la bacteria es capaz de incorporar ADN exógeno del medio e incorporarlo al cromosoma) naturalmente y tiene un alto índice de recombinación que puede contribuir en la diversidad. Además de naturalmente transformable, también presenta la capacidad de compartir material genético mediante la conjugación (Wang and Taylor, 1990b).

1.1.3 Identificación

La identificación de este patógeno por las técnicas convencionales suele ser difícil incluso en la diferenciación a nivel de especie (García *et al.*, 2011). Las pruebas, basadas en reacciones bioquímicas, son las que han sido utilizadas en la rutina de los laboratorios durante muchos años. Algunas de ellas son la hidrólisis del hipurato, la cual permite discriminar las cepas de *C. jejuni* (positivas) de otras especies de *Campylobacter* (Nakari *et al.*, 2008). También con el desarrollo de los medios de cultivo cromogénicos se ha logrado identificar cepas de *Campylobacter* termófilas, como son *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*. Con el uso del medio cromogénico RAPID' *Campylobacter* Agar (Bio-Rad, Estados Unidos) se pueden identificar estas especies provenientes de muestras alimentarias y ambientales. Este medio selectivo y validado ha sido probado en estudios con cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de pollos con resultados similares al ser comparado con los medios mCCDA (OXOID, Reino Unido) y CFA (bioMérieux, Francia) (Seliwiorstow *et al.*, 2014).

También existen otros kits comerciales no automatizados, como el *API-Campy system* (bioMérieux, Francia). Este es un sistema de identificación miniaturizado, basado en propiedades bioquímicas, que incluye pruebas enzimáticas y convencionales de asimilación e inhibición (Martiny *et al.*, 2010). Otro de estos kits comerciales es el Microgen *Campylobacter* látex (Microgen, Reino Unido) el cual es un kit de aglutinación rápida indicado para la confirmación de las especies identificadas como especies termófilas de *Campylobacter*. Las especies que se pueden tipificar con este kit son las provenientes de muestras de pacientes con sospecha de enteritis bacteriana.

Debido a los grandes avances en la biología molecular se han desarrollado diferentes metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y vertientes de

esta técnica, tales como la *real time*-PCR (Ivanova *et al.*, 2009) y la *multiplex*-PCR (Pavlova *et al.*, 2016) tanto para el diagnóstico directo de muestra clínica como para la identificación de los aislados. Basados en este principio se desarrolló el kit iQ-Check™ *Campylobacter* Kit (Bio-Rad, Estados Unidos), el cual de forma cualitativa, sencilla y rápida permite detectar secuencias específicas de ADN de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* provenientes de muestras de alimentos y del ambiente. También se han desarrollado otras técnicas como la hibridación *in situ* (Poppert *et al.*, 2008) o la combinación de dot-blot-PCR (Fontanot *et al.*, 2014). En 1999, Denis y colaboradores (Denis *et al.*, 1999) desarrollaron una *multiplex* PCR para diferenciar las especies de *C. jejuni* y *C. coli*. El principal beneficio de esta técnica, según sus autores, es la velocidad en la que se pueden diferenciar estas dos especies partiendo de una misma muestra; además de evitar la utilización de pruebas bioquímicas para llegar a la identificación de especie.

Actualmente existen preparados comerciales de detección de *Campylobacter* y otros enteropatógenos directamente de muestras clínica. Estos sistemas tienen la ventaja de ser automatizados y entre ellos se encuentran el *Filmarray* (bioMérieux, Francia), el STAT-dx (QIAGEN, Alemania) y *Seegene*. Estos tipos de sistemas tienen la ventaja de la manipulación rápida y fácil de la muestra, de la homogeneidad en los resultados obtenidos y la existencia de bases de datos, las cuales permiten o facilitan la interpretación de los resultados.

Actualmente, la técnica líder para la identificación de cepas de *Campylobacter* se basa en picos de absorción iónica. Estos son espectros proteicos que son leídos a través de un espectrofotómetro de masa (MALDI-TOF, Bruker Daltonics, Estados Unidos), donde cada cepa tiene un perfil o huella determinado que corresponde a una especie en particular. Esta técnica provee un resultado rápido y preciso de la cepa partiendo solo de un aislado obtenido de las muestras a analizar (Bessede *et al.*, 2011; Lawton *et al.*, 2018).

1.2. Campilobacteriosis

1.2.1 Infecciones causadas por especies de *Campylobacter*

Campylobacter es uno de los principales enteropatógenos responsables de gastroenteritis y, dentro de este género, las principales especies que provocan diarrea o gastroenteritis en humanos son *C. jejuni* y *C. coli*. La infección y el grado de enfermedad dependen de la dosis infectiva. Existen estudios donde se ha comprobado

que para desarrollar la campylobacteriosis es necesario una dosis de 360 UFC/ml (Hara-Kudo and Takatori, 2011). En otros estudios, con cepas aisladas de pacientes infectados, se ha comprobado que el nivel de colonización aumenta con la dosis, no siendo así con la sintomatología y la gravedad de la enfermedad (Johnson *et al.*, 2017).

Los síntomas ocurren generalmente entre las 24 y las 72h después de la ingestión de alimentos contaminados, aunque la enfermedad puede tardar en desarrollarse si se ha ingerido una dosis baja del microorganismo. A pesar de que *C. jejuni* y *C. coli* pueden infectar a humanos de cualquier edad, se ha demostrado que afecta con mayor frecuencia a niños, entre 1 y 5 años, y a adultos jóvenes entre 15 y 24 años (Amour *et al.*, 2016).

Mientras que la gastroenteritis es la principal patología producida por *Campylobacter*, este microorganismo también se asocia, aunque en menor medida, con otros trastornos en el tracto gastrointestinal entre los que se incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, del inglés *Inflammatory Bowel Disease*), enfermedades esofágicas, periodontitis, desórdenes del funcionamiento gastrointestinal, enfermedad celíaca, colecistitis y cáncer de colon (Kaakoush *et al.*, 2015).

Además de las patologías mencionadas, las especies de *Campylobacter* pueden causar infecciones sistémicas tras un episodio de enteritis; desorden inmune post-infección, el síndrome de Guillán-Barré (Hughes *et al.*, 1999), el síndrome de Miller-Fisher (Salloway *et al.*, 1996) y otros cuadros como abscesos cerebrales y meningitis, artritis reactiva, bacteriemia, sepsis, endocarditis y miocarditis; además de manifestaciones clínicas que resultan en complicaciones en el tracto genital (Kaakoush *et al.*, 2015).

1.2.2 Epidemiología de la campilobacteriosis

En general la infección causada por *Campylobacter* es un problema de salud mundial (EFSA-ECDC, 2016). En la última década, se ha evidenciado un incremento de la incidencia de la campilobacteriosis, sobre todo en países de Norte América, Europa y Australia. En países como Argentina, Bolivia, Brazil, Chile y Venezuela constituye un problema de salud y no está debidamente valorado por las autoridades sanitarias (Kaakoush *et al.*, 2015).

En países desarrollados, *Campylobacter* suele ser endémico, las infecciones son generalmente limitadas a niños, y la gravedad decrece con la edad, lo que sugiere que el

desarrollo de la enfermedad a temprana edad puede deberse a no haber desarrollado todavía la inmunidad (Rao *et al.*, 2001). El aislamiento de este patógeno es común en la mayoría de los niños asintomáticos en estos países. En varios estudios, la diferencia en los porcentajes de cepas aisladas de niños portadores asintomáticos y de niños con síntomas, no presenta valores significativamente diferentes (Coker *et al.*, 2002).

Los brotes causados por *Campylobacter* no son frecuentes. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés *Center for Disease Control and Prevention*), define como un brote a la ocurrencia de más casos de los esperados en un área particular o entre un grupo específico de personas durante un período específico de tiempo, usualmente debido a una causa común (<http://www.cdc.gov/mmwr>). Sin embargo, se ha evidenciado que al menos una vez al año se sucede un episodio de campilobacteriosis por cada adulto sano, evento que si no causa síntomas agudos no es notificado. Por lo que los casos de campilobacteriosis que son reportados constituyen una pequeña fracción de los episodios reales ocurridos (Havelaar and Swart, 2016).

En Estados Unidos, por ejemplo, ha aumentado el número de brotes en la última década (Geissler *et al.*, 2017); mientras que en Europa son más frecuentes los casos esporádicos que los brotes (Figura 2).

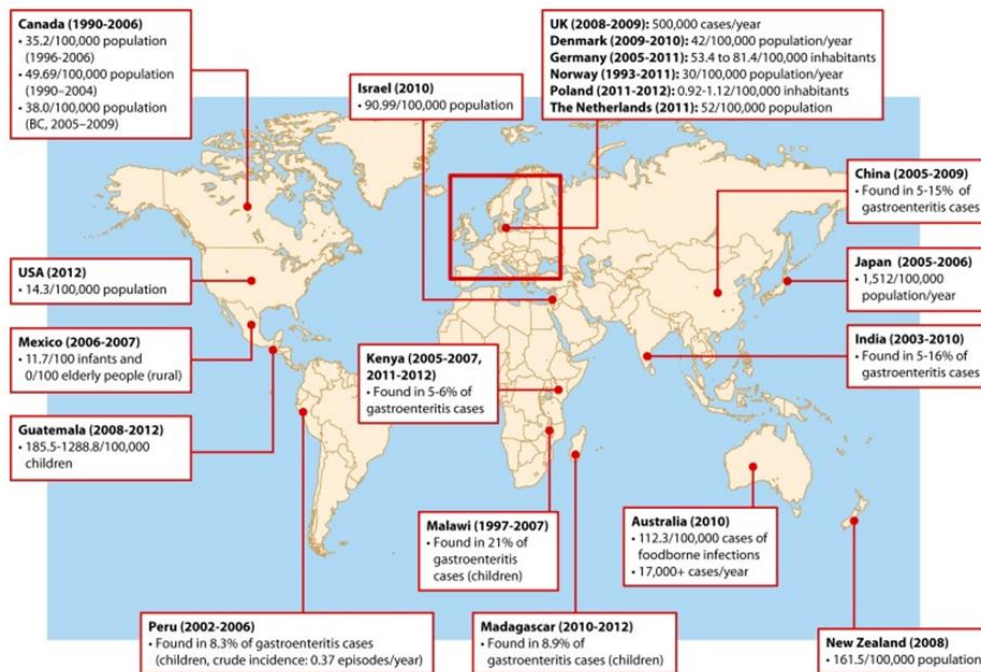


Figura 2: Incidencia y prevalencia de campilobacteriosis provocado por *C. jejuni/C. coli*. Tomado de (Kaakoush *et al.*, 2015).

En general, el enfoque que se le ha dado a la infección por *C. jejuni* se asocia fuertemente a la ingestión de carne de pollo mal cocida (Luber *et al.*, 2003), al consumo de leche de vaca no pasteurizada (Lucarelli *et al.*, 2016) y al consumo de agua no tratada (Dale *et al.*, 2010).

En España, particularmente los estudios de gastroenteritis provocados por *Campylobacter* han sido identificados en niños pequeños, de entre 2 y 5 años, varones predominantemente y que tienen lugar en verano (Sanz *et al.*, 2006; Berradre-Sáenz *et al.*, 2017). En 2016, 69 laboratorios notificaron de manera estable la presencia de *Campylobacter* en aislamientos asociados a las infecciones gastrointestinales (Centro Nacional de Epidemiología, 2016). Este reporte continuo de centros que declaran los episodios provocados por este patógeno contribuye al mejoramiento de la vigilancia de *Campylobacter* en el país.

1.2.3 Reservorios

C. jejuni forma parte de la microbiota normal de mamíferos y aves domésticas y salvajes, en las cuales se ha demostrado que existe una estrecha relación patógeno-hospedador (Waldenström *et al.*, 2002).

Las aves domésticas son el reservorio más común de *C. jejuni*. Se cree que su alta temperatura corporal, de alrededor de 40°C, favorece el establecimiento de esta especie (Skirrow, 1977).

Las aves de corral (pollos, pavos, patos y gansos) están consideradas como el hospedador natural de *C. jejuni*. Se ha demostrado que las aves de corral son las responsables, aproximadamente, del 80% de las infecciones ocurridas en humanos (EFSA, 2010); a través de su manejo en los mataderos (Humphrey *et al.*, 2007). Concretamente, en los pollos de engorde, la colonización por *C. jejuni* ocurre en un número elevado, llegando a valores de 10^{10} UFC/g de intestino (EFSA, 2010).

Transcurrido un tiempo después de haber nacido el polluelo, alrededor de las 2 a las 4 semanas (Hermans *et al.*, 2012), ya es evidente la colonización por *C. jejuni*. Aunque las vías de colonización no están totalmente descritas, se conoce la transmisión a través del ambiente, de los roedores cercanos al sitio de cría o a través de los mismos granjeros que no cumplen con las normas de vestimenta y manejo establecidas en las granjas (Colles *et al.*, 2010).

En los pollos, *Campylobacter* ha sido aislado a lo largo de todo el intestino, pero fundamentalmente en las criptas del ciego, donde no está adherido a las células epiteliales sino que se encuentra en la capa mucosa (Achen *et al.*, 1998).

Como animal destinado al consumo alimentario, la notificación de la presencia de *Campylobacter* en aves de corral es obligatoria, sobre todo en países de la Unión Europea. La detección del patógeno se realiza en granjas y mataderos, mediante técnicas de amplificación de ADN. El tipo de muestras a tomar en las granjas son hisopos cloacales o muestras de heces colectadas en calcetines. Este último tipo de muestra proviene de una maya en los pies de los granjeros, las cuales se colocan para la recolección. Con esta maya los granjeros caminan por la granja donde hay deposiciones y de esta manera se colecta el contenido fecal depositado en el suelo. En los mataderos también pueden recogerse las muestras de los hisopos cloacales, del intestino ciego o de la piel del cuello del pollo (EFSA, 2016).

Se conoce que en Europa, dentro de las aves de corral, la carne de consumo proveniente es mayoritariamente de pollos, y el resto de pavos (EFSA, 2017); mientras que en Estados Unidos constituye uno de los principales países donde se ha aumentado el consumo de pavo (Wesley *et al.*, 2009). Según estudios del 2016 la prevalencia de cepas de *Campylobacter* en pavos tiende a aumentar (EFSA, 2017). La microbiota en el tracto gastrointestinal de los pavos no está tan bien estudiada como la del pollo (Wilkinson *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que el número y la variedad de microorganismos, dependiendo de la edad del animal, aumentan y se observan *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Se plantea que en los pavos, como en el caso de los pollos de engorde, después de un tiempo de nacidos en las granjas (10-14 días) ya están colonizados por *Campylobacter* (García *et al.*, 2013).

En un estudio realizado, para comparar el número y variedad de microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal del pavo a lo largo de su crecimiento, se ha llegado a conocer que la prevalencia de algunos microorganismos varía con el tiempo. Se conoce que a las seis semanas de vida del pavo ya existe colonización por *Campylobacter*, y los microorganismos que predominan son generalmente *Firmicutes*, los cuales están en su mayoría hasta las 10 semanas de edad, aproximadamente. Transcurridas las 10 semanas ya comienza un periodo de transición microbiana, la cual consiste en el cambio de los microorganismos ya establecidos por otros. Regularmente,

en este periodo de transición microbiana se sacrifica al animal en los mataderos, de ahí que se ha planteado que la contaminación cruzada en los mataderos sea la causa más favorable para que se contamine la carne de pavo. Por su parte, ya llegadas las 16 semanas se ha observado que predominan más *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y algunas *Proteobacterias* (Wilkinson *et al.*, 2017).

En estudios de prevalencia de este patógeno en la carne destinada al consumo humano en Canadá, se ha reportado la presencia de cepas de *Campylobacter* en pavos en un 14.2% (8/110) (Narvaez-Bravo *et al.*, 2017). Algunos reportan que la colonización es mayor en pavos y otros han evidenciado que la prevalencia en pollos de engorde supera lo encontrado en pavos (Pedonese *et al.*, 2017).

Las aves salvajes, las cuales se alimentan en una variedad de sitios, tanto en el campo como en zonas urbanas, son consideradas potenciales transmisores de patógenos a humanos y a animales de consumo, por lo que actúan como reservorio y transportador del patógeno a la vez (Weis *et al.*, 2014).

Dentro de la amplia gama de especies de aves salvajes, las especies más estudiadas como transmisores de *Campylobacter* al humano son las gaviotas, las palomas y los patos, los cuales constituyen causa de zoonosis, principalmente en países de Europa. Otras especies como los cuervos, otras especies de patos y la chara californiana (ave típica de algunas regiones de Estados Unidos) constituyen objeto de estudio en Estados Unidos y México (Weis *et al.*, 2016).

Las gaviotas poseen un alto potencial para diseminar y transmitir patógenos entéricos al ambiente (Migura-Garcia *et al.*, 2017). Estas aves salvajes han sido objeto de estudio por ser una de las aves salvajes más relacionadas con las bacterias enteropatógenas asociadas a humanos, pues están en un contacto más estrecho con el hombre que otro tipo de ave salvaje, debido a su cercanía a zonas urbanas, como las playas, plazas y cercanía de lagos o estuarios (Broman *et al.*, 2002). Además, cabe destacar que en algunos de los estudios genotípicos realizados, las cepas de *C. jejuni* aisladas de este tipo de ave no comparten mucha semejanza con los perfiles genéticos predominantes en la clínica humana. Esto lo atribuyen a que el nivel de colonización de cepas de *C. jejuni* en una misma especie de aves salvaje depende del hábitat alimentario, las preferencias de hábitat y a las épocas migratorias, por lo que se ha planteado que dentro de la misma

especie de ave salvaje existe una marcada diferencia genotípica (Waldenström *et al.*, 2002).

También forman parte de las aves transmisoras de este patógeno, sobre todo en Europa, las palomas urbanas (*Columba livia*), las cuales por habitar en contacto directo con los humanos son fuente potencial de transmisión de cepas de *Campylobacter*. En un estudio de determinación de patógenos entéricos en palomas urbanas en Italia, la especie de *C. jejuni* fue aislada con una prevalencia del 48.3% (870/1800) de las muestras analizadas (Gargiulo *et al.*, 2014).

Otro tipo de ave salvaje muy estudiada, principalmente en Estados Unidos, asociada a la clínica humana en varios casos, son los cuervos, en especial la especie *Corvus brachyrhynchos*. En estudios realizados con cepas de *C. jejuni* aisladas de esta especie de cuervos y cepas aisladas de pacientes se ha demostrado que poseen una alta similitud genética, por lo que se plantea que los cuervos podrían ser una fuente potencial de infección para los humanos (Weis *et al.*, 2014), debido al elevado número de cuervos presentes en las zonas urbanas y suburbanas, así como en los campos de cultivos de Estados Unidos (Sen *et al.*, 2018).

Otros reservorios de *C. jejuni* son el ganado vacuno, el ganado ovino, los cerdos y en algunos casos los conejillos de indias (Skirrow, 1991). Los cerdos y el ganado vacuno son más propensos a la colonización por *C. jejuni* en edad joven, lo cual puede provocar aborto en época de gestación del animal (Janssen *et al.*, 2008).

En perros y gatos también se han encontrado evidencias de especies de *Campylobacter*, por lo que se asegura que estos animales pueden ser reservorios potenciales. *C. upsaliensis* es la especie predominantemente aislada en estos animales de compañía (Baker *et al.*, 1999).

Otra fuente de *C. jejuni* suele ser también el agua contaminada, en ocasiones la contaminación se debe a las fuentes de abasto contaminadas que suministran el líquido para los animales en las granjas. Se ha planteado que la presencia de *C. jejuni* en aves salvajes y otros animales se debe al consumo de estas aguas no tratadas (Galanis *et al.*, 2014).

1.2.4 Vías de transmisión

La vía de transmisión de la campilobacteriosis más frecuente es la transmisión alimentaria (Figura 3), tal como se ha comentado anteriormente, y concretamente por el consumo de aves de corral. Pero además del consumo de carne de pollo contaminada, se ha evidenciado que en casos esporádicos de campilobacteriosis la fuente de infección suele estar más ligada a la contaminación cruzada en el manejo de esta carne que a la ingestión de carne mal cocida (Mughini Gras *et al.*, 2012).

También se han descrito, contaminaciones por contacto humano-humano o con animales de vida libre (Domingues *et al.*, 2012). Según estudios realizados en el Reino Unido se comprobó que la vía fecal-oral fue la responsable del 3% de los brotes de campilobacteriosis ocurridos entre los años 1992 al 2009 (Little *et al.*, 2010).

La ingestión de leche de vaca no pasteurizada, puede ser una importante fuente de brotes por *Campylobacter* (Davis *et al.*, 2016). En este sentido, varios estudios realizados en Estados Unidos evidenciaron un aumento en el número de brotes por el consumo de esta leche entre los años 2007 al 2009 y 2010 al 2012 (Mungai *et al.*, 2015).

Además, se ha logrado determinar que la infección por *Campylobacter* depende del hábitat del hospedador, destacando otras rutas de transmisión como la acción de roedores y aves que no son de corral. Según un estudio (Strachan *et al.*, 2009) comparativo entre niños menores de cinco años infectados por *Campylobacter* en zonas rurales y urbanas se observó que la adquisición del patógeno ocurría mayormente en niños de hábitat rural (24.4%) que en niños de zona urbana (6.4%) debido al consumo de aves que no son de corral. También la acción de roedores, los cuales contaminan las aguas de abasto o influyen en la contaminación de la leche, ejerce un importante papel en la infección de niños que habitan las zonas rurales en comparación con los niños de la zona urbana.

Por otra parte, se ha planteado que en determinadas áreas, *Campylobacter* tiene mayor prevalencia, por lo que es mayor el número de cepas circulantes y mayor el riesgo de infestación en las personas, principalmente los viajeros (Kaakoush *et al.*, 2015). En estudios de meta análisis se ha demostrado que los viajeros que van al sureste asiático tienen mayor probabilidad de infestarse que aquellos que van al occidente de Europa

(Mughini-Gras *et al.*, 2014). También se ha considerado como un factor de riesgo si se realizan viajes a Asia y al Sur de América (Patrick *et al.*, 2018).

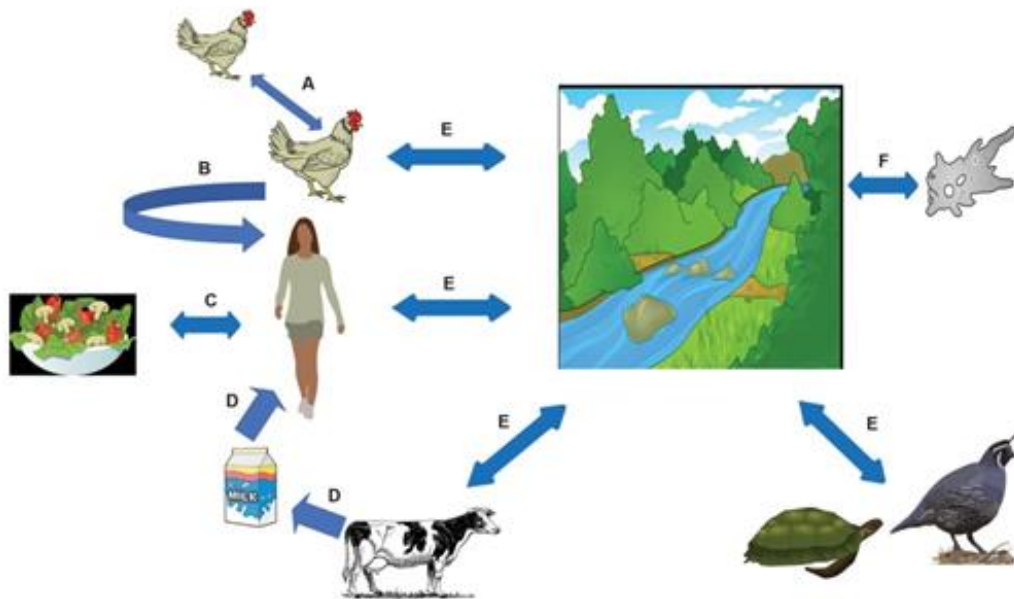


Figura 3: Vías de transmisión y reservorios de *Campylobacter spp.* Diseminación de la bacteria en **A:** granjas; **B:** consumo de carne de pollo mal elaborada; **C:** consumo de productos frescos; **D:** consumo de productos lácteos; **E:** en la superficie del agua producto de contaminación por heces de animales. Tomado de (Johnson *et al.*, 2017).

1.2.5 Factores de virulencia asociados a *Campylobacter*

Campylobacter jejuni tiene la capacidad de resistir ante el estrés provocado por la acción de diferentes factores ambientales mostrando una elevada persistencia en la cadena de tratamiento de alimentos hasta la llegada al humano. Actúa como patógeno en estos, y en algunos mamíferos debido a la existencia y expresión de factores de patogenicidad (Dasti *et al.*, 2010). Actualmente no está totalmente estudiado su mecanismo de acción patógena ni su inocuidad en aves, aunque se han descrito las tres principales fases de la patogenicidad (Figura 4) que desarrolla *Campylobacter* (Schnee and Petri, 2017).

Estas fases son (i) la adhesión, mediada por la acción de los genes *cadF* y *jlpA* (Jin *et al.*, 2001), la motilidad a través de flagelos (mediante la acción de los genes *flaA* y *flaB*) (Guerry, 2007) y del mecanismo de quimiotaxis (Yao *et al.*, 1997); (ii) la invasión, mediada por la acción del gen *ciaB* y la supervivencia en las células huésped (Konkel *et*

al., 1999), las cuales son esenciales en la colonización (Wysok and Wojtacka, 2018); y (iii) la producción de citotoxinas de distensión, lo cual es mediado por la acción de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* (Purdy *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se ha comprobado que la presencia de una estructura de carbohidratos como los lipooligosacáridos (LOS) también participa en la patogenicidad de este microorganismo, lo cual es mediado por la acción del gen *wlaN* (Guerry *et al.*, 2000) y actúa en la patogénesis de la bacteria así como en el sistema de secreción tipo IV (T6SS), mediado por la acción del gen *hcp*. La molécula lipooligosacáridica contiene en su cápsula un oligosacárido y un lípido A, los cuales entre sus funciones presentan la evasión de la respuesta inmune del hospedador facilitando la adhesión y la invasión. La siliación de la molécula incrementa el potencial invasivo y reduce la inmunogenicidad (Guerry *et al.*, 2000). En experimentos de infección con mutantes de cepas de *C. jejuni* sin cápsulas en células humanas INT-407 se ha evidenciado una reducción de la adhesión de estos microorganismos (Bacon *et al.*, 2001).

Otras características como el sistema de captación de hierro (Hermans *et al.*, 2011), la resistencia a la bilis y al estrés provocado por factores ambientales, así como la resistencia a antibióticos (Alfredson and Korolik, 2007) se han considerado también como factores de patogenicidad.

Adhesión y colonización

La primera de las fases en el proceso de patogenia desarrollado por *Campylobacter* comprende la motilidad mediada por flagelos, lo que le permite, unido a su pequeño tamaño, adherirse a las células epiteliales del intestino y atravesar las paredes del tubo digestivo. Durante la infección, *Campylobacter* necesita atravesar el moco que recubre las células epiteliales, unirse a ellas y penetrarlas. En este proceso interviene el flagelo polar que está compuesto por una flagelina mayor FlaA (codificada por el gen *flaA*) y por una flagelina menor FlaB (codificada por el gen *flaB*) (Nachamkin *et al.*, 1993). Estudios de mutación han demostrado que la flagelina mayor es esencial en la colonización, no siendo así la flagelina menor FlaB (Wassenaar *et al.*, 1993).

El segundo factor del proceso de patogénesis que interviene en la adhesión mediante la motilidad es la quimiotaxis, principalmente mediante la acción del gen *acfB*. Este es un mecanismo por el cual las bacterias móviles se mueven en un sentido favorable para

invadir a su hospedador. En estudios realizados en pollos se ha demostrado que la quimiotaxis conduce a *C. jejuni* hacia condiciones químicas óptimas para la colonización ayudado por algunos atrayentes, que son fundamentalmente mucinas y glicoproteínas, de las cuales se ha descrito su acción en el intestino ciego de los pollos (Hermans *et al.*, 2011).

La adherencia de *C. jejuni* a las células del epitelio intestinal es un prerrequisito para la colonización. Este mecanismo está mediado por un conjunto de adhesinas presentes en la superficie de la bacteria (Jin *et al.*, 2001). Entre ellas destacan la proteína de membrana exteARN CadF (Konkel *et al.*, 1997) relacionada con la adhesión de *Campylobacter* a la fibronectina (glicoproteína) y JlpA, una proteína de superficie, cuya adhesión contribuye a la respuesta inflamatoria (Jin *et al.*, 2003).

Otro de los genes, el cual se ha descrito principalmente localizado en un plásmido conjugativo, pVir, es el *virB11*. Este gen manifiesta un importante papel en la adhesión y además una vez presente en el hospedador contribuye al desarrollo de un cuadro grave de la enfermedad (Bacon *et al.*, 2000).

Invasión

Una vez que la bacteria se adhiere a la célula del hospedador y lo coloniza comienza el proceso de invasión, provocando una destrucción o modificación de las estructuras citoesqueléticas del hospedador. Uno de los genes principalmente descritos en esta fase es el gen *htrA*, aunque otros autores también mencionan al gen *htrB* presente no solo en *Campylobacter* sino también en cepas de *Salmonella typhimurium* (Phongsisay *et al.*, 2007). Además, el gen *ciaB*, como ya mencionábamos anteriormente, también interviene en este proceso (Konkel *et al.*, 2004).

Producción de citotoxinas

Continuando con el proceso de patogénesis desarrollado por las cepas de *Campylobacter* se destaca la acción de las citotoxinas de distensión o CDT, producidas por muchos otros patógenos gramnegativos. Estas toxinas detienen el ciclo celular por lo que causan la muerte en cultivos celulares de líneas humanas. Las CDT son las únicas toxinas identificadas hasta la fecha en *Campylobacter*, las cuales son producidas por un grupo de especies como: *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. upsaliensis* (Johnson and Lior, 1988). El papel de las CDT en la patogénesis de *C. jejuni* aún no ha

sido determinado, sin embargo puede estar involucrado en la invasión y modulación de la respuesta inmune (Purdy *et al.*, 2000). La CDT está compuesta, en el caso de *Campylobacter*, por tres subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. La subunidad que tiene el efecto es CdtB debido a su actividad ADNasa, la cual rompe el ADN y comienza el mecanismo de reparación que concluye con la muerte de la célula (Ge *et al.*, 2008). CdtB ingresa a la célula hospedadora y se une en la superficie celular con las proteínas CdtA y CdtC produciendo daño en el ADN celular. La producción de CDT contribuye a aumentar la patogenicidad de las cepas de *C. jejuni* ya que prolonga la persistencia de la enfermedad gastrointestinal, aumentando la inflamación de la mucosa gastrointestinal y el daño hepático, lo cual ha sido observado en estudios con ratones.

Otra de las propiedades que le confieren patogenicidad a las bacterias gramnegativas y descrita en *Campylobacter spp.* (Bleumink-Pluym *et al.*, 2013) es el uso del sistema de secreción, el cual exporta otras toxinas. La acción de este sistema en las cepas de *Campylobacter*, se ha descrito más recientemente (Bleumink-Pluym *et al.*, 2013).

Este sistema está fuertemente asociado con las formas más severas de la enfermedad. Un componente significativo de este sistema es el producto del gen *hcp* y su presencia ha sido descrita de manera funcional en las cepas de *C. jejuni*. Se ha reportado que es más prevalente en pacientes que han sufrido de diarrea sanguinolenta. Las cepas que presentan este gen han demostrado tener una habilidad mayor de adherirse e invadir el epitelio gastrointestinal del hospedador (Lertpiriyapong *et al.*, 2012). También en cepas tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* aisladas de pollos se ha demostrado la funcionalidad de los ORF (de las siglas en inglés *Open Reading Frame*) de todo el sistema T6SS incluso llegando a tener un comportamiento *in vitro* más virulento que las cepas de referencia (Corcionivoschi *et al.*, 2015).

En aves no se observan los mismos síntomas ni la misma respuesta inflamatoria que se manifiesta en humanos, aunque los mecanismos de invasión tanto en cepas aisladas de pollos como de humanos son similares, lo cual se ha demostrado en un estudio con líneas celulares de pollos y de humanos (Van Deun *et al.*, 2008). El intestino de las aves provee condiciones óptimas para el crecimiento de *Campylobacter*, permitiendo a estas especies comportarse como portadores asintomáticos (Broman *et al.*, 2002). Un rasgo presente en pollos, pero diferente a humanos y otros mamíferos es la temperatura

corporal, la cual oscila entre 41 y 45°C, lo que hace que sea una señal potencial para la infección hospedador específico. Se ha descrito que *C. jejuni* ha desarrollado un sistema de regulación térmica (RacRS) para la supervivencia a estas altas temperaturas (MacKichan *et al.*, 2004).

El primer sitio de colonización es en las criptas profundas del intestino ciego, donde el microorganismo es encontrado en la capa mucosa cerca de las células epiteliales. Se cree que este mucus puede contribuir a la naturaleza asintomática de la infección por *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 1993).

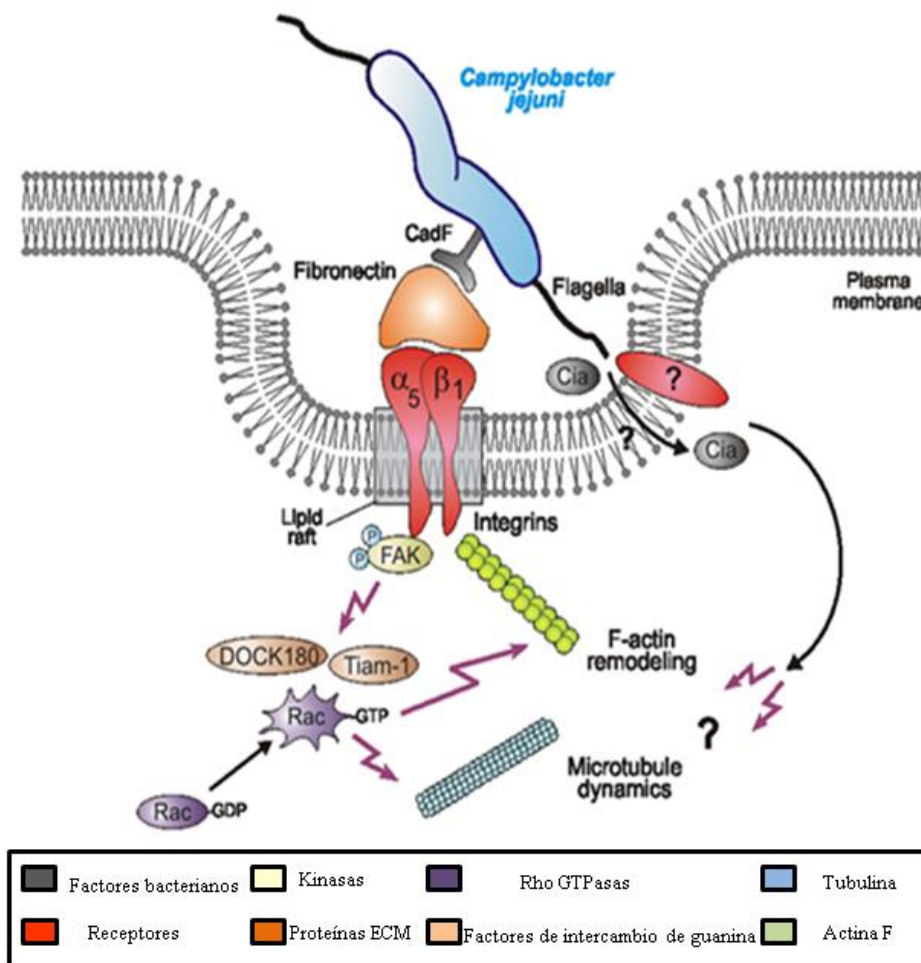


Figura 4: Interacción de la célula con algunos factores de patogenicidad presentes en cepas de *C. jejuni*. ECM: proteínas de matriz extracelular. Tomado de <https://bagginis.blogspot.com.es/2017/01/>

En estudios realizados en cuervos se ha detectado un alto porcentaje de los factores de virulencia presentes en cepas de *C. jejuni* (66.9% (85/127)). Estos resultados definen a

los cuervos como fuente potencial de patogenicidad para los humanos (Weis *et al.*, 2014). Resultados similares se han encontrado en estudios de genotipo con *Larus ridibundus* (gaviota reidora), donde se ha demostrado que los patrones más prevalentes encontrados en estas aves difieren de los patrones estudiados en humanos y pollos. Toda esta información supone que existen subpoblaciones especie-específico, las cuales no se transmiten a otros hospedadores (Broman *et al.*, 2002).

1.3. Tratamiento de las gastroenteritis provocadas por *Campylobacter*. Papel de los antimicrobianos en la cadena de producción alimentaria

La mayoría de las infecciones causadas por *Campylobacter* suelen ser autolimitadas. En casos prolongados o severos, especialmente en personas jóvenes, adultos mayores (> 65 años) y personas inmunodeprimidas, se administra terapia antibiótica (Blaser and Engberg, 2008).

Las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, eran comúnmente utilizadas como antibiótico de elección en malestares intestinales donde no se ha diagnosticado el agente causal, como es el caso de la diarrea del viajero (Guerrant *et al.*, 2001). Aunque en algunos países, como Italia (Mearelli *et al.*, 2017) se sigue administrando, existen estudios donde se ha evidenciado el aumento de la resistencia ante este fármaco en *Campylobacter* y no es aconsejable su uso como tratamiento empírico (Duong *et al.*, 2017). Más del 50% de las cepas de *Campylobacter* son resistentes a fluoroquinolonas y el resto puede desarrollar resistencia durante el tratamiento. Aunque actualmente no se administra con la frecuencia de hace algunos años, la resistencia a este fármaco sigue aumentando (Bolinger and Kathariou, 2017).

Los antibióticos de elección para el tratamiento de la campylobacteriosis actualmente suelen ser los macrólidos, como la eritromicina o, en algunos casos, los de generación más avanzada como la claritromicina y la azitromicina (Moore *et al.*, 2005). En caso de bacteriemia o de cualquier infección generalizada puede emplearse imipenem o amoxicilina-ácido clavulánico asociado o no a la gentamicina (Mense *et al.*, 2014).

También es cierto que hace algunos años se ha venido observando el aumento de la resistencia a eritromicina en cepas de *Campylobacter*. Aunque con mayor frecuencia esta resistencia se evidencia en cepas de *C. coli*, el mecanismo de resistencia a

macrólidos presente en cepas de *C. coli* pudiera extenderse a cepas de *C. jejuni* (Bolinger and Kathariou, 2017).

Antiguamente los antimicrobianos eran utilizados en la industria avícola con diversos fines:

- En el tratamiento de infecciones en animales de forma individual o colectiva.
- En el tratamiento profiláctico y metafiláctico para prevenir la propagación de la infección de un animal enfermo a uno sano en una misma unidad de producción.
- Para promover el crecimiento (APC: antimicrobianos promotores del crecimiento), como son el uso de la tetraciclina y la ciprofloxacina. Con la administración de los APC se pretende aumentar la tasa de crecimiento y el rendimiento productivo, pues se disminuye la microbiota intestinal y el número de bacterias patógenas.
- Para el tratamiento de enfermedades a dosis muy bajas.

Sin embargo, en 1950 se erradicó el uso de los antimicrobianos como APC (Marshall and Levy, 2011) y comenzó la implementación de la utilización de antimicrobianos de no utilización en la terapéutica humana, o más conocidos como NTA (del inglés *nontherapeutic antimicrobials*). En 2006, se erradicó la política de utilización de los antimicrobianos como APC en la Unión Europea (UE), debido a los elevados índices de resistencia presentado en las cepas aisladas de este tipo de muestras. Actualmente en la mayoría de los países, y en especial en la UE, solamente se administran antibióticos en las aves de corral como uso terapéutico. Algunos de estos antimicrobianos son danofloxacino y difloxacino, provenientes de la familia de las quinolonas, varias tetraciclinas y macrólidos, así como varios aminoglucósidos (Wimalarathna *et al.*, 2013). Debido a la actual existencia de cepas resistentes a antibióticos aisladas de las aves de corral se ha planteado la utilización de probióticos (Park *et al.*, 2017) y de ácidos orgánicos (Roth *et al.*, 2017) como aditivos suplementados a la dieta animal permitiendo un crecimiento óptimo del animal y una disminución del nivel de resistencia de las cepas no solo de *Campylobacter*, sino de otras cepas como *E. coli*.

1.4. Epidemiología molecular de *Campylobacter*

Los conocimientos adquiridos con respecto a la epidemiología de las infecciones causadas por *C. jejuni* se debe en gran medida al desarrollo de los nuevos métodos de tipaje molecular (Sheppard and Maiden, 2015). Los métodos de sero y fagotipado han quedado obsoletos con la estandarización de técnicas como la identificación de alelos de secuencias de genes del metabolismo bacteriano (MLST del inglés *MultiLocus Sequence Typing*) y el gel de electroforesis en campo pulsado (PFGE del inglés *pulsed field gel electrophoresis*). A su vez, la aparición de la técnica de secuenciación masiva (WGS, del inglés *Whole Genome Sequence*) puede desplazar el uso del MLST y PFGE.

El MLST nos brinda información acerca de la variación genética presente en siete genes *housekeeping* los cuales determinarán la relación genética entre los aislados (Dingle *et al.*, 2001). Mediante MLST nos podemos explicar la evolución de una población bacteriana en función de los secuencia tipos (ST) obtenidos (Cody *et al.*, 2012). Esta técnica es esencial para estudios epidemiológicos, de genética poblacional y de evolución (Dingle *et al.*, 2001).

Los genomas de *Campylobacter* son genéticamente diversos e inestables con recombinación inter e intragenómica frecuente lo que complica la interpretación de los datos de muchos métodos de tipado. Hasta hace poco, con la aplicación de la técnica MLST, la tipificación de *Campylobacter* ha tenido un gran éxito y se ha agregado a la base de datos MLST. En mayo de 2008, la base de datos *Campylobacter* MLST contenía 3516 aislamientos y alrededor de 30 publicaciones que la usaban o mencionaban (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). En el MLST de *Campylobacter* se estudia la secuencia nucleotídica de 7 genes conservados, implicados en rutas metabólicas imprescindibles en la bacteria. La secuencia nucleotídica estudiada de estos genes son de alrededor de 500 pares de bases y se nombran: *aspA* (aspartasa), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidrometil transferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transcetolasa) y *uncA* (subunidad alfa de la ATP sintasa) (Dingle *et al.*, 2001).

El número y variedad de secuencias tipos incrementa de manera considerable, debido a la identificación de nuevas secuencias tipos presentes en cepas aisladas de diversos ambientes. Un ejemplo de ello es la gran variedad de ST que hasta la fecha se han descrito, el cual llega hasta la ST 9219 (https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_

campylobacter_seqdef&page=tableQuery&table=profile_history&order=timestamp&direction=descending&submit=1).

La descripción de estos nuevos alelos y nuevas ST derivan de clones locales restringidos a una determinada zona (Stone *et al.*, 2013). Además, se plantea que la prevalencia de una determinada secuencia tipo puede variar en un tipo de muestra con el tiempo, donde las cepas de *C. jejuni* de un ST determinado deja de colonizar el huésped y da lugar a que predomine otra cepa con un ST diferente (Griekspoor *et al.*, 2015).

Según un estudio realizado en Estados Unidos con cepas de *Campylobacter* aisladas de niños y animales domésticos, se identificaron con mayor prevalencia los ST-137, ST-1233 y ST-7671, donde los complejos clonales que predominaron fueron el ST-353 identificado en cepas aisladas de muestras de niños y de animales de compañía, el complejo clonal ST-607 identificado en cepas aisladas de muestras de animales de compañía solamente, mientras que el complejo clonal ST-354 solamente se identificó en cepas aisladas de aves domésticas (Vasco *et al.*, 2016).

En otro estudio realizado en Finlandia, los ST mayormente identificados en cepas de *C. jejuni* aislados de pacientes con gastroenteritis, son los ST-21, ST-45, ST-353 y ST-50 (Kovanen *et al.*, 2014). Estos ST también se han obtenido en la mayoría de las cepas estudiadas en Lituania, específicamente en 2015, en cepas aisladas de muestras de pollo directamente de los mataderos donde se destaca el ST-45 (Llarena *et al.*, 2015). Otras secuencias tipo frecuentemente detectadas son ST-206 y ST-677, que han sido descritas en casos esporádicos de campylobacteriosis y se han relacionado con el consumo de carne de pollo contaminada (Kovanen *et al.*, 2014).

Según otro estudio realizado en Suecia, con cepas aisladas de humanos y pollos en los años 2000 y 2008 se observó que los ST más predominantes (42% de todos los ST identificados) fueron ST-45, ST-50, ST48, ST-21 y ST-677 tanto en cepas aisladas de muestras de humanos como de pollos (Griekspoor *et al.*, 2015).

Por tanto, en la mayoría de los estudios se evidencia la alta variabilidad genética existente entre las cepas aisladas; sin embargo en las cepas aisladas de muestras de pollos o animales destinados al consumo humano como cerdos y ganado vacuno, se ha observado similitud entre los ST identificados. Esta estrecha relación entre ST y complejos clonales entre cepas aisladas de muestras de pollos y de muestras de

humanos se ha reportado en países como Alemania y Polonia, donde los ST mayoritariamente identificados fueron ST-50 (15%) y ST-206 (13%) entre las 91 cepas de *C. jejuni* estudiadas; y donde se atribuyó, en el 74% de los casos la gastroenteritis desarrollada, al consumo de carne de pollo contaminada (Rosner *et al.*, 2017). En el estudio realizado en Polonia los principales complejos clonales identificados se corresponden con los ST-21, ST-206 y ST-354, lo cual se atribuye a una de las posibles causas de la contaminación en humanos (Wieczorek and Osek, 2017).

Por otra parte, en un estudio realizado en Estados Unidos con cepas aisladas de muestras de humanos y de pollos se detectaron, en la mayoría de los aislados, los ST-137, ST-1233 y ST-7671. Además, las cepas aisladas de muestras de humanos y de pollos compartieron complejos clonales ST-353 y el complejo clonal ST-607 estuvo presente solo en cepas aisladas de muestras de animales domésticos, mientras que el complejo clonal ST-354 solo se encontró en cepas aisladas de muestras de pollos (Vasco *et al.*, 2016). En Canadá, en un estudio realizado en 2015 con cepas aisladas de muestras de carne de pollo, predominaron los complejos clonales ST-21 y ST-45 (Oh *et al.*, 2015), los cuales se han descrito como causantes de gastroenteritis en humanos.

En un estudio realizado en Nueva Zelanda con cepas de *C. jejuni* aislados de otros reservorios, como el ganado vacuno y las aves salvajes, también se ha detectado el ST-45 y el ST-48, aunque asociado minoritariamente a la clínica humana (French *et al.*, 2009). Adicionalmente, en otros animales diferentes a las aves, como los cerdos y el ganado vacuno, la colonización por cepas de *C. jejuni* conduce al aborto; lo cual se ha asociado con los ST-8 y ST-50 en estudios realizados con cepas aisladas de muestras de cerdos en Estados Unidos y Reino Unido (Wu *et al.*, 2014).

En el caso de las aves salvajes, específicamente en un estudio realizado en Suecia en 2015 en cuervos, los ST mayoritariamente descritos fueron los ST-1034, ST-1275, ST-1287 y ST-1332 (Griekspoor *et al.*, 2015).

Por otro lado el PFGE brinda información acerca de la diversidad clonal existente en un conjunto de cepas. Con esta técnica se ha demostrado que se puede determinar la relación entre aislados de *Campylobacter* procedentes de diferentes orígenes (Gibson *et al.*, 1995; Fitzgerald *et al.*, 2001).

El PFGE es considerado generalmente como uno de los métodos más discriminativos para el genotipado de *C. jejuni*. Ha sido utilizado en estudios de epidemiología en investigación de brotes, persistencia de genotipos en poblaciones humanas, diversidad ambiental de aislados causantes de infecciones esporádicas, diseminación de cepas resistentes a antibióticos y comparación de genotipos entre y con otros hospedadores (Zhou and Oyarzabal, 2015). En esta técnica se utilizan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte. Las enzimas mayormente utilizadas en estudios con cepas de *Campylobacter* son SmaI y KpnI. Varios autores se plantean el uso de una enzima o ambas, para así tener mayor poder de discriminación a la hora de clasificar un clon (Michaud *et al.*, 2001).

Los casos de brotes difusos, los cuales no se circunscriben a un lugar o zona en específico, tienen un alto impacto en la epidemiología de la campylobacteriosis. Actualmente varios investigadores sustentan la idea de que con la implementación de la nueva era de la secuenciación (NGS) (del inglés *Next Generation Sequencing*) en donde es posible obtener la secuencia de todo un gen o de todo el genoma bacteriano (*WGS*), se podría distinguir entre brotes y casos esporádicos; lo cual ayudaría en la vigilancia de las infecciones de *C. jejuni* (Cody *et al.*, 2013).

Dentro de las utilidades que nos brinda la *WGS* en los estudios del genoma bacteriano están: la identificación de factores de patogenicidad, la presencia de plásmidos, así como de genes de resistencia a antibióticos. Con la utilización de esta información, se puede realizar la construcción de la estructura del plásmido presente en la bacteria. Además, es posible detectar islas de patogenicidad, así como identificar el entorno de genes de resistencia a antibiótico de importancia clínica; los cuales pueden llevar consigo otros determinantes de resistencia no conocidos y a su vez, dependiendo de su localización, ser transmisibles o no. Toda esta información conlleva a poder realizar estudios de epidemiología molecular de una manera rápida y con mayor profundidad (Llarena *et al.*, 2017).

En lo que respecta a la sensibilidad a los antimicrobianos, no hay suficiente conocimiento sobre la concordancia entre las pruebas fenotípicas y la presencia de genes de resistencia en diferentes aislamientos. Aunque es destacable que con la utilización de *WGS* se han obtenido valores superiores al 96% de sensibilidad y entre un 97-100% de especificidad en la predicción del fenotipo resistente, por lo que en base a

estos valores *WGS* es una alternativa realística a los métodos de prueba de sensibilidad fenotípica antimicrobiana (Zankari *et al.*, 2013). En un estudio realizado en 2018 en Estados Unidos, se analizaron un total de 1668 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, con el objetivo de predecir la concentración mínima inhibitoria (CMI) sin conocer el contenido genético presente en las cepas. Mediante *WGS* se demostró que era posible realizar un análisis in silico para predecir el panel de CMI en cepas de *K. pneumoniae* y además utilizarlo como modelo predictivo de otras bacterias enteropatógenas (Nguyen *et al.*, 2018).

En general, el análisis de *WGS* puede ser una solución única, rápida y rentable para definir los genotipos de resistencia y predecir la resistencia fenotípica de bacterias con gran sensibilidad y especificidad (Zhao *et al.*, 2016).

Se han realizado diversos estudios con *WGS* en *Campylobacter*, la mayoría comparativos y de evaluación o profundización de técnicas, como el realizado para evaluar los resultados obtenidos con el MALDI-TOFF en 2018 (Lawton *et al.*, 2018), y el realizado para conocer con mayor profundidad el contenido proteico de la bacteria (Clark *et al.*, 2018). También se han realizado estudios para conocer el cgMLST y wgMLST (Kovanen *et al.*, 2014), así como para ampliar o conocer la presencia de factores de virulencia y de presencia de genes de resistencia a antibióticos adquiridos, así como de mutaciones puntuales. En estos diversos estudios se ha planteado la importancia de conocer la calidad de la secuencia obtenida por las plataformas utilizadas y sobre todo y aún más importante, el conocimiento del software con que se analicen los datos.

1.5. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Campylobacter*

Los antibióticos se pueden clasificar según su estructura química, su mecanismo o su espectro de acción. De acuerdo a su mecanismo de acción hay compuestos que actúan sobre la síntesis de la pared celular (betalactámicos y fosfomicina), la síntesis proteica (macrólidos, tetraciclina, aminoglucósidos y cloranfenicol) o en la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas). Según su espectro de acción, los antibióticos pueden ser de reducido o amplio espectro. También se clasifican en bacteriostáticos o bactericidas según inhiban o impidan el crecimiento bacteriano (Tabla 1).

La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha ido paralela a la incorporación de los antibióticos al arsenal terapéutico. La industria farmacéutica ha ido modificando la estructura química de las moléculas de antibióticos ya conocidos y ha buscado, así mismo, nuevos antibióticos que fuesen esquivando los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias. Sin embargo, aunque estas nuevas moléculas han sido eficaces durante unos años, las bacterias han desarrollado nuevos mecanismos que incluyen la resistencia a estos nuevos antibióticos.

El uso indiscriminado de los antibióticos como las tetraciclinas y quinolonas en humanos, así como los utilizados para uso animal en el tratamiento o como factor de crecimiento como medida profiláctica en pollos, ha llevado a un incremento en la resistencia de las cepas de *C. jejuni* (Marshall and Levy, 2011).

Según un estudio emitido por EFSA en 2014 fue relevante la resistencia a los antimicrobianos, principalmente a fluoroquinolonas, observada en aislamientos de *Campylobacter* aislado de humanos, así como de animales productores de alimentos, donde destacó el pollo de engorde. Casi la mitad de los aislados de muestras clínicas fueron resistentes al menos a un antimicrobiano de los que se evalúan generalmente (ciprofloxacina, tetraciclina y eritromicina) y 28.9% fueron resistentes a múltiples fármacos (EFSA, 2014b). Resistencia alta a extremadamente alta (82.7%) a fluoroquinolonas también se observó en cepas de *Campylobacter* aisladas de alimentos de origen animal como la carne de pollo (*Gallus gallus*). En cerdos y ganado bovino los valores de resistencia fueron algo menores, del 32.0% (EFSA, 2014b). En estudios realizados en Polonia el incremento de la resistencia en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos de engorde se reporta tanto para la tetraciclina, de 0% en 1994–1996 a 18.7% en 2005–2008, como para la ciprofloxacina, de 43.6% en 1994–1996 a 85.4% en 2005–2008 (Woniak-Biel *et al.*, 2017). Varios estudios en Estados Unidos, Reino Unido y Europa, asocian la resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de humanos con el incremento de la resistencia de las cepas aisladas de muestras de pollos o de su carne (EFSA, 2010).

En otro estudio realizado en Italia con cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos y de pavos, la resistencia a ampicilina se mostró muy elevada, con valores del 93 y 100% en pollos y pavos, respectivamente (Giacomelli *et al.*, 2014).

Pero no sólo se han descrito resistencias en los ámbitos relacionados con la presión antibiótica, sino que algunas cepas de *Campylobacter* aisladas de aves salvajes han presentado resistencia frente a los principales antibióticos utilizados en la clínica, como fluoroquinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y en menor medida a macrólidos (Krawiec, *et al.*, 2017), aunque en porcentajes menores que los descritos en las cepas aisladas de humanos, pollos y otros animales destinados a la alimentación. En un estudio realizado en 2005 en Suecia con cepas aisladas de animales de diversos tipos como cuervos, zorzales, gavilanes y pájaros playeros, se observaron valores de resistencia con una prevalencia del 0.7-3.6% para compuestos como amoxicilina, ciprofloxacina, doxiciclina y ácido nalidixico, y solo en un aislado se observó resistencia con una prevalencia moderada al metronidazol del 14% (Waldenström *et al.*, 2005). En otro estudio, realizado con gaviotas del género *Lariadae*, se evidenció resistencia frente a quinolonas, β -lactámicos y también frente a tetraciclinas (Moré *et al.*, 2017).

Sin embargo, en un estudio realizado en aves acuáticas de vida libre en el Delta del Ebro, se evidenció que todas las cepas fueron sensibles a los siete antimicrobianos testados: ciprofloxacina, enrofloxacin, ácido nalidíxico, gentamicina, eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol (Antilles *et al.*, 2015). También se observó una mayor prevalencia de *C. coli* con respecto a *C. jejuni* (11.64% vs. 0.94%).

Es importante destacar que en todos los estudios de sensibilidad a antimicrobianos realizados en aves salvajes se transmite el mensaje de la importancia de estas aves como transmisores de *Campylobacter spp.* a ambientes urbanos y la implicación de estas cepas, donde muchas son resistentes a antibióticos, en la salud pública (Waldenström *et al.*, 2005).

Estas aves de vida libre no tienen administración, ni profiláctica ni terapéutica, como los animales de granja (pollos y pavos destinados al consumo humano); por lo que esto pudiera ser un factor importante a la hora de analizar los patrones de sensibilidad antimicrobiana. Sin embargo, a las aves salvajes que viven cerca de zonas urbanas, se les realizan controles para describir su papel en la dispersión de patógenos zoonóticos a la comunidad humana, y por lo tanto pueden ser un factor de diseminación de cepas resistentes a los antibióticos. También dentro del perfil de resistencia se ha comprobado el creciente ascenso de la multidrogorresistencia (Wieczorek *et al.*, 2015).

