

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología-Microbiología

**Prevalencia de cápsulas polisacáridas de *Campylobacter jejuni*
aislados en una población de niños de una comunidad
rural de la amazonía peruana**

TESIS

Presentada por:

Bach. Jesús Daniel Rojas Rivero

Para optar el Título Profesional de:

Biólogo Microbiólogo

Tacna – Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE DE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS 283 TÍTULO PROFESIONAL: BIÓLOGO –
MICROBIÓLOGO

En la ciudad de Tacna, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 17:30 horas del día jueves 29 de septiembre del 2016, estando presente el jurado calificador nombrado por Resolución de Facultad N° 8574-2016-FACI-UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

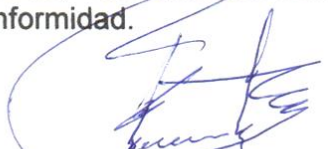
Mgr. Daladier Castillo Cotrina	Presidente
Dr. César Julio Cáceda Quiroz	Miembro
Mblgo. Luis Lloja Lozano	Secretario

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al artículo del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó al Bachiller Jesús Daniel Rojas Rivero, a exponer la tesis titulada: Prevalencia de cápsulas polisacáridas de *Campylobacter jejuni* aislados en una población de niños de una comunidad rural de la amazonía peruana.

Siendo las 18:10 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo al reglamento. El promedio de calificación dio el siguiente resultado: Aprobado con Felicitaciones y recomendación de publicación, tres votos a favor, con el calificativo de dieciocho (18) de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 18:50 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, a señal de conformidad.


Mr. Daladier Castillo Cotrina
Presidente


Dr. César Julio Cáceda Quiroz
Miembro


Mblgo. Luis Lloja Lozano
Secretario

DEDICATORIA

A Dios, gracias a él todo y mucho más es y será posible.

A mi padre, quien con su incondicional amor, paciencia, dedicación e incansable motivación y apoyo ha forjado en mí la persona que soy hoy en día. Gracias por tu gran ejemplo, sin tu apoyo este trabajo y muchos otros logros en mi vida no hubieran sido posibles.

A mi abuela, que fue como mi madre y que desde el cielo cuida de mí y mi familia.

A mi hermano, quien es y ha sido mi mejor amigo y motivo para crecer como ser humano y profesional.

A la Sra. Elizabeth Mamani Tenorio, quien desde un inicio ha mostrado incondicional amor y dedicación a mí y mi familia y que, indudablemente, sin su apoyo y soporte este y muchos otros logros, no hubieran sido posibles.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, Dr. César Ceballos Columbus, quien desde las aulas y fuera de ellas incentivó en mí realizar este trabajo y llevar a cabo diversos objetivos profesionales.

A mis profesores, quienes con sus enseñanzas han contribuido con mi formación personal.

A mis supervisoras en NAMRU-6, Blga. Rina Meza, Blga. Manuela Bernal y Lic. Gladys Núñez, quienes con su experiencia y amplios conocimientos han permitido que este trabajo sea posible.

A mis compañeros de trabajo en NAMRU-6, quienes con su experiencia y apoyo han contribuido en este trabajo.

A mi co – Asesor, Dr. Nathanael D. Reynolds, quien con su apoyo y motivación permitió que este trabajo sea llevado a cabo.

Al Dr. Frédéric Poly, quien ha guiado paso a paso el desarrollo del proyecto con su extenso conocimiento sobre el tema.

CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS.....	5
III. OBJETIVOS	5
A. Objetivo general.....	5
B. Objetivos específicos	5

IV. MARCO TEÓRICO.....	6
4.1 Breve historia de <i>Campylobacter jejuni</i>	6
4.2 Microbiología.....	8
4.3 Epidemiología	11
A. Epidemiología en países desarrollados.....	12
B. Epidemiología en países en vías de desarrollo	14
C. Patrones estacionales	17
4.4 Mecanismos de transmisión.....	18
4.5 Aspectos clínicos de la infección por <i>C. jejuni</i>	20
A. Dosis infecciosa	22
4.6 Técnicas de caracterización.....	23
A. Serotipificación según el esquema de Penner	24
4.7 Mecanismos de infección.....	26
A. Penetración de la lámina mucosa	28
B. Adherencia a las células del epitelio intestinal	30
C. Mecanismos de entrada en células eucarióticas	31
4.8 Cápsulas polisacáridas	34
A. Funciones	34
B. Tipos, genética y biosíntesis	35

C. Composición química.....	38
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
5.1 Población	43
5.2 Material biológico	43
5.3 Procedimiento	44
A. Cultivo y purificación de aislamientos de <i>C. jejuni</i>	44
B. Extracción de ADN.....	46
C. Confirmación de los cultivos	47
D. PCR para discriminación de especies	48
E. Tipificación capsular.....	53
F. Análisis estadístico.....	59
VI. RESULTADOS.....	60
6.1 Población	60
6.2 Material biológico	61
6.3 Tipificación capsular.....	61
6.4 Análisis estadístico.....	62
6.5 Análisis comparativo de tipos capsulares	66
VII. DISCUSIÓN.....	70

VIII. CONCLUSIONES.....	75
IX. RECOMENDACIONES	76
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABLAS

1.	Tabla 1.....	48
2.	Tabla 2.....	50
3.	Tabla 3.....	51
4.	Tabla 4.....	55
5.	Tabla 5.....	56
6.	Tabla 6.....	60
7.	Tabla 7.....	63
8.	Tabla 8.....	64
9.	Tabla 9.....	65
10.	Tabla 10.....	65
11.	Tabla 11.....	68
12.	Tabla 12.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

1. Gráfico 1	62
--------------------	----

RESUMEN

Campylobacter jejuni es uno de los principales agentes causales de diarrea a nivel mundial. A pesar de su gran importancia como patógeno el conocimiento sobre este microorganismo permanece aún muy limitado, sobre todo en países en vías de desarrollo. Las cápsulas polisacáridas (CPSs) de *C. jejuni* son el principal serodeterminante en el esquema de serotipificación desarrollado por Penner, así como un factor de virulencia clave para este patógeno. Además, se ha demostrado que una vacuna conjugada basada en CPS ofreció 100% de protección en un modelo animal primate no humano, *Aotus nancymae*. Por tanto, es de vital importancia determinar los tipos capsulares que circulan globalmente, sobre todo en países en vías de desarrollo. Con la finalidad de contribuir con este conocimiento se realizó un PCR múltiple que permite detectar el total de los 47 tipos capsulares en 290 aislamientos de *C. jejuni* en un estudio prospectivo de muestras provenientes de niños sintomáticos y asintomáticos de la comunidad rural de Santa Clara ubicada en Iquitos, Loreto. Las CPS más frecuentes fueron el HS15 (9,1%), complejo HS4 (9,1%) y complejo HS15 (13,4%) y el complejo HS4 (9.1%). Los resultados muestran que existe diferencias significativas entre la infección por

serotipos de *C. jejuni* entre niños sintomáticos y asintomáticos, sólo en el caso del complejo capsular HS3. Además, se observó una diferencia significativa en las infecciones por este patógeno entre niños y niñas, sólo en el tipo capsular HS15. Adicionalmente, existe una diferencia significativa en complejo HS3 en comparación con la prevalencia observada en el resto del mundo.

Palabras Clave: *Campylobacter jejuni*, Cápsulas polisacáridas (CPSs), factor de virulencia.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is one of the leading causes of diarrhea worldwide. Despite its importance, little is known about this pathogen, mainly in developing countries. Capsule polysaccharides (CPSs) of *Campylobacter jejuni* are the main serodeterminant according to Penner's scheme and a key virulence factor as well. Moreover, a CPS-conjugated vaccine has been shown to be 100% protective in a non-human primate model, *Aotus nancymae*. Thus, it is critical to determine the capsule types circulating globally, mostly those from developing nations. Moving forward in that direction, a multiplex PCR able to detect all 47 CPS types in 290 *Campylobacter jejuni* isolates in a prospective study from samples of symptomatic and asymptomatic children living Santa Clara, a rural community, located in Iquitos, Loreto. The most common CPS types were HS15 (9,1%), HS4 complex (9,1%) and HS3 complex (13,4%). Results show significant differences among those symptomatic and asymptomatic children in regards to Penner type HS3 complex solely. Moreover, a significant difference was observed in gender-related CPS type HS15. In addition to, a significant difference was observed for CPS types HS3 complex in contrast to worldwide CPS type prevalence.

Key words: *Campylobacter jejuni*, capsule polysaccharides (CPSs), virulence factor.

I. INTRODUCCIÓN

Campylobacter jejuni es la segunda mayor causa de diarrea a nivel mundial. En países en vías de desarrollo es la segunda causa, después de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés Enterotoxigenic *Escherichia coli*), de la diarrea del viajero. La infección ocurre debido al consumo de carne de aves de corral mal cocidas o consumo de agua contaminada. La población más vulnerable son niños menores de cinco años de edad de países en vías de desarrollo, por tanto, es crucial realizar estudios de vigilancia epidemiológica de este microorganismo utilizando diversas técnicas que permitan caracterizarlo de forma más rápida y apropiada.

C. jejuni no forma parte de la flora normal del ser humano, sino que es adquirido por diversas formas, principalmente por consumo de carne de aves de corral. Sin embargo, leche, agua y otros productos animales contaminados también son fuentes de infección por este patógeno.

Se han diseñado diversas técnicas de tipificación serológica, entre ellas el esquema de serotipificación pasiva de antígenos termolábiles de Lior y el esquema de serotipificación por hemaglutinación pasiva de antígenos

termoestables de Penner. No obstante, con el desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, se han diseñado técnicas que permiten caracterizar *C. jejuni* con mayor precisión y que a su vez permiten brindar datos más detallados de su epidemiología y distribución en la naturaleza.

Este microorganismo es nutricionalmente exigente, por lo que, las técnicas estándares de cultivo no son apropiadas. Desde su descubrimiento en 1975, se han desarrollado diversas técnicas que permiten cultivar, aislar y estudiar este complejo microorganismo. Sin embargo, hasta el momento ha sido pobremente caracterizado, principalmente debido a la falta de modelos animales que repliquen la enfermedad observada en humanos. Esto conlleva a que se hayan descubierto una cantidad limitada de factores de virulencia asociados a este patógeno y que, por ende, los mecanismos de infección en los humanos no se hayan caracterizado del todo.

Entre los factores de virulencia estudiados, se encuentra la cápsula polisacárida (CPS), una estructura especial en un patógeno entérico. Esta estructura interactúa directamente con el medio externo circundante al microorganismo. Se han atribuido diversos roles a esta estructura como adherencia, colonización, invasión, resistencia al suero, evasión y modulación de la respuesta del sistema inmune. La región genética responsable de la

síntesis de la cápsula comprende una de las áreas hipervariables del genoma de *C. jejuni*. Esta hipervariabilidad conlleva a un elevado número de tipos capsulares, en total 47, según el esquema de tipificación de Penner basado en antígenos capsulares termoestables.

El desarrollo de una vacuna conjugada con CPS, ensayada en un modelo primate no humano, *Aotus nancymae*, ha demostrado ser hasta 100% efectiva. No obstante, es necesario determinar los CPS que circulan en diversas regiones para determinar la valencia de una vacuna que ofrezca protección contra este enteropatógeno. Lamentablemente, debido a la complejidad del ensayo de Penner para ser llevado a cabo, la información referente a los tipos capsulares ha permanecido limitada a países industrializados que cuentan con sistemas apropiados de vigilancia y que es relativamente escasa en otras regiones con bajos recursos donde la infección por este microorganismo alcanza altos niveles.

Globalmente, se sabe que los tipos capsulares más frecuentes son el tipo capsular HS1/44, HS2 y el complejo capsular HS4; sólo estos serotipos juntos representan el 37% de las infecciones por *C. jejuni*. Las naciones desarrolladas son las que han provisto de mayor información epidemiológicas, mas son las naciones en vías de desarrollo las mayormente afectadas por este

patógeno. Mayores esfuerzos son requeridos en caracterizar a este microorganismo, sobre todo en aquellos países de alta endemicidad.

El presente trabajo hace uso de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase chain reaction) adaptada a partir del esquema de serotipificación capsular de Penner. La técnica fue aplicada a una cohorte de niños menores de 5 años en una comunidad de la Amazonía peruana. El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la distribución de los tipos capsulares de *C. jejuni* en países en vías de desarrollo como Perú.

II. HIPÓTESIS

La prevalencia los tipos capsulares más frecuentes encontrados en la comunidad rural de Santa Clara en la Amazonía peruana difiere a los tipos capsulares más prevalentes a nivel mundial, tipo capsular HS1/44, HS2 y el complejo capsular HS4.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Determinar la prevalencia de las cápsulas polisacáridas de *Campylobacter jejuni* aislados de una población de niños de una comunidad rural de la Amazonía peruana.

B. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de los tipos capsulares de *C. jejuni* en la población en estudio.
- Determinar las diferencias entre los tipos capsulares más frecuentes en países en vías de desarrollo y países desarrollados en comparación con los tipos capsulares encontrados en Perú.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Breve historia de *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni fue, muy probablemente, reportado por primera vez por Theodor Escherich en 1881 al describir organismos similares a *Vibrio* en heces de infantes que murieron de diarrea, o lo que el denominaba como “cholera infantum” (1). Años más tarde, McFadyean y Stockman (1) en 1906 reportaron el primer aislamiento de organismos espiralados relacionados a abortos en ganado. Más de una década después, en 1919, se describieron las características microbiológicas de aislamientos de *Vibrio fetus*, a las cuales, actualmente, se les atribuye a especies de *Campylobacter* (2). En 1957 King (3) reportó los primeros aislamientos de *Vibrio fetus* y “organismos relacionados a vibrios” a partir de muestras clínicas humanas. Sebald y Véron en 1963 (4) transfirieron 2 de estos “organismos relacionados a *Vibrio*”, *Vibrio fetus* y *Vibrio bubulus*, al género recientemente creado y denominándolos *Campylobacter fetus* y *Campylobacter bubulus*, respectivamente, basados en sus características microbiológicas, bioquímicas y en el contenido GC de ADN, además, se acuñó por primera vez el nombre “*Campylobacter*”, del griego “curvo” y “bacilo” (5). De acuerdo a una revisión realizada por Skirrow (1), no fue hasta la década de 1970 en que se relacionó por primera vez a este

microorganismo con diarrea en humanos, hecho podría ser atribuido a la dificultad de aislar a este microorganismo a partir de muestras fecales, a causa de la flora competitiva y el desarrollo de medios apropiados para su cultivo. El primer reporte del aislamiento de *Campylobacter* a partir de heces fue hecho por Dekeyser et al. (6), hasta entonces reportado como “organismos relacionados a vibrios”; se llevó a cabo utilizando filtros de 0,65 μm de porosidad, antibióticos para eliminar la flora competitiva, un medio enriquecido y una mezcla de gases que permitían el crecimiento favorable del microorganismo. No obstante, en 1973 Butzler et al. (7) definieron un medio para el aislamiento de *Campylobacter* y lo emplearon en un estudio con un número más elevado de pacientes, 1900 en total, obteniendo resultados significativos. El mismo año, Véron y Chatelain (8) propusieron transferir a *Vibrio fetus* y *Vibrio jejuni* al nuevo género *Campylobacter*, denominándolos *Campylobacter fetus* y *Campylobacter jejuni*. Algunos años después, Skirrow (9) reportó por primera vez la “nueva” enfermedad, enteritis causada por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Dos décadas después, Vandamme y De Ley (10) propusieron la creación de la familia *Campylobacteriaceae*, en base a sus características morfológicas, metabolismo y ADN, de esta manera diferenciándolo del género *Arcobacter*.