En general, los mecanismos de resistencia a antibióticos comprenden la modificación de la diana del antibiótico, la modificación o inactivación del antibiótico y la incapacidad del antibiótico de alcanzar la diana por la existencia de bombas de expulsión y/o alteraciones en las porinas propias de la bacteria.

Los genes implicados en la resistencia a un antibiótico pueden estar localizados en el cromosoma o asociados a plásmidos, por lo que representan una combinación de genes endógenos y adquiridos (Iovine, 2013). También estructuras propias de la bacteria, como las bombas de expulsión, funcionan como mecanismos de resistencia a antibióticos, los cuales se han identificado como mecanismos intrínsecos de resistencia, al expresarse constitutivamente en las cepas salvajes (Lin *et al.*, 2002).

Las cepas de *Campylobacter spp.* poseen una resistencia intrínseca frente a determinados grupos de antibióticos como la bacitracina, novobiocina, rifampicina, estreptogramina B, trimetoprim y vancomicina (Luangtongkum *et al.*, 2009), así como a muchos betalactámicos, aunque algunos como el imipenem y cefepime tienen buena actividad *in vitro* contra *Campylobacter* (Tabla 2).

1.5.1 Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son bactericidas y actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Su anillo betalactámico, análogo a la D-alanil-D-alanina, que es el péptido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera de péptidoglicano en formación, se une irreversiblemente a las transpeptidasas bacterianas o “*penicillin binding proteins*” (PBP), inhibiendo la reacción de los enlaces cruzados que confieren integridad al péptidoglicano, componente de la pared bacteriana. Como consecuencia, la membrana se debilita y provoca la lisis celular (Tipper, 1985).

Los distintos mecanismos de resistencia a betalactámicos pueden agruparse en a) producción de betalactamasas, enzimas inactivantes del anillo betalactámico, b) cambios en la estructura de las PBP por mutación, c) disminución de la entrada del antibiótico, alteraciones en las proteínas de membrana externa (porinas) y d) expulsión del antibiótico fuera de la célula a través de bombas de expulsión.

Campylobacter spp. presenta resistencia intrínseca a varios betalactámicos, como las penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, sin embargo esta resistencia a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro no la presentan todas las cepas (Tajada

et al., 1996), lo cual se debe a la débil unión de estos antimicrobianos a las *PBP* de *Campylobacter* (García *et al.*, 2009). En *Campylobacter*, la resistencia a betalactámicos mediante la producción de betalactamasas es la más común (Taylor and Courvalin, 1988), seguido de la acción de las bombas de expulsión. La producción de penicilinasas han sido detectada entre el 80-90% de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* (Li *et al.*, 2007).

En *C. jejuni* se ha identificado el gen *bla_{OXA-61}* (Alfredson and Korolik, 2005) correspondiente a una oxacilinasas de clase D de Ambler (Ambler, 1980) y grupo 2D de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995), la cual confiere resistencia a ampicilina, carbenicilina y piperacilina. Este gen puede estar localizado en el cromosoma y, en otros casos, estar ubicado en elementos móviles (plásmidos e integrones), favoreciéndose así su diseminación (Alfredson and Korolik, 2005). Sin embargo, se ha evidenciado que en las cepas de *Campylobacter* se expresa pobremente por lo que no parece tener un papel relevante en la resistencia a ampicilina (Alfredson and Korolik, 2005). De hecho, Griggs y colaboradores (Griggs *et al.*, 2009) describen que el 59% de las cepas sensibles a ampicilina eran portadoras de *bla_{OXA-61}*, así como un 9% de las resistentes no lo portaban. En este mismo estudio se sugiere la existencia de otra betalactamasa, CjBla2, con diferente punto isoeléctrico a *bla_{OXA-61}*, y aunque esta no se logró identificar, si se describió que no era producto de un mutante de *bla_{OXA-61}* (Griggs *et al.*, 2009). Otra de las oxacilinasas identificadas en *Campylobacter* es la *bla_{OXA-184}*, la cual se ha identificado principalmente en el genoma de aves salvajes, específicamente cuervos. Esto se demostró en un estudio realizado donde se observaron los dos tipos de oxacilinasas, identificándose la *bla_{OXA-184}* en el 55% de las cepas, mientras que la *bla_{OXA-61}* estuvo presente en el 29% de las cepas (Weis *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de resistencia que se ha relacionado con la resistencia a betalactámicos es la sobreexpresión de la bomba de expulsión CmeABC debido a la presencia de la mutación en el represor CmeR (Zhang *et al.*, 2017). CmeABC es una bomba del tipo *RND* (de sus siglas en inglés *resistance- nodulation-cell division*), la cual consta de tres componentes proteicos localizados en la membrana interna (*CmeB*), en el periplasma (*CmeA*) y en la membrana externa (*CmeC*); los cuales confieren el operón *cmeABC* (Lin *et al.*, 2002). Esta bomba de expulsión también confiere resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos y algunos aminoglucósidos (Iovine, 2013), siendo uno de los principales mecanismos implicados en la multiresistencia (MDR) (Poole, 2005).

Tabla 1: Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos incluidos en este estudio.

Familia química	Antibiótico	Mecanismo de acción	Referencia
Betalactámicos	Penicilina	Inhibe la síntesis del péptidoglicano, polímero esencial para la formación de la pared celular bacteriana. La alteración de la pared produce la activación de proteínas autolíticas provocando la destrucción de la bacteria.	(Tipper, 1985)
	Carabapenems		
Derivado del ácido fosfónico	Fosfomicina	Inhibe la síntesis del peptidoglicano, mediante el bloqueo de la enzima MurA	(Giske, 2015)
Macrólidos	Eritromicina	Inhibe la síntesis proteica bacteriana mediante la fijación a la subunidad 50 S del ribosoma.	(Chopra and Reader, 2015)
Tetraciclinas	Tetraciclina	Inhibe la síntesis proteica bacteriana impidiendo la unión del aminoacil RNAt al ribosoma Alteración de la membrana plasmática	(Chopra and Roberts, 2001)
	Gentamicina		
Aminoglucósidos	Kanamicina	Inhibe síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 30 S del ribosoma, lo cual provoca la producción de proteínas defectuosas	(Davis, 1987)
Fenicol	Estreptomicina	Inhibe síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 50 S del ribosoma	(Schwarz <i>et al.</i> , 2004)
	Cloranfenicol		
Quinolona	Ácido nalidíxico	Inhibición de la actividad de dos topoisomeras (DNA girasa y la topoisomerasa IV), las cuales están involucradas en la modulación del súper enrollamiento del DNA bacteriano.	(Correia <i>et al.</i> , 2017)
	Fluoroquinolona		
	Ciprofloxacino		

1.5.2 Tetraciclinas

Las tetraciclinas fueron descubiertas en los años 40 del siglo XX como metabolitos secundarios producidos por actinomicetales, presentes en el suelo. Su ventaja principal era su amplio espectro sin necesidad de modificaciones secundarias. Su uso extensivo en agricultura y medicina tuvo como consecuencia la aparición temprana de resistencias en cepas patógenas para el hombre (Roberts, 2005).

En los años 60 surgieron las tetraciclinas de segunda generación: minociclina y doxiciclina, con sustituciones en algunas posiciones de los anillos. Finalmente en los años 90 surgieron las tetraciclinas de tercera generación, como las glicilciclinas y tigeciclina, que poseen la ventaja de no verse afectadas por bombas de expulsión.

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro y efectivos contra microorganismos grampositivos y gramnegativos. La tetraciclina es un antibiótico bacteriostático, pues actúa uniéndose reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esta unión no permite que se efectúe la unión con el aminoacil ARNt y por lo tanto no se adicionan aminoácidos a la cadena peptídica lo que conlleva a la inhibición de la síntesis proteica (Chopra and Roberts, 2001). Se ha planteado que en microorganismos gramnegativos el antibiótico atraviesa la membrana externa a través de las porinas unidos a cationes de Mg^{2+} formando un complejo. Ya una vez dentro del espacio celular el complejo formado se disocia y se libera la molécula de tetraciclina (Roberts, 2003).

La resistencia a tetraciclinas en *C. jejuni* se debe a dos mecanismos, uno relacionado con la síntesis de proteínas de protección ribosomal (RPP) y el otro con la sobreexpresión de bombas de eflujo.

El responsable de la síntesis de RPP es el gen *tetO*, que ha sido localizado tanto en un plásmido autotransferible (Taylor and Courvalin, 1988; Li *et al.*, 2013), como en el cromosoma (Gibreel *et al.*, 2004). La presencia de este gen es universal y se ha reportado tanto en cepas de humanos como de animales. Su presencia en el ámbito de animales de engorde se creyó que era debida a la presión antibiótica pues las tetraciclinas se han usado como factor de crecimiento en la alimentación de animales de granja. Sin embargo, hay estudios que descartan esta hipótesis pues se ha encontrado dicho gen en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos procedentes de una granja ecológica,

donde un 74% de las cepas presentaban el gen (Luangtongkum *et al.*, 2006), o ganado vacuno con un 91% de las cepas eran portadoras del gen o en el ámbito salvaje donde el gen estaba presente en la totalidad de aislados procedentes de muestras de primates (Weis *et al.*, 2016).

En estudios realizados con cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de carcasas de pollos se han identificado otro determinante que confiere resistencia a tetraciclina, el cual es denominado *tetA*. Este gen posee un amplio espectro de hospedadores (Gebreyes *et al.*, 2005). La acción de proteínas estructurales codificadas por el gen *tetA*, unidas a la acción del gen *tetO*, están involucradas en la resistencia a tetraciclina mediante el mecanismo de expulsión activa, provocan altos niveles de resistencia a tetraciclina en cepas aisladas de muestras de pollos (Abdi-Hachesoo *et al.*, 2014).

Otro mecanismo de resistencia que actúa en sinergia con los mecanismos ya explicados anteriormente es la acción de la bomba de expulsión CmeABC. Se ha demostrado la acción de este sistema de expulsión en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos en un 89% de las cepas resistentes a tetraciclina y en el 90% para *C. coli* (Zhang *et al.*, 2017).

1.5.3 Quinolonas

El primer miembro de la familia de las quinolonas fue el ácido nalidíxico, introducido en la clínica en 1962 y utilizado para el tratamiento de infecciones urinarias causadas por bacterias entéricas (Emmerson and Jones, 2003). En la década de los 80 surge la segunda generación de quinolonas, las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacino y ofloxacina). Estas nuevas drogas disponen de una mayor actividad contra la ADN girasa, una mayor penetración en los organismos grampositivos y una mejor farmacocinética (Andriole, 2005).

El mecanismo de acción de las quinolonas se centra en la ADN Topoisomerasa II (ADN girasa) y la ADN Topoisomerasa IV. Las dos enzimas intervienen tanto en la replicación como en la transcripción del ADN, así como en la reparación y almacenamiento del material genético (Levine *et al.*, 1998). En ambos casos las dos enzimas son heterodímeros formados por cuatro subunidades, en la ADN girasa dos subunidades tipo A y dos tipo B (codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente) y en la ADN topoisomerasa IV dos subunidades tipo A y dos tipo B (codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente). Las quinolonas interaccionan

con estas dos enzimas, impidiendo la replicación del ADN, aunque con diferencias, ya que por lo general en las bacterias gramnegativas su objetivo es la ADN girasa y en las bacterias grampositivas la Topoisomerasa IV. Aunque el mecanismo exacto por el que las quinolonas producen la pérdida de viabilidad de la bacteria no está perfectamente conocido, se teoriza con la posibilidad de que se origine una acumulación de ADN cromosómico fragmentado y de reactivos tóxicos. Dentro de la secuencia de aminoácidos de las girasas o topoisomerasas existe una región denominada QRDR (*Quinolone-resistance Determining Region*) localizada en la zona amino-terminal (entre los aminoácidos 67-106 en las bacterias gramnegativas) de la enzima. Es en los aminoácidos de esta región, que topológicamente se localizan en la superficie de la estructura cuaternaria de la enzima, donde interaccionan las quinolonas, provocando su efecto deletéreo (Aldred *et al.*, 2014).

Los principales mecanismos de resistencia a las quinolonas son mutaciones en las regiones determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), del gen *gyrA*, en el caso de las bacterias gramnegativas, o de *parC*, en las grampositivas (Smith and Fratamico, 2010). A parte de estas mutaciones, se han descrito otros mecanismos de resistencia a quinolonas como son la reducción de la acumulación intracelular del antimicrobiano (por disminución de la permeabilidad de la membrana externa o por aumento de la actividad de expulsión) y la protección de las dianas mediante proteínas Qnr. Estos genes *qnr* son transportados por plásmidos, confieren un nivel bajo de resistencia a fluoroquinolonas en otras especies bacterianas, pero no han sido descritos en *Campylobacter* (Payot *et al.*, 2006).

La mutación de *gyrA* más frecuente en *C. jejuni* y *C. coli* es Thr86Ile, aunque otras mutaciones poco frecuentes también se han detectado como Asp90Asn y Thr86Lys, que confieren valores inferiores de resistencia a quinolonas (8-16 µg/ml), Thr86Ala (2 µg/ml), Thr86Val, Asp90Tyr y las mutaciones dobles Thr86Ile, Pro104Ser y Thr86Ile, Asp90Asn (Payot *et al.*, 2006).

En *Campylobacter* hay evidencias de que la diana secundaria (topoisomerasa IV) está ausente. Tampoco han sido descritas mutaciones en *Campylobacter* en la subunidad GyrB (Payot *et al.*, 2006). La ausencia de una diana secundaria sugiere que solo la modificación de la subunidad GyrA es responsable de conferir un fenotipo de elevada resistencia a las fluoroquinolonas en *C. jejuni* y *C. coli* (Wieczorek and Osek, 2013).

La resistencia a ciprofloxacina presente en *Campylobacter spp.* ha sido reportada en casi la totalidad de las cepas analizadas en varios estudios, tanto en cepas aisladas de muestras de humanos como de pollos (Kinana *et al.*, 2006; Maesaar *et al.*, 2016); y en algunos casos, conforman el patrón de la multiresistencia unido a ampicilina y tetraciclina en un 98% de las cepas (Zhang *et al.*, 2017).

1.5.4 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas, de amplio espectro y comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos grampositivos y gramnegativos. Estas moléculas actúan a nivel del ribosoma, uniéndose a la subunidad 30S e interrumpiendo el proceso de alargamiento de péptidos, lo cual provoca que el ribosoma sea más propenso a producir errores en la traducción, lo que dará lugar a una síntesis anómala de proteínas (Davis, 1987). Entre los principales antimicrobianos que conforman este grupo se encuentran la gentamicina, la kanamicina, la neomicina y la estreptomicina.

Entre los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos está la modificación enzimática, por lo que los antibióticos modificados no pueden unirse al ribosoma perdiendo su efectividad bactericida (Shaw *et al.*, 1993). Las enzimas que modifican los aminoglucósidos se dividen en tres grandes grupos basados en la reacción que median: aminoglucósidos-fosfotransferasas (APH), aminoglucósidos-nucleotidiltransferasas (ANT), también denominadas aminoglicósido-adenililtransferasas (AAD), y aminoglucósidos-acetiltransferasas (AAC). Enzimas de los tres grupos han sido detectadas en diferentes cepas de *Campylobacter* (Aarestrup and Engberg, 2001).

En un estudio realizado con cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de humanos y de carne de pollo en Estados Unidos se evidenció la presencia de dos genes bifuncionales (*aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia* y *aac(6')-Ie/aph(2'')-If₂*), los cuales confieren resistencia a gentamicina, sin embargo la presencia de *aacA4* no fue detectada en ninguna de las cepas estudiadas (Zhao *et al.*, 2015).

Del grupo de las APH se ha descrito el gen *aph(3')* que confiere resistencia a kanamicina, neomicina y, en algunas variantes, a gentamicina (Shaw *et al.*, 1993). Otro gen de resistencia a kanamicina, *aph7*, fue identificado en un plásmido de 14-kb (pS1178) en cepas de *C. jejuni* aisladas de un paciente con gastroenteritis en Seattle,

Estados Unidos. Además, se han encontrado las diferentes variantes del gen *aph(2'')*. El gen *aph(2'')*-I_g determinante de la resistencia a gentamicina se describió en cepas de *C. coli* aisladas de muestras humanas (34.2%) y de carne de pollo (95%) (Zhao *et al.*, 2015), el gen *aph(2'')*-I_f se describió en cepas de *C. jejuni* (15.6%) y en *C. coli* (79%) aisladas de pollos y cerdos (Yao *et al.*, 2017).

Del grupo ANT se ha identificado el gen *ant(6)* en cepas de *C. fetus* aisladas de terneros de engorde, también denominado *aadE*, de origen plasmídico en su generalidad. Este gen, con capacidad transferible a otras especies de *Campylobacter*, confiere resistencia a la estreptomicina y forma parte de una isla de patogenicidad unido a genes de resistencia a tetraciclina como *tet* (44), descrito este último en otros microorganismos (Yao *et al.*, 2017).

Los genes mayormente descritos en *Campylobacter*, que confieren resistencia frente a aminoglucósidos, son los genes *aph* y *ant*. El gen *aph* se ha descrito presentando una prevalencia del 5.3% en cepas de *C. coli* aisladas de muestras tanto de leche cruda como de carcasas de ternera en un estudio realizado en Tanzania (Kashoma *et al.*, 2016). Por su parte, en un estudio realizado en China en 2017, con cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos y cerdos la prevalencia del gen *aph* fue del 79.9%. En este estudio, el gen identificado fue *aph(2)*-I_f e incluso mostró la mayor prevalencia en comparación otros genes como *aacA* y *aphD* (Yao *et al.*, 2017).

El gen *ant(6)* o también denominado *aadE*, (Yao *et al.*, 2017) se ha descrito en un estudio con cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos realizado en China, donde de 138 cepas se identificó la prevalencia de la resistencia a aminoglucósidos en un 71% para las cepas de *C. coli*, las cuales conformaban un clon, y en menos porcentaje (5.6%) para las cepas de *C. jejuni*. El mecanismo de resistencia identificado en las cepas de *C. coli* fue por la presencia de un gen clúster, *aadE-sat4-aphA-3*, el cual confería resistencia a kanamicina y gentamicina, mientras que en las cepas de *C. jejuni* solo fue identificado el gen *aphA-3*. Curiosamente este gen clúster fue localizado, mediante estudios de hibridación, en el cromosoma de la bacteria (Qin *et al.*, 2012).

1.5.5 Macrólidos

Los macrólidos son compuestos que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de tipo lactona, al cual se le unen varios deoxiazúcares como la cladinosa o la desosamina. De forma general se suelen englobar los macrólidos junto con otros antibióticos en lo que se denomina grupo MLKSO (Macrólidos-Lincosamidas-Ketólidos-Streptogramina-Oxazolidinona), ya que todos ellos actúan uniéndose a sitios comunes en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Roberts, 2008).

Durante la síntesis proteica en las bacterias, los péptidos sintetizados deben atravesar una estructura en forma de túnel que se encuentra en la subunidad 50S del ribosoma. Esta estructura está constituida por zonas del ARN (regiones V) y hélices Beta de dos proteínas ribosómicas: L4 y L22. El péptido recién sintetizado debe atravesar este túnel, y es ahí donde actúan los macrólidos, impidiendo su salida del ribosoma (Chopra and Reader, 2015).

Los mecanismos de resistencia a macrólidos están basados en la modificación de la diana por mutación o metilación del gen 23S ARNr, hidrólisis del antibiótico, disminución de la permeabilidad de la membrana y la acción de bombas de expulsión.

La mutación más frecuentemente encontrada en cepas de *Campylobacter* es la que ocurre en el nucleótido 2075 del dominio V del gen 23S ARNr (A2075G) (Gibreel *et al.*, 2005), aunque se ha demostrado que esta resistencia se evidencia con mayor frecuencia en cepas de *C. coli* (Qin *et al.*, 2014). En el caso de los pollos se ha evidenciado que este tipo de sustituciones nucleotídicas disminuye la habilidad del patógeno para colonizar su intestino, lo que hace que disminuya la prevalencia del patógeno en *Campylobacter* y por lo tanto la resistencia a macrólidos (Qin *et al.*, 2014). Otras mutaciones que se han descrito son en los genes *rplD* y *rplV*, los cuales codifican las proteínas ribosomales L4 y L22 y podrían estar asociadas con niveles bajos de resistencia a macrólidos (Pérez-Boto *et al.*, 2010). Recientemente se han identificado cepas de *C. jejuni* resistentes a macrólidos donde se ha determinado la presencia de una mutación en A2074T (Ohno *et al.*, 2016).

En estudios realizados en Korea, con cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de pollos se han observado altos valores de resistencia a eritromicina, siempre predominando las cepas de *C. coli* con un 19% (23/121) con respecto a las cepas de

C. jejuni en un 6.8% (5/73). Los mecanismos de resistencia que provocaron estos valores de resistencia son los correspondientes a las sustituciones en las proteínas ribosomales L4 y L22 (Lim *et al.*, 2016).

Por último otro mecanismo de resistencia a macrólidos descrito es la presencia del gen *erm* (B) identificado en una isla genómica multirresistente en cepas de *C. coli*. Estas cepas de *C. coli* se identificaron mostrando una expansión clonal en China, lugar que unido a España en un estudio publicado con cepas aisladas de muestras de pavos (Florez-Cuadrado *et al.*, 2016), han sido las dos zonas donde se ha identificado este gen *erm* (B) hasta el momento (Bolinger and Kathariou, 2017).

Esta acción se ha comprobado mediante estudios de mutación al gen *cmeB*, en los cuales se ha demostrado que al estar mutado aumenta la sensibilidad de la bacteria a varios fármacos como las quinolonas y macrólidos (Martinez and Lin, 2006).

1.5.6 Fenicoles

El cloranfenicol fue aislado por primera vez de *Streptomyces venezuelae* en 1947. Mostró ser un antibiótico de amplio espectro con una estructura química diferente donde resaltaba el grupo nitro (Ehrlich *et al.*, 1947). En los primeros años después de su introducción en el uso clínico, el cloranfenicol fue considerado como un prometedor antibiótico de amplio espectro. Sin embargo, desde mediados de los años sesenta se han observado una serie de efectos adversos en relación con su aplicación (Schwarz *et al.*, 2004). Debido a estos efectos adversos no es aconsejable su uso en humanos, y en algunos países su uso se ve limitado para animales.

Este fármaco es un inhibidor muy específico y potente de la síntesis proteica debido a la prevención del alargamiento de la cadena polipeptídica. Su actividad bacteriostática se basa en una unión reversible al centro de la peptidiltransferasa en la subunidad ribosomal 50S del ribosomas 10S (Schlunzen *et al.*, 2001).

La resistencia a cloranfenicol se ha evidenciado en organismos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* mientras que la resistencia en *Campylobacter* raramente ocurre (Ma *et al.*, 2014).

Los mecanismos de resistencia a cloranfenicol suelen estar asociados a la inactivación enzimática por acetilación del antimicrobiano, vía acetiltransferasas mediante la acción

del gen *cat*. Este mecanismo ha sido identificado en cepas de *C. coli* (Wang and Taylor, 1990b).

Otro mecanismo suele ser la inactivación del sitio diana mediante mutaciones en el dominio V del gen 23S ARNr (Ma *et al.*, 2014) identificado en cepas de *C. jejuni*. Además, otro mecanismo de resistencia presente en *C. jejuni* es la presencia del gen *cfrr* localizado en plásmidos, el cual codifica para 23S ARNr metiltransferasa que confiere resistencia a cloranfenicol (Schwarz *et al.*, 2000). Este gen se había descrito solo en microorganismos grampositivos. Recientemente, debido a su localización en plásmidos transferibles, ha sido identificado, concretamente el gen *cfrr(C)* en cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de alimentos (Tang *et al.*, 2017).

Por último, otro mecanismo de resistencia frente a cloranfenicol es el sistema de expulsión, donde se ha evidenciado la acción de los genes *cmlA*, *floR*, *floRv*, *fexA*, *fexAc* y *fex B* en cepas de *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Staphylococcus* no siendo así en cepas de *Campylobacter* (Schwarz *et al.*, 2004).

Los porcentajes de resistencia a cloranfenicol solían ser generalmente muy bajos o casi nulos en cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de humanos (Luangtongkum *et al.*, 2009; El-Adawy *et al.*, 2015), debido a que esta droga no se administra a pacientes por sus efectos hepatotóxicos, sin embargo, se continua analizando el patrón de sensibilidad en cepas aisladas de animales de granja, como en pollos y pavos. Estos bajos porcentajes de cepas resistentes a cloranfenicol se observan en estudios comparativos donde se analizan cepas de *Campylobacter* de granjas convencionales y biológicas donde no presentaron resistencia al cloranfenicol (El-Adawy *et al.*, 2015).

También en países como Estados Unidos (Englen *et al.*, 2007), España (Pérez-Boto *et al.*, 2013) y Japón (Ozawa *et al.*, 2012) no se ha evidenciado resistencia a cloranfenicol. Sin embargo, hace unos años, en estudios epidemiológicos realizados en China se ha demostrado que la resistencia a cloranfenicol y florfenicol presente en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos han llegado a alcanzar valores de 24.5% y 61.7%, respectivamente. En otros países, como Brasil, los niveles de resistencia a cloranfenicol han alcanzado valores de hasta 37.5%. Los mecanismos de resistencia identificados en estos estudios han sido la sustitución nucleotídica G2073A en el dominio V del gen 23S ARNr (Li *et al.*, 2015).

1.5.7 Fosfomicina

La fosfomicina penetra en las bacterias a través de dos sistemas de permeasas, uno que transporta el L- α -glicerol- fosfato y otro, inducible, que lleva la D-glucosa-6-fosfato al interior de la célula bacteriana. Una vez dentro actúa impidiendo la síntesis de su pared, inhibiendo por competición, al ser análogos, la enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-O-enolpiruvil transferasa (MurA). El antibiótico actúa sobre las bacterias en fase de crecimiento. Este mecanismo de acción hace que el efecto de la fosfomicina sea bactericida, existiendo una correlación entre la cinética de su actividad y la tasa de crecimiento bacteriano (Skarzynski *et al.*, 1996).

El mecanismo más común de resistencia frente a la fosfomicina es la modificación por mutación del sitio diana, MurA o la sobreexpresión de esta. Otros mecanismos que se han descrito en la resistencia bacteriana a este antibiótico son la disminución de la permeabilidad de la membrana mediante la mutación de genes estructurales (permeasas) de la bacteria, así como la modificación del propio antibiótico, mediante enzimas que producen cambios químicos que lo inactivan, como son FosA, FosB o FosX (Castañeda-García *et al.*, 2013; Giske, 2015).

Hasta hace tres años no se había caracterizado ningún mecanismo de resistencia a fosfomicina en las cepas de *Campylobacter*, por lo que la administración de fosfomicina ante episodios de campilobacteriosis en humanos era totalmente segura. En 2015 se identificó un gen de resistencia, tipo *fosX* (*fosX^{CC}*) localizado en una isla genómica multirresistente (MDRGI) en cepas de *C. coli* aisladas de cerdos, capaz de conferir resistencia a fosfomicina (Wang *et al.*, 2015)

Tabla 2: Mecanismos de resistencia a antibióticos descritos en cepas de *C. jejuni* y genes involucrados.

Grupo	Antibiótico	Mecanismo de resistencia a antibióticos descritos en <i>Campylobacter</i>	Genes involucrados	Referencias
Betalactámicos	Ampicilina	Inactivación enzimática por betalactamasa codificadas cromosomalmente	<i>bla_{oxa-61}</i>	(Alfredson and Korolik, 2005, 2007)
		Disminución de la capacidad de permeabilidad de la membrana debido a proteínas MOMP	<i>cmeABC</i>	(Kurinčič <i>et al.</i> , 2007)
		Expulsión activa por la bomba CmeABC		(Lin <i>et al.</i> , 2002)
Derivado del ácido fosfónico	Fosfomicina	Disminución de la permeabilidad de la membrana	<i>fosA</i> <i>fosX^{CC}</i>	(Kurinčič <i>et al.</i> , 2007)
		Modificaciones enzimáticas del antibiótico por transferasas codificadas en plásmidos		(Giske, 2015)
		Modificación del sitio de unión a la fosfomicina por un mecanismo desconocido		(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Macrólidos	Eritromicina	Mutación en el gen 23S rARN	<i>cmeABC</i>	(Gibreel <i>et al.</i> , 2005)
		Disminución de la capacidad de permeabilidad de la membrana debido a proteínas MOMP		(Kurinčič <i>et al.</i> , 2007)
		Expulsión activa por la bomba CmeABC		(Cagliero <i>et al.</i> , 2005)
Tetraciclinas	Tetraciclina	Protección del sitio de unión al ribosoma por RPP (del inglés Ribosomal Protection Proteins)	<i>tetO</i>	(Taylor and Courvalin, 1988; Li <i>et al.</i> , 2013)
		Expulsión activa por la bomba CmeABC	<i>cmeABC</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2002)
		Expulsión activa	<i>tetA</i>	(Abdi-Hachesoo <i>et al.</i> , 2014)
Aminoglucósidos	Gentamicina	Modificación enzimática, las cuales son usualmente de origen plasmídico	<i>aph</i> ; <i>aad</i> ; <i>ant</i>	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	Kanamicina			
Quinolonas	Ácido nalidíxico y Ciprofloxacina	Inactivación del sitio activo/ mutaciones en el gen que codifica para la ADN girasa y Expulsión activa por la bomba CmeABC	<i>gyrA</i> <i>cmeABC</i>	(Smith and Fratamico, 2010)
		Protección de las dianas mediante proteínas Qnr	<i>qnr</i>	(Payot <i>et al.</i> , 2006)
Fenicoles	Cloranfenicol	Inactivación enzimática por acetilación del antimicrobiano, vía acetiltransferasas	<i>cat</i>	(Wang and Taylor, 1990a)
		Inactivación del sitio diana mediante mutaciones en el dominio V del gen 23S rARN	23S ARNr	(Ma <i>et al.</i> , 2014)
		Inactivación enzimática por metiltransferasas sintetizadas por el gen <i>cfr</i>	<i>cfr</i>	(Schwarz <i>et al.</i> , 2000)

RPP: del inglés *Ribosomal Protection Proteins*

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Describir, a nivel molecular, la población de *Campylobacter jejuni* a partir de 150 cepas aisladas de tres poblaciones diferentes: humanas (50), pollos de engorde (50) y aves salvajes (50).

En la descripción se incluyeron los siguientes objetivos específicos:

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar la diversidad clonal de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos de engorde y aves salvajes mediante PFGE.
2. Determinar la filogenia de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos de engorde y aves salvajes mediante MLST.
3. Determinar la posible difusión de determinados clones de *C. jejuni* entre humanos, pollos de engorde y aves salvajes.
4. Determinar el perfil de sensibilidad a antibióticos de estas cepas frente a los antimicrobianos de mayor uso en clínica y veterinaria, y comparar la prevalencia de las resistencias entre las tres poblaciones del estudio.
5. Determinar la presencia de los genes de resistencia a antimicrobianos descritos en la bibliografía y su localización en el genoma de la bacteria para analizar el potencial de transmisión de los mismos.
6. Evaluar la técnica de secuenciación masiva del genoma (*WGS*) como herramienta para el estudio de los puntos anteriores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas del estudio

En este estudio se analizaron 150 cepas de *Campylobacter jejuni* las cuales provenían de tres poblaciones diferentes: 50 de pacientes (H), 50 de pollos de granja (B) y 50 de aves salvajes (W).

En el caso de las muestras aisladas de humanos estas fueron obtenidas en el transcurso del año 2014 en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y procedían de pacientes de la comunidad que presentaban un episodio de gastroenteritis. La población estaba representada por un 54% de niños de edad comprendida entre los 0 y los 16 años, un 30% de adultos de entre 17 y 64 años y un 16% de ancianos de edades ≥ 65 años. El 58% fueron hombres y el 42% mujeres (anexo 1).

Las cepas aisladas de pollos de engorde, del género *Gallus gallus*, se obtuvieron de muestras de intestino ciego en siete mataderos diferentes de Cataluña (A-G), los cuales se abastecían de cuatro granjas (CAT, CT, ES, EU) ubicadas en Barcelona, Lleida y Tarragona. Las muestras se obtuvieron entre los años 2009 y del 2011 al 2013 (anexo 2).

Por último, las restantes cepas fueron aisladas de muestras de hisopos cloacales de aves salvajes, las cuales fueron donadas por el Centro de Investigación de Salud Animal (CReSA) y la Agencia de Salud Pública de Barcelona (ASPB), entre los años 2008 y 2015. Esta colección la comprenden cepas aisladas de cinco tipos de aves: una cepa aislada de *Spatula clypeata* (pato del norte) proveniente del Delta del Ebro, dos cepas aisladas de *Ciconia ciconia* (cigüeña blanca) provenientes de Lleida, cinco cepas aisladas de *Corvus corax* (cuervos comunes) de los alrededores de Sabadell (provincia de Barcelona), 14 cepas aisladas de *Columba livia* (palomas domésticas) provenientes de Barcelona, siete de *Larus michahellis* (gaviota patiamarilla) de Islas Medes (5 cepas) y de Barcelona (2 cepas) y 21 de *Larus audouinii* (gaviota Audouin) del Delta del Ebro (13 cepas) y de Isla Alborán (8 cepas) (anexo 3).

La colección de cepas se guardó en dos ceparios distintos, uno en el Servicio de Microbiología y el otro en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona.

Todos los datos se detallan en las tablas de los anexos 1, 2 y 3.

3.1.1 Aislamiento e identificación

Para el aislamiento de las cepas de *Campylobacter* a partir de muestra fecal humana se utilizó el medio de aislamiento de CCDA (del inglés *Charcoal Cefoperaxone Desoxycolate Agar*, BioMérieux[®], Francia). Las placas se incubaron a 42°C durante 48h en una jarra para anaerobiosis de 1 litro con un sobre de microaerofilia GENbox (BioMérieux[®], Francia) con el cual se logró una atmósfera de 10% de CO₂ y 5% de O₂. Una vez se obtenían las primeras colonias en el medio selectivo, se realizó un subcultivo a Agar Sangre, se incubó a 42°C durante 48h (BioMérieux[®], Francia) con el fin de observar la morfología en este medio, a partir del cual se llevó a cabo la identificación y posterior crioconservación.

Tras obtener un cultivo puro en Agar Sangre a partir de una colonia aislada en el medio selectivo, se procedió a la recogida de todo el inóculo de la placa con un asa de siembra estéril que se introdujo en un criovial: Cryoinstant[™] (DeltaLab, España) de 2ml, conteniendo 25 crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores que actúan como conservante. Transcurridos 5min se vertió el medio líquido y luego se congeló a -80°C.

Las cepas de origen animal fueron aisladas y conservadas en CReSA, del cual se obtuvo una copia del criotubo. De la misma manera, una copia del criotubo de muestras humanas se cedió al Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Barcelona para que procedieran con sus estudios.

La identificación de todas las cepas del estudio (humanas y de origen animal) se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*), (Bruker Daltonics, Estados Unidos), utilizando como cepa control *E. coli* ATCC 25922. Para la identificación se precisó una colonia de la cepa a determinar, crecida en cultivo puro y fresco (24h) en medio Agar Sangre (BioMérieux[®], Francia).

3.2. Estudio de la sensibilidad

Tras disponer de la identificación de los aislados, se prosiguió con el estudio de la sensibilidad. Un antibiótico se considera efectivo frente a una bacteria cuando administrado a dosis terapéuticas en una persona inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa *in vitro* determinando la CMI. El valor de la CMI se puede determinar

directamente mediante técnicas de microdilución o indirectamente mediante la técnica de disco difusión, la cual fue la escogida en nuestro estudio.

La validación y la estandarización de los resultados se realizó siguiendo las recomendaciones del *CLSI* (del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2017) y del *EUCAST* (del inglés *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*) (EUCAST, 2013).

Para este estudio la sensibilidad a los 12 antimicrobianos se ensayó por el método de difusión en disco en medio Mueller-Hinton (BioMeriux[®], Francia) suplementado con 5% de sangre de oveja desfibrinada. Las cepas se sembraron en placas de agar sangre, a partir del cultivo congelado, y se incubaron durante 48h en una estufa a 42°C en microaerofilia. Una vez detectado el crecimiento bacteriano, se tomaron una o dos colonias y se disgregaron en 1,5 ml de caldo triptona (CT) hasta obtener una medida de aproximadamente 0,5 U de Mc Farland (DO625nm = 0,08-0,1), obteniéndose una concentración celular de 1-2 x10⁸ UFC/ml. Con estos inóculos se procedió a la siembra con un hisopo en las placas de Mueller-Hinton (BioMeriux[®], Francia), se colocaron los discos de antibióticos y se incubaron a 37°C durante 24h en microaerofilia. Los criterios para la interpretación del halo fueron los descritos por el CLSI para los antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, kanamicina, gentamicina, ácido nalidíxico, estreptomina, fosfomicina y cloranfenicol y por EUCAST para los antibióticos tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacina (Tabla 3).

3.3. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Otra de las herramientas muy aplicadas para la caracterización de las cepas de *Campylobacter* lo constituye la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). El PFGE es una técnica que se desarrolló en 1984 (Schwartz and Cantor, 1984) con el objetivo de separar largos fragmentos de ADN en orden de dividir el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y calcular su tamaño. Desde esa fecha esta técnica ha tenido alto impacto en el estudio de la biología molecular.

Tabla 3: Antibióticos testados por difusión en agar mediante la técnica de disco difusión y puntos de cortes según los criterios de CLSI y EUCAST.

Antibiótico	Concentración (µg/disco)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Ampicilina (AMP)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Tetraciclina (TET)	30	< 30		≥ 30
Imipenem (IMP)	10	≤ 19	20-22	≥ 23
Eritromicina (ERY)	15	< 20		≥ 20
Ciprofloxacina (CIP)	5	< 26		≥ 26
Ácido nalidíxico (NAL)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Kanamicina (K)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina (G)	10	≤ 13	13-14	≥ 15
Estreptomicina (S)	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Cloranfenicol (CHL)	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Fosfomicina (FOS)	200	≤ 12	13-15	≥ 16

R: resistentes; S: sensibles; I: intermedio (los valores intermedios se consideraron resistentes).

El PFGE tiene como base la migración del ADN en zig-zag a través de los poros de un gel de acuerdo a los impulsos eléctricos. Debido a los pulsos, o cambios en la dirección del campo eléctrico, es que las moléculas mayores de 10Mb pueden migrar. Los diferentes tamaños de los fragmentos requieren diferentes tiempos para reorientarse en el campo eléctrico. De esta forma estos fragmentos se pueden mover a diferente velocidad a través del gel de agarosa. Este movimiento es proporcional al peso molecular del fragmento de ADN (Herschleb *et al.*, 2007).

El PFGE provee de un único perfil de bandas a cada microorganismo con la utilización de una o dos enzimas de restricción. Debido a esta cualidad se ha convertido en la técnica de tipaje predominante en *C. jejuni* (Swaminathan *et al.*, 2001).

Al principio de su aplicación (Yan *et al.*, 1991), la duración de la técnica para *C. jejuni* era de varios días; hoy en día la duración se ha acortado hasta llegar a realizarse en 24h (Ribot *et al.*, 2001; Michaud *et al.*, 2001).

Su procedimiento comprende: la preparación del ADN, la digestión utilizando las endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte, la separación de los fragmentos del ADN a través de la electroforesis en gel de campo pulsado y por último la visualización e interpretación de los patrones de bandas (pulsotipos).

Las diferentes bandas generadas por el PFGE son debidas a las variaciones en la longitud de los segmentos de ADN obtenidos del corte en los sitios de restricción del

cromosoma bacteriano. El PFGE no proporciona información del pool de genes presentes en la bacteria estudiada. Se asume que la cepa con idéntico patrón de PFGE puede tener un origen similar. Basándonos en los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995), el cual clasificó la relación existente entre las cepas en: indistinguibles, cercanamente relacionadas, posiblemente relacionadas y cepas no relacionadas, podemos analizar un grupo de aislados y sacar conclusiones de la relación existente entre ellos.

Además es muy importante que los pulsotipos sean analizados tras analizar los datos obtenidos de un cuestionario epidemiológico que definen el tiempo y el lugar donde ha tenido lugar el brote, y siempre tener presente que los datos deben tener una concordancia epidemiológica (Van Belkum *et al.*, 2007).

Sin embargo, existen algunas limitaciones del PFGE, una de ellas es la reproducibilidad en los patrones de bandas, por lo cual es importante el uso de un software para la estandarización y análisis cuando se estudian patrones de bandas de un largo número de aislados (de Boer *et al.*, 2000). Esta variabilidad, que podemos observar entre cepas de un mismo clon, puede limitar la aplicación del PFGE para identificar brotes (Hedberg *et al.*, 2001). Otra de las limitaciones de esta técnica radica en que algunas cepas se lisan y no se observa el patrón de bandas sino un difuminado a lo largo del carril de corrida.

A pesar de estas dificultades el PFGE es uno de los métodos disponibles más discriminativos.

En nuestro estudio el PFGE se realizó siguiendo las normativas descritas por *PulsNet (Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Campylobacter jejuni)* publicadas en la última actualización del 2013.

Se partió de cultivos frescos crecidos en las placas de agar sangre, durante 48h a 42°C. El procedimiento constó de las siguientes fases: preparación de los insertos, lisis y lavado, digestión con enzimas de baja frecuencia de corte, electroforesis y tinción, visualización y análisis.

3.3.1 Preparación de insertos, lisis y lavado

Para realizar los insertos, en el primer día se tomaron de tres a cinco colonias y se resuspendieron en 1 ml de CSB (Tris 100 mM-EDTA 100 mM; pH=7,5) hasta obtener una suspensión homogénea. De esta suspensión se tomaron 250µl y se añadieron 1,2µl

de proteinasa K 50mg/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Luego se pesó la agarosa Incert™ agarose (Lonza®, Suiza) y se diluyó en TE al 2% (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y se mantuvo en el *heat-bloquer* a 55°C hasta que se dispensó en los moldes. Para formar el inserto se mezcló la solución microbiana y la agarosa templada y se dispensó en los moldes, los cuales se incubaron a 4°C durante 30min. Una vez solidificados los bloques de agarosa se colocaron en tubos tipo eppendorfs de 2ml con 2ml de tampón de lisis (5g SLS; 250ml CSB) y 12µl de proteinasa K 50mg/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Para realizar la lisis se procedió a incubar estos insertos en un baño a 55°C durante 2h con una agitación moderada.

Al día siguiente se tomaron los insertos y auxiliados por un portaobjetos se procedió a cortarlos (1/3) para el lavado. Se realizaron para cada digestión cinco lavados, dos con agua estéril y tres con TE, incubando los insertos en un baño termostatado a 55°C durante 10min con una agitación moderada.

3.3.2 Digestión con enzimas de baja frecuencia de corte, condiciones de corrida del gel de electroforesis

Transcurrido ese tiempo del lavado los insertos fueron colocados en otro tubo tipo eppendorf para la digestión con las enzimas de restricción SmaI y KpnI (40 U/µl) (Roche, Suiza). Para la digestión de los insertos con cada enzima se preparó en un tubo tipo eppendorf una solución que contenía 177µl agua, 20 µl del tampón (tp) correspondiente (tp A en SmaI y tp L en KpnI), 2 µl de BSA 10 mg/ml (New England BioLabs, Estados Unidos) y 1 µl de enzima en cada caso. Los insertos en esta solución se incubaron en el baño a 25°C y 37°C, respectivamente, para cada enzima durante 2h con agitación moderada. Durante el tiempo en que ocurría la digestión se preparó la cubeta del CHEF-MAPPER, donde se realizó un lavado con agua estéril para eliminar restos de tampón anterior. Se pesó la agarosa SeaKem® Gold Agarose (Lonza, Suiza) al 1%. Se preparó el molde y el peine donde fueron ubicados los insertos. Se preparó tampón TBE al 0,5X (0,9 M Tris, 0,9 M ac. bórico, 0,02 M pH 8,0 EDTA). Se preparó la cubeta 2,5 L de tampón y 750µl de tiourea al 0,1M (New England BioLabs, Estados Unidos) por cada litro de tampón y se esperó hasta que alcanzara los 14°C luego de haber encendido la unidad de refrigeración del CHEF. Una vez lista la cubeta y terminada la digestión se procedió a colocar los insertos en el peine y el marcador de

peso molecular Lambda Ladder (BioRad[®], Estados Unidos). Estos marcadores fueron colocados en los extremos y en el centro del peine. Cuando la agarosa estuvo a unos 40°C aproximadamente se vertió en el molde y se esperó a que se solidificara con los insertos dentro para su introducción en la cubeta.

El programa descrito para SmaI fue de 6,8s-35,4s y para KpnI fue de 5,2s-42,3s durante 19h para ambos.

3.3.3 Tinción, visualización y análisis

Al tercer día se retiró el gel del soporte, se colocó en una cubeta con 500ml del mismo tampón de corrida añadiéndose 40µl de bromuro de etidio y se colocó en un agitador, con potencia moderada, por 45min. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la foto con luz UV. Los patrones de macrorrestricción fueron analizados utilizando el programa Bionumerics v7.6.3 (Applied Maths, Bélgica).

El análisis de los patrones de bandas de PFGE para SmaI y KpnI fueron comparados con el mismo software utilizando el coeficiente de Dice y algoritmo UPGMA (de sus siglas en inglés: *unweighted pair group method using arithmetic averages*). La optimización utilizada fue del 2% y la posición de tolerancia del 1%.

3.4. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Una de las herramientas necesarias para la caracterización filogenética de las cepas lo constituye la técnica del MLST. Esta técnica está basada en la comparación de las secuencias de genes conservados (*housekeeping*). El amplio uso de esta metodología unido a la existencia de la base de datos *online* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>), ha permitido un avance en la comprensión de la epidemiología y biología de la población a escala local, nacional y global (Colles and Maiden, 2012).

El esquema de MLST para *Campylobacter* se basa en la variación de los fragmentos de 7 genes *housekeeping*. Estos genes son: *aspA* (aspartasa), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidromexil transferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transcetolasa) y *uncA* (subunidad alfa de la ATP sintasa). Son genes altamente conservados por estar implicados en rutas metabólicas de gran importancia en la supervivencia celular (Dingle *et al.*, 2001). La combinación de estos perfiles nos permite detectar variantes alélicas que definen líneas clonales relativamente estables. La asignación a esta combinación de genes se denomina secuencia tipo (ST). Las

secuencias tipo que comparten cinco o más alelos se agrupan formando los llamados complejos clonales (Complejo clonal ST-), que tomarán el nombre de una secuencia tipo central de la que descienden todas las demás del complejo, de manera que en cada uno quedaran incluidas poblaciones bacterianas genéticamente relacionadas pero no idénticas (Dingle *et al.*, 2001).

La metodología usada para el MLST de *Campylobacter* es la descrita en el sitio web previamente mencionado (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Para realizar esta técnica partimos de las cepas en cultivo fresco donde se le realizó la extracción del ADN genómico, se amplificaron los genes requeridos mediante PCR y se enviaron a secuenciar los fragmentos purificados.

3.4.1 Extracción del ADN genómico

Para la extracción genómica se utilizó el kit GenElute™ (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante a partir del crecimiento obtenido en placa luego de 48h de cultivo.

Luego de la extracción de ADN se tomaron 2µl y se cuantificó la concentración del mismo (ng/µl) mediante el equipo Epoch (BioTek, Estados Unidos) y la utilización del software *Gen5*.

3.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro* mediante el cual un segmento particular de ADN puede ser replicado de forma específica. El procedimiento involucra un termociclador y una serie de productos que se enumeran a continuación:

- Dos cebadores, u oligonucleótidos, o secuencias cortas “cebadoras” de ADN que flanquean el fragmento de ADN que va a ser amplificado. La concentración de los iniciadores para hacer la PCR es 10mM.
- ADN a amplificar, que debe desnaturalizarse por calor para separar las hebras y ser “copiado”. La temperatura que se requiere para ello suele ser próxima a los 90°C.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), a partir de los cuales se sintetizará el nuevo ADN, y que se utilizan a una concentración final de 2mM.

- La polimerasa (acompañada de su tampón) que será la encargada de sintetizar el ADN. En este trabajo se empleó la Taq polimerasa y el tampón del Kit Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).
- Otros componentes de la reacción PCR a tener en cuenta son: el pH, que debe ser óptimo para la enzima y la temperatura de hibridación de los ácidos nucleicos.

La master mix tiene estas proporciones:

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	25.75 μ l
Tampón (5x)	10 μ l
dNTP (2mM)	5 μ l
Iniciador 1 (10uM)	2 μ l
Iniciador 2 (10uM)	2 μ l
Taq pol (5U/ μ l)*	0.25 μ l

*volúmenes para la TaqADN polimerasa citada

La secuencia general del proceso consta de tres etapas, que se repiten 30 veces:

1. **Desnaturalización:** el ADN a amplificar debe desnaturalizarse por calor para separar las hebras y ser “copiado”. La temperatura que se utiliza es 94°C, que se extiende durante 1 min.
2. **Hibridación:** Unión de los oligonucleótidos a sus secuencias complementarias del ADN a amplificar, que se logra bajando la temperatura a unos 50-65°C, dependiendo de cada caso. En las Tablas 6 y 8 se muestran los oligonucleótidos empleados en este estudio y las temperaturas de hibridación utilizadas. La hibridación se realiza durante 30seg.
3. **Extensión:** Una vez unidos los oligos al ADN que se desea amplificar comienza la extensión desde los extremos 3' de los oligos por la polimerasa. La temperatura de incubación es de 72°C y el tiempo es variable, con un mínimo de 1 min.

Los oligonucleótidos y las temperaturas de hibridación utilizados para la PCR-MLST se muestran en la tabla 4.

Para la visualización de los amplificados obtenidos se emplea la electroforesis en gel de agarosa. A través de la electroforesis se puede observar los tamaños del ADN al ser comparado con un marcador de peso molecular. En nuestro estudio dependiendo del

tamaño esperado de cada fragmento que se ha separado se ha ajustado la concentración de agarosa en el rango 1-2%.

Tabla 4: Relación de cebadores utilizados para la amplificación por PCR-MLST según pubMLST.org/campylobacter/.

GEN <i>diana</i>	Primer	secuencias 5'-3'	TA	Tamaño del amplificado (bp)
<i>aspA</i>	A9-f	AGTACTAATGATGCTTATCC	50°C	899
	A10-r	ATTCATCAATTTGTTCTTTGC		
<i>glnA</i>	A1-f	TAGGAAGCTGGCATCATATTACC	60°C	1262
	A2-r	TTGGACGAGCTTCTACTGGC		
<i>gltA</i>	A1-f	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG	60°C	1012
	A2-r	CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG		
<i>glyA</i>	A1-f	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG	60°C	816
	A2-r	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC		
<i>pgm</i>	A7-f	TACTAATAATATCTTAGTAGG	50°C	1150
	A8-r	CACAACATTTTTCATTTCTTTTTC		
<i>tkt</i>	A3-f	GCAAACCTCAGGACACCCAGG	60°C	1102
	A6-r	AAAGCATTGTTAATGGCTGC		
<i>uncA</i>	A7-f	ATGGACTTAAGAATATTATGGC	50°C	1102
	A8-r	ATAAATTCCATCTTCAAATTCC		

TA: temperatura de hibridación inglés *temperature of anilling*

Descripción de los ciclos utilizados para MLST y BLEE.

	Ciclos	MLST:	Ciclos	BLEA
Desnaturalización	1	95°C x 3min 94°C x 2min	1	95°C x 5min 95°C x 30 segundos
Hibridación	35	TA x 1min 72°C x 1min	30	TA x 30 segundos 72°C x 1min
Extensión	1	72°C x 5min	1	72°C x 7min

TA: temperatura de hibridación; BLEE: betalactamasas de espectro extendido

Para preparar el gel de electroforesis, se pesó la agarosa, SeaKem[®] Gold Agarose (Lonza, Suiza), y se fundió por calentamiento en TBE 0,5x (Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos) hasta obtener una disolución clara y transparente. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C para añadir el bromuro de etidio (Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos). Se vertió sobre un molde de electroforesis y se esperó a temperatura ambiente hasta que solidificó.

El gel se introdujo en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad[®], Estados Unidos) que contenía TBE 0,5x (Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos). Los geles se cargaron con 10µl del producto de PCR junto con 2µl de tampón de carga. Como marcador de peso

molecular se utilizó el ADN *Molecular weight* VIII (Roche[®], Suiza) que mostraba pesos de entre 67 y 1114 bp. Se aplicaron voltajes entre 100-110V a un amperaje de entre 30 y 40 mA y la visualización de los geles se realizó con un transiluminador de luz ultravioleta con el software incorporado (TM-40, UVP, Fisher Scientific, Estados Unidos).

3.4.3 Purificación y secuenciación de los amplificados

Para la purificación de los amplificados se empleó el sistema comercial ExoSap (Affimetrix, Estados Unidos) donde se mezclaron 6µl del producto y 12µl de producto de PCR. El ADN se purificó directamente desde los amplificados obtenidos de las reacciones de PCR. El ciclo de purificación es de 30min, 15min a 37°C y los restantes 15min a 80°C.

Los amplicones se secuenciaron en *Macrogen Inc* (Países Bajos) utilizando los oligonucleótidos que se describen en la tabla 5 y analizaron con el programa Bionumerics v7.6.3 (Applied Maths, Bélgica) y con las herramientas bioinformáticas disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 5: Relación de cebadores utilizados para la reacción de secuenciación de los siete genes *housekeeping* según pubMLST.org/campylobacter/.

GEN diana	Primer	secuencia 5`-3`	Tamaño del fragmento (bp)
<i>aspA</i>	S3-f	CCAAGTCAAGATGCTGTACC	477
	S6-r	TTCATTTGCGGTAATACCATC	
<i>glnA</i>	S3-f	CATGCAATCAATGAAGAAAC	477
	S6-r	TTCCATAAGCTCATATGAAC	
<i>gltA</i>	S3-f	CTTATATTGATGGAGAAAATGG	402
	S6-r	CCAAAGCGCACCAATACCTG	
<i>glyA</i>	S3-f	AGCTAATCAAGGTGTTTATGCGG	507
	S6-r	AGGTGATTATCCGTTCCATCGC	
<i>pgm</i>	S5-f	GGTTTTAGATGTGGCTCATG	498
	S2-r	TCCAGAATAGCGAAATAAGG	
<i>tkt</i>	S5-f	GCTTAGCAGATATTTAAGTG	459
	S6-r	AAGCCTGCTTGTCTTTGGC	
<i>uncA</i>	S3-f	AAAGTACAGTGGCACAAGTGG	489
	S4-r	TGCCTCATCTAAATCACTAGC	

3.4.4 Análisis de datos

Para el análisis de los datos se utilizó el algoritmo *Minimum Spanning Tree* (MST). Mediante este algoritmo es posible la reconstrucción de la divergencia a corto plazo y la microevolución en las poblaciones sobre la base de datos muestreados. El *minimum spanning tree* (MST) implementado en el software de BioNumerics v7.6.3 es una excelente herramienta para analizar datos de subtipos genéticos como los derivados de MLST.

3.5. Detección molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos

El segundo bloque de nuestro estudio, lo constituye la detección de genes de resistencia o mutaciones en determinado gen según los principales mecanismos de resistencia a antibióticos descritos en la literatura en *Campylobacter jejuni*. La detección de estos genes o mutaciones involucrados en la resistencia a antibióticos se analizaron en las cepas que mostraron resistencia a ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina y ácido nalidíxico, así como a gentamicina, kanamicina y estreptomina.

3.5.1 Detección de genes de resistencia mediante PCR

Se determinó la presencia de genes que causan resistencia a antibióticos mayormente descritos mediante PCR y posterior secuenciación mediante tecnología Sanger. En la tabla 6 se describen los principales mecanismos de resistencia a antibióticos descritos y evaluados en nuestras cepas, así también como los genes que están implicados en su acción. En la tabla 7 se muestran los cebadores utilizados en cada caso y las condiciones de los ciclos denominados BLEE (betalactamasa de espectro extendido), el cual se describe en el apartado 3.4.2 (PCR).

Los amplicones obtenidos de la PCR se secuenciaron en *Macrogen Inc*. El análisis y el ensamblaje de las secuencias fueron realizados utilizando el software BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths, Bélgica).

3.5.2 Localización de los genes de resistencia

3.5.2.1 PFGE con endonucleasa S1

Para determinar la localización plasmídica de los genes de resistencia detectados se empleó la técnica de *Southern blot* con posterior hibridación. Para ello empleamos la

electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Las muestras fueron digeridas con la endonucleasa S1 (Promega, Estados Unidos).

Tabla 6: Mecanismos de resistencia a antibiótico estudiados.

Grupo	Antibiótico	Mecanismo de resistencia estudiado	Genes involucrados
Betalactámicos	Ampicilina	Inactivación enzimática por betalactamasa	<i>bla_{oxa-61}</i> -type <i>bla_{BLEE}</i> *
		Protección del sitio de unión al ribosoma por RPPs	<i>tetO</i>
Tetraciclina	Tetraciclina	Expulsión activa/Bomba de eflujo	<i>tetA</i>
		Inactivación del sitio activo/ mutaciones en el gen que codifica para la ADN girasa	<i>gyrA</i> , <i>qnr</i>
Quinolonas	Ciprofloxacina Ác. nalidíxico		
Aminoglucósidos	Gentamicina	Modificación enzimática, las cuales son usualmente de origen plasmídico	**
	Kanamicina		

*BLEE: TEM, SHV, CTX-M **: *aph(2)-Ig*; *aph(3')-IIIa*; *aph(3')-IVa*; *aph(3')-VIIa*; *ant(3')-Ia*; *ant(6)-Ia*; *aph(3')-Ia*; *aph(3')-IIa*; *aph(3')-VIb*; *aac(3)-IIa*; *aac(3)-IVa*; *aac(6)-Ib*; *aac(6)-Ic*; *ant(2'')-Ia*; *aac(3')-Ia*; *aac(3')-Ib*; *aac(2')-Ia*; *aac(6)-Ia*. RPP: del inglés *ribosomal protection protein*.

La enzima S1 se utilizó en este estudio debido a su habilidad de linealizar los plásmidos presentes en una cepa, y de este modo la banda presente en la imagen del PFGE sería solo la correspondiente al plásmido. Para este análisis se procedió a seguir el protocolo descrito por Barton y colaboradores en 1995 (Barton *et al.*, 1995), donde se utiliza la endonucleasa S1 para linealizar el súper enrollamiento del ADN plasmídico, de este modo ya el ADN linealizado migra en el gel de agarosa en campo pulsado en función de su peso molecular.

La técnica difiere en pocos aspectos de la descrita para el estudio de epidemiología (PFGE, 3.3). La densidad óptica a utilizar para hacer los bloques de agarosa es mayor que la utilizada para PFGE en epidemiología.

Una vez lavados los insertos, como se describió previamente en la técnica, se procedió a cortar la tercera parte del inserto para realizar la digestión con la endonucleasa S1 de 90 U/μL (Promega, USA). Se depositó el inserto en un tubo eppendorf con 200μl de Tris-HCl 10mM durante 10min a temperatura ambiente. Este paso se realizó por duplicado. Luego se digirió el inserto con la enzima S1 a una dilución 1/100.

Tabla 7: Relación de cebadores utilizado en el estudio.

Gen diana	Primer	secuencia 5`-3`	TA	Producto (bp)	Referencia
<i>bla_{oxa-61}</i>	oxa61-f	AGAGTATAATACAAGCG	45°C	372	(Obeng <i>et al.</i> , 2012)
	oxa61-r	TAGTGAGTTGTCAAGCC			
<i>rp-bla_{oxa-61}</i>	rp-oxa61f	CGCGGATCCACTTTTTCTCATTTTGCATACCTCA	52°C	240	(Zeng <i>et al.</i> , 2014)
	rp-oxa61r	TGCTCTAGAGCCCAAACACTAAATTTAAGAAAA			
<i>tetO</i>	tetOf	GCGTTTTGTTTATGTGCG	50°C	559	(Obeng <i>et al.</i> , 2012)
	tetOr	ATGGACAACCCGACAGAAG			
<i>tetA</i>	tetAf	ATTACCGCATCCCACTGTTC	60°C	559	BLAST
	tetAr	AACTTAGGCATTCTGGCTCA			
<i>gyrA</i> *	gyrAf	GCTATGCAAAATGATGAGGC	55°C	210	Beckmann <i>et al.</i> , 2004
	gyrAr	CAGTATAACGCATCGCAGCGG			
<i>qnrA</i>	qnrAf	ATTTCTCACAGGATTTG	55°C	580	Diseñados en el laboratorio
	qnrAr	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA			
<i>qnrB</i>	qnrBf	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	55°C	264	Diseñados en el laboratorio
	qnrBr	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
<i>qnrS</i>	qnrSf	ACGACATTCGTCAACTGCAA	55°C	428	Diseñados en el laboratorio
	qnrSr	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			

TA: temperatura de hibridación, *: Para la determinación de la mutación responsable de la resistencia a quinolonas no se ha secuenciado toda la topoisomerasa.

Tabla 7: Continuación

Gen diana	Primer	secuencia 5'-3'	TA	Producto (bp)	Referencia
<i>aph(2)-Ig</i>	aph(2)-Igf (G)	TTGAGAATGCCATGGAACGGATCGG	55°C	864	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
	aph(2)-Igr (G)	GGGTCTATGGCTAGAAAGTTCACGG			
<i>aph(3')-IIIa</i>	CJ-IIIF (K, G)	GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG	60°C	382	(Crespo <i>et al.</i> , 2016)
	CJ-IIIR (K, G)	ATGTTGCTGTCTCCCAGGTC			
<i>aph(3')-IVa</i>	CJ-IVF (K, G)	GTTTGTGAAGCTGTACGCGG	60°C	568	BLAST
	CJ-IVR (K, G)	CACGGTTTGTCCCCCTTTCT			
<i>aph(3')-VIIa</i>	CJ-VIIF (K, G)	CAACCCCTCTTGTTGGTCA	60°C	892	BLAST
	CJ-VIIR (K, G)	TGCAACTCCACATCTTGCCA			
<i>ant(3')-Ia</i>	CJ-IF (S)	AGCCTCGTTCGGTTCGTAAG	60°C	574	BLAST
	CJ-IR (S)	TTAGCTGGATAACGCCACGG			
<i>ant(6)-Ia</i>	CJ-6IF (S)	GGAAGGTCGGCATCGAAACA	60°C	327	BLAST
	CJ-6IR (S)	ACTGTTCCCGCCTCTCTTCT			
<i>aph3'-Ia</i>	APH-3'-Ia F (K)	CGAGCATCAAATGAAACTGC	55°C	624	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	APH-3'-Ia R (K)	GCGTTGCCAATGATGTTACAG			
<i>aph(3')-IIa</i>	APH-3'-IIa F (K)	GAACAAGATGGATTGCACGC	55°C	624	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	APH-3'-IIa R (K)	GCTCTTCAGCAATATCACGG			
<i>aph(3')-VIb</i>	APH-3'-VIb F (K)	CGGAAACAGCGTTTTAGAGC	55°C	624	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	APH-3'-VIb R (K)	GGTTTTGCATTGATCGCTTT			

G: gentamicina; K: kanamicina; S: estreptomicina

TA: temperatura de hibridación

Tabla 7: Continuación

Gen diana	Primer	secuencia 5'-3'	TA	Producto (bp)	Referencia
<i>aac(3)-IIa</i>	AAC-3-IIa F (K, G)	GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA	55°C	563	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-3-IIa R (K, G)	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG			
<i>aac(3)-IVa</i>	AAC-3-IVa F (G)	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC	55°C	628	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-3-IVa R (G)	AGTTGACCCAGGGCTGTCGC			
<i>aac(6)-Ib</i>	AAC-6'-Ib F (G)	CGCGCGGATCCAAAGTTAGGCATCACA	50°C	540	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-6'-Ib R (G)	ACCTGTACAGGCTGGAC			
<i>aac(6)-Ic</i>	AAC-6'-Ic F (G)	CTACGATTACGTCAACGGCTGC	50°C	130	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-6'-Ic R (G)	TTGCTTCGCCCACTCCTGCACC			
<i>ant(2'')-Ia</i>	ANT-2''-Ia F (K, G)	ACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGT	55°C	572	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	ANT-2''-Ia R (K, G)	CTTTTCCGCCCCGAGTGAGGTG			
<i>aac(3')-Ia</i>	AAC-3'-Ia/Ib F (G)	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	54°C	441	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-3'-Ia R (G)	CACTTCTTCCCGTATGCCCAACT			
<i>aac(3')-Ib</i>	AAC-3'-Ia/Ib F (G)	GCAGTCGCCCTAAAACAAA	55°C	417	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-3'-Ib R (G)	GGATCGTCACCGTAGTCTGC			
<i>aac(2')-Ia</i>	AAC-2'-Ia F (G)	AGAAGCGCTTTACGATTTATTA	50°C	406	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-2'-Ia R (G)	GACTCCGCCTTCTTCTTCAA			
<i>aac(6)-Ia</i>	AAC-6'-Ia F (G)	ATGAATTATCAAATTGTG	42°C	558	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)
	AAC-6'-Ia R (G)	TTACTCTTTGATTAAACT			
TEM	TEM-F	TCGGGGAAATGTGCGCG	55°C	938	(Miró <i>et al.</i> , 2002) ⁱ
	TEM-R	TGCTTAATCAGTGAGGCACC			
SHV	SHV-F	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTTCGC	55°C	1024	(Miró <i>et al.</i> , 1998)
	SHV-R	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA			

G: gentamicina; K: kanamicina; S: estreptomicina

TA: temperatura de hibridación

Para ello, se realizó una mezcla de 200µl de tampón S1 (acetato de sodio 30mM, NaCl 50mM y sulfato de Zinc 5mM) con 0,24 µl de una dilución 1/100 de enzima S1 (2 µl S1 en 198 µl de tpS1). Se incubó la digestión en un baño a 37°C durante 45 min. Luego de transcurrido este tiempo se detuvo la reacción de digestión añadiendo 150µl de tampón ES (EDTA 0,5mM, SLS 1%; pH=9,5) y se procedió a colocar los tubos eppendorf en un recipiente con hielo durante un mínimo de 15 min. El procedimiento hasta la visualización de los plásmidos mediante PFGE se realizó del mismo modo que se describió para epidemiología (PFGE). Las condiciones utilizadas fueron de 2 bloques, uno de 5-25s durante 6h, seguido de 30-45s durante 18h. Luego de haber tomado la foto a las 24h se procedió a preparar el gel para la transferencia.

3.5.2.2 Transferencia e hibridación

Luego de realizado el PFGE con la endonucleasa S1, se procedió a realizar la transferencia del ADN a una membrana de nylon para su posterior hibridación (Figura 5) con las sondas correspondientes: *tetO* (gen de resistencia a la tetraciclina) y *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia* (genes de resistencia a aminoglucósidos).

A continuación se describen las diferentes etapas según se muestra en la figura 5:

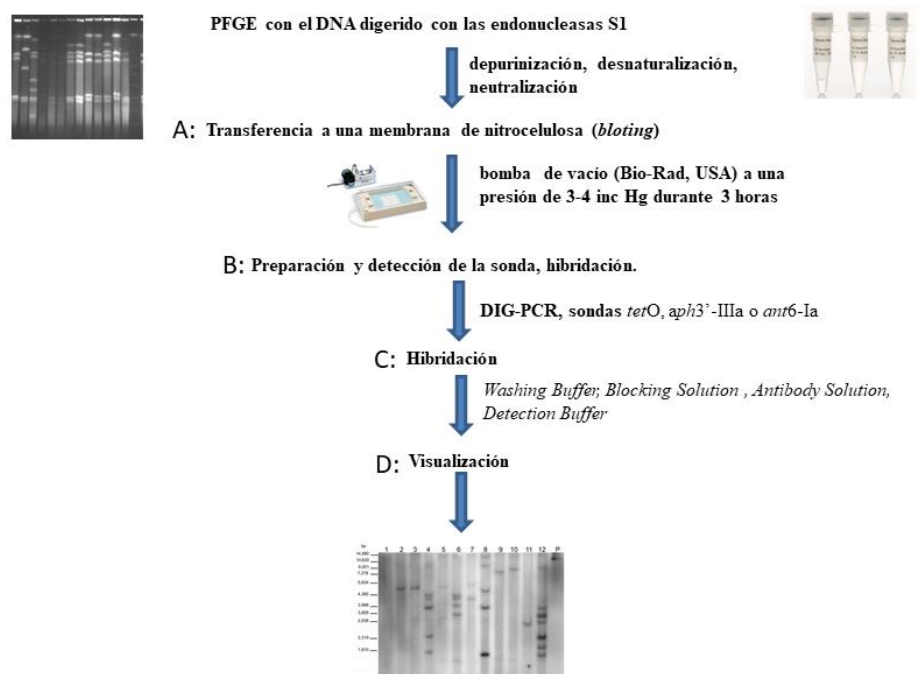


Figura 5: Flujo de procesos dentro de la técnica de transferencia e hibridación. Los acápite A, B, C y D se describen en el texto.

A: Para la transferencia se requiere una serie de pasos donde el gel se despuriniza, se desnatura y se neutraliza, con la ayuda de tampones específicos para ello. Se procedió a pasar el gel situado en la cubeta con bromuro de etidio a una cubeta de lavados y se cubrió con agua destilada durante 5 minutos en agitación. Se retiró el agua y se cubrió con una solución de despurinización (HCl 0,25M), preparada al momento, en otra cubeta, la cual se dejó en agitación por 25min. Se retiró el agua y se cubrió con una solución de desnaturación (NaOH 0,5M + NaCl 1,5M) en otra cubeta la cual se dejó en agitación por 30min. Se retiró el agua y se cubrió con una solución de neutralización (NaCl 1,5M-Tris 0,5M-HCl pH 7,5) en otra cubeta la cual se dejó en agitación por 30min.

Mientras transcurrió ese tiempo se procedió a preparar la membrana HybondTM - N⁺ (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y el papel *Whatmann* 3MM (Fisher Scientific, Estados Unidos) a la medida del gel dejando 1cm por cada lado. Luego se pasó el papel *Whatmann* a una cubeta con SSC 2x (100mL SSC 20x + 900H₂O).

La cubeta de transferencia (modelo 785, Bio-Rad, Estados Unidos) se humedeció con agua destilada y se procedió a poner el papel *Whatmann*, encima la membrana y por último la membrana de goma para ajustar la medida en la cual se pondrá el gel. Se colocó el gel y se cubrieron los pocillos y los bordes con agarosa. Una vez transcurridos los 30min de neutralización se procedió a lavar el gel con agua destilada durante 5min y se depositó a la cubeta de transferencia. Se marcan los pocillos cargados en el gel con un lápiz.

Para el proceso de transferencia se conectó la bomba de vacío (Bio-Rad, USA) a la unidad de transferencia y se ajustó la presión de 3-4 inc Hg. La transferencia se realizó por 3h, durante las cuales se hidrató el gel con tampón de transferencia SSC 10x cada 30min. Luego de transcurrido el tiempo se lavó la membrana durante 2min con SSC 2x en una cubeta para eliminar restos de agarosa. Luego se colocó la membrana sobre un papel de filtro y se mantuvo en un horno a 80°C durante 30min para su secado.

B: Para la hibridación y detección de la sonda se utilizó el kit comercial DIG *Luminescent Detection Kit* (Roche, Suiza) (Tabla 8). El principio fundamental del sistema DIG no radiactivo consiste en el uso de digoxigenina, un hapteno

esteroideo, que se une a dUTP, UTP o ddUTP para marcar el ADN, ARN u oligonucleótidos, para la hibridación y subsecuente detección luminiscente.

Tabla 8: Reactivos utilizados en el kit DIG para la realización de las sondas.

Reactivos	MM para la sonda (μL)	MM para el control (μL)
Agua	26.25	26.25
<i>Buffer</i> (vial 3)	5	5
DIG-Probe (vial 2)	5	-
dNTPs (vial 4)	-	5
<i>Oligonucleótido 1</i>	5	5
<i>Oligonucleótido 2</i>	5	5
Enzima Mix (vial 1)	0.75	0.75
ADN	3	3
Volumen final	50	50

Las sondas hibridadas son inmunodetectadas con antidigoxigenina y, después, visualizados con el sustrato CSPD quimioluminiscente. La defosforilación enzimática de CSPD por la fosfatasa alcalina produce una emisión de luz a una longitud de onda de 477nm. La señal de quimioluminiscencia del CSPD persiste durante días en las membranas de nylon. Así, exposiciones de pocos minutos son suficientes para detectar la señal y permiten conseguir múltiples imágenes.

La temperatura de hibridación escogida fue de 42°C, la cual es estándar. Se atemperaron 20ml de tampón de hibridación a la temperatura de hibridación escogida. Luego se situó la membrana en un tubo de hibridación y se recolocan los 20ml de tampón de hibridación precalentados. Se incubó en un horno con rotación fuerte durante 30min.

La concentración de la sonda a desnaturalizar fue de 5ng de sonda por ml de tampón de hibridación (5μl de sonda en 45μl de agua estéril), luego se hirvió durante 5min y rápidamente se colocó en hielo durante 5min. Se realizó un *spin*.

Se añadió la sonda (en cada caso *tetO*, *aph(3')-IIIa* o *ant(6)-Ia* al tampón de hibridación, el cual se vertió en un tubo eppendorf donde se mezclaron y se les dio un *spin*. Luego se procedió a volver a poner el tampón de hibridación, ya con la sonda, a la membrana y se incubó toda la noche a la 42°C.

Luego de la incubación *overnight* se vertió el tampón de hibridación con la sonda en un eppendorf y se guardó a -20°C.

C: Se añadieron 100ml de *Low Stringency Buffer* (kit DIG Easy Hyb de Roche, Suiza) en una bandeja y se colocó la membrana. Se agitó a temperatura ambiente durante 5min. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Luego se pasó la membrana al tubo de hibridación previamente lavado y se añadieron 100ml de *High Stringency Buffer* de baja contenido en G+C previamente atemperado a 65°C. Se colocó en el horno de hibridación con rotación fuerte a 65°C durante 15min. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Luego se eliminó el tampón y se añadió en la bandeja 100ml de *Washing Buffer* 1x [0,1M ácido maleico, 0,15 M NaCl; pH 7.5 (20°C); 0,3% (v/v) Tween 20] y se colocó la membrana. Se incubó durante 5min en agitación fuerte y a temperatura ambiente.

Se eliminó la solución y se añadieron 100ml de *Blocking Solution* 1x durante 10min en agitación suave a temperatura ambiente.

A los 25min del paso anterior, se comenzó a preparar el *Antibody Solution*. Se eliminó la solución y se pasó la membrana a una bandeja pequeña y se añadieron los 20ml de *Antibody solution* (2µl de Anti-digoxigenina-AP + 20 ml de *blocking solution* del paso anterior) y se incubó durante 30min en agitación suave a temperatura ambiente.

Se eliminó la solución y se añadieron 100ml de *Washing Buffer* 1x. Se incubó durante 15min en agitación fuerte a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Se eliminó la solución y se añadieron 25ml de *Detection Buffer* (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5) y se incubó 5min en agitación.

Luego se colocó la membrana en una bolsa de hibridación, y se le añadieron 2ml de CSPD el cual se expandió evitando formar burbujas. Se incubó 5min a temperatura ambiente.

D: Por último se incubó la membrana en la bolsa de hibridación 15min a 37°C para que tuviera lugar la reacción de fluorescencia.

Para capturar la imagen se colocó la membrana con la bolsa en el GBOX (Syngene, UK). Luego de tomada la foto se lavó la membrana con SSC2X y se dejó secar en un papel de filtro a temperatura ambiente y se guardó a 4°C.

3.6. *Whole genome sequence (WGS)*

Las tecnologías o métodos utilizados en los laboratorios como técnicas *gold standards* son el PFGE y el MLST, las cuales se aplican para caracterizar y tipar aislados provenientes de muestras clínicas, de animales, de comida, y del ambiente. Sin embargo estas técnicas nos brindan una limitada información con respecto a la totalidad del contenido genético presente en cada organismo. Con estos métodos, considerados de baja resolución ante la nueva era de secuenciación, no siempre es posible detectar los clúster de enfermedades en humanos clasificados como brotes difusos o casos esporádicos (Gilmour *et al.*, 2013).

La nueva generación de la secuenciación masiva (*NGS* del inglés *next generation sequencing*) inicia su actividad en 2005 y está desplazando a la secuenciación mediante la tecnología Sanger debido a que ofrece nuevas alternativas para la secuenciación del genoma completo (Rabbani *et al.*, 2012).

En la nueva era de la secuenciación *Next Generation Sequencing* (NGS) se ha desarrollado la secuenciación de todo el genoma, *WGS* (de sus siglas en inglés *Whole Genome Sequencing*), la cual nos permite detectar con alta especificidad (97-100%) y sensibilidad (96-97%) la totalidad genómica de una cepa (Zhao *et al.*, 2016). *NGS* está reduciendo drásticamente el costo y el tiempo necesario para secuenciar un genoma bacteriano, haciendo de esta técnica una opción factible para los laboratorios de salud pública, pues los análisis basados en *WGS* ya son de uso libre en la comunidad científica (Carleton and Gerner-smidt, 2016). Para organizaciones tales como la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*EFSA*, del inglés *European Food Safety Authority*) y para el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (*CDC*, del inglés *Center for Disease Prevention and Control*) el uso de *WGS* debería ser el método de análisis para las actividades de salud (EFSA, 2014a; ECDC, 2015).

Con el uso de esta metodología, *WGS*, se ha evaluado la correspondencia entre fenotipo de resistencia antibiótico obtenido por técnicas de sensibilidad a antibióticos y la

detección de genes de resistencia (Zhao *et al.*, 2016). También se han podido establecer relaciones epidemiológicas más completas donde se han utilizado la interpretación del *cgMLST* y *wgMLST* en relación con el *MLST* convencional (Biggs *et al.*, 2011; Cody *et al.*, 2017).

En nuestro estudio, 48 cepas (de las cuales conocíamos el *MLST* y algunos genes de resistencia a antibióticos, los cuales fueron determinados por PCR-secuenciación mediante tecnología Sanger), fueron analizadas utilizando *WGS* con el objetivo de evaluarla como técnica sustituta de las clásicas.

Mediante la utilización de esta técnica también se evaluó la utilización de la misma y las técnicas convencionales en la interpretación de la epidemiología y los mecanismos de resistencia a antimicrobianos presentes en estas cepas.

Las cepas analizadas en este estudio (Tabla 9) se escogieron en función de sus características, las cuales sobresalían al resto de las cepas del estudio. Algunas de estas cepas presentaban resistencia a antimicrobianos como gentamicina, kanamicina, estreptomicina y tetraciclina. Otras de las cepas escogidas fueron cepas sensibles a ampicilina, las cuales presentaban betalactamasas *bla*_{OXA-type}.

También nos resultaban curiosos los *singletons* y su distribución en el árbol de filogenia, los cuales se encontraban muy alejados de toda la población u otros casos insertados en las poblaciones con complejos clonales mayoritariamente descritos.

Tabla 9: Cepas analizadas por WGS.

No. de cepas	Epidemiología			Resistencia			Virulencia
	Singletons	Otros aspectos		AME	AMP	TET	
1	H07	H05	W28	H01	H61	H35	H72
2	B16	H19	W29	H50	B17	W12	H32
3	B39	H33	W43	W53			H60
4	W13	H38	W47				H63
5	W17	H48	W50				B09
6	W33	H49	W52				B24
7		H70	W56				W09
8		B02					W20
9		B23					
10		B27					
11		B28					
12		B29					
13		B56					
14		B25					
15		B02					
16		B05					
17		B06					
18		B07					
19		B25					
20		B26					

AME: aminoglucósidos; AMP: ampicilina; TET: tetraciclina.

Para el estudio del *WGS* se siguió un esquema de trabajo el cual representamos en la figura 6:

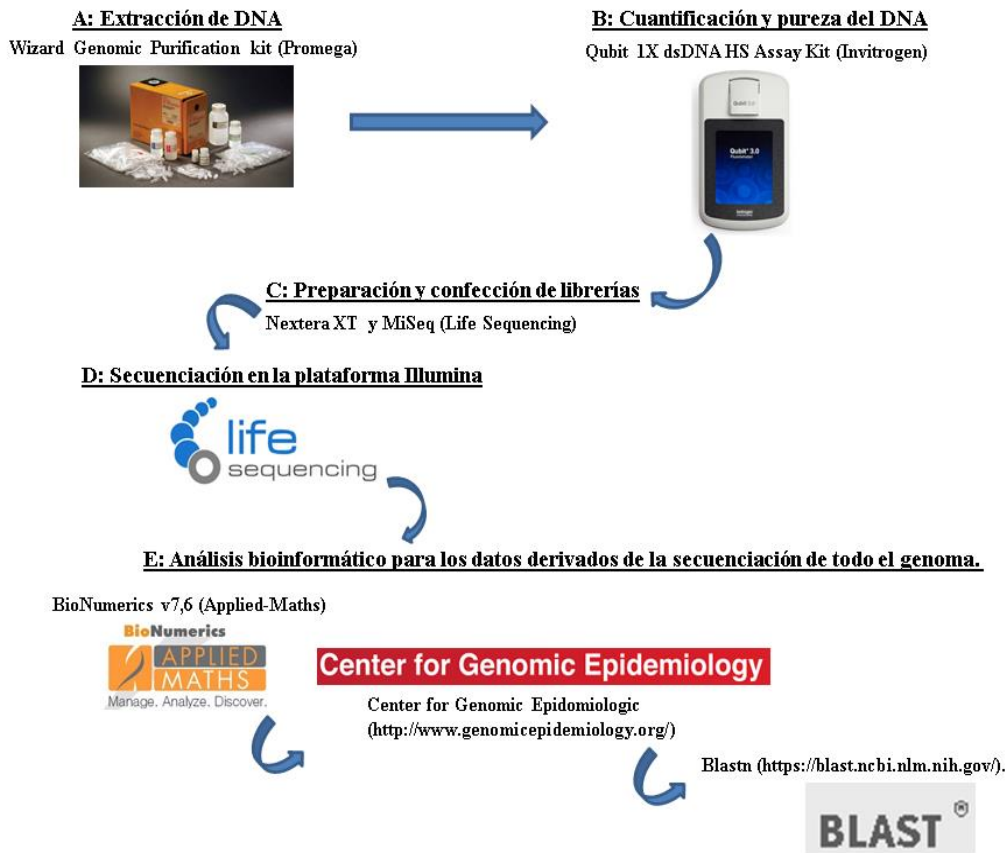


Figura 6: Flujo de trabajo de la técnica de *WGS*

A: Extracción de ADN

La extracción de ADN de alto peso molecular fue realizada a partir de colonias crecidas en placas de agar sangre durante 48h en microaerofilia. El kit de extracción genómica utilizado fue el Wizard[®] Genomic ADN Purification Kit (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante, según el acápite 3.G del manual de Promega. Este kit se basa en el principio de *salting-out*.

B: Cuantificación y pureza del ADN

El ADN de alto peso molecular obtenido se cuantificó en un fluorómetro Qubit[®] 3.0 Fluorometer (ThermoFisher, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ratios 260/280 y 260/230 para medir la pureza y el índice colorimétrico se determinaron en el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

C: Preparación y confección de las librerías

La captura de zonas específicas del ADN requiere la construcción de librerías de fragmentos que consisten en la fragmentación del ADN en segmentos de entre 150 y 200pb de longitud a los que posteriormente se ligan adaptadores específicos a ambos extremos. Los adaptadores sirven de punto de inicio para la secuenciación de forma unidireccional o bidireccional. Asimismo, estos adaptadores son utilizados para anclar la molécula de ADN a una esfera sintética, a partir de la cual se amplificará el fragmento de ADN, y se fijará la molécula de ADN amplificada a la superficie de la placa de secuenciación. Se elaboraron 48 librerías utilizando del sistema Illumina paired-end y la fragmentación del ADN en segmentos de 150pb (Life Sequence, España).

D: Secuenciación en la plataforma Illumina

El ADN obtenido fue enviado para su análisis a *Life Sequencing* (Valencia, España). La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Illumina NextSeq 150PE. Se elaboraron 48 librerías TrueSeq ADN/Nextera XT. Las lecturas resultantes de la secuenciación fueron recibidas en formato FASTQ.

E: Análisis bioinformático para los datos derivados de la secuenciación de todo el genoma

El alineamiento o mapeo de las lecturas consiste en la comparación de cada una de ellas frente a una secuencia de referencia con el objetivo de identificar la posición genómica original de donde proviene ese fragmento de ADN secuenciado.

Desde el punto de vista computacional, el alineamiento es el paso del análisis más costoso ya que dependiendo del algoritmo de mapeo empleado, el tipo de secuenciación llevada a cabo y la cantidad de lecturas generadas por muestra se requiere una mayor o menor capacidad de computación.

Los archivos una vez entregados en formato FASTQ fueron analizados con el software BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths, Bélgica). Uno de los aspectos importantes luego del *assembly* es la verificación de la calidad de las secuencias obtenidas. En estas secuencias se analizaron los siguientes parámetros:

- *Average coverage*: El cual se refiere al número de veces que una base de referencia es representada en un set de lectura de secuencias.
- N50: Es un estadístico de un set de *contigs* (o *scaffolds*), se mide como la longitud para la cual la colección de todos los *contigs* de esa longitud o mayor contiene al menos la mitad del total de la lectura de los *contigs*.
- Q30: Significa *quality score* y es una medida de la exactitud del *base call*. Este valor es equivalente a la probabilidad de un *base call* incorrecto de 1 en 1000 veces. Esto se traduce, en que la cepa tiene un 99,9% de probabilidad del que el *base call* sea correcto.

También se determinó el tamaño de las secuencias (bp) y el porcentaje de GC. Todos estos datos fueron obtenidos a través de BioNumerics v7.6.3.

Para el *calculation engine* se utilizó *assembly de novo/assembly based calls/assembly free calls*. Mediante este software, el cual cuenta con seis esquemas de *wgMLST*, se obtuvo el *core genome MLST* (*cgMLST*) el cual comprende 1343 alelos. Conjuntamente con 2186 alelos accesorios y los 7 que conforman el *MLST*, se conforma el *whole genome MLST* (*wgMLST*) donde existen en conjunto 3529 alelos.

Con la utilización de <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> se determinaron los genes de resistencia a antibióticos adquiridos y las mutaciones puntuales conocidas y no conocidas con un porcentaje de identidad y longitud de secuencia analizada de entre el 90-100% y del 60-80%, respectivamente.

Para determinar la presencia de genes de virulencia y la presencia de plásmidos utilizamos se utilizaron los sitios webs: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/> y <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>, respectivamente.

Otras webs fueron utilizadas como: *card* (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) <https://card.mcmaster.ca/about> y *Argannot* (*Antibiotic Resistance Gene-*

ANNOTation) <http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=282&titer=argannot> en la búsqueda de genes de resistencia adquiridos. También se utilizaron las bases ecoh, la cual es una base de datos que contiene información acerca de los antígenos O y H de *E. coli* y la base de datos del vfdb (*virulence factor database*) <http://www.mgc.ac.cn/VFs/> las cuales fueron analizadas con el software Linux.

3.7. Análisis estadístico

Para calcular las diferencias existentes entre los valores de porcentajes de resistencia a antibióticos se utilizó el estadístico χ^2 calculado mediante el software SPSS v24, donde se consideró una $p < 0,05$. Se consideró que las cepas que mostraron una $p < 0,05$ entre ellas presentaban una diferencia significativa.

4. RESULTADOS

4.1 Cepas de estudio

En este estudio se analizaron 150 cepas de *Campylobacter jejuni* las cuales provenían de tres poblaciones diferentes: 50 de pacientes (H), 50 de pollos de engorde (B) y 50 de aves salvajes (W).

Las muestras aisladas de humanos fueron obtenidas en el transcurso del año 2014 en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau de pacientes de la comunidad que presentaban un episodio de gastroenteritis. La población estaba representada por un 54% de niños de edad comprendida entre los 0 y los 16 años, un 30% de adultos de entre 17 y 64 años y un 16% de ancianos de edades ≥ 65 años. El 58% fueron hombres y el 42% mujeres.

Las cepas aisladas de pollos de engorde, del género *Gallus gallus*, se obtuvieron de muestras del intestino ciego de siete mataderos de Cataluña (A-G), los cuales se abastecían de cuatro granjas (CAT, CT, ES, EU) ubicadas en Barcelona, Lleida y Tarragona. Las muestras se obtuvieron en los años 2009 y del 2011 al 2013.

Las cepas de aves salvajes fueron aisladas de muestras de hisopos cloacales las cuales fueron donadas por el Centro de Investigación de Salud Animal (CReSA) y la Agencia de Salud Pública de Barcelona (ASPB), entre los años 2008 y 2015. Esta colección la comprenden cepas aisladas de cinco tipos de aves: una cepa aislada de *Spatula chlypeata* (pato del norte) proveniente del Delta del Ebro, dos cepas aisladas de *Ciconia ciconia* (cigüeña blanca) provenientes de Lleida, cinco cepas aisladas de *Corvus corax* (cuervos comunes) de los alrededores de Sabadell (provincia de Barcelona), 14 cepas aisladas de *Columba livia* (palomas domésticas) provenientes de Barcelona, siete de *Larus michahellis* (gaviota patiamarilla) de Islas Medes (5 cepas) y de Barcelona (2 cepas) y 21 de *Larus audouinii* (gaviota Audouin) del Delta del Ebro (13 cepas) y de Isla Alborán (8 cepas).

La colección de cepas se guardó en dos ceparios distintos, uno en el Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau y el otro en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona.

4.2. Determinación de la relación clonal y filogenética entre las cepas de *C. jejuni* obtenidas de los tres ámbitos de estudio

Para conocer la relación clonal entre las cepas y poder descartar la presencia de algún brote (sobre todo en el ámbito animal, pues en el humano ya se escogieron cepas no relacionadas epidemiológicamente) se aplicó la técnica del campo pulsado (PFGE) utilizando dos enzimas de restricción: SmaI y KpnI, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Además, para describir la evolución filogenética de esta especie se determinó la secuencia tipo (ST) de cada cepa mediante MLST, y aprovechando que se habían incluido cepas de origen animal, determinar cuál era el posible origen de los clones presentes en el ámbito humano.

En los anexos 4, 5 y 6 se detallan los resultados obtenidos para cada cepa, tanto de los perfiles de PFGE como de MLST.

4.2.1 Análisis de la clonalidad mediante la técnica de campo pulsado (PFGE)

De los 150 aislados, en seis casos no fue posible la tipificación, sin embargo se recuperaron dos con la utilización de la *thiurea* a diferentes concentraciones. Las cuatro cepas no tipables se correspondieron a un aislado procedente de muestra humana (H49), dos aislados procedentes de muestras de pollos (B24 y B50) y a otro aislado procedente de muestra de ave salvaje (W10).

Como se relata en el apartado de Materiales y Métodos para obtener el perfil genético de las 146 cepas restantes, éstas fueron digeridas primero con la enzima SmaI, donde se obtuvieron 120 patrones de PFGE (Figura 7). A pesar de que no existen criterios para definir un clon en una colección de cepas de *Campylobacter* (de Boer *et al.*, 2000), se decidió seguir los criterios descritos por Tenover y colaboradores (Tenover *et al.*, 1995). De esta manera, las cepas que compartían más del 95% de homología entre ellas se consideraron un clon. Con estos criterios se detectaron 12 clones (Tabla 10).

De las cepas aisladas de humanos se describieron los clones 6 y 10. Sin embargo, los datos clínico-epidemiológicos descartan cualquier relación entre los pacientes de ambos clones.

En las cepas aisladas de los pollos se conformaron tres clones (1, 5 y 11), de los cuales, dos clones (5 y 11) contenían cepas aisladas de pollos de diferentes granjas y procesadas

en diferentes mataderos, por lo que se descartó cualquier relación epidemiológica; mientras que en el caso del clon 1, seis de las siete cepas que lo conforman fueron aisladas de pollos que provenían de granjas diferentes pero todas pertenecían a la misma empresa y fueron procesadas en el mismo matadero.

De las cepas aisladas de diferentes especies de aves salvajes, se observó que estaban distribuidas a todo lo largo del dendrograma (Figura 7), entrelazando sus patrones de campo pulsado. Sin embargo, se pueden observar *clusters* en las cepas aisladas de las palomas (*Columba livia*), las cuales constituyeron la población que mayor grado de homología presentó entre sus cepas, pues 12 de las 14 cepas conformaron cuatro clones (3, 7, 8 y 9). Las dos cepas restantes (W47 y W48) aunque no conformaron un clon, presentaron una homología del 85% con respecto a las otras cepas. Es importante destacar que todos estos aislados fueron recogidos en un mismo lugar de Barcelona.

Por otro lado, tres de las cinco cepas aisladas de cuervo (*Corvus corax*), conformaron el clon 4; mientras que los dos aislados restantes se mezclaron con cepas aisladas de muestras de pollos y otras especies de aves salvajes con una homología de entre un 60.1% y un 66.3% (Figura 7).

Las especies aisladas de gaviotas (*Larus audouinii*) de Barcelona formaron el clon 9. Sin embargo, las cepas aisladas de gaviotas provenientes del Delta del Ebro, así como de las gaviotas de la especie *L. michaellis* provenientes de Islas Medes se distribuyeron a lo largo del dendrograma sin mostrar una homología mayor del 60% (Figura 7). Por último, el clon 2, conformado por las cepas aisladas de muestras de tres gaviotas provenientes de Islas Alborán presentaron una homología del 100% (W06 y W08) y del 95% (W06 y W07).

Por último, se definió el clon 12, el cual está constituido por dos cepas idénticas, una de origen humano y la otra de pollo (Tabla 10); las cuales no parecen tener ninguna relación epidemiológica, pues una se aisló en Barcelona y la otra en Tarragona.

Así pues, cabe destacar que la mayor parte de las cepas con relación clonal se encontraron por un lado en un episodio de contagio en un matadero y por el otro en el hábitat salvaje. Estos últimos resultados no son sorprendentes, teniendo en cuenta que las cepas aisladas de estas aves provenían de las heces de animales que viven en

bandadas. El hecho de no encontrar clonalidad entre cepas humanas se debe a que ya se descartó dicha posibilidad al escoger las cepas.

Siguiendo la propuesta de varios autores (Michaud *et al.*, 2001; Praakle-Amin *et al.*, 2007; Melero *et al.*, 2012; Pedonese *et al.*, 2017) se valoró un segundo análisis utilizando la unión de KpnI como segunda enzima de restricción, para poder perfilar la relación de las cepas englobadas en los 12 clones.

Del análisis de la restricción con las dos enzimas se ampliaron el número de patrones de 120 a 137 (Figura 8) y se redujo el número de clones de 12 a cuatro (Tabla 10). Del clon 1, la cepa B13 quedó con un porcentaje de similitud del 80%. Este dato confirma que la transmisión sólo tuvo lugar durante el 2009, pues la cepa B13 se aisló en el 2012.

El clon 2 se mantuvo e incluyó las tres cepas aisladas de muestras de heces de gaviotas (*Larus audouinii*) recolectadas de Islas Alborán en el mismo tiempo. En cambio, el clon 3 pierde las cepas W40 y W41, con una homología del 85%, y recoge la W43 que pertenecía al clon 9. Por último, el clon 4 perdió la cepa W51 que mostró una homología del 55%.

A modo de conclusión, se observó una gran diversidad clonal en el análisis de los patrones del campo pulsado de las cepas de *C. jejuni* de los tres hábitats estudiados. En el dendrograma, se observa que las cepas de las tres poblaciones a pesar de estar mezcladas forman diferentes *clusters* (Figura 8). Así, por ejemplo, las cepas aisladas de la población de palomas (*Columba livia*) muestran una homología mayor del 75%, las dos cepas aisladas de cigüeñas (*Ciconia ciconia*) presentaron una homología entre ellas de alrededor del 70% y las cepas aisladas de las especies de gaviotas *Laurus*, *L. michahellis* y *L. audouinii*, están distribuidas a través del dendrograma creando *clusters* con una similitud del 65%.

Finalmente, cabe decir que las cepas aisladas de muestras de humanos y pollos a pesar de no definirse en un *cluster* se observa una estrecha relación entre las cepas, lo cual apoya la idea que relaciona el origen de las gastroenteritis con el consumo de pollo.

Tabla 10: Clones presentes en las 146 cepas digeridas con la enzima SmaI y con la combinación de las enzimas SmaI-KpnI.

Clones	Procedencia	Cepas agrupadas con SmaI	Cepas agrupadas con SmaI-KpnI	Edad/ Género	Fecha de aislamiento	Lugar de aislamiento	Granja	Matadero
1	Pollo de engorde	B13;	-		2012	Lleida	ES202	E
		B52; B53; B54; B55; B56	B52; B53; B54; B55; B56		2009	Lleida	EU	G
		B57	B57		2009	Lleida	CT1	G
2	Gaviota	W06, W07 y W08	W06, W07 y W08		2009	Islas Alborán		
3	Paloma	W40, W41 y W44	W43 y W44		2015	Barcelona		
4	Cuervo	W50, W51 y W52	W50 y W52		2008	Barcelona provincia		
5	Pollo de engorde	B28 / B29	-		2013	Barcelona/Lleida	ES193/ES52	C/A
6	Humanos	H67 y H68	-	29/F*	2014	Hospital de Sant Pau		
7	Paloma	W33, W34 y W39	-		2015	Barcelona		
8	Paloma	W46 y W49	-		2015	Barcelona		
9	Paloma	W32, W36, W37 y W43	-		2015	Barcelona		
	Gaviota	W30	-		2014	Barcelona		
10	Humanos	H52 y H56	-	(1/F)/(2/M)	2014	Hospital de Sant Pau		
11	Pollo de engorde	B05 y B18	-		2012/2013	Lleida/Barcelona	ES154/ES193	F/C
12	Humanos y pollo	H34	-	22/M	2014	Barcelona		
	de engorde	B07	-		2011	Tarragona	ES184	F

-, clones no corroborados al aplicar las dos enzimas de restricción; * Dos cepas del mismo paciente aisladas en episodios distintos. F: femenino; M: masculino; los números asociados a las granjas significa el lote de pollo

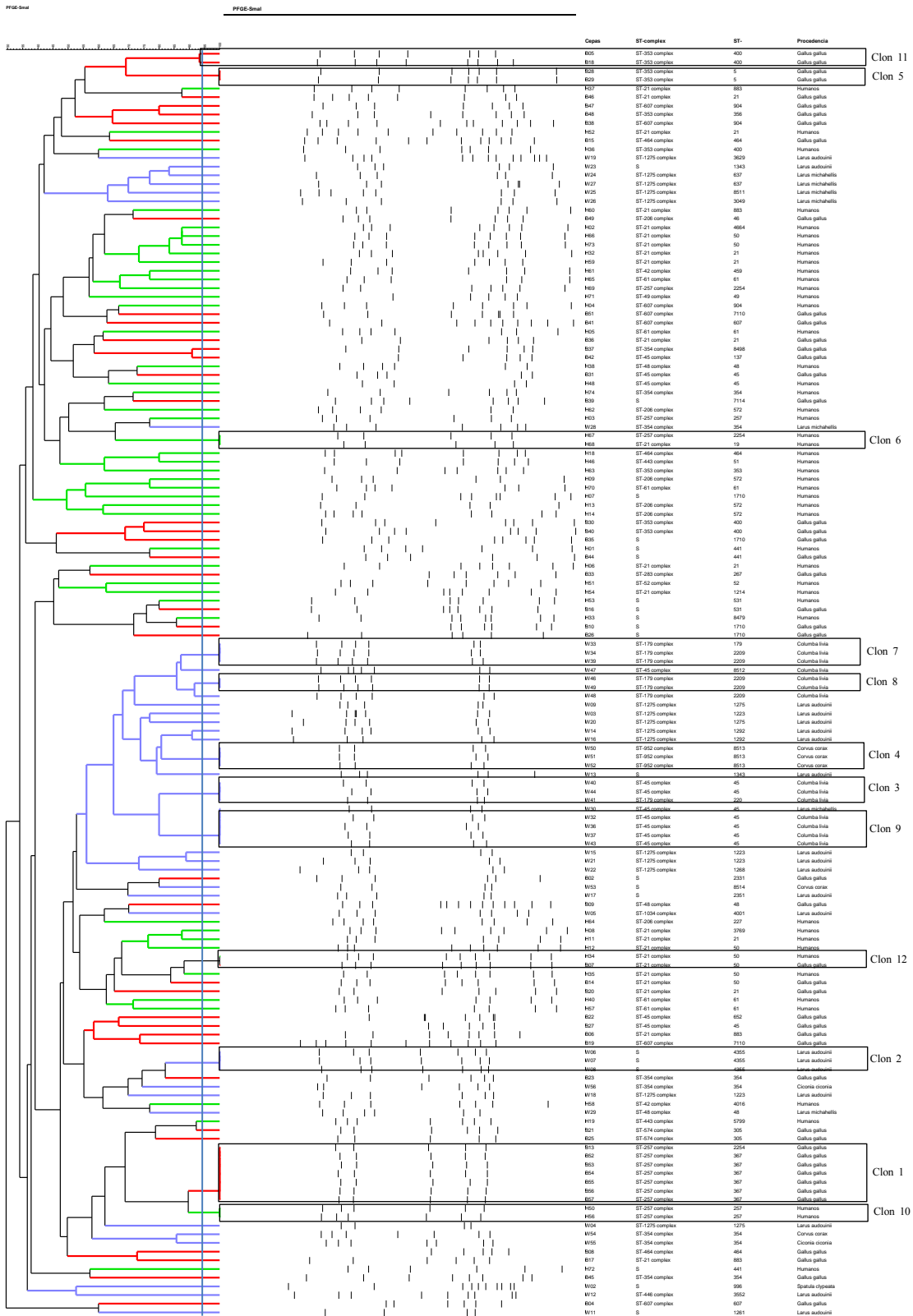


Figura 7: Dendrograma de los patrones de SmaI de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes. En la figura se muestran los clones identificados enmarcados en recuadros naranjas. Los colores de las ramas indican los diferentes nichos (verde: humanos, rojo: pollos y lila: aves salvajes).

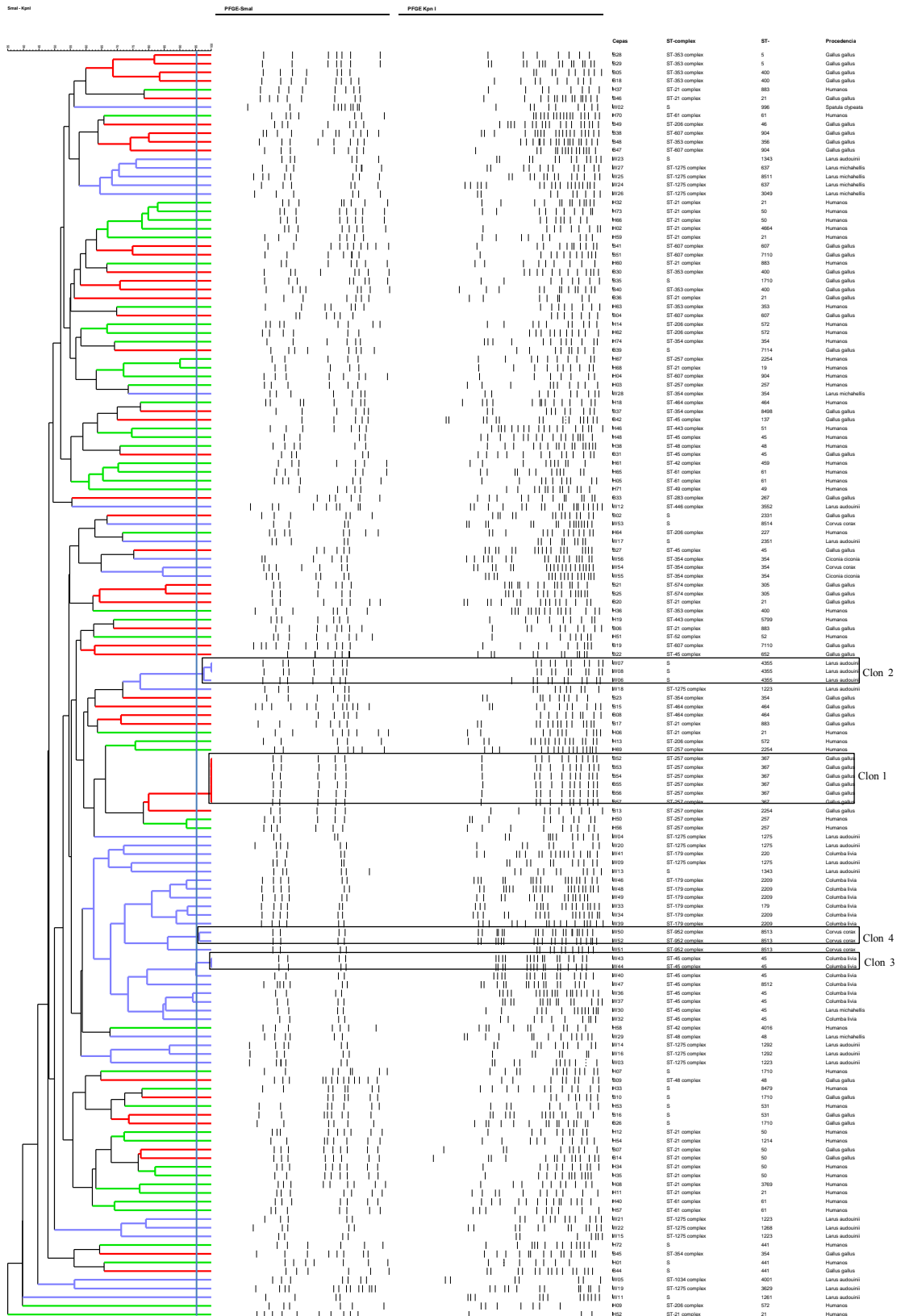


Figura 8: Dendrograma de los patrones de *Sma* y *KpnI* de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes. En la figura se muestran los clones identificados enmarcados en recuadros. Los colores de las ramas indican los diferentes nichos (verde: humanos, rojo: pollos y lila: aves salvajes).

4.2.2 Análisis de la estructura poblacional mediante la técnica de MLST

Para estudiar la distribución poblacional de las cepas analizamos los siete genes conservados (*housekeeping*) descritos en *C. jejuni* (Dingle *et al.*, 2001). De este análisis se obtuvieron 64 secuencias tipo (ST), agrupadas en 21 complejos clonales (complejo clonal-ST) y 12 *singletons* (S) (Tabla 11).

Se obtuvieron por primera vez en este estudio cinco nuevos alelos (*glnA*-619; *gltA*-526; *glyA*-690; *pgm*-859 y *uncA*-544) todos de la cepa W53 y seis nuevas secuencias tipos [ST-8479 (humanos), ST-8498 (pollos), ST-8511, ST-8512, ST-8513 y ST-8514 (aves salvajes)].

La ST más predominante fue la ST-45 con 10 aislados, seguido de la ST-21, ST-50 y ST-354 con ocho aislados cada uno (Tabla 11).

Entre las 64 ST, 16 fueron exclusivamente encontradas en muestras aisladas de humanos (Anexo 4) donde la ST-21, ST-50, ST-61 y ST-572 fueron las más prevalentes, representando entre un 8% y 10%; 14 se encontraron en pollos (Anexo 5) donde la ST-367 y ST-400 fueron los más prevalentes (8% y 12%, respectivamente) y 21 en aves salvajes (Anexo 6), siendo la ST-45, ST-1223 y ST-2209 las más frecuentes (10%-14%) (Tabla 11). Además, diez ST se compartieron entre las muestras aisladas de humanos y pollos (ST-21, ST-50, ST-883, ST-400, ST-441, ST-464, ST-531, ST-904, ST-1710 y ST-2254) y solo tres fueron coincidentes en las tres poblaciones (ST-45, ST-48 y ST-354). Ningún ST fue compartido entre aves salvajes y humanos o entre aves salvajes y pollos (Tabla 11).

Los complejos clonales más frecuentes fueron el ST-21 con 24 aislados y el ST-257 con 12 aislados. Estos dos complejos clonales estuvieron representados por cepas aisladas de humanos y de pollos. Por otra parte, el complejo clonal ST-1275 fue otro complejo clonal que destacó en mayoría, con 16 aislados, representado sólo por cepas aisladas de aves salvajes. Por último, el complejo clonal ST-45 también estuvo representado con un gran número de aislados (13), formando parte de este complejo clonal cepas aisladas de las tres poblaciones de estudio.

En el caso de las cepas aisladas de humanos (Tabla 11) el complejo clonal con el mayor número de cepas fue el complejo clonal ST-21. La mayor parte del resto de los complejos clonales sólo estuvieron representados por un solo aislado. No se observó la prevalencia de ningún ST en ninguna de las franjas de edad definidas (Figura 9).

Tabla 11: Distribución de las secuencias tipo (ST) y complejos clonales por cada población estudiada.

Complejo clonal (n)	ST	Humanos	Pollos	Aves salvajes	Total
ST-21 (24)	19	1			1
	21	5	3		8
	50	5	3		8
	883	2	2		4
	1214	1			1
	3769	1			1
	4664	1			1
ST-42 (2)	459	1			1
	4016	1			1
ST-45 (13)*	45	1	2	7	10
	137		1		1
	652		1		1
	8512			1	1
ST-48 (3)	48	1	1	1	3
ST-49 (1)	49	1			1
ST-52 (1)	52	1			1
ST-61 (5)	61	5			5
ST-179 (7)	179			1	1
	220			1	1
	2209			5	5
ST-206 (6)	46		1		1
	227	1			1
	572	4			4
ST-257 (12)*	257	3			3
	367		6		6
	2254	2	1		3
ST-283 (1)	267		1		1
ST-353 (9)	5		2		2
	353	1			1
	356		1		1
	400	1	4		5
ST-354 (9)	354	2	2	4	8
	8498		1		1
ST-443 (2)	51	1			1
	5799	1			1
ST-446 (1)	3552			1	1
ST-464 (3)	464	1	2		3
ST-574 (2)	305		2		2
ST-607 (8)	607		2		2
	904	1	2		3
	1707		1		1
	7110		2		2
ST-952 (3)*	8513			3	3
ST-1034 (1)	4001			1	1
ST-1275 (16)	637			2	2
	1223			5	5
	1268			1	1
	1275			3	3
	1292			2	2
	3049			1	1
	3629			1	1
	8511			1	1

Tabla 11: Continuación

Complejo clonal (n)	ST	Humanos	Pollos	Aves salvajes	Total
<i>Singletons</i> (21)*	441	2	1		3
	531	1	1		2
	996			1	1
	1261			1	1
	1343			2	2
	1710	1	3		4
	2331		1		1
	2351			1	1
	4355			3	3
	7114		1		1
	8479	1			1
	8514			1	1

*: Los clones definidos por PFGE se sitúan en: clon 1 en el Complejo clonal ST-257, clon 3 en el Complejo clonal ST-45 y el clon 4 en el Complejo clonal ST-952. El clon 2 lo forman tres cepas del *singleton* ST-4355.

Tal como se ha dicho anteriormente, en el hábitat de los pollos, el complejo clonal predominante fue el ST-21 como en el caso de las cepas aisladas de humanos, junto a los complejos clonales ST-353 y ST-354 (Tabla 12).

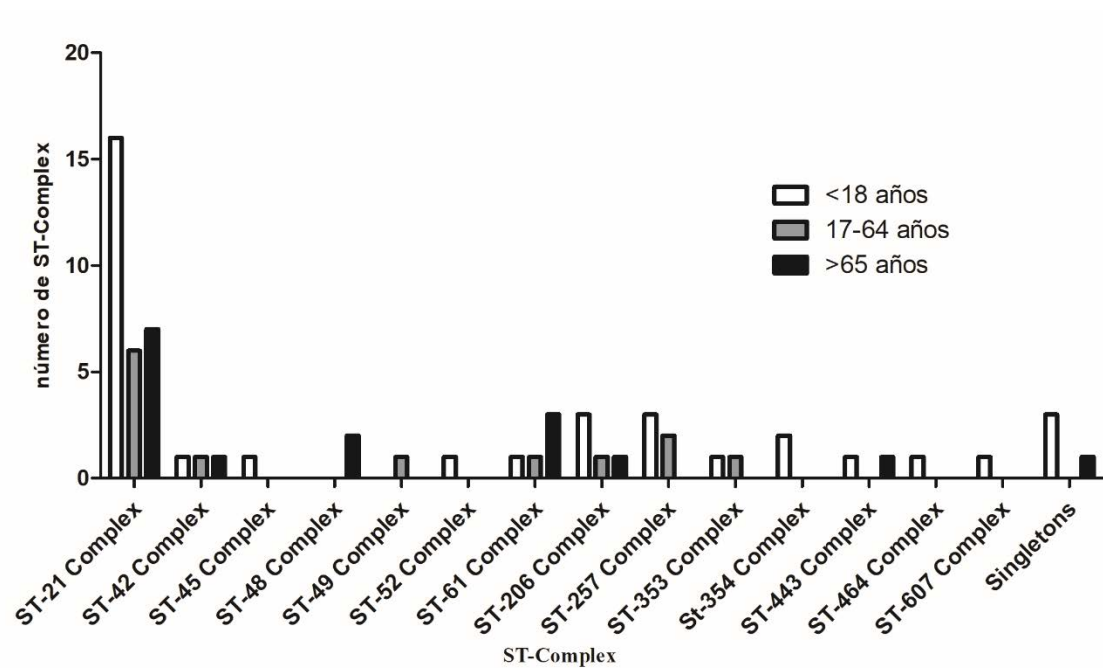


Figura 9: Distribución de complejos clonales según la edad de los pacientes con gastroenteritis

Tabla 12: Relación de secuencias tipos (ST), complejo clonal y *Singletons* (S) según la procedencia de las muestras aisladas de ciego de pollo.