Desde entonces, el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y nuevos medios de cultivo para el género *Campylobacter* ha permitido el descubrimiento de nuevas especies, que hacen un total de 26 especies, 17 de ellas aisladas o reportadas en humanos (11).

4.2 Microbiología

Campylobacter jejuni es, en muchos aspectos, una bacteria bastante inusual al tratarse de un patógeno entérico humano. Sus características morfológicas, metabólicas y genéticas lo diferencian de los demás enteropatógenos. Estas particularidades conllevan a la utilización de técnicas especiales de cultivo y aislamiento de este microorganismo.

Campylobacter jejuni es un bacilo Gram negativo, espiralado con forma de coma o "S", tienen un tamaño aproximado de 0,2 a 0,8 μm de ancho y 0,5 a 5,0 μm de longitud (12). Este microorganismo no forma esporas, sin embargo, en cultivos viejos se puede observar formas esféricas o cocoides denominadas "viables no cultivables", aunque esta denominación actualmente se encuentra en discusión (13). Son microorganismos móviles, su movimiento característico es el de un "sacacorchos" gracias a la presencia de uno o dos flagelos polares. El flagelo de *C. jejuni* también es peculiar si lo comparamos con otros microorganismos, se encuentra compuesto de 7 y no 11 pares de

microfilamentos y, además de ello, ha evolucionado sus flagelinas de manera que escapan al reconocimiento por parte del receptor tipo Toll 5 (TLR5, del inglés Toll-like receptor) (14,15).

C. jejuni es una bacteria microaerófila capnófila, con metabolismo y respiración quimiorganotrofa. Su fuente de energía son los aminoácidos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, su maquinaria metabólica no les permite fermentar ni oxidar carbohidratos (12,16). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *C. jejuni* es capaz de utilizar la L-fucosa (17). Al tratarse de un comensal de aves de corral, la temperatura óptima de crecimiento es de 42°C, aunque también crece bien a 37°C. Se ha observado que a temperaturas menores a 37°C, pero superiores a 20°C, su metabolismo y velocidad de crecimiento disminuyen. No obstante, por debajo de 20°C, pero por sobre los 4°C, los microorganismos mueren progresivamente a medida que la temperatura se acerca a los 4°C, temperatura a la cual puede sobrevivir mayor cantidad de días (18,19).

La principal fuente de energía de *C. jejuni* son los aminoácidos, con cierta preferencia por serina, aspartato, glutamato, prolina, asparagina y glutamina, en ese orden preferencialmente (16,20). Este microorganismo cuenta con una maquinaria metabólica dirigida a la absorción y metabolismo de aminoácidos.

Además, esta maquinaria se encontraría relacionada con la virulencia. Particularmente, se ha propuesto que la enzima relacionada al metabolismo de la serina, un complejo hierro-azufre sensible al oxígeno, sería clave en la sensibilidad de *C. jejuni* al oxígeno (20). Determinados genes relacionados al transporte y metabolismo de aminoácidos, como leucina, isoleucina y valina, son utilizados diferencialmente por este microorganismo durante la colonización del tracto gastrointestinal humano (19).

Este patógeno entérico es microaerófilo y, a pesar de poseer un genoma relativamente pequeño (21), posee una cadena respiratoria compleja. *C. jejuni* es capaz de utilizar formiato, hidrógeno, lactato, succinato, gluconato y 2-oxiglutarato como donadores de electrones, los cuales utilizan menaquinonas para atravesar la cadena respiratoria hasta un aceptor final de electrones que puede incluir oxígeno, fumarato, nitrato y nitrito (19). No obstante, se ha demostrado experimentalmente sólo el transporte y metabolismo de lactato (20). Estos microorganismos no licúan la caseína, gelatina, tirosina ni el almidón. Típicamente son organismos oxidasa y catalasa positivas. No se observa actividad lipasa o lecitinasa (12). El contenido de G+C del genoma de *C. jejuni* es de aproximadamente 30%, mientras que su genoma tiene un tamaño aproximado de 1,6 megabases (21).

No existe un método “Gold standard” para el aislamiento de *C. jejuni*. Sin embargo, la utilización combinada de un ambiente microaerófilo de 5% oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno (16), un método de filtración y medios selectivos son una buena solución para su aislamiento (11). No obstante, estas técnicas permiten aislar especies de *Campylobacter* patógenos de humanos que, en mayor proporción, son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, por lo que se utiliza la prueba de hidrólisis del hipurato como técnica de diferenciación entre estas dos especies, en la cual *C. coli* es negativo (18). Si bien la mayor parte de aislamientos de *C. jejuni* son hipurato positivos, un estudio demostró que el 10% de estos microorganismos son hipurato negativos (22).

4.3 Epidemiología

Desde su descubrimiento oficial se han desarrollado diversas técnicas de aislamiento y enriquecimiento selectivo en medios que han permitido aislar a este patógeno entérico, lo que ha mostrado que este microorganismo es responsable de diarrea en humanos, más frecuentemente que especies de *Salmonella* o *Shigella* (23). De acuerdo a un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud, especies de *Campylobacter* son la segunda mayor causa de diarreas a nivel mundial, 96 millones de casos de diarrea, en

un estudio que comprende reportes y estudios realizados entre el 1990 y el 2012 (24).

A. Epidemiología en países desarrollados

Desde su descubrimiento en la década de los años 70, se observó un crecimiento constante en la detección de este patógeno entérico en muestras diarreicas, principalmente niños menores de 5 años, a pesar de los diversos mecanismos de control y los programas de vigilancia en estos países. Se observan dos picos principales de infección por este microorganismo: en menores de un año de edad y en adultos entre edades comprendidas de 15 a 44 años (23). En los Estados Unidos, *Campylobacter jejuni* representa el 9% del total de infecciones entéricas, superado sólo por Norovirus, especies de *Salmonella* no tifoidea y *Clostridium perfringens* (25); que sumado a otros patógenos entéricos tienen un costo aproximado de 10 a 83 billones de dólares anuales a la economía de ese país (26). En el mismo país, se ha incrementado en un 13% los casos de enfermedad por *C. jejuni*, además, por cada caso diagnosticado de infección por *C. jejuni*, existe un estimado de 30% de casos no diagnosticados, en comparación a los años comprendidos entre el 2006 y el 2008 (27). Sólo en Inglaterra y Wales se reportaron más de medio millón de casos entre el 2000 y 2012, incluyendo casos con enteritis y sin enteritis (28).

En la misma región, en un estudio que incluye datos comprendidos entre 1989 y 2011, con más de un millón de casos analizados, se observa un incremento de infecciones desde el 2004 (29). En el Reino Unido *C. jejuni* es la causa más común de infección por alimentos, siendo responsable de 321 000 infecciones en el Reino Unido y Wales en el 2008 (30). En Dinamarca, se observó un constante incremento, hasta cuadruplicar el número inicial de infecciones registradas, desde 1980 hasta el año 2004 (31). En Austria, se implementó el sistema de vigilancia para especies de *Campylobacter* desde 1996 y desde entonces se ha observado un incremento gradual del número de casos reportados hasta el 2007, esto en contraste al número decreciente de infecciones reportadas para patógenos como *Salmonella* (32).

A pesar del establecimiento de mecanismos de vigilancia y control en países desarrollados, en la última década se ha incrementado el número de casos detectados de patógenos entéricos (26), entre ellos *C. jejuni* y otras especies dentro del mismo género. Sin embargo, esto podría deberse a los mecanismos de detección mejorados a lo largo de los años de vigilancia y no necesariamente a un incremento del número de casos (33).

B. Epidemiología en países en vías de desarrollo

A pesar de la alta endemicidad de *C. jejuni* y otras especies del género *Campylobacter* en países en vías de desarrollo se observa una pobre y/o limitada vigilancia epidemiológica así como programas de prevención adecuados y pobres sin sistemas de sanidad apropiados. Estos factores antes mencionados sumados al hacinamiento, baja presencia del gobierno y los bajos ingresos económicos de la población susceptible colocan a *C. jejuni*, y otros patógenos igualmente importantes, entre los principales responsables de las más de 125 000 muertes anuales de niños causadas por infecciones transmitidas por alimentos (34). Las regiones más afectadas son las que se encuentran en el sur este asiático y África, no obstante, los países con ingresos económicos bajos a medianos-bajos en América también son endémicas de este microorganismo (34). Los casos registrados de infecciones por *C. jejuni* alcanzan cifras del 40 a 60% de la población afectada en estos países, siendo los niños menores de 5 años los más afectados (35). Sin embargo, debido a la escasa información epidemiológica en estas regiones, no es posible proveer información epidemiológica precisa, principalmente debido a los casos no reportados (36).

Se ha observado desde la década de los años 80 que en países en vías de desarrollo existe una inmunidad adquirida ante infecciones por *Campylobacter jejuni* después de los primeros años de vida y que el radio sintomatológico: asintomatológico decrecía después del segundo año de vida (37). La excreción de este patógeno por pacientes asintomáticos podría tener un impacto significativo en la transmisión del microorganismo en países en vías de desarrollo (36).

El continente africano es uno de los más afectados por las infecciones de este microorganismo. Por ejemplo, en un estudio caso-control de vigilancia realizado en el África sub-sahariana y en el sur de Asia por 3 años, se enroló más de 9000 niños menores de 5 años, en el estudio *Campylobacter jejuni* es reconocido como un importante agente causante de episodios de diarrea (38). En países de América del Sur, el panorama no es distinto. En poblaciones con estructuras de saneamiento limitadas se observa que los niños menores de 2 años son los principales afectados y la sintomatología se reduce con el incremento de los años, convirtiéndose así en portadores sanos (39). Es así que diversos estudios llevados a cabo muestran una alta frecuencia de casos de diarrea en niños menores de 5 años, entre ellos, un estudio caso-control realizado por Grados y Colaboradores (40) entre 1983 y 1986, determina que

los niños menores de 3 años son los más susceptibles y que la frecuencia de infección se reduce a mayor edad, lo cual sugiere una inmunidad ante este microorganismo.

En Perú la realidad es similar a los demás países en América del sur. En un estudio llevado a cabo en 1993 se concluye que los infantes menores a 1 año de vida son los principales afectados y que, debido al comportamiento estacional y las pobres condiciones higiénico sanitarias, *Campylobacter jejuni* es un organismo comensal de la región y se encontró como principal agente bacteriano causante de diarrea, seguido por especies de *Salmonella* y *Shigella* (41). En el 2000 se llevó a cabo un estudio de 55 familias en Pampas de San Juan de Miraflores, distrito de la ciudad de Lima. Se determinó que el género *Campylobacter* fue el más frecuente (19%) y que el 62% correspondían a la especie *C. jejuni*. Además, se encontró que los pacientes en estudio sufrieron un total de 0,44 episodios de diarrea por año, mientras que, dentro del mismo grupo, los niños menores de 36 meses de edad sufrieron 0,64 episodios por año, todas causadas por *C. jejuni* (42). Resultado similar al encontrado por Perales y colaboradores (43) en niños menores de 2 años en un distrito de la ciudad de Lima en el 2002. Kosek y colaboradores (44) realizaron una investigación sobre shigellosis en una comunidad de la Amazonía peruana, en

la cual encontraron como patógeno entérico más frecuente a especies de *Shigella* (34%), seguido de especies de *Campylobacter* (16%), solamente en pacientes sintomáticos con diarrea líquida. En un análisis posterior de los datos obtenidos por Kosek y colaboradores (44), Lee y colaboradores (45) encontraron que infecciones sintomáticas y asintomáticas estaban asociadas con una reducción significativa de peso y, solamente en casos sintomáticos, en una reducción significativa de crecimiento lineal. Adicionalmente, se encontró que los picos de infección de los pacientes en cuestión, estaban comprendidos entre los 0 y 36 meses de edad (45). Estos datos nos confirman lo observado en diversas regiones del mundo donde *Campylobacter* es endémico y se encuentra entre los principales patógenos entéricos (46).

C. Patrones estacionales

Aunque no se han realizado estudios intensivos específicos en este campo, diversos estudios muestran, entre sus datos analizados, un patrón relacionado a las estaciones, con picos en verano, en países como Inglaterra, Australia, Nueva Zelanda y Finlandia.

En una revisión sistemática de las infecciones entéricas y su relación con la temperatura medioambiental, con artículos publicados comprendidos entre los años 1960 y 2010, se observó que los picos más altos se encuentran en el

verano para especies de *Campylobacter* (47). En un estudio realizado por McCarthy y colaboradores (48) se observa un pico en el número de casos detectados en verano, comprendido entre junio y agosto en el Reino Unido, pero menos marcado en Australia y Nueva Zelandia. En Dinamarca se estableció una mayor probabilidad de infección en humanos cuando la temperatura semanal promedio oscilaba los 13°C y una humedad relativa elevada (49). Finalmente, en un estudio conducido en Finlandia, se encontró que los tipos clonales más comunes se presentaban con mayor frecuencia entre los meses de junio y agosto, temporada de verano en aquella región (50).

En general, se observa que los patrones de frecuencia de *C. jejuni* se relacionan con las estaciones del año, predominantemente en verano, en diversos países. Estos datos nos sugieren que se deben tener programas de prevención más adecuados a estas infecciones, que deben ser destinadas principalmente durante los meses de temperaturas elevadas (47).

4.4 Mecanismos de transmisión

La principal fuente de infección por *C. jejuni* es a través de contaminación cruzada de alimentos con este microorganismo. El principal reservorio de *C. jejuni*, y otras especies del género *Campylobacter*, son los pollos. Sin

embargo, el ganado vacuno, los cerdos, patos, pavos, entre otros animales de granja, son también una fuente significativa de contaminación (30).

La principal fuente de infección por *C. jejuni* es la carne de aves de corral, principalmente los pollos (30,51). Este microorganismo es comensal en las aves de corral, reside principalmente en la lámina mucosa de las criptas del ciego del pollo (51). Algunas aves se encuentran colonizadas con 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonia (ufc)/gramo de heces (52). La colonización del ave se produce debido a ciertos factores, entre ellos: edad de los animales, estación del año, transmisión horizontal y dosis infectiva. A nivel mundial se estima que entre el 60 a 80% de las carcasas de las aves se encuentran contaminadas con *C. jejuni* (51). Factores como las altas temperaturas, el agua del matadero, personal encargado del sacrificio de las aves, moscas, roedores y reservorios de agua contaminados contribuyen a la prevalencia del microorganismo en las aves (51). La contaminación de la carne se produce durante el sacrificio de las aves, el tracto intestinal del ave se rompe y libera el contenido que, finalmente, contamina la carcasa y la piel del ave (30).