Matadero (n)	Complejo clonal	ST	Año de aislamiento	Granja	Ubicación	Cepa
A (8)	S	441	2011	ES44	Lleida	B44
	ST-21	21	2013	ES28	Lleida	B36
	ST-45	45	2013	ES3	Lleida	B31
		137	2012	ES41	Lleida	B42
	ST-353	5	2013	ES52	Lleida	B29
	ST-354	354	2013	ES52	Lleida	B45
	ST-607	904	2011	ES28	Lleida	B47
B (6)	S	531	2013	ES138	Barcelona	B16
	ST-45	652	2013	ES138	Barcelona	B22
	ST-464	464	2013	ES129	Barcelona	B15
	ST-574	305	2015	ES129	Barcelona	B21
			2013	ES138	Barcelona	B25
	ST-607	1707	2013	ES129	Barcelona	B24
C (6)	S	7114	2013	ES191	Barcelona	B39
	ST-283	267	2013	ES191	Barcelona	B33
	ST-353	5	2013	ES193	Barcelona	B28
		400	2013	ES193	Barcelona	B18
	ST-48	48	2011	ES193	Barcelona	B09
	ST-464	464	2011	ES191	Barcelona	B08
D (9)	S	1710	2013	ES125	Tarragona	B26
	S	1710	2013	ES128	Tarragona	B35
	ST-21	50	2012	ES116/CAT5	Tarragona	B14/B50
		883	2013	ES116	Tarragona	B17
	ST-353	400	2013	ES116/ES115	Tarragona	B30/B40
	ST-354	8498	2013	ES125	Tarragona	B37
	ST-607	607	2013	ES128	Tarragona	B41
E (9)	S	1710	2011	ES84	Lleida	B10
	S	2331	2011	ES84	Lleida	B02
	ST-21	21	2013	ES84	Lleida	B20/B46
	ST-45	45	2013	ES85	Lleida	B27
	ST-257	2254	2012	ES202	Lleida	B13
	ST-353	356	2013	ES202	Lleida	B48
	ST-354	354	2013	ES84	Lleida	B23
	ST-607	7110	2012	CAT1	Lleida	B51
F (6)	ST-21	883	2011	ES156	Barcelona	B06
		50	2011	ES184	Tarragona	B07
	ST-206	46	2012	ES156	Barcelona	B49
	ST-353	400	2012	ES154	Lleida	B05
	ST-607	607	2011	ES147	Lleida	B04
		7110	2013	ES154	Lleida	B19
G (6)*	ST-257	367	2009	CT1/EU	Lleida	B57/B52/B53/ B54/B55/B56

*: Matadero donde se identificó el clon 1 en PFGE.

El ST-353 se describió en pollos procedentes de granjas de las tres provincias: Barcelona, Lleida y Tarragona, mientras que el ST-354 sólo se encontró en granjas de Lleida y Tarragona. Sin embargo, no puede establecerse ninguna correlación entre ST y la localización, pues existe una gran variabilidad de ST que se distribuyeron a lo largo del

territorio. Solo en el matadero G, donde se procesaron seis cepas procedentes de dos granjas diferentes, pero pertenecientes a la misma empresa fue donde se identificó el clon 1 por PFGE y correspondiente al complejo clonal ST-257.

La distribución del MLST, en las cepas aisladas de aves salvajes (Tabla 13), fue más homogénea que la presentada en las cepas aisladas de humanos y de pollos. También cabe destacar que el ST-45, compartido por las tres poblaciones, se ha observado en palomas, ave integrada en el hábitat humano. Por otro lado, se definen que los complejos clonales ST-1275 eran más frecuentes en gaviotas, el complejo clonal ST-179 en palomas y el complejo clonal ST-952 en cuervos.

Como se muestra en el *minimum spanning tree* (MST) y el diagrama de Venn (Figura 10) es fácil distinguir dos bloques de agrupaciones de cepas, aunque se reflejan algunas excepciones dentro de ellos debido a la ecología de las muestras aisladas.

Por un lado, un bloque incluye los complejos clonales obtenidos de aves salvajes (ST-952, ST-179 y ST-1275) representados principalmente por cuervos, palomas y gaviotas, mientras que un segundo bloque incluye aquellos complejos clonales que provienen de las muestras aisladas de humanos y pollos (ST-21, ST-206, ST-353 y ST-607). En el caso de los complejos clonales ST-45, ST-48 y ST-354 se encontraron presentes en los tres hábitats estudiados.

Todos estos datos demuestran que se compartió un número considerable de ST entre la población humana y de pollos de engorde, y que solo unas pocas estaban presentes en todas las poblaciones estudiadas. Además, se detectó una posible cadena de transmisión en ciertos clones entre aves salvajes que comparten el mismo nicho ecológico. También se ha detectado una posible contaminación cruzada de un clon en muestras de ciego de pollo pertenecientes a la misma empresa de pollos.

Tabla 13: Relación de secuencias tipos (ST), complejo clonal y *Singletons* (S) según la procedencia de las muestras aisladas de aves salvajes.

Ave salvaje	Complejo clonal	ST	Ubicación	Cepa (Fecha de aislamiento)		
<i>L. audouinii</i> (21)	ST-446 (1)	3552	Islas Alboran	W12 (2010)		
	ST-1034 (1)	4001	Delta del Ebro	W05 (2009)		
	ST-1275 (12)	1223	Delta del Ebro	W03 (2009), W10 (2010), W15 (2010), W18 (2011), W21 (2011)		
				W22 (2011)		
				W04 (2009), W09 (2010), W20 (2010)		
				W14 (2010), W16 (2010)		
				W19 (2010)		
	<i>Singletons</i> (7)*	1261	Delta del Ebro	W11 (2010)		
				1343	Islas Alboran	W13 (2010), W23 (2010)
				2351	Delta del Ebro	W17 (2011)
4355				Islas Alboran	W06 (2009), W07 (2009), W08 (2009)	
<i>L. michahellis</i> (7)	ST-45 (1)	45	Barcelona	W30 (2014)		
	ST-48 (1)	48	Barcelona	W29 (2014)		
	ST-354 (1)	354	Islas Medes	W28 (2013)		
	ST-1275 (4)	637	Islas Medes	W24 (2012), W27 (2013)		
				3049	Islas Medes	W26 (2013)
8511	Islas Medes	W25 (2012)				
<i>Corvus corax</i> (5)	ST-354 (1)	354	Barcelona provincia	W54 (2008)		
	ST-952 (3)*	8513	Barcelona provincia	W50 (2008), W51 (2008), W52 (2008)		
	<i>Singleton</i> (1)	8514	Barcelona provincia	W53 (2008)		
<i>Columba livia</i> (14)	ST-45 (7)*	45	Barcelona	W32 (2015), W36 (2015), W37 (2015), W40 (2015), W43 (2015), W44 (2015)		
				W47 (2015)		
	ST-179 (7)	179	Barcelona	W33 (2015)		
				220	Barcelona	W41 (2015)
				2209	Barcelona	W34 (2015), W39 (2015), W46 (2015), W48 (2015), W49 (2015)
<i>Spatula clypeata</i> (1)	<i>Singleton</i> (1)	996	Delta del Ebro	W02 (2008)		
<i>Ciconia ciconia</i> (2)	ST-354 (2)	354	Lleida	W55 (2011), W56 (2011)		

*: Complejo clonal y *Singletons* donde se identificaron los clones 2, 3 y 4 definidos por PFGE. *L. audouinii*: gaviota de Audouin; *L. michahellis*: gaviota patiamarilla; *Corvus corax*: cuervo común; *Columba livia*: paloma doméstica; *Spatula clypeata*: pato cuchara; *Ciconia ciconia*: cigüeña blanca.

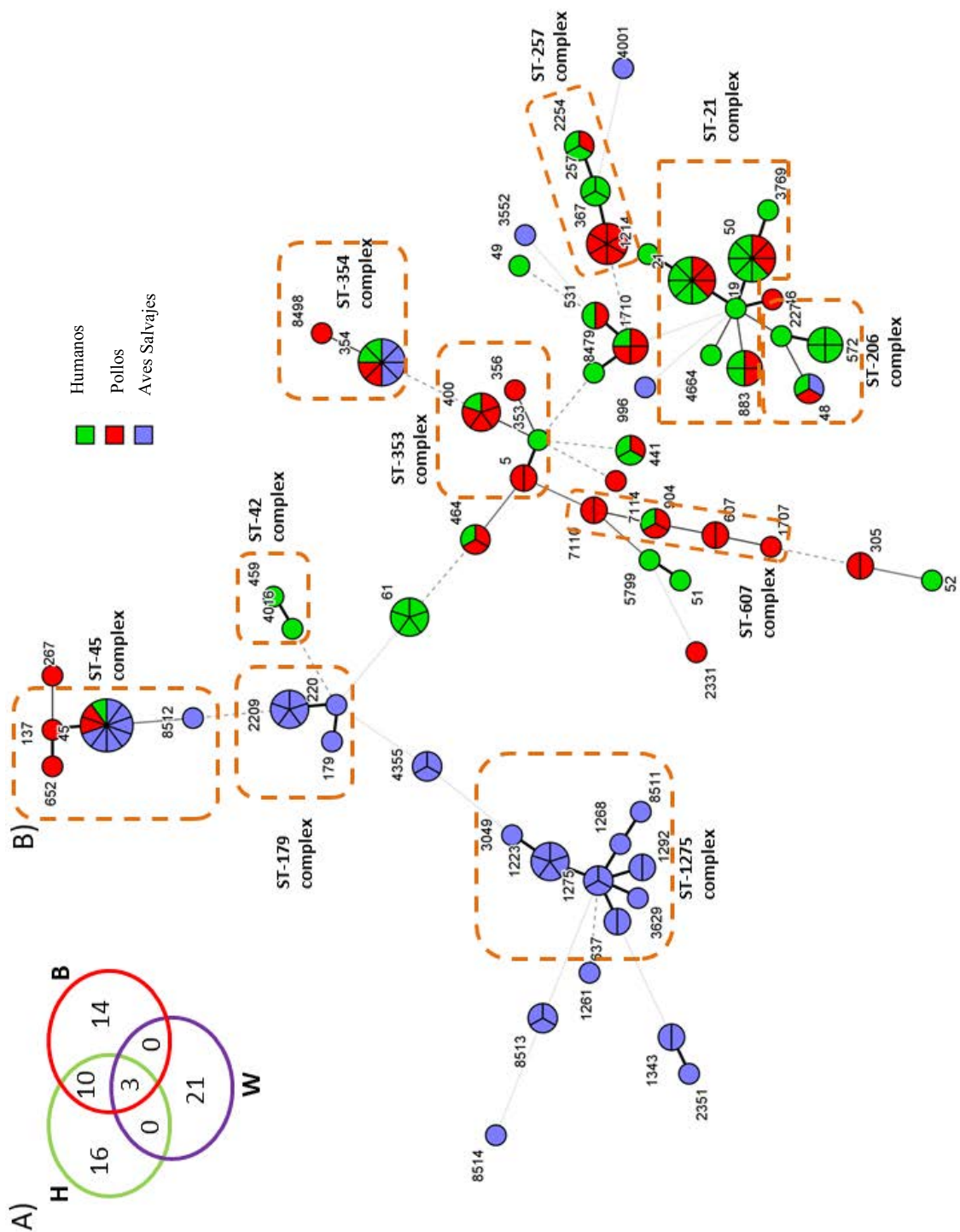


Figura 10: Diagrama de Venn y *Minimum spannig tree* según la distribución de las tres poblaciones del estudio. A: Diagrama de Venn donde se muestra el número de secuencias tipos compartidas en cada población (pacientes en color verde, pollos en color rojo y aves salvajes en color lila) y las que son comunes entre sí. **B:** Se muestra un *Minimum spannig tree* según la distribución de las tres poblaciones. En líneas discontinuas se agrupan los complejos clonales (ST-complex). Los círculos muestran las ST y si las contienen más de una cepa el círculo se divide en quesitos. Las líneas entre los círculos muestran la distancia alélica, las líneas gruesas muestran una distancia más cercana entre ST que las líneas delgadas, mientras que las líneas delgadas muestran más cercanía que las líneas delgadas discontinuas.

4.3. Perfil de sensibilidad y detección de genes de resistencia a antibióticos en muestras aisladas de humanos, pollos y aves salvajes

4.3.1 Estudio de la sensibilidad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad en las 150 cepas del estudio se realizó por disco-difusión y muestran que el 84.6% (127/150) de las cepas fueron resistentes a algunos de los antimicrobianos testados. Un 71.3% de las cepas fueron resistentes a tetraciclina (TET), un 67.3% a ciprofloxacina (CIP), un 64.6% a ácido nalidíxico (NAL) y un 63.3% a ampicilina (AMP) (Figura 11A). Dentro de estas familias de antimicrobianos las cepas aisladas de pollos fueron quienes mostraron el porcentaje de resistencia más elevado (74% a 98%), seguidas de las aisladas de humanos (78%-88%), mientras que, en las cepas aisladas de aves salvajes, el porcentaje de resistencia fue menor, oscilando entre el 16% y 36%. El 42% de las cepas de aves salvajes fueron sensibles a todos los antimicrobianos, y el 38% resistentes sólo a un agente. Lejos de estos porcentajes tan elevados están los porcentajes de resistencia a algún aminoglucósido: 7.3% a estreptomicina, 4.6% a kanamicina y 0.6% a gentamicina. En este caso también las cepas más resistentes fueron encontradas en el hábitat de los pollos, siendo parecidos los porcentajes entre humanos y pollos, con el hecho a resaltar que la única cepa resistente a gentamicina es de origen humano. Todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, eritromicina, cloranfenicol y fosfomicina.

De las 150 cepas del estudio, se establecieron 20 perfiles de sensibilidad (A-T) siendo el A el que engloba las cepas sensibles a todos los antimicrobianos y del L al T recogen las cepas que mostraron resistencia a tres o más familias de antimicrobianos, las cuales se denominan cepas multiresistentes (Figura 11B, C). De las 127 cepas resistentes a algún antibiótico, el 58.2% (74 cepas) fueron multiresistentes (MDR). El perfil MDR más frecuente fue el M (TET+NAL+CIP+AMP) con un 41.3% de las cepas, representado mayoritariamente por cepas aisladas de humanos (58%) y pollos (58%) (Tabla 14; Figura 11D). Si se analiza, no a nivel de familia sino de antimicrobiano, se observa que el mayor porcentaje está en las cepas resistentes a cuatro antimicrobianos, seguido por cepas resistentes a tres (17.3%) y en menor medida cepas resistentes a cinco (5.3%) o seis antimicrobianos (1.3%), incluyendo en estos casos una cepa de aves salvajes correspondiente a un cuervo.

Tabla 14: Frecuencia de los distintos perfiles de sensibilidad encontrados en las 150 cepas de *C. jejuni*.

Perfil de sensibilidad		Humanos n (%)	Pollos n (%)	Aves salvajes n (%)	Total n (%)
A	Sensibles a todos los ATB	2 (4)	0	21 (42)	23 (15.33)
B	Solo a TET	2(4)	0	6 (12)	8 (5.3)
C	Solo a AMP	0	0	12 (24)	12 (8)
D	Solo a NAL	0	0	1 (2)	1 (0.6)
		2(4)	0	19 (38)	21 (14)
E	TET, AMP	1 (2)	0	1 (2)	2(1.3)
F	TET, CIP	1 (2)	0	0	1 (0.6)
G	TET, S	0	1 (2)	0	1 (0.6)
H	NAL, CIP	1 (2)	0	0	1 (0.6)
		4(8)	1 (2)	1 (2)	6 (4)
I	TET, NAL, CIP	2 (4)	11(22)	3 (6)	16 (10.6)
J	NAL, CIP, AMP	3 (6)	2 (4)	0	5 (3.3)
K	AMP, S, K	0	0	1 (2)	1 (0.6)
L	TET, CIP, AMP **	4 (8)	0	0	4 (2.6)
		9 (18)	13 (26)	4 (8)	26 (17.33)
M	TET, NAL, CIP, AMP**	29 (58)	29 (58)	4 (8)	62 (41.3)
N	TET, NAL, CIP, K**	1 (2)	0	0	1 (0.6)
O	TET, NAL, CIP, S**	0	1 (2)	0	1 (0.6)
		30 (60)	30 (60)	4 (8)	64 (42.6)
P	TET, NAL, CIP, AMP, S**	1 (2)	4 (8)	0	5 (3.3)
Q	TET, NAL, CIP, AMP, K**	0	1 (2)	0	1 (0.6)
R	TET, NAL, CIP, K, G**	1 (2)	0	0	1 (0.6)
S	TET, NAL, CIP, S, K**	0	0	1 (2)	1 (0.6)
		2 (4)	5 (10)	1 (2)	8 (5.3)
T	TET, NAL, CIP, AMP, S, K**	1 (2)	1 (2)	0	2 (1.3)
		1 (2)	1 (2)	0	2 (1.3)

** : cepas multiresistentes; ATB, antimicrobianos; AMP, ampicilina; TET, tetraciclina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; S, estreptomycin; K, kanamicina; G, gentamicina.

Una vez que se observó que las cepas más resistentes estaban en el hábitat humano y de pollos se quiso determinar si había alguna relación entre la multiresistencia y las secuencias tipo, teniendo en cuenta que los dos hábitats citados compartían varios ST. De hecho, se encontró que entre las cepas MDR se encuentran los principales complejos clonales identificados, como el ST-21, ST-206, ST-257, ST-354 y ST-607. Además, se observó que las cepas con fenotipo sensible (A) pertenecen a los complejos clonales ST-179 y ST-1275 presentes en aves salvajes. Sin embargo, del complejo clonal ST-45, presente en los tres hábitats, las cepas resistentes están en el hábitat humano y de pollos, y las cepas sensibles pertenecen a aves salvajes (Tabla 15).

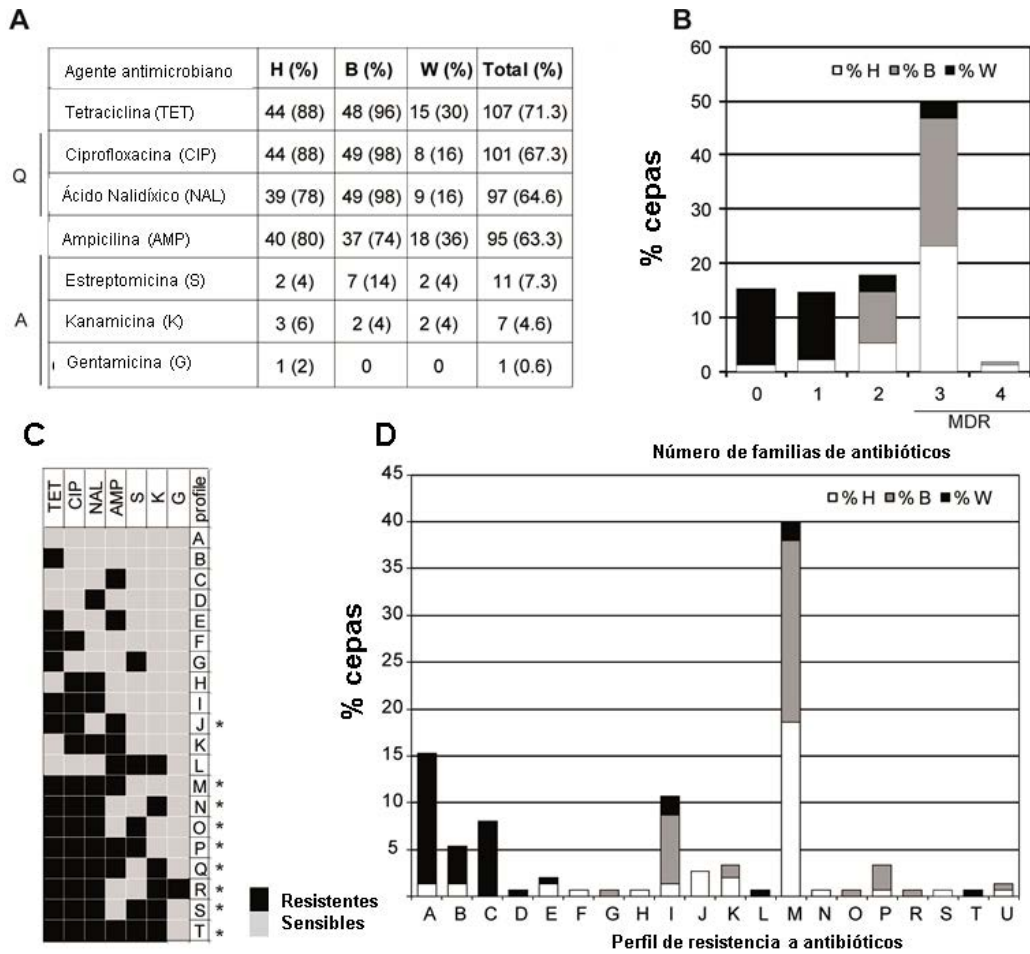


Figura 11: Perfil de resistencia a antibióticos en las cepas de *C. jejuni* estudiadas. A: valores y porcentajes de cepas resistentes a antibióticos donde H (humanos), B (pollos) y W (aves salvajes). Las familias de antibióticos Q: quinolonas y A: aminoglucósidos. Todas las cepas fueron resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, eritromicina, cloranfenicol y fosfomicina. **B:** Porcentaje de cepas resistentes a familias de 0 a 4 antibióticos, MDR: cepas multi drogorrresistentes. **C:** subgrupo de cepas según la resistencia a antibióticos, el * indica cepas MDR. **D:** porcentaje de cepas resistentes según el subgrupo definido en C.

Por último, si se analizan las cepas clonales por PFGE (W06,W07 y W08; W43 y W44; W50 y W52) se puede observar que todas las cepas del clon 1 (B52, B53, B54, B55, B56 y B57) con el mismo ST (ST-367) presentaron el mismo patrón de MDR (M), así también ocurre con los clones 2 (W06, W07 y W08) con el ST-4355 y patrón A, y el clon 3 (W43, W44) con el ST-45 y patrón A, mientras que en el clon 4 (W50 y W52) con ST-8513 presentaron diferente patrón de resistencia antimicrobiana (A y C, respectivamente).

Tabla 15: Complejos clonales, Secuencias tipos (ST), *Singletons* y perfil de resistencia a antibióticos en las 150 cepas aisladas de muestras de humanos, de pollos y de aves salvajes.

Complejo clonal ST			Humanos	Pollos	Aves Salvajes
	ST	n	PRA	PRA	PRA
ST-21 (24)	19	(1)	M (1)		
	21	(8)	M (1) I (2) J (1) T (1)	M (2) O (1)	
	50	(8)	M(4) K (1)	M (1) K (2)	
	883	(4)	M (1) J (1)	I (1)	
				I (1)	
	1214	(1)	J (1)		
	3769	(1)	M (1)		
ST-42 (2)	4664	(1)	B (1)		
	459	(1)	M (1)		
	4016	(1)	E (1)		
ST-45 (13)	45	(10)	K (1)	M (1) G (1)	A (3) C (3) I (1)
	137	(1)		P (1)	
	652	(1)		P (1)	
	8512	(1)			A (1)
ST-48 (3)	48	(3)	M (1)	M (1)	M (1)
ST-49 (1)	49	(1)	M (1)		
ST-52 (1)	52	(1)	H (1)		
ST-61 (5)	61	(5)	M (2) A (1) E (1)		
			B (1)		
ST-179 (7)	179	(1)			A (1)
	220	(1)			D (1)
	2209	(5)			A (1) A (2) C (2)
ST-206 (6)	46	(1)		M (1)	
	227	(1)	A (1)		
	572	(4)	M (4)		
ST-257 (12)	257	(3)	M (1) N (1) P(1)		
	367	(6)		M (6)	
	2254	(3)	M (2)	I (1)	
ST-283 (1)	267	(1)		M (1)	
ST-353 (9)	5	(2)		I (1)	
				I (1)	
ST-354 (9)	353	(1)	K (1)		
	356	(1)		M (1)	
	400	(5)	M (1)	I (3) M (1)	
	354	(8)	M (2)	M (2)	M (2) I (2)
	8498	(1)		M (1)	
ST-443 (2)	51	(1)	M (1)		
	5799	(1)	M (1)		
ST-446 (1)	3552	(1)			M (1)
ST-464 (3)	464	(3)	F (1)	M (1)	
				M (1)	
ST-574 (2)	305	(2)		M (1) I (1)	
ST-607 (8)	607	(2)		M (1) I (1)	
	904	(3)	M (1)	M (2)	

Tabla 15: Continuación

Complejo clonal ST	Perfil de resistencia a antibióticos				
	ST	n	Humanos	Pollos	Aves Salvajes
	1707	(1)		M (1)	1707
	7110	(2)		M (1) I (1)	7110
ST-952 (3)	8513	(3)			A (2) C (1)
ST-1034 (1)	4001	(1)			L (1)
ST-1275 (16)	637	(2)			A (1) B (1)
	1223	(5)			C (1) A (2) C (1) C (1)
	1268	(1)			B (1)
	1275	(3)			B (2) B (1)
	1292	(2)			C (1) C (1)
	3049	(1)			A (1)
	3629	(1)			E (1)
	8511	(1)			B (1)
Singletons	441	(3)	R (1)	P (1)	
			J (1)		
	531	(2)	M (1)	M (1)	
	996	(1)			A (1)
	1261	(1)			A (1)
	1343	(2)			A (2)
	1710	(4)	M (1)	M (1) Q (1) P (1) M (1)	
	2331	(1)			
	2351	(1)			C (1)
	4355	(3)			A (3)
	7114	(1)		T (1)	
	8479	(1)	M (1)		
	8514	(1)			S (1)

*, la leyenda de las letras de la A a la M pueden encontrarse en la Figura 11.

4.3.2 Detección de los mecanismos de resistencia

4.3.2.1 Resistencia a ampicilina

Tal como se especifica en la introducción, el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en *Campylobacter* es la presencia de betalactamasas. Sin embargo, la presencia de estas enzimas no siempre confiere un fenotipo resistente. Es por ello que además de las 95 cepas resistentes a ampicilina por disco difusión, se realizó la prueba del nitrocefín, para detectar la presencia de betalactamasas en las cepas sensibles a ampicilina y a amóxido-clavulánico. Todas las cepas resistentes a ampicilina hidrolizaron el

nitrocefín así como 16 cepas sensibles aisladas de muestras de humanos, dos cepas sensibles aisladas de muestras de pollos y siete de aves salvajes.

Según lo descrito en la literatura, uno de los principales mecanismos de resistencia a ampicilina que presentan las cepas de *Campylobacter* es la acción de la betalactamasa de clase D, *bla_{OXA-61}* (Alfredson and Korolik, 2005). Sin embargo, y debido a que en algunas cepas se ha descrito la presencia de este gen como mecanismo secundario, se amplió la búsqueda del gen *bla_{OXA-61}* a todas las cepas sensibles a ampicilina (Tabla 16).

Los resultados muestran la presencia del gen *bla_{OXA-61-type}* o sus derivados en todas las cepas aisladas de humanos y pollos (tanto sensibles como resistentes a ampicilina) y sólo en el 54% (27/50) de las cepas aisladas de aves salvajes. En la población de aves salvajes, además de *bla_{OXA-61-type}*, en tres cepas (dos de las cuales eran sensibles a ampicilina) se encontró el gen *bla_{OXA-184-type}*. Este gen es un derivado de *bla_{OXA-61}*. Varias son las diferencias entre estos dos genes a nivel de sus proteínas, tal y como se puede observar en la figura 12, aunque se mantiene el sitio activo STFK, idéntico entre todas las oxacilinasas, según lo descrito por Poirel y colaboradores (Poirel *et al.*, 2010).

```

OXA61  1  MKKITL-FLLFLNLVFGQDKILNNWFKEYNTSGTFVFDGKTWASNDFSRAMETFSPAST  59
      MKKI L F LF +      DK L ++FK+YNTSG F+ +DGK +ASN+F RA E FSPAST
OXA184 1  MKKILLFLSLFYSFALANDK-LKDFFKDYNTSGVFITFDGKHYASNNFKRAKEPFSFAST  59

OXA61  60  FKIFNALIALDSGVIKTKKEIFYHYRGEKVFLLSSWAQDMNLSSAIKYSNVLAFKEVARRI  119
      FKIFNALIALD+GV+K  KEIFYHY+GEKVFL SW QD +LSSAIK S V AFKE+AR+I
OXA184 60  FKIFNALIALDNGVVKDTKEIFYHYRGEKVFLLPSWKQDASLSSAIKRSQVPAFKELARKI  119

OXA61  120 GIKTMQEYLNKLHYGNKISKIDTFWLDNSLKISAKEQAILLFRLSQNSLPFSQEAMNSV  179
      G+KTMQE LNKL YGN KISKIDTFWLDNSL+ISAK QA LLF+LSQNSLPFS+++  V
OXA184 120 GLKTMQESLNKLSYGNKISKIDTFWLDNSLQISAKNQADLLFKLSQNSLPFSKKSQEEV  179

OXA61  180 KEMIYLNKMNENLELFGKTGFNDGQKIAWIVGFVYLKDENKYKAFALNLDIDKFEDLYKRE  239
      K++I K + +++ KTFNDG +AWIVGF+ + +NK +FALN+DI +++ RE
OXA184 180 KKIILFKEDKIQKIYAKTGFNDGINLAWIVGFI--ESKNKILSFALNVDIKNIKIKIRE  237

OXA61  240 KILEKYLDEL  249
      ++LEKY+ L
OXA184 238 ELLEKYIYSL  247

```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias *bla_{OXA-61}* (H01) y *bla_{OXA-184}* (W09).

Como los genes *bla_{OXA-61}-type* y *bla_{OXA-184}-type* se presentaron tanto en cepas resistentes como sensibles se procedió a analizar si en el gen *bla_{OXA-61}* existía alguna condición que definiera el fenotipo resistente. Según la literatura (Zeng *et al.*, 2014), un cambio (G en lugar de T) en el nucleótido 49, localizado *upstream* del codón de inicio de *bla_{OXA-61}* en la región promotora de dicho gen condicionaría el fenotipo resistente. Del análisis de la región del promotor del gen *bla_{OXA-61}* se observó que en 26 cepas (14 resistentes y 12 sensibles) había una guanina y en 50 cepas (41 resistentes y 9 sensibles) una timina, por lo que esta transversión G-T no parece ser la causa que explique el distinto fenotipo de las cepas (Tabla 16).

Siguiendo este hilo de resultados y dado que algunas de las cepas de *C. jejuni* son resistentes a cefalosporinas se planteó la búsqueda de betalactamasas de amplio espectro más frecuentes entre las bacterias gramnegativas. Así se realizó la PCR de las betalactamasas TEM y SHV de las cepas con fenotipo sensible a ampicilina, pero nitrocefín positivas. Los resultados de PCR-secuenciación mostraron que sólo la cepa H12 (1/150) presentaba la SHV-1, correspondiente (100% de homología) con la betalactamasa SHV-1 descrita en *Klebsiella pneumoniae* (A5F124984.1). Ninguna de las cepas analizadas presentó la betalactamasa TEM.

Tabla 16: Frecuencia del gen *bla_{OXA}* en las 150 cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos (H), pollos (B) y aves salvajes (W).

Cepas	Gen	H	B	W	Promotor con G o T			Total	
					H (n=39)	B (n=30)	WB (n=7)		
Resistentes	<i>bla_{OXA-61}</i>	100%	100%	60%	G	13	1	0	14
		40	37	14/18	T	17	20	4	41
	<i>bla_{OXA-184}</i>			1/18					
	<i>bla_{OXA-61}</i>	10	13	13/32	G	5	5	2	12
Sensibles	<i>bla_{OXA-61}</i>				T	4	4	1	9
	<i>bla_{OXA-184}</i>			2/32					
	Sin <i>bla_{OXA}</i>			20					
Total		50	50	50		39	30	7	

G: guanina; T: timina

De modo que el mecanismo de resistencia a ampicilina estudiado, es decir la presencia del gen *bla_{OXA}*, no es suficiente para explicar el fenotipo resistente en las cepas de *C. jejuni* aisladas de los tres ambientes, pues el gen está presente tanto en cepas resistentes como sensibles y la mutación de T a G en el promotor que condicionaría el fenotipo resistente no se restringe solo a las cepas resistentes.

4.3.2.2. Resistencia a tetraciclina

El 71.3% de las cepas estudiadas (107/150) fueron resistentes a tetraciclina. Para la identificación del mecanismo de resistencia a tetraciclina nos propusimos determinar, tal como describe la bibliografía, la presencia mediante PCR-secuenciación de los genes *tetO* y *tetA*. Según hemos explicado en la introducción, el gen *tetO* es el principal gen descrito involucrado en la resistencia a tetraciclina en cepas de *Campylobacter*, aunque la presencia del gen estructural *tetA*, pudiera determinar el fenotipo de resistencia a tetraciclina al actuar en sinergia con el gen *tetO*.

El gen *tetO* puede presentarse en cepas de *C. jejuni* sensibles a tetraciclina (Whitehouse *et al.*, 2018), por lo que en nuestro estudio se incluyeron tanto las cepas resistentes como sensibles. De la determinación de estos genes se encontró que todas las cepas aisladas de muestras de humanos y pollos, tanto resistentes como sensibles, resultaron tener los genes *tetO* y *tetA*. En el caso de las cepas aisladas de aves salvajes el comportamiento de estos genes se encontró variado (Tabla 17). Específicamente, las cepas resistentes presentaron ambos genes (con la excepción de una cepas de gaviota que no amplificó para *tetO*), mientras que un 61% de las cepas sensibles presentaron el *tetO* y un 58% el *tetA*.

Tabla 17: Presencia de los genes *tetO* y *tetA* en las 50 cepas de *C. jejuni* aisladas de aves salvajes.

Especies de aves salvajes	TET	n	<i>tetO</i> +	<i>tetA</i> +
<i>Spatula clypeata</i> (pato del norte)	S	(1)	0	0
<i>Ciconia ciconia</i> (cigüeña blanca)	R	(2)	2	2
<i>Corvus corax</i> (cuervos comunes)	R	(2)	2	2
	S	(3)	0	0
<i>Columba livia</i> (palomas domésticas)	S	(14)	3	1
<i>Larus michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	R	(5)	5	5
	S	(2)	2	2
<i>Larus audouinii</i> (gaviota Audouin)	R	(6)	5	6
	S	(15)	14	15

S: sensible, R: resistente, n: número de cepas

El conocimiento de la localización de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas de *C. jejuni* ha permitido tener una idea de la naturaleza de los mismos y la importancia en la diseminación a otras cepas en diferentes hábitats. En nuestro estudio se decidió determinar la localización del gen *tetO*, pues generalmente se presenta en un elemento móvil, asumiendo que al ser el gen *tetA* de naturaleza estructural está localizado en el cromosoma.

Para el estudio de la localización del gen *tetO* se procedió a realizar el PFGE con la enzima de restricción S1 (para localizar genes en plásmidos) en las 134 cepas donde se había detectado la presencia del gen *tetO* mediante PCR. Sin embargo, en un alto porcentaje de las cepas (105 cepas; 78.3%) no se pudo localizar el gen. En las 29 cepas restantes, la mayoría presentes en muestras aisladas de humanos y pollos, el gen *tetO* se encontró en un plásmido de alrededor de 55 kb (Tabla 18; Figura 13).

Tabla 18: Localización del gen *tetO* en las cepas de *C. jejuni* aisladas de humanos y aves salvajes.

Población con <i>tetO</i> (n)	Cepas analizadas	Cepas localizadas en Plásmidos (n)	No localizadas (n)
Humanos (50)	R:44	17	27
	S:6	0	6
Pollos (50)	R:48	11	37
	S:2	0	2
Aves salvajes (34)	R:14	1	13
	S:20	0	20

S: sensible, R: resistente, n: número de cepas

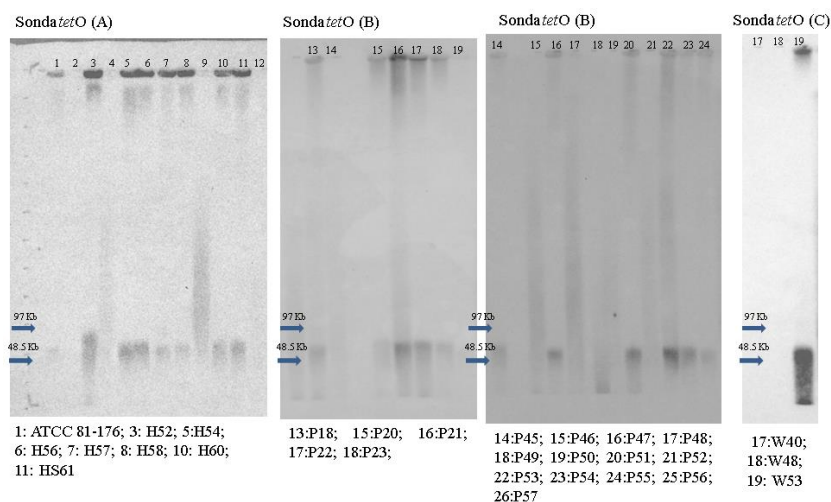


Figura 13: PFGE-S1 hibridación con sonda *tetO* de algunas de las cepas de *C. jejuni* aisladas digeridas con la enzima S1. A: humanos; B: pollos; C: aves salvajes se digirieron con la enzima S1 y se hibridaron con la sonda *tetO*. La cepa ATCC 81-176, que contiene un plásmido de 55 kb, se utilizó como cepa control al contener el gen *tetO*.

4.3.2.3 Resistencia a aminoglucósidos

En nuestro estudio el 9.3% de las cepas (14/150) presentaron resistencia a aminoglucósidos. Sólo una cepa fue resistente a gentamicina, siete fueron resistentes a kanamicina y 11 a estreptomina (Tabla 19). El perfil de resistencia de estas cepas mostró que siete eran resistentes a estreptomina (S), dos a kanamicina (K), cuatro a kanamicina y estreptomina y una a kanamicina y gentamicina (G). Producto de la amplificación mediante PCR y posterior secuenciación de los 18 genes se encontró que de las 14 cepas, sólo en 11 se identificaron genes AME quedando tres cepas por caracterizar el mecanismo responsable de la resistencia (H50, B36 y B44) (Tabla 19). En 8 de las 11 cepas productoras de AME se detectó el gen *aph(3')-IIIa*, que confiere resistencia a kanamicina, neomicina y gentamicina, junto al gen *ant(6)-Ia*, que confiere resistencia a estreptomina.

Tabla 19: Presencia de los genes *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia* en cepas de *C. jejuni* resistentes a aminoglucósidos.

Perfil de sensibilidad	AME	Cepas
K, G	<i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S)	H01
K	<i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S) <i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S)	H03, B26
K, S	<i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S) <i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S)	H52, B39, W05, W53
S	<i>aph(3')-IIIa</i> (KGNm), <i>ant(6)-Ia</i> (S) <i>ant(6)-Ia</i> (S) -	B27 B10, B22, B42 H50, B36, B44

AME, *aminoglycosides modifying enzymes*. K, kanamicina; G, gentamicina; S, estreptomina; Nm, neomicina

Los genes que confieren resistencia a aminoglucósidos están localizados en su mayoría en plásmidos (Shaw *et al.*, 1993) e incluso se han encontrado en islas de patogenicidad unidos a otros determinantes genéticos como *tetO* (Qin *et al.*, 2012).

Para el estudio de la localización de los genes *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia* se procedió a realizar el PFGE con la enzima de restricción S1 con las cepas resistentes a aminoglucósidos que presentaron estos genes. Al igual que en el apartado anterior, mediante PFGE-S1 sólo pudimos localizar el gen *aph(3')-IIIa* en las cepas H01 y H52 en

una banda de entre 97 y 145kb y el gen *ant(6)-Ia* en la cepa HS52 en una banda entre el mismo rango de tamaños (Figura 14).

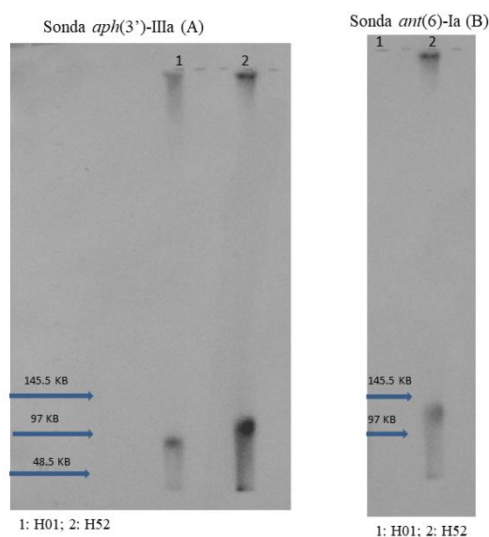


Figura 14: PFGE-S1 con sondas *aph(3')-IIIa* (A) y *ant(6)-Ia* (B) en cepas resistentes a aminoglucósidos digeridas con la enzima S1.

4.3.2.4 Resistencia a quinolonas

De las 150 cepas estudiadas, 102 fueron resistentes a quinolonas y dentro de ellas, 96 fueron resistentes a ácido nalidíxico y ciprofloxacina, cinco sólo a ciprofloxacina (H18, H32, H54, H60 y H72), con halos de inhibición entre 18 y 27 mm para el ácido nalidíxico y de 9 mm para ciprofloxacina, y una sólo fue resistente a ácido nalidíxico (W41) con halos de 9 mm para ácido nalidíxico (9mm) y de 30 mm a ciprofloxacina. Las 96 cepas resistentes a quinolonas y las cinco sólo resistentes a ciprofloxacina presentaron la mutación Thr86Ile, mientras que la cepa sólo resistente a ácido nalidíxico no presentó ninguna mutación en la región amplificada del gen *gyrA*.

Otro de los mecanismos descritos que confiere resistencia a quinolonas es la adquisición de los genes *qnr*. Mediante PCR descartamos la presencia estos genes de origen plasmídico.

4.4. Secuenciación masiva (*WGS*) en una selección de cepas aisladas de muestras de humanos, pollos y aves salvajes

Según se ha observado hasta este punto, todos los mecanismos estudiados han sido mediante PCR y secuenciación por el método de Sanger. Sin embargo, con la nueva era de la secuenciación (*NGS*: del inglés *Next Generation Sequencing*) se ha ganado en velocidad, profundidad y precisión en la obtención de los resultados, los cuales se obtienen con menos labor en el laboratorio. Mediante *NGS* y sus variantes se pueden estudiar en profundidad genes específicos o secuenciar todo el genoma (*WGS*). En nuestro estudio se escogieron 48 cepas con el objetivo de comparar las técnicas estándares de MLST y PFGE obtenidas mediante PCR y secuenciación, con el MLST+, tanto el *core genome* MLST (*cgMLST*) como el *whole genome* MLST (*wgMLST*), obtenidos mediante *WGS*. Además, aprovechando la *WGS* se determinaron los genes de resistencia presentes en dichas cepas introduciendo las secuencias al web *ResFinder*. Uno de los primeros análisis, luego de obtener las secuencias, consistió en verificar la calidad de las mismas (Tabla 20).

Las 48 cepas alcanzaron valores altos de Q30, entre el 86% y el 93%, con una profundidad de 30x, una longitud de los *scalfold* superior a 15.000 bases y una media de la longitud de los *scalfolds* (N50) superior a 15.000 bases, valores mínimos descritos en la literatura para el análisis de las secuencias. La excepción estuvo en la cepa B27 (con una N50 de 22194, que aunque dentro del rango muy cerca del límite) y en la cepa W47 (con una N50 de 3409), las cuales presentaron los valores de Q30 del 87.4% y el 86.9%, respectivamente, que aunque fueron valores de calidad menores se decidió continuar con el análisis.

Una vez procesadas las secuencias tal como se indica en Materiales y Métodos, se procedió a la obtención del ST utilizando el *plugin* del software BioNumerics v7.6.3, basado en los siete genes *houskeeping* definidos en pubmlst.org. En nueve de las 48 cepas analizadas (18.75%), la ST resultante fue distinta a la obtenida por técnicas convencionales (Tabla 21). Estas diferencias se deben, por una parte, a la nominación de alelos distintos a los obtenidos mediante PCR y Sanger, y por la otra, a que la nominación de los ST no coincide entre pubmlst.org y BioNumerics. Además, en un caso (W47) se observó como BioNumerics nomina un nuevo ST sin consensuarlo con pubmlst.org.

Tabla 20: Parámetros de calidad obtenidos en las cepas analizadas mediante WGS.

Cepas	<i>Avg Coverage</i>	Q30	N50	<i>Length</i>	%GC
H01	510	88	58687	1757648	31,79
H05	515	89	53382	1735448	31,48
H07	600	88	86781	1674036	31,51
H19	480	87	166226	1718094	31,76
H32	604	88	114932	1697237	32,07
H33	433	88	114689	1705259	31,59
H35	627	88	114362	1630145	32,1
H38	549	88	94313	1662876	32,28
H48	612	89	149326	1608892	31,91
H49	466	88	103367	1676993	31,72
H50	560	88	117957	1690418	31,26
H60	490	88	87207	1732490	31,7
H61	393	88	114200	1630260	31,85
H63	410	88	91808	1762481	31,19
H70	540	87	268356	1691421	31,95
H72	436	89	90043	1857647	31,37
B02	509	88	127727	1710580	31,48
B09	581	87	97595	1709197	31,8
B16	470	88	115946	1683287	31,99
B17	457	87	94850	1783058	31,93
B23	457	88	101614	1680563	31,41
B24	526	88	89739	1779596	31,58
B25	794	87	103770	1728757	31,65
B27	662	87	22194	1731743	31,79
B28	576	87	94480	1743310	31,89
B29	570	86	218495	1817086	32,16
B39	514	88	105511	1690002	31,59
B56	484	87	109933	1632242	32,17
W02	505	88	99726	1633995	31,68
W05	764	87	133928	1623877	32,1
W06	742	87	176447	1642126	31,96
W07	337	88	82186	1628983	31,81
W09	803	86	129213	1786390	32,23
W12	592	87	121098	1770848	31,5
W13	530	87	164519	1615882	31,61
W17	489	87	143396	1610342	32,02
W20	531	87	155147	1777875	31,91
W25	536	87	129233	1742200	31,82
W26	687	87	88859	1755500	32,59
W28	546	86	103408	1748332	32,16
W29	574	87	400553	1761695	31,39

Tabla 20: Continuación

Cepas	<i>Avg Coverage</i>	Q30	N50	<i>Length</i>	%GC
W33	1583	87	134523	1639149	31,86
W43	540	87	138895	1607794	31,87
W47	660	87	3409	1916821	32,39
W50	253	93	129617	1751101	32,16
W52	458	87	129713	1762755	32,05
W53	726	87	120843	1671299	31,51
W56	1295	87	54492	1715643	32,3

Antes de realizar el *cgMLST* y el *wgMLST*, se compararon los datos proporcionados por el *MLST* clásico con los datos obtenidos mediante *NGS* (Figuras 17A y 18A). En el *MLST* clásico había 9 casos con más de una cepa por *ST* (*ST*-5, *ST*-45, *ST*-48, *ST*-61, *ST*-354, *ST*-441, *ST*-1275, *ST*-4355 y *ST*-8513). De estos, en el *MLST* mediante *WGS*, en cinco *ST* la homología entre las cepas fue del 100% (*ST*-354, *ST*-441, *ST*-1275, *ST*-4355 y *ST*-8513). En el resto, el porcentaje de homología fue variable. Así las cepas del *ST*-5 (B28 y B29) presentaron una homología del 42%, siendo la cepa B29 la que por *WGS* se obtiene como resultado el *ST*-607, del complejo clonal *ST*-607. De las tres cepas del *ST*-45 (H48, B27 y W43), dos presentaron una homología del 100% mientras que la cepa B27 mostró una homología del 10%. Esta cepa por *WGS* era del *ST*-48, cuya homología con el *ST*-45 no es tampoco cercana (Figura 15A). De las tres cepas que conforman el *ST*-48, dos (B09 y W29) tienen una homología del 100% mientras que la cepa H38 sólo mostró una homología del 72% y fue caracterizada por *WGS* como *ST*-572 (complejo clonal *ST*-206). Finalmente está el *ST*-61 cuyas cepas (H05 y H70) presentaron una homología del 85%. También cabe señalar la pareja formada por las cepas H07 y H33, con *ST*-1710 y *ST*-8479, respectivamente, las cuales mostraron una homología del 100%, pues por *WGS* la H33 se caracterizó con la *ST*-1710. Por último, cabe remarcar que de los cuatro clones descritos por *PFGE*, dos se seleccionaron para el estudio de *WGS* y los dos se mantuvieron.

Tabla 21. Diferencias en la nominación de los alelos y ST al comparar los resultados obtenidos mediante el MLST convencional con los obtenidos mediante *WGS*, los cuales se analizaron a través de la utilización del software BioNumerics v7.6.3.

Cepas	MLST convencional (PubMLST)								MLST por <i>WGS</i> (BioNumerics)								ST ^a	Q30 (%)	
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>	ST	CC	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>			ST
H19	7	<u>2</u>	2	15	23	3	12	5799	443	7	<u>17</u>	2	15	23	3	12	<u>51</u>	51	87
W33	1	6	<u>7</u>	2	40	32	3	179	179	1	6	<u>29</u>	2	40	32	3	220	220	87
W25	27	33	22	49	43	20	<u>6</u>	8511	127	27	33	22	49	43	20	<u>31</u>	1268	1268	87
H33	2	71	5	<u>62</u>	<u>10</u>	67	6	8479	-	2	71	5	<u>66</u>	<u>22</u>	67	6	1710	1710	88
H38	<u>2</u>	4	<u>1</u>	2	<u>7</u>	1	5	48	48	<u>62</u>	4	<u>5</u>	2	<u>2</u>	1	5	572	572	88
B29	<u>7</u>	2	5	<u>2</u>	<u>10</u>	3	<u>6</u>	5	353	<u>8</u>	2	5	<u>53</u>	<u>11</u>	3	<u>1</u>	607	607	86
B17	<u>2</u>	<u>17</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	883	21	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>64</u>	<u>23</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	7110	7110	87
B27	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>7</u>	<u>1</u>	45	45	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>5</u>	48	48	87
W47	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>10</u>	<u>176</u>	<u>1</u>	<u>32</u>	<u>1</u>	8512	45	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>7</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>7</u>	<u>1</u>	9190	*	87

STa: ST obtenidas con *WGS* mediante pubmlst.org

*: La combinación de estos alelos es la más próxima al complejo clonal ST-45, sin embargo BioNumerics da una numeración no existente en la base de datos del pubmlst.org

Al analizar los datos mediante MLST+, primero mediante *core genome* MLST (*cgMLST*) y después mediante *whole genome* MLST (*wgMLST*), las relaciones clonales variaron. En el *cgMLST* se compararon 2186 alelos, mientras que en el *wgMLST* se complementaron con 1343 comparando un total de 3529 alelos. Mediante el análisis de *cgMLST*, el primer cambio que se observó, respecto al MLST por *NGS*, es que no había ninguna homología del 100% con la excepción de los clones 2 (ST-4355) y 4 (ST-8513) ya descritos por PFGE (Figuras 15B y 16B). Las cepas de los ST-354, ST-441 y ST-1275 presentaron una homología del 96%, 97% y 99%, respectivamente. En cambio, las cepas del ST-5 pasaron de una homología del 42% al 69%, el ST-48 del 72 al 76% y el ST-61 del 85% al 90%. Dos de las cepas del ST-45 mostraron una homología del 71% e incorporaron la cepa W47 del ST-8512 (ST-9190 por *WGS*) con una homología del 77%. Sin embargo, la cepa B27 (con un ST-48 por *WGS*) pasa a formar parte del completo clonal ST-48.

Por último, el análisis del *wgMLST* (Figura 15C; Figura 16C), mantiene los porcentajes obtenidos con el *cgMLST* por lo que, a modo de conclusión se podría definir que a partir de nuestros resultados las cepas formarían parte de un clon cuando presentan una homología igual o superior al 90% y las cepas formarían un cluster cuando presentan una homología igual o superior al 70%.

El análisis de la clonalidad mediante *WGS* cuando se realiza comparando alelos y no comparando SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*), se describe mediante distancias genéticas. En nuestro caso se ha determinado las distancias génicas entre las cepas con un mismo ST tanto cuando las analizamos mediante *cgMLST* como por *wgMLST* (Tabla 22).

Las distancias génicas entre las cepas de un mismo clon, es decir que presentaron una homología del 90% o superior oscilaron entre 0 y 0,18 (B, C, D, F, G y I) por *cgMLST* y entre 0 y 0,14 por *wgMLST* (B, C, D, F, G y I). Las distancias génicas entre las cepas del *cluster* A fueron de 0,02 y 0,03 para *cgMLST* y *wgMLST*, respectivamente. En las cepas con una homología del 96% (B09 y W29) cuando otra cepa fue añadida (H38), la distancia encontrada fue de 0,44 a 0,46 (*cgMLST*) o de 0,27 a 0,28 (*wgMLST*). Respecto al *cluster* H, las distancias génicas encontradas varían: entre las cepas W47 y W43 fue de 0,1; entre W47 y H48 de 0,4 y entre H48 y W43 de 0,5. Esta distancia incrementa a mayor de 1 cuando se introduce en el *cluster* la cepa B27.

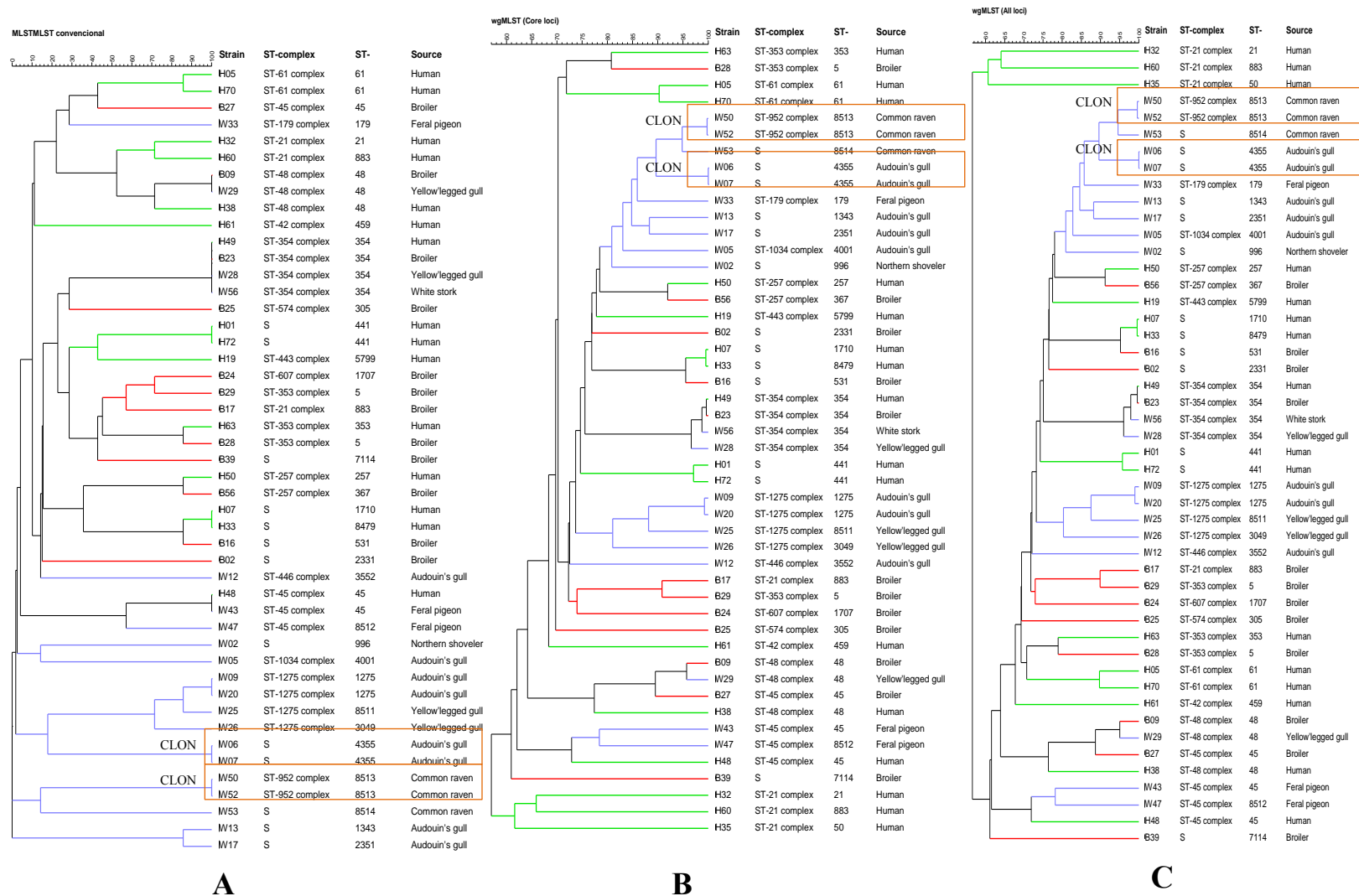


Figura 15: Agrupación de las 48 cepas analizadas mediante WGS. A: Distribución de las ST obtenidas mediante MLST convencional; B: Mediante el cgMLST y C: Mediante el wgMLST. Se observa que la distribución de las cepas se mantiene aunque aumente de los siete genes del MLST a todos los genes en wgMLST.