Si bien los pollos son la principal fuente de infección por *C. jejuni*, existen otros animales que son fuentes de infección por este microorganismo, entre ellos tenemos: ganado vacuno, patos, cerdos, pavos, corderos, entre otros

(30). También se ha observado que leche fresca y reservorios de agua son fuente de infección de *C. jejuni*.

Con la finalidad de disminuir los casos de infección por *C. jejuni*, las medidas de control deben estar dirigidas en disminuir los niveles de infección en las aves. Sin embargo, la mejor forma de hacer esto no es muy clara debido a que la forma más usual de hacerlo es a través del uso de antibióticos, lo que genera a su vez otro problema, la resistencia a antibióticos del microorganismo (53).

4.5 Aspectos clínicos de la infección por *C. jejuni*

La Campylobacteriosis, término utilizado de forma general para describir las infecciones asociadas a especies pertenecientes al género *Campylobacter* (35), se caracteriza por presentar diarrea como sintomatología principal (23,54). Adicionalmente, existen otros síntomas post infecciosos, relacionados en su mayoría con desórdenes neurológicos o inflamatorios crónicos (55,56). Las personas más susceptibles a infecciones por *C. jejuni* son los niños menores de cinco años de edad (56). A mayor edad se observan menores infecciones sintomatológicas, sin embargo, es posible aislar estos microorganismos en pacientes asintomáticos, sobre todo en países en desarrollo, donde la infección es endémica (35).

El principal síntoma de una infección por *C. jejuni* es diarrea, que puede ser acuosa y/o sanguinolenta (55,56). Generalmente la diarrea producida por *C. jejuni* es indistinguible de la producida por otros patógenos como especies de *Salmonella* o *Shigella* (23), sin embargo, síntomas previos como astenia, dolor de cabeza y fiebre, síndrome prodrómico, son característicos de una infección por *C. jejuni* (54). La diarrea tiene una duración promedio de 5 a 7 días (11,57). Se ha reportado fiebre en más del 90% de los casos, la cual puede tener una duración de hasta una semana (23). La presencia de linfocitos en heces y niveles elevados de IL-8, una interleucina pro inflamatoria, son dos características centrales de la infección por *C. jejuni* (23).

Algo importante que resaltar son los síndromes posinfecciosos como Guillian-Barré (57,58), Miller-Fisher (59), artritis reumatoide de Reiter (59), síndrome del colon irritable (57,60) y, recientemente, reducción del crecimiento de niños (45). En una revisión sistemática de la secuela de los casos reportados asociados a una infección por *C. jejuni* se observa que existe un número significativo para las enfermedades antes mencionadas (59).

En países en vías de desarrollo se ha observado un número elevado de casos de diarrea sintomática, principalmente en niños menores de 5 años de edad, siendo los picos con mayores casos de infección antes de los 2 años de

edad (45,57). Se ha observado también que personas mayores no presentan infecciones sintomáticas. Esto demostraría una inmunidad adquirida ante infecciones repetidas por *C. jejuni*. En países desarrollados la realidad es distinta, esto se debe, principalmente, a los relativamente pocos casos reportados. Las personas más susceptibles son los niños menores de 5 años, sin embargo, los adultos jóvenes y mayores son también susceptibles al patógeno entérico (56,57). La enfermedad suele ser más severa y prolongada en países desarrollados en comparación a países en vías de desarrollo(35) y está, mayormente, restringida a adultos jóvenes (60), no obstante, la deshidratación es crítica en los países en vías de desarrollo, probablemente debido al pobre estado nutricional de los menores infectados (39).

A. Dosis infecciosa

Dosis tan bajas como 800 microorganismos parecen causar enfermedad, según un estudio conducido por 1988 en el cual al menos la mitad de los sujetos voluntarios padecieron la enfermedad (61). En otro estudio conducido por Robinson (62), quien reportó su propia infección, se establece como dosis infecciosa 500 células en 180 mL de leche. No obstante, en el estudio conducido por Black y colaboradores (61) se sugiere que dosis más elevadas de microorganismos son causantes menos frecuentes de infecciones. Sin

embargo, en un análisis de probabilidad de infección/enfermedad, las dosis bajas no muestra una fuerte relación con la ausencia de enfermedad y el hecho de que dosis altas sean menos infecciosas se aplicarían sólo en adultos pues niños menores de 5 años no tienen un sistema inmune desarrollado como para afrontar la enfermedad (63).

4.6 Técnicas de caracterización

Existen diversas técnicas para caracterizar a *C. jejuni*, entre las más utilizadas se encuentran las serológicas y las moleculares. Las técnicas más ampliamente utilizadas son la hemaglutinación pasiva de antígenos termoestables, desarrollada por Penner y colaboradores (64,65) y la antígenos termolábiles, desarrollada por Lior y colaboradores (66). Algunas técnicas moleculares han cobrado mayor relevancia gracias a la gran especificidad de datos generados, entre ellas tenemos a la genotipificación por PFGE (del inglés, Pulse field gel electrophoresis), RFLP (del inglés, Restriction fragment length polymorphism) y, mayormente utilizada, MLST (del inglés, Multi locus Sequence typing).

Las técnicas moleculares de caracterización han cobrado gran importancia en la epidemiología del microorganismo en los últimos años debido, principalmente, a su mayor precisión y eliminando la variable de

expresión génica. El PFGE ha sido estandarizado por el Centro de Control de Enfermedades (67) por su gran poder de discriminación entre aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* en brotes (67,68). Aunque el PFGE es considerado, generalmente, como el “Gold standard” en brotes, también han sido empleado el RFLP del gen *flaA* como una buena alternativa de caracterización genómica de *C. jejuni* en brotes (69). No obstante, la técnica más precisa de caracterización es el MLST que, actualmente, cuenta con una banco mundial de datos el cual puede ser utilizado con propósitos epidemiológicos (70), sin embargo, debido a su elevado costo y complejidad está restringida a ciertos laboratorios (69,71).

Debido a que el presente trabajo fue realizado en base a la técnica desarrollada por Penner y colaboradores (64,65), describiremos brevemente esta técnica.

A. Serotipificación según el esquema de Penner

La técnica de hemaglutinación pasiva de Penner (64,65) incluye 47 serotipos que pueden ser agrupados en 35, debido a reacciones cruzadas (72). La identificación de la cápsula como posible determinante antigénico fue realizada en el año 2000 gracias al secuenciamiento del primer genoma completo de *C. jejuni* (21), además, algunos estudios que utilizaron técnicas

genéticas, bioquímicas (73–75) y observación al microscopio electrónico de la cápsula (76).

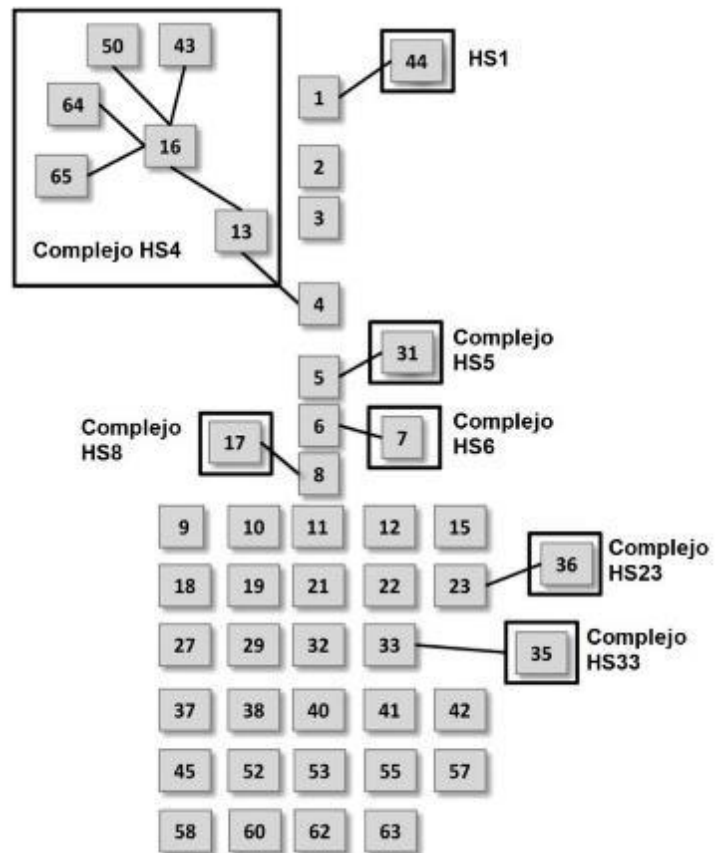


Figura 1. Ilustración de los 47 tipos capsulares agrupados en 35 complejos, según el esquema de serotificación de Penner. Modificado de Maue y colaboradores (77).

La técnica desarrollada por Penner a inicio de la década de 1980, consistía en una serie de reacciones serológicas por hemaglutinación pasiva sobre lámina de antígenos termoestables, que en adelante denominaremos HS (del inglés, Heat Stable) (64,65). Esta técnica permitía identificar 47 serotipos distintos. De acuerdo a sus reacciones cruzadas estos serotipos se pueden agrupar en complejos (Figura 1) (72,77). Por ejemplo, los serotipos HS23 y HS36 pueden presentar reacción cruzada y ser HS23/36 o solamente HS23 o solamente HS36 (78). El complejo HS4 es el tipo capsular que presenta mayor cantidad de reacciones cruzadas: HS4/13/16/43/50/64/65 (65,72,77) y además, es el más prevalente a nivel mundial (72). Entre otros serotipos con reacciones cruzadas tenemos: HS1/44, HS5/31, HS6/7, HS8/17 y HS33/35 (65,77,79).

4.7 Mecanismos de infección

Debido a la falta de buenos modelos de animales pequeños de experimentación, las diferencias entre la infección en aves y humanos no ha sido muy bien descrita (53). Sin embargo, se han utilizado diversas líneas celulares epiteliales entéricas humanas como Caco-2 (80), INT 407 (74), T84, COS-1 (81), E12 y HT29 (82) para estudiar los mecanismos de infección y factores de virulencia de *C. jejuni*. Los modelos de experimentación actuales

y el estudio de la genómica (21), proteómica (83) y transcriptómica (84,85) han permitido elucidar, al menos parcialmente, los mecanismos de variabilidad genética, variabilidad fenotípica, ausencia de islas de patogenicidad típicas, factores de virulencia y los mecanismos que este microorganismo emplea a lo largo del proceso infeccioso en humanos. Aunque los mecanismos precisos que causan la enfermedad aún no han sido del todo esclarecidos (53) se postulan dos mecanismos por los cuales *C. jejuni* causa diarrea: el primero sugiere que la adherencia del microorganismo seguido de la producción de toxinas que conllevan a la diarrea acuosa-sanguinolenta. El segundo mecanismo postula que la invasión de las células epiteliales y replicación dentro de las mismas, esto lleva a la producción de interleucinas pro inflamatorias y diarrea-sanguinolenta seguido de infiltración de células del sistema inmune (86).

Para establecer una infección, *C. jejuni* debe sobrevivir al pH ácido del estómago y colonizar el yeyuno e íleon. La infección se establecerá a medida que acidez del medio disminuya. Sin embargo, este microorganismo debe sobrepasar barreras mecánicas e inmunológicas y para ello ha desarrollado diversos mecanismos que le permiten lograrlo.

A. Penetración de la lámina mucosa

Los patógenos intestinales tienen como objetivo principal interactuar con las células epiteliales y para ello deben atravesar exitosamente la mucosa intestinal (82). La primera barrera a atravesar es la lámina mucosa, que usualmente se encuentra cubierta de un gran número de bacterias adheridas a ella. Para lograr dichos objetivos posee un repertorio de moléculas y estructuras que le permiten interactuar con las diferentes proteínas y glúcidos que se encuentran en la superficie del tracto gastrointestinal (87).

La mucina, cuyo componente principal es la mucina MUC2 en el intestino delgado de los humanos (82), es un fuerte quimio atrayente de *C. jejuni* que, en lugar de expulsarlo hacia el exterior del tracto intestinal, le permite moverse libremente a lo largo de las capas de lámina mucosa (88). Además, en estudios recientes se ha demostrado que la utilización de *L*-fucosa por parte de *C. jejuni*, único carbohidrato conocido metabolizado por este microorganismo (17), es liberado por la mucina y actúa como fuerte quimioatrayente (17) y que, junto con galactosa, son utilizados en colonizaciones prolongadas (89). La motilidad se debe a su forma espiralada y sobre todo a sus flagelos polares, además de la presencia de enzimas putativas degradadoras de mucina. Esta motilidad se ve incrementada en ambientes de alta viscosidad mientras que

disminuye en ambientes de baja viscosidad, el movimiento es recto y rápido seguido de algunas pausas, similar al movimiento que se observa en espiroquetas (90). Un estudio realizado en aves de corral demuestra que ciertos constituyentes de los alimentos de aves alteran la producción de mucina y que ello contribuye a una menor obtención de células de *C. jejuni* excretadas por estas aves, apoyando así el rol que cumple mucina en la colonización de estos animales (91).

A diferencia del tracto gastrointestinal de las aves, la unión de los epítopes bacterianos a los residuos glucosídicos de la mucina en el tracto gastrointestinal humano es lábil (82,92), lo que le permitiría al patógeno desplazarse rápidamente en dirección a la superficie epitelial (88) ante una viscosidad elevada (90). Además, se ha observado que cambios en la concentración y, por ende, en la unión de los epítopes bacterianos, tendrían un efecto sobre el comportamiento de *C. jejuni* como patógeno o comensal (93). Más aún, algunos estudios demuestran que la composición de la mucina y la interacción de esta con el patógeno es específica de especie y que, por lo tanto, define el rol de *C. jejuni* en cada organismo (82,92,94).

B. Adherencia a las células del epitelio intestinal

Después de haber penetrado la mucosa intestinal, *C. jejuni* entra en contacto con las células epiteliales del intestino. *C. jejuni* puede adherirse a las células superficiales gracias a diversas proteínas. Hasta el momento sólo se han logrado identificar 2 receptores celulares: la fibronectina (Fn) y la proteína de choque térmico 90 (HSP90, del inglés Heat-shock protein 90). Las proteínas CadF y FlpA muestran especificidad para HSP90 y JlpA afinidad para Fn (95).

JlpA es una proteína secretada que media la unión a las células HEp-2 mediante el receptor de superficie Hsp90. Así mismo, JlpA puede unirse a la proteína GSP del huésped e iniciar la translocación del factor de transcripción nuclear kappaB (NF-kappaB, del inglés Nuclear factor kappa B) y fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP-k, del inglés Mithogen-activated protein kinase) p38, lo que inicia una respuesta proinflamatoria en la célula infectada (87,95).

La fibronectina (Fn) puede unirse a diversas estructuras de la bacteria, sean proteínas o estructura de superficie celular. Entre las estructuras a las cuales puede unirse se encuentra el flagelo y a LOS, no obstante, el efecto que esta unión tiene es aún desconocido. La Fn también puede unirse a CadF,

una proteína secretada por *C. jejuni*, mediante un único motivo proteico de 4 residuos.

Se ha demostrado que la cápsula polisacárida cumple un rol esencial en la adherencia e invasión de células epiteliales humanas. El estudio de mutantes defectivos en la expresión capsular abrogó la adherencia y colonización del microorganismo en células humanas INT407 (74,96). Sin embargo se han realizado otros estudios que muestran resultados contradictorios en la función de la cápsula como molécula de adherencia en células Caco-2 (95). Se ha postulado que la expresión de la cápsula se encuentre regulada por factores intrínsecos del microorganismo dependiendo el microambiente en el que se encuentra, lo que permitiría una expresión diferencial de acuerdo al estado de la infección (97).

C. Mecanismos de entrada en células eucarióticas

Actualmente no se conocen los mecanismos precisos por los cuales *C. jejuni* ingresa a células epiteliales de la mucosa intestinal. No obstante, las recientes investigaciones nos permiten perfilar dos mecanismos distintos. El primer mecanismo, denominado “cremallera”, propone la utilización de diversas moléculas receptoras de superficie celular eucariota que interactúan con moléculas de superficie de la bacteria. El segundo mecanismo,

denominado “gatillo”, implica la utilización de los sistemas de secreción tipo III y IV (T3SS y T4SS, del inglés Type 3 secretion system y Type 4 secretion system) mediante los cuales se inyectan proteínas o se secuestran factores de la célula huésped que activan un mecanismo que atrapa a *C. jejuni*. Aunque el análisis genómico de *C. jejuni* no ha revelado T3SS o T4SS (87), el flagelo podría actuar como aparato secretor de proteínas de virulencia más que sólo como un aparato de locomoción (88).

La utilización de diversas cepas y líneas celulares para investigar el rol del flagelo en la invasividad e internalización de *C. jejuni* en células epiteliales humanas genera confusión, probablemente debido a diferencias entre las cepas utilizadas o en las técnicas utilizadas. Diversos estudios han demostrado que las células eucarióticas internalizan a *C. jejuni*. La mayor parte de los estudios de invasividad realizados fueron desarrollados mediante el uso de gentamicina. Muchos de estos ensayos realizados difieren en la forma que utilizan el recuento de las células internalizadas después de haber expuesto el cultivo al antibiótico, algo que podría influir significativamente en los resultados de conteo obtenidos.

Un factor clave en la invasión de células eucarióticas por parte de *C. jejuni* es la presencia de su flagelo funcional. Células de *C. jejuni* que carecen de flagelo mostraron una reducción en invasividad de células epiteliales (88).

Otro factor envuelto en la invasión es la proteína CsrA. Mutantes defectuosos en la expresión de esta proteína disminuyen en 5 veces su adherencia a células epiteliales INT407, un requisito indispensable para la invasión. Sin embargo, las células adheridas incrementaron en 20 veces su invasividad (98). Esto podría deberse a que CsrA es un regulador de otros factores relacionados directamente con factores de invasividad como la cápsula polisacárida (74).

La cápsula polisacárida también ha demostrado tener un rol importante en la invasividad. Ensayos realizados con *C. jejuni* 81-176 defectuosas en la expresión de la cápsula, en células epiteliales INT407, mostraron una reducción al 11% de invasividad, en comparación con el tipo silvestre (74). También se ha observado fenotipos hiperinvasivos de aislamientos de *C. jejuni* con genes ortólogos que, notablemente, se encontraron en la región de síntesis capsular (99).

4.8 Cápsulas polisacáridas

Las cápsulas polisacáridas bacterianas son la estructura en contacto inmediato con el medio en el que se encuentran estos microorganismos y por tanto cumplen diversas funciones. Su composición varía enormemente debido a su composición química variable y las múltiples decoraciones que posee. En relación a los genes que la codifican, las cápsulas bacterianas tienen un operón de biosíntesis, transporte y ensamblaje muy organizado que, de acuerdo al microorganismo en cuestión, varía en propiedades y características. En el específico caso de *C. jejuni*, la cápsula polisacárida es el principal serodeterminante del esquema de serotipificación de Penner (75).

A. Funciones

La presencia de cápsulas polisacáridas en bacterias es extensa en la naturaleza así como sus funciones. Entre las funciones principales tenemos a la protección ante la desecación, contribución a la formación de biopelículas, evasión del sistema inmune, adherencia a células epiteliales, entre otras.

Las CPS, al ser moléculas altamente hidratadas, debido su número elevado de residuos hidroxilo que interactúan con las moléculas de agua, contribuyen con la regulación del agua disponible para el microorganismo y su supervivencia (100).

Estudios recientes que evalúan el rol que cumplen los diversos polisacáridos que recubren la superficie del microorganismo en la formación de biopelículas, han demostrado que las CPS cumplen un rol significativo en este proceso. De esta forma, las CPS contribuirían con protección ante medio ambientes hostiles y el efecto tóxico del oxígeno en *C. jejuni* (101).

Entre otras funciones tenemos el rol que cumplen en conferir resistencia ante el suero y factores del complemento (102) evitando la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, del inglés Membrane attack complex) (103). En estudios de mutagénesis se observó niveles elevados de interleucina 17 en células de la lámina propia CD4⁺ (del inglés Cluster of differentiation 4) y estimulación de los TLR 2 y 4, sugiriendo una modulación de la respuesta inmune (104). Además, evitan la opsonización y consecuentemente la evasión de la fagocitosis (103).

B. Tipos, genética y biosíntesis

De acuerdo con la clasificación actual, basado en la organización genética de las CPS en *E. coli*, el operón biosintético tiene una organización mixta entre los grupos II y III de cápsulas polisacáridas (21,105). La organización típica se encuentra conformada por una región variable central biosintética, flanqueada por una región transporte y otra de ensamblaje de las

azúcares (Figura 2). Estos grupos capsulares se caracterizan por encontrarse unidos a una ancla fosfolipídica unida al residuo repetitivo mediante un enlace débil de la azúcar ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) (103,105,106).

Los genes encargados del transporte y ensamblaje de las azúcares del grupo II son *kpsFEDUCS...TM*. Mientras que la organización genética del grupo III es *kpsDMTE...CS* (97,105,106). Sin embargo, la organización genética del operón capsular de *C. jejuni* es *kpsMTEDF...CS*; una mezcla de los genes que conforman los grupos II y III (105). A diferencia del grupo II, en el grupo de genes de las CPS de *C. jejuni* no se observa *kpsU*, responsable de la síntesis de la CPM-Kdo sintetasa, además de la falta de termorregulación de la síntesis capsular por parte del gen *kpsU* (97,107) Sin embargo, ante la ausencia de un CPM-Kdo sintetasa en el operón biosintético, es posible que existan genes en otras regiones del cromosoma bacteriano que podrían cumplir esta función (97). La región interna es la región biosintética, contiene los genes responsable de definir los serotipos (97,103,105).

Las funciones de las proteínas codificadas por los genes responsables del transporte y ensamblaje de las azúcares han sido estudiadas desde la década pasada y haciendo referencia en las funciones de genes similares a

los encontrados en *C. jejuni* se puede proponer el siguiente modelo funcional de genes: La estructura que define el sistema de transporte ABC (ABC, del inglés ATP Binding Cassette) denominados, según la nomenclatura de *E. coli*, las proteínas KpsM y KpsT; mientras que las proteínas KpsE y KpsD formarían la proteína externa de exportación del polisacárido (OPX, del inglés Outer-membrane Polysaccharide export). Todas estas proteínas juntas, KpsMTED, formarían un complejo transmembranal (103,108,109). Una vez ensamblado en el citoplasma bacteriano, la estructura macromolecular sería translocada por una proteína transmembranal (KpsM) mediante la ayuda de una proteína que cataliza esta acción mediante la hidrólisis de un nucleótido (KpsT). Las proteínas KpsC y KpsS, de acuerdo a su secuencia nucleotídica, son proteínas citoplasmáticas que, según un modelo reciente, catalizan la unión del residuo repetitivo al ancla fosfolipídica mediante un residuo dipalmitoyl-glicerofosfato (110).

En relación a la expresión de las CPS, tanto en la región 1 y 2 del operón de transporte y ensamblaje capsular se encuentran regiones repetitivas de GC, estas regiones generan corridos del marco de lectura y por consiguiente la producción de estos productos afectarían la expresión capsular (74). No sólo eso, estas mismas regiones repetitivas se observan en el gen *dmhA*, un gen

encargado de la síntesis de una desoxiheptosa, que podría afectar los niveles de azúcares estructurales de la cápsula. Además, regiones repetitivas de GC también se han observado en genes requeridos para la síntesis del O-metil-fosforamidato, compuesto crítico estructural y determinante antigénico de la mayoría de las CPS (78), y que podría afectar los niveles estequiométricos de la cápsula. Este proceso de regulación de la expresión capsular podría verse influenciado selectivamente en el medio ambiente del patógeno pues le confiere ventajas selectivas ante el reconocimiento del sistema inmune en humanos (74,104).

C. Composición química

Inicialmente, las CPSs se describieron como moléculas polisacáridas de elevado peso molecular (HMW, del inglés High Molecular Weight) asociadas a lipopolisacáridas (LPS) (105). Estudios genéticos (73) y el secuenciamiento de *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (NCTC, del inglés National Collection of Type Cultures) (21) demostraron que se trataba de una cápsula polisacárida. Corcoran y colaboradores (110) demostraron que no se trataba de un LPS sino de una cápsula polisacárida unida a través de un ancla lipídica de dipalmitoyl-glicerofosfato con un residuo de fosfato que se une al azúcar (110). Se realizaron diversos estudios para determinar la composición química de las

cápsulas durante la primera década del 2000 (111,112) mediante la utilización de la Resonancia Magnética Nuclear (NMR, del inglés Nuclear Magnetic Resonance) unida a otras técnicas que permitieron definir de forma más precisa su composición.

Entre los primeros estudios en determinar la composición química de la cápsula fue Michael y colaboradores (113) que, mediante la NMR, determinó la composición química de la cepa NCTC 11168 serotipo HS2, cuya estructura polisacárida fue: β -D-Ribp, β -D-GalNAc, α -D-GlcPA6 (NGro), donde NGro es aminoglicerol, y un ácido urónico amidado con 2-amino-2-desoxiglicerol en el C-6 y 6-O-metil-D-glicero- α -L-gluco-heptopiranososa (6-MeHep), como ramificación de la estructura principal. Cabe destacar que los investigadores analizaron una estructura con variación de fase respecto a la presencia del 6-O-MeHep, debido a la composición nucleotídica del gen responsable de la modificación de la estructura.

Posteriormente, después del secuenciamiento de diversas cápsulas (114), se determinó la estructura química de HS1: $[-4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1-2)-(R)-Gro-(1-P)]_n$, donde Galp es galacto piranososa y Gro es glicerol, estructura similar al ácido teicoico, con ramificaciones de galactosas identificadas como β -D-fructofuranosas en los carbonos 2 y 3 que son sustituidos, de forma variable,

con $\text{CH}_3\text{OP}(\text{O})(\text{NH}_2)(\text{OR})$, que denominaremos en adelante O-metil-fosforamidato (MeOPN) (115). Estas sustituciones incrementan la complejidad de las cápsulas aún con un número limitado de genes (78,115). El mismo compuesto, MeOPN, ha sido encontrado en otras CPS de *C. jejuni*, alrededor del 65% (105). Además, también se determinó la composición química del serotipo HS19, con estructura similar al ácido hialurónico: $[-4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA6NGro-(1-3)-}\beta\text{-D-GlcNAc-(1-)]_n$, con ramificaciones variables de $\alpha\text{-L-sorbofuranosa}$ y MeOPN, en el carbono 2 y 4, respectivamente (116). Entre otros serotipos analizados químicamente se encuentran HS53 (117), el complejo HS4 (118) y el complejo HS23/36 (78).

Debido a los hallazgos antes mencionados es que McNally y colaboradores (78) decidieron investigar el rol que cumple el MeOPN en la CPS. Sorprendentemente se reveló que esta molécula, que se encuentra en cantidades no estequiométricas, juega un papel muy importante en la determinación del serotipo, particularmente en el serotipo HS23 y HS36. Los genes encargados de la transferencia de los grupos MeOPN a los carbonos C-3 y C-4 fueron *cj1421* y *cj1422*, respectivamente; confiriendo así los serotipos HS23 y HS36 (Figura 2) (78). La expresión variable de estos genes permite al microorganismo cambiar de serotipo o, una variación de fase,

durante el proceso infeccioso permitiendo así la evasión de la respuesta inmune (78,119).

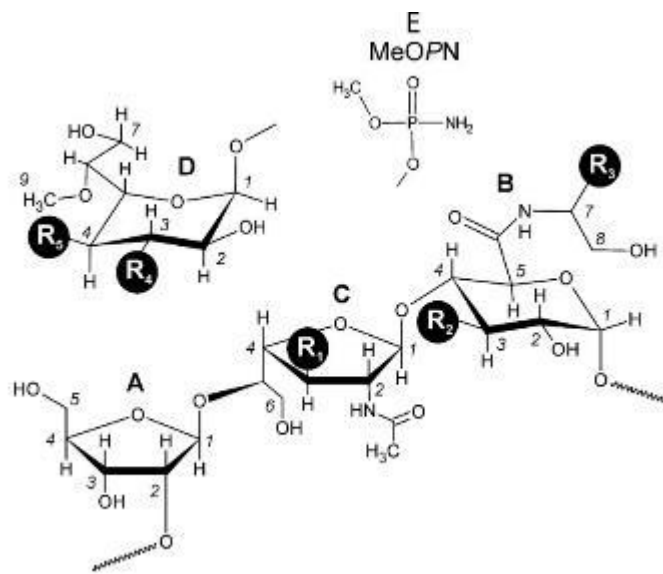


Figura 2. Estructura química de la cápsula polisacárida de *C. jejuni* con las modificaciones variables de MeOPN.

A: β -D-Ribf; B: α -D-GlcpA6 (NGro); C: β -D-GalNAc; D: D-glicero- α -L-gluco-heptopiranos y E: MeOPN. El MeOPN puede sustituir al radical hidroxilo (-OH) en R₁ y R₅. La heptopiranos puede sustituir al radical -OH en R₂.

Modificado de McNally y colaboradores (78).

Recientemente, se ha hecho diversos estudios para determinar el rol que cumple el MeOPN en la biología de *C. jejuni* (119). Uno de los estudios iniciales lo llevo a cabo McNally y colaboradores (78) quien observó su rol como determinante antigénico capsular y variabilidad de los niveles estequiométricos. Estudios recientes en mutantes de *C. jejuni* 81-176 muestran que el MeOPN también cumple un rol en la invasión de células epiteliales Caco-2 y en la resistencia al suero, sin embargo, no observaron diferencias en la colonización en comparación con microorganismo silvestres (119).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Población

El estudio del cual provienen las muestras fue realizado en la Comunidad de Santa Clara en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto, entre los años 2002-2006. En el presente estudio se analizó un total de 290 muestras. Los aislamientos de *Campylobacter jejuni* fueron obtenidos a partir de un estudio de vigilancia prospectivo, para lo cual se consideró 177 pacientes menores de 5 años y 11 meses de edad.