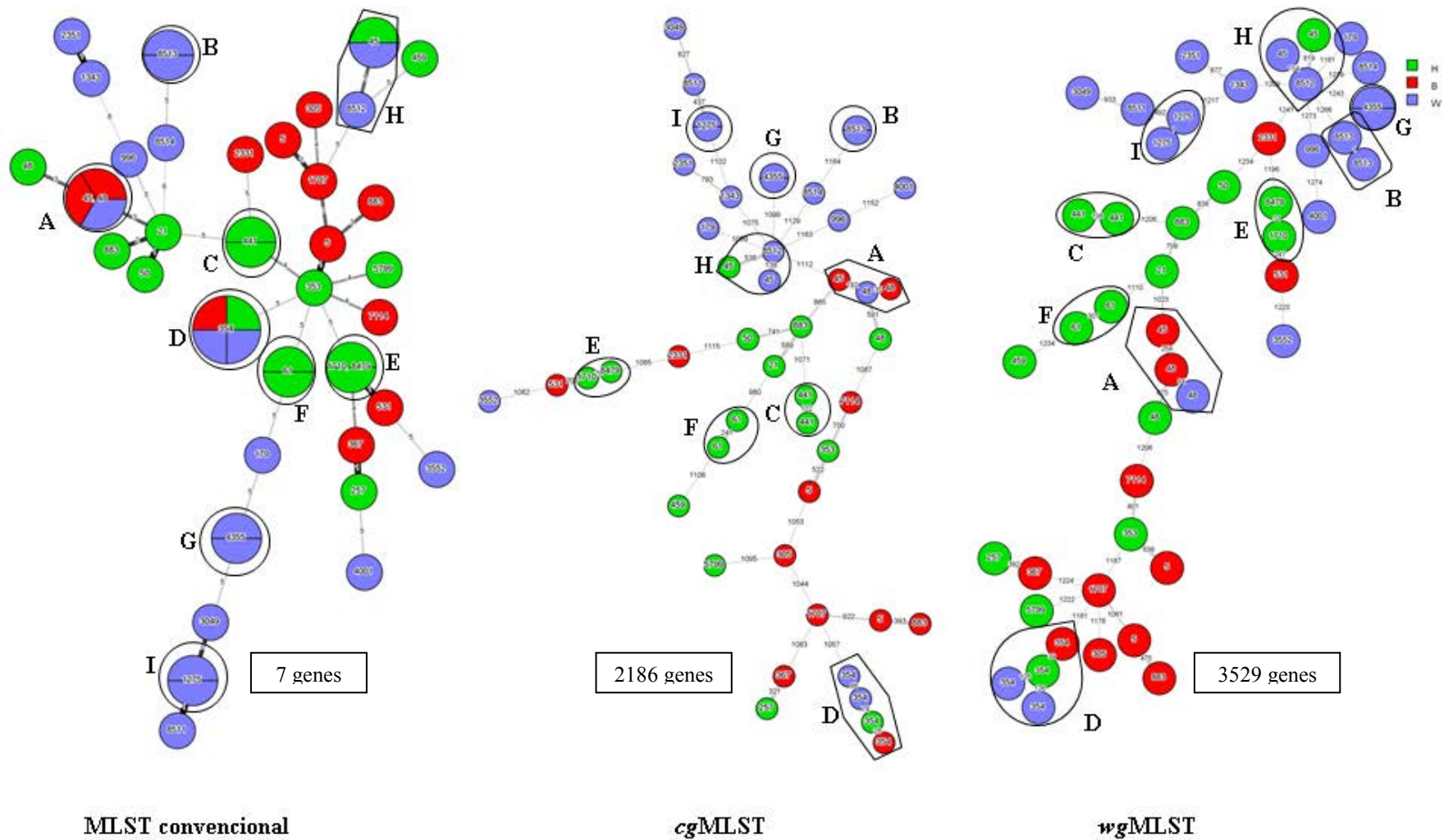


Figura 16: *Minimum Spanning Tree* de las 48 cepas estudiadas. Se muestra la relación existente según MLST, *cgMLST* y *wgMLST* basándonos en la *WGS*. El número de las ST es el obtenido por PCR/pubmlst.org. Los círculos señalan las cepas que resultaron idénticas al comparar los siete genes del MLST convencional.

Tabla 22: Distancia génica obtenida por *WGS*.

Grupo*	Complejo clonal	ST	n	Cepa	Según <i>cgMLST</i>	Según <i>wgMLST</i>
A	48	48	3	H38, B09, W29	0.02 a 0.46	0.03 a 0.28
B (clon 4)	952	8513	2	W50, W52	0	0.00045
C	S	441	2	H01, H72	0.07	0.09
D	354	354	4	B23, H49, W28 y W56	0.02 a 0.05	0.01 a 0.06
E	S	1710	1	H07	0.02	0.01
F	S	8479	1	H33	0.18	0.14
G (clon 2)	S	4355	2	W06, W07	0	0
	45	45	2	H48, W43	0.5	0.30
H	45	8512	1	W47	0.1 a 0.4	0.06 a 0.25
	45	45	1	B27	1.2 a 1.3	0.75 a 0.81
I	1275	1275	2	W09, W20	0	0.00045

*Las iniciales de la A a la I coinciden con los círculos detallados en la Figura 18.

Según las últimas tendencias para determinar los puntos de corte que permitirían definir un clon sólo sería necesario utilizar las distancias obtenidas por *cgMLST*. Así pues, en nuestro caso la distancia génica que definen un clon sería de 0,18, es decir todas las cepas que tuvieran una distancia génica igual o menor a 0,18 dentro de un mismo lineaje estarían incluidas dentro de un mismo clon.

A parte de la relación clonal entre las cepas, los resultados obtenidos por *WGS* muestran una correlación con los métodos convencionales de tipaje (MLST y PFGE). Las cepas de aves salvajes están agrupadas y son más cercanas entre sí, mientras que las cepas humanas y de pollo se muestran mezcladas entre ellas, apoyando la idea de que el principal origen de las gastroenteritis por *Campylobacter* es la ingestión de carne de pollo contaminada.

4.4.1 Resistencia a antibióticos

Otra función que se puede realizar a partir de la secuencia del genoma es la determinación de la presencia de distintos genes de resistencia. En nuestro caso utilizamos la web *ResFinder* que presenta una relación de genes específicos que confieren resistencia frente a: aminoglucósidos, betalactámicos, tetraciclinas, quinolonas, glucopéptidos, fenicoles, macrólidos entre otros. Esta web, sin embargo, no brinda información de genes estructurales o su acción en los mecanismos de resistencia,

sino que sólo están reflejados los genes adquiridos que más han sido reportados y las mutaciones mayormente descritas de algunos de los genes estructurales.

Mediante esta herramienta se identificaron en las cepas de *C. jejuni* estudiadas un total de 9 genes de resistencia a antibióticos adquiridos causantes de resistencia frente a diferentes antimicrobianos como ampicilina (6 genes de oxacilinasas), tetraciclina (*tetO*) y aminoglucósidos (2 genes) (Tabla 23). De los seis genes que codifican para una oxacilinasas, *bla*_{OXA-61} se encontró en 23 cepas, *bla*_{OXA-184} en 7, *bla*_{OXA-185} y *bla*_{OXA-447} en 1, *bla*_{OXA-448} en 3 y *bla*_{OXA-449} y *bla*_{OXA-465} en 4. Mientras que por PCR y Sanger sólo se logró identificar dos tipos *bla*_{OXA-61}-type y *bla*_{OXA-184}-type (Tabla 23). Con estos nuevos datos podemos observar que las oxacilinasas diferentes a la *bla*_{OXA-61} fueron identificadas en cepas aisladas de muestras de aves salvajes, con la excepción de las encontradas en las cepas aisladas de muestras de humanos (H19 y H48). También cabe señalar que en tres cepas (H61, B17 y B28) por *WGS* no se determinó la presencia de *bla*_{OXA-61} (Tablas 23 y 24).

La problemática de las cepas que no fueron coincidentes en el tipo de oxacilinasas (A) identificada mediante PCR y mediante *ResFinder* y otras webs como *card* (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) y *Argannot* (*Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation*) utilizando la secuencia de todo el genoma, podría explicarse debido a que el fragmento analizado del gen *bla*_{OXA-61} amplificado mediante PCR en nuestro estudio comprende un tamaño entre 238-449 bp, por lo que no contienen todo el tamaño del gen *bla*_{OXA-61}, el cual presenta un total de 762 bp. Al realizar la comparación con la secuencia completa obtenida del *WGS* se obtiene la identificación de la oxacilinasas específica, ya que analiza la totalidad del gen. Esta problemática aplica para todas las 17 cepas incluidas en el grupo A, por lo que el error podría estar en los cebadores escogidos con los cuales se amplificó el gen, aunque cabe decir que los cebadores utilizados son los descritos desde la identificación del gen por Alfredson y Korolik en 2005 (Alfredson and Korolik, 2005). Por tanto, se puede afirmar que en nuestro estudio de determinación de genes de resistencia a ampicilina los genes amplificados mediante PCR fueron *bla*_{OXA}-type.

De los genes encontrados que confieren resistencia a tetraciclina: *tetA* y *tetO*, sólo el último puede ser adquirido, por lo que es el único que se encuentra inscrito en la base de datos. De las 48 cepas se detectó el gen *tetO* en 32 cepas de las 35 positivas por PCR y

Sanger (Tabla 14). Las tres cepas en que no se detectó fueron H48, W07 y W17 (Tabla 24, grupo C).

Por último, los genes de resistencia a aminoglucósidos, se detectaron por PCR y Sanger en ocho de las seis cepas portadoras. Las dos cepas nuevas, la H35 y la H72 (Tablas 23 y 24) presentaron los genes *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia*, ambos descritos como causantes de fenotipos de resistencia a gentamicina y/o kanamicina y estreptomicina, respectivamente. En este caso, es válido recordar que sólo se escogieron para el estudio las cepas resistentes a uno o más aminoglucósidos, por lo que las cepas que mostraron fenotipo sensible no se estudiaron, tal y como se evidencia en la tabla 25. Las dos cepas nuevas se mostraron sensibles a todos los antimicrobianos, por lo que estos genes en estas cepas podrían no expresarse.

Tabla 23: Relación de genes de resistencia adquiridos identificados mediante *ResFinder*.

Betalactámicos	Tetraciclina	Aminoglucósidos	n	Cepas
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	<i>tetO</i> (M18896)	-	16	H05, H07, H32, H33, H38, H49, H50, H60, H63, B16, B25, B56, W29, W56
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	-	-	3	B09, B27, W12
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	<i>tetO</i> (M20925)	<i>aph(3')-III</i> (M26832) <i>ant(6)-Ia</i> (AF330699)	2	H01, B39
-	-	-	2	W50, W52
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	<i>tetO</i> (AIOQ01000025)	-	1	H70
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	<i>tetO</i> (M20925)	-	1	B24
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	<i>tetO</i> (AIOQ01000025)	<i>ant(6)-Ia</i> (KF864551)	1	H35
<i>bla_{OXA-61}</i> (AY587956)	-	<i>aph(3')-III</i> (M26832); <i>ant(6)-Ia</i> (KF864551)	1	H72
<i>bla_{OXA-184}</i> (JQ396378)	<i>tetO</i> (M18896)	-	3	B23, B29, W28
<i>bla_{OXA-184}</i> (JQ396378)	<i>tetO</i> (AIOQ01000025)	-	3	B02, W20, W09
<i>bla_{OXA-184}</i> (JQ396378)	<i>tetO</i> (M18896)	<i>aph(3')-III</i> (M26832)	1	W05
<i>bla_{OXA-185}</i> (JQ396379)	<i>tetO</i> (M18896)	-	1	H19
<i>bla_{OXA-447}</i> (KR061496)	-	<i>aph(3')-III</i> (M26832); <i>ant(6)-Ia</i> (KF864551)	1	W53
<i>bla_{OXA-448}</i> (KR061497)	-	-	3	W33, W43, W47
<i>bla_{OXA-449}</i> (KR061498)	-	-	4	H48, W06, W07, W13
<i>bla_{OXA-465}</i> (KR061500)	-	-	4	W02, W17, W25, W26
-	<i>tetO</i> (M18896)	-	3	H61, B17, B28

Entre paréntesis se describe la secuencia del GenBank con la que presenta mayor grado de homología.

Tabla 24: Cepas con genes de resistencia a antibióticos identificados mediante *ResFinder* y discrepantes a las identificadas o no mediante PCR.

No.	Cepas del grupo A		Cepas del grupo B		Cepas del grupo C		Q30 (%)
1	H48	OXA-449	H35	<i>ant(6)-Ia</i>	W07	<i>tetO</i>	88
2	B02	OXA-184	H72	<i>aph(3')-IIIa</i> ; <i>ant(6)-Ia</i>	H48	<i>tetO</i>	89
3	B23	OXA-184			H61	<i>bla_{OXA-61}</i>	88
4	W06	OXA-449			B17	<i>bla_{OXA-61}</i>	87
5	W13	OXA-449			B28	<i>bla_{OXA-61}</i>	87
6	W17	OXA-465			W17	<i>tetO</i>	87
7	W20	OXA-184					
8	W28	OXA-184					
9	W26	OXA-465					
10	H19	OXA-185					
11	B29	OXA-184					
12	W02	OXA-465					
13	W05	OXA-184					
14	W25	OXA-465					
15	W33	OXA-448					
16	W47	OXA-448					
17	W53	OXA-447					
Total	17		2		6		

A: Cepas discrepantes en cuanto a oxacilinasas; **B:** Cepas con fenotipo sensible y con genes de resistencia que posiblemente no se expresan; **C:** Cepas PCR positivas en las que no se ha identificado el gen de resistencia mediante *WGS*.

Si se analiza la relación entre fenotipo y presencia de genes de resistencia se tiene que de las 48 cepas analizadas, 43 presentaron el gen *bla_{OXA}*, tanto las cepas sensibles como las resistentes. Solo en 2 cepas (B28 y W50) sensibles se corresponde fenotipo sensible y no presencia de este gen de resistencia mediante *WGS* y PCR (Tabla 25). De las cepas resistentes a quinolonas se observó la mutación Thr86Ile en todas las cepas resistentes a ciprofloxacina y a ácido nalidíxico, mientras que la mutación descrita también se observó en las tres cepas sensibles a NAL (H32, H60 y H72) (Tabla 25). Tanto las cepas sensibles como resistentes a tetraciclina presentaron el gen *tetO*. La diferencia existente entre las dos técnicas se evidenció en una cepa resistente a TET la cual, mediante PCR, presentó el gen *tetO* (B09). En el caso de las cepas sensibles a TET siete de ellas (H48, W02, W06, W07, W13, W17 y W26) presentaron el gen *tetO* mediante PCR, mientras que mediante *WGS* no se detectó el gen.

Por último, en el caso de las cepas resistentes a aminoglucósidos la presencia de genes detectados por PCR en todas las cepas se corresponden con los mismos genes detectados mediante *WGS*, excepto en una cepa resistente a estreptomicina (B27) donde se detectaron los genes de resistencia mediante PCR y no por *WGS* (Tabla 25).

Tabla 25: Mecanismos de resistencia a antimicrobianos detectados por *ResFinder* mediante *WGS*.

Resistencia a	Nº Resistentes (R) Sensibles (S)	Mecanismo de resistencia adquirido encontrado	Nº cepas (R/S) con el mecanismo detectado por <i>WGS</i>	Nº cepas (R/S) con el mecanismo detectado por PCR + Sanger
Ampicilina	R:29/ S:19	<i>bla_{OXA}</i>	43 (27/16)	43 (29/14)
Acido nalidíxico	R:28/ S:20	<i>gyrA</i> Thr86Ile	31 (28/3)	31 (28/3)
Ciprofloxacina	R:31/ S:17		31 (31/0)	31 (31/0)
Tetraciclina	R:34/ S:14	<i>tetO</i>	34 (32/2)	42 (33/9)
Aminoglucósidos				
Gentamicina	R: 1/ S:47	<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6)-Ia</i>	1/0	1/NA
Kanamicina	R:4/ S:44	<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6)-Ia</i>	4/2*	4/NA
Estreptomicina	R:5/ S:43	<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6)-Ia</i>	4/3**	3/NA

*: Dos cepas con la presencia del gen *ant(6)-Ia* y una cepa con la presencia del gen *aph(3')-IIIa* (Kanamicina).

** : Tres cepas con la presencia del gen *ant(6)-Ia* y dos cepa con la presencia del gen *aph(3')-IIIa* (Estreptomicina).

Nº: número, R: cepa resistente, S: cepa sensible, NA: no analizado

Otra información que nos brinda la web *ResFinder* es conocer las mutaciones que presentan la totalidad de los genes introducidos en la web. Así se conocen las mutaciones en los genes *rpsL*, en el gen *cmeR*, en el gen *gyrA* y en el gen 23S.

Los genes *rpsL* y *rplV*, los cuales codifican para las proteínas L4 y L22, respectivamente; son los comúnmente analizados en busca de mutaciones que ocasionan el fenotipo resistente a eritromicina y estreptomicina o a ambos (Olkola *et al.*, 2010). Si se manifiesta una mutación en estos genes la resistencia a macrólidos principalmente

es evidente (Ladely *et al.*, 2009). Por otra parte el gen *cmeR*, es un regulador transcripcional que actúa sobre la bomba de expulsión CmeABC, por lo que si el represor esta mutado no se uniría al promotor de la bomba de expulsión y esta se expresaría constitutivamente, provocando resistencia frente a varios antimicrobianos (Nishino *et al.*, 2016).

En las 31 cepas resistentes a quinolonas de las 48 que se analizaron por *WGS*, se describió la mutación de una Treonina por una Isoleucina (Thr86Ile). Además, de esta mutación, estuvo presente la mutación de una prolina por una serina (P104S) en la cepa H01 y la mutación del ácido aspártico por la asparagina (D90N) en la cepa H70.

Es importante destacar que esta base de datos, *ResFinder*, es muy referida y completa, y cuenta con la información de secuencias específicas descritas para *Campylobacter*, lo cual contribuye al gran volumen de genes que se ha logrado identificar. Aunque también, puede darse el caso de que nuestras cepas tengan genes que no se hayan descrito aún y no estén en esta base de datos. La utilización de las restantes bases de datos, *card* y *Argannot*, no arrojaron datos significativos que discreparan de los obtenidos mediante *ResFinder*.

4.4.2 Identificación de plásmidos y genes de virulencia mediante las web *PlasmidFinder*, *VirulenceFinder* y *vfdb* respectivamente

En el caso de la presencia de plásmidos, las webs *PlasmidFinder* y *VirulenceFinder*, disponen, específicamente, de información para Enterobacterias y algunos microorganismos grampositivos como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. La web *VirulenceFinder* identifica factores de virulencia correspondientes a especies tales como: *Listeria*, *E. coli* (toxina de shiga), *Enterococcus* y *Staphylococcus* (genes para *S. aureus*). Por este motivo en ninguno de los casos fue identificado ningún plásmido. Sin embargo, con la utilización de la web *vfdb* se detectaron 9 genes de virulencia, como se muestra en la tabla 26.

Tabla 26. Genes de virulencia identificados mediante la web *VirulenceFinder* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>).

Genes	POS (n=48)	Identidad (%)
<i>cadF</i>	48	98-100
<i>cdtA</i>	40	99-100
<i>cdtB</i>	36	99-100
<i>cdtC</i>	38	98-100
<i>htrB</i>	36	94-100
<i>ciaB</i>	44	98-99
<i>virB11</i>	1	98
<i>wlaN</i>	1	100

4.4.3 Comparación de los resultados entre las técnicas convencionales y el *WGS*

El haber determinado por técnicas convencionales los estudios de clonalidad (PFGE), filogenia (MLST) y detección de los mecanismos de resistencia (PCR y secuenciación por Sanger), nos permite evaluar los resultados de la secuenciación masiva con el posterior análisis con BioNumerics y la base de datos del *Center for Genomic Epidemiology* (*ResFinder*, *PlasmidFinder* y *VirulenceFinder*) (Tabla 27).

El primer problema que se encontró fue la diferente numeración de alelos y ST entre pubmlst.org y BioNumerics, con una discrepancia en 9 cepas. En segundo lugar, mediante *WGS* se pudo caracterizar todos los genes *bla_{OXA}*, sin depender del diseño de iniciadores, excepto en dos cepas, del mismo modo que se detectó el gen *tetO* en todas excepto en tres cepas. En cambio, como para los aminoglucósidos sólo se escogieron las cepas resistentes se pudieron detectar la presencia de genes AME en cepas sensibles.

Así pues, los resultados del análisis de *WGS* muestran que sería preferible analizar dichas secuencias con más de un sistema de análisis.

Tabla 27: Número de cepas que concuerdan o no en la información resultante de las técnicas convencionales y la obtenida mediante la utilización de la información de todo el genoma.

ST	ST por WGS	AMP-PCR	AMP-WGS	TET-PCR	TET-WGS	AME-PCR	AME-WGS	n	Cepas
5799	51	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-185}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	H19
8479	1710	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	H33
48	227	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	H38
45	7512	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		<i>aph(3')-III; ant(6)-Ia</i>	N	1	B27
5	607	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	B29
8511	1268	N	<i>bla_{OXA-465}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	W25
883	1710	<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	B17
179	220	N	<i>bla_{OXA-448}</i>	N		NE	N	1	W33
8512	7510	N	<i>bla_{OXA-448}</i>	N		NE	N	1	W47
=		N	N	N			N	2	W50, W52
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		NE	<i>ant(6)-Ia</i>	1	H35
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	14	H05, H07, H32, H49, H50, H60, H63, H70, B16, B24, B25, B56, W29, W56
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	N		NE	N	2	B09, W12
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	N	<i>tetO</i>		NE	N	2	H61, B28
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>		<i>aph(3')-III; ant(6)-Ia</i>		2	H01, B39
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-61}</i>	<i>tetO</i>	N	NE	<i>aph(3')-III; ant(6)-Ia</i>	1	H72
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>tetO</i>		-	-	3	B02, B23, W20, W28
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>tetO</i>	<i>tetO</i>	<i>aph(3')-III; ant(6)-Ia</i>	<i>aph(3')-III; ant(6)-Ia</i>	2	W05, W53
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-449}</i>	<i>tetO</i>	N	NE	N	1	H48
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-449}</i>	N		NE	N	2	W06, W13
=		<i>bla_{OXA-61t}</i>	<i>bla_{OXA-465}</i>	N		NE	N	1	W02
=		<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>tetO</i>		NE	N	1	W09
=		<i>bla_{OXA-184}</i>	<i>bla_{OXA-465}</i>	<i>tetO</i>	N	NE	N	1	W17

Tabla 27: Continuación

ST	ST por WGS	AMP-PCR	AMP-WGS	TET-PCR	TET-WGS	AME-PCR	AME-WGS	n	Cepas
=		N	<i>bla_{OXA-448}</i>	N	NE	N	N	1	W43
=		N	<i>bla_{OXA-449}</i>	<i>tetO</i>	N	NE	N	1	W07
=		N	<i>bla_{OXA-465}</i>	N	N	NE	N	1	W26

NE: no estudiadas; N: negativo; *bla_{OXA-61t}*: *bla_{OXA-61}*-type

5. DISCUSIÓN

Campylobacter es una de las causas más comunes de enfermedad bacteriana de transmisión alimentaria en todo el mundo. El número estimado de casos de campilobacteriosis es de nueve millones por año. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son las dos especies responsables de la gran mayoría de las infecciones humanas, de entre las cuales un 80-90% se deben a *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 2000; CDC, 2013). La campilobacteriosis es una de las infecciones más frecuentemente transmitidas por alimentos. Con más de 190.000 nuevos casos por año en la UE, la EFSA ha estimado un coste económico anual de alrededor de 2,4 mil millones de euros (EFSA, 2015).

El reservorio de *Campylobacter* es el tracto gastrointestinal de las aves, ganado y animales domésticos. En el hombre, la infección se transmite fundamentalmente a partir de la ingesta de pollo poco cocinado o de alimentos contaminados con *Campylobacter* al haber estado en contacto con carne de ave cruda durante su manipulación. La mayoría de los casos de campilobacteriosis son esporádicos, siendo relativamente poco frecuente la aparición de brotes. Esto se debe, en parte, a que *Campylobacter* no se multiplica en los alimentos. La dosis infectiva mínima no se conoce con exactitud pero se considera que 10^3 UFC son suficientes para causar la enfermedad (Fitzgerald and Nachamkin, 2011).

A pesar que la caracterización de brotes producidos por *Campylobacter* no es frecuente pues son fenómenos autolimitados, si existen estudios poblacionales donde se describen los clones predominantes. Estos estudios incluyen diferentes hábitats, como el animal, tanto el relacionado con la alimentación como con la vida salvaje, con el objetivo de determinar diferencias entre los clones presentes en un hábitat y en otro, pues tal como se ha dicho anteriormente, en el hábitat humano *Campylobacter* actúa como patógeno, mientras que en el hábitat animal está como reservorio. La caracterización del microorganismo nos brinda la posibilidad de saber si existen determinados clones en un hábitat concreto o no. También la caracterización nos brinda información de las cepas circundantes en un ambiente y sus características de acuerdo a su perfil de resistencia a antibióticos, o si sería el caso, de la existencia de cepas multiresistentes.

En nuestro estudio las cepas no fueron escogidas en el contexto de brote, pues las muestras de humanos, pollos y aves salvajes se seleccionaron en diferentes años y diferentes sitios.

A pesar de las diferentes técnicas de tipaje para determinar la clonalidad, el campo pulsado es considerado la técnica *Gold Standard* y es la utilizada por la mayoría de laboratorios (Noormohamed and Fakhr, 2014), y a día de hoy es muy utilizada en la descripción de brotes (Burakoff *et al.*, 2018).

En nuestro estudio, el campo pulsado se realizó con la utilización de dos enzimas de restricción, SmaI y KpnI, tal como recomiendan distintos autores (Oyarzabal *et al.*, 2008; Pedonese *et al.*, 2017) y donde se utiliza primeramente la enzima SmaI y después se le añade al análisis, el patrón obtenido con la enzima KpnI (Kim *et al.*, 2017). De esta forma se logran establecer los clones con mayor precisión, pues se conoce que la suma de los patrones de estas dos enzimas aumenta el poder discriminativo (Pedonese *et al.*, 2017), en nuestro caso se pasó de 12 a 4 clones.

Un fenómeno encontrado en nuestro estudio fue la presencia de la lisis celular que nos impidió tipar algunas cepas. Una vez realizadas las digestiones, cuatro de las 150 cepas fueron no tipables, como se ha evidenciado en otro estudio (Rozynek *et al.*, 2010). Este fenómeno, a parte de manifestarse en cepas de *Campylobacter*, también ha sido detectado en otras especies (O'reilly, 2011). En algunos casos esta problemática se resuelve con la utilización de la *thiurea* a diferentes concentraciones, como en un estudio realizado en 2011 donde solo en dos de las seis cepas estudiadas fue posible visualizar el patrón, gracias al efecto estabilizador de esta sustancia (O'reilly, 2011).

Otro aspecto clave en el análisis de los patrones de campo pulsado fue la interpretación de los patrones de bandas. Para ello nos basamos en los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995) a pesar que éstos no deberían ser tomados, pues las cepas no fueron colectadas en un mismo año. Sin embargo, otros autores avalan su aplicación siempre tomándose en consideración los datos epidemiológicos (Pedonese *et al.*, 2017). En nuestro caso, se determinó que las cepas que presentaban una homología del 95% eran pertenecientes a un mismo clon, pues entre ellas no había más de cuatro bandas de diferencia entre los perfiles de campo pulsado, así como había una correlación con los datos epidemiológicos disponibles (edad, sexo, localización, año de aislamiento, entre otros). Este criterio es muy exigente si lo comparamos con otros estudios que reportaron puntos de corte del 80 al 90%, siendo estudios que describen casos esporádicos (Frazão *et al.*, 2017) o brotes (García-Sánchez *et al.*, 2017), respectivamente, en diferentes hábitats.

La relación clonal, obtenida mediante campo pulsado, con la unión de los dos patrones de las dos enzimas estudiadas, solo mostró 4 clones, de los cuales 3 corresponden a cepas aisladas de aves salvajes y solo una a cepas aisladas de muestras de pollo. Las cepas aisladas de muestras de pacientes que sufrieron gastroenteritis no mostraron relación clonal. Estos resultados fueron concordantes con los datos clínicos, pues las cepas aisladas de muestras de humanos no fueron tomadas en el contexto de un brote, sino como casos esporádicos, de la misma manera que tampoco hay una prevalencia en niños de entre 1 y 5 años tal como se describe en la literatura (Quetz *et al.*, 2012), pues las muestras escogidas representaban varios grupos de edades.

La identificación del clon 1 comprendido por cepas aisladas de muestras de pollo se explica ya que las mismas aunque proceden de dos granjas diferentes, pertenecen a la misma empresa comercializadora y fueron procesadas en el mismo matadero, el mismo día. Se ha demostrado que existen expansiones clonales en los mataderos, debido a contaminación cruzada con otras cepas de *Campylobacter*, las cuales han persistido en el mismo matadero luego del proceso de limpieza y desinfección (Peyrat *et al.*, 2008; Elvers *et al.*, 2011; Melero *et al.*, 2012).

En el caso de los clones formados por cepas aisladas de muestras de gaviotas, palomas y cuervos no es de sorprender, pues las muestras fueron tomadas a cada especie de ave salvaje en un mismo muestreo o a lo sumo en dos muestreos y siempre a un mismo grupo de aves que compartían nicho ecológico. Aunque según se observó en el dendrograma las cepas estaban distribuidas formando diferentes *clusters* a todo lo largo del mismo. También es importante destacar la marcada especificidad de hospedador que muestran las cepas aisladas de cuervos y cigüeñas, lo cual se ha descrito para las cepas que colonizan este tipo de aves (Griekspoor *et al.*, 2013). Para las cepas aisladas de las palomas muestreadas en Sabadell (Barcelona) la distribución se mostró más amplia, observándose valores de entre 65% y 80% de similitud entre ellas, lo cual puede deberse a la relación más estrecha que tienen estas aves con el entorno urbano, por lo que sería más probable que las cepas de *C. jejuni* no compartan tal nivel de similitud como las aisladas de las gaviotas y cuervos. Esto nos confiere una idea de la importancia del ambiente donde conviven estos animales y la diversidad genética de las cepas que puedan colonizarles en dependencia del hábitat. La alta clonalidad entre las aves salvajes es debida a que todos los aislados fueron recogidos en la provincia de Barcelona. por lo que estos datos sugieren que las gaviotas y las palomas tienen una

fuente de infección común o también pudiera ser consecuencia de que las gaviotas son depredadores de las palomas.

En general los *clusters* representados por el género *Larus* (gaviotas) compartieron una homología del 65%, aunque estas muestras fueron tomadas de diferentes áreas como las Islas Medes, Delta del Ebro e Islas Alborán. Esto también se observó en otro estudio con cepas aisladas de heces de cuervos, donde las cepas aisladas de estas aves procedentes de diferentes regiones (Suecia, Australia y Reino Unido) eran genéticamente similares, lo cual concluye la elevada habilidad que posee *C. jejuni* de adaptarse a su hospedador (Griekspoor *et al.*, 2015).

Del análisis del MLST se obtuvieron 64 secuencias tipo, agrupadas en 21 complejos clonales y 12 *singletons*. De esta relación de ST se evidenció una cercanía entre las secuencias tipos de las cepas aisladas de muestras de pacientes con las aisladas de pollos donde se compartieron diez ST, no siendo así con las de aves salvajes, las cuales solo presentaron tres ST iguales que en las poblaciones restantes. Esto concuerda con los planteamientos de que las cepas aisladas de pacientes que sufren campylobacteriosis provienen del consumo de la carne de pollo contaminada (Skarp *et al.*, 2016; Ramonaite *et al.*, 2017).

Según nuestros resultados, en los diferentes nichos ecológicos analizados, parece predominar un ST específico en las cepas aisladas de cada uno de ellos (ST-21 en humanos, el ST-45 y ST-353 en pollo y el ST-179 y ST-1275 en aves salvajes).

Con respecto a las relaciones clonales, en las muestras humanas, sólo cuatro cepas comparten el mismo ST, el ST-572 (complejo ST-206). Estas cepas se aislaron en 2014 (tres en julio y una en diciembre), pero de personas no relacionadas, con diferentes edades (de 9 meses a 20 años). Cualquier relación clonal entre ellos fue descartada por el patrón de campo pulsado.

Las tres secuencias tipos obtenidas en mayoría (ST-21, ST-45 y ST-1275) se corresponden con las secuencias tipos que predominan en las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de humanos y pollos, como son la ST-21 y la ST-45. Estos ST se han considerado endémicos en algunas regiones, como en un estudio realizado en Japón entre los años 2007 y 2014, donde en muestreos aleatorios se observó el predominio de la ST-21 y ST-45 (Ohishi *et al.*, 2017). También en otro estudio realizado con cepas de

C. jejuni aislados de heces y de sangre de pacientes, las cepas con ST-21 y ST-50 se consideran de distribución global (Skarp *et al.*, 2017).

La ST-45 por su parte, en nuestro estudio, se ha encontrado en los tres ambientes estudiados (humano, pollo y ave salvaje); lo que se correlaciona con lo descrito, pues se ha demostrado que estas cepas son capaces de colonizar varios hospedadores (Colles and Maiden, 2012). Sin embargo, se ha relacionado más con cepas que colonizan pollos, sobretodo en Europa y Nueva Zelanda (Colles *et al.*, 2003).

Una agrupación de ST que se observó en la distribución del *minimum spanning tree* en mayoría fueron los ST-179 y ST-1275, los cuales han sido descritos en cepas aisladas de aves salvajes, como palomas y gaviotas. Nuestros resultados se corresponde con los planteamientos de otros estudios, donde estas secuencias tipo raramente han sido identificadas de cepas procedentes de muestras de humanos ni de pollos (Griekspoor *et al.*, 2010). En otros tipos de muestras, como agua de abasto a animales, se han aislado cepas de *C. jejuni* con ST-179, aunque se ha relacionado la carga bacteriana presente en estas aguas de estanques y lagos cercanos a sitios urbanos, a la presencia de aves acuáticas, las cuales suelen vivir y alimentarse en estos lugares (Krawiec *et al.*, 2017). El complejo ST-1275 y ST-179 también se han descrito en Escocia, en un estudio realizado con cepas de *C. jejuni* aisladas de varios ambientes (heces de humanos y aves salvajes y muestras de alimentos procedentes de la carne de pollo) donde estos complejos clonales se identificaron en cepas aisladas de aves salvajes principalmente (Sheppard *et al.*, 2009). En nuestro estudio, en cada especie de ave salvaje se observó predominio de una ST en especial, como fueron los casos de: la gaviota de *Audouin* y algunas gaviotas de patas amarillas que llevan el complejo ST-1275, mientras que en las palomas predominaban el complejo ST-45 y ST-179 y en cuervos el complejo ST-952.

Es importante destacar que en nuestro estudio el muestreo fue realizado en años diferentes. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran cierta relación entre las cepas aisladas de humanos y las cepas aisladas de pollos, así como entre las diferentes especies de aves salvajes entre sí, sugiriendo cierta relación entre algunos clones y el hospedador.

Como es conocido, la campilobacteriosis es una infección autolimitada en la mayoría de las personas que la sufren. A veces, sin embargo, perdura, volviéndose severa, por lo que es necesario la administración de terapia antimicrobiana (Aarestrup and Engberg,

2001). En la actualidad, los antimicrobianos de elección son los macrólidos, como la eritromicina y azitromicina, y en episodios más agudos se suelen combinar con los aminoglucósidos (Bolinger and Kathariou, 2017). Desgraciadamente, ha aumentado el porcentaje de resistencia a los antibióticos de elección como la eritromicina (Bolinger and Kathariou, 2017), aunque no en valores tan elevados como los mostrados ante las quinolonas (Sierra–Arguello *et al.*, 2016).

En nuestro estudio, los antimicrobianos que mostraron mayor porcentaje de resistencia fueron las quinolonas, tetraciclinas y ampicilina; y en menor porcentaje los aminoglucósidos, no encontrándose ninguna cepa resistente a fosfomicina, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulánico e imipenem. El estudio de la sensibilidad fue evaluada mediante el método de disco difusión. De esta manera se logró observar el comportamiento de sinergia entre algunos de los antimicrobianos (AMP-AMC), además de que es una técnica fácil tanto en el manejo como en la interpretación de los resultados, aunque algunos estudios consideren como mejor opción la microdilución (Lehtopolku *et al.*, 2012).

Es importante destacar que el nivel de resistencia mostrado en las cepas aisladas de las poblaciones de humanos y de pollos evidenció mayores porcentajes de resistencia que los encontrados en las cepas aisladas de aves salvajes. Por décadas se ha reportado el elevado porcentaje de resistencia que presentan las cepas de *Campylobacter* frente a estos antimicrobianos tanto en cepas aisladas de muestras de pacientes como de pollos, siendo estos últimos los casos más descritos (Wirz *et al.*, 2010). En nuestro estudio, se observó resistencia frente a los mismos antimicrobianos que han alcanzado valores elevados de resistencia en los últimos años (CIP, TET y AMP), donde los mayores valores se reportaron en las cepas aisladas de muestras de pollos, seguido de las cepas aisladas de muestras de humanos. Según la relación poblacional que se ha observado entre las cepas aisladas de estos dos tipos de muestras, es evidente la estrecha relación que existe entre estos dos grupos. Aunque los antimicrobianos administrados en las granjas de pollos analizadas en nuestro estudio no sean los administrados en la terapéutica clínica, nos podemos plantear que existe un vínculo entre la administración de antibióticos a los pollos y la aparición de cepas resistentes a estos antimicrobianos en humanos. Este mismo análisis ha sido evidenciado por varios autores (Aarestrup and Engberg, 2001; Pedersen and Wedderkopp, 2003). Según se describe en la literatura no fue hasta 2006 que se prohibió en la UE la administración de antimicrobianos como

promotores del crecimiento animal (http://www.vmd.gov.uk/fsf/antimicrobial_agp.aspx), los cuales son análogos a los utilizados en la terapéutica clínica. Los antibióticos mayormente utilizados en la terapéutica avícola en la actualidad son danofloxacina y defloxacina pertenecientes a la familia de quinolonas, varias tetraciclinas, varios macrólidos incluidos dos derivados de la eritromicina y numerosos aminoglucósidos (Wimalarathna *et al.*, 2013).

En el caso del bajo porcentaje de resistencia a antibióticos que presentaron las cepas aisladas de muestras de aves salvajes en nuestro estudio puede estar relacionado con la no administración de antibióticos a esta población. En el caso de las cepas aisladas de aves salvajes que sí mostraron resistencia a antibióticos, una de las posibles causas podría ser la convivencia de estas aves en ambientes urbanos y por lo tanto la posibilidad de la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Waldenström *et al.*, 2005). Varios estudios demuestran el elevado número de cepas MDR aisladas de aves salvajes, las cuales no son tratadas representando un alto riesgo de contaminación para el ambiente, que se ve reflejado en la contaminación en las granjas, lo que conlleva a un problema de salud para los humanos (Nelson *et al.*, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009; Krawiec, Woźniak-Biel, *et al.*, 2017).

En el caso de la resistencia a tetraciclina, los porcentajes de resistencia obtenidos de las cepas aisladas de pollos y humanos concuerdan con los obtenidos en otros estudios. En un estudio realizado con cepas aisladas de pollos y ganado se ha relacionado el aumento de la resistencia a tetraciclina en la población humana debido al consumo de carne procedente de ganado vacuno (Webb *et al.*, 2018). También se plantea que la resistencia a tetraciclina es alta en cepas aisladas de muestras de pollo, valores que van aparejados con los que se demuestran en las cepas aisladas de humanos (Sierra-Arguello *et al.*, 2015).

Por otro lado, la resistencia a fluoroquinolonas y a ácido nalidíxico presente en *C. jejuni* ha sido ampliamente descrita, tanto en cepas aisladas de humanos como de origen animal (Nelson *et al.*, 2007). Aunque existen varios reportes de la resistencia a fluoroquinolonas, todavía se receta este fármaco para las diarreas del viajero o como tratamiento profiláctico (Taylor *et al.*, 2017).

En cuanto a la resistencia a aminoglucósidos, pudimos observar que las tres poblaciones presentaron valores similares, el 4.6% y 7.3% de los aislados fueron resistentes a

kanamicina y estreptomicina, respectivamente, mientras que solo una cepa aislada de muestra de humanos fue resistente a gentamicina. La resistencia frente a aminoglucósidos fue mayor en las cepas aisladas de muestras de pollos. Esto se corresponde con varios de los estudios donde se ha planteado el incremento de la resistencia en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos de engorde en los últimos años, donde se asocia el incremento de la resistencia a gentamicina debido al uso de este antimicrobiano en China, como uno de los antimicrobianos introducidos en la dieta para el tratamiento de enfermedades en los pollos, lo cual, según sus autores, está comprometiendo la eficacia de este antimicrobiano en la terapéutica clínica (Yao *et al.*, 2017).

En nuestro estudio todos los aislados fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, eritromicina, cloranfenicol y fosfomicina. No se han descrito cepas de *C. jejuni* resistentes a imipenem, por lo que se considera un candidato para el tratamiento en casos complicados (Hakanen *et al.*, 2003). Sin embargo, sí existen estudios en los que se ha evidenciado la resistencia a AMC en cepas aisladas de humanos y pollos (Abay *et al.*, 2014), aunque no es muy frecuente.

Aunque en nuestro estudio todas las cepas fueron sensibles a eritromicina y cloranfenicol, existen estudios donde se ha reflejado resistencia en cepas de *Campylobacter* frente a estos antimicrobianos. Ambas resistencias han sido detectadas mayoritariamente en cepas de *C. coli* (Wang and Taylor, 1990a; Florez-Cuadrado *et al.*, 2017). Aunque en valores muy bajos también se ha documentado la resistencia a eritromicina en cepas de *C. jejuni* (Florez-Cuadrado *et al.*, 2017). Esta resistencia a eritromicina también ha sido documentada en cepas aisladas de muestras de carcasas de pollos (Sierra-Arguello *et al.*, 2016).

El cloranfenicol ya no se utiliza en la terapia antimicrobiana en humanos por sus efectos secundarios, pero se sigue observando resistencia a cloranfenicol en cepas aisladas de muestras de humanos (Yang *et al.*, 2017), lo que se podría relacionar al consumo de carne de pollo, pues en cepas aisladas de estas muestras si se ha evidenciado resistencia a cloranfenicol (Kashoma *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente la resistencia a fosfomicina en *Campylobacter* es muy poco frecuente, datos que se correlacionan con nuestro estudio. Aunque recientemente en un estudio realizado en México con cepas de *C. jejuni* aisladas durante el año 2013 de pacientes que sufrieron gastroenteritis en 10 laboratorios diferentes, el

20% de las cepas de *C. jejuni* resultaron presentar resistencia a fosfomicina. Este elevado porcentaje comparado con los casi nulos de la mayoría de otros estudios no se explica al no disponer de datos clínicos (Novoa-Farías *et al.*, 2016).

La multiresistencia (MDR), definida como resistencia a tres o más familias de agentes antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2011), es un fenómeno común que se ha ido incrementando en todo el mundo en cepas de *Campylobacter* aisladas de diferentes hábitats (Giacomelli *et al.*, 2014). En nuestro estudio, el 49.3% de los aislados fueron MDR, el perfil de resistencia más frecuente fue TET-NAL-CIP-AMP (40%), representado por cepas aisladas de muestras humanas y de pollos (23.3%). También en estudios realizados con cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de muestras de carcasas de carne y de leche en Tanzania se observaron patrones de multiresistencia donde la resistencia mayormente encontrado fue ante los antibióticos: AMP (63%)-CIP(9%)-TET(18%) (Kashoma *et al.*, 2016). Por su parte, otros estudios plantean que en cepas de *Campylobacter* aisladas de cerdos y terneros los principales patrones de resistencia a antibióticos son frente a ciprofloxacina y tetraciclina (CIP-TET) (Wieczorek and Osek, 2017) y en estudios realizados con cepas aisladas de pollos de engorde en China el patrón de multiresistencia mayoritario ha sido CIP+TET+CHL, unido a la resistencia a eritromicina en el caso de *C. coli* (CIP+TET+CHL-ERY) y a aminoglucósidos, como gentamicina y kanamicina, en el caso de *C. jejuni* (CIP+TET+CHL-GEN-KAN) (Li *et al.*, 2017).

En nuestro estudio, solo cuatro aislados de muestras de aves salvajes presentaron MDR, tres cepas con TET-NAL-CIP-AMP como perfil de resistencia y una cepa con el perfil TET-NAL-CIP-STR-KAN. Según los estudios realizados en palomas salvajes y domésticas se han observado que más de la mitad de las cepas de *C. coli* aisladas fueron resistentes a eritromicina y a estreptomicina, y que el 40% presentó MDR mostrando un perfil de TET-AMP-AMOX (Dudzic *et al.*, 2016).

En nuestro estudio se muestra la alta variabilidad en perfiles de resistencia a antibióticos entre aislados cercanamente relacionados (ST), por lo que hay cepas muy relacionadas y que no comparten el perfil de MDR. También, observamos que hay cepas no relacionadas (con diferente ST), y que son MDR, presentando el mismo perfil. Estos resultados nos muestran la alta capacidad de adquisición de genes de resistencia que poseen las cepas estudiadas y/o la elevada frecuencia de mutaciones que pudieran

ocurrir. También este hallazgo evidencia que en un mismo ST, o complejo clonal, las cepas pueden no tener los mismos patrones de resistencia a antibióticos.

Como se ha evidenciado a lo largo del estudio una cepa con un mismo ST puede estar colonizando diferentes hábitats, como es el caso de las cepas que presentaron el mismo ST en las tres poblaciones (ST-45, ST-48 y ST-354). Sin embargo, solamente en las cepas aisladas de muestras de humanos y de pollos el perfil de resistencia M fue el más prevalente, mientras que en las cepas aisladas de muestras de aves salvajes además del perfil M, se observaron los perfiles A, B e I, los cuales estaban compuestos por cepas no MDR.

Evidentemente la descripción de cepas MDR, hace imprescindible determinar si esta MDR se debe a la presencia de varios mecanismos de resistencia. Para ello, se quiso detectar la presencia de los mecanismos de resistencia descritos hasta ahora en la literatura (Wieczorek and Osek, 2013), y más específicamente aquellos que son potencialmente transferibles. Fenómenos como la transferencia horizontal de genes y la expansión clonal están fuertemente involucrados en la diseminación de estos genes de resistencia en *C. jejuni*, lo cual provee una capacidad de adaptación ante la terapia antibiótica (Yao *et al.*, 2017).

La resistencia a ampicilina en algunas cepas de las tres colecciones, está asociada con la presencia del gen *bla_{OXA-61}-type* (Kashoma *et al.*, 2016). Este gen, generalmente, está codificado en el cromosoma de *C. jejuni* (Alfredson and Korolik, 2005). En el 87% de las tres poblaciones se evidenció la presencia de *bla_{OXA-61}-type*, mostrándose la presencia en todas las cepas resistentes a ampicilina aisladas de muestras de humanos y de pollos, mientras que sólo se detectó en el 83% de las cepas aisladas de muestras de aves salvajes. Sin embargo, la presencia de este gen por sí solo no explica la resistencia a ampicilina pues no sólo se detectó en las cepas resistentes sino también en todas las cepas sensibles aisladas de muestras humanas y de pollo, así como en el 47% de las cepas sensibles aisladas de muestras de aves salvajes. Similares resultados fueron observados en otros estudios donde entre el 82 y el 93% de las cepas de *C. jejuni* eran productoras de estas betalactamasas. Además no se observaron diferencias en la resistencia a los betalactámicos testados en cuanto a las cepas productoras y no productoras de betalactamasas (Lachance *et al.*, 1991).

Otro de los genes identificados en nuestro estudio fue el gen *bla_{OXA-184}-type* en tres cepas aisladas de muestras de gaviota que pertenecen al mismo complejo clonal (ST-1275) y que fueron aisladas del mismo sitio (Delta del Ebro), en el mismo año (2010), pero que no presentan patrones de campo pulsado idénticos, sino similares. Este gen *bla_{OXA-184}*, ha sido identificado por otros autores en cepas de *C. jejuni* aisladas de cuervos (Weis *et al.*, 2016). Según estos autores, como hasta la fecha solo estaba presente en cuervos, describieron que la presencia del gen *bla_{OXA}* podía tener una relación con el hospedador. Así el gen *bla_{OXA-184}* era propio de cuervos, mientras que el gen *bla_{OXA-61}* era más común en cepas aisladas de cerdos y de primates (Weis *et al.*, 2016).

Tal como se ha comentado la presencia del gen *bla_{OXA}* no es suficiente para explicar la resistencia a ampicilina. Un mecanismo asociado que se ha descrito es la transversión en la región promotora del gen *bla_{OXA-61}* descrita por Zeng y colaboradores en 2014 (Zeng *et al.*, 2014). Del análisis de la región del promotor del gen *bla_{OXA-61}-type* en nuestro estudio, se observó que esta transversión de guanina a timidina se producía tanto en cepas resistentes como sensibles, por lo que esta transversión G-T no parece ser la causa que explique el distinto fenotipo de las cepas. Además, en dos cepas no fue posible amplificar la región promotora del gen lo que puede indicar que existe heterogeneidad en esta región de la secuencia.

Mediante *WGS* pudimos desglosar los distintos tipos de OXA-61 encontrados mediante secuenciación por Sanger (aunque sólo en las cepas seleccionadas para el estudio de *NGS*), observando una mayor variabilidad de ellas (*bla_{OXA-185}*, *bla_{OXA-447}*, *bla_{OXA-448}*, *bla_{OXA-449}* y *bla_{OXA-465}*) además del gen *bla_{OXA-184}*, hecho que discrepa del descrito por Giggs y colaboradores (Griggs *et al.*, 2009), donde un 90% de las cepas presentaron la OXA-61, cepas todas ellas provenientes de pollos o de Weis y colaboradores que describieron la presencia de los genes *bla_{OXA-61}* y *bla_{OXA-184}* en cepas aisladas de animales, tanto salvajes como de engorde (Weis *et al.*, 2016).

Por último, y a fin de encontrar otros mecanismos que justificaran la resistencia a la ampicilina, se quiso determinar la presencia de betalactamasas de amplio espectro tipo SHV y TEM, tan frecuentes en enterobacterias. Sólo en una cepa detectamos la presencia de SHV-1, pero esto pone de manifiesto la habilidad de este patógeno en captar genes de resistencia proveniente de otros microorganismos descrita por otros autores (Gardner and Olson, 2012).

Así pues el mecanismo de resistencia a ampicilina no ha quedado caracterizado. La resistencia podría deberse también a la existencia de bombas de expulsión, como la descrita por otros autores (Iovine, 2013), CmeABC, la cual contribuye a la expulsión del antibiótico. Esta bomba es un sistema de expulsión energía dependiente, la cual contribuye a la resistencia intrínseca de *Campylobacter* a varios antimicrobianos como son las quinolonas, macrólidos, betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos, cuyos mecanismos, como veremos más adelante tampoco quedaron bien definidos.

Otros de los antibióticos que mostraron los mayores porcentajes de resistencia fueron las quinolonas (NAL y CIP). Como se evidenció en nuestro caso en varios estudios se demuestra la elevada prevalencia de la resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico principalmente en cepas aisladas de muestras de pollos (Mathew *et al.*, 2007). Varias publicaciones han asociado el aumento de la resistencia de *Campylobacter spp.* a fluoroquinolonas con la introducción de estos fármacos en la industria avícola, principalmente de enrofloxacin, cuyo metabolito activo es ciprofloxacina (EFSA/ECDC, 2012). El mecanismo de resistencia identificado en nuestro estudio fue la mutación Thr86Ile, en la QRDR del gen *gyrA*, la cual confiere el fenotipo de resistencia y es la mayormente descrita por ser la mutación más común en las cepas de *Campylobacter* (Payot *et al.*, 2006). La mayoría de los estudios se enfocan en la determinación de esta mutación para explicar las resistencias a ciprofloxacina y no hay datos sobre la resistencia y mecanismos de resistencia a ácido nalidíxico (Ge *et al.*, 2003; Dionisi *et al.*, 2004). En nuestro estudio el 100% de los aislados que fueron resistentes a quinolonas presentaron esta mutación. Sin embargo, cinco cepas aisladas de muestras de humanos presentaron un patrón CIP resistente y NAL sensible. Según la literatura, donde también se describe esta discrepancia, pues en general la resistencia a ácido nalidíxico es predictivo de una futura resistencia a ciprofloxacina; la resistencia pudiera deberse a la acción de sistemas de expulsión de energía dependientes unido a la acción de las proteínas externas de membrana (Charvalos *et al.*, 1995). Sin embargo, otros estudios realizados en años posteriores, han demostrado en cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos, que los niveles de expresión de CmeB y CmeC para CIP resistente y CIP sensible han sido similares, descartando el papel de esta bomba en la resistencia (Luo *et al.*, 2003).

Otro resultado interesante en nuestro estudio fue la obtención de una cepa CIP sensible y NAL resistente (W41), lo cual se ha descrito con una baja frecuencia. Por ejemplo, en el 18% de las cepas de *C. jejuni* aisladas de heces de pacientes pediátricos en España, todas mostraron resistencia a NAL, mientras que solo un 15% de ellas la presentaron a CIP (Reina *et al.*, 1994). También en el ámbito animal, este fenómeno se ha identificado en cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos y cerdos en un estudio realizado en España. El mecanismo involucrado según sus autores se corresponde con mutaciones en el gen *gyrA* (Sáenz *et al.*, 2000), siendo la mutación Thr86Ala la que condiciona este fenotipo (Jesse *et al.*, 2006).

Por otra parte, los genes de resistencia a quinolonas contenidos en plásmidos, *qnr*, aislados de varias especies de enterobacterias, no se encontraron en los aislados de *Campylobacter* analizados en nuestro estudio. Estos resultados lo apoyan estudios donde se confirma la ausencia de estos genes *qnr* en las cepas de *Campylobacter* que han sido analizadas (Chatzipanagiotou *et al.*, 2005).

La resistencia a tetraciclinas en *C. jejuni* es una problemática que viene sucediendo desde hace décadas (Alfredson and Korolik, 2007; Friis *et al.*, 2007; Albert *et al.*, 2009). Los elevados valores de resistencia obtenidos en este estudio en las cepas aisladas de muestras de pollos de engorde (96%) y en las cepas aisladas de muestras de humanos (88%), se corresponden con los mostrados por varios autores (Mazi *et al.*, 2008; Deckert *et al.*, 2010). Según EFSA, en 2012 reportó esta problemática en España, donde el 85% de aislamientos de *C. jejuni* presentaron resistencia frente a la tetraciclina (EFSA/ECDC, 2012). También en estudios realizados en la India con cepas aisladas de carne de pollo se reportó que el 59.4% de las cepas de *C. jejuni* presentó resistencia a tetraciclina (Khan *et al.*, 2018).

En nuestro estudio se identificó que el mecanismo de resistencia a tetraciclina en la mayoría de las cepas está mediado por la acción del gen *tetO*, el cual estuvo presente en las tres poblaciones de estudio, tanto en cepas con fenotipo resistente como sensibles. En otros estudios se ha evidenciado la prevalencia de este gen en cepas de *C. jejuni* de origen vacuno donde el 99% de las cepas resistentes a tetraciclinas eran portadoras del gen (Webb *et al.*, 2018).

En nuestro estudio, la prevalencia del gen *tetO* en las cepas provenientes de aves salvajes fue más baja que la obtenida en las cepas de humanos y pollos. Esta baja

prevalencia de *tetO* en cepas aisladas de aves salvajes se ha evidenciado en otros estudios (Waldenström *et al.*, 2005). Esto puede deberse a la naturaleza del hábitat de estas aves, las cuales al ser de vida libre no están sujetas a dietas donde suele suministrarse este antibiótico. Sin embargo, en las cepas que sí contenían el gen *tetO* (68%), pudiera deberse a la plasticidad característica de este gen, ya que al encontrarse en un plásmido conjugativo, en la mayoría de los casos, facilita su diseminación entre cepas, lo cual facilita su llegada a diferentes nichos ecológicos (Avrain *et al.*, 2004).