5.2 Material biológico

Para la realización del presente estudio se tomaron los aislamientos almacenados de *Campylobacter jejuni* obtenidos a partir del estudio realizado en la Comunidad de Santa Clara ubicado en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto. Los aislamientos que forman parte de este estudio fueron previamente purificados en agar CBA (del inglés, Columbia Blood Agar) suplementado con 5% de sangre de carnero e incubados en microaerofilia a 42°C por 48 a 72 horas. Además de ello, se observó al microscopio bacilos curvos Gram negativos y se utilizaron pruebas enzimáticas de oxidasa y catalasa. Para la diferenciación de especie se utilizó la prueba de hidrólisis del hipurato. Los aislamientos fueron preservados con las siguientes

denominaciones de género y especie (en caso corresponda): *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter spp.* Posteriormente, los aislamientos fueron almacenados en nitrógeno líquido, en medio Caldo tripticasa de soja (TSB, del inglés Trypticase Soy Broth) con 20% de glicerol.

5.3 Procedimiento

A. Cultivo y purificación de aislamientos de *C. jejuni*

Se tomaron los aislamientos previamente identificados de *Campylobacter jejuni* almacenados en tanques de nitrógeno líquido. Para el cultivo se tomó una azada del medio de preservación y se sembró sobre la superficie del medio de cultivo CBA suplementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero. Los cultivos fueron incubados de 48 a 72 horas a 42 °C, en condiciones de microaerofilia con una mezcla de gases de 5% O₂, 10% CO₂, y 85% N₂ en jarras gas-pak (120).

En algunos casos, las muestras se encontraban contaminadas con otros microorganismos. En tales casos se procedió a purificar las muestras mediante la técnica del filtro que consistió en colocar un disco de papel filtro de poro de 45 µm de diámetro, con la ayuda de una pinza estéril, sobre medio CBA sin antimicrobianos, luego se colocó 100 µL del medio de preservación sobre el

disco de papel filtro por 30 minutos. Posteriormente, con la ayuda de una pinza estéril, se retiró el disco de papel filtro y se incubó bajo las condiciones anteriormente descritas (120). Las colonias obtenidas son típicamente brillantes y de color gris, aspecto mucoso, convexas y de bordes definidos o irregulares. Luego de la incubación se observaron, en algunas placas, colonias puras típicas de *Campylobacter*, las cuales fueron sometidas a las pruebas moleculares correspondientes para la discriminación de género.

Con la finalidad de evitar perder muestras, en los casos en los que no se logró obtener colonias de especies de *Campylobacter*, se procedió a refrescar los aislamientos del enteropatógeno en el caldo de enriquecimiento Tioglicolato. El medio fue calentado por breves minutos para eliminar la mayor cantidad de oxígeno presente en el medio, luego se colocó el contenido completo del medio de preservación en el cual se encontraban los microorganismos. El tubo con el caldo de enriquecimiento se incubó, con la tapa ligeramente ajustada, bajo las condiciones anteriormente descritas. Después de la incubación se observó, en algunos casos, un anillo de turbidez color rojizo unos milímetros por debajo de la superficie del caldo, característica típica del crecimiento de especies de *Campylobacter* en el medio Tioglicolato. En estos casos se tomó 100 μ L del caldo correspondiente a la zona de

crecimiento del enteropatógeno en cuestión y se procedió a purificar mediante la técnica del filtro, anteriormente descrita y se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

B. Extracción de ADN

A partir de los cultivos obtenidos de colonias individuales se procedió con la extracción de ADN de acuerdo a protocolos estándares desarrollados en el laboratorio. Para ello, se tomó una asada del cultivo de *Campylobacter jejuni* con la ayuda de un asa bacteriológica estéril y se inoculó en un microtubo de 1,5 mL de capacidad, al cual se ha adicionado previamente 100 μ L de agua de PCR libre de endonucleasas. Una vez listo el inóculo se colocó el mismo en un bloque caliente a 100 °C por 10 minutos, luego se colocó en hielo por otros 10 minutos y finalmente se centrifugó a 14 000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 minutos en condiciones de refrigeración, 4 °C. Se separó el sobrenadante en otro microtubo con capacidad para 1,5 mL, se etiquetó apropiadamente y se preservó a -20 °C hasta su utilización (120).

El ADN fue ajustado a una concentración de 200 η g/ μ L con agua ultra pura, de grado de biología molecular. La medición se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Luego, se tomó 10 μ L de ADN extraído y

se colocó en otro microtubo, apropiadamente etiquetado. La muestra fue diluida con agua ultra pura de acuerdo a los cálculos obtenidos mediante la siguiente fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2^*$$

*C= Concentración, V= Volumen

En algunas ocasiones la cantidad de ADN obtenido se encontraba por debajo del óptimo requerido por lo cual se utilizó un equipo concentrador de ADN Bio-Rad. El procedimiento consistió en colocar el tubo que contiene la muestra con la tapa abierta dentro del equipo. Se programó al equipo para desecar la muestra por un tiempo aproximado de 60 minutos. Culminado el proceso, con el microtubo sin agua, se procedió a re-hidratar la muestra con la cantidad apropiada de agua de PCR hasta alcanzar la concentración adecuada de acuerdo a cálculo. El ADN ajustado fue almacenado a -20 °C hasta su posterior utilización (120).

C. Confirmación de los cultivos

Debido a que un 10% de los aislamientos de *C. jejuni* son hipurato negativos (22), y con la finalidad de asegurar que todos los aislamientos

obtenidos fueron *C. jejuni*, se procedió a realizar un PCR que permitió discriminar *C. jejuni* de *C. coli* mediante iniciadores para este uso específico (120).

D. PCR para discriminación de especies

La discriminación de especies (120) se realizó por PCR mediante el uso de iniciadores específicos para la identificación de *C. jejuni* y *C. coli* listados en la Tabla 1 (121).

Tabla 1.			
Iniciadores utilizados para el PCR (121).			
Especies blanco	Tamaño del producto	Secuencia del iniciador	
		Forward	Reverse
<i>C. coli</i>	364pb	AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC	TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC
<i>C. jejuni</i>	773pb	CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT	AAG ATA TGG CTC TAG CAA GAC

Preparación de la mezcla maestra

Este proceso se llevó a cabo en un ambiente acondicionado para este único procedimiento, denominado “cuarto limpio”, bajo las condiciones apropiadas en el interior de una cabina de bioseguridad: a) limpieza de la cabina y materiales a utilizar con lejía al 10% y b) irradiación con luz UV durante 15 minutos de la cabina de bioseguridad y los materiales a ser

utilizados. Se utilizó tubos de 0,2 mL, 0,5 mL y de 1,5 mL convenientemente de acuerdo al número de muestras que fueron procesadas por reacción. Los volúmenes precisos para una reacción de PCR se encuentran enlistados en la Tabla 2. Para determinar la cantidad de reactivo a utilizar se multiplicó las cantidades mencionadas en la Tabla 2 por el número de reacciones requeridas y se añadió 5 reacciones más: dos controles positivos, un control de reactivo, un control negativo y otra adicional como mezcla excedente, para evitar los errores de pipeteo. Se utilizaron como controles positivos cepas ATCC (del inglés, American Type Collection Culture). Como control negativo se utilizó ADN de *E. coli* DH5 α y agua para PCR como control de reactivo (120).

Una vez juntos los reactivos en el microtubo se mezclaron con ayuda de un Vortex por espacio aproximado de 15 segundos. Las gotas adheridas a la tapa del microtubo fueron recuperadas mediante un centrifugado de 30 segundos a máxima velocidad (este procedimiento lo denominaremos, en adelante, "spin"). La mezcla maestra fue repartida en volúmenes de 23 μ L en tubos de reacción de PCR, los cuales fueron posteriormente etiquetados de forma apropiada (120).

Todo el proceso de preparación de la mezcla maestra se debe llevar a cabo en condiciones de refrigeración, por lo que todo este proceso se realizó

en contenedores con hielo en su interior y el uso de soporte para microtubos congelado con indicador de temperatura por colorimetría.

Tabla 2.

Preparación de la mezcla maestra para el PCR, volúmenes utilizados para una reacción (120).

Reactivo	Volumen (µL)
Amplitaq Master Mix 360	11,0
Agua de PCR	8,0
Iniciador 364F (10 µM)	1,0
Iniciador 364R (10 µM)	1,0
Iniciador 773F (10 µM)	1,0
Iniciador 773R (10 µM)	1,0
Total	23,0

Reacción de PCR

El proceso de amplificación se llevó a cabo en otro ambiente separado, denominado “cuarto sucio”, acondicionado para diversos procesos sólo relacionados a biología molecular. El proceso completo se continúa llevando a cabo en condiciones de refrigeración. A cada tubo que contiene la mezcla maestra se añadió 2 µL de muestra de ADN, haciendo un total de 25 µL de mezcla (120). Los tubos con las mezclas respectivas se colocaron en un soporte y posteriormente en el termociclador Veriti, el cual fue previamente programado de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 3 (120).

Tabla 3.	
Configuración del Termociclador para el PCR (121).	
Nombre del ciclaje: <i>C. jejuni C. coli</i>	
Ciclo	Tiempo
95 °C	1 min
Paso 1	
94 °C	1 min
64 °C	1 min
72 °C	1 min
2 veces y retornar al paso 1	
Paso 2	
94 °C	1 min
64 °C	1 min
72 °C	1 min
2 veces y retornar al paso 2	
Paso 3	
94 °C	1 min
60 °C	1 min
72 °C	1 min
2 veces y retornar al paso 2	
Paso 4	
94 °C	1 min
58 °C	1 min
72 °C	1 min
2 veces y retornar al paso 4	
Paso 5	
94 °C	1 min
56 °C	1 min
72 °C	1 min
2 veces y retornar al paso 5	
Paso 6	
94 °C	1 min
54 °C	1 min
72 °C	1 min
30 veces y retornar al paso 6	
Paso 7	
72 °C	10 min
4°C	"Guardar"

Una vez finalizada la amplificación las muestras fueron analizadas mediante una electroforesis y/o almacenadas a -20 °C.

Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo utilizando agarosa ultrapura al 2,5%, disuelta en buffer TBE 1X (Tris-Borato EDTA). La tinción del gel para la observación de las bandas de ADN se realizó utilizando el colorante de DNA SYBR® safe, 15 µL por cada 100 mL de buffer. Para el procedimiento se utilizaron geles con dimensiones de 14 mm x 11 mm, longitud y ancho respectivamente, y 1 cm de grosor. Los peines utilizados para la preparación del gel fueron de 20 pocillos con un volumen de 20 µL cada uno. En cada pocillo se colocaron 8 µL de la mezcla y 2 µL de colorante de carga (120).

Para evitar contaminación cruzada de los pocillos que llevan el ADN se mantuvo el siguiente orden de las muestras: El primer y segundo pocillo correspondieron a los controles positivos; el tercer pocillo correspondió al marcador de peso molecular, que en este caso fue una escalera de ADN de 100 pares de bases; los siguientes pocillos correspondieron a las muestras en estudio; finalmente, luego de las muestras, se colocó el segundo marcador de peso molecular seguido de los controles negativos. Las condiciones de la

electroforesis fueron 110 V por 1 hora y 30 minutos. La cámara electroforética fue cubierta con papel aluminio debido a que el colorante de ADN es sensible a la luz. La lectura y análisis de las bandas de ADN se realizó con el digitalizador de imágenes Gel Doc XR 2000 a una absorbancia de 302 nm (120).

E. Tipificación capsular

En esta etapa del proceso se utilizó solamente el ADN de muestras que corresponden a *C. jejuni* confirmadas mediante PCR, en el procedimiento anteriormente descrito. Aquellas muestras que no fueron confirmadas como *C. jejuni* fueron excluidas del análisis. Asimismo, el procedimiento se realizó bajo las mismas condiciones de bioseguridad anteriormente descritas.

Preparación de la mezcla maestra

Para cada muestra a ser tipificada, se prepararon 4 mezclas maestras distintas: Mezcla alfa, beta, gama y delta (ver Tabla 4); de acuerdo a las concentraciones de reactivo a continuación descritas:

- 12,5 µL de Amplitaq Master Mix 360
- 1,0 µL de mezcla de cebadores (alfa, beta, gama o delta, según corresponda)

- 2,0 μ L de ADN genómico
- 9,5 μ L de Agua destilada ultra pura

De la misma forma que el caso anterior, se calculó la cantidad de reactivo de acuerdo al número de muestras procesadas. En cada reacción se incluyó un control negativo. Debido a que la mezcla maestra gama contiene un control interno no se incluyó un control positivo por reacción (120).

Reacción de PCR

Para esta reacción se utilizaron los cebadores α (alfa), β (beta), γ (gama) y δ (delta) provistos por el NMRC (del inglés, Naval Medical Research Center). El contenido de cada mezcla maestra así como el tamaño, en pares de bases, de los productos esperados se encuentran detallados en la Tabla 4 (79). Los iniciadores fueron resuspendidos en agua ultra pura libre de endonucleasas de acuerdo a las indicaciones del proveedor, que en este caso fue de 400 μ L en cada juego de cebadores. Hecho esto, se hicieron alícuotas y se repartió todo el contenido en tubos de 0,2 mL de volumen y se conservó en congelación.

Tabla 4.

Juego de cebadores distribuidos en 4 grupos de mezclas (79).

Mezcla Alfa	Tamaño en pb*	Tipo capsular reconocido	Mezcla Beta	Tamaño en pb*	Tipo capsular reconocido
Mu_HS2	62	HS2	Mu_HS1D	610	HS1 y HS1/44
Mu_HS3	149	Complejo HS3	Mu_8486	652	HS4 complejo B
Mu_HS4	370	HS4 complejo A	Mu_HS12	201	HS12
Mu_HS6	185	HS6 y HS7	Mu_HS17	342	HS8 y HS17
Mu_HS10	229	HS10	Mu_HS21	801	HS21
Mu_HS19	450	HS19	Mu_HS23	161	HS23 y HS36
Mu_HS15C	325	HS15	Mu_HS31	941	HS5 y HS31
Mu_HS41	279	HS41	Mu_HS42E	440	HS42
Mu_HS53	251	HS53	Mu_HS27A	280	HS27
Mu_HS63	520	HS63	Mu_HS57A	100	HS57
Mu_HS33A	819	HS33 y HS35			
Mezcla Gama	Tamaño en pb*	Tipo capsular reconocido	Mezcla Delta	Tamaño en pb*	Tipo capsular reconocido
Mu_HS22	216	HS22	Mu_HS11D	540	HS11
<i>lpxA</i>	331	<i>C. jejuni</i>	Mu_HS60A	240	HS60
Mu_HS37	510	HS37	Mu_HS32A	420	HS32
Mu_HS9	278	HS9	Mu_HS58C	89	HS58
Mu_HS18	653	HS18	Mu_HS40c	636	HS40
Mu_HS44	148	HS44	Mu_HS55B	355	HS55
Mu_HS45	128	HS45	Mu_HS52C	170	HS52
Mu_HS29	185	HS29	Mu_HS32B	740	HS32
Mu_HS18A	653	HS18			

*pb: Pares de bases

Los cebadores α , β , γ y δ identifican el tipo de cápsula codificada por un gen específico y único en cada tipo capsular y, mediante comparación del tamaño del producto de PCR obtenido con el marcador molecular de ADN de 100 pares de bases, se determinó a que tipo capsular corresponde cada banda obtenida (120).