Como ocurrió en el caso de la presencia del gen *bla_{OXA-61}-type* en el estudio de determinación de mecanismos involucrados en la resistencia a ampicilina, tanto las cepas con fenotipo resistente como sensible a tetraciclina presentaron el gen *tetO*. Este fenómeno se ha identificado también en otros estudios donde se han analizado la resistencia de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de muestras de pollos y pavos, donde el 100% de los aislamientos de pollos y el 71% de los de pavos presentaban el gen *tetO*, mientras que cinco cepas aisladas de pavos y tres de pollos eran sensibles a tetraciclina, aún conteniendo el gen (Woniak-Biel *et al.*, 2017). Se ha planteado que esto pudiera deberse a que el gen *tetO* estuviese inactivado o simplemente no se haya expresado (Obeng *et al.*, 2012). Este mismo autor reportó que el 3.8% de las cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos sensibles a tetraciclinas presentaron el gen *tetO*.

Otro fenómeno que suele ocurrir es lo reportado por Pratt y Korolik donde de todas las cepas resistentes a tetraciclina en su estudio solo se logró detectar el gen *tetO*, mediante PCR, en el 97% de los aislados analizados, mientras que por *Southern blot* las cepas PCR negativas sí contenían el gen, lo cual demuestra la variabilidad en las secuencias de *tetO* (Pratt and Korolik, 2005). En nuestro estudio, en la determinación del gen *tetO*, la cepa W12 no amplificó mediante PCR y tampoco se observó presencia de banda mediante *Southern blot*, por lo que el mecanismo de resistencia a tetraciclina en esta cepa resistente puede estar determinado por otras causas.

Otros autores plantean que por la actuación del gen *tetA*, el cual codifica para una proteína de acción de bomba de expulsión, se podría potenciar el fenotipo resistente a tetraciclina (Abdi-Hachesoo *et al.*, 2014) e incluso determinarlo.

En nuestro estudio en las cepas aisladas de humanos y pollos todos presentaron el gen *tetA*, por lo que esta teoría no explica el porqué de las cepas con fenotipo sensibles presentan los dos genes (*tetO* y *tetA*). Aunque en la población de aves salvajes en tres

cepas ocurrió diferente. Se encontró en dos cepas con fenotipo sensible a tetraciclina la presencia del gen *tetO* y no de *tetA*, mientras que en otra cepa (W12) con fenotipo resistente a tetraciclina no se identificó *tetO* y sí *tetA*.

Todos estos resultados nos indican que existe otro u otros mecanismos de resistencia a tetraciclina presente en las cepas de nuestro estudio como pudiera ser la expresión del gen *tetO*, o la acción de la bomba de expulsión CmeABC. Solo en una cepa de ave salvaje (W12) este planteamiento no se cumple, aunque el mecanismo pudiera estar relacionado con la presencia del gen *tetA* (identificado) y/o la acción de la bomba de expulsión, la cual se ha demostrado que actúa en sinergia con otros mecanismos (Iovine, 2013), dando lugar también a la multiresistencia.

La importancia de conocer la localización de estos genes de resistencia radica también en el rol que desempeñan en la diseminación de la resistencia. El gen *tetO* se ha localizado en plásmidos conjugativos (Wieczorek and Osek, 2013), y en nuestro estudio en 29 casos el gen *tetO* se encontró en un plásmido. Se ha descrito que la localización no tiene ya mucha importancia, pues se ha demostrado que la localización cromosómica se debe a la integración de parte de plásmidos de resistencia producto de conjugación entre cepas de la misma especie (Pérez-Boto *et al.*, 2014).

Por otro lado, los genes que estuvieron involucrados en la resistencia a G, K y S detectados dentro de un pool de genes analizados en este estudio fueron *ant(6)-Ia* y *aph(3')-IIIa*. Estos genes se corresponden con los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos identificados en cepas de *C. jejuni* en otros estudios (Qin *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015).

Con respecto a la resistencia a gentamicina, solamente fue detectada en un aislado procedente de muestra humana. Este hallazgo se corresponde con otros estudios donde la resistencia a gentamicina en cepas de *C. jejuni* aislado de pacientes han sido muy bajos (Pérez-Boto *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2016), en comparación con los elevados valores mostrados en las cepas aisladas de muestras de pollos (25% de 59 cepas) y cerdos (22.2% de 37 cepas (Sáenz *et al.*, 2000). En este mismo estudio, realizado en España, se plantea que la alta resistencia a gentamicina en las cepas de *C. coli*, principalmente aisladas de pollos, se debe al uso en veterinaria del aminoglucósido apramicina. En estos estudios coincidió en que el mecanismo de resistencia identificado en estas cepas resistentes a gentamicina fue la presencia del gen *aac(3')-IV*, la cual es

una acetiltransferasa que confiere resistencia a apramicina y gentamicina (Salauze *et al.*, 1990). Sin embargo, en nuestro estudio no obtuvimos ninguna cepa aislada de muestras de pollos resistente a gentamicina.

La resistencia a kanamicina en nuestro estudio se vinculó con la presencia del gen *aph(3')-IIIa*. Este gen ha sido frecuentemente asociado a la resistencia a kanamicina en cepas de *C. coli* (Rivera *et al.*, 1986). Además, ha sido relacionado con la presencia del gen *tetO*, confiriendo a las cepas que lo presentan fenotipo resistente a tetraciclina y a kanamicina. Estos dos genes se han ubicado formando parte de un plásmido de entre 41 y 132 kb y los autores han planteado que una vez que el gen de resistencia a kanamicina penetra en la célula se integra al plásmido (conteniendo el gen *tetO*) residente (Tenover and Elvrum, 1988).

En el caso del gen *ant(6)-Ia* o *aadE*, identificado en nuestras 14 cepas resistentes a estreptomicina se ha vinculado a la resistencia a estreptomicina en otros estudios en cepas de *C. jejuni* aisladas de muestras de pollos (Cantero *et al.*, 2017). También este gen se ha reportado en cepas de *C. fetus* con carácter transmisible a otras cepas del mismo género (Abril *et al.*, 2010). Interesantemente este gen se encuentra frecuentemente en microorganismos grampositivos como *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*, lo cual evidencia el carácter promiscuo de las cepas de *Campylobacter* en la adquisición de genes (Abril *et al.*, 2010).

En el caso de las tres cepas (H50, B36 y B44) que fueron resistentes a estreptomicina y no se detectó la presencia de ninguno de los genes estudiados puede deberse a la presencia de otro gen que confiera modificación enzimática no analizado o a la presencia de sustituciones en la proteína RpsL, las cuales se han descrito en *C. coli* (Lys43Arg y Lys88Arg) (Olkola *et al.*, 2010, 2015). Es importante destacar que en nuestro estudio sólo hemos detectados en dos casos el gen contenido en plásmidos.

En general, el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos en nuestro estudio fue mediante inactivación enzimática en la generalidad de las cepas resistentes a gentamicina, kanamicina y estreptomicina. Sin embargo, en las cepas resistentes en las que no fue posible determinar el mecanismo presente puede deberse a la acción de bombas de expulsión o a otros genes de resistencia no descritos como hemos comentado para la resistencia a betalactámicos o tetraciclinas.

Otro hallazgo importante fue que debido al análisis por *WGS* de algunas cepas, dentro de ellas algunas sensibles a aminoglucósidos, se identificaron cepas que presentaron los genes *ant(6)-Ia* y *aph(3')-IIIa*, lo que demuestra que el fenotipo de resistencia no se debe a la presencia/ausencia del gen sino a los niveles de expresión del mismo.

Para el caso de los genes de resistencia a aminoglucósidos, en los que fue posible determinar su localización, se ubicaron en plásmidos. Estos resultados se corresponden con los descritos por otros autores, donde plantean que los genes de resistencia a aminoglucósidos están localizados en plásmidos conjugativos (Ghotaslou *et al.*, 2017). De aquí su fácil adquisición y diseminación entre las especies de *Campylobacter* y con microorganismos grampositivos.

Como se ha dicho, *C. jejuni* representa un importante problema de salud público y socioeconómico a nivel mundial (Karp *et al.*, 2017). No todas las rutas de infección y transmisión han sido identificadas y por lo tanto se tiene un limitado progreso en la reducción de esta patología (Carrillo *et al.*, 2012).

Dentro de la Nueva era de la Secuenciación (*NGS*) se han introducido técnicas para el estudio del contenido genético total de las bacterias. Una de estas técnicas es el *WGS*, la cual ha demostrado capacidad para determinar con alta especificidad y precisión el contenido genético presente en la bacteria (Zhao *et al.*, 2016). Con la utilización de esta herramienta se ha podido estudiar con mayor profundidad el contenido genético de la bacteria, ayudado por el *core genome* (*cgMLST*) y el *whole genome* (*wgMLST*) (Cody *et al.*, 2017).

Según los resultados obtenidos en este estudio mediante la utilización de las técnicas de tipaje como el PFGE y el MLST, así como la determinación de mecanismos de resistencia mediante métodos convencionales nos ha permitido identificar la asociación que existe entre las cepas aisladas de muestras de humanos y las aisladas de muestras de pollos, según la estructura poblacional que presentan las mismas. Mediante la utilización de estas técnicas convencionales se observó la marcada diferencia que presentan estas dos poblaciones de cepas con las cepas aisladas de muestras de aves salvajes, lo que nos sugiere la distancia existente entre este grupo de cepas aisladas de aves salvajes con las que habitan y colonizan en humanos y pollos, respectivamente. También se pone de manifiesto la cercanía clonal y poblacional que existe entre las cepas que habitan cada especie de ave salvaje destacando las cepas aisladas de muestras

de cuervos (clon 4 con ST-8513), de gaviotas (clon 2 y ST-4355) y por último en palomas (clon 3 y ST-45), además de observarse entre cada especie una homología mayor del 65% y complejos clonales descritos e identificados solo en estas especies.

A pesar de todos estos hallazgos, la epidemiología molecular de cada cepa se podría analizar de una manera más profunda y se obtendrían resultados con datos más precisos si se utiliza la técnica del *Whole Genome Sequence* (Clark *et al.*, 2016). Algunos estudios plantean que solamente con la utilización de esta técnica es suficiente para dar un diagnóstico completo del contenido genético de una bacteria de interés clínico, eso sí, de forma rápida y con altos valores de especificidad y precisión. Aunque se es consciente de que la interpretación de los datos requiere de conocimientos bioinformáticos (Hasman *et al.*, 2014). Además, la tradicional secuenciación por el método Sanger y los métodos moleculares permiten un pesquizado para un limitado número de genes de resistencia a antibióticos mientras que mediante *WGS* se tienen datos a cerca de cualquier gen de resistencia o mutación presente. Además esta información obtenida del *WGS* puede ser analizada para crear un perfil de resistencia antimicrobiana inferido genotípicamente (Ellington *et al.*, 2017).

Nuestros resultados de las 48 cepas analizadas por *WGS* fueron analizados mediante la utilización de la herramienta BioNumerics v7.6.3 (Applied Maths). De acuerdo con los resultados obtenidos en los ST del MLST se observaron diferencias. Las mismas se deben a la utilización de diferentes bases de datos para la obtención del MLST. En nuestro caso se utilizó para el análisis el PubMLST mientras que el software BioNumerics v7.6.3 cuenta con su propia base de datos, actualizable en cada edición de la misma. Esto sería una limitante si solo se contara con la información de este software.

En las cepas que contenían igual ST se observó mediante un *minimum spanning tree* con la información del *wgMLST* que estaban fuertemente relacionadas, y además que existía una estrecha relación entre las cepas aisladas de humanos y las aisladas de pollos. Las distancias alélicas no fueron determinantes para separar las cepas aisladas de estos dos hábitats, aunque tampoco demostraron tanta homología como en los casos de brotes. Lo que demuestra que, aunque sea mayor el número de alelos a comparar, la relación entre las cepas aisladas de humanos y las de pollos se mantiene estrechamente cercana.

La importancia del análisis de las distancias alélicas con la información brindada mediante *WGS* radica en la determinación de brotes donde las cepas se agrupan en

clusters o se disgregan hasta evidenciar su separación poblacional. Este planteamiento se ha demostrado, por ejemplo, con cepas del ST-45, donde mediante *wgMLST* se lograron ubicar a las cepas analizadas en diferentes *clusters*, diferentes a los que se habían establecido en el estudio utilizando metodologías convencionales (Cody *et al.*, 2013).

Como se mencionaba al inicio de esta discusión la campilobacteriosis se ha convertido en un problema de salud mundial, y esto es debido a la elevada resistencia a los antimicrobianos que se utilizan en la clínica. La efectividad en la determinación de los mecanismos y genes involucrados en la resistencia antimicrobiana ha aumentado con la ayuda de *WGS* (Fournier *et al.*, 2014). En nuestro estudio los genes de resistencia a antibióticos identificados utilizando la información de *WGS* mediante la utilización de *Center for Genomic Epidemiology* (Resfinder) se correspondieron entre un 89 y un 100% a los genes identificados mediante PCR y secuenciación Sanger. La principal correlación que se observó fue la correspondencia entre la presencia de estos genes (de resistencia a aminoglucósidos) o mutaciones (en el caso del gen *gyrA*) y el fenotipo resistente de las cepas que lo contenían. Similares resultados fueron obtenidos en un estudio, donde se encontró una correlación genotípica y fenotípica del 100% en la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacina y ácido nalidíxico, mientras que valores de entre el 95 y el 98% fueron encontrados para la resistencia a gentamicina (Zhao *et al.*, 2016).

En base a nuestros resultados y aceptando las ventajas del *WGS* es evidente la importancia del software de análisis de los datos. Existen estudios con cepas de *Campylobacter* que se han realizado solamente con la utilización de *WGS*, mientras que otros estudios se han enfocado en la obtención de sus resultados utilizando las dos herramientas, técnicas convencionales y *WGS*. Como ejemplo de ellos se han realizado estudios para identificación de cepas comparando MALDI-TOFF y *WGS* (Lawton *et al.*, 2018), otros para la obtención del perfil proteómico de *Campylobacter* (Clark *et al.*, 2018) y también se han realizado estudios epidemiológicos por MLST utilizando nuevas herramientas de determinación de SNP (Katz *et al.*, 2017) o simplemente con la utilización del MLST convencional (Kovanen *et al.*, 2014).

Todos estos estudios se apoyan en la utilización del *WGS* para conocer la profundidad de las relaciones existentes entre las cepas a analizar o para la obtención del perfil

completo de proteínas o del wgMLST, o sencillamente para confirmar una relación que se ha identificado mediante una técnica convencional como puede ser el PFGE (Lahti *et al.*, 2015), aunque no dejan de plantear lo complejo de la interpretación de los resultados además de la experiencia requerida y el software de análisis necesario.

Por otro lado, aprovechando la NGS también se pudo determinar la presencia de distintos factores de patogenicidad. Los genes *cadF*, *ciaB*, *htrA* y el operón *cdtABC*, que codifica proteínas que se supone que participan en la adherencia bacteriana, la invasión de células epiteliales y la producción de toxinas, son altamente prevalentes entre las cepas de *Campylobacter* (Dasti *et al.*, 2010; Schnee and Petri, 2017). Se ha detectado una correlación entre ciertos perfiles de factores de virulencia y ST específicos, que pueden tener implicaciones ecológicas. Por ejemplo, nuestros datos indican una gran diversidad en alelos *cdtA* entre cepas de aves silvestres en comparación con cepas de pollos de engorde y humanos, lo que sugiere que la colonización de hospedadores específicos podría ser promovida por ciertas variantes de CdtA.

A pesar de toda la información que hemos obtenido con la utilización de *WGS* y los aspectos importantes encontrados en la caracterización de los mecanismos de resistencia y factores de virulencia presentes en nuestras cepas, es necesario conocer en mayor profundidad los genomas bacterianos y su correlación con el fenotipo para poder establecer con mayor precisión el fenotipo de resistencia y de virulencia a partir del genotipo, los cuales van más allá de la simple presencia de un gen descrito. Esta técnica no nos brinda información suficiente para la determinación de un mecanismo de resistencia. Tampoco nos permite conocer el fenotipo ni las relaciones de sinergia que se observaron en el método de disco difusión para la determinación de la sensibilidad a antibióticos.

6. CONCLUSIONES

1. La técnica óptima para el análisis clonal de *Campylobacter jejuni* mediante PFGE es el análisis del patrón obtenido con la suma de los perfiles de restricción de SmaI y KpnI.
2. Mediante la doble restricción se observó una gran variabilidad clonal, obteniéndose de las 146 cepas analizadas 137 pulsotipos; cuatro de los cuales representaron clones que incluían entre 2 y 6 cepas. De los 4 clones, sólo se encontraron datos epidemiológicos que relacionaran las cepas en el clon 1, que correspondió a una contaminación de 6 pollos de engorde procesados en un mismo matadero.
3. En las 150 cepas analizadas, se obtuvieron 64 ST, agrupadas en 21 complejos clonales y 12 *singletons*. En este estudio se describieron por primera vez cinco nuevos alelos (*glnA*-619; *gltA*-526; *glyA*-690; *pgm*-859 y *uncA*-544) todos incluidos en la cepa W53, y seis nuevos ST: ST-8479 en humanos, ST-8498 en pollos, y ST-8511, ST-8512, ST-8513 y ST-8514 en aves salvajes.
4. De las 64 ST, 16 fueron exclusivamente encontradas en muestras aisladas de humanos, 14 en pollos y 21 en aves salvajes. Diez se encontraron tanto entre las muestras aisladas de humanos como en las de pollos, y sólo tres estuvieron presentes en las tres poblaciones del estudio (ST-45, ST-48 y ST-354).
5. Del análisis clonal y filogenético se desprendieron dos agrupaciones: una mixta formada por cepas humanas y de pollos de engorde, y otra que comprendía distintos grupos con sólo cepas de aves salvajes.
6. En *C. jejuni* se observó un 71.3% de resistencia a tetraciclina, un 67.3% a ciprofloxacina, un 64.6% a ácido nalidíxico y un 63.3% a ampicilina, además de casos esporádicos de resistencia a aminoglucósidos (7.3%).
7. Las cepas aisladas de pollos fueron las más resistentes (74% a 98%), seguidas de las cepas aisladas de humanos (78%-88%), mientras que en las cepas aisladas de aves salvajes, el porcentaje de resistencia fue menor, oscilando entre el 16% y 36%.
8. La multiresistencia también estuvo presente en un 58.2%, siendo el patrón más frecuente la resistencia a ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina.

9. Los genes de resistencia a los antimicrobianos descritos, *tetO/tetA* y *bla_{OXA}-type*, no fueron el único mecanismo de resistencia a tetraciclina y ampicilina, respectivamente. Por otra parte, la resistencia a ciprofloxacina se debió a la mutación Thr86Ile en el gen *gyrA*, y la resistencia a aminoglucósidos, en la mayoría de los casos, a la presencia de los enzimas modificadores (AME).
10. La técnica de *WGS*, en un sólo experimento, permitió caracterizar la relación clonal y filogenética de las cepas de *Campylobacter*. Los resultados obtenidos estuvieron en concordancia con los resultados del PFGE y la determinación de la secuencia tipo.
11. Los resultados del análisis de *WGS* requirieron del uso de varios métodos, pues en nuestro estudio se encontraron discrepancias entre el análisis mediante *pubmlst.org* y el análisis con *BioNumerics v7.6.3*, tanto en la numeración de los alelos como en la de los ST.
12. La detección de los genes implicados en la resistencia a los antibióticos fue más eficaz mediante *WGS* porque se obtuvo la totalidad de los genes descritos en una sola reacción de secuenciación, aunque no estuvieron presentes en el fenotipo. Además, esto permite el reanálisis de las secuencias si surgiese un nuevo mecanismo, siempre y cuando se mantuviese la base de datos.

6. CONCLUSIONS

1. The optimal technique for the clonal analysis of *Campylobacter jejuni* by PFGE is to analyze the pattern obtained from the sum of the SmaI and KpnI restriction profiles.
2. The double restriction revealed a high clonal variability: 137 PFGE types were obtained from the 146 strains analyzed, 4 of which represented clones of 2 to 6 strains. Epidemiological data for the 4 clones only related the strains of clone 1, which corresponded to a contamination of 6 broilers processed in the same slaughterhouse.
3. The 64 sequences types (STs) obtained from the 150 analyzed strains were grouped in 21 clonal complexes and 12 singletons. In this study five new alleles belonging to the W53 strain (*glnA*-619; *gltA*-526; *glyA*-690; *pgm*-859 y *uncA*-544) and six new STs (ST-8479 in humans, ST-8498 in broilers, and ST-8511, ST-8512, ST-8513 and ST-8514 in wild birds) are described for the first time.
4. Of the 64 STs, 16 were exclusively found in samples isolated from humans, 14 in broilers and 21 in wild birds. Ten STs were observed in both human and broiler samples, and only 3 were found in all three populations (ST-45, ST-48 and ST-354).
5. Two groups were described from the clonal and phylogenetic analysis: one mixed group formed by human and broiler strains, and another one comprising different subgroups with only strains from wild birds.
6. Among the *C. jejuni* strains, 71.3% resistance to tetracycline was observed, 67.3% to ciprofloxacin, 64.6% to nalidixic acid and 63.3% to ampicillin. Sporadic cases of resistance to aminoglycoside (7.3%) were also found.
7. Strains isolated from broilers were the most resistant (74%-98%), followed by those from humans (78%-88%) and finally, to a much lesser extent wild birds (16%-36%).
8. Multidrug resistance was also present in 58.2% of all resistance strains, the most frequent pattern being resistance to ampicillin, ciprofloxacin and tetracycline.

9. The described antimicrobial resistance genes, *tetO/tetA* and *bla_{OX4}-type*, are not the only mechanism of resistance to tetracycline and ampicillin, respectively. The resistance to ciprofloxacin is due to the Thr86Ile mutation in the *gyrA* gene, and resistance to aminoglycosides was associated, in most cases, with the presence of enzyme modifiers (AME).
10. The Whole Genome Sequencing (WGS) allowed the clonal and phylogenetic relationship of *Campylobacter* strains to be characterized in a single experiment. The results were in agreement with those of the PFGE and ST determination.
11. The WGS results need to be analyzed by several methods, since *pubmlst.org* and the analysis by *BioNumerics v7.6.3* gave discrepant results in the numbering of alleles and STs.
12. Genes involved in resistance to antibiotics are more effectively detected by WGS because all genes described are obtained in a single sequencing reaction, even if they are not present in the phenotype. Moreover, the sequences can be re-analyzed if a new mechanism arises, as long as the database is maintained.

7. REFERENCIAS

- Aarestrup, F.M. and Engberg, J. (2001) Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res.* **32**: 311–321.
- Abay, S., Kayman, T., Otlu, B., Hizlisoy, H., Aydin, F., and Ertas, N. (2014) Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* **178**: 29–38.
- Abdi-Hachesoo, B., Khoshbakht, R., Sharifiyazdi, H., Tabatabaei, M., Hosseinzadeh, S., and Asasi, K. (2014) Tetracycline resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from poultry carcasses. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**: 7–11.
- Abril, C., Brodard, I., and Perreten, V. (2010) Two novel antibiotic resistance genes, *tet(44)* and *ant(6)-Ib*, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 3052–3055.
- Achen, M., Morishita, T.Y., and Ley, E.C. (1998) Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day-of-hatch to slaughter age. *Avian Dis.* **42**: 732–7.
- Albert, M.J., Udo, E., Jose, B.T., Haridas, S., and Rotimi, V.O. (2009) Tetracycline Resistance Is Frequent Among *Campylobacter jejuni* Isolates from Kuwait. *Microb. Drug Resist.* **15**: 115–120.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., and Osheroff, N. (2014) Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53**: 1565–1574.
- Alfredson, D.A. and Korolik, V. (2007) Identification of putative zinc hydrolase genes of the metallo- β -lactamase superfamily from *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**: 159–164.
- Alfredson, D.A. and Korolik, V. (2005) Isolation and Expression of a Novel Molecular Class D β -Lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2515–2518.
- Alfredson, D.A. and Korolik, V. (2007) Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **277**: 123–132.
- Ambler, R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**: 321–31.
- Amour, C., Gratz, J., Mduma, E., Svensen, E., Rogawski, E.T., McGrath, M., et al. (2016) Epidemiology and Impact of *Campylobacter* Infection in Children in 8 Low-Resource Settings: Results from the MAL-ED Study. *Clin. Infect. Dis.* **63**: 1171–1179.
- Andriole, V.T. (2005) The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 113–9.

- Antilles, N., Sanglas, A., and Cerdà-Cuéllar, M. (2015) Free-living Waterfowl as a Source of Zoonotic Bacteria in a Dense Wild Bird Population Area in Northeastern Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **62**: 516–521.
- Avrain, L., Vernozy-Rozand, C., and Kempf, I. (2004) Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens.
- Bacon, D.J., Alm, R., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., et al. (2000) Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* **68**: 4384–4390.
- Bacon, D.J., Szymanski, C.M., Burr, D.H., Silver, R.P., Alm, R. A., and Guerry, P. (2001) A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol. Microbiol.* **40**: 769–777.
- Baker, J., Barton, M.D., and Lanser, J. (1999) *Campylobacter* species in cats and dogs in South Australia. *Australian Vertebr. J.* **77**: 662–666.
- Barton, B., Harding, G., and Zuccarelli, A. (1995) A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Analytical Biochemest.* **226**: 235-240.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., et al. (2007) Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 1–46.
- Berradre-Sáenz, B., Yáñez-Ortega, J.L., García-Sánchez, L., Lero-Gil, B.M.-, Rovira-Carballido, J., Carramiñana-Martínez, I., et al. (2017) Epidemiología de la Campylobacteriosis en Castilla y León durante el período 2008-2015. *Rev Esp Salud Pública.* **91**: 1-12.
- Bessede, E., Solecki, O., and Sifre, E. (2011) Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 1735–1739.
- Biggs, P.J., Fearnhead, P., Hotter, G., Mohan, V., Collins-Emerson, J., Kwan, E., et al. (2011) Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. *PLoS One* **6**: 1-14.
- Blaser, M.J. and Engberg, J. (2008) Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. In, Nachamkni, I., Szymanski, C.M., and Blaser, M.J. (eds), *Campylobacter*. ASM press, Washington, D. C., pp. 99–121.
- Bleumink-Pluym, N.M., Van Alphen, L.B., Bouwman, L.I., Wösten, M.M.S.M., and van Putten, J.P.M. (2013) Identification of a Functional Type VI Secretion System in *Campylobacter jejuni* Conferring Capsule Polysaccharide Sensitive Cytotoxicity. *PLoS Pathog.* **9**: 16–18.

- Bolinger, H. and Kathariou, S. (2017) The Current State of Macrolide Resistance in *Campylobacter spp.*: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: 1–9.
- Broman, T., Palmgren, H., Bergström, S., Sellin, M., Waldenström, J., Danielsson-Tham, M.L., and Olsen, B. (2002) *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4594–4602.
- Burakoff, A., Brown, K., Knutsen, J., Hopewell, C., Rowe, S., Bennett, C., and Cronquist, A. (2018) Morbidity and Mortality Weekly Report Outbreak of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption from a Herdshare Dairy — Colorado, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**: 146–148.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995) MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1211–1233.
- Cagliero, C., Mouline, C., Payot, S., and Cloeckaert, A. (2005) Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 948–950.
- Cantero, G., Correa-Fiz, F., Ronco, T., Strube, M., Cerdà-Cuellar, M., and Pedersen, K. (2017) Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Broiler Isolates by Whole-Genome Sequencing. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**:145–152.
- Carleton, H. a and Gerner-smidt, P. (2016) Whole-Genome Sequencing Is Taking over Foodborne Disease Surveillance. *Microbe* **11**: 311–317.
- Carlone, G.M. and Lascelles, J. (1982) Aerobic and Anaerobic Respiratory Systems in *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* Grown in Atmospheres Containing Hydrogen. *J. Bacteriol.* **152**: 306–314.
- Carrillo, C.D., Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Tudor, a, Clark, C., and Taboada, E.N. (2012) 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* **2**: 1-12.
- Castañeda-García, A., Blázquez, J., and Rodríguez-Rojas, A. (2013) Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2**: 217–236.
- CDC (2013) Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2012. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2013 **63**: 277–282.
- Centro Nacional de Epidemiología (2016) Boletín Epidemiológico Semanal. 2016. Volumen 24, número 7. **102**: 102–115.

- Charvalos, E., Tselentis, Y., Michea Hamzehpour, M., Hler, T.K., and Pechere, J. (1995) Evidence for an Efflux Pump in Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2019–2022.
- Chatzipanagiotou, S., Ioannidou, V., Ioannidis, A., Nicolaou, C., Papavasileiou, E., Chaniotaki, S., et al. (2005) Absence of the plasmid-mediated quinolone resistance *qnrA* gene among *Campylobacter jejuni* clinical isolates from Greece. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**: 261–262.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **65**: 232–260.
- Chopra, S. and Reader, J. (2015) tARNs as Antibiotic Targets. *Int. J. Mol. Sci* **16**: 321–349.
- Clark, C.G., Berry, C., Walker, M., Petkau, A., Barker, D.O.R., Guan, C., et al. (2016) Genomic insights from whole genome sequencing of four clonal outbreak *Campylobacter jejuni* assessed within the global *C. jejuni* population. *BMC Genomics* **17**: 990.
- Clark, C.G., Chen, C. yu, Berry, C., Walker, M., McCorrister, S.J., Chong, P.M., and Westmacott, G.R. (2018) Comparison of genomes and proteomes of four whole genome-sequenced *Campylobacter jejuni* from different phylogenetic backgrounds. *PLoS One* **13**: 1–28.
- CLSI (2017) M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Lab. Stand. Institute, Wayne, PA, USA* 27th. ed.
- Cody, A.J., Bray, J.E., Jolley, K.A., Mccarthy, N.D., and Maiden, M.C.J. (2017) Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Stable, Comparative Analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Human Disease Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **55**: 2086–2097.
- Cody, A.J., McCarthy, N.D., Van Rensburg, M.J., Isinkaye, T., Bentley, S.D., Parkhill, J., et al. (2013) Real-time genomic epidemiological evaluation of human *Campylobacter* isolates by use of whole-genome multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 2526–2534.
- Cody, A.J., Mccarthy, N.M., Wimalarathna, H.L., Colles, F.M., Clark, L., Bowler, I.C.J.W., et al. (2012) A Longitudinal 6-Year Study of the Molecular Epidemiology of Clinical *Campylobacter* Isolates in Oxfordshire, United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3193–3201.
- Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O., and Larry Obi, C. (2002) Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 237–243.

- Colles, F.M., Jones, K., Harding, R.M., and Maiden, M.C.J. (2003) Genetic Diversity of *Campylobacter jejuni* Isolates from Farm Animals and the Farm Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7409–7413.
- Colles, F.M. and Maiden, M.C.J. (2012) *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. *Microbiology* **158**: 2695–2709.
- Colles, F.M., Mccarthy, N.D., Sheppard, S.K., and Layton, R. (2010) Europe PMC Funders Group Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *Int. J. Food Microbiol.* **137**: 259–264.
- Corcionivoschi, N., Gundogdu, O., Moran, L., Kelly, C., Scates, P., Stef, L., et al. (2015) Virulence characteristics of *hcp+* *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail chicken. *Gut Pathog.* **7**: 1–11.
- Crespo, M.D., Altermann, E., Olson, J., Miller, W.G., Chandrashekhar, K., and Kathariou, S. (2016) Novel plasmid conferring kanamycin and tetracycline resistance in the turkey-derived *Campylobacter jejuni* strain 11601MD. *Plasmid* **86**: 32–37.
- Dale, K., Kirk, M., Sinclair, M., Hall, R., and Leder, K. (2010) Reported waterborne outbreaks of gastrointestinal disease in Australia are predominantly associated with recreational exposure. *Aust. N. Z. J. Public Health* **34**: 527–530.
- Dasti, J.I., Malik Tareen, A., Lugert, R., Zautner, A.E., and Groß, U. (2010) *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 205–211.
- Davis, B.D. (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* **51**: 341–350.
- Davis, K.R., Dunn, A.C., Burnett, C., McCullough, L., Dimond, M., Wagner, J., et al. (2016) *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption - Utah, 2014. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 301–305.
- De Boer, P., Duim, B., Rigter, A., Van Der Plas, J., Jacobs-Reitsma, W.F., and Wagenaar, J. A. (2000) Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1940–1946.
- Deckert, A., Valdivieso-Garcia, A., Reid-Smith, R., Tamblyn, S., Seliske, P., Irwin, R., et al. (2010) Prevalence and Antimicrobial Resistance in *Campylobacter spp.* Isolated from Retail Chicken in Two Health Units in Ontario. *J. Food Prot.* **73**: 1317–1324.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., and Colin, P. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 406–410.

- Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., et al. (2008) Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet. Microbiol.* **130**: 285–297.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., et al. (2001) Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 14–23.
- Dionisi, A.M., Luzzi, I., and Carattoli, A. (2004) Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* and analysis of the *gyrA* gene by the Light Cycler mutation assay. *Mol. Cell. Probes* **18**: 255–261.
- Domingues, A.R., Pires, S.M., Halasa, T., and Hald, T. (2012) Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.* **140**: 970–981.
- Duarte, A., Seliwiorstow, T., Miller, W.G., De Zutter, L., Uyttendaele, M., Dierick, K., and Botteldoorn, N. (2016) Discriminative power of *Campylobacter* phenotypic and genotypic typing methods. *J. Microbiol. Methods* **125**: 33–39.
- Dudzić, A., Urban-Chmiel, R., Stępień-Pyśniak, D., Dec, M., Puchalski, A., and Wernicki, A. (2016) Isolation, identification and antibiotic resistance of *Campylobacter* strains isolated from domestic and free-living pigeons. *Br. Poult. Sci.* **57**: 172–178.
- Duong, V.T., Tuyen, H.T., Minh, P. Van, Campbell, J.I., Phuc, H. Le, Nhu, T.D.H., et al. (2017) No clinical benefit of empirical antimicrobial therapy for pediatric diarrhea in a high usage, high resistance setting. *Clin. Infect. Dis.* 1–8.
- ECDC (2015) Expert Opinion on the introduction of next-generation typing methods for food- and waterborne diseases in the EU and EEA. Stockholm.1-33.
- EFSA (2010) Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU 1. *EFSA J.* **8**: 1–89.
- EFSA (2014a) EFSA Scientific Colloquium 20. Pharma 16-17 junio. 1-64.
- EFSA (2014b) European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. *Eurosurveillance* **12**: 3590. 336 pp.
- EFSA (2015) The 2013 joint ECDC/EFSA report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks published. *Eurosurveill* **20**: 21021.
- EFSA (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **14**: 20449.
- EFSA (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* **15**: 5077.

- EFSA-ECDC (2012) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA J.* **10**: 1–2.
- EFSA-ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **14**: 4634.
- Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., and Joslyn, D.A. (1947) Chloromycetin, a New Antibiotic From a soil *Actinomycete*. *Science.* **106**: 417.
- El-Adawy, H., Ahmed, M.F.E., Hotzel, H., Tomaso, H., Tenhagen, B.-A., Hartung, J., et al. (2015) Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* recovered from organic turkey farms in Germany. *Poult. Sci.* **94**: 2831–2837.
- Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., et al. (2017) The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**: 2–22.
- Elvers, K.T., Morris, V.K., Newell, D.G., and Allen, V.M. (2011) Molecular tracking, through processing, of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5722–5729.
- Emmerson, A.M. and Jones, A.M. (2003) The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 13–20.
- Englen, M.D., Hill, A.E., Dargatz, D.A., Ladely, S.R., and Fedorka-Cray, P.J. (2007) Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1570–1577.
- EUCAST (2013) EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1**: 1–43.
- Fitzgerald, C., Helsel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., et al. (2001) Evaluation of Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* during an Outbreak Involving a Food Handler. **39**: 2386–2390.
- Fitzgerald, C. and Nachamkin, I. (2011) Manual of Clinical Microbiology. In, Versalovic, J., Carroll, K., Funke, J., Jorgensen, J., Landry, N., and Warnock, D. (eds). A:S.M. Press, Washington, D.C.
- Florez-Cuadrado, D., Ugarte-Ruiz, M., Meric, G., Quesada, A., Porrero, M.C., Pascoe, B., et al. (2017) Genome Comparison of Erythromycin Resistant *Campylobacter* from Turkeys Identifies Hosts and Pathways for Horizontal Spread of *erm(B)* Genes. *Front. Microbiol.* **8**: 1–8.

- Florez-Cuadrado, D., Ugarte-Ruiz, M., Quesada, A., Palomo, G., Domínguez, L., and Concepción Porrero, M. (2016) Description of an erm(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. *J Antimicrob Chemother* **71**: 841–847.
- Fontanot, M., Iacumin, L., Cecchini, F., Comi, G., and Manzano, M. (2014) Rapid detection and differentiation of important *Campylobacter spp.* in poultry samples by dot blot and PCR. *Food Microbiol.* **43**: 28–34.
- Fournier, P.-E., Dubourg, G., and Raoult, D. (2014) Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med.* **6**: 114.
- Frazão, M.R., Medeiros, M.I.C., Da Silva Duque, S., and Falcão, J.P. (2017) Pathogenic potential and genotypic diversity of *Campylobacter jejuni*: A neglected food-borne pathogen in Brazil. *J. Med. Microbiol.* **66**: 350–359.
- French, N.P., Midwinter, A., Holland, B., Collins-Emerson, J., Pattison, R., Colles, F., and Carter, P. (2009) Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolates from Wild-Bird Fecal Material in Children's Playgrounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 779–783.
- Friis, L.M., Pin, C., Taylor, D.E., Pearson, B.M., and Wells, J.M. (2007) A role for the tet(O) plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. *Plasmid* **57**: 18–28.
- Galanis, E., Mak, S., Otterstatter, M., Taylor, M., Zubel, M., Takaro, T.K., et al. (2014) The association between campylobacteriosis, agriculture and drinking water: A case-case study in a region of British Columbia, Canada, 2005-2009. *Epidemiol. Infect.* **142**: 2075–2084.
- Garci, S., Wesley, I., and Soli, L.Y. (2011) A Charcoal- and Blood-Free Enrichment Broth for Isolation and PCR Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Food Prot.* **74**: 221–227.
- García, F., Abad, J., Serrano, T., Frías, N., Castro, M., and Lorente, S. (2013) Epidemiología de *Campylobacter* en avicultura. 50 Congr. Cient. Avic. 1-12.
- García, P.C., Valenzuela, N.S., Rodríguez, V.M., León, E.C., and Fernández, H. (2009) Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Rev Chil Infect.* **26**: 511–514.
- García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Hänninen, M.L., Rossi, M., and Rovira, J. (2017) *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiol.* **65**: 185–192.
- Gardner, S.P. and Olson, J.W. (2012) Barriers to Horizontal Gene Transfer in *Campylobacter jejuni*. *Adv. Appl. Microbiol.* **79**: 19–42.
- Gargiulo, A., Russo, T.P., Schettini, R., Mallardo, K., Calabria, M., Menna, L.F., et al. (2014) Occurrence of enteropathogenic bacteria in urban pigeons (*Columba livia*) in Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **14**: 251–255.

- Ge, B., White, D.G., McDermott, P.F., Girard, W., Zhao, S., Hubert, S., and Meng, J. (2003) Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3005–3007.
- Ge, Z., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (2008) In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* **10**: 1599–1607.
- Gebreyes, W.A., Thakur, S., and Morrow, W.E.M. (2005) *Campylobacter coli*: Prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 765–768.
- Geissler, A.L., Carrillo, F.B., Swanson, K., Patrick, M.E., Fullerton, K.E., Bennett, C., et al. (2017) Increasing *Campylobacter* Infections, Outbreaks, and Antimicrobial Resistance in the United States, 2004–2012. *Clin. Chem.* **65**: 1624–31.
- Ghotaslou, R., Yeganeh Sefidan, F., Akhi, M.T., Asgharzadeh, M., and Mohammadzadeh Asl, Y. (2017) Dissemination of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes and armA among *Enterobacteriaceae* Isolates in Northwest Iran. *Microb. Drug Resist.* **23**: 826–832.
- Giacomelli, M., Salata, C., Martini, M., Montesissa, C., and Piccirillo, A. (2014) Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Poultry in Italy. *Microb. Drug Resist.* **20**: 181–188.
- Gibreel, A., Kos, V.N., Keelan, M., Trieber, C.A., Levesque, S., Michaud, S., and Taylor, D.E. (2005) Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2753–2759.
- Gibreel, A., Tracz, D.M., Nonaka, L., Ngo, T.M., Connell, S.R., and Taylor, D.E. (2004) Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in with Special Reference to *tet(O)*-Mediated Tetracycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3442–3450.
- Gibson, J.R., Fitzgerald, C., and Owen, R.J. (1995) Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. *Epidemiol. Infect.* **115**: 215–25.
- Gilmour, M.W., Graham, M., Reimer, A., and Van Domselaar, G. (2013) Public health genomics and the new molecular epidemiology of bacterial pathogens. *Public Health Genomics* **16**: 25–30.
- Giske, C.G. (2015) Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**: 899–905.
- Griekspoor, P., Colles, F.M., McCarthy, N.D., Hansbro, P.M., Ashhurst-Smith, C., Olsen, B., et al. (2013) Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. *Mol. Ecol.* **22**: 1463–1472.

- Griekspoor, P., Engvall, E.O., Olsen, B., and Waldenström, J. (2010) Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet. Microbiol.* **140**: 180–185.
- Griekspoor, P., Hansbro, P.M., Waldenström, J., and Olsen, B. (2015) *Campylobacter jejuni* sequence types show remarkable spatial and temporal stability in Blackbirds. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **5**: 1-5.
- Griekspoor, P., Olsson Engvall, E., Åkerlind, B., Olsen, B., and Waldenström, J. (2015) Genetic diversity and host associations in *Campylobacter jejuni* from human cases and broilers in 2000 and 2008. *Vet. Microbiol.* **178**: 94–98.
- Griggs, D.J., Peake, L., Johnson, M.M., Ghori, S., Mott, A., and Piddock, L.J. V (2009) β -Lactamase-Mediated β -Lactam Resistance in *Campylobacter* Species: Prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and Evidence for a Novel β -Lactamase in C. jejuni. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3357–3364.
- Guerrant, R.L., Gilder, T. Van, Steiner, T.S., Thielman, N.M., Slutsker, L., Tauxe, R. V, et al. (2001) Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 331–350.
- Guerry, P. (2007) *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* **15**: 456–461.
- Guerry, P., Ewing, C.P., Hickey, T.E., Prendergast, M.M., and Moran, A.P. (2000) Sialylation of lipooligosaccharide cores affects immunogenicity and serum resistance of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **68**: 6656–6662.
- Hakanen, A.J., Lehtopolku, M., Siitonen, A., Huovinen, P., and Kotilainen, P. (2003) Multidrug resistance in *Campylobacter jejuni* strains collected from Finnish patients during 1995-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 1035–1039.
- Hald, B., Skov, M.N., Nielsen, E.M., Rahbek, C., Madsen, J.J., Wain, M., et al. (2016) *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. *Acta Vet. Scand.* **58**: 1-10.
- Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. (2011) Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiol. Infect.* **139**: 1505–1510.
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C.A., Frimodt-Møller, N., and Aarestrup, F.M. (2014) Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 139–146.
- Havelaar, a. H. and Swart, A. (2016) Impact of waning acquired immunity and asymptomatic infections on case-control studies for enteric pathogens. *Epidemics* **17**: 56–63.

- Hedberg, C.W., Smith, K.E., and Besser, J.M. (2001) Limitations of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for the Routine Surveillance of *Campylobacter* Infections. **184**: 242–243.
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., et al. (2011) Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet. Res.* **42**: 1-14.
- Hermans, D., Pasmans, F., Heyndrickx, M., Van Immerseel, F., Martel, A., Van Deun, K., and Haesebrouck, F. (2012) A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**: 17–29.
- Herschleb, J., Ananiev, G., and Schwartz, D.C. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.* **2**: 677-684
- Hughes, R.A.C., Hadden, R.D.M., Gregson, N.A., and Smith, K.J. (1999) Pathogenesis of Guillain–Barre syndromé. *J. Neuroimmunol.* **100**: 74–97.
- Humphrey, T., O'Brien, S., and Madsen, M. (2007) *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* **117**: 237–57.
- Iovine, N.M. (2013) Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* **4**: 230–40.
- Ivanova, M., Singh, R., Dharmasena, M., Gong, C., Krastanov, A., and Jiang, X. (2009) Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. **93**: 1587–1597.
- Janssen, R., Krogfelt, K.A., Cawthraw, S.A., Van Pelt, W., Wagenaar, J.A., and Owen, R.J. (2008) Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: The host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 505–518.
- Jesse, T.W., Englen, M.D., Pittenger-Alley, L.G., and Fedorka-Cray, P.J. (2006) Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 682–688.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., and Chan, V.L. (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **39**: 1225–1236.
- Jin, S., Song, Y.C., Emili, A., Sherman, P.M., and Chan, V.L. (2003) JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 α and triggers signalling pathways leading to the activation of NF- κ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **5**: 165–174.
- Johnson, T.J., Shank, J.M., and Johnson, J.G. (2017) Current and Potential Treatments for Reducing *Campylobacter* Colonization in Animal Hosts and Disease in Humans. *Front. Microbiol.* **8**: 1–14.

- Johnson, W.M. and Lior, H. (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter spp.* *Microb. Pathog.* **4**: 115–126.
- Kaakoush, N.O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H.M., and Man, S.M. (2015) Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 687–720.
- Karp, B.E., Tate, H., Plumblee, J.R., Dessai, U., Whichard, J.M., Thacker, E.L., et al. (2017) National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Two Decades of Advancing Public Health Through Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* **14**: 545-557.
- Kashoma, I.P., Kassem, I.I., John, J., Kessy, B.M., Gebreyes, W., Kazwala, R.R., and Rajashekara, G. (2016) Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolated from Dressed Beef Carcasses and Raw Milk in Tanzania. *Microb. Drug Resist.* **22**: 40–52.
- Katz, L.S., Griswold, T., Williams-Newkirk, A.J., Wagner, D., Petkau, A., Sieffert, C., et al. (2017) A comparative analysis of the Lyve-SET phylogenomics pipeline for genomic epidemiology of foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* **8**: 1-13.
- Khan, J.A., Rathore, R.S., Abulreesh, H.H., Qais, F.A., and Ahmad, I. (2018) Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry Meat and Related Samples at Retail Shops in Northern India. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**: 218-225.
- Kim, Z., Linda, C., Robin, K., Suzanne, J., Patrick, B., and Roger P, J. (2017) Subtyping of Canadian isolates of *Salmonella enteritidis* using Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) alone and in combination with Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and phage typing. *J. Microbiol. Methods* **139**: 29–36.
- Kinana, A.D., Cardinale, E., Tall, F., Bahsoun, I., Sire, J.-M., Garin, B., et al. (2006) Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3309–3313.
- Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson Jr., D.E., and Cieplak Jr., W. (1997) Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **24**: 953–963.
- Konkel, M.E., Kim, B.J., Rivera-Amill, V., and Garvis, S.G. (1999) Bacterial secreted proteins are required for the inteARNlization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **32**: 691–701.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., and Mickelson, J. (2004) Secretion of Virulence Proteins from. *Society* **186**: 3296–3303.

- Kovanen, Kivistö, R.I., Rossi, M., Schott, T., Kärkkäinen, U., Tuuminen, T., and Uksila, J. (2014) 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.* **52**: 4147–4154.
- Kovanen, S., Kivistö, R.I., Rossi, M., Schott, T., Kärkkäinen, U.-M., Tuuminen, T., et al. (2014) 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.* **52**: 4147–54.
- Kovanen, S.M., Kivistö, R.I., Rossi, M., and Hänninen, M.L. (2014) A combination of MLST and CRISPR typing reveals dominant *Campylobacter jejuni* types in organically farmed laying hens. *J. Appl. Microbiol.* **117**: 249–257.
- Krawiec, M., Woniak-Biel, A., BeADNrski, M., and Wieliczko, A. (2017) Antimicrobial Susceptibility and Genotypic Characteristic of *Campylobacter spp.* Isolates from Free-Living Birds in Poland. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **17**: 755–763.
- Krawiec, M., Woźniak-Biel, A., BeADNrski, M., and Wieliczko, A. (2017) Antimicrobial Susceptibility and Genotypic Characteristic of *Campylobacter spp.* Isolates from Free-Living Birds in Poland. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **17**: 755–763.
- Kurinčič, M., Botteldoorn, N., Herman, L., and Smole Možina, S. (2007) Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter spp.* isolated from food, animals and humans. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 186–190.
- Kwon, T., Chung, S., Jung, Y., Jung, S., Roh, S., Park, J., et al. (2017) Comparative genomic analysis and characteristics of NCCP15740, the major type of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Korea. *Gut Pathog.* **9**: 1–7.
- Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F., and Larivitre, L.A. (1991) Role of the β -Lactamase of *Campylobacter jejuni* in Resistance to β -Lactam Agents. *Microbiology* **35**: 813–818.
- Ladely, S.R., Meinersmann, R.J., Englen, M.D., Fedorka-Cray, P.J., and Harrison, M.A. (2009) 23S rARN Gene Mutations Contributing to Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**: 91-98.
- Lahti, E., Löfdahl, M., Ågren, J., Hansson, I., and Olsson Engvall, E. (2015) Confirmation of a *Campylobacteriosis* Outbreak Associated with Chicken Liver Pâté Using PFGE and WGS. *Zoonoses Public Health* **64**: 14–20.
- Lawton, S.J., Weis, A.M., Byrne, B. a., Fritz, H., Taff, C.C., Townsend, A.K., et al. (2018) Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and ADN sequencing. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **30**: 354–361.

- Lehtopolku, M., Kotilainen, P., Puukka, P., Nakari, U.-M., Siitonen, A., Eerola, E., et al. (2012) Inaccuracy of the Disk Diffusion Method Compared with the Agar Dilution Method for Susceptibility Testing of *Campylobacter spp.* *J. Clin. Microbiol.* **50**: 52–56.
- Lertpiriyapong, K., Gamazon, E.R., Feng, Y., Park, D.S., Pang, J., Botka, G., et al. (2012) *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: Roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization. *PLoS One* **7**: 1–15.
- Levine, C., Hiasa, H., and Marians Ay By, K.J. (1998) ADN gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**: 29–43.
- Li, B., Ma, L., Li, Y., Jia, H., Wei, J., Shao, D., et al. (2017) Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Species Isolated from Broilers in Live Bird Markets in Shanghai, China. *Foodborne Pathog. Dis.* **14**: 96–102.
- Li, H., Xia, X., Li, X., Naren, G., Fu, Q., Wang, Y., et al. (2015) Untargeted metabolomic profiling of amphenicol-resistant *Campylobacter jejuni* by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **14**: 1060–1068.
- Li, W., Atkinson, G.C., Thakor, N.S., Allas, Ü., Lu, C.-C., Chan, K.-Y., et al. (2013) Mechanism of Tetracycline Resistance by Ribosomal Protection Protein Tet(O). *Nat Commun* **12**: 1–16.
- Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., and Adewoye, L. (2007) β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet. Microbiol.* **121**: 197–214.
- Lim, S.-K., Moon, D.-C., Chae, M.H., Kim, H.J., Nam, H.-M., Kim, S.-R., et al. (2016) Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and carcasses. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 1791–1795.
- Lin, J., Overbye Michel, L., and Zhang, Q. (2002) CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2124–2131.
- Little, C.L., Gormley, F.J., Rawal, N., and Richardson, J.F. (2010) A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* **138**: 1691–1694.
- Llarena, A.-K., Huneau, A., Hakkinen, M., and Hänninen, M.-L. (2015) Predominant *Campylobacter jejuni* Sequence Types Persist in Finnish Chicken Production. *PLoS One* **10**: 1–18.
- Llarena, A.-K., Taboada, E., and Rossi, M. (2017) Whole-Genome Sequencing in Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections. *J. Clin. Microbiol.* **55**: 1269–1275.

- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C.M., and Zhang, Q. (2009) Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Futur. Microbiol* **4**: 189–200.
- Luangtongkum, T., Morishita, T.Y., Ison, A.J., Huang, S., Mcdermott, P.F., and Zhang, Q. (2006) Effect of Conventional and Organic Production Practices on the Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter spp.* in Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3600–3607.
- Luber, P., Wagner, J., Hahn, H., and Bartelt, E. (2003) Antimicrobial Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains Isolated in 1991 and 2001–2002 from Poultry and Humans in Berlin , Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3825–3830.
- Lucarelli, C., Dionisi, A.M., Trezzi, L., Farina, C., Passera, M., Kärki, T., et al. (2016) Molecular and Epidemiological Analysis of a *Campylobacter jejuni* Outbreak in Northern Italy in November 2013. *Foodborne Pathog. Dis.* **13**: 490–494.
- Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L.O., and Zhang, Q. (2003) In Vivo Selection of *Campylobacter* Isolates with High Levels of Fluoroquinolone Resistance Associated with gyrA Mutations and the Function of the CmeABC Efflux Pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 390–394.
- Ma, L., Shen, Z., Naren, G., Li, H., Xia, X., Wu, C., et al. (2014) Identification of a novel G2073A mutation in 23S rARN in amphenicol-selected mutants of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **9**: 1–7.
- MacKichan, J.K., Gaynor, E.C., Chang, C., Cawthraw, S., Newell, D.G., Miller, J.F., and Falkow, S. (2004) The *Campylobacter jejuni* dccRS two-component system is required for optimal in vivo colonization but is dispensable for in vitro growth. *Mol. Microbiol.* **54**: 1269–1286.
- Maesaar, M., Kramarenko, T., Merem€ Ae, K., S~ Ogel, J., Lillenberg, M., He Akkinen, L., et al. (2016) Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter spp.* Isolated from Broiler Chicken Meat of Estonian, Latvian and Lithuanian Origin at Estonian Retail Level and from Patients with Severe Enteric Infections in Estonia. *Zoo.* **63**: 89–96.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., et al. (2011) Multidrug-resistance, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an inteARNtional expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: 268–281.
- Marshall, B.M. and Levy, S.B. (2011) Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 718–733.
- Martinez, L. and Lin, J. (2006) Effect of an Efflux Pump Inhibitor on the Function of the Multidrug Efflux Pump CmeABC and Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**: 393–402.

- Martiny, D., Dediste, A., Debruyne, L., Vlaes, L., Haddou, N.B., Vandamme, P., and Vandenberg, O. (2010) Accuracy of the API Campy system , the Vitek 2 Neisseria – Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 1001–1006.
- Mathew, A.G., Cissell, R., and Liamthong, S. (2007) Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog. Dis.* **4**: 115–133.
- Mazi, W., Senok, A., Al-Mahmeed, A., Arzese, A., Bindayna, K., and Botta, G. (2008) Trends in Antibiotic Sensitivity Pattern and Molecular Detection of *tet(O)*-Mediated Tetracycline Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolates from Human and Poultry Sources. *Jpn. J. Infect. Dis* **61**: 82–84.
- Mearelli, F., Casarsa, C., Breglia, A., and Biolo, G. (2017) Septic Shock with multi organ failure due to fluoroquinolones resistant *Campylobacter jejuni*. *Am. J. Case Rep.* **18**: 972–974.
- Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M.L., Jaime, I., and Rovira, J. (2012) 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.* **32**: 124–128.
- Mensa, J., Gatell, J., García-Sánchez, J., Letang, E., López-Suñé, E., and Marco, F. (2014) Guía de terapéutica antimicrobiana. 24 ed. 812pp.
- Michaud, S., Arbeit, R.D., and Gaudreau, C. (2001) Molecular strain typing of *Campylobacter jejuni* by pulsed-field gel electrophoresis in a single day. *Can. J. Microbiol.* **47**: 667–669.
- Michaud, S., Menard, S., Gaudreau, C., and Arbeit, R.D. (2001) Comparison of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by KpnI: A population-based study. *J. Med. Microbiol.* **50**: 1075–1081.
- Michaud, S., Menard, S., Gaudreau, C., and Arbeit, R.D. (2001) Comparison of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by KpnI: a population-based study. *J. Med. Microbiol.* **50**: 1075–1081.
- Migura-Garcia, L., Ramos, R., and Cerdà-Cuellar, M. (2017) Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars and *Campylobacter spp.* Isolated from an Opportunistic Gull Species, Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*). *Source J. Wildl. Dis. Wildl. Dis. Assoc.* **53**: 148–152.
- Miró, E., Del Cuerpo, M., Navarro, F., Sabaté, M., Mirelis, B., and Prats, G. (1998) Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 535–538.

- Miró, E., Navarro, F., Mirelis, B., Sabaté, M., Rivera, A., Coll, P., and Prats, G. (2002) Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3991–3994.
- Moore, J.E., Corcoran, D., and Dooley, J.S. (2005) *Campylobacter*. *Vet. Res.* **36**: 351–382.
- Moré, E., Ayats, T., Ryan, P.G., Naicker, P.R., Keddy, K.H., Gaglio, D., et al. (2017) Seabirds (*Laridae*) as a source of *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* and antimicrobial resistance in South Africa. *Environ. Microbiol.* **19**: 4164–4176.
- Mughini Gras, L., Smid, J.H., Wagenaar, J.A., de Boer, A.G., Havelaar, A.H., Friesema, I.H.M., et al. (2012) Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: A combined case-control and source attribution analysis. *PLoS One* **7**: 1-13.
- Mughini-Gras, L., Smid, J.H., Wagenaar, J. a., De Boer, a., Havelaar, a. H., Friesema, I.H.M., et al. (2014) Campylobacteriosis in returning travellers and potential secondary transmission of exotic strains. *Epidemiol. Infect.* **142**: 1277–1288.
- Mungai, E. a., Behravesh, C.B., and Gould, L.H. (2015) Increased outbreaks associated with nonpasteurized Milk, United States, 2007-2012. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 119–122.
- Nachamkin, I., Allos, B.M., and Ho, T.. (2000) *Campylobacter*. In, Nachamkin, I. and Blaser, S.. (eds). A.S.M. Press, Washington, D.C, pp. 155–175.
- Nachamkin, I., Yang, X.-H., Stern, N.J., and Russell, R.B. (1993) Role of *Campylobacter jejuni* Flagella as Colonization Factors for Three-Day-Old Chicks: Analysis with Flagellar Mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1269–1273.
- Nakari, U.M., Puhakka, A., and Siitonen, A. (2008) Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 513–518.
- Narvaez-Bravo, C., Taboada, E.N., Mutschall, S.K., and Aslam, M. (2017) Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter spp.* isolated from retail meats in Canada. *Int. J. Food Microbiol.* **253**: 43–47.
- Nelson, J.M., Chiller, T.M., Powers, J.H., and Angulo, F.J. (2007) Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. *Clin. Infect. Dis.* **44**: 997–980.
- Nguyen, M., Brettin, T., Long, S.W., Musser, J.M., Olsen, R.J., Olson, R., et al. (2018) Developing an in silico minimum inhibitory concentration panel test for *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* **8**: 1–11.

- Nishino, K., Picard, M., Zhang, Q., Grinnage-Pulley, T., Mu, Y., and Dai, L. (2016) Dual Repression of the Multidrug Efflux Pump CmeABC by CosR and CmeR in *Campylobacter jejuni*. *Front. Microbiol* **7**: 1-12.
- Noormohamed, A. and Fakhr, M.K. (2014) Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Various Retail Meats by MLST and PFGE. *Foods* **3**: 82–93.
- Novoa-Farías, O., Frati-Munari, a. C., Peredo, M. a., Flores-Juárez, S., Novoa-García, O., Galicia-Tapia, J., and Romero-Carpio, C.E. (2016) Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **81**: 3–10.
- O'reilly, L.C. (2011) A method for overcoming ADN degradation during PFGE for *Serratia marcescens*. *J. Microbiol. Methods* **85**: 173–174.
- Obeng, A., Rickard, H., Sexton, M., Pang, Y., Peng, H., and Barton, M. (2012) Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J. Appl. Microbiol.* **113**: 294–307.
- Oh, E., McMullen, L., and Jeon, B. (2015) High prevalence of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* in retail poultry with potential implication in human infection. *Front. Microbiol.* **6**: 1–8.
- Ohishi, T., Aoki, K., Ishii, Y., Usui, M., Tamura, Y., Kawanishi, M., et al. (2017) Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing. *J. Infect. Chemother.* **23**: 165–172.
- Ohno, H., Wachino, J.-I., Saito, R., Jin, W., Yamada, K., Kimura, K., and Arakawa, Y. (2016) A Highly Macrolide-Resistant *Campylobacter jejuni* Strain with Rare A2074T Mutations in 23S rARN Genes. *Antimicrob. agents Chemother.* **60**: 2580–2581.
- Olkkola, S., Juntunen, P., Heiska, H., Hyytiäinen, H., and Hä Nninen, M.-L. (2010) Mutations in the *rpsL* Gene Are Involved in Streptomycin Resistance in *Campylobacter coli*. *Microb. Drug Resist.* **16**: 105–110.
- Olkkola, S., Kovanen, S., Roine, J., Hänninen, M.L., Hielm-Björkman, A., Kivistö, R., and Chang, Y.F. (2015) Population genetics and antimicrobial susceptibility of canine campylobacter isolates collected before and after a raw feeding experiment. *PLoS One* **10**: 1–15.
- Oyarzabal, Ackert, S., Williams, L.L., Lastovica, A.J., Miller, R.S., Pierce, S.J., et al. (2008) Molecular typing, serotyping and cytotoxicity testing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from commercial broilers in Puerto Rico. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 800–812.

- Ozawa, M., Makita, K., Tamura, Y., and Asai, T. (2012) Associations of antimicrobial use with antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* from grow-finish pigs in Japan. *Prev. Vet. Med.* **106**: 295–300.
- Park, S.H., Lee, S.I., Kim, S.A., Christensen, K., and Ricke, S.C. (2017) Comparison of antibiotic supplementation versus a yeast-based prebiotic on the cecal microbiome of commercial broilers. *PLoS One* **12**: 1-16.
- Patrick, M.E., Henao, O.L., Robinson, T., Geissler, a. L., Cronquist, A., Hanna, S., et al. (2018) Features of illnesses caused by five species of *Campylobacter*, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) – 2010–2015. *Epidemiol. Infect.* **146**: 1–10.
- Pavlova, M.R., Dobreva, E.G., Ivanova, K.I., Asseva, G.D., Ivanov, I.N., Petrov, P.K., et al. (2016) Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates. *Folia Med. (Plovdiv)*. **58**: 95–100.
- Payot, S., Bolla, J.M., Corcoran, D., Fanning, S., M??graud, F., and Zhang, Q. (2006) Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter spp.* *Microbes Infect.* **8**: 1967–1971.
- Pedersen, K. and Wedderkopp, A. (2003) Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 111–119.
- Pedonese, F., Nuvoloni, R., Turchi, B., Torracca, B., Di Giannatale, E., Marotta, F., and Cerri, D. (2017) Prevalence, phenotypic and genetic diversity of *Campylobacter* in poultry fresh meat and poultry products on retail sale in Tuscany (Italy). *Vet. Ital.* **53**: 29–37.
- Pérez-Boto, D., García-Peña, F.J., Abad-Moreno, J.C., and Echeita, M.A. (2013) Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from two early stages of poultry production. *Microb. drug Resist.* **19**: 323–30.
- Pérez-Boto, D., Herrera-León, S., García-Peña, F.J., Abad-Moreno, J.C., and Echeita, M.A. (2014) Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol.* **43**: 176–182.
- Pérez-Boto, D., Ló Pez-Portolé S, J.A., Simó N, C., Valdezate, S., and Echeita, M.A. (2010) Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Antimicrob Chemother* **2010**; **65**: 2083–2088.
- Peyrat, M.B., Soumet, C., Maris, P., and Sanders, P. (2008) Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **124**: 188–194.

- Phongsisay, V., Perera, V.N., and Fry, B.N. (2007) Expression of the *htrB* gene is essential for responsiveness of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* to harsh environments. *Microbiology* **153**: 254–262.
- Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010) Diversity, epidemiology, and genetics of class β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 24–38.
- Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 20–51.
- Poppert, S., Haas, M., Yildiz, T., Alter, T., Bartel, E., Fricke, U., and Essig, A. (2008) Identification of Thermotolerant *Campylobacter* Species by Fluorescence In Situ Hybridization. **46**: 2133–2136.
- Praakle-Amin, K., Roasto, M., Korkeala, H., and Hänninen, M.L. (2007) PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *Int. J. Food Microbiol.* **114**: 105–112.
- Pratt, A. and Korolik, V. (2005) Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 452–460.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, a E., McAlpine, K., Henderson, I., and Leach, S.A. (2000) Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* **49**: 473–479.
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., et al. (2012) Identification of a Novel Genomic Island Conferring Resistance to Multiple Aminoglycoside Antibiotics in *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5332–5339.
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Zhang, M., Deng, F., Shen, Z., et al. (2014) Report of ribosomal ARN methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* **69**: 964–968.
- Quetz, J.S., Lima, I.F.N., Havt, A., Prata, M.M.G., Cavalcante, P.A., Medeiros, P.H.Q.S., et al. (2012) *Campylobacter jejuni* infection and virulence- associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *J. Med. Microbiol.* **61**: 507–513.
- Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., and Inoue, I. (2012) Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J. Hum. Genet.* **5791**: 621–632.
- Ramonaite, S., Tamuleviciene, E., Alter, T., Kasnauskite, N., and Malakauskas, M. (2017) MLST genotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from broiler products, dairy cattle and human campylobacteriosis cases in Lithuania. *BMC Infect. Dis.* **430**: 1–10.

- Rao, M.R., Naficy, A.B., Savarino, S.J., Abu-Elyazeed, R., Wierzba, T.F., Peruski, L.F., et al. (2001) Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. *Am. J. Epidemiol.* **154**: 166–173.
- Reina, J., Ros, M.J., and Serra, A. (1994) Susceptibilities to 10 Antimicrobial Agents of 1,220 *Campylobacter* Strains Isolated from 1987 to 1993 from Feces of Pediatric Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2917–2920.
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., and Barrett, T.J. (2001) Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1889–1894.
- Rivera, M.J., Castillo, J., Martin, C., Navarro, M., and Gomez-Lus, R. (1986) Aminoglycoside-phosphotransferases *aph(3'')-IV* and *aph(3'')* synthesized by a strain of *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**: 153–8.
- Roberts, M.C. (2003) Tetracycline Therapy: Update. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 462–7.
- Roberts, M.C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 195–203.
- Roberts, M.C. (2008) Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**: 147–159.
- Rosner, B.M., Schielke, A., Didelot, X., Kops, F., Breidenbach, J., Willrich, N., et al. (2017) A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011–2014. *Sci. Rep.* **7**: 1-12.
- Roth, N., Mayrhofer, S., Gierus, M., Weingut, C., Schwarz, C., Doupovec, B., et al. (2017) Effect of an organic acids based feed additive and enrofloxacin on the prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in cecum of broilers. *Poult. Sci.* **96**: 4053–4060.
- Rozynek, E., Źydek, R., Antos-Bielska, M., Dzierżanowska-Fangrat, K., Szczepa, B., and Trafny, A. (2010) Genetic Similarity of *Campylobacter* Isolates in Humans, Food, and Water Sources in Central Poland. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**: 597–600.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., José, M., Ares, G., Baquero, F., and Torres, C. (2000) Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals, Foods, and Humans in Spain in 1997–1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 267–271.
- Salauze, D., Otal, I., Gomez-Lus, R., and Davies, J. (1990) Aminoglycoside acetyltransferase 3-IV (*aacC4*) and hygromycin B 4-I phosphotransferase (*hphB*) in bacteria isolated from human and animal sources. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 1915–1920.

- Salloway, S., Mermel, L.A., Seamans, M., Aspinall, G.O., Nam Shin, J.E., Kurjanczyk, L.A., and Penner, J.L. (1996) Miller-Fisher Syndrome Associated with *Campylobacter jejuni* Bearing Lipopolysaccharide Molecules That Mimic Human Ganglioside GD 3. *Infect. Immun.* **64**: 2945–2949.
- Sanz, J.C., Ríos, R.D.L., López-portolés, J.A., Antonio, J., Simón, C., and Aurora, M. (2006) Descripción de un brote de gastroenteritis por *Campylobacter jejuni* y caracterización molecular de la cepa implicada. **24**: 2005–2007.
- Schlunzen, F., Zarivach, R., È rg Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., et al. (2001) Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**: 814–821.
- Schnee, A.E. and A, Petri, W. (2017) *Campylobacter jejuni* and associated immune mechanisms: short-term effects and long-term implications for infants in low-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **30**: 322–328.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized ADNs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67–75.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 519–542.
- Schwarz, S., Werckenthin, C., and Kehrenberg, C. (2000) Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2530–2533.
- Seliwiorstow, T., Baré, J., Verhaegen, B., Uyttendaele, M., and De Zutter, L. (2014) Survival of *Salmonella enterica* Serotype *Tennessee* during Simulated Gastric Passage Is Improved by Low Water Activity and High Fat Content. *J. of Food Prot.* **77**: 2111–2114.
- Sen, K., Lu, J., Mukherjee, P., Berglund, T., Varughese, E., and Mukhopadhyay, A.K. (2018) *Campylobacter jejuni* Colonization in the Crow Gut Involves High Deletion within the Cytotoxic Distending Toxin Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.01893–17.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., and Miller, G.H. (1993) Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**: 138–163.
- Sheppard, S.K., Dallas, J.F., MacRae, M., McCarthy, N.D., Sproston, E.L., Gormley, F.J., et al. (2009) *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. *Int. J. Food Microbiol.* **134**: 96–103.
- Sheppard, S.K. and Maiden, M.C.J. (2015) The Evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: 1–14.

- Sierra-Arguello, Y.M., Morgan, R.B., Perdoncini, G., Lima, L.M., Gomes, M.J.P., and do Nascimento, V.P. (2015) Resistance to β -lactam and tetracycline in *Campylobacter spp.* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* **35**: 637–642.
- Sierra-Arguello, Y.M., Perdoncini, G., B. Morgan, R., P. Salle, C.T., S. Moraes, H.L., P. Gomes, M.J., et al. (2016) Fluoroquinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter Jejuni* Isolated from Broiler Slaughterhouses in Southern Brazil. *Avian Pathol.* **9457**: 1–22.
- Skarp, C.P.A., Akinrinade, O., Kaden, R., Johansson, C., and Rautelin, H. (2017) Accessory genetic content in *Campylobacter jejuni* ST21CC isolates from feces and blood. *Int. J. Med. Microbiol.* **307**: 233–240.
- Skarp, C.P.A., Hänninen, M.L., and Rautelin, H.I.K. (2016) Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**: 103–109.
- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S.E., Kelly, V. a, and Duncan, K. (1996) Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure* **4**: 1465–74.
- Skirrow, M.B. (1977) *Campylobacter* enteritis: a new disease. *Br. Med. J.* **2**: 9–11.
- Skirrow, M.B. (1991) Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int. J. Food Microbiol.* **12**: 9–16.
- Smith, J.L. and Fratamico, P.M. (2010) Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter*. *J. Food Prot.* **73**: 1141–1152.
- Steele and, T.W. and Owen, R.J. (1988) NOTES *Campylobacter jejuni* subsp. *doyle* subs. nov., a Subspecies of Nitrate-Negative Campylobacters Isolated from Human Clinical Specimens. *Int. Union Microbiol. Soc.* **38**: 316–318.
- Stone, D., Davis, M., Baker, K., Besser, T., Roopnarine, R., and Sharma, R. (2013) MLST Genotypes and Antibiotic Resistance of *Campylobacter spp.* Isolated from Poultry in Grenada. *Biomed Res. Int.* **2013**: 1–10.
- Strachan, N.J.C., Gormley, F.J., Rotariu, O., Ogden, I.D., Miller, G., Dunn, G.M., et al. (2009) Attribution of *Campylobacter* infections in northeast Scotland to specific sources by use of multilocus sequence typing. *J. Infect. Dis.* **199**: 1205–8.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., and Tauxe, R. V. (2001) PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 382–389.

- Tajada, P., Gomez-Garces, J.-L., Al, J.-I., Balas, D., and Cogollos, R. (1996) Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 β -Lactam Agents and Combinations with β -Lactamase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1924–1925.
- Tang, Y., Dai, L., Sahin, O., Wu, Z., Liu, M., and Zhang, Q. (2017) Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr(C)* in foodborne pathogen *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother* **72**: 1581–1588.
- Taylor, D.E. and Courvalin, P. (1988) Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1107–1112.
- Taylor, D.N., Hamer, D.H., and Shlim, D.R. (2017) Medications for the prevention and treatment of travellers' diarrhea. *J. Travel Med.* **24**: 17–22.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V, Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995) Interpreting Chromosomal ADN Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233–2239.
- Tenover, F.C. and Elvrum, P.M. (1988) Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1170–1173.
- Tipper, D.J. (1985) Modo of action of β -lactams antibiotics. *Pharmac. Ther* **27**: 1–35.
- Vandamme P, FE, D., BJ, P., and SLW, O. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Spring. Garrity GM, DJ,B., NR,K., and JT,S. (eds) New York, NY.
- Vasco, K., Graham, J.P., and Trueba, G. (2016) Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in ecuador. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 4218–4224.
- Waldenström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R.P., Wagenaar, J.A., and Olsen, B. (2002) Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in Different Ecological Guilds and Taxa of Migrating Birds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5911–5917.
- Waldenström, J., Mevius, D., Veldman, K., Hasselquist, D., Olsen, B., Waldenstro, J., and Broman, T. (2005) Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Isolates from Wild Birds in Sweden Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Isolates from Wild Birds in Sweden †. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2438–2441.
- Wang, Y. and Taylor, D.E. (1990a) Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene* **94**: 23–28.

- Wang, Y. and Taylor, D.E. (1990b) Natural transformation in *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* **172**: 949–955.
- Wang, Y., Yao, H., Deng, F., Liu, D., Zhang, Y., and Shen, Z. (2015) Identification of a novel *fos*^{XCC} gene conferring fosofmycin resistance in *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother* **2015** 1261–1263.
- Wassenaar, T.M., Fry, B.N., and Van Der Zeijst, B.A.M. (1993) Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene* **132**: 131–135.
- Webb, A.L., Selinger, L.B., Taboada, E.N., and Inglis, G.D. (2018) Subtype-specific selection for resistance to fluoroquinolones but not to tetracyclines occurs in *Campylobacter jejuni* from beef cattle in confined feeding operations in Southern Alberta, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2713–17.
- Weis, A.M., Miller, W. a., Byrne, B. a., Chouicha, N., Boyce, W.M., and Townsend, A.K. (2014) Prevalence and pathogenic potential of *Campylobacter* isolates from free-living, human-commensal American crows. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 1639–1644.
- Weis, A.M., Storey, D.B., Taff, C.C., Townsend, A.K., Huang, B.C., Kong, N.T., et al. (2016) Genomic Comparison of *Campylobacter spp.* and Their Potential for Zoonotic Transmission between Birds, Primates, and Livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 7165–7175.
- Wesley, I. V, Rostagno, M., Hurd, H.S., and Trampel, D.W. (2009) Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in market-weight turkeys on-farm and at slaughter. *J. Food Prot.* **72**: 43–8.
- Whitehouse, C.A., Young, S., Li, C., Hsu, C.-H., Martin, G., and Zhao, S. (2018) Use of whole-genome sequencing for *Campylobacter* surveillance from NARMS retail poultry in the United States in 2015. *Food Microbiol.* **73**: 122–128.
- Wieczorek, K., Denis, E., and Osek, J. (2015) Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* **210**: 24–32.
- Wieczorek, K. and Osek, J. (2017) Antimicrobial Resistance and Genotypes of *Campylobacter jejuni* from Pig and Cattle Carcasses Isolated in Poland During 2009–2016. *Microb. Drug Resist.* **24**: 680-684.
- Wieczorek, K. and Osek, J. (2013) Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res. Int.* 1–12.
- Wilkinson, T.J., Cowan, A.A., Vallin, H.E., Onime, L.A., Oyama, L.B., Cameron, S.J., et al. (2017) Characterization of the Microbiome along the Gastrointestinal Tract of Growing Turkeys. *Front. Microbiol* **8**: 1–11.

- Wimalarathna, H.M., Richardson, J.F., Lawson, A.J., Elson, R., Meldrum, R., Little, C.L., et al. (2013) Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. *BMC Microbiol.* **13**: 1.
- Wirz, S.E., Overesch, G., Kuhnert, P., and Korczak, B.M. (2010) Genotype and antibiotic resistance analyses of campylobacter isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6377–6386.
- Woniak-Biel, A., Bugła-Płosko ska, G., Kielsznia, A., Korzekwa, K., Tobiasz, A., Korzeniowska-Kowal, A., and Wieliczko, A. (2017) High Prevalence of Resistance to Fluoroquinolones and Tetracycline *Campylobacter spp.* Isolated from Poultry in Poland. *Microb. Drug Resist.* **24**: 314–322.
- Wu, Z., Sippy, R., Sahin, O., Plummer, P., Vidal, A., and Newell, D. (2014) Genetic Diversity and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* Isolates Associated with Sheep Abortion in the United States. **52**: 1853–1861.
- Wysok, B. and Wojtacka, J. (2018) Detection of virulence genes determining the ability to adhere and invade in *Campylobacter spp.* from cattle and swine in Poland. *Microb. Pathog.* **115**: 257–263.
- Yan, W., Chang, N., and Taylor, D.E. (1991) Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic ADN and its epidemiologic application. *J. Infect. Dis.* **163**: 1068–72.
- Yang, W., Zhang, M., Zhou, J., Pang, L., Wang, G., and Hou, F. (2017) The Molecular Mechanisms of Ciprofloxacin Resistance in Clinical *Campylobacter jejuni* and Their Genotyping Characteristics in Beijing, China. *Foodborne Pathog. Dis.* **14**: 386–392.
- Yao, H., Liu, D., Wang, Y., Zhang, Q., and Shen, Z. (2017) High Prevalence and Predominance of the aph(2'')-I_f Gene Conferring Aminoglycoside Resistance in *Campylobacter*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**: 112–17.
- Yao, R., Burr, D.H., and Guerry, P. (1997) CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol. Microbiol.* **23**: 1021–31.
- Zankari, E., Hasman, H., Kaas, R.S., Seyfarth, A.M., Agerso, Y., Lund, O., et al. (2013) Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 771–777.
- Zeng, X., Brown, S., Gillespie, B., and Lin, J. (2014) A single nucleotide in the promoter region modulates the expression of the β -lactamase OXA-61 in *Campylobacter jejuni*. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**: 1215–1223.
- Zhang, T., Dong, J., Cheng, Y., Lu, Q., Luo, Q., Wen, G., et al. (2017) Genotypic diversity, antimicrobial resistance and biofilm-forming abilities of *Campylobacter* isolated from chicken in Central China. *Gut Pathog.* **9**: 1–10.

- Zhao, S., Mukherjee, S., Chen, Y., Li, C., Young, S., Warren, M., et al. (2015) Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2015 **70**: 1314–1321.
- Zhao, S., Tyson, G.H., Chen, Y., Li, C., Mukherjee, S., Young, S., et al. (2016) Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 459–466.
- Zhou, P. and Oyarzabal, O.A. (2015) Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis to Type *Campylobacter jejuni*. *Methods Mol. Biol.* **1301**: 978–1.

8. ANEXOS

Anexo 1: Características de las cepas aisladas de muestras de pacientes atendidos en el Hospital de la Santa Creu I Sant Pau en el año 2014 según la edad y el género.

Cepa	Edad (años)	Género
H01	28	F
H02	1	M
H03	3	M
H04	2	M
H05	1	F
H06	1	M
H07	14	M
H08	2	F
H09	0,09	M
H11	1	F
H12	77	F
H13	20	M
H14	2	M
H18	0,196	M
H19	14	M
H32	0,07	M
H33	17	M
H34	22	M
H35	73	M
H36	1	F
H37	45	M
H38	82	M
H40	25	F
H46	90	F
H48	1	M
H49	1	F
H50	3	F
H51	1	M
H52	1	F
H53	1	M
H54	77	F
H56	2	M
H57	88	M
H58	15	M
H59	22	F
H60	3	M
H61	52	F
H62	0,09	M
H63	27	F
H64	76	F
H65	70	F
H66	6	M
H67	29	F
H68	29	F
H69	59	M
H70	62	M
H71	25	F
H72	60	M
H73	5	M
H74	0.58	F

F: femenino; M: masculino

Los aislados no fueron escogidos en contexto de brote, por lo que durante el año 2014 los aislados escogidos fueron de pacientes no relacionados entre ellos.

Anexo 2: Características de las cepas aisladas de muestras de pollos según su ubicación en granjas y lugar de procesamiento.

Cepa	Fecha de aislamiento	Granja	Ubicación	Matadero
B02	2011	ES84	Lleida	E
B04	2011	ES147	Lleida	F
B05	2012	ES154	Lleida	F
B06	2011	ES156	Barcelona	F
B07	2011	ES184	Tarragona	F
B08	2011	ES191	Barcelona	C
B09	2011	ES193	Barcelona	C
B10	2011	ES84	Lleida	E
B13	2012	ES202	Lleida	E
B14	2012	ES116	Tarragona	D
B15	2013	ES129	Barcelona	B
B16	2013	ES138	Barcelona	B
B17	2013	ES116	Tarragona	D
B18	2013	ES193	Barcelona	C
B19	2013	ES154	Lleida	F
B20	2013	ES84	Lleida	E
B21	2015	ES129	Barcelona	B
B22	2013	ES138	Barcelona	B
B23	2013	ES84	Lleida	E
B24	2013	ES129	Barcelona	B
B25	2013	ES138	Barcelona	B
B26	2013	ES125	Tarragona	D
B27	2013	ES85	Lleida	E
B28	2013	ES193	Barcelona	C
B29	2013	ES52	Lleida	A
B30	2013	ES116	Tarragona	D
B31	2013	ES3	Lleida	A
B33	2013	ES191	Barcelona	C
B35	2013	ES128	Tarragona	D
B36	2013	ES28	Lleida	A
B37	2013	ES125	Tarragona	D
B38	2013	ES3	Lleida	A
B39	2013	ES191	Barcelona	C
B40	2013	ES115	Tarragona	D
B41	2013	ES128	Tarragona	D
B42	2012	ES41	Lleida	A
B44	2011	ES44	Lleida	A
B45	2013	ES52	Lleida	A
B46	2013	ES84	Lleida	E
B47	2011	ES28	Lleida	A
B48	2013	ES202	Lleida	E
B49	2012	ES156	Barcelona	F
B50	2012	CAT5	Tarragona	D
B51	2012	CAT1	Lleida	E
B52	2009	EU	Lleida	G
B53	2009	EU	Lleida	G
B54	2009	EU	Lleida	G
B55	2009	EU	Lleida	G
B56	2009	EU	Lleida	G
B57	2009	CT1	Lleida	G

La procedencia de los mataderos no es un dato que se pueda revelar, por lo que no mencionamos descripción pertinente.

Anexo 3: Características de las cepas aisladas de muestras de aves salvajes según la especie y el sitio de aislamiento.

Cepa	Fecha de aislamiento	Procedencia	Especie	Sitio de aislamiento
W02	2008	CRSA	<i>Spatula clypeata</i> (pato cuchara)	Delta del Ebro
W03	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W04	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W05	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W06	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W07	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W08	2009	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W09	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W10	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W11	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W12	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W13	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W14	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W15	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W16	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W17	2011	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W18	2011	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W19	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W20	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W21	2011	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W22	2011	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Delta del Ebro
W23	2010	CRSA	<i>L. audouinii</i> (gaviota Audouin)	Isla Alborán
W24	2012	CRSA	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Islas Medes
W25	2012	CRSA	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Islas Medes
W26	2013	CRSA	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Islas Medes
W27	2013	CRSA	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Islas Medes
W28	2013	CRSA	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Islas Medes
W29	2014	ASPB	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Barcelona
W30	2014	ASPB	<i>L. michahellis</i> (gaviota patiamarilla)	Barcelona
W32	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W33	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W34	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W36	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W37	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W39	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W40	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W41	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W43	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W44	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W46	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W47	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W48	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W49	2015	ASPB	<i>Columba livia</i> (paloma doméstica)	Barcelona
W50	2008	CRSA	<i>Corvus corax</i> (cuervo común)	Barcelona provincia
W51	2008	CRSA	<i>Corvus corax</i> (cuervo común)	Barcelona provincia
W52	2008	CRSA	<i>Corvus corax</i> (cuervo común)	Barcelona provincia
W53	2008	CRSA	<i>Corvus corax</i> (cuervo común)	Barcelona provincia
W54	2008	CRSA	<i>Corvus corax</i> (cuervo común)	Barcelona provincia
W55	2011	CRSA	<i>Ciconia ciconia</i> (cigüeña blanca)	Lleida
W56	2011	CRSA	<i>Ciconia ciconia</i> (cigüeña blanca)	Lleida

Las muestras se tomaron, en todos los casos, a diferentes individuos en muestreos que duraban de 2 a 3 días en el caso de las gaviotas y en el mismo día en el caso de los cuervos y las cigüeñas.

Anexo 4: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE SmaI-KpnI de las cepas aisladas de muestras de humanos.

Cepas	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA	ST	MLST CC	PFGE SmaI-KpnI
H01	7	1	2	83	2	3	6	441	S	131
H02	2	1	21	3	20	1	5	4664	ST-21	25
H03	9	2	4	62	4	5	6	257	ST-257	43
H04	24	2	5	53	23	3	1	904	ST-607	42
H05	1	4	2	2	6	3	17	61	ST-61	54
H06	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	80
H07	2	71	5	62	22	67	6	1710	S	109
H08	2	1	12	3	2	1	12	3769	ST-21	122
H09	62	4	5	2	2	1	5	572	ST-206	136
H11	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	123
H12	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	116
H13	62	4	5	2	2	1	5	572	ST-206	81
H14	62	4	5	2	2	1	5	572	ST-206	36
H18	24	2	2	2	10	3	1	464	ST-464	45
H19	7	2	2	15	23	3	12	5799	ST-443	70
H32	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	22
H33	2	71	5	62	10	67	6	8479	S	111
H34	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	120
H35	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	121
H36	8	17	5	2	10	59	6	400	ST-353	69
H37	2	17	2	3	2	1	5	883	ST-21	9
H38	2	4	1	2	7	1	5	48	ST-48	50
H40	1	4	2	2	6	3	17	61	ST-61	124
H46	7	17	2	15	23	3	12	51	ST-443	48
H48	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	49
H49	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	no tipable
H50	9	2	4	62	4	5	6	257	ST-257	84
H51	9	25	2	10	22	3	6	52	ST-52	72
H52	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	137
H53	2	71	5	62	11	67	6	531	S	113
H54	2	1	1	53	2	1	5	1214	ST-21	117
H56	9	2	4	62	4	5	6	257	ST-257	85
H57	1	4	2	2	6	3	17	61	ST-61	125
H58	1	2	3	2	5	9	3	4016	ST-42	104
H59	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	26
H60	2	17	2	3	2	1	5	883	ST-21	29
H61	1	2	3	3	5	9	3	459	ST-42	52
H62	62	4	5	2	2	1	5	572	ST-206	37
H63	7	17	5	2	10	3	6	353	ST-353	34
H64	2	4	5	2	2	1	5	227	ST-206	60
H65	1	4	2	2	6	3	17	61	ST-61	53
H66	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	24
H67	8	2	4	62	4	5	6	2254	ST-257	40
H68	2	1	5	3	2	1	5	19	ST-21	41
H69	8	2	4	62	4	5	6	2254	ST-257	82
H70	1	4	2	2	6	3	17	61	ST-61	12
H71	3	1	5	17	11	11	6	49	ST-49	55
H72	7	1	2	83	2	3	6	441	S	129
H73	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	23
H74	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	38

S: Singletons

Anexo 5: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE Sma-KpnI de las cepas aisladas de muestras de pollos.

Cepas	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA	ST	MLST CC	PFGE SmaI-KpnI
B02	7	21	2	62	67	48	26	2331	S	58
B04	8	2	5	53	11	3	1	607	ST-607	35
B05	8	17	5	2	10	59	6	400	ST-353	7
B06	2	17	2	3	2	1	5	883	ST-21	71
B07	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	118
B08	24	2	2	2	10	3	1	464	ST-464	78
B09	2	4	1	2	7	1	5	48	ST-48	110
B10	2	71	5	62	22	67	6	1710	S	112
B13	8	2	4	62	4	5	6	2254	ST-257	83
B14	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	119
B15	24	2	2	2	10	3	1	464	ST-464	77
B16	2	71	5	62	11	67	6	531	S	114
B17	2	17	2	3	2	1	5	883	ST-21	79
B18	8	17	5	2	10	59	6	400	ST-353	8
B19	7	2	5	64	23	3	1	7110	ST-607	73
B20	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	68
B21	9	53	2	10	11	3	3	305	ST-574	66
B22	9	7	10	4	42	7	1	652	ST-45	74
B23	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	76
B24	9	2	5	2	11	3	1	1707	ST-607	no tipable
B25	9	53	2	10	11	3	3	305	ST-574	67
B26	2	71	5	62	22	67	6	1710	S	115
B27	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	62
B28	7	2	5	2	10	3	6	5	ST-353	5
B29	7	2	5	2	10	3	6	5	ST-353	6
B30	8	17	5	2	10	59	6	400	ST-353	30
B31	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	51
B33	4	7	40	4	42	51	1	267	ST-283	56
B35	2	71	5	62	22	67	6	1710	S	31
B36	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	33
B37	24	10	2	2	23	12	6	8498	ST-354	46
B38	24	2	5	53	23	3	1	904	ST-607	14
B39	7	114	5	298	11	3	218	7114	S	39
B40	8	17	5	2	10	59	6	400	ST-353	32
B41	8	2	5	53	11	3	1	607	ST-607	27
B42	4	7	10	4	42	7	1	137	ST-45	47
B44	7	1	2	83	2	3	6	441	S	132
B45	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	130
B46	2	1	1	3	2	1	5	21	ST-21	10
B47	24	2	5	53	23	3	1	904	ST-607	16
B48	14	17	5	2	11	3	6	356	ST-353	15
B49	2	21	5	3	2	1	5	46	ST-206	13
B50	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	no tipable
B51	7	2	5	64	23	3	1	7110	ST-607	28
B52	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,1
B53	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,2
B54	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,3
B55	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,4
B56	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,5
B57	2	2	4	62	4	5	6	367	ST-257	1,6

S: Singletons

Anexo 6: Relación de alelos, ST, complejos clonales y perfiles de PFGE Sma-KpnI de las cepas aisladas de muestras de aves salvajes.

Cepas	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkf	uncA	ST	MLST CC	PFGE SmaI-KpnI
W02	2	29	84	48	131	25	57	996	S	11
W03	27	33	22	49	43	9	31	1223	ST-1275	108
W04	27	33	22	49	43	82	31	1275	ST-1275	86
W05	22	335	4	64	74	25	23	4001	ST-1034	133
W06	1	172	95	62	43	32	147	4355	S	2,1
W07	1	172	95	62	43	32	147	4355	S	2,2
W08	1	172	95	62	43	32	147	4355	S	2,3
W09	27	33	22	49	43	82	31	1275	ST-1275	89
W10	27	33	22	49	43	9	31	1223	ST-1275	no tipable
W11	1	33	22	49	116	10	47	1261	S	135
W12	47	84	5	10	11	48	8	3552	ST-446	57
W13	10	31	106	129	101	45	49	1343	S	90
W14	27	33	22	49	43	95	31	1292	ST-1275	106
W15	27	33	22	49	43	9	31	1223	ST-1275	128
W16	27	33	22	49	43	95	31	1292	ST-1275	107
W17	10	31	63	129	101	45	49	2351	S	61
W18	27	33	22	49	43	9	31	1223	ST-1275	75
W19	228	33	22	49	43	82	31	3629	ST-1275	134
W20	27	33	22	49	43	82	31	1275	ST-1275	87
W21	27	33	22	49	43	9	31	1223	ST-1275	126
W22	27	33	22	49	43	20	31	1268	ST-1275	127
W23	10	31	106	129	101	45	49	1343	S	17
W24	10	33	22	49	43	82	31	637	ST-1275	20
W25	27	33	22	49	43	20	6	8511	ST-1275	19
W26	27	33	95	49	43	9	31	3049	ST-1275	21
W27	10	33	22	49	43	82	31	637	ST-1275	18
W28	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	44
W29	2	4	1	2	7	1	5	48	ST-48	105
W30	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	102
W32	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	103
W33	1	6	7	2	40	32	3	179	ST-179	94
W34	1	6	29	176	40	32	3	2209	ST-179	95
W36	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	100
W37	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	101
W39	1	6	29	176	40	32	3	2209	ST-179	96
W40	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	98
W41	1	6	29	2	40	32	3	220	ST-179	88
W43	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	3,1
W44	4	7	10	4	1	7	1	45	ST-45	3,2
W46	1	6	29	176	40	32	3	2209	ST-179	91
W47	4	6	10	176	1	32	1	8512	ST-45	99
W48	1	6	29	176	40	32	3	2209	ST-179	92
W49	1	6	29	176	40	32	3	2209	ST-179	93
W50	18	22	20	98	138	301	16	8513	ST-952	4,1
W51	18	22	20	98	138	301	16	8513	ST-952	97
W52	18	22	20	98	138	301	16	8513	ST-952	4,2
W53	18	619	526	690	859	399	544	8514	S	59
W54	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	64
W55	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	65
W56	8	10	2	2	11	12	6	354	ST-354	63

S: Singletons

Anexo 7: Population structure, antimicrobial resistance and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers and wild birds.

Population structure, antimicrobial resistance and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers and wild birds.

Yaidelis Iglesias^{1,2}, Elisenda Miro¹, Pedro Guirado³, Teresa Llovet^{1,2}, Carmen Muñoz^{1,2}, Marta Cerdà-Cuellar⁴, Cristina Madrid³, Carlos Balsalobre^{3*}, Ferran Navarro^{1,2}

¹Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Spain, ²Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ³Departament de Genètica, Microbiologia and Statistics, Universitat de Barcelona, Spain, ⁴IRTA-CReSA, Centre for Research on Animal Health, Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Food Microbiology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
392787

Received on:
02 May 2018

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

YI: investigation, formal analysis, statistical analysis, writing manuscript; PG: investigation, formal analysis, statistical analysis; TL, CM: conception and design of the study; revision manuscript; MC, FN: formal analysis, statistical analysis, conception and design of the study; revision manuscript; EM, CM and CB: formal analysis, statistical analysis, conception and design of the study; writing manuscript.

Keywords

Campylobacter jejuni, PFGE, mlst, antimicrobial resistance, Pathogenicity genes

Abstract

Word count: 221

Campylobacter jejuni is the causal agent of the food-borne infection with the highest incidence in Europe. Both poultry and wild birds are a major reservoir. To gain insight into the population structure, virulence potential and antimicrobial resistance (AMR), a collection of 150 isolates from three different ecological niches (broilers, wild birds and human patients) was studied. Despite the high genetic diversity found, the population structure defined two distinct clusters, one formed mostly by broiler and human isolates and another one by most wild bird isolates. The ST-21 complex exhibits highest prevalence (in humans and broilers), followed by ST-1275 complex (only in wild birds). The ST-48, -45 and -354 complexes were found in all three niches, but represent only 22 out of 150 studied strains. A higher occurrence of AMR and multidrug resistance was detected among broiler and human isolates. Moreover, significant differences were found in the distribution of certain putative virulence genes. Remarkably, many wild bird strains were negative for either *cdtA*, *cdtB* or *cdtC* from the canonical strain 81-176, whereas all broiler and human strains were positive. These data suggest that the different variants of the *cdt* genes might be relevant for the efficient colonization of certain hosts by *C. jejuni*. Our study contribute to the understanding of the role of the diverse Campylobacter reservoirs in the transmission of campylobacteriosis to humans.

Funding statement

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant AGL2013-45339R), the Spanish National Institute of Agrifood Research and Technology (INIA, grant FAU2008-00012-C02-0 and RTA2009-00117-00-00), the Catalanian government (grant 2017SGR499), the Recercaixa program (grant 2012/ACUP/00048) and the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 244547 (CamCon project). CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya is also acknowledged.

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: No

1 **Population structure, antimicrobial resistance and virulence-associated genes in**
2 ***Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients,**
3 **broilers and wild birds.**

4 Yaidelys Iglesias^{1,2}, Elisenda Miró¹, Pedro Guirado³, Teresa Llovet^{1,2}, Carmen
5 Muñoz^{1,2}, Marta Cerdà-Cuéllar⁴, Cristina Madrid³, Carlos Balsalobre³, Ferran
6 Navarro^{1,2}.

7 ¹Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau
8 (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain.

9 ²Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona,
10 Barcelona, Spain.

11 ³Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística. Universitat de Barcelona, Spain.

12 ⁴Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), IRTA, Campus Universitat Autònoma
13 de Barcelona, 08193-Bellaterra (Barcelona), Spain.
14

15 **Corresponding authors:**

16 Dr. Carlos Balsalobre, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística.
17 Universitat de Barcelona, Spain; Phone: +34934034622; Email: cbalsalobre@ub.edu

18 Dr. Elisenda Miro, Servei de Microbiologia- Pavelló 17, Hospital de la Santa Creu i
19 Sant Pau, Av. Sant Antoni M. Claret 165, 08025 Barcelona, Spain; Phone:
20 +34935537577; Email: emiro@santpau.cat

21 Running title: Ecological distribution of *C. jejuni*

22 Key words: *Campylobacter jejuni*, PFGE, MLST, antimicrobial resistance,
23 pathogenicity genes.

24 Number of words: 4961

25 Number of Figures: 3

26

27

28 **ABSTRACT**

29 *Campylobacter jejuni* is the causal agent of the food-borne infection with the highest
30 incidence in Europe. Both poultry and wild birds are a major reservoir. To gain insight
31 into the population structure, virulence potential and antimicrobial resistance (AMR), a
32 collection of 150 isolates from three different ecological niches (broilers, wild birds and
33 human patients) was studied. Despite the high genetic diversity found, the population
34 structure defined two distinct clusters, one formed mostly by broiler and human isolates
35 and another one by most wild bird isolates. The ST-21 complex exhibits highest
36 prevalence (in humans and broilers), followed by ST-1275 complex (only in wild birds).
37 The ST-48, -45 and -354 complexes were found in all three niches, but represent only 22
38 out of 150 studied strains. A higher occurrence of AMR and multidrug resistance was
39 detected among broiler and human isolates. Moreover, significant differences were found
40 in the distribution of certain putative virulence genes. Remarkably, many wild bird strains
41 were negative for either *cdtA*, *cdtB* or *cdtC* from the canonical strain 81-176, whereas all
42 broiler and human strains were positive. These data suggest that the different variants of
43 the *cdt* genes might be relevant for the efficient colonization of certain hosts by *C. jejuni*.
44 Our study contribute to the understanding of the role of the diverse *Campylobacter*
45 reservoirs in the transmission of campylobacteriosis to humans.

46

In review

47 INTRODUCTION

48 In the last decade there has been an increase in the incidence of campylobacteriosis
49 worldwide, which is especially significant in North America, Europe and Australia
50 (Cody *et al.*, 2012; Harvala *et al.*, 2016). This zoonosis is therefore of economic and
51 public health concern (Havelaar *et al.*, 2015). Particularly in the European Union,
52 *Campylobacter* has outnumbered *Salmonella* as the most commonly reported cause of
53 bacterial diarrheal disease in humans since 2005 (EFSA-ECDC, 2016). *Campylobacter*
54 *jejuni* followed by *C. coli* are responsible for the vast majority of infections which lead
55 to diarrhea and a range of other serious conditions affecting the gastrointestinal tract,
56 especially in children under five years old (Eberle and Kiess, 2012; Kaakoush *et al.*,
57 2015). Furthermore, two autoimmune neurological disorders, Guillain-Barre and Miller-
58 Fisher syndromes have been associated in some patients with previous *C. jejuni*
59 infections (Ang *et al.*, 2001; van Doorn *et al.*, 2008).

60 The natural reservoir of *Campylobacter* are a variety of domesticated and wild animals,
61 including cats, dogs, cows, pigs, poultry and wild birds, with the avian reservoir being
62 the most important (Kaakoush *et al.*, 2015). *Campylobacter* can be easily isolated from
63 poultry retail meat, untreated water, unpasteurized milk and soil (Workman *et al.*, 2005;
64 Engberg, 2006).

65 Since *C. jejuni* infections are usually self-limited and sporadic, antimicrobial therapy is
66 only indicated in severe or long-lasting infections. The antimicrobials of choice are
67 macrolides, sometimes combined with azithromycin and aminoglycosides in more
68 severe cases of the disease (Moore *et al.*, 2005; Bolinger and Kathariou, 2017). The use
69 of fluoroquinolones and tetracyclines, often prescribed as empirical therapy for
70 traveler's diarrhea (Guerrant *et al.*, 2001), has been reduced due to the dramatic increase
71 of the frequency of resistant strains to these antimicrobials agents. Unfortunately
72 macrolide resistance is increasingly being reported too (Lim *et al.*, 2016).

73 Although the infection route has been described, the pathogenicity of *Campylobacter*
74 remains mostly elusive. Very little is known on the bacterial factors exploited by
75 *Campylobacter* during the infectious process. Besides the flagella and
76 lipopoligosaccharide, some putative virulence factors have been defined such as the
77 cytolethal distending toxin (CdtABC), the fibronectin binding protein (CadF) and the
78 invasion antigen (CiaB) (Young *et al.*, 2007; Dasti *et al.*, 2010).

79 Characterization of the population structure of *Campylobacter* strains recovered from
80 different sources within a region and its antimicrobial resistance is critical to identify
81 the major source of infection and to implement efficient control measures to reduce
82 human exposure to the pathogen. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and
83 multilocus sequence typing (MLST) have been used to determine clonal diversity and
84 population structure, respectively (Duarte *et al.*, 2016). Moreover, gaining insight into
85 the distribution of virulence-associated genes among strains might shed some light on
86 the mechanisms exploited by *Campylobacter* to trigger infection.

87 In this study, we have characterized three populations of *Campylobacter* strains from
88 different ecological niches: human patients suffering gastroenteritis, broilers and wild
89 birds. The relationship among the different strains in terms of population structure,

90 antimicrobial resistance profile and prevalence of virulence-associated genes have been
91 established.

92 **MATERIALS AND METHODS**

93 **Bacterial strains**

94 One hundred fifty isolates were obtained from faeces of three different sources: human
95 patients, broilers and wild birds. Human samples were obtained from 50 patients with
96 diarrhoea attended at the Santa Creu i Sant Pau Hospital (Barcelona) through the year
97 2014. The patients were 54% children (≤ 16 years old), 30% adults and 16% elderly
98 people (≥ 65 years old). From these, 58% were men and 42% women. Broiler (*Gallus*
99 *gallus*) isolates were obtained from caecal samples collected in seven different
100 slaughterhouses (A-G), from 2009 and 2011 to 2013. Broilers were supplied from 24
101 farms located in Barcelona, Lleida and Tarragona (Catalonia) (Table 3). Finally, the
102 wild bird faecal samples from cloacal swabs were obtained during 2008 - 2013. Wild
103 bird species sampled were: one northern shoveler (*Spatula clypeata*), two white storks
104 (*Ciconia ciconia*), five common ravens (*Corvus corax*), fourteen feral pigeons
105 (*Columba livia*), seven yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) and twenty-one
106 Audouin's gulls (*Larus audouinii*). All wild bird samples were collected in Catalonia,
107 except eight from Audouin's gulls which were obtained from Alboran Island.

108 Isolates were recovered from stock cultures stored at -80 °C in cryovials containing
109 Brain Heart Infusion broth (BHI; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) supplemented
110 with 20% glycerol. Fresh cultures were obtained by streaking a loop of the frozen stock
111 cultures onto blood agar plates (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France); plates were
112 incubated at 37 °C for 48 h under a microaerobic atmosphere (85% N₂, 10% CO₂, 5%
113 O₂; Anaerocult©, Merck, Darmstadt, Germany).

114 **Species identification and antimicrobial susceptibility testing**

115 Confirmation of *C. jejuni* strains was performed by conventional species-specific PCR
116 using primers targeting the lipid A gene *lpxA* (Klena *et al.*, 2004) and Matrix-Assisted
117 Laser Desorption/Ionization-Time of flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (Bruker
118 Daltonics).

119 Susceptibility to 12 antimicrobial agents was assessed by the disk diffusion method
120 according to the Clinical Laboratory and Standard Institute (M100-S26; (CLSI, 2016))
121 using Mueller-Hinton medium supplemented with 5% defibrinated sheep blood
122 (BioMérieux). The antimicrobials tested were: ampicillin (10 µg) (AMP), amoxicillin-
123 clavulanic acid (30 µg) (AMC), imipenem (10 µg) (IMP), tetracycline (30 µg) (TET),
124 erythromycin (15 µg) (ERY), ciprofloxacin (5 µg) (CIP), nalidixic acid (30 µg) (NAL),
125 gentamicin (10 µg) (GEN), streptomycin (10 µg) (STR), kanamycin (30 µg) (KAN),
126 chloramphenicol (30 µg) (CHL) and fosfomycin (200 µg) (FOS). The breakpoints were
127 performed following the CLSI criteria except for TET, ERY and CIP where the
128 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints
129 criteria was used. All the clinical intermediate values were considered as resistant. The
130 strains that showed resistance to three or more classes of antimicrobials agents were
131 considered as multidrug resistant (MDR) (Schwarz *et al.*, 2010) .

132 ***Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multi Locus Sequence Typing (MLST)***

133 PFGE was performed following the Standard Operating Procedure of PulseNet for *C.*
134 *jejuni* (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge>). Genomic DNA was
135 digested with SmaI and KpnI restriction enzymes (Sigma-Aldrich, USA).
136 Electrophoresis was performed in a CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories,
137 Hercules, CA, USA). We performed a comparison analysis of PFGE profiles using the
138 BioNumerics v7.6 software (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Similarity
139 matrices were calculated by the Dice coefficient (2% optimization and 1% position
140 tolerance) and dendrograms were constructed using the UPGMA method using the cited
141 BioNumerics v7.6 software. Strains with a similarity $\geq 95\%$ were considered as the
142 same pulsotype, that means there are not at least two bands of difference.

143 *C. jejuni* strains were typed by MLST according to the procedures of PubMLST
144 (pubmlst.org/campylobacter). DNA was obtained using GenElute™ Bacterial Genomic
145 DNA Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Sanger sequence data were analysed using
146 BioNumerics v7.6 software. Alleles and sequence types (STs) were assigned based on
147 the MLST scheme provided on the *Campylobacter* PubMLST database
148 (<http://pubmlst.org/campylobacter>). Novel alleles and STs were submitted to the
149 database.

150 To represent the relationship among *Campylobacter* strains, we generated a complete
151 minimum spanning tree (MST) using the BioNumerics v7.6 software.

152 **Virulence-associated genes detection**

153 The 150 *C. jejuni* strains were tested by PCR for the presence of eight genes encoding
154 putative virulence factors. These included genes related to adhesion and colonization
155 (*cadF*), invasion (*ciaB*, *virB11*, *htrA* and *hcp*) and cytotoxin production (*cdtA*, *cdtB* and
156 *cdtC*). Genomic DNA was extracted by standard procedures using the InstaGene matrix
157 Kit (Bio-Rad Laboratoires). PCR reactions (PCR Master Mix x2, Thermo Scientific)
158 were performed using 35 ng of DNA as a template and the specific primers indicated in
159 Table S1 (supplementary information). As internal control of the PCR reaction, primers
160 for the amplification of the housekeeping gene *gltA* were included in the PCR mixtures.

161 **Statistical analysis**

162 The virulence-associated genes data was analyzed using Person's chi-squared test (R
163 Studio software). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

164

165 **RESULTS AND DISCUSSION**

166 **Genetic diversity of *C. jejuni* strains from the three different ecological niches**

167 A collection of 150 *C. jejuni* isolates recovered from faecal samples from different
168 ecological niches [50 isolates/each: human patients suffering gastroenteritis (H), broilers
169 (B) and wild birds (W)] have been the focus of the study. The clonal relationship of the
170 whole collection was determined by PFGE profiling. Four strains were non-typeable
171 because of DNA smearing: one human (H49), one wild bird (W10) and two broiler
172 (B24, B50) strains. As expected, a high clonal diversity was found among the 146
173 typeable strains. Genotyping using the *Sma*I restriction enzyme resulting 120 pulsotypes
174 and 12 clones. To increase the clonal discrimination, the secondary *Kpn*I enzyme was
175 used (On *et al.*, 1998). The combined analysis of *Sma*I and *Kpn*I-PFGE banding
176 patterns resulted in a wider clonal diversity with 137 pulsotypes and four clones (Figure
177 S1). The highest clonal diversity was found in the human population where no strains
178 with the same pulsotype were found, consistent with the fact that human samples were
179 not chosen in the context of an outbreak. By contrast, 13 strains, six from broilers and
180 seven from wild birds were grouped in four clones (similarity $\geq 95\%$). Clone 1 included
181 six broiler strains (B52-B57) from two different farms (five from EU and one from CT)
182 belonging to the same broiler company. The five strains (B52-B56) from farm EU were
183 recovered from broilers included in the same flock. This possible flock colonization is
184 not a rare case and has also previously been reported by others authors (Ridley *et al.*,
185 2011). Also, the recovery of the same clone in broilers from two different farms may be
186 due to cross contamination between farms belonging to the same broiler company.
187 Clone 2, included three strains (W06-W08) from Audouin's gulls (*Larus audouinii*)
188 sampled at Alboran Island at the same breeding season. Clones 3 and 4, both with two
189 strains, W43 and W44 from pigeons (*Columba livia*, Barcelona) and W50 and W52
190 from common ravens (*Corvus corax*) (Sabadell, Barcelona province), respectively. It is
191 not surprising the finding of different strains from the same host species belonging to
192 the same clone, since samples were collected from different birds belonging to the same
193 colony during the same time period.

194 The remaining PFGE patterns from the three different niches were scattered along the
195 dendrogram, although different clusters could be observed (Figure S1). Overall, human
196 and broiler strains frequently grouped together at different similarity levels. On the
197 contrary, a marked host specificity was found within some specific genus of wild birds
198 (*Columba*, *Corvus* and *Ciconia*) as previously described (Griekspoor *et al.*, 2013). Thus,
199 pigeons' strains were grouped in different clusters with a similarity ranging from 65%
200 to 80%; the three ravens' strains (two of them constitute the clone 4) clustered with a
201 similarity of 82% and the two storks clustered with a broiler strain with a 65%
202 similarity. Finally, the northern shoveler strain showed low similarity ($\leq 50\%$) with all
203 other wild birds strains (Figure S1). Gulls strains were scattered along the dendrogram
204 but some clusters were also defined. Interestingly, a cluster containing strains from two
205 different gull species had a similarity of 65%. These gulls were from different
206 geographical location (Medes Islands, Ebro Delta and Alboran Island). This fact has
207 already been described by Griekspoor *et al.* (Griekspoor *et al.*, 2013) who found high
208 similarity between strains from the same or closely related bird species from different
209 geographical areas (Sweden, Australia and UK). Notably, the gull isolate W30 cluster
210 together with several pigeon isolates (W32, W36, W37). Since all those isolates were
211 recovered from birds at the same geographical area (Barcelona), these data suggest that

212 both the gull and the pigeons have a common source of infection or it is a consequence
213 of gulls being pigeons predators.

214 **MLST analysis and population structure**

215 MLST analysis corroborates the genetic diversity observed by PFGE typing among the
216 *C. jejuni* strains and confirms a closer relationship between human and broiler strains.

217 Among the 150 strains studied, 64 different sequence types (ST) grouped in 21 clonal
218 complexes (ST-complexes) and 12 singletons (S) were recognized (Table 1 and Figure
219 S2). Six novel STs were identified: ST-8479 (human), ST-8498 (broiler), ST-8511, ST-
220 8512, ST-8513 and ST-8514 (wild birds). In this study, the ST-21 (24 strains), ST-1275
221 (16 strains) and ST-45 (13 strains) clonal complexes were the most frequent. Strains
222 from the ST-1275 complex were only isolated from two different gull species. The ST-
223 21 complex was found in humans (16 strains) and broilers (8 strains), whereas the ST45
224 was found in the three environments studied. Thus, the ST-45 complex was
225 predominant in wild birds (8 strains), followed by broilers (4 strains) and by humans (1
226 strain). Both, the ST-21 and ST-45 complexes are described as multihost genotypes and
227 have been isolated from a wide variety of agricultural and environmental sources
228 (Sopwith *et al.*, 2006; French *et al.*, 2009; Sheppard *et al.*, 2011; Colles and Maiden,
229 2012).

230 The relationship among the three studied populations is reflected in a minimum
231 spanning tree diagram (Figure 1). Three STs (ST-45, ST-48 and ST-354) were found in
232 all three niches representing 14% (21/150) of the 150 studied strains. The spanning tree
233 diagram distributes the strains in two main clusters, characterized – with some
234 exceptions- by its ecology. The first cluster, in the left side of the figure 1B, grouped
235 STs from wild birds, whereas the second cluster (right side) agglutinate most human
236 and broiler STs. This distribution clearly establishes a closer relationship between
237 broiler and human strains, consistent with broiler meat being the most frequent source
238 of *Campylobacter* human infection (EFSA-ECDC, 2016; Ramonaite *et al.*, 2017). This
239 can also be observed when looking at the number of STs shared among the different
240 niches (Figure 1): 10 STs are shared between human and broiler strains, only three in
241 the three niches, and no ST is shared among wild birds and either humans or broilers.