La termociclador Veriti fue programado bajo las condiciones especificadas en la Tabla 5, a dicho programa se le denominó "Penner multiplex".

Tabla 5.	
Configuración del Termociclador para el PCR múltiple (79).	
Nombre del ciclo: Penner multiplex	
Ciclo	Tiempo
95 °C	5 min
Paso 1	
94 °C	40 seg
54 °C	30 seg
72 °C	45 seg
29 veces y retornar al paso 1	
Paso 2	
72 °C	2 min
4 °C	"Guardar"

Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo utilizando agarosa al 2,5 %, disuelta en buffer TBE 1X (Tris-Borato EDTA). La tinción del gel para la observación de las bandas de ADN fue realizada utilizando el colorante SYBR® safe. Los geles tuvieron las siguientes dimensiones: 14 mm x 11 mm, longitud y ancho respectivamente, y 1 cm de grosor. En cada pocillo se colocaron 8 µL de la mezcla y 2 µL de colorante de carga. Las condiciones de la electroforesis fueron de 100 V por 3 horas y 20 minutos. En cada corrido electroforético se utilizó un control negativo. La lectura y análisis de las bandas de ADN se realizó con el digitalizador de imágenes Gel Doc XR 2000 a una absorbancia de 302 nm. El análisis del gel se realizó por comparación del peso molecular de las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular de ADN. El control negativo no debe presentar bandas (120).

Interpretación de resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos se comparó la altura a la cual la banda se encontraba con el marcador de peso molecular de ADN de 100 pares de bases. Los resultados fueron categorizados de la siguiente forma:

- Tipificable: Presentó una o más bandas en cualquiera de las columnas correspondientes a cada mezcla maestra y se observa una banda de

331 pares de bases en la columna correspondiente a la mezcla gama, que corresponde a la especie *C. jejuni*.

- No tipificable: No se observó ninguna banda en las columnas correspondientes de las mezclas maestras, sin embargo se observó una banda de 331 pb en la columna correspondiente a la mezcla maestra gama.

Algunos de los tipos capsulares presentar reacción cruzada de acuerdo al PCR múltiple, estos son:

- Tipos capsulares HS5/15/31/45.
- Tipos capsulares HS4 complejo 4A y complejo 4B.

A pesar de que los tipos capsulares HS5/31 son indistinguibles mediante este método, también presentan reacción cruzada con los tipos HS15 y HS45, por lo que en el casos en los que se observó el tipo capsular HS5/31 y HS15 y/o HS45 en una misma muestra, se consideró al tipo capsular sólo como HS5/31, descartando los otros dos tipos capsulares.

En el particular caso del complejo capsular HS4, los complejos 4A y 4B, ambos fueron considerados como un único complejo denominado tipo capsular “Complejo HS4”, debido a que presentan reacciones cruzadas no distinguibles mediante ésta técnica (79).

F. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Stata v. 13.1, utilizando el “Análisis de mediciones repetidas”. Para tal análisis de consideraron las siguientes variables: Edad, género, tipo de cápsula y sintomatología.

Debido a que en las muestras consideradas dentro de la base de datos no se logró recuperar el total de aislamientos o que algunos aislamientos no fueron *C. jejuni*, estos aislamientos no fueron considerados para el análisis estadístico.

VI. RESULTADOS

6.1 Población

Del número total de pacientes considerados para el análisis, después del cultivo y PCR, la muestra se redujo a 111 pacientes de los cuales fueron consideradas sus muestras propicias para el análisis de tipificación capsular. Se obtuvo un total de 185 muestras tipificables, 82 aislamientos de *C. jejuni* provenientes de pacientes menores de 2 años de edad y 103 aislamientos de pacientes mayores a 2 años de edad y menores/iguales a 5 años y 10 meses (Tabla 6). Al tratarse de un estudio de vigilancia de una cohorte, 67 niños experimentaron de 2 a 6 infecciones repetidas por *C. jejuni* dentro de los cuatro años en que duró el estudio. Del total de las muestras consideradas para la tipificación capsular a partir de pacientes pediátricos, 57 corresponden a niños y 73 a niñas.

Tabla 6.	
Resumen de las muestras analizadas para el presente estudio y los resultados obtenidos.	
No cultivables	69
No <i>C. jejuni</i>	29
Sin resultado en PCR capsular múltiple	7
Total de aislamientos tipificados	185
Total de aislamientos	290

6.2 Material biológico

El total de muestras analizadas fue 290, de las cuales 29 aislamientos no fueron reconocidos mediante PCR como *Campylobacter jejuni* y 7 aislamientos no fueron tipificables o dieron algún tipo de reacción al gen *lpxA* mas sí al gen *glyA* mediante PCR. Además, no fue posible recuperar 69 aislamientos mediante técnicas microbiológicas estándares para *C. jejuni*, lo que significa un 70.9% de poder de análisis de muestras.

6.3 Tipificación capsular

Las muestras tipificadas fueron 185, en 15 muestras no fue posible reconocer algún tipo capsular mediante esta técnica, por lo que se les denominó “No tipificables”. El resto de muestras, 170 aislamientos, generaron 22 tipos de CPS distintas (Gráfico 1). Los tipos capsulares más frecuentes fueron el tipo capsular HS15 (9,1%), complejo HS4 (9,1%) y complejo HS3 (13,5%). Los valores obtenidos y sus respectivos porcentajes se encuentran en la Tabla 13.

6.4 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de riesgo relativo (RR) mediante el análisis de mediciones repetidas entre los tipos capsulares y sintomatología, edad y género de los pacientes de los cuales provienen las muestras. Debido al tamaño de las muestras sólo se analizó estadísticamente la relación entre los tipos capsulares más frecuentes: HS15, complejo HS3 y complejo HS4.

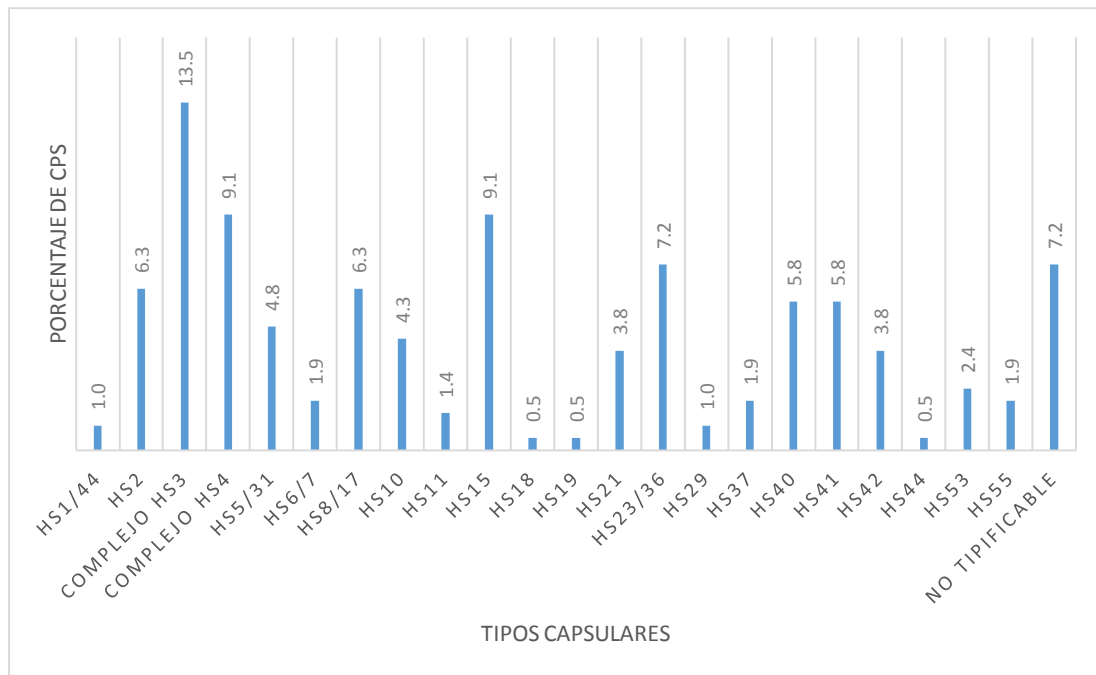


Gráfico 1: Frecuencia de tipos capsulares. Se observan 22 tipos capsulares de las 35 tipos de capsulares.

Los valores totales y sus respectivos porcentajes obtenidos en pacientes sintomáticos y asintomáticos se observan en la Tabla 11. En el caso del tipo capsular HS15, se encontró que el RR de ser infectado por *C. jejuni* con este tipo capsular es de 1,37 veces mayor en niñas comparado con los niños ($p=0,032$) ajustado por género (Tabla 7). Cabe resaltar que el complejo capsular HS3 se encuentra asociado a sintomatología; aquellos pacientes infectados por *C. jejuni* con este complejo capsular tienen 3,7 veces mayor riesgo de presentar diarrea en comparación con aquellos que fueron infectados con algún tipo capsular distinto (Tabla 10).

Tabla 7.

Análisis de mediciones repetidas del tipo capsular HS15.				
	RR	valor p	RR ajustado	valor p
Edad	1,02 (0,93 – 1,12)	0,655	1,06 (0,96 – 1,17)	0,257
Género		0,032		0,032
Femenino	1		1	
Masculino	0,37 (0,15 – 0,92)		0,37 (0,15 – 0,92)	
Sintomatología		0,737		0,851
No	1		1	
Sí	0,81 (0,24 -2,72)		0,90 (0,30 -2,69)	

En relación al complejo capsular HS4, el riesgo relativo de ser infectado por un organismo con este complejo capsular se incrementa en 74% a mayor edad del paciente en este estudio (Tabla 9). Sin embargo, también se realizó un análisis de RR que incluyó a todos tipos capsulares en conjunto. Se observó que el RR aumenta en 89% con la edad del paciente, similar a lo observado en el complejo HS4. No obstante, no se observan asociaciones significativas de RR por género ni sintomatología (Tabla 10).

Tabla 8.

Análisis de mediciones repetidas del complejo capsular HS3.				
	RR	valor p	RR ajustado	valor p
Edad	1,02 (0,93 – 1,12)	0,623	1,02 (0,93 – 1,13)	0,631
Género		0,151		0,217
Femenino	1		1	
Masculino	1,91 (0,79 – 4,62)		1,72 (0,73 – 4,05)	
Sintomatología		0,002		0,002
No	1		1	
Sí	3,66 (1,58 – 8,47)		3,66 (1,58 – 8,47)	

Tabla 9.				
Análisis de mediciones repetidas del complejo capsular HS4.				
	RR	valor p	RR ajustado	valor p
Edad	0,74 (0,57 – 0,95)	0,017	0,74 (0,57 – 0,95)	0,017
Género		0,859		0,859
Femenino	1		1	
Masculino	0,94 (0,48 – 1,83)		1,09 (0,58 – 2,03)	
Sintomatología		0,282		0,448
No	1		1	
Sí	1,37 (0,77 – 2,44)		1,27 (0,68 – 2,37)	

Tabla 10.				
Análisis de mediciones repetidas del total de tipos capsulares.				
	RR	valor p	RR ajustado	valor p
Edad	0,89 (0,82 – 0,96)	0,003	0,89 (0,83 – 0,97)	0,005
Género		0,023		0,096
Femenino	1		1	
Masculino	0,72 (0,54 – 0,96)		0,80 (0,62 – 1,03)	
Sintomatología		0,623		0,279
No	1		1	
Sí	1,13 (0,68 – 1,88)		1,27 (0,82 – 1,98)	

6.5 Análisis comparativo de tipos capsulares

Se realizó el análisis comparativo de los porcentajes obtenidos en la tipificación capsular de las muestras de pacientes pediátricos en la Amazonía peruana y porcentajes de los tipos capsulares en el resto del mundo, a excepción de América del Sur debido a que no se hallaron datos al respecto.

Para llevar a cabo este análisis se tomó en cuenta una publicación que realizó un análisis extenso sistemático de todos los estudios conducidos desde el desarrollo del serotipado de Penner hasta el 2012. Esta revisión sistemática tomó en cuenta sólo aquellos reportes publicados en revistas indizadas publicadas en idioma inglés. Para lograr tal objetivo, la búsqueda se realizó con los siguientes términos: “Campylobacter”, “Penner” y “Serotype”. Se excluyeron las revisiones y publicaciones que no sean en inglés. Los datos obtenidos se dividieron de acuerdo al estado económico de los países de los cuales se obtuvieron los datos en: Países desarrollados y países no desarrollados. Además, también se obtuvo un total global de los porcentajes de tipos capsulares, que incluye ambas economías. El estudio realizado consideró 21 394 muestras en total, de las cuales 1 222 muestras provienen de países en vías de desarrollo y 20 172 muestras provienen de países desarrollados (72).

El análisis comparativo entre los datos aquí obtenidos y las frecuencias capsulares en países en vías de desarrollo nos indica que solamente existe una diferencia significativa con el complejo capsular HS3 ($p > 0,006$) y una diferencia significativa marginal con el tipo capsular HS15 ($p > 0,107$) (Tabla 12).

Respecto a los países desarrollados, se observó que sólo existe una diferencia estadística significativa para el complejo capsular HS3 ($p > 0,001$) entre los porcentajes de países desarrollados y los porcentajes obtenidos en este estudio.

Además, en el análisis comparativo para determinar las diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes globales de los tipos capsulares y los porcentajes obtenidos en el presente estudio, se encontró que los tipos capsulares HS15 y el complejo capsular HS3 presentan una diferencia significativa ($p > 0,001$). Más aún, el tipo capsular HS23/36 presenta una diferencia significativa marginal ($p > 0,063$) con respecto a los porcentajes globales hallados (Tabla 12).

Tabla 11.

Comparación entre tipos capsulares y sintomatología en valores reales y porcentajes correspondientes.

Tipo capsular	Asintomáticos		Sintomáticos	
	Valor Real	Porcentaje	Valor Real	Porcentaje
HS10	2	2,9	2	1,4
HS2	0	0,0	13	9,3
Complejo HS3	12	17,6	16	11,4
Complejo HS4	4	5,9	15	10,7
HS5/31	5	7,4	5	3,6
HS6/7	2	2,9	2	1,4
HS8/17	5	7,4	8	5,7
HS10	0	0,0	7	5,0
HS11	1	1,5	2	1,4
HS15	6	8,8	13	9,3
HS18	1	1,5	0	0,0
HS19	0	0,0	1	0,7
HS21	1	1,5	7	5,0
HS23/36	7	10,3	8	5,7
HS29	1	1,5	1	0,7
HS37	3	4,4	1	0,7
HS40	3	4,4	9	6,4
HS41	1	1,5	11	7,9
HS42	5	7,4	3	2,1
HS44	0	0,0	1	0,7
HS53	1	1,5	4	2,9
HS55	3	4,4	1	0,7
No tipificable	5	7,4	10	7,1

Tabla 12.

Análisis comparativo entre los porcentajes hallados en el estudio y porcentajes globales.

Tipo capsular	Perú	PD*	Valor p	PnD**	Valor p	Global	Valor p
HS1/44	1,0%	9,0%	0,693	5,0%	0,795	8,2%	0,711
HS2	6,2%	16,5%	0,317	5,0%	0,843	13,5%	0,441
Complejo HS3	13,4%	2,1%	<0,001	3,7%	0,006	2,2%	<0,001
Complejo HS4	9,1%	17,5%	0,335	8,2%	0,886	15,3%	0,453
HS5/31	4,8%	2,6%	0,662	4,3%	0,938	2,9%	0,720
HS6/7	1,9%	2,9%	0,905	0,0%	n/a	2,4%	0,948
HS8/17	6,2%	2,8%	0,457	3,5%	0,596	2,8%	0,457
HS11	1,4%	3,5%	0,843	0,0%	n/a***	3,1%	0,865
HS15	9,1%	0,0%	n/a***	2,9%	0,107	1,1%	<0,001
HS23/36	7,7%	0,0%	n/a***	3,3%	0,325	1,7%	0,063
HS37	1,9%	0,0%	n/a***	0,0%	n/a***	1,8%	0,988
HS53	2,4%	0,0%	n/a***	2,9%	0,947	0,7%	0,648

*PD: Países desarrollados

**PnD: Países no desarrollados

***n/a: No aplica

VII. DISCUSIÓN

Las cápsulas polisacáridas de *C. jejuni* han ganado gran importancia como antígeno en el desarrollo de una vacuna que ofrezca protección ante este patógeno entérico (105). No obstante, la pobre información respecto a su distribución global, sobre todo en aquellos países donde es endémico, y su relación con la sintomatología clínica son, ambos, aspectos que faltan esclarecer (72,105). Responder estas preguntas es crucial para determinar la valencia de una vacuna en contra este patógeno (122). Debido a la complejidad y laboriosidad de la técnica de serotipificación de Penner, ciertos laboratorios de referencia en países desarrollados son los que han contribuido con la mayor parte de información colectada hasta el momento mas los países en vías de desarrollo son los más afectados por este microorganismo pero con información de pobre o mala calidad (24,72).

Se tipificaron un total de 185 aislamientos provenientes de una población con acceso limitado a condiciones sanitarias en una región rural de la Amazonía peruana, Santa Clara de Nanay, en el departamento de Loreto. Los datos obtenidos por el estudio aquí presentado muestran a los tipos capsulares HS15, complejo HS4 y complejo HS3 como los más prevalentes y, en su

conjunto, representan aproximadamente el 31% de los aislamientos. A nivel global, el complejo capsular HS4, el tipo capsular HS2 y el HS1/44 representan cerca al 40% de los aislamientos (72). Sin embargo, estos datos globales se ven fuertemente influenciados por la gran cantidad de datos generados en países desarrollados, principalmente la región europea, algo que, probablemente, no refleje la distribución capsular real en países en vías de desarrollo. Tomando en cuenta sólo los datos generados en países en vías de desarrollo, los tipos capsulares más frecuentes son el complejo HS4, tipo capsular HS2, HS1/44 y HS5/31 (72). Sorprendentemente, estos tipos capsulares sólo representan aproximadamente el 24% del total de aislamientos en estas regiones, su distribución es relativamente homogénea (72). Los datos aquí obtenidos se diferencian significativamente con los datos obtenidos en otras regiones del mundo, sorprendentemente, sólo con el complejo capsular HS3, ya sea en países desarrollados o países no desarrollados. También se observó que el tipo capsular HS15 sólo se diferencia significativamente en países en vías de desarrollo y en los porcentajes globales mas en países desarrollados no se observa diferencia significativa. Aunque nuestros datos no son concluyentes, debido, principalmente, al tamaño de la muestra y el modelo poblacional, se puede

observar diferencias interesantes respecto al complejo HS3 y el tipo capsular HS15. Además, cabe resaltar que se han considerado solamente aquellos estudios que hayan sido reportados en revistas indizadas, por lo que aquellos datos provenientes de países de América del Sur no han sido considerados para el análisis.

El análisis de RR permitió generar observaciones interesantes de resaltar. En primer lugar, el complejo HS3 fue el único tipo capsular con una asociación significativa a la enfermedad, ajustado por edad y género. Segundo, los tipos capsulares HS15 y el complejo HS4 se encuentran asociados a género y edad, respectivamente. Debido a que esta técnica es basada en detección de genes y no se su expresión fenotípica no es posible concluir que el tipo capsular se encuentre asociado a enfermedad, además, la presencia de otros patógenos en los niños conlleva a que la enfermedad sea un proceso, probablemente, multifactorial y no exclusivo de una patogenia causada por *C. jejuni* en específico. En relación a las variables como edad y género, no se han hecho observaciones en otros estudios en este aspecto y no es posible aún poder generar una explicación concreta al respecto.

Es importante resaltar que las condiciones de salubridad en la población de estudio son completamente distintas a las observadas en países

desarrollados (34,35,123) y que, por consiguiente, se esperaría encontrar valores de distribución capsular similares a países en vías de desarrollo debido a la poca accesibilidad a servicios sanitarios (123). Otro factor a considerar es la continua exposición desde los primeros años de vida a animales comensales de este microorganismo que explican el elevado número de infecciones (123). Estudios posteriores en distintas regiones, en condiciones sanitarias similares, podrían confirmar estos resultados y, con ello, fortalecer nuestro conocimiento sobre los principales tipos capsulares que afectan a la población y su rol con la enfermedad (35,39).

La tipificación capsular de *C. jejuni* realizada mediante esta técnica es más fácil de realizar y es independiente de la expresión fenotípica. La técnica de serotipificación desarrollada por Penner y colaboradores (64,65) al inicio de la década de los 80 ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de *C. jejuni*, sin embargo, su complejidad la ha limitado al uso, principalmente, en países desarrollados (72). Además, el descubrimiento de la cápsula polisacárida de *C. jejuni* como antígeno capaz de ofrecer protección ante las infecciones causadas por este microorganismo (124,125), ha generado, por consiguiente, que este factor de virulencia cobre mayor importancia en epidemiología (122). El presente estudio ha utilizado una modificación de esta

técnica, basada en detección de genes únicos a los tipos capsulares correspondientes, es independiente de la expresión de las cápsulas (79,126). En los estudios de serotipificación realizados anteriormente se encontró un 14% de aislamientos no tipificables (72) en comparación al 7% obtenido en este estudio. Los datos obtenidos en este estudio y otro estudio desarrollado en Estados Unidos (127) son prometedores debido a que nos demuestran que la realización de esta técnica no se ve afectada por la disponibilidad de los antisueros necesarios para su realización y dependencia de la expresión capsular y que podría utilizarse en diversos laboratorios de vigilancia epidemiológica, sobre todo, en aquellos países donde este microorganismo es endémico.

VIII. CONCLUSIONES

Se determinó que los tipos capsulares más frecuentes fueron el complejo capsular HS3 (13.4%), el tipo capsular HS15 (9.1%) y el complejo capsular HS4 (9.1%) en la población de estudio, sólo estos tipos capsulares juntos representan más del 31% del total de aislamientos analizados. El presente estudio encontró en total 22 tipos capsulares de los 35 probables en las muestras analizadas.

Se determinó que la prevalencia del complejo capsular HS3 presenta una diferencia estadística significativa con respecto a la prevalencia observada en países en vías de desarrollo, países desarrollados y, en general, la prevalencia mundial de este tipo capsular. Respecto a la prevalencia del tipo capsular HS15, se observó una diferencia significativa en relación a la prevalencia observada en países en vías de desarrollo y la prevalencia global de este tipo capsular. Sin embargo, la prevalencia del complejo capsular HS4 en nuestro estudio no muestra ninguna diferencia significativa con la prevalencia en países desarrollados, países en vías de desarrollo ni la prevalencia global de este tipo capsular.

IX. RECOMENDACIONES

Se observa una deficiencia crítica de conocimientos epidemiológicos en países en vías de desarrollo y, sobre todo, en países de América del Sur respecto a los tipos capsulares de *C. jejuni* y, en general, a este microorganismo. Por consiguiente, se recomienda realizar estudios caso-control de comunidades con pobre acceso sanitario y orientado, principalmente, a niños menores de 5 años de edad.

Con la finalidad de generar una vacuna protectora en contra la infección por *C. jejuni* es necesario determinar la valencia de la misma. Por tanto, se recomienda continuar con estudios de tipificación capsular de *C. jejuni* mediante la utilización de esta técnica molecular en diversas regiones del Perú y demás países de América del Sur.

No se tiene conocimiento sobre la estabilidad de los tipos capsulares a través del tiempo. Por esta razón, se recomienda realizar estudios de vigilancia que nos brinden información sobre la estabilidad temporal de los tipos capsulares de *C. jejuni*.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skirrow MB. John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. Clin Infect Dis. 1 de noviembre de 2006;43(9):1213–7.
2. Smith T, Taylor MS. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, N. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. J Exp Med. 1 de octubre de 1919;30(4):299–311.
3. King EO. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. The Journal of Infectious Diseases. 1957;101(2):119–28.
4. Sebald M, Veron M. Base DNA content and classification of vibrios. Ann Inst Pasteur (Paris). noviembre de 1963;105:897–910.
5. Etymologia: *Campylobacter*. Emerg Infect Dis. agosto de 2013;19(8):1313.
6. Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. J Infect Dis. 1 de abril de 1972;125(4):390–2.

7. Butzler JP, Dekeyser P, Detrain M, Dehaen F. Related vibrio in stools. *The Journal of Pediatrics*. 1 de marzo de 1973;82(3):493–5.
8. Véron M, Chatelain R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* sebald and véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1973;23(2):122–34.
9. Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *Br Med J*. 2 de julio de 1977;2(6078):9–11.
10. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, Campylobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1991;41(3):451–5.
11. Fitzgerald C. *Campylobacter*. *Clinics in Laboratory Medicine*. junio de 2015;35(2):289–98.
12. Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae. En: *Campylobacter*. Third Edition. Washington D.C.: ASM Press; 2008. p. 3–25.

13. Ikeda N, Karlyshev AV. Putative mechanisms and biological role of coccoid form formation in *Campylobacter jejuni*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. marzo de 2012;2(1):41–9.
14. Galkin VE, Yu X, Bielnicki J, Heuser J, Ewing CP, Guerry P, et al. Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*. 18 de abril de 2008;320(5874):382–5.
15. Gilbreath JJ, Cody WL, Merrell DS, Hendrixson DR. Change is good: Variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1 de marzo de 2011;75(1):84–132.
16. Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*. 29 de septiembre de 2014;4.
17. Stahl M, Friis LM, Nothaft H, Liu X, Li J, Szymanski CM, et al. I-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de abril de 2011;108(17):7194–9.
18. Jackson DN, Davis B, Tirado SM, Duggal M, Frankenhuyzen JK van, Deaville D, et al. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter*

jejuni under stress conditions. Antonie van Leeuwenhoek. 23 de septiembre de 2009;96(4):377–94.

19. Szymanski CM, Gaynor E. How a sugary bug gets through the day. Gut Microbes. 1 de marzo de 2012;3(2):135–44.

20. Stahl M, Butcher J, Stintzi A. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. Front Cell Infect Microbiol. 7 de febrero de 2012;2.

21. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature. 10 de febrero de 2000;403(6770):665–8.

22. Totten PA, Patton CM, Tenover FC, Barrett TJ, Stamm WE, Steigerwalt AG, et al. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. J Clin Microbiol. septiembre de 1987;25(9):1747–52.

23. Acheson D, Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 15 de abril de 2001;32(8):1201–6.

24. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, et al. World Health Organization estimates of the global

and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A Data Synthesis. PLOS Med. dic de 2015;12(12):e1001921.

25. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne Illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg Infect Dis. enero de 2011;17(1):7–15.

26. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? Nutrition Reviews. 1 de mayo de 2010;68(5):257–69.

27. National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases (U.S.). Division of Foodborne, Bacterial, and Mycotic Diseases. Food safety progress report for 2013 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2014 abr. Disponible en: <http://stacks.cdc.gov/view/cdc/22441>

28. *Campylobacter* cases: 2000 to 2012 - Publications - GOV.UK [Internet]. [citado 31 de enero de 2016]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/campylobacter-cases-2000-to-2012>

29. Nichols GL, Richardson JF, Sheppard SK, Lane C, Sarran C. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in

England and Wales between 1989 and 2011. *BMJ Open*. 1 de enero de 2012;2(4):e001179.

30. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter spp.* as a foodborne pathogen: A review. *Front Microbiol*. 27 de septiembre de 2011;2.

31. Engberg J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. A review of clinical and microbiological studies. *Dan Med Bull*. noviembre de 2006;53(4):361–89.

32. Feierl G, Jelovcan S. *Campylobacteriosis* in Austria: situation and trends. *Wien Klin Wochenschr*. febrero de 2009;121(3-4):103–7.

33. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. diciembre de 2011;8(12):669–85.

34. World Health Organization. WHO | WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths [Internet]. WHO. [citado 31 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>

35. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human Campylobacteriosis in developing countries¹. *Emerg Infect Dis.* marzo de 2002;8(3):237–43.
36. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* julio de 2015;28(3):687–720.
37. Calva J, Lopez-Vidal A, Ruiz-Palacios G, Ramos A, Bojalil R. Cohor study of intestinal infection with *Campylobacter* in mexican children. *The Lancet.* 5 de marzo de 1988;331(8584):503–6.
38. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 20 de julio de 2013;382(9888):209–22.
39. Fernández H. *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* marzo de 2011;28(1):121–7.

40. Grados O, Bravo N, Black RE, Butzler JP. Paediatric *Campylobacter* diarrhoea from household exposure to live chickens in Lima, Peru. Bull World Health Organ. 1988;66(3):369–74.

41. Murga H, Huicho L, Guevara G. Acute Diarrhoea and *Campylobacter* in peruvian children: a Clinical and Epidemiologic Approach. J Trop Pediatr. 1 de diciembre de 1993;39(6):338–41.

42. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Cordova J, Zimic M, Cabrera L, et al. An intervention-control study of corralling of free-ranging chickens to control campylobacter infections among children in a peruvian periurban shantytown. Am J Trop Med Hyg. 1 de junio de 2006;74(6):1054–9.

43. Perales M, Camiña M, Quiñones C. Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de diarrea aguda acuosa en niños menores de dos años en el distrito de La Victoria, Lima - Perú [Internet]. 2008 [citado 1 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/handle/123456789/919>

44. Kosek M, Yori PP, Pan WK, Olortegui MP, Gilman RH, Perez J, et al. Epidemiology of highly endemic multiply antibiotic-resistant shigellosis in

children in the peruvian amazon. *Pediatrics*. 1 de septiembre de 2008;122(3):e541–9.

45. Lee G, Pan W, Peñataro Yori P, Paredes Olortegui M, Tilley D, Gregory M, et al. Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 31 de enero de 2013;7(1).

46. Platts-Mills JA, Kosek M. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*. octubre de 2014;27(5):444–50.

47. Lal A, Hales S, French N, Baker MG. Seasonality in human zoonotic enteric diseases: A systematic review. *PLoS One*. 2 de abril de 2012;7(4).

48. McCarthy ND, Gillespie IA, Lawson AJ, Richardson J, Neal KR, Hawtin PR, et al. Molecular epidemiology of human *Campylobacter jejuni* shows association between seasonal and international patterns of disease. *Epidemiol Infect*. diciembre de 2012;140(12):2247–55.

49. Christiansen LE, Madsen H, Ethelberg S, Wegenerl HC, Wainø M, Patrick ME. Effects of climate on incidence of *Campylobacter spp.* in

humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7474–80.

50. Kovanen SM, Kivistö RI, Rossi M, Schott T, Kärkkäinen U-M, Tuuminen T, et al. Multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome MLST of *Campylobacter jejuni* isolates from human infections in three districts during a seasonal peak in Finland. *J Clin Microbiol*. diciembre de 2014;52(12):4147–54.

51. Hermans D, Pasmans F, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Rasschaert G, et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 1 de diciembre de 2011;12(2):89–98.

52. Hermans D, Van Deun K, Martel A, Van Immerseel F, Messens W, Heyndrickx M, et al. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*. 2011;42:82.

53. Young KT, Davis LM, DiRita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 1 de septiembre de 2007;5(9):665–79.

54. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. *Veterinary Research*. 2005;36(3):32.

55. Poly F, Guerry P. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Current Opinion in Gastroenterology*. enero de 2008;24(1):27–31.

56. Havelaar AH, Pelt W van, Ang CW, Wagenaar JA, Putten JPM van, Gross U, et al. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Critical Reviews in Microbiology*. 1 de febrero de 2009;35(1):1–22.

57. Zilbauer M, Dorrel N, Zilbauer M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;(102):123–9.

58. Nyati KK, Nyati R, Nyati KK, Nyati R. Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome: An update. *BioMed Research International*, *BioMed Research International*. 13 de agosto de 2013;2013, 2013:e852195.

59. Keithlin J, Sargeant J, Thomas MK, Fazil A. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health*. 2014;14:1203.

60. Phongsisay V. The immunobiology of *Campylobacter jejuni*: Innate immunity and autoimmune diseases. *Immunobiology*. abril de 2016;221(4):535–43.
61. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*. marzo de 1988;157(3):472–9.
62. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 16 de mayo de 1981;282(6276):1584.
63. Teunis P, Van den Brandhof W, Nauta M, Wagenaar J, Van den Kerkhof H, Van Pelt W. A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect*. agosto de 2005;133(4):583–92.
64. Penner JL, Hennessy JN. *Passive* hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol*. diciembre de 1980;12(6):732–7.
65. Penner JL, Hennessy JN, Congi RV. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur J, Clin Microbiol*. agosto de 1983;2(4):378–83.

66. Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J Clin Microbiol. mayo de 1982;15(5):761–8.
67. Serichantalergs O, Pootong P, Dalsgaard A, Bodhidatta L, Guerry P, Tribble DR, et al. PFGE, Lior serotype, and antimicrobial resistance patterns among *Campylobacter jejuni* isolated from travelers and US military personnel with acute diarrhea in Thailand, 1998-2003. Gut Pathog. 10 de noviembre de 2010;2:15.
68. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid Pulsed-Field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1 de mayo de 2001;39(5):1889–94.
69. Djordjevic SP, Unicomb LE, Adamson PJ, Mickan L, Rios R. Clonal Complexes of *Campylobacter jejuni* identified by Multilocus Sequence Typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. J Clin Microbiol. enero de 2007;45(1):102–8.
70. Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus Sequence Typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1 de enero de 2001;39(1):14–23.

71. Taboada EN, Clark CG, Sproston EL, Carrillo CD. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *Journal of Microbiological Methods*. octubre de 2013;95(1):24–31.
72. Pike BL, Guerry P, Poly F. Global Distribution of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes: A Systematic Review. *PLoS One*. 27 de junio de 2013;8(6).
73. Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Lastovica AJ, Wren BW. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Molecular Microbiology*. 1 de febrero de 2000;35(3):529–41.
74. Bacon DJ, Szymanski CM, Burr DH, Silver RP, Alm RA, Guerry P. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology*. 1 de mayo de 2001;40(3):769–77.
75. Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Lastovica AJ, Wren BW. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity: Genetics and biochemistry of *C. jejuni* LPS biosynthesis. *Molecular Microbiology*. 5 de abril de 2002;35(3):529–41.

76. Karlyshev AV, McCrossan MV, Wren BW. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Infect Immun.* septiembre de 2001;69(9):5921–4.
77. Maue AC, Poly F, Guerry P. A capsule conjugate vaccine approach to prevent diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 4 de junio de 2014;10(6):1499–504.
78. McNally DJ, Lamoureux MP, Karlyshev AV, Fiori LM, Li J, Thacker G, et al. Commonality and biosynthesis of the O-methyl phosphoramidate capsule modification in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem.* 28 de septiembre de 2007;282(39):28566–76.
79. Poly F, Serichantalergs O, Kuroiwa J, Pootong P, Mason C, Guerry P, et al. Updated *Campylobacter jejuni* capsule PCR multiplex typing system and its application to clinical isolates from South and Southeast Asia. *PLoS ONE.* 2 de diciembre de 2015;10(12):e0144349.
80. Bouwman LI, Niewold P, van Putten JPM. Basolateral Invasion and Trafficking of *Campylobacter jejuni* in polarized epithelial cells. *PLoS One.* 28 de enero de 2013;8(1).

81. Watson RO, Galán JE. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. PLoS Pathog. enero de 2008;4(1).
82. Naughton J, Duggan G, Bourke B, Clyne M. Interaction of microbes with mucus and mucins. Gut Microbes. 1 de enero de 2014;5(1):48–52.
83. Prokhorova TA, Nielsen PN, Petersen J, Kofoed T, Crawford JS, Morsczeck C, et al. Novel surface polypeptides of *Campylobacter jejuni* as traveller's diarrhoea vaccine candidates discovered by proteomics. Vaccine. 29 de septiembre de 2006;24(40–41):6446–55.
84. Chaudhuri RR, Yu L, Kanji A, Perkins TT, Gardner PP, Choudhary J, et al. Quantitative RNA-seq analysis of the *Campylobacter jejuni* transcriptome. Microbiology. octubre de 2011;157(Pt 10):2922–32.
85. Wright JA, Grant AJ, Hurd D, Harrison M, Guccione EJ, Kelly DJ, et al. Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. Microbiology. 1 de enero de 2009;155(1):80–94.

86. Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, Pelt W van, Wagenaar JA, Owen RJ. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. Clin Microbiol Rev. 1 de julio de 2008;21(3):505–18.
87. Ó Cróinín T, Backert S. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: Trigger or zipper mechanism? Front Cell Infect Microbiol. 5 de marzo de 2012;2.
88. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Trends in microbiology. 10 de enero de 2007;15(10):456–61.
89. Day CJ, Semchenko EA, Korolik V. Glycoconjugates play a key role in *Campylobacter jejuni* Infection: Interactions between host and pathogen. Front Cell Infect Microbiol. 14 de febrero de 2012;2.
90. Szymanski CM, King M, Haardt M, Armstrong GD. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. Infect Immun. noviembre de 1995;63(11):4295–300.
91. Fernandez* F, Sharma R, Hinton M, Bedford MR. Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. CMLS, Cell Mol Life Sci. noviembre de 2000;57(12):1793–801.

92. Naughton JA, Mariño K, Dolan B, Reid C, Gough R, Gallagher ME, et al. Divergent mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with mucus and mucins. *Infect Immun.* agosto de 2013;81(8):2838–50.
93. Lindén SK, Florin THJ, McGuckin MA. Mucin Dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS ONE.* 17 de diciembre de 2008;3(12).
94. Alemka A, Corcionivoschi N, Bourke B. Defense and Adaptation: The complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. *Front Cell Infect Microbiol.* 20 de febrero de 2012;2.
95. Rubinchik S, Seddon A, Karlyshev AV. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* marzo de 2012;2(1):32–40.
96. Bachtiar BM, Coloe PJ, Fry BN. Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium–host interactions. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 1 de febrero de 2007;49(1):149–54.

97. Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide. En: *Campylobacter*. Third Edition. Washington D.C.: ASM Press; 2008. p. 505–21.
98. Fields JA, Thompson SA. *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *J Bacteriol.* mayo de 2008;190(9):3411–6.
99. Baig A, McNally A, Dunn S, Paszkiewicz KH, Corander J, Manning G. Genetic import and phenotype specific alleles associated with hyper-invasion in *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics.* 24 de octubre de 2015;16.
100. Taylor CM, Roberts IS. Capsular polysaccharides and their role in virulence. En: Russell W, Herwald H, editores. *Contributions to Microbiology.* Basel: KARGER; 2004. p. 55–66.
101. Pascoe B, Méric G, Murray S, Yahara K, Mageiros L, Bowen R, et al. Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolve from divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. *Environ Microbiol.* 1 de noviembre de 2015;17(11):4779–89.

102. Keo T, Collins J, Kunwar P, Blaser MJ, Iovine NM. *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. *Virulence*. 2011;2(1):30–40.
103. Willis LM, Whitfield C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research*. 30 de agosto de 2013;378:35–44.
104. Maue AC, Mohawk KL, Giles DK, Poly F, Ewing CP, Jiao Y, et al. The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. *Infect Immun*. 1 de marzo de 2013;81(3):665–72.
105. Guerry P, Poly F, Riddle M, Maue AC, Chen Y-H, Monteiro MA. *Campylobacter* polysaccharide capsules: Virulence and vaccines. *Front Cell Infect Microbiol*. 15 de febrero de 2012;2.
106. Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 1996;50(1):285–315.
107. Stintzi A. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *J Bacteriol*. marzo de 2003;185(6):2009–16.

108. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Annual Review of Biochemistry. 2006;75(1):39–68.

109. Whitfield C. Structure and assembly of *Escherichia coli* capsules. EcoSal Plus [Internet]. 3 de diciembre de 2013 [citado 25 de enero de 2016];1(2). Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.4.7.3>

110. Corcoran AT, Annuk H, Moran AP. The structure of the lipid anchor of *Campylobacter jejuni* polysaccharide. FEMS Microbiology Letters. 1 de abril de 2006;257(2):228–35.

111. Szymanski CM, Michael FS, Jarrell HC, Li J, Gilbert M, Larocque S, et al. Detection of conserved N-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from *Campylobacter* cells by Mass Spectrometry and High Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. J Biol Chem. 4 de julio de 2003;278(27):24509–20.

112. Liu X, McNally DJ, Nothaft H, Szymanski CM, Brisson J-R, Li J. Mass spectrometry-based glycomics strategy for exploring n-linked

glycosylation in eukaryotes and bacteria. *Anal Chem.* 1 de septiembre de 2006;78(17):6081–7.

113. Michael FS, Szymanski CM, Li J, Chan KH, Khieu NH, Larocque S, et al. The structures of the lipooligosaccharide and capsule polysaccharide of *Campylobacter jejuni* genome sequenced strain NCTC 11168. *European Journal of Biochemistry.* 1 de noviembre de 2002;269(21):5119–36.

114. Karlyshev AV, Champion OL, Churcher C, Brisson J-R, Jarrell HC, Gilbert M, et al. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. *Molecular Microbiology.* 1 de enero de 2005;55(1):90–103.

115. McNally DJ, Jarrell HC, Li J, Khieu NH, Vinogradov E, Szymanski CM, et al. The HS:1 serostrain of *Campylobacter jejuni* has a complex teichoic acid-like capsular polysaccharide with nonstoichiometric fructofuranose branches and O-methyl phosphoramidate groups. *FEBS Journal.* 1 de septiembre de 2005;272(17):4407–22.

116. McNally DJ, Jarrell HC, Khieu NH, Li J, Vinogradov E, Whitfield DM, et al. The HS:19 serostrain of *Campylobacter jejuni* has a hyaluronic acid-

type capsular polysaccharide with a nonstoichiometric sorbose branch and O-methyl phosphoramidate group. FEBS Journal. 1 de septiembre de 2006;273(17):3975–89.

117. Gilbert M, Mandrell RE, Parker CT, Li J, Vinogradov E. Structural Analysis of the capsular polysaccharide from *Campylobacter jejuni* RM1221. ChemBioChem. 16 de abril de 2007;8(6):625–31.

118. Chen Y-H, Poly F, Pakulski Z, Guerry P, Monteiro MA. The chemical structure and genetic locus of *Campylobacter jejuni* CG8486 (serotype HS:4) capsular polysaccharide: the identification of 6-deoxy-d-idoheptopyranose. Carbohydrate Research. 5 de mayo de 2008;343(6):1034–40.

119. van Alphen LB, Wenzel CQ, Richards MR, Fodor C, Ashmus RA, Stahl M, et al. Biological roles of the O-Methyl phosphoramidate capsule modification in *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 30 de enero de 2014; 9(1).

120. Naval Medical Research Unit-6. Standard operational procedure. Naval Medical Research Unit-6.; 2012.

121. Kolínská R, Dřevínek M, Jakubů V, Žemličková H. Species identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by matrix-assisted

laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR. *Folia Microbiol.* 16 de diciembre de 2008;53(5):403–9.

122. Riddle MS, Guerry P. Status of vaccine research and development for *Campylobacter jejuni*. *Vaccine.* 2016;34(26):2903–6.

123. Yori PP, Lee G, Olórtegui MP, Chávez CB, Flores JT, Vasquez AO, et al. Santa Clara de Nanay: The MAL-ED Cohort in Peru. *Clin Infect Dis.* 1 de noviembre de 2014;59(suppl 4):S310–6.

124. Monteiro MA, Baqar S, Hall ER, Chen Y-H, Porter CK, Bentzel DE, et al. Capsule polysaccharide conjugate vaccine against diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* marzo de 2009;77(3):1128–36.

125. Bertolo L, Ewing CP, Maue A, Poly F, Guerry P, Monteiro MA. The design of a capsule polysaccharide conjugate vaccine against *Campylobacter jejuni* serotype HS15. *Carbohydrate Research.* 25 de enero de 2013;366:45–9.

126. Poly F, Serichatalergs O, Schulman M, Ju J, Cates CN, Kanipes M, et al. Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR ▽. *J Clin Microbiol.* mayo de 2011;49(5):1750–7.

127. Garrigan C, Ettela A, Poly F, Guerry P, Nachamkin I. Distribution of *Campylobacter jejuni* capsular types, 2007–2012, Philadelphia, PA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 de noviembre de 2014;80(3):204–6.



Bach. Jesus Daniel Rojas Rivero

TESISTA



Dr. Cesar Augusto Cevallos Columbus

ASESOR