242 From the first cluster (STs from wild birds), the ST-179 and ST-1275 complexes were
243 mainly found in pigeons and seagulls, respectively. These data support that
244 *Campylobacter* genotypes isolated from non-agricultural sources, such as wild birds, are
245 found only rarely among broilers (Griekspoor *et al.*, 2010). However, these clonal
246 complexes have also been recovered from stool samples from humans with sporadic
247 cases of gastroenteritis (Hughes *et al.*, 2009). STs from the ST-179 complex have been
248 isolated from environmental sources, specifically from the sand of bathing beaches in
249 UK, presumably ultimately coming from wild birds (Dingle *et al.*, 2001). The ST-1275
250 complex has also been found in several wild bird species such as pigeons (Sheppard *et*
251 *al.*, 2009). Certain host specificity was found among the ST-complexes present in
252 different wild birds. Hence, the ST-1275 complex was predominant in gulls, the ST-179
253 complex in pigeons and the ST-952 complex in ravens (Table 2).

254 With regards to the second cluster (STs from human and broiler strains), five ST-
255 complexes were found as predominant (ST-21, ST-206, ST-257, ST-353 and ST-607).

256 These clonal complexes have been previously associated with human infections,
257 poultry, other farm animals and environmental samples (Colles and Maiden, 2012;
258 Cody *et al.*, 2015; Ramonaite *et al.*, 2017). Overall, a great diversity of ST-complexes
259 was found among both human and broiler strains. Sixteen STs were found in humans
260 and 14 in broilers (Figure 1A). Strains from clones 1, 2, 3 and 4 by PFGE belong to ST-
261 367, ST-4355, ST-45, and ST-8513 respectively, whilst the remaining strains showed
262 unrelated PFGE pattern.

263 **Antimicrobial susceptibility**

264 Antimicrobial susceptibility was tested for all the isolates and antimicrobial resistance
265 profiles (AMR) were defined (Figure 2). In agreement with the increase in the
266 occurrence of antimicrobial and multidrug resistance detected in *Campylobacter* strains
267 in many countries (Luangtongkum *et al.*, 2009), a high frequency of antimicrobial
268 resistance was detected among the strains of our collection. One hundred and twenty
269 seven strains (84.6%) were resistant to one or more antimicrobial agents. The highest
270 percentage of antimicrobial resistance was found for tetracycline (71.3%), quinolones
271 [ciprofloxacin (67.3%), nalidixic acid (64.6%)] and ampicillin (63.3%). In agreement
272 with the genotyping data, the antimicrobial susceptibility describes important
273 differences between wild bird strains and the clustered broiler and human strains, with
274 the occurrence of antibiotic resistance much lower among wild bird strains. In our strain
275 collection, 23 strains were susceptible to all antimicrobial agents tested. From those, 21
276 strains were recovered from wild birds and the other two from human samples.
277 Moreover, the occurrence of tetracycline, quinolones and ampicillin resistance was
278 higher in human and broiler strains compared to wild birds. In contrast, the low
279 occurrence resistance to aminoglycosides is shared among strains from the three niches.
280 In our study, 7.3% and 4.6% of the strains were resistant to streptomycin and
281 kanamycin, respectively, whereas only one strain from human sample was resistant to
282 gentamicin.

283 The high occurrence of resistance to some antibiotics cannot be accounted to the non-
284 therapeutic use of antimicrobial drugs in poultry production since this practice was
285 banned in the EU in 2006. The therapeutic antibiotics used in poultry are mainly
286 quinolones (enrofloxacin), tetracyclines (doxycycline), penicillins (amoxicillin) and
287 macrolides (erythromycin, tylosin), which is reflected – in general- with the occurrence
288 of antibiotic resistance detected. All strains were susceptible to amoxicillin-clavulanic
289 acid, imipenem, erythromycin, chloramphenicol and fosfomicin. The rare occurrence of
290 imipenem, erythromycin and amoxicillin-clavulanic acid resistance among
291 *Campylobacter* strains has been previously described (Gallay *et al.*, 2007; Deckert *et*
292 *al.*, 2010; Deng *et al.*, 2015). In contrast, resistance to fosfomicin has been detected in
293 *C. jejuni* strains (Novoa-Farías *et al.*, 2016) as well as to chloramphenicol in *C. coli*
294 strains isolated from humans and broilers (Yang *et al.*, 2017) .

295 Multidrug resistance (MDR), defined as resistance to three or more families of
296 antimicrobial agents (Schwarz *et al.*, 2010), has increased worldwide among *C. jejuni*
297 strains (Giacomelli *et al.*, 2014). In this study, 49.3% of the strains were MDR (Figure
298 2B). The most frequent MDR profile (M profile, TET-NAL-CIP-AMP) was detected in
299 40% of the strains, being mostly identified in humans (23.3%) and broilers (23.3%)
300 (Figure 2C). Only five strains from wild birds were MDR, four of them with the above
301 mentioned M profile and one with the T profile (TET-NAL-CIP-S-K). Those MDR

302 strains were recovered from birds with insalubrious feeding habits (feeding on refuse
303 dumps and carrion) such as gulls, storks and ravens (Ramos *et al.*, 2010).

304 Among these MDR strains, they were included in five out of the six predominant ST-
305 complexes found in humans and broilers (ST-21, ST-206, ST-257, ST-354 and ST-607)
306 (Table 1). Interestingly, the percentage of MDR among strains of ST-353 complex, also
307 defined as predominant in humans and broilers, was much lower (33.3 %). No MDR
308 strains have been found among the two ST- complexes exclusive for wild birds (ST-179
309 and ST-1275). It should be highlighted that there is a high variability in the AMR
310 profile among genetically closely related strains. For instance, within the ST-45 and ST-
311 61, strains susceptible to all antimicrobial agents tested and MDR were found. These
312 suggest a rapid acquisition of antibiotic resistance determinants among *C. jejuni* strains.
313 Accordingly, transfer of antibiotic resistance genes by mobile genetic elements, such as
314 plasmids and transposons that can help acquisition and diffusion of drug resistance, has
315 been described (Bennett, 2008).

316 **Prevalence and distribution of virulence-associated genes among the *C. jejuni*** 317 **strains**

318 The presence of genes coding for putative virulence factors in the 150 *C. jejuni* strains
319 have been tested by PCR. The genes detected were: i) *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes,
320 conforming a polycistronic operon, coding for synthesis and deliver of the cytolethal
321 distending toxin that causes host cell cycle arrest; ii) three genes involved in adherence
322 and invasion of host cells: *cadF* coding for a putative OmpA-like protein that mediates
323 bacterial adhesion by binding to host fibronectin, *ciaB* coding for an invasive antigen
324 that translocate into the cytoplasm of host cells facilitating the *C. jejuni* invasion, and
325 *htrA* coding for a serine-protease that contributes to stress tolerance and with ability to
326 cleave E-cadherin; iii) the *hcp* gene coding for a host surface adhesion protein that is a
327 component of a type VI secretion system that has been associated with virulence; and
328 iv) the *virB11*, a gene located in the virulence related plasmid pVir (Bacon *et al.*, 2002;
329 Tracz *et al.*, 2005; O Cróinín and Backert, 2012; Bleumink-Pluym *et al.*, 2013). The
330 results showed a high prevalence of six out of eight genes tested (Figure 3).
331 Remarkably, significant differences exist in the prevalence of some of the genes when
332 comparing among the strains from different origin. A different distribution of the *cdtA*,
333 *cdtB* and *cdtC* genes was detected among the three subgroups of strains. The three genes
334 were present in all the human and broiler strains whereas 46% of the wild bird strains
335 were negative for at least one of the *cdt* genes (Figure S2). The fact that many strains
336 (23) lacked one or two of the three open reading frames (ORF) present in the
337 polycistronic *cdtABC* operon is an interesting phenomenon that has been reported
338 earlier (Bang *et al.*, 2003; Koolman *et al.*, 2015). Remarkably, the *cdtA* gene had the
339 more uneven distribution since it was detected in all human and broilers strains, while it
340 was only present in 58% of the wild bird strains. Among the 23 strains lacking at least
341 one *cdt* gene, 14 lacked *cdtA*, 1 *cdtB*, 1 *cdtC*, 3 *cdtAB* and 4 *cdtAC*. The negative PCR-
342 amplification of one or two of the three ORF present in the *cdtABC* operon, when using
343 primers designed from the 81-176 genome sequence (Table S1), may indicate
344 significant differences among alleles from different strains. Our results suggest that: i) a
345 high diversity of *cdt* alleles exist among *C. jejuni* strains found in natural environments
346 (wild bird) and ii) the *cdt* alleles promoting efficient broiler colonization are much less
347 diverse. CdtA and CdtC are involved in the binding to the target host cells allowing
348 internalization of the CdtB toxin. Therefore, we hypothesize that different CdtA might

349 have distinct target molecules during tissue recognition and consequently might play a
350 relevant role defining the host susceptibility of *C. jejuni* strains. Interesting observations
351 can be made when having a closer look to the phylogenetic and ecological relationships
352 of the strains that were negative for any of the *cdt* genes (Table 1, Figure S2): i) all 16
353 strains belonging to the ST-1275 complex and different PFGE pattern were *cdtA*
354 negative and were isolated from the two different seagull species located in three
355 geographically distinct colonies along the western Mediterranean coast; three of them
356 were also *cdtC*-negative. From these seagulls' colonies, *cdtABC*⁺ strains, belonging to
357 diverse ST-complex distinct to ST-1275, were also isolated. ii) all three strains
358 belonging to ST-952 complex are *cdtAB* negative but two share the same PFGE pattern
359 (W50 and W52), these strains were isolated from commons ravens. The other two
360 ravens' strains are *cdtA* negative (W53, singletone ST-8514) and *cdtABC*⁺ (W54, ST-
361 354 complex), respectively. iii) the ST-48 complex includes three strains, belonging
362 each one to a different niche, the broiler (B09) and human (H38) strains are *cdtABC*⁺
363 and showed different PFGE pattern, whereas the wild bird strain (W29) from a Yellow-
364 legged gull is *cdtB* negative. iv) from the wild bird subgroup, all the strains from
365 pigeons and storks, birds that are more in contact with the human population, are
366 positive for all three *cdt* genes. v) the unique *cdtC*⁻ strain belongs to the ST-1034
367 complex. The relevant diversity among *cdtABC* found among wild bird strains and the
368 apparently highly conserved distribution among human and broiler strains might
369 indicate that the specific sequence of certain *cdt* alleles can be related to the ability to
370 colonize different hosts. Moreover, the fact that there are differences in the presence of
371 *cdt* alleles among strains from the same ST-complex and/or ST indicate the high
372 plasticity of this genetic locus (the *cdtABC* operon).

373 Regarding the genes coding for putative factors involved in host cell invasion, only
374 *cadF* showed an uneven prevalence distribution among strains from the different niches.
375 The tested *cadF* allele was present in all broiler and wild bird strains and in 45 out of 50
376 human strains. This result suggests that either some strains lack the *cadF* gene or carry a
377 *cadF* allele with significant differences from the *cadF*₈₁₋₁₇₆ allele chosen as template in
378 this study (Table S1). Interestingly, all the *cadF* negative strains belong to ST-61, which
379 is often found in cattle / bovine reservoirs (Patrick *et al.*, 2008). Our results suggest that
380 the presence of the *cadF* tested may not be essential for the ability of *Campylobacter* to
381 cause infection in humans. It cannot be disregarded that the five *cadF*⁻ strains carry a
382 different *cadF* allele not detected with the primers used (Table S1). In a recent report
383 studying the distribution of virulence-associated genes in a collection of 24
384 *Campylobacter* strains, *cadF* was detected in all *C. jejuni* strains whereas some *C. coli*
385 from both humans and broilers were negative for this gene (Koolman *et al.*, 2015).

386 No significant differences exist when comparing the prevalence of the *ciaB* gene among
387 the three populations. The *ciaB* negative strains are the majority for certain ST-
388 complexes such as ST-48, ST-179, ST-353, ST-206 and two singletons (ST-441, ST-
389 1710). However, we also found *ciaB* negative strains belonging to ST-complex where
390 most strain are positive for this genetic locus. Only four strains were negative for *htrA*,
391 two from humans (ST-61 and ST-441), one from a broiler (ST-48) and one from a
392 seagull wild bird (ST-48).

393 The presence of the *hcp* gene is a hallmark of the ability of *C. jejuni* to express a T6SS
394 (Lindmark *et al.*, 2009) . A functional T6SS has been identified in some *C. jejuni*
395 strains, those carrying the integrative element CJIE3. Its presence had been related to

396 the ability to infect humans and cause disease by influencing cell adhesion and
397 cytotoxicity towards erythrocytes (Lertpiriyapong *et al.*, 2012; Bleumink-Pluym *et al.*,
398 2013; Harrison *et al.*, 2014). Notably, the *hcp* gene was detected in a low proportion in
399 all three populations. The detection frequency was in range similar to that described in
400 previous reports (Harrison *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2015). Surprisingly, our data
401 indicate that *hcp* is significantly less represented among the human strains (14%) as
402 compared to broiler (38%) and wild bird (28%) strains (Figure 3A). Interestingly, the
403 *hcp*-positive clones are mostly distributed among certain ST-complexes: ST-1275 (12
404 out of 16 are positive), ST-607 (7/8), ST-353 (8/9), ST-464 (2/3) and ST-446 (1/1). The
405 differential prevalence of *hcp*, with lower prevalence among human strains, suggests
406 that T6SS does not promote causing human infection. The last putative virulence factor
407 encoding gene tested was *virB11*. Previous reports have argued on the contribution of
408 the pVir plasmid in the virulence potential of *C. jejuni* (Tracz *et al.*, 2005; Louwen *et*
409 *al.*, 2006). Among our strains the prevalence of the *virB11* gene is very low since only
410 two strains, one from human and one from broiler, were positive for the tested *virB11*
411 allele, suggesting that the pVir plasmid is not required for *C. jejuni* to either colonize
412 birds or infect humans.

413 Virulence profiles were defined attending to the presence/absence of virulence-related
414 genes of chromosomal location (all genes except *virB11*) (Figure 3). The virulence
415 profile #2 (*cadF*⁺, *cdt*⁺, *htrA*⁺, *ciaB*⁺) is overrepresented among the collection, being
416 detected in a 54% of the strains and being the most prevalent in all three subgroups
417 (human, broiler and wild birds). In addition to profile #2, only three more virulence
418 profiles (#1, #3, #5) were detected in all the three subgroups. The highest variability
419 was found among the wild bird strains since up to 14 different profiles were identified,
420 in contrast to human and broiler strains where five profiles were found within each
421 subgroup. From the 14 profiles described in wild birds, 10 were only found in this
422 subgroup. One virulence profile (#6, *cdt*⁺, *cadF*⁻, *ciaB*⁺, *htrA*⁺ *hcp*⁻) was only found
423 among human strains, being detected in four clinical strains belonging to ST-61, but
424 with different PFGE patterns. Moreover the profile #9 has only been detected among
425 broiler strains.

426

427 CONCLUDING REMARKS

428 In this report, a comparative study has been performed among *C. jejuni* strains from
429 three different sources: humans, broilers and wild birds from Catalonia. As expected, by
430 PFGE a great genetic diversity was observed among all included strains, with the
431 exception of a few clones. In our *Campylobacter* population, the ST-45, ST-48 and ST-
432 354 were present in all three niches; the ST-21 complex was the predominant in human
433 and the ST-1275 complex in wild birds, while in broilers different complexes: ST-21,
434 ST-257, ST-353 and ST-607 were present equally. MLST analysis clearly distinguished
435 the wild bird *Campylobacter* population from that of humans and chickens, suggesting
436 that certain host specificity may exist among *C. jejuni* clonal complexes. The drug
437 antimicrobial profiles show an overall high percentage of MDR strains (49%). Again, a
438 closer relationship between human and broiler strains was detected. A similar high
439 percentage of MDR strains (72%) was detected among human and broiler strains
440 whereas the percentage among wild bird strains was much lower (8%). This discrepancy
441 in MDR prevalence correlates with the differential antibiotic pressure. The broiler and
442 human strains are under a high antibiotic pressure due to the use of antimicrobial drugs
443 whereas the selective pressure is barely inexistent in wild bird population. The presence
444 of several putative virulence genes have been detected by PCR. The genes *cadF*, *ciaB*,
445 *htrA*, and the operon *cdtABC*, coding for proteins presumably involved in bacterial
446 adherence, invasion of epithelial cells and toxin production, are highly prevalent among
447 *Campylobacter* strains. Correlation between certain virulence factors profiles and
448 specific STs has been detected, which may have ecological implications. For instance,
449 our data indicates a great diversity in *cdtA* alleles among wild bird strains as compared
450 with broiler and human strains, suggesting that colonization of specific hosts might be
451 promoted by certain CdtA variants.

452 All the genotype- and phenotype-based analysis indicate that most strains isolated from
453 wild birds form a cluster clearly differentiated from those strains isolated from broilers
454 and humans. Nonetheless, some wild bird strains belong to clonal complexes also
455 detected among broiler or human strains suggesting a reverse zoonosis transmission,
456 most likely consequence of the scavenging feeding habitats of the studied birds.
457 Overall, our report provides new insights into the distribution of circulating *C. jejuni*
458 strains among different ecological niches.

459 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

460 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
461 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

462 FUNDING

463 This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness
464 (grant AGL2013-45339R), the Spanish National Institute of Agrifood Research and
465 Technology (INIA, grant FAU2008-00012-C02-0 and RTA2009-00117-00-00), the
466 Catalanian government (grant 2017SGR499), the Recercaixa program (grant
467 2012/ACUP/00048) and the European Community's Seventh Framework Programme
468 (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 244547 (CamCon project). CERCA
469 Programme from the Generalitat de Catalunya is also acknowledged.

470 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

471 YI: investigation, formal analysis, statistical analysis, writing manuscript; PG:
472 investigation, formal analysis, statistical analysis; TL, CM: conception and design of the
473 study; revision manuscript; MC, FN: formal analysis, statistical analysis, conception and
474 design of the study; revision manuscript; EM, CM and CB: formal analysis, statistical
475 analysis, conception and design of the study; writing manuscript.

476 **ACKNOWLEDGMENTS**

477 Pigeon samples were kindly provided by the Barcelona Public Health Agency (ASPB).

478 **REFERENCE LIST**

- 479 Ang, C. W., De Klerk, M. A., Endtz, H. P., Jacobs, B. C., Laman, J. D., Van Der
480 Meché, F. G. A., et al. (2001). Guillain-Barré syndrome- and Miller Fisher
481 syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM 1
482 and anti-GQ 1b antibodies in rabbits. *Infect. Immun.* 69, 2462–2469.
483 doi:10.1128/IAI.69.4.2462–2469.2001.
- 484 Bacon, D. J., Alm, R. A., Hu, L., Hickey, T. E., Ewing, C. P., Batchelor, R. A., et al.
485 (2002). DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of
486 *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* 70, 6242–6250.
487 doi:10.1128/IAI.70.11.6242-6250.2002.
- 488 Bang, D. D., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., and Madsen, M.
489 (2003). PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni*
490 and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal
491 distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1003–1014.
492 doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x.
- 493 Bennett, P. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of
494 antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153, 347–357.
495 doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
- 496 Bleumink-Pluym, N. M., Van Alphen, L. B., Bouwman, L. I., Wösten, M. M. S. M., and
497 van Putten, J. P. M. (2013). Identification of a functional type VI secretion system
498 in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity.
499 *PLoS Pathog.* 9, 16–18. doi:10.1371/journal.ppat.1003393.
- 500 Bolinger, H., and Kathariou, S. (2017). The current state of macrolide resistance in
501 *Campylobacter spp.* : trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl. Environ.*
502 *Microbiol.* 83, 1–9. doi: 10.1128/AEM.00416-17.
- 503 CLSI (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI*
504 *supplement M100S.*
- 505 Cody, A. J., Mccarthy, N. D., Bray, J. E., Wimalarathna, H. M. L., Colles, F. M., Jansen
506 Van Rensburg, M. J., et al. (2015). Wild bird-associated *Campylobacter jejuni*
507 isolates are a consistent source of human disease, in Oxfordshire, United Kingdom.
508 *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 782–788. doi:10.1111/1758-2229.12314.
- 509 Cody, A. J., Mccarthy, N. M., Wimalarathna, H. L., Colles, F. M., Clark, L., Bowler, I.
510 C. J. W., et al. (2012). A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology
511 of clinical *Campylobacter* isolates in Oxfordshire, United Kingdom. *J. Clin.*

512 *Microbiol.* 50, 3193–3201. doi:10.1128/JCM.01086-12.

513 Colles, F. M., and Maiden, M. C. J. (2012). *Campylobacter* sequence typing databases:
514 applications and future prospects. *Microbiology* 158, 2695–2709.
515 doi:10.1099/mic.0.062000-0.

516 Dasti, J. I., Malik Tareen, A., Lugert, R., Zautner, A. E., and Groß, U. (2010).
517 *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and
518 disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 205–211.
519 doi:10.1016/j.ijmm.2009.07.002.

520 Deckert, A., Valdivieso-Garcia, A., Reid-Smith, R., Tamblyn, S., Seliske, P., Irwin, R.,
521 et al. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp.
522 isolated from retail chicken in two health units in Ontario. *J. Food Prot.* 73, 1317–
523 1324.

524 Deng, F., Shen, J., Zhang, M., Wu, C., Zhang, Q., and Wang, Y. (2015). Constitutive
525 and inducible expression of the rRNA methylase gene *erm(B)* in *Campylobacter*.
526 *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6661–6664. doi:10.1128/AAC.01103-15.

527 Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., et al.
528 (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin.*
529 *Microbiol.* 39, 14–23. doi:10.1128/JCM.39.1.14–23.2001.

530 Duarte, A., Seliwiorstow, T., Miller, W. G., De Zutter, L., Uyttendaele, M., Dierick, K.,
531 et al. (2016). Discriminative power of *Campylobacter* phenotypic and genotypic
532 typing methods. *J. Microbiol. Methods* 125, 33–39.
533 doi:10.1016/j.mimet.2016.03.004.

534 Eberle, K. N., and Kiess, A. S. (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing
535 *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poult. Sci.* 91, 255–264.
536 doi:10.3382/ps.2011-01414.

537 EFSA-ECDC (2016). The European Union summary report on trends and sources of
538 zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 4634.
539 doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.

540 Engberg, J. (2006). Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. A
541 review of clinical and microbiological studies. *Dan. Med. Bull.* 53, 361–389.

542 French, N. P., Midwinter, A., Holland, B., Collins-Emerson, J., Pattison, R., Colles, F.,
543 et al. (2009). Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-
544 bird fecal material in children’s playgrounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 779–
545 783. doi:10.1128/AEM.01979-08.

546 Gallay, A., Prouzet-mauléon, V., Kempf, I., Lehours, P., Labadi, L., Camou, C., et al.
547 (2007). *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler
548 chickens, and pigs, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 259–266.
549 doi:10.3201/eid1302.060587

550 Giacomelli, M., Salata, C., Martini, M., Montesissa, C., and Piccirillo, A. (2014).
551 Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from
552 poultry in Italy. *Microb. Drug Resist.* 20, 181–188. doi:10.1089/mdr.2013.0110.

553 Griekspoor, P., Colles, F. M., McCarthy, N. D., Hansbro, P. M., Ashhurst-Smith, C.,
554 Olsen, B., et al. (2013). Marked host specificity and lack of phylogeographic
555 population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. *Mol. Ecol.* 22, 1463–
556 1472. doi:10.1111/mec.12144.

- 557 Griekspoor, P., Engvall, E. O., Olsen, B., and Waldenström, J. (2010). Multilocus
558 sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet. Microbiol.* 140, 180–
559 185. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.022.
- 560 Guerrant, R. L., Gilder, T. Van, Steiner, T. S., Thielman, N. M., Slutsker, L., Tauxe, R.
561 V, et al. (2001). Practice guidelines for the management of infectious diarrhea.
562 *Clin. Infect. Dis.* 32, 331–350.
- 563 Harrison, J. W., Dung, T. T. N., Siddiqui, F., Korbrisate, S., Bukhari, H., Vu Tra, M. P.,
564 et al. (2014). Identification of possible virulence marker from *Campylobacter*
565 *jejuni* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1026–1029. doi:10.3201/eid2006.130635.
- 566 Harvala, H., Rosendal, T., Lahti, E., Engvall, E. O., Brytting, M., Wallensten, A., et al.
567 (2016). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in Sweden, November
568 2011–October 2012: is the severity of infection associated with *C. jejuni* sequence
569 type? *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6, 31079. doi: 10.3402/iee.v6.31079.
- 570 Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., et al.
571 (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of
572 the burden of foodborne disease in 2010. *Plos Med.* 12, 1–23.
573 doi:10.1371/journal.pmed.1001923.
- 574 Hughes, L. A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T. R., Jones, R. C., et al.
575 (2009). Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp.
576 isolated from wild bird populations in northern England. *Appl. Environ. Microbiol.*
577 75, 3007–3015. doi:10.1128/AEM.02458-08.
- 578 Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., and Man, S. M. (2015).
579 Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev Clin.*
580 *Microbiol. Rev.* 28, 687–720. doi:10.1128/CMR.00006-15.
- 581 Klena, J. D., Parker, C. T., Knibb, K., Claire Ibbitt, J., Devane, P. M. L., Horn, S. T., et
582 al. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*,
583 *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR
584 developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J. Clin.*
585 *Microbiol.* 42, 5549–5557. doi:10.1128/JCM.42.12.5549-5557.2004.
- 586 Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., and Bolton, D. (2015). Distribution of virulence-
587 associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog. Dis.*
588 12, 424–432. doi:10.1089/fpd.2014.1883.
- 589 Lertpiriyapong, K., Gamazon, E. R., Feng, Y., Park, D. S., Pang, J., Botka, G., et al.
590 (2012). *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: Roles in adaptation to
591 deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and *in vivo* colonization. *PLoS*
592 *One* 7, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0042842.
- 593 Lim, S.-K., Moon, D.-C., Chae, M. H., Kim, H. J., Nam, H.-M., Kim, S.-R., et al.
594 (2016). Macrolide resistance mechanisms and virulence factors in erythromycin-
595 resistant *Campylobacter* species isolated from chicken and swine feces and
596 carcasses. *J. Vet. Med. Sci* 78, 1791–1795. doi:10.1292/jvms.16-0307.
- 597 Lindmark, B., Kumar Rompikuntal, P., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin,
598 B. E., et al. (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal
599 distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 9, 1–10.
600 doi:10.1186/1471-2180-9-220.
- 601 Louwen, R. P. L., Van Belkum, A., Wagenaar, J. A., Doorduyn, Y., Achterberg, R., and
602 Endtz, H. P. (2006). Lack of association between the presence of the pVir plasmid

603 and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44,
604 1867–1868. doi:10.1128/JCM.44.5.1867-1868.2006.

605 Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., and Zhang, Q. (2009).
606 Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence.
607 *Futur. Microbiol* 4, 189–200. doi:10.2217/17460913.4.2.189.

608 Moore, J., Corcoran, D., Dooley, J., and Lucey, B. (2005). *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36,
609 351–382. doi: 10.1051/vetres:2005012

610 Novoa-Farías, O., Frati-Munari, C., Peredo, M., Flores-Juárez, S., Novoa-García, O.,
611 Galicia-Tapia, J., et al. (2016). Susceptibilidad de las bacterias aisladas de
612 infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes
613 antimicrobianos en México. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 81, 3–10.
614 doi:10.1016/j.rgmx.2015.07.003.

615 O Cróinín, T., and Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter*
616 *jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 25.
617 doi:10.3389/fcimb.2012.00025.

618 On, S. L. W., Nielsen, E. M., Engberg, J., and Madsen, M. (1998). Validity of SmaI-
619 defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by SalI, KpnI, and BamHI
620 polymorphisms : evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle.
621 *Epidemiol. Infect* 120, 231–237.

622 Patrick, Kwan, S. L., Birtles, A., Bolton, F. J., French, N. P., Robinson, S. E., et al.
623 (2008). Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni*
624 in cattle on dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3626–3633.
625 doi:10.1128/AEM.01669-07.

626 Ramonaite, S., Tamuleviciene, E., Alter, T., Kasnauskite, N., and Malakauskas, M.
627 (2017). MLST genotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from broiler products,
628 dairy cattle and human campylobacteriosis cases in Lithuania. *BMC Infect. Dis.*
629 430, 1–10. doi:10.1186/s12879-017-2535-1.

630 Ramos, R., Cerdà-Cuéllar, M., Ramírez, F., Jover, L., and Ruiz, X. (2010). Influence of
631 refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in
632 seagulls. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3052–3056. doi:10.1128/AEM.02524-09.

633 Ridley, A. M., Morris, V. K., Cawthraw, S. a., Ellis-Iversen, J., Harris, J. a., Kennedy,
634 E. M., et al. (2011). Longitudinal molecular epidemiological study of thermophilic
635 campylobacters on one conventional broiler chicken farm. *Appl. Environ.*
636 *Microbiol.* 77, 98–107. doi:10.1128/AEM.01388-10.

637 Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A. P., et
638 al. (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained
639 from animals. *J Antimicrob Chemother* 65, 601–604.
640 doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.013).

641 Sheppard, S. K., Colles, F. M., McCarthy, N. D., Strachan, N. J. C., Ogden, I. D.,
642 Forbes, K. J., et al. (2011). Niche segregation and genetic structure of
643 *Campylobacter jejuni* populations from wild and agricultural host species. *Mol.*
644 *Ecol.* 20, 3484–3490. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05179.x.

645 Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Macrae, M., Mccarthy, N. D., Gormley, F. J., Strachan,
646 N. J. C., et al. (2009). Europe PMC funders group *Campylobacter* genotypes from
647 food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005 / 6. 134,
648 96–103. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.010.Campylobacter.

- 649 Siddiqui, F., Champion, O., Akram, M., Studholme, D., Eqani, S. A. M. A. S., Wren, B.
650 W., et al. (2015). Molecular detection identified a type six secretion system in
651 *Campylobacter jejuni* from various sources but not from human cases. *J. Appl.*
652 *Microbiol.* 118, 1191–1198. doi:10.1111/jam.12748.
- 653 Sopwith, W., Birtles, A., Matthews, M., Fox, A., Gee, S., Painter, M., et al. (2006).
654 *Campylobacter jejuni* multilocus sequence types in humans, Northwest England,
655 2003-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1500–1507. doi:10.3201/eid1210.060048.
- 656 Tracz, D. M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska,
657 K., and Taylor, D. E. (2005). pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni*
658 enteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 838–843. doi:10.3201/eid1106.041052.
- 659 van Doorn, P., Ruts, L., and Jacobs, B. C. (2008). Clinical features, pathogenesis, and
660 treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol.* 7, 939–950.
661 doi:10.1016/S1474-4422(08)70215-1.
- 662 Workman, S. N., Mathison, G. E., Marc, C., and Lavoie, M. C. (2005). Pet dogs and
663 chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp . in Barbados. *J. Clin. Microbiol.*
664 43, 2642–2650. doi:10.1128/JCM.43.6.2642.
- 665 Yang, W., Zhang, M., Zhou, J., Pang, L., Wang, G., and Hou, F. (2017). The molecular
666 mechanisms of ciprofloxacin resistance in clinical *Campylobacter jejuni* and their
667 genotyping characteristics in Beijing, China. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 386–392.
668 doi:10.1089/fpd.2016.2223.
- 669 Young, K. T., Davis, L. M., and Dirita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular
670 biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 665–79.
671 doi:10.1038/nrmicro1718.

672 **Table 1.** Clonal complex (ST-complex), sequence type (ST), virulence factors profile (VF) and antimicrobial resistance profile (AMR) found in
 673 150 *C. jejuni* strains from humans, broilers and wild birds niches. In brackets, number of strains.

ST complexes	ST	Humans		Broilers		Wild Birds	
		VF ^a	AMR ^b	VF	AMR	VF	AMR
ST-21 complex (24)	19	(1)	#2	M (1)			
	21	(8)	#2	M (1) I (2) J (1) T (1)	#2	M (2) O (1)	
	50	(8)	#2	M(4) K (1)	#2	M (1) K (2)	
	883	(4)	#2	M (1) J (1)	#1	I (1)	
					#2	I (1)	
	1214	(1)	#2	J (1)			
	3769	(1)	#2	M (1)			
	4664	(1)	#2	B (1)			
ST-42 complex (2)	459	(1)	#2	M (1)			
	4016	(1)	#2	E (1)			
ST-45 complex (13)	45	(10)	#2	K (1)	#2	M (1) G (1)	#2 A (3) C (3) I (1)
	137	(1)			#2	P (1)	
	652	(1)			#2	P (1)	
	8512	(1)					#2 A (1)
ST-48 complex (3)	48	(3)	#5	M (1)	#9	M (1)	#14 M (1)
ST-49 complex (1)	49	(1)	#2	M (1)			
ST-52 complex (1)	52	(1)	#2	H (1)			
ST-61 complex (5)	61	(5)	#6	M (2) A (1) E (1)			
			#12	B (1)			
ST-179 complex (7)	179	(1)					#5 A (1)
	220	(1)					#3 D (1)
	2209	(5)					#2 A (1)
							#5 A (2) C (2)
ST-206 complex (6)	46	(1)			#2	M (1)	
	227	(1)	#2	A (1)			

	572	(4)	#5	M (4)				
ST-257 complex (12)	257	(3)	#2	M (1) N (1) P(1)				
	367	(6)			#2	M (6)		
	2254	(3)	#2	M (2)	#2	I (1)		
ST-283 complex (1)	267	(1)			#2	M (1)		
ST-353 complex (9)	5	(2)			#1	I (1)		
					#3*	I (1)		
	353	(1)	#1*	K (1)				
	356	(1)			#2	M (1)		
	400	(5)	#3	M (1)	#3	I (3) M (1)		
ST-354 complex (9)	354	(8)	#2	M (2)	#2	M (2)	#2	M (2) I (2)
	8498	(1)			#2	M (1)		
ST-443 complex (2)	51	(1)	#2	M (1)				
	5799	(1)	#2	M (1)				
ST-446 complex (1)	3552	(1)					#1	M (1)
ST-464 complex (3)	464	(3)	#1	F (1)	#2	M (1)		
					#1	M (1)		
ST-574 complex (2)	305	(2)			#2	M (1) I (1)		
ST-607 complex (8)	607	(2)			#1	M (1) I (1)		
	904	(3)	#1	M (1)	#1	M (2)		
	1707	(1)			#1	M (1)		
	7110	(2)			#2	M (1)		
					#1	I (1)		
ST-952 complex (3)	8513	(3)					#10	A (2) C (1)
ST-1034 complex (1)	4001	(1)					#13	L (1)
ST-1275 complex (16)	637	(2)					#4	A (1) B (1)
	1223	(5)					#4	C (1)
							#7	A (2) C (1)
							#15	C (1)
	1268	(1)					#4	B (1)

	1275	(3)					#4	B (2)
	1292	(2)					#8	B (1)
	3049	(1)					#4	C (1)
	3629	(1)					#8	C (1)
	8511	(1)					#4	A (1)
Singletons	441	(3)	#2	R (1)	#5	P (1)		
			#11	J (1)				
	531	(2)	#3	M (1)	#1	M (1)		
	996	(1)					#16	A (1)
	1261	(1)					#2	A (1)
	1343	(2)					#2	A (2)
	1710	(4)	#1	M (1)	#1	M (1) Q (1)		
					#3	P (1)		
	2331	(1)			#1	M (1)		
	2351	(1)					#2	C (1)
	4355	(3)					#2	A (3)
	7114	(1)			#2	T (1)		
	8479	(1)	#1	M (1)				
	8514	(1)					#7	S (1)

674 ^aThe VF profile is described in figure 3.

675 ^bThe AMR profile is described in figure 2.

676 *: virB11 positive

677

678 **Table 2.** Distribution of ST-complexes and sequence types (ST) of *C. jejuni* strains from wild birds. In brackets, number of strains.

Wild bird	ST-complex	ST	Location	Strains (Year of recollection)	
Audouin's gull (21)	ST-446 (1)	3552	Alboran Island	W12 (2010)	
		4001	Ebro Delta	W05 (2009)	
	ST-1275 (12)	1223	Ebro Delta	W03 (2009), W10 (2010), W15 (2010), W18 (2011), W21 (2011)	
		1268	Ebro Delta	W22 (2011)	
		1275	Ebro Delta	W04 (2009), W09 (2010), W20 (2010)	
		1292	Alboran Island	W14 (2010), W16 (2010)	
		3629	Ebro Delta	W19 (2010)	
		Singletons (7)	1261	Ebro Delta	W11 (2010)
			1343	Alboran Island	W13 (2010), W23 (2010)
	Yellow-legged gull (7)	ST-45 (1)	45	Barcelona	W30 (2014)
			48	Barcelona	W29 (2014)
ST-354 (1)		354	Medes Islands	W28 (2013)	
ST-1275 (4)		637	Medes Islands	W24 (2012), W27 (2013)	
		3049	Medes Islands	W26 (2013)	
Common Ravens (5)	ST-354 (1)	8511	Medes Islands	W25 (2012)	
		354	Barcelona province	W54 (2008)	
	ST-952 (3)	8513	Barcelona province	W50 (2008), W51 (2008), W52 (2008)	
Fereal Pigeons (14)	ST-45 (7)	8514	Barcelona province	W53 (2008)	
		45	Barcelona	W32 (2015), W36 (2015), W37 (2015), W40 (2015), W43 (2015), W44 (2015)	
	ST-179 (7)	8512	Barcelona	W47 (2015)	
		179	Barcelona	W33 (2015)	
		220	Barcelona	W41 (2015)	
		2209	Barcelona	W34 (2015), W39 (2015), W46 (2015), W48 (2015), W49 (2015)	

Northern shoveler (1)	Singleton (1)	996	Ebro Delta	W02 (2008)
White storks (2)	ST-354 (2)	354	Lleida	W55 (2011), W56 (2011)

679

In review

680 **Table 3.** Geographical relation between ST-complex and sequence types (ST) among *C. jejuni* from caeca broilers.

Slaughterhouse (n)	ST-complex	ST	Year	Farm	Farm Location	Strain
A (8)	S	441	2011	ES44	Lleida	B44
	ST-21	21	2013	ES28	Lleida	B36
	ST-45	45	2013	ES3	Lleida	B31
		137	2012	ES41	Lleida	B42
	ST-353	5	2013	ES52	Lleida	B29
	ST-354	354	2013	ES52	Lleida	B45
	ST-607	904	2011	ES28	Lleida	B47
				2013	ES3	Lleida
B (6)	S	531	2013	ES138	Barcelona	B16
	ST-45	652	2013	ES138	Barcelona	B22
	ST-464	464	2013	ES129	Barcelona	B15
	ST-574	305	2015	ES129	Barcelona	B21
				2013	ES138	Barcelona
	ST-607	1707	2013	ES129	Barcelona	B24
C (6)	S	7114	2013	ES191	Barcelona	B39
	ST-283	267	2013	ES191	Barcelona	B33
	ST-353	5	2013	ES193	Barcelona	B28
		400	2013	ES193	Barcelona	B18
	ST-48	48	2011	ES193	Barcelona	B09
	ST-464	464	2011	ES191	Barcelona	B08
D (9)	S	1710	2013	ES125	Tarragona	B26
	S	1710	2013	ES128	Tarragona	B35
	ST-21	50	2012	ES116/ CAT5	Tarragona	B14/B50
		883	2013	ES116	Tarragona	B17
	ST-353	400	2013	ES116/ES115	Tarragona	B30/B40
	ST-354	8498	2013	ES125	Tarragona	B37
	ST-607	607	2013	ES128	Tarragona	B41

E (9)	S	1710	2011	ES84	Lleida	B10
	S	2331	2011	ES84	Lleida	B02
	ST-21	21	2013	ES84	Lleida	B20/B46
	ST-45	45	2013	ES85	Lleida	B27
	ST-257	2254	2012	ES202	Lleida	B13
	ST-353	356	2013	ES202	Lleida	B48
	ST-354	354	2013	ES84	Lleida	B23
	ST-607	7110	2012	CAT1	Lleida	B51
F (6)	ST-21	883	2011	ES156	Barcelona	B06
		50	2011	ES184	Tarragona	B07
	ST-206	46	2012	ES156	Barcelona	B49
	ST-353	400	2012	ES154	Lleida	B05
	ST-607	607	2011	ES147	Lleida	B04
		7110	2013	ES154	Lleida	B19
G* (6)	ST-257	367	2009	CT1/EU	Lleida	B57/B52, B53, B54, B55, B56

681 *, include the six strains belonging to clone 1 of PFGE pattern.

682 **FIGURE LEGENDS.**

683 **Figure 1.** Minimum spanning tree showing the distribution of the *C. jejuni* strains. A.
684 The number of STs shared among the three niches was represented by a Venn-diagram.
685 B. Minimum spanning tree (MST) of *C. jejuni* sequence types (ST) based on allele
686 numbers. Each circle corresponds to a ST, being its size proportional to the number of
687 strains within it. The ST of each strain as indicated in different color attending to the
688 origin of the strain: green for humans (H), red for broilers (B) and blue for wild birds
689 (W). The thickness and the dotting of the lines indicate the distance between STs. A
690 thicker line denotes closer distance than a thin line and a thin line denotes closer
691 distance than a dotted line. The ST-complexes including several STs are indicated in
692 dotted color lines. The MST analysis was carried out by BioNumerics v7.6.

693

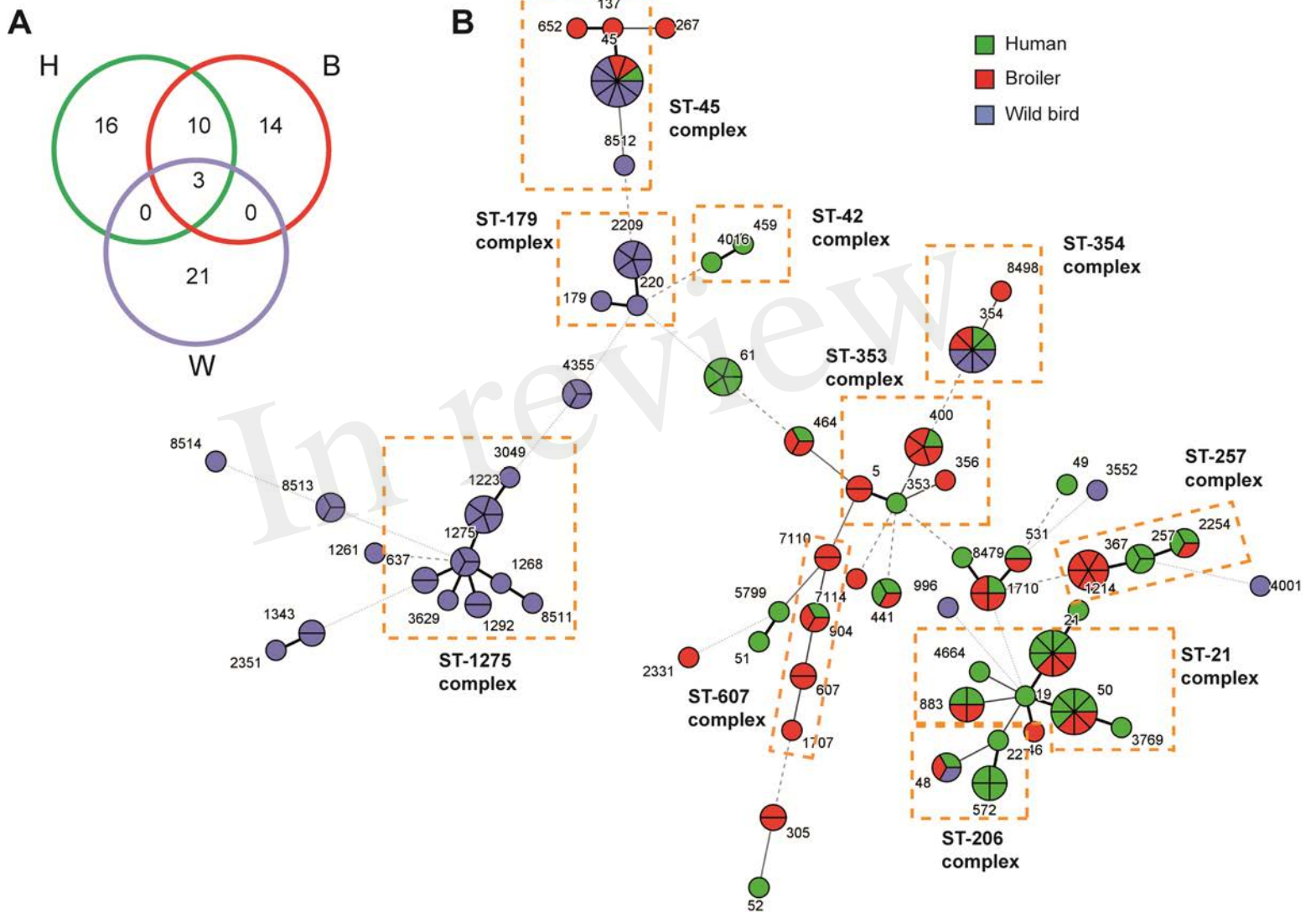
694 **Figure 2.** Antimicrobial resistance in *C. jejuni* studied strains. A. Absolute and relative
695 values of antimicrobial resistant in human (H), broiler (B) and wild bird (W) strains.
696 Antibiotic families (Q: quinolones and A: aminoglycosides) are indicated. All strains
697 were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, imipenem, erythromycin,
698 chloramphenicol and fosfomycin. B. Percentage of resistant strains to 0 to 4 families of
699 antibiotics. MDR indicates multidrug resistant strains. C. Antimicrobial resistance
700 profiles obtained. Asterisks indicate the MDR profiles. D. Percentage of the different
701 antimicrobial resistance profiles in each subgroup, as defined in C.

702

703 **Figure 3.** Virulence factors in *C. jejuni* studied strains. A. Absolute and relative values
704 of the virulence factors found in human (H), broiler (B) and wild bird (W) strains. B.
705 Virulence factors profiles obtained. C. Percentages of the different virulence factors
706 profiles in each subgroup, as defined in B.

707

Figure 1.TIF



A

Figure 2.TIF

Antimicrobial agent	H (%)	B (%)	W (%)	Total (%)
Tetracycline (TET)	44 (88)	48 (96)	15 (30)	107 (71.3)
Ciprofloxacin (CIP)	44 (88)	49 (98)	8 (16)	101 (67.3)
Nalidixic Acid (NAL)	39 (78)	49 (98)	9 (16)	97 (64.6)
Ampicillin (AMP)	40 (80)	37 (74)	18 (36)	95 (63.3)
Streptomycin (S)	2 (4)	7 (14)	2 (4)	11 (7.3)
Kanamycin (K)	3 (6)	2 (4)	2 (4)	7 (4.6)
Gentamicin (G)	1 (2)	0	0	1 (0.6)

Q

A

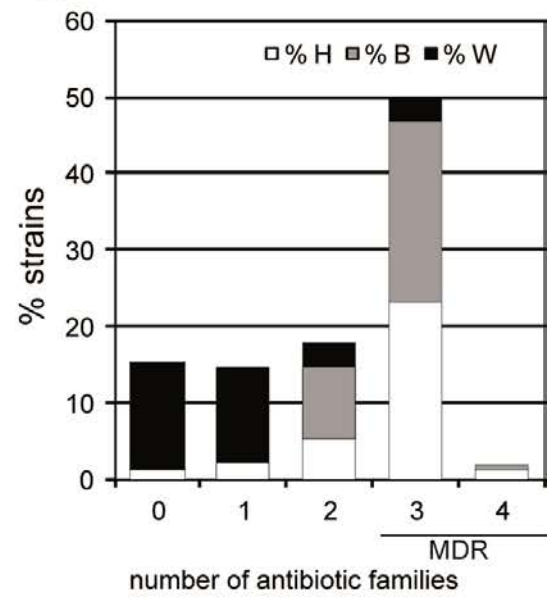
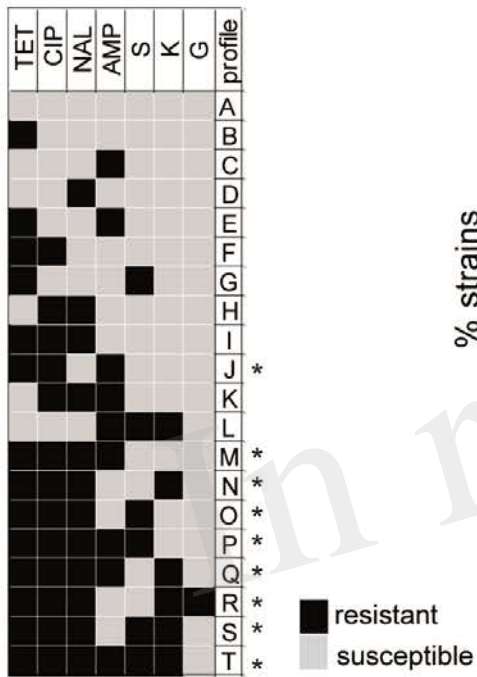
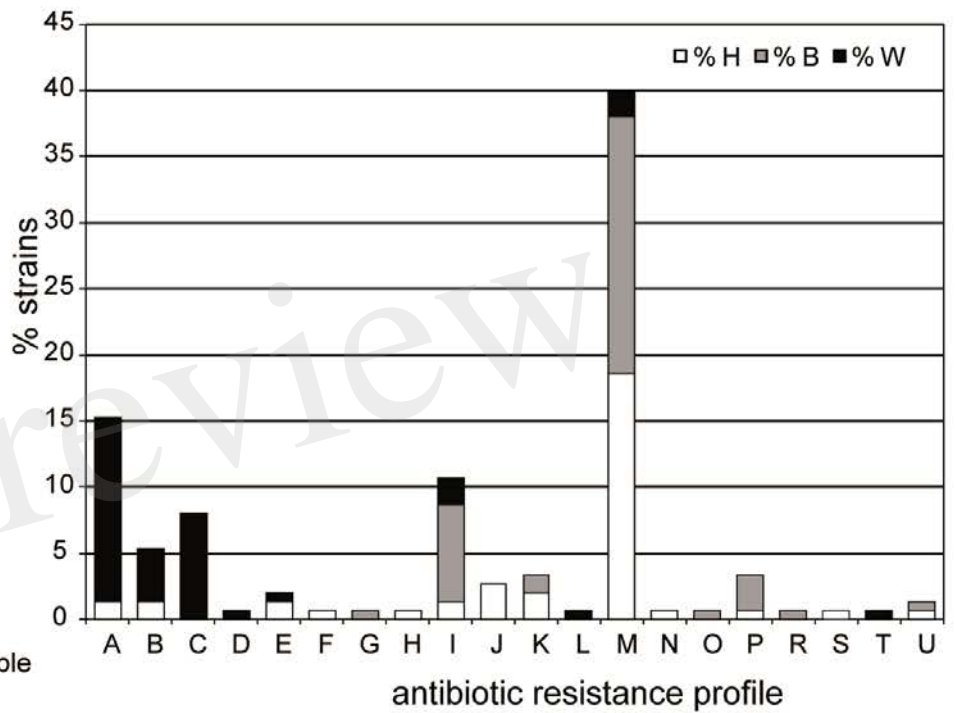
B**D****C**

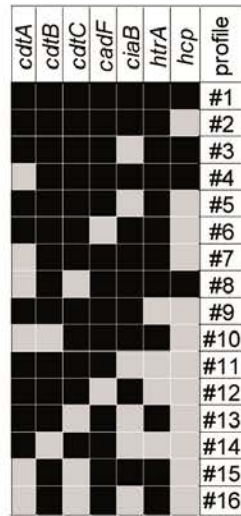
Figure 3.TIF

A

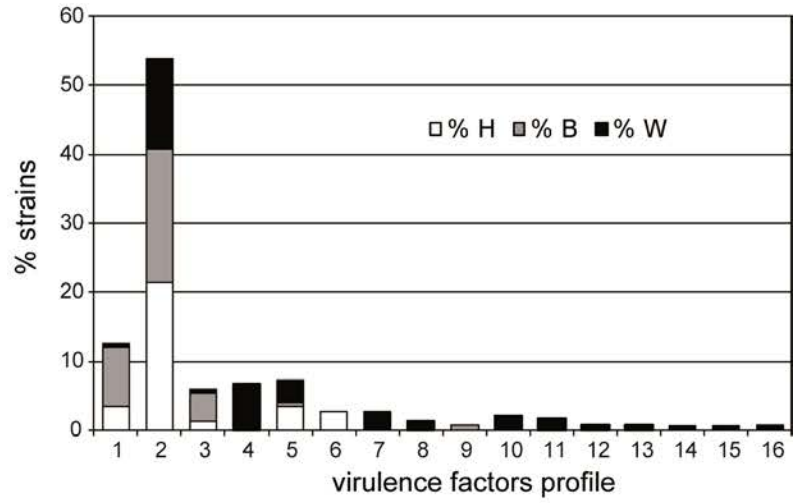
Gene	H (%)	B (%)	W (%)	Total (%)
<i>cdtA</i>	50 (100)	50 (100)	29 (58)	129 (86)
<i>cdtB</i>	50 (100)	50 (100)	46 (92)	146 (97.3)
<i>cdtC</i>	50 (100)	50 (100)	45 (90)	145 (96.7)
<i>cadF</i>	45 (90)	50 (100)	50 (100)	144 (96)
<i>ciaB</i>	42 (84)	43 (86)	41 (82)	126 (84)
<i>htrA</i>	48 (96)	49 (98)	49 (98)	146 (97.3)
<i>hcp</i>	7 (14)	19 (38)	14 (28)	40 (26.7)
<i>virB11</i>	1 (2)	1 (2)	0	2 (1.3)

positive
 negative

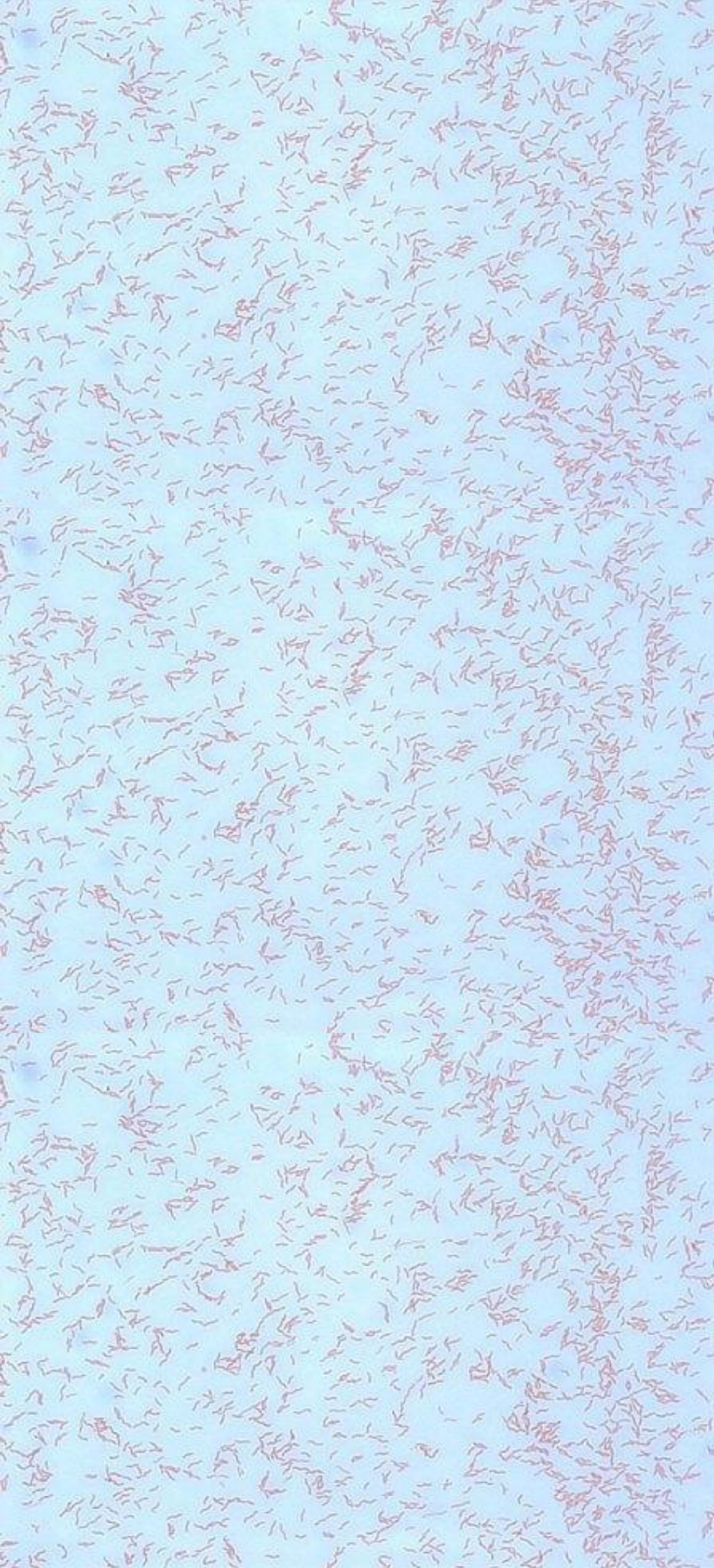
B



C



In review



UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**



**HOSPITAL DE LA
SANTA CREU I
SANT PAU**

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA