



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Análisis de los tipos capsulares de *Campylobacter jejuni*
(Jones et al. 1931) Véron and Chatelain 1973, de una
comunidad amazónica y el pueblo joven costero de
Pampas de San Juan de Miraflores, en razón a las
frecuencias globales**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Jesús Daniel ROJAS RIVERO

ASESOR

Mg. Débora Elizabeth ALVARADO IPARRAGUIRRE

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rojas, J. (2020). *Análisis de los tipos capsulares de Campylobacter jejuni (Jones et al. 1931) Véron and Chatelain 1973, de una comunidad amazónica y el pueblo joven costero de Pampas de San Juan de Miraflores, en razón a las frecuencias globales.* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

| | |
|---|---|
| Código ORCID del autor | https://orcid.org/0000-0003-0912-490X |
| DNI o pasaporte del autor | DNI: 44072527 |
| Código ORCID del asesor | https://orcid.org/0000-0002-2191-1618 |
| DNI o pasaporte del asesor | DNI 07576929 |
| Grupo de investigación | Departamento de bacteriología, área de estudios clínicos. |
| Agencia financiadora | Estados Unidos U.S. Naval Medical Research and Development Command Work Unit 6000.RAD1. DA3.A0308. National Institutes of Health (NIH) K01-TW005717. Premio Fisher Center Discovery de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins. |
| Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación | United States Naval Medical Research Unit-6 (NAMRU-6), Bellavista, Callao, Perú. Coordenadas: 12°03'23.6"S 77°05'18.8"W -12.056543, -77.088566 |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación | 2012 - 2017 |
| Disciplinas OCDE | Biología celular, Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 |



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 193-UPG-FCB-2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 16:10 horas del día 12 de octubre de 2020 en el Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/cty-tnmr-btn, el Jurado de Tesis conformado por:

| | |
|--|--------------|
| Dr. Enrique Walter Mamani Zapana | (Presidente) |
| Mg. Asunción Alipio Cano Echevarría | (Miembro) |
| Mg. Fernando Abilio Merino Rafael | (Miembro) |
| Mg. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre | (Asesora) |

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **JESÚS DANIEL ROJAS RIVERO**.

Después de darse lectura al Expediente N° 193-UPG-FCB-20, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“Análisis de los tipos capsulares de *Campylobacter jejuni*. (Jones et al.1931) Véron and Chatelain 1973, de una comunidad amazónica y el Pueblo Joven costero de Pampas de San Juan de Miraflores, en razón a las frecuencias globales”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Excelente con la nota de diecinueve (19)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular al Bachiller **JESÚS DANIEL ROJAS RIVERO**.

Siendo las 17:40 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día lunes 12 del mes de octubre del año 2020.

.....
Dr. Enrique W. Mamani Zapana

Profesor Principal a D.E.

PRESIDENTE

emamaniz@unmsm.edu.pe

RENACYT P0000226

.....
Mg. Débora Alvarado Iparraguirre

Profesora Principal a D. E.

ASESORA

dalvaradoi@unmsm.edu.pe

RENACYT P0000427

.....
Mg. Asunción A. Cano Echevarría

Profesor Principal a D.E.

MIEMBRO

acano@unmsm.edu.pe

RENACYT P0002953

.....
Mg. Fernando A. Merino Rafael

Profesor Principal a T.C.

MIEMBRO

fmerinor@unmsm.edu.pe

RENACYT P0013439

CONTENIDO

| | |
|---|-------------------------------------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 <i>Campylobacter</i> | 3 |
| 2.2 Microbiología | 3 |
| 2.3 Capsulas polisacáridas | 6 |
| 2.4 Descubrimiento de la cápsula polisacárida de <i>C. jejuni</i> | 6 |
| 2.5 Funciones de las CPS | 8 |
| 2.6 Tipos, genética y biosíntesis | 9 |
| 2.7 Composición química | 11 |
| 2.8 O-metil-fosforamidato (MeOPN) | 17 |
| 2.9 Tipificación capsular de <i>C. jejuni</i> mediante PCR múltiple | 18 |
| 2.10 Problema de la investigación | 20 |
| 2.11 Importancia del estudio | 22 |
| III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Hipótesis | 23 |
| 3.2 Objetivos | Error! Bookmark not defined. |
| A. Objetivo general | 23 |
| B. Objetivos específicos | 23 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 4.1 Población | 24 |
| 4.2 Pampas de San Juan de Miraflores, Lima | 24 |
| 4.3 Criterios de selección y definición de caso | 24 |
| 4.4 Recolección, transporte y procesamiento de muestras | 25 |
| 4.5 Comunidad rural Santa Clara de Nanay, Loreto | 25 |
| 4.6 Criterios de selección y definición de caso | 25 |
| 4.7 Recolección, transporte y procesamiento de muestras | 26 |
| 4.8 Muestra | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9 Cultivo y confirmación de especie | 28 |
| 4.10 Cultivo | 28 |
| 4.11 Extracción de ADN | 28 |
| 4.12 Identificación y confirmación de especie | 29 |
| 4.13 Tipificación capsular | 30 |
| 4.14 Electroforesis y determinación del tipo capsular | 31 |
| 4.15 Análisis demográfico y estadístico | 32 |
| 4.16 Análisis de frecuencias y diferencia de proporciones | 32 |
| 4.17 Análisis de riesgos relativos | 33 |
| V. RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Identificación molecular | 37 |
| 5.2 Distribución de los tipos capsulares | 37 |
| 5.3 Análisis de RR | 40 |
| 5.4 Reinfecciones y tipos capsulares | 42 |
| 5.5 Análisis comparativo porcentual entre Perú y el resto del mundo | 43 |
| VI. DISCUSIÓN | 45 |
| VII. CONCLUSIONES | 52 |
| VIII. RECOMENDACIONES | 53 |
| IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |
| X. ANEXOS | 65 |
| 10.1 Tablas suplementarias. | 65 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características fenotípicas de <i>C. jejuni</i> basadas en Levin (2007). | 5 |
| Tabla 2. Reactivos y volúmenes empleados en el PCR, volúmenes empleados en una reacción. | 29 |
| Tabla 3. Protocolo de amplificación del gen <i>glyA</i> para la identificación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> mediante PCR. | 30 |
| Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados en el PCR, volúmenes utilizados para una reacción. | 30 |
| Tabla 5. Juego de primers, tamaño (en pb) y tipo capsular reconocido de los cuatro grupos de mezclas empleados: Alfa, beta, gamma y delta. | 35 |
| Tabla 6. Protocolo de amplificación para el PCR múltiple de tipificación capsular. | 36 |
| Tabla 12. Análisis de diferencia de proporciones entre las frecuencias absolutas (Pampas de San Juan y Santa Clara de Nanay) y frecuencias acumuladas (Perú) en función a las frecuencias absolutas en países desarrollados. | 44 |
| Tabla 13. Análisis de diferencia de proporciones entre las frecuencias absolutas (Pampas de San Juan y Santa Clara de Nanay) y frecuencias acumuladas (Perú) en función a las frecuencias absolutas en países en vías de desarrollo. | 44 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.Organización del operón de biosíntesis capsular en <i>C. jejuni</i> 11168 (HS2). | 10 |
| Figura 2.Representación esquemática de la región dos del operón de síntesis capsular de serotipos capsulares. | 12 |
| Figura 3.Complejos capsulares según el esquema de serotipificación de Penner. | 14 |
| Figura 4. Unidad repetitiva estructural de la cápsula polisacárida del serotipo HS23/36. | 16 |
| Figura 5.Ubicación de los poblados donde se realizaron los muestreos. | 27 |
| Figura 6.Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en las muestras analizadas. | 38 |
| Figura 7. Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en cada lugar de estudio. | 38 |
| Figura 8. Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en pacientes de 0 a 24 y 25 a 72 meses de edad. | 39 |
| Figura 9. Porcentaje total de los tipos capsulares por sintomatología. | 39 |

Lista de abreviaturas

- 1) CPS: cápsula polisacárida
- 2) SGB: síndrome de Guillain-Barré
- 3) HS: termoestable (por sus siglas en inglés)
- 4) G: guanina
- 5) C: citosina
- 6) PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por siglas en inglés)
- 7) DMSO: dimetilsulfóxido
- 8) ADN: ácido desoxirribonucleico
- 9) HMW: elevado peso molecular (por sus siglas en inglés)
- 10) LPS: lipopolisacárido
- 11) ORF: marcos abiertos de lectura (por sus siglas en inglés)
- 12) NMR: resonancia magnética nuclear (por sus siglas en inglés)
- 13) MAS: giro de ángulo mágico
- 14) MeOPN: O-metil-fosforamidato (por sus siglas en inglés)
- 15) NBD: proteína de unión a nucleótido
- 16) ATP: adenosín trifosfato (por sus siglas en inglés)
- 17) ABC: casete de unión a ATP (por sus siglas en inglés)
- 18) OPX: exportación de polisacáridos de membrana externa (por sus siglas en inglés)
- 19) HR: alta resolución externa (por sus siglas en inglés)
- 20) Gal β NAc: β -D-N-acetilgalactosamina en configuración furanosa
- 21) 6-MeHep: 6-O-metil-D-glicero- α -L-gluco-heptopiranososa
- 22) MgCTP: magnesio-citidin trifosfato (por sus siglas en inglés)
- 23) CDP: citidin-difosfato (por sus siglas en inglés)
- 24) ETEC: Escherichia coli enterotoxigénica
- 25) CBA: agar Columbia sangre (por sus siglas en inglés)
- 26) TBE: tris-Borato-EDTA
- 27) I. C.: Intervalo de confianza

RESUMEN

Campylobacter jejuni (Jones *et al.* 1931) Véron and Chatelain 1973, es la primera causa de diarrea bacteriana en el mundo. La técnica de serotipificación desarrollada por Penner es el *gold* estándar para la tipificación de este microorganismo, siendo la cápsula polisacárida (CPS) el principal serodeterminante. La CPS es uno de los principales factores de virulencia de *C. jejuni* y uno de los más estudiados; se sabe que la CPS se encuentra asociada al síndrome de Guillain – Barré (SGB) y puede ser considerada un biomarcador de éste. Además, una vacuna conjugada capsular se encuentra en desarrollo y requiere la determinación de su valencia. En la actualidad la distribución de los tipos capsulares circulantes en el mundo se encuentra pobremente descrita. El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias de los tipos capsulares circulantes en Perú y compararlos con las frecuencias observadas a nivel mundial; además, se evaluó la relación de las cápsulas con la edad, sintomatología y lugar de estudio. Se utilizó un PCR múltiple para detectar los tipos capsulares en aislamientos de *C. jejuni* de muestras diarreicas y no diarreicas de dos poblaciones pediátricas, una del PP.JJ. Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, y otra de la Comunidad Santa Clara de Nanay, Loreto, Perú. Los resultados mostraron que los tipos capsulares complejo HS4 (12,3 %), complejo HS3 (10,8 %), HS15 (8,7 %), HS41 (5,6 %), HS10 (5,4 %), complejo HS8/17 (5,2 %) y HS2 (5 %) fueron los más prevalentes. No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias en Perú y a nivel mundial de los tipos capsulares complejo HS1/44, HS2, complejo HS4 y complejo HS23/36, no así con los tipos capsulares complejo HS3 ($p < 0,001$), HS15 ($p < 0,001$) y HS53 ($p = 0,018$). No se observaron diferencias estadísticas significativas entre las proporciones de tipos capsulares observadas en sintomatología, lugar de estudio ni edad de los participantes, no obstante, se observó un mayor riesgo de infección por el tipo capsular HS15 en función de la edad. El 85 % de los participantes tuvieron reinfecciones con distintos tipos de CPS, lo cual sugiere que las CPS podrían conferir un cierto nivel de inmunidad protectora homóloga. Se necesita llevar a cabo más estudios para contribuir al conocimiento sobre la distribución de los tipos capsulares que permitan determinar sus frecuencias en nuestra región, determinar qué tipos capsulares asociados al SGB se encuentran circulando en la sociedad y llevar a cabo estudios epidemiológicos que permitan tomar las acciones preventivas pertinentes ante este microorganismo.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, tipos capsulares, sintomáticos, asintomáticos, Perú.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni (Jones *et al.* 1931) Véron and Chatelain 1973, is the leading cause of bacterial diarrhea worldwide. The serotyping technique developed by Penner is the gold standard for typing this microorganism, being the capsule polysaccharide (CPS) the main serodeterminant. The CPS is one of the most important virulence factors of *C. jejuni*, and one of the most studied. It is known that the CPS is associated to the Guillain-Barré syndrome (GBS), and it can be considered as a biomarker. In addition, a capsular conjugated vaccine is under development and the determination of its valency is required. Currently, the world distribution of capsular types is poorly described. The aim of this study is to determine the frequencies of the circulating capsular types in Peru, and whether these differ from the global frequencies. In addition, the relationship of the capsules with age, symptoms and study site was evaluated. A multiplex PCR was employed to detect the circulating capsular types from *C. jejuni* isolates from diarrheic and non-diarrheic samples obtained in two pediatric communities studies conducted in Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, and Santa Clara de Nanay, Loreto, Peru. Results shown that the most prevalent capsular types were HS4 complex (12,3 %), HS3 complex (10,8 %), HS15 (8,7 %), HS41 (5,6 %), HS10 (5,4 %), HS8/17 complex (5,2 %), and HS2 (5 %). No significant differences were observed between the frequencies in Peru and worldwide of the capsular types HS1/44, HS2, HS4 complex and HS23 / 36 complex, not so with the HS3 complex capsular types ($p < 0,001$), HS15 ($p < 0,001$) and HS53 ($p = 0,018$). No statistically significant differences were observed between the proportions of capsular types observed in symptoms, place of study or age of the participants, however, an increased risk of infection by capsular type HS15 was observed as a function of age. 85% of participants had reinfections with different types of CPS, suggesting that CPS may confer a certain level of homologous protective immunity. More studies are needed to contribute to knowledge about the distribution of capsular types that allow determining their frequencies in our region, determine which capsular types associated with GBS are circulating in society, and carry out epidemiological studies that allow taking the pertinent preventive actions against this microorganism.

Key words: *Campylobacter jejuni*, Penner, capsule types, symptomatic, asymptomatic, Peru.

I. INTRODUCCIÓN

El patógeno transmitido por alimentos, *Campylobacter jejuni* (Jones *et al.* 1931) Véron and Chatelain 1973, es la principal causa de diarrea bacteriana en el mundo (Havelaar *et al.*, 2015), además de ser responsable de síndromes neurológicos post infecciosos; como el SGB y el síndrome de Miller-Fisher (Nyati y Nyati, 2013); también se encuentra asociado a la artritis reactiva (Pope *et al.*, 2007), desnutrición (Schnee y Petri, 2017) y retraso del crecimiento en niños (Lee *et al.*, 2012); así como otras secuelas patológicas. Las aves de corral son el principal reservorio de este microorganismo, el consumo de carne, agua o leche contaminada constituyen la primera fuente de infección en humanos (Skarp *et al.*, 2016). *C. jejuni* afecta tanto a países desarrollados y países en vías de desarrollo, siendo estos últimos endémicos de este microorganismo, con prevalencias que pueden alcanzar hasta el 60% de la población (Coker *et al.*, 2002; Kaakoush *et al.*, 2015). Sorprendentemente, es relativamente muy poco lo que se conoce sobre este microorganismo.

C. jejuni es un bacilo curvo nutricionalmente exigente y, si lo comparamos con patógenos entéricos clásicos, con necesidades especiales de crecimiento (Hofreuter, 2014). Esta característica ha sido una gran limitante para su estudio, sobre todo en aquellos países que no cuentan con la infraestructura y condiciones necesarias para su cultivo y aislamiento. Esto ha conllevado a que las estimaciones reales sobre la prevalencia de este patógeno se encuentren muy por debajo de las reportadas (Platts-Mills y Kosek, 2014).

Diversos estudios de genómica, transcriptómica y proteómica han revelado la ausencia de factores de virulencia comunes a otros enteropatógenos como *Salmonella* sp. o *Escherichia coli* Castellani y Chalmers, 1919. La pato-adaptabilidad metabólica de *C. jejuni* es crucial para su supervivencia en diversos hospederos y en varios ambientes estresantes para este microorganismo (Burnham y Hendrixson, 2018; Crofts *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2017). También se han descrito extensamente diversas estructuras de superficie que son esenciales para la colonización de diversos hospederos y que se encuentran codificadas por regiones genómicas altamente variables, lo que les brinda características que les permite

evadir eficientemente la respuesta inmune del hospedero (Burnham y Hendrixson, 2018).

La cápsula polisacárida (CPS) se encuentra entre las estructuras de superficie más estudiadas de *C. jejuni* (Guerry *et al.*, 2012) y es el principal serodeterminante del esquema de serotipificación de Penner, que incluye 47 tipos capsulares termoestables denominados HS (del inglés, *Heat Stable*) (Penner y Hennessy, 1980; Penner *et al.*, 1983). Esta estructura es altamente variable debido a la extensa transferencia horizontal de genes de la región cromosómica responsable de la biosíntesis y ensamblaje de azúcares (Karlyshev *et al.*, 2005), además de poseer regiones repetitivas ricas en nucleótidos de guanina (G) y citosina (C), lo que ocasiona mutaciones por corrido del marco de lectura (Parkhill *et al.*, 2000). Adicionalmente, moléculas de naturaleza no glucosídica se unen variablemente a la CPS modulando su antigenicidad (McNally *et al.*, 2007). Cabe resaltar que esta molécula posee propiedades antigénicas y que viene siendo utilizada, conjugada a una proteína derivada de la toxina diftérica, en una vacuna que ha demostrado tener capacidad de generar protección en desafíos homólogos y heterólogos en un modelo animal primate no-humano, *Aotus nancymaae* Hershkovitz, 1983 (Aotidae) (Maue *et al.*, 2014).

El esquema de serotipificación de Penner para la determinación de los tipos capsulares circulantes ha sido empleado principalmente en laboratorios de referencia de países desarrollados, existen pocos reportes e información al respecto en países en vías de desarrollo (Pike *et al.*, 2013). En América del Sur no existen reportes sobre los tipos capsulares circulantes (Pike *et al.*, 2013). Esta diferencia se debe a la complejidad de la prueba y, consecuentemente, la falta de personal entrenado para llevarla a cabo, así como la necesidad de reactivos especiales para realizar el ensayo.

Recientemente se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple que permite detectar genes conservados específicos a cada tipo capsular, según el esquema de serotipificación de Penner (Poly *et al.*, 2011, 2015). Esto facilita enormemente la identificación de los tipos capsulares, reduce la complejidad de la prueba y elimina la necesidad de adquirir reactivos especializados para la serotipificación. El presente trabajo utiliza la PCR

múltiple para determinar los tipos capsulares circulantes en dos regiones endémicas con pobres sistemas sanitarios, contacto directo con animales de corral, pero con distinta ubicación geográfica.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Campylobacter*

El género *Campylobacter* (*Campylobacteraceae*) comprende 33 especies de bacterias comensales de animales, algunas de las cuales son patógenos de humanos y de animales (Fitzgerald, 2015; Parte, 2018). Es probable que la primera descripción de estos microorganismos la haya realizado Theodor Escherich en 1886 en muestras diarreicas de niños que murieron de una enfermedad denominada “cholera infantum” (Butzler, 2004). Sin embargo, no fue hasta 1970 en que se logró cultivar por primera vez a estos microorganismos utilizando técnicas aplicadas en microbiología veterinaria (Butzler *et al.*, 1973; Dekeyser *et al.*, 1972). Posteriormente, el desarrollo de un medio base selectivo (Skirrow, 1977) permitió la descripción, caracterización y clasificación taxonómica de estos microorganismos (Debruyne *et al.*, 2008). En la actualidad *C. jejuni* es la especie más estudiada de este género por ser considerado un importante patógeno humano (Burnham y Hendrixson, 2018).

Microbiología

Campylobacter jejuni (Jones *et al.*, 1931) Véron & Chatelain, 1973 pertenece a la clase Epsilonproteobacteria Garrity *et al.* 2006, orden *Campylobacterales* Garrity *et al.* 2006, que a su vez comprende a las familias *Arcobacteraceae* Waite *et al.* 2020; *Campylobacteraceae* Vandamme and De Ley 1991 e *Helicobacteraceae* Garrity *et al.* 2006. La familia *Campylobacteraceae* agrupa a los géneros *Campylobacter* Sebald and Véron 1963 y *Sulforospirillum* Schumacher *et al.* 1993 (Parte, 2018).

Las especies del género *Campylobacter* son bacterias pequeñas, curvas o espiraladas y de gran motilidad (On *et al.*, 2017), Gram-negativas, no fermentadoras de azúcares y con un contenido de G + C de 28-30% (Debruyne *et al.*, 2008). *C. jejuni* tiene un tamaño de 0,2 a 0,8 μm de ancho y 0,5 a 5 μm de longitud, posee 1 o 2 flagelos polares que le brindan su típico movimiento de sacacorchos (Debruyne

et al., 2008). Su estructura espiralada característica y los flagelos polares le permiten movilizarse a través de la mucosa intestinal y colonizar efectivamente a su hospedero (Ferrero y Lee, 1988; Shigematsu *et al.*, 1998; Szymanski *et al.*, 1995). Se ha observado que mutantes defectivos en Pgl1, una endopeptidasa que se encarga del clivaje de los componentes de la pared celular, tienen forma recta y son deficientes en moverse a través de la mucosa intestinal y, por consiguiente, de colonizar a su hospedero (Firdich *et al.*, 2012; Stahl *et al.*, 2016).

C. jejuni tiene la capacidad de producir una gran cantidad y diversidad de azúcares (Burnham y Hendrixson, 2018), no obstante, no es capaz de utilizarlas como fuente de energía (Sebald y Veron, 1963), su principal fuente de carbono son los aminoácidos (Hofreuter, 2014), por lo que no puede ser aislado con medios convencionales de aislamiento de enteropatógenos (Butzler, 2004). Este microorganismo es termotolerante (Levin, 2007), su temperatura óptima de crecimiento es de 42 °C pero también crece bien a 37 °C (Butzler *et al.*, 1973; Dekeyser *et al.*, 1972; Skirrow, 1977). Se ha observado que *C. jejuni* continúa multiplicándose, aunque lentamente, hasta una temperatura de 30 °C, temperatura por debajo de la cual no se reproduce (Hazeleger *et al.*, 1998). Este microorganismo sobrevive mejor a 4 °C que a 25 °C, en diferentes condiciones, hasta por 5 semanas (Blaser *et al.*, 1980). Cuando las condiciones para el microorganismo no son favorables, este enteropatógeno entra en una fase denominada “viable no-cultivable”, en la cual adquiere una forma cocoide y pierde los flagelos polares (Rollins y Colwell, 1986), aunque esta asociación no se encuentra del todo esclarecida (Ikeda y Karlyshev, 2012). La Tabla 1 resume las características de aislamiento e identificación de *C. jejuni*.

Este patógeno es microaerófilo, esto significa que requiere una concentración de oxígeno por debajo de la concentración atmosférica. Esta característica es un arma de doble filo para *C. jejuni*, por un lado este microorganismo requiere de oxígeno para multiplicarse, por otra parte, tiene un grupo de proteínas sensibles al oxígeno que son clave en su metabolismo (Kelly, 2008). En condiciones óptimas para su aislamiento, este microorganismo requiere 85 % de CO₂, 10 % de N₂ y 5 % de O₂ (Bolton y Coates, 1983), aunque estas condiciones no son las que normalmente afronta durante su ciclo de vida (Kelly,

2008). Su dependencia de oxígeno se explica por la síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) dependiente de oxígeno (Sellars *et al.*, 2002), sin embargo, posee varias enzimas que contienen complejos de hierro-azufre en su núcleo catalizador que son sensibles al oxígeno (Stahl *et al.*, 2012; Velayudhan *et al.*, 2004). Para contrarrestar el efecto nocivo del oxígeno sobre el metabolismo del patógeno, *C. jejuni* produce 2 hemeritinas que protegen a estas enzimas (Kendall *et al.*, 2014). Este microorganismo puede utilizar formiato, hidrógeno, lactato, succinato, gluconato y 2-oxoglutarato como donadores de electrones y al oxígeno, fumarato, nitrato, nitrito y DMSO (dimetilsulfóxido) como aceptores de electrones (Sellars *et al.*, 2002). Debido a la variedad de nichos que utiliza *C. jejuni* es que ha desarrollado diversos sistemas que le permiten sobrevivir a diversos ambientes (Szymanski y Gaynor, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que tiene la capacidad de respirar lactato mediante el uso de dos enzimas lactato deshidrogenasa, algo inusual en un microorganismo (Thomas *et al.*, 2010), y de utilizar un sistema de respiración de sulfito, mediante una enzima sulfito-citocromo C oxidorreductasa (Myers y Kelly, 2005).

Tabla 1. Características fenotípicas de *C. jejuni* basadas en Levin (2007).

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Gram-negativo | Utilización de citrato |
| Crecimiento a 42 °C | Utilización de succinato |
| Microaerofílico | Reducción de nitratos a nitritos (+) |
| Producción de catalasa (+) | Producción de ADNasa (+) |
| Producción de ureasa (+) | Resistente a la cefalotina |
| Utilización de hipurato (+) | Citocromo oxidasa (+) |
| Sensible al ácido nalidíxico | No crece por debajo los 30 °C |
| No fermenta ni oxida carbohidratos | No crece con 3,5% de NaCl |
| Producción de fosfatasa alcalina | Producción de H ₂ S (-) |

C. jejuni no tiene la capacidad de metabolizar carbohidratos, no obstante produce una gran variedad y cantidad de éstos; mediante reacciones anapleróticas, lleva a cabo la gluconeogénesis a partir de la carboxilación piruvato a oxaloacetato y la carboxilación de este a fosfoenolpiruvato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa PckA (Velayudhan y Kelly, 2002), indispensable para la biosíntesis de azúcares que conforman la cápsula (Karlyshev *et al.*, 2000), lipooligosacáridos (Michael *et al.*, 2002) y la N- (Young *et al.*, 2002) y O-glicosilación de proteínas (Thibault *et al.*, 2001).

Debido a la incapacidad de este microorganismo de utilizar carbohidratos como fuente principal de energía (Parkhill *et al.*, 2000), *C. jejuni* utiliza aminoácidos e intermediarios de los ácidos tricarboxílicos como principales fuentes de energía (Leach *et al.*, 1997; Leon-Kempis *et al.*, 2006; Velayudhan *et al.*, 2004). Este enteropatógeno metaboliza serina, aspartato, glutamato y prolina, preferencialmente en ese orden (Wright *et al.*, 2009), aminoácidos que se encuentran en elevadas concentraciones en las heces de los pollos (Stahl *et al.*, 2012). Además, se ha observado una diferencia quimiotáctica hacia determinados aminoácidos en función a temperaturas de 37 y 42 °C (Baserisalehi y Bahador, 2011). Así mismo, su capacidad colonizadora depende de su capacidad de metabolizar nutrientes específicos (Hofreuter *et al.*, 2008).

Capsulas polisacáridas

Las CPSs son estructuras que recubren la superficie celular bacteriana. Estas estructuras se encuentran compuestas de unidades repetitivas de azúcares unidas entre sí; a su vez, estas unidades repetitivas forman un polímero que se encuentra unido a la membrana bacteriana a través de un ancla lipídica (Roberts, 1996). Las CPSs son estructuras altamente variables como resultado de la diversidad de azúcares que la componen, la forma en la que éstas se unen entre sí, la cantidad de azúcares que componen la unidad repetitiva y la presencia de diversas moléculas que la decoran (Willis y Whitfield, 2013).

Descubrimiento de la cápsula polisacárida de *C. jejuni*

El sistema de serotipificación de antígenos termoestables desarrollado por Penner y Hennessy en 1980 (Penner y Hennessy, 1980) es una técnica ampliamente utilizada para caracterizar aislamientos de *C. jejuni* (Preston y Penner,

1987). Sin embargo, la estructura genética y bioquímica del componente serodeterminante del sistema de Penner se mantuvo en la oscuridad por alrededor de dos décadas. Inicialmente se creyó que el serodeterminante principal, una molécula de elevado peso molecular (HMW, del inglés *High Molecular Weight*), era un lipopolisacárido (LPS), por lo que la literatura de la época los denominó comúnmente como “antígenos O” (Preston y Penner, 1987). Sólo un estudio sugirió que una estructura capsular era el principal serodeterminante del sistema de tipificación de Penner (Chart *et al.*, 1996). No obstante, no se realizaron estudios genéticos ni bioquímicos adicionales.

La primera evidencia de la presencia de la CPS se obtuvo como resultado del secuenciamiento del genoma de *C. jejuni* 11168. El análisis genómico reveló la presencia de un operón de biosíntesis capsular similar a los grupos II y III del esquema de clasificación de *E. coli*. El loci comprende los genes Cj1413c al Cj1448c, en él se pueden observar tres regiones de genes putativos: las regiones 1 y 3, encargadas de ensamblaje y transporte de CPSs, y la región 2 responsable de la biosíntesis del polímero (Parkhill *et al.*, 2000). Se llevaron a cabo diversos estudios genéticos y bioquímicos para determinar las funciones de los genes putativos (Bacon *et al.*, 2001; Karlyshev *et al.*, 2000). El análisis de las secuencias de los genes Cj1448c y Cj1447c reveló una similitud a los genes KpsM y KpsT, respectivamente. Corriente abajo a los genes Cj1448c y Cj1447c se identificaron 3 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*), los genes Cj1445c, Cj1444 y Cj1443, con similitud significativa a los genes KpsE, KpsD y KpsF, respectivamente. Seguido a una región de 34 ORFs corriente abajo, contiguos al gen KpsF, se encontró a 2 ORFs en tándem, Cj1414c y Cj1413c, con una similitud significativa a los genes KpsC y KpsS (Karlyshev *et al.*, 2000). Estudios de mutagénesis en los genes KpsM (Cj1448c), KpsC (Cj1414c) y KpsS (Cj1413c) fallaron en la producción del polímero y fueron negativos al esquema de tipificación de Penner, sumado a la sensibilidad a un ensayo de fosfolipasa, todo indicaba que la HMW, se trataba de una cápsula polisacárida (Karlyshev *et al.*, 2000; Preston y Penner, 1987). Además, el análisis post genómico reveló la presencia de seis transferasas putativas de azúcares y tres genes putativos de biosíntesis de aminoácidos con funciones responsables de la conformación de la estructura capsular (Wren *et al.*, 2001).

Estudios posteriores confirmaron la presencia de la cápsula mediante observación al microscopio electrónico (Karlyshev *et al.*, 2001) y análisis de su composición bioquímica mediante resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) espectroscópica de giro de ángulo mágico (MAS, del inglés *Magic Angle Spinning*), así como la presencia de moléculas adicionales que la decoran (Michael *et al.*, 2002) y que son responsables de la variación de fase (Bacon *et al.*, 2001). Como resultado, se determinó que las HMWs se trataban de un cápsula polisacárida, principal serodeterminante del esquema de serotipificación de Penner (Bacon *et al.*, 2001).

Funciones de las CPS

Las CPS son estructuras de superficie y por lo tanto interactúan directamente con el medio en el que se encuentra la bacteria. Diversos estudios han demostrado el rol que cumple esta estructura frente al sistema inmunitario, el papel clave en la virulencia, así como la resistencia a antibióticos. La determinación de los genes que codifican la biosíntesis y ensamblaje de las CPS y los estudios bioquímicos sobre la estructura de este antígeno de superficie han contribuido en elucidar sus diversas funciones biológicas. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares precisos de la patogénesis mediada por esta estructura.

La expresión de las CPS parece estar influenciada por el medio en el que se encuentra el microorganismo (Corcionivoschi *et al.*, 2009). Estudios de mutagénesis en *C. jejuni* 81-176 han demostrado que aquellos microorganismos deficientes en la producción de cápsula son sensibles al suero humano, tienen una reducción significativa en la invasión de la línea celular INT-407 y su virulencia se ve disminuida en hurones (Bacon *et al.*, 2001). Reducción en la adhesión e invasividad también han sido reportadas en células epiteliales por mutantes deficientes en la producción de cápsulas (Bachtiar *et al.*, 2007). Maue y colaboradores reportaron hallazgos similares en mutantes deficientes en la producción del O-metil-fosforamidato (MeOPN) (Maue *et al.*, 2013), una estructura que se une a la CPS de algunos serotipos y que contribuye a la serodeterminación (McNally *et al.*, 2007). Es posible que estas modificaciones en las heptosas jueguen un rol clave en la virulencia mediada por la cápsula de este patógeno (van Alphen *et al.*, 2014; Pequegnat *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2015). En la investigación realizada

por Maue y colaboradores, se observó una reducción en los niveles de invasividad en un modelo murino y sensibilidad al suero humano, en niveles similares a los observados en mutantes deficientes en la producción de CPS (Maue *et al.*, 2013). También se ha observado un incremento en células CD4⁺ que expresan IL-17 en modelos murinos en los días 7 y 21 después de la infección, en comparación de los mutantes CPS deficientes, evitando la opsonización y evasión de la fagocitosis (Willis y Whitfield, 2013). Cabe resaltar que se han identificado diferencias en la respuesta inmune en distintos hospederos (Kim *et al.*, 2018). Recientemente se reportaron numerosos casos de abortos en ovejas por un clon altamente virulento denominado SA (del inglés, *Sheep Abortion*) en los Estados Unidos. La generación de mutantes deficientes en la producción de CPS develaron el rol patogénico fundamental que cumple esta estructura en inducir abortos y bacteriemia en ovejas y cobayos. El análisis del locus reveló la presencia de un mosaico de genes correspondientes a los tipos capsulares HS1,8, complejo capsular HS4, HS17 y el locus de una cepa no tipificable (Sahin *et al.*, 2017).

El rol de las CPS no se limita a la virulencia de *C. jejuni*, sino que contribuye a la supervivencia de este microorganismo en diversos ambientes. 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 la CPS cumple un rol significativo en este proceso. De esta forma, las CPS contribuirían con la protección ante medio ambientes hostiles y el efecto tóxico del oxígeno en *C. jejuni* (Joshua *et al.*, 2006; Pascoe *et al.*, 2015). Aunque la capsula no tiene un rol directo en la resistencia a antibióticos (Jeon *et al.*, 2009; Keo *et al.*, 2011), es posible que esta estructura contribuya al incremento de las frecuencias de transformación y, de esta manera, contribuir al desarrollo de la resistencia a antibióticos mediada por ADN foráneo (Jeon *et al.*, 2009).

Tipos, genética y biosíntesis

En *C. jejuni* la organización del operón de biosíntesis capsular, similar a los grupos II y III de *E. coli*, involucra a genes de transporte (Región 1), seguida a otra región de biosíntesis de azúcares que conforman la cápsula (Región 2) y una región de ensamblaje de azúcares (Región 3) (Figura 1 y 2).

En la región 1 encontramos a los genes KpsMTEDF (Karlyshev *et al.*, 2000). Los estudios realizados en *E. coli* muestran que KpsM es una proteína integral de membrana muy conservada, esta proteína se encuentra formada por 6 dominios intermembranales, normalmente se encuentra unida a otra proteína idéntica, formando así un dímero (Willis y Whitfield, 2013). Estudios de cristalografía de la estructura del dímero muestran un canal formado por los dominios intermembranales por el cual atraviesan los polímeros (Willis y Whitfield, 2013). No se han realizado estudios sobre la estructura de KpsM en *C. jejuni*, sin embargo, el análisis de la secuencia del gen predice 6 dominios intermembranales (Karlyshev *et al.*, 2000). El dímero formado por KpsM se encuentra asociado a la proteína con dominio de unión a un nucleótido (NBD, del inglés *Nucleotide Binding Protein*), con la cual forman el casete de unión a ATP (adenosín trifosfato), denominado también sistema de transporte ABC (del inglés, *ATP-Binding Cassette*) (Willis y Whitfield, 2013).

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 (Whitfield, 2013; Willis y Whitfield, 2013). Una vez ensamblado en el citoplasma bacteriano, la estructura macromolecular sería translocada por KpsM mediante la ayuda de la proteína que cataliza esta acción mediante la hidrólisis de ATP, 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 (Corcoran *et al.*, 2006).

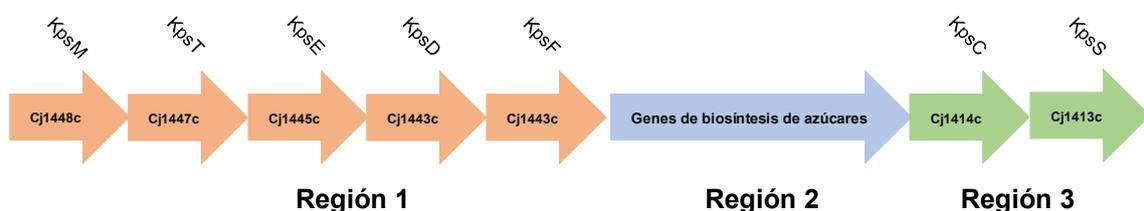


Figura 1. Organización del operón de biosíntesis capsular en *C. jejuni* 11168 (HS2). La orientación de las flechas indica dirección de lectura de los genes. Los nombres de los genes se encuentran en cada flecha y sus respectivos productos sobre cada flecha.

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 y composición capsular (Bacon *et al.*, 2001). 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 (Bacon *et al.*, 2001; Maue *et al.*, 2013).

Composición química

La composición bioquímica de la capsula polisacárida de *C. jejuni* es altamente variable y, como resultado, según el esquema de serotipificación de Penner (Penner *et al.*, 1983), es posible identificar 47 tipos capsulares que, por agrupación y reacciones cruzadas, dan como resultado 35 tipos capsulares (Figura 3) (Pike *et al.*, 2013). A la fecha se ha determinado la composición bioquímica de diversos tipos capsulares mediante NMR MAS de alta resolución (HR, del inglés *High Resolution*) con diferentes técnicas de aislamiento y purificación del polímero, además, de técnicas de mutagénesis para determinar la función de algunos genes involucrados en la biosíntesis del polímero.

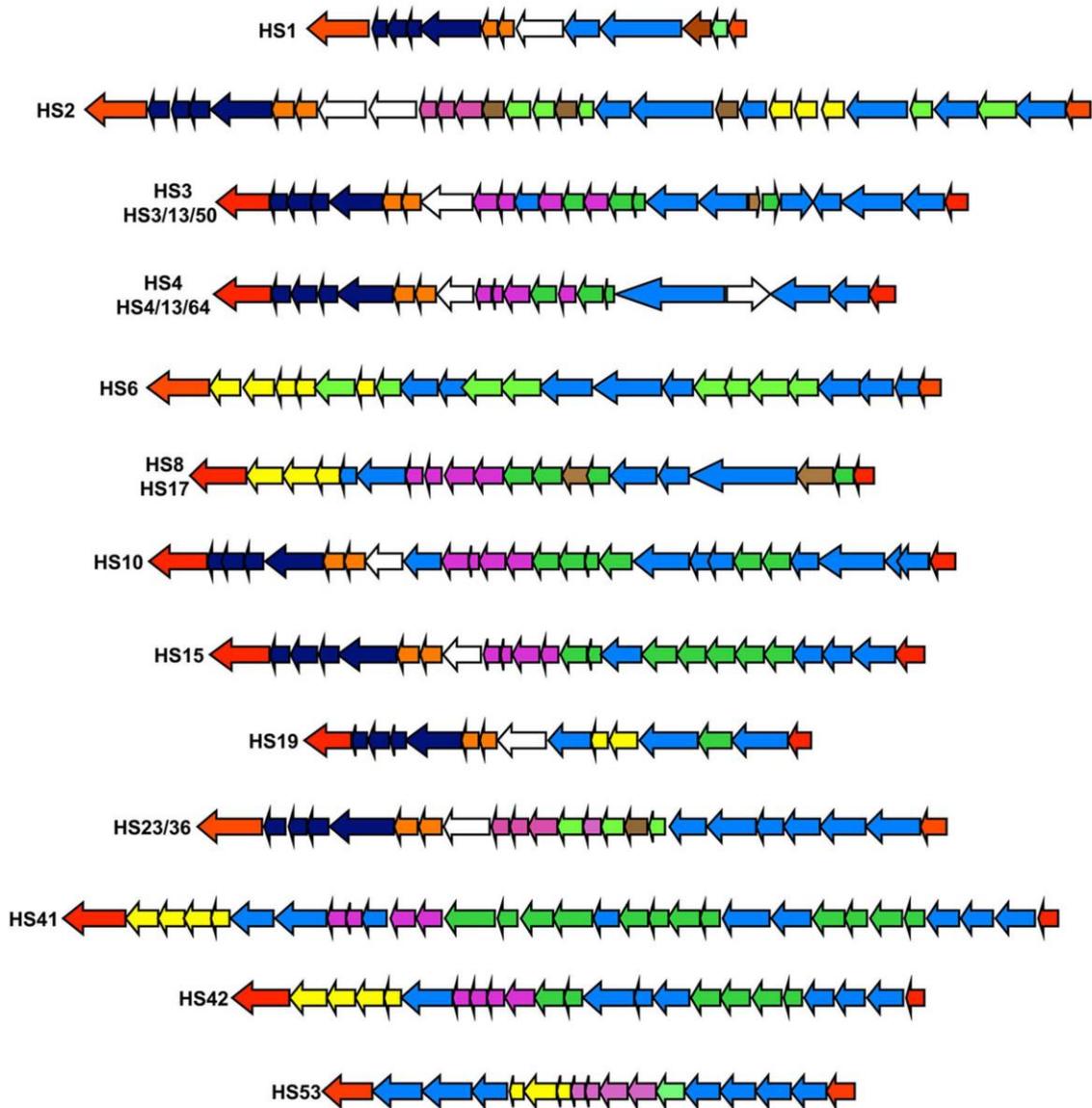


Figura 2. Representación esquemática de la región dos del operón de síntesis capsular de serotipos capsulares. Las flechas en colores indican: rojo: ensamblaje y transporte de la cápsula, azul: biosíntesis de MeOPN, naranja: metil transferasas putativas, blanco: MeOPN transferasa putativa, celeste: glucotransferasas, marrón: genes hipotéticos, verde: biosíntesis de azúcares, púrpura: biosíntesis de heptosas y amarillo: genes sin relación aparente a la biosíntesis de azúcares (Guerry *et al.*, 2012).

El análisis del serotipo HS2 de *C. jejuni* 11168 permitió elucidar la composición estructural polisacárida en la cual la unidad repetitiva se encuentra compuesta por 6-O-metil-D-glicero- α -L-gluco-heptopiranosas, ácido α -D-glucorónico modificado con 2-amino-2-desoxiglicerol, β -D-N-acetilgalactosamina en configuración furanosa (Gal_fNAc), reportada por primera vez en la naturaleza, y β -

D-ribofuranosa. Adicionalmente, los ensayos de mutagénesis determinaron el rol potencial de algunos genes de la región de biosíntesis capsular. Entre los genes estudiados se determinó que el gen Cj1428c estaría posiblemente involucrado en la epimerización de la 6-O-metil-D-glicero- α -L-gluco-heptopiranososa (6-MeHep) y que la delección de este gen no afecta polimerización capsular. En contraste, una cepa mutante en el gen Cj1439c, homólogo al gen *glp*, que codifica un enzima UDP-galactopiranososa mutasa responsable de la síntesis de galactofuranosa, da como resultado la ausencia de la GalfNAc, uno de los componentes principales de la unidad repetitiva de la cápsula y, por consiguiente, un mutante acapsular (Michael *et al.*, 2002). También se observó un grupo de genes involucrados en la biosíntesis de heptopiranosas, homólogos a los encontrados en *Aneurinibacillus thermoaerophilus* Meie-Stauffer *et al.* 1996, Heyndrickx *et al.* 1997 (*Paenibacillaceae*). Cabe resaltar las modificaciones de la estructura capsular con residuos de etanolamina, glicerol y metilo (Michael *et al.*, 2002).

Utilizando la misma técnica, Szymanski y colaboradores determinaron la composición del serotipo HS41 (ATCC43460) y llevaron a cabo un análisis de los componentes variables del serotipo HS2. El residuo glucosídico predominante del serotipo HS41 fue 6-desoxialtrofuranosil. En el análisis del serotipo HS2 se determinó que el ácido glucorónico se encuentra modificado con residuos de N-etanolamina y aminoglicerol (Szymanski *et al.*, 2003). A pesar que St. Michael y colaboradores (Michael *et al.*, 2002) no lograron identificar la posición precisa de las modificaciones, el estudio encontró tres variantes del serotipo HS2, las cuales fueron analizadas (Szymanski *et al.*, 2003). La variante uno contiene residuos de N-etanolamina en el ácido glucorónico, la variante encontrada en mayor proporción (variante 0) contiene aminoglicerol. La variante 2 es similar a la variante mayor, con la diferencia de un residuo de $\text{CH}_3\text{OP}(\text{O})(\text{NH}_2)(\text{OR})$, que en adelante denominaremos MeOPN u O-metil fosforamidato, en el carbono 3 del GalfNAc; mientras que la variante 3 no posee el grupo 6-O-metilo. La unidad estructural del serotipo HS2 es 2- β -D-ribofuranosa-(1-5)- β -D-GalfNAc-(1-4)- α -D-acetilglucopiranososa-6-aminoglicerol unida mediante el carbono 3 de la acetilglucopiranososa al 6-O-metil-D-glicero- α -L-gluco-heptopiranososa-(1- (Szymanski *et al.*, 2003).

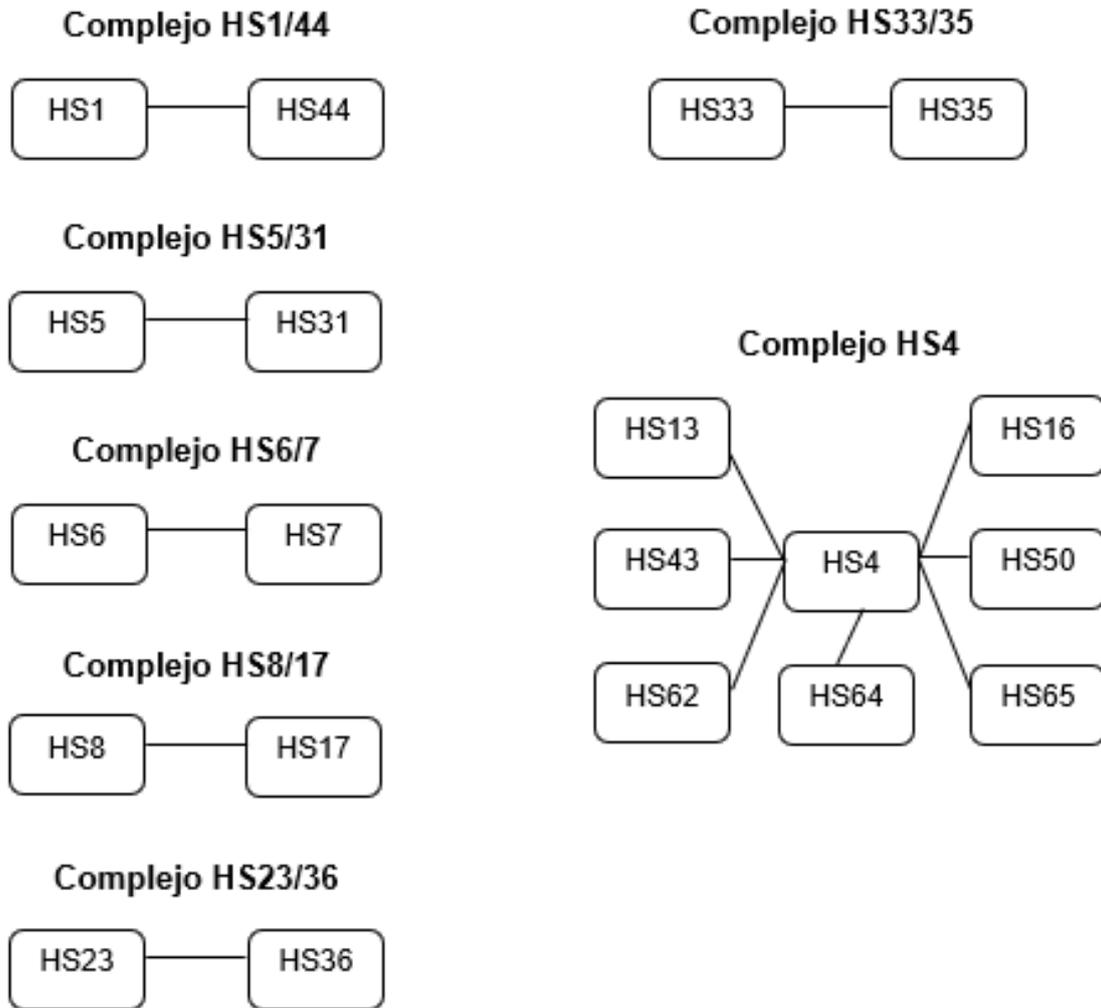


Figura 3. Complejos capsulares según el esquema de serotificación de Penner. Las cápsulas polisacáridas tienen reacciones cruzadas, estas reacciones pueden ser agrupada en los complejos capsulares que se observan en la imagen.

En un estudio más amplio realizado por Karlyshev y colaboradores, se realizó un análisis de la composición genética y bioquímica de los serotipos HS1, HS19, HS23, HS36 y HS41 y la comparación con las secuencias de los genes ya descritos en *C. jejuni* 11168. El análisis estructural de la cápsula del serotipo HS19 determinó la unidad repetitiva del CP como $[-4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA6(NGro)\text{-}1\text{-}3\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}\text{-}1\text{-}]_n$, con residuos de fosforamida y un azúcar lábil que no pudo ser determinado. El análisis genético del serotipo HS19 encontró un homólogo al gen *udg*, que se correlaciona con la presencia del ácido $\beta\text{-D-glucorónico}$ sustituido con 2-amino-2-desoxiglicerol (Karlyshev *et al.*, 2005).

El análisis bioquímico de la cepa con serotipo HS1 (cepa G1) determinó la estructura de la unidad repetitiva del CPS como $[P-4)\text{-}\alpha\text{-D-Gal-1-3-Gro-1-}]_n$, también se detectó la presencia de residuos lábiles de fosforamida. El análisis genético reveló que el serotipo HS1 contiene el grupo de genes dedicados a biosíntesis capsular más pequeño, con sólo 11 genes. Además, se encontraron homólogos al gen *tagD*, que codifica una glicerol-3-fosfato citidil transferasa, responsable de la formación de CDP-glicerol. Adicionalmente, se identificó a un homólogo del gen *tagF*, que transfiere residuos de glicerolfosfato a partir de CDP-glicerol (Karlyshev *et al.*, 2005).

El análisis estructural de los serotipos HS23 (CCUG 10954), HS36 (ATCC 43456) y HS23/36 (81-716) revelaron que las tres cepas tienen estructuras bioquímicas similares con diversas modificaciones. En todas las cepas se encontraron $\alpha\text{-D-galactosa}$, $\beta\text{-D-N-acetilglucosamina}$ y $\text{D-glicero-D-altro-heptosa}$ o desoxiheptosa . A pesar de la similitud entre las resonancias de los serotipos, el serotipo HS36 presenta mayor complejidad que el HS23, mientras que el serotipo HS23/36 con resonancias más complejas (Figura 4). Se observaron diferencias y similitudes entre las resonancias de los serotipos HS23, HS36 y HS23/36, empero, no se observaron diferencias significativas en la composición genética entre las tres cepas. Asimismo, se evidenció la presencia de genes relacionados con la biosíntesis de desoxiheptosas: Cj1423 (*hddC*, $\text{D,D-heptosa-1-fosfato}$ guanosiltransferasa), Cj1424 (*gmhA2*, $\text{sedoheptulosa-7-fosfato}$ isomerasa), Cj1425 (*hddA*, $\text{D,D-heptosa-7-fosfato}$ kinasa) y el gen *dmhA*, que codifica una dehidratasa, el cual está posiblemente involucrada en la conversión de heptosa a desoxiheptosa (Karlyshev *et al.*, 2005).

El análisis estructural del serotipo HS41 reveló la presencia de $[-2)\text{-}\beta\text{-L-Araf-1-2-}\beta\text{-D-6d-altro-Hepf-1-2-}\beta\text{-L-6d-Alt-1-}]_n$, en la cual la 6-desoxi- $\beta\text{-L-altrosa}$ puede ser sustituida por $\alpha\text{-D-fucosa}$. El análisis genético de la cepa reveló la presencia de los genes *gmhA2*, *hddA*, *hddC* y *dmhA*, lo cual explica la presencia de heptosas en la cápsula. El estudio también identificó tres genes homólogos a *glf*, que codifica una UDP-piranososa mutasa. Cabe resaltar que se encontraron genes de contingencia responsables de la variación de fase de los serotipos HS23/36 y HS41. Por último, mediante ensayos de mutagénesis y NMR se determinó la función de

los genes involucrados en la biosíntesis de la D-glicero- α -L-glucoheptosa (Karlyshev *et al.*, 2005).

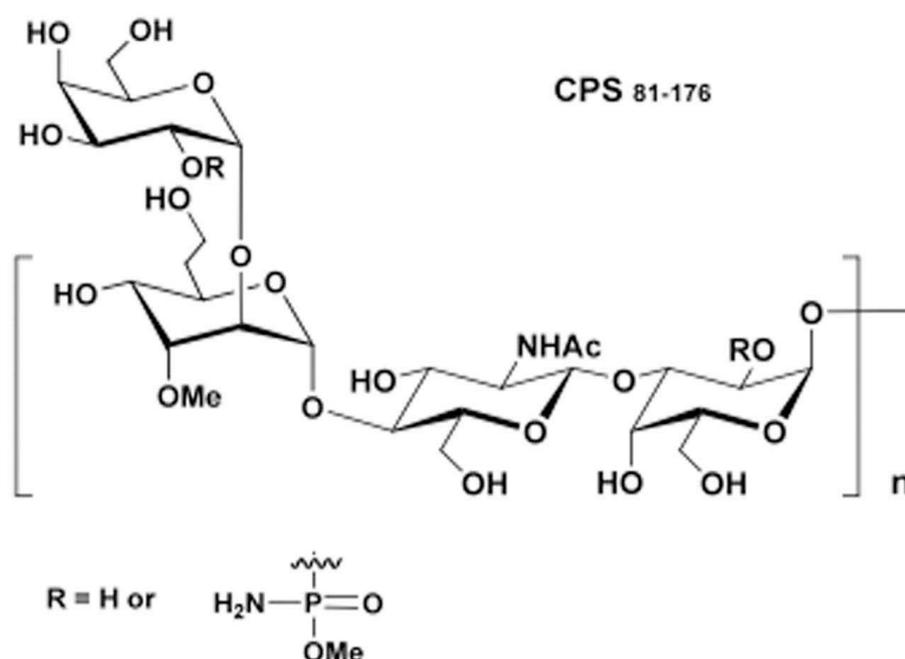


Figura 4. Unidad repetitiva estructural de la cápsula polisacárida del serotipo HS23/36. Compuesta de 3)-D-galactopiranososa-(1,2)-3-metil-6 desoxi- α -D-altro heptopiranososa-(1,3)- β - D-N-acetil-glicopiranososa-(1,3). El MeOPN se encuentra variablemente unido al carbono 2 de la galactosa (Guerry *et al.*, 2012).

McNally y colaboradores (McNally *et al.*, 2005, 2006) realizaron dos estudios para determinar la composición bioquímica de los serotipos HS1 y HS19. En el primer estudio se analizó la composición estructural de la capsula de HS1 con una variante en el procedimiento. La finalidad fue determinar si la NMR HR-MAS podría identificar los componentes estructurales capsulares sobre la superficie bacteriana y la CPS aislada enzimáticamente (McNally *et al.*, 2005). Con resultados idénticos, la unidad repetitiva detectada fue [-4]- α -D-galactopiranososa-(1-2)-(R)-glicerolfosfato-(1-]_n, similar al ácido teicoico, y similar a lo encontrado por Karlyshev y colaboradores, con ramificaciones variables de MeOPN en el carbono 3 de la β -D-fructofuranosa con unión lábil al carbono C-2 y unión variable al C-3 de la galactosa (McNally *et al.*, 2005). En el segundo estudio se determinó la estructura del serotipo HS19. La unidad repetitiva detectada fue [-4]- β -D-GlcA6NGro-(1-3)- β -D-GlcNAc-(1-]_n con una ramificación de α -L-sorbofuranosa en el carbono 2 de la GlcA y un grupo MeOPN, con metilación variable, en el carbono 4 del GlcNAc. β -D-GlcA6NGro es

ácido β -D-glucorónico 6-N-glicerol, mientras que β -D-GlcNAc es 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa. Además, en este estudio se utilizó la enzima piranosa oxidasa para determinar la configuración L- o D- de la α -sorbofuranosa, la enzima oxida sólo la L-sorbosa, debido a que el análisis mediante NMR no detectó ninguna señal de la sorbosa luego del ensayo con la enzima, se concluyó que tiene el azúcar tiene la configuración L-, siendo así α -L-sorbofuranosa (McNally *et al.*, 2006).

El análisis estructural de la CPS de la cepa RM1221, serotipo HS53, reveló que se encuentra compuesta de un polímero lineal de una unidad repetitiva de un trisacárido: dos α -6-desoxi-D-mano-heptopiranosas y un β -6-desoxi-D-mano-heptopiranosas que se encuentran unidos entre sí por enlaces fosfodiéster; a este trisacárido se le unen residuos de xilulosa (D-threo-penta-2-ulosa) de forma no estequiométrica los residuos O2 y O-4 de la heptosa. Además, se observó que algunos de los genes de la región biosintética, *gmhA2*, *hddA* y *hddC*, de la CPS son conservados en los serotipos HS2, HS3, HS23/36 y HS53 (Gilbert *et al.*, 2007).

O-metil-fosforamidato (MeOPN)

McNally y colaboradores investigaron la extensión de la presencia de los residuos de MeOPN en las CPSs. Sorprendentemente encontraron que esta molécula, hallada en cantidades no estequiométricas en el 70% de los aislamientos de *C. jejuni*, juega un papel muy importante en la determinación del serotipo, particularmente en el serotipo HS23 y HS36. Los encargados de la transferencia de los grupos MeOPN a los carbonos C-3 de la GalNAc y C-4 de la D-glicero-L-glucoheptosa son los genes *cj1421* y *cj1422*, respectivamente; los mismos que se expresan variablemente, confiriendo así los serotipos HS23, HS36 y HS23/36 (McNally *et al.*, 2007). La expresión variable de estos genes permite al microorganismo cambiar de serotipo o variar de fase durante el proceso infeccioso, evadiendo así la respuesta inmune (van Alphen *et al.*, 2014; McNally *et al.*, 2007).

Recientemente se elucidó la serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en la biosíntesis del MeOPN. La síntesis del MeOPN inicia con la fosforilación ATP-dependiente del nitrógeno de la amida de la L-glutamina, catalizada por el producto del gen *Cj1418*, una L-glutamina quinasa, obteniendo como sub producto L-glutamina fosfato (Taylor *et al.*, 2017a). Luego, el producto del gen *Cj1416*, una fosfoglutamina citidiltransferasa, cataliza la defosforilación del magnesio-citidin

trifosfato (MgCTP, del inglés *magnesium-dytidine triphosphate*) mediante la L-glutamina fosfato para formar citidin-difosfato-L-glutamina (CDP-L-glutamina). La CDP-L-glutamina es hidrolizada por el producto del gen Cj1417, una γ -glutamil-CDP-amidato hidrolasa, obteniendo como producto L-glutamato y citidin-difosforamidato (Taylor *et al.*, 2017b). Finalmente, la fosforilación ATP-dependiente del citidin-difosforamidato es catalizada por una citidin-difosforamidato quinasa, codificada por el gen Cj1415, que genera como producto final el 3'-fosfo-citidin-5'-difosforamidato (Taylor y Raushel, 2018). Las reacciones finales que llevan a la formación del MeOPN y su incorporación a los azúcares constituyentes de las CPS continúan siendo estudiadas.

La presencia del MeOPN no sólo tiene implicancia en la variación de fase del microorganismo y la evasión de la respuesta inmune. Algunos estudios han demostrado que el MeOPN tiene una estructura molecular muy similar a algunos pesticidas y que tendría un efecto insecticida sobre la larva de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Pyralidae - Galleriinae) (Champion *et al.*, 2010). Aunque existe un reporte contradictorio al respecto (van Alphen *et al.*, 2014), es necesario realizar más estudios que clarifiquen esta propiedad del MeOPN. También se ha observado que la presencia de esta molécula está relacionada con el incremento a la resistencia al suero humano (van Alphen *et al.*, 2014), probablemente bloqueando la unión de los anticuerpos circulantes (Pequegnat *et al.*, 2017) y la ausencia de la misma se encuentra asociada a un aumento a la invasividad en la línea celular Caco-2 (van Alphen *et al.*, 2014). Asimismo, se observó que el MeOPN promueve el incremento de la producción de IL-6 e IL-10 en monocitos derivados de médula ósea. Sin embargo, la presencia del MeOPN no tuvo efecto sobre la producción de IL-6 e IL-10 en monocitos derivados de macrófagos en humanos ni murinos (Kim *et al.*, 2018). No obstante, la presencia del MeOPN no siempre es benéfica para el microorganismo ya que es un receptor para el bacteriófago F336 en *C. jejuni* 11168 (Sørensen *et al.*, 2012).

Tipificación capsular de *C. jejuni* mediante PCR múltiple

Desde el desarrollo de la técnica de PCR múltiple para la identificación de tipos capsulares de *C. jejuni* en función al esquema de serotipificación de Penner se han realizado relativamente pocos estudios, no obstante, la mayor parte de ellos

fueron llevados a cabo en regiones con altas prevalencias de infecciones por *C. jejuni*.

Garrigan et al. (2014) desarrolló el primer estudio utilizando el nuevo sistema de tipificación que fue llevado a cabo en Filadelfia, Estados Unidos, donde se analizaron 170 de muestras tomadas entre el 2007 y el 2012 de pacientes con una edad promedio de 41,6 años (en hombres) y 42,7 años (en mujeres). Se encontró 28 tipos capsulares distintos, de los cuales el complejo HS4 (24,9 %) fue el más frecuente, seguido de HS2 (13,3 %), complejo HS3 (6,7 %), HS53 (6,1 %) y HS21 (5,5 %), mientras que el 2,94 % no fueron tipificables por PCR. Además, se encontró que el 70 % de los tipos capsulares más frecuentes no difieren a los encontrados en un estudio realizado 20 años atrás (Garrigan et al., 2014).

Poly y colaboradores (2015) aplicaron esta técnica en 990 aislamientos de *C. jejuni* en pacientes residentes y viajeros en Tailandia, Cambodia y Nepal, países con alta prevalencia de infecciones por *C. jejuni*, encontrando que los tipos capsulares más frecuentes fueron el complejo HS4 (16,1 %), HS2 (14,7 %), HS5/31 (10,6 %), complejo HS8/17 (9,8 %), complejo HS3 (7,8 %) y complejo HS23/36 (6,3 %). Además, se observaron diferencias en la distribución de la frecuencia de los tipos capsulares entre pobladores locales y visitantes a estos países; los tipos capsulares más frecuentes en viajeros visitantes fue: complejo HS4 (18,87 %), complejo HS23/36 (13,52 %) y HS53 (12,39 %); mientras que en pobladores nativos fue: HS2 (18,7 %), complejo HS4 (14,8 %), complejo HS5/31 (12,68 %) y complejo HS8/17 (12,68 %) (Poly et al., 2015).

En Egipto se llevó a cabo un estudio retrospectivo de la distribución de los tipos capsulares circulantes en niños menores de 3 años de edad, desde 1995 al 2003. Se tipificaron 272 aislamientos de *C. jejuni*, de los cuales el tipo capsular más frecuente el HS2 (11,4 %), complejo HS3 (11,4 %), HS15 (9,2 %), complejo HS4 (8,1 %), HS5/31 (7,0 %), HS10 (6,6 %) y HS1/44 (5,5 %), no fue posible tipificar 11,8% de los aislamientos. No se observó diferencias entre la sintomatología y la presencia de algún tipo capsular identificado (Sainato et al., 2018).

En un análisis retrospectivo de pacientes atendidos en un centro médico militar en Hawái entre el 2012 y el 2016, se investigó la frecuencia de los tipos

capsulares de *C. jejuni* por PCR múltiple en 106 pacientes, entre niños y adultos (mediana 27 años, 11 – 35). Los tipos capsulares más frecuentes fueron el complejo HS4 (30,1 %), HS2 (18,9 %), HS8/17 (7,55 %) y el complejo HS3 (6,6 %). Adicionalmente, se encontró que el complejo capsular HS4-AB, los tipos capsulares HS2 – HS8/17 y el complejo HS4-A estaban asociados a los complejos conales (CC) CC:ST-48, CC:ST-21 y CC:ST-508, respectivamente (Ewers *et al.*, 2018).

Neitenbach *et al.* (2019) analizó la frecuencia de tipos capsulares de *C. jejuni* de tres comunidades del departamento de Loreto, evaluó una población de 198 niños desde el nacimiento hasta los 2 años de edad. Analizaron 318 aislamientos de *C. jejuni* y encontraron que 70 % correspondieron a infecciones asintomáticas, los tipos capsulares más frecuentes fueron el complejo HS4 (14,8 %), complejo HS5/31 (11,9 %), HS15 (8,2 %), HS2 (7,4 %) y HS10 (6,8 %), no encontraron asociación entre la frecuencia de los tipos capsulares y la sintomatología clínica. Mientras que el 55,2 % de los niños sufrieron de 2 hasta 7 infecciones en el transcurso de los 2 años de vigilancia, donde el 97,9 % de ellos fue por un tipo capsular diferente. Además, no encontraron una asociación significativa entre la presencia del MeOPN, heptosas o desoxiheptosas y la sintomatología clínica.

Hasta el momento se han tipificado 1856 aislamientos mediante el PCR múltiple, la gran mayoría (90,8 %) proveniente de países en vías de desarrollo, lo que constituye sólo el 8,8 % de la información disponible de los tipos capsulares circulantes en Europa (Pike *et al.*, 2013).

Problema de la investigación

Perú es un país en vías de desarrollo con altas prevalencias de patógenos entéricos como *C. jejuni*, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), especies de *Shigella* y *Salmonella*. No obstante, existe escasa información epidemiológica sobre estos patógenos, sobre todo, información relacionada a *C. jejuni* y ETEC. Más aún, es escasa la información epidemiológica que detalle con precisión datos serológicos y moleculares sobre estos microorganismos. Existen diversos factores por los cuales la información epidemiológica de *C. jejuni* es limitada en países de escasos recursos, sumado a la dificultad de aislar un patógeno nutricionalmente exigente y de aislamiento particularmente complejo, la dificultad de realizar las técnicas serotipificación, confluyen en un vacío de información sobre este microorganismo.

C. jejuni es el microorganismo más frecuentemente aislado de muestras fecales de pacientes con el SGB y su rol en el desencadenamiento de este síndrome ha sido bastante estudiado (Yuki, 2012). Aunque las estructuras involucradas en el desarrollo del SGB son los lipooligosacáridos, un estudio de tipificación capsular de aislamientos de *C. jejuni* de muestras fecales de pacientes con el SGB ha demostrado una asociación de los tipos capsulares HS1/44, HS2, complejo HS4, HS19, complejo HS23/36 y HS41, lo que sugiere que pueden ser utilizados como marcadores de este síndrome (Heikema *et al.*, 2015). En el Perú la prevalencia de este síndrome es 10 a 20 casos por cada millón de habitantes, sin embargo, se han reportado dos brotes importantes de Guillain-Barré en Lima y el norte del país el 2018 y el 2019 (Gavilán *et al.*, 2019). Recientemente se reportó el aislamiento de *C. jejuni* de muestras fecales de 4 pacientes del brote del SGB en Lima 2019, todos los aislamientos con el tipo capsular HS41 (Alarico *et al.*, 2019). En Perú no existen estudios sobre la relación entre *C. jejuni* y el SGB; por lo tanto, la descripción de los tipos capsulares circulantes, como marcadores del SGB, podría dar luces respecto a la relación de este microorganismo y el SGB en nuestro país.

También se ha observado que los tipos capsulares más frecuentes se encuentran asociados a complejos clonales y que determinados tipos capsulares se encuentran asociados a resistencia a antibióticos (Ewers *et al.*, 2018).

La CPS al ser el principal serodeterminante del esquema de serotipificación de Penner (Penner *et al.*, 1983) tiene propiedades inmunogénicas (Maue *et al.*, 2013), esto se ha evidenciado en una vacuna capsular conjugada a una proteína inmunogénica que ha demostrado protección homologa y heteróloga significativa en primates no-humanos (Monteiro *et al.*, 2009). Esta vacuna se encuentra actualmente en fase clínica 2 de desarrollo (Poly *et al.*, 2018), la cobertura de protección dependerá del número de tipos capsulares incluidos en esta vacuna, consecuentemente, la validez de la misma dependerá de la información que se tenga disponible al respecto. Se ha observado que la prevalencia de los tipos capsulares varía entre regiones, en consecuencia, una vacuna protectora deberá contener los tipos capsulares más frecuentes de acuerdo a cada región. En América del Sur sólo se ha reportado un estudio sobre los tipos capsulares circulantes en

Perú (Neitenbach *et al.*, 2019). La falta de información complica el desarrollo de una vacuna protectora contra la infección por *C. jejuni* que es imprescindible en regiones con una elevada prevalencia de este microorganismo.

Por lo tanto, es de gran importancia determinar, primero, que tipo capsulares se encuentran circulando en el Perú y, segundo, es necesario saber si estos tipos capsulares difieren de los tipos capsulares más frecuentes observados a nivel global.

Importancia del estudio

La tipificación capsular de *C. jejuni* mediante un PCR múltiple es importante para monitorear la circulación de este microorganismo en la comunidad, facilitará la investigación de brotes infecciosos, contribuirá con información valiosa para determinar el rol de esta bacteria en los casos del SGB, así como información crítica para el desarrollo de una vacuna capsular conjugada para prevenir las infecciones por *C. jejuni*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- **Hipótesis nula:** Los tipos capsulares de *Campylobacter jejuni* de las poblaciones de Santa Clara de Nanay, Loreto, y Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, no difieren de las frecuencias de los tipos capsulares HS2, HS1/44 y el complejo HS4 observadas a nivel mundial.
- **Hipótesis alterna:** Los tipos capsulares de *C. jejuni* encontrados en las poblaciones de Santa Clara de Nanay, Loreto, y Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, difieren de las frecuencias de los tipos capsulares HS2, HS1/44 y el complejo HS4 observadas a nivel mundial.

3.2 Objetivos

A. Objetivo general

Comparar la frecuencia acumulada de los tipos capsulares de *C. jejuni* en la comunidad amazónica de Santa Clara de Nanay, Loreto, y el pueblo joven costero Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, en razón a las frecuencias globales.

B. Objetivos específicos

- a. Identificar a nivel molecular *C. jejuni* en los aislamientos considerados en el estudio.
- b. Determinar a nivel molecular los tipos capsulares de los aislamientos de *C. jejuni*.
- c. Comparar los tipos capsulares más frecuentes obtenidos en el presente estudio y los tipos capsulares más frecuentes a nivel mundial encontrados en la literatura científica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población

El estudio incluyó todos los microorganismos previamente identificados como *Campylobacter jejuni*, mediante la prueba de reducción del hipurato, y especies no identificadas del género *Campylobacter* que fueron aislados de muestras fecales de niños menores de 5 años de edad en dos estudios que se llevaron a cabo de forma independiente. En el pueblo joven Pampas de San Juan de Miraflores, departamento de Lima se realizó un estudio de caso-control en niños menores de 5 años; en la comunidad rural de Santa Clara de Nanay, departamento de Loreto, se realizó un estudio de cohorte (Figura 5). El anexo 3 resume las características demográficas de las poblaciones estudiadas.

4.2 Pampas de San Juan de Miraflores, Lima

Ubicado en la región costera del departamento de Lima, en el distrito de San Juan de Miraflores (Longitud: 076°58'8.9" Latitud: S12°9'35.68"). Las 72 familias que participaron en el estudio tenían un ingreso económico mensual promedio de 242 dólares, vivían sin acceso a agua y desagüe y en contacto directo con aves de corral. (Oberhelman *et al.*, 2003, 2006).

4.3 Criterios de selección y definición de caso

La selección de los participantes del estudio siguió los siguientes criterios: ser menor de 72 meses de edad y contar con al menos 2 pollos/familia. Los participantes fueron monitoreados mensualmente para determinar la carga bacteriana asintomática. La vigilancia consistió en la toma de muestras fecales y el llenado de un cuestionario por parte del algún miembro de la familia, esta encuesta incluyó preguntas referentes a la frecuencia de las deposiciones, consistencia de las heces y la presencia de moco o sangre en las mismas (Oberhelman *et al.*, 2003, 2006).

Los pacientes fueron clasificados como sintomáticos o asintomáticos según el número y consistencia de sus deposiciones; aquellos pacientes con más de 4 deposiciones líquidas en 24 horas fueron considerados como sintomáticos (Black *et al.*, 1988). La duración de la diarrea se definió como el número de días antes y después del(los) día(s) en el cual se cumplió el criterio

de diarrea. Además, en este estudio, de acuerdo a la definición de diarrea, debieron pasar al menos 2 días sin diarrea para ser clasificado como un episodio nuevo de diarrea (Oberhelman *et al.*, 2003, 2006).

4.4 Recolección, transporte y procesamiento de muestras

La recolección de muestras fecales fue llevada a cabo por personal entrenado, se realizó de forma mensual por un periodo de 18 meses; las muestras de heces fueron transportadas en medio Cary Blair en condiciones de refrigeración al departamento de Bacteriología del Centro de Enfermedades Infecciosas Tropicales de la Marina de los Estados Unidos. Las muestras fueron sembradas en medio selectivo agar Brucella suplementado con 5 % de sangre de oveja y con el suplemento de antibióticos de Butzler (Oxoid) y suplementos de crecimiento para *Campylobacter* (Oxoid). Los medios inoculados fueron incubados a 42 °C por 24 a 48 horas en condiciones de microaerobiosis. Las colonias sospechosas fueron evaluadas por coloración Gram, pruebas de oxidasa, catalasa y sometidas a la prueba de hidrólisis de hipurato para la confirmación de especie, aquellos identificados como *Campylobacter* sp. o *C. jejuni* fueron crio-preservados en medio caldo tripticasa de soja con 20 % de glicerol crioviales almacenados en tanques de nitrógeno líquido.

4.5 Comunidad rural Santa Clara de Nanay, Loreto

El estudio que fue llevado a cabo en una población de niños menores de 5 años en Santa Clara de Nanay (Latitud: 3° 47' 2.1" S, Longitud: 73° 21' 12.1" W), una comunidad rural ubicada en la región Amazónica, departamento de Loreto. Las 180 familias que participaron en el estudio tenían un ingreso económico mensual de 28 dólares y acceso limitado a agua potable y desagüe. Esta comunidad se encuentra ubicada a 15 kilómetros de la ciudad de Iquitos, tiene una población de 3472 habitantes en 612 hogares (Kosek *et al.*, 2008; Yori *et al.*, 2014).

4.6 Criterios de selección y definición de caso

Los participantes en este estudio fueron seleccionados en función a los siguientes criterios: tener menos de 70 meses de edad, sólo un participante por familia y la firma de un consentimiento informado por sus apoderados; los participantes que cumplieron más de 72 meses de edad fueron removidos del

estudio y se incluyeron a participantes que cumplieran con el criterio de selección.

Los participantes de la Comunidad Santa Clara de Nanay fueron clasificados como sintomáticos o asintomáticos en función a la consistencia de sus deposiciones y al número de las mismas; participantes con 3 deposiciones líquidas en menos de 24 horas fueron considerados sintomáticos, participantes con presencia de *Campylobacter* sp. en heces sin diarrea fueron considerados como asintomáticos. Se consideró caso nuevo a aquellos participantes con un nuevo episodio de diarrea 15 días después del último episodio, caso contrario se consideró como infección persistente. Además, se tomaron muestras cada tres meses para determinar la carga bacteriana asintomática (Kosek *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012).

4.7 Recolección, transporte y procesamiento de muestras

La recolección de muestras fecales se llevó a cabo por personal entrenado, se realizó de forma trimestral por un periodo de 43 meses; las muestras fueron transportadas en solución salina tamponada con glicerol y medio Cary-Blair. Se pesó 1 gramo de heces en 1 mililitro de solución salina tamponada con glicerol, se tomó 100 µL de esta solución y se colocó en un filtro de 0.45 µm de porosidad sobre agar Columbia suplementado con sangre al 5 %, los medios fueron incubados a 42 °C en condiciones de microaerobiosis por 48 horas. Las colonias sospechosas fueron evaluadas por coloración Gram, prueba de oxidasa, catalasa e hidrólisis del hipurato; aquellos identificados como *Campylobacter* sp. o *C. jejuni* fueron crio-preservados en medio caldo tripticasa de soja con 20 % de glicerol crioviales almacenados en tanques de nitrógeno líquido.

4.8 Muestra

Se consideraron todos los aislamientos de *Campylobacter* spp. y *C. jejuni* obtenidos a partir de muestras fecales (n = 663), los cuales fueron previamente cultivados, purificados y almacenados en caldo peptonado con 20 % de glicerol en crioviales en tanques con nitrógeno líquido. Los aislamientos para este estudio fueron tomados de 247 muestras diarreicas, que incluyen 202 de Santa

Clara y 45 de Pampas de San Juan y 414 muestras no diarreicas, de las cuales 83 son de Santa Clara y 333 de Pampas de San Juan.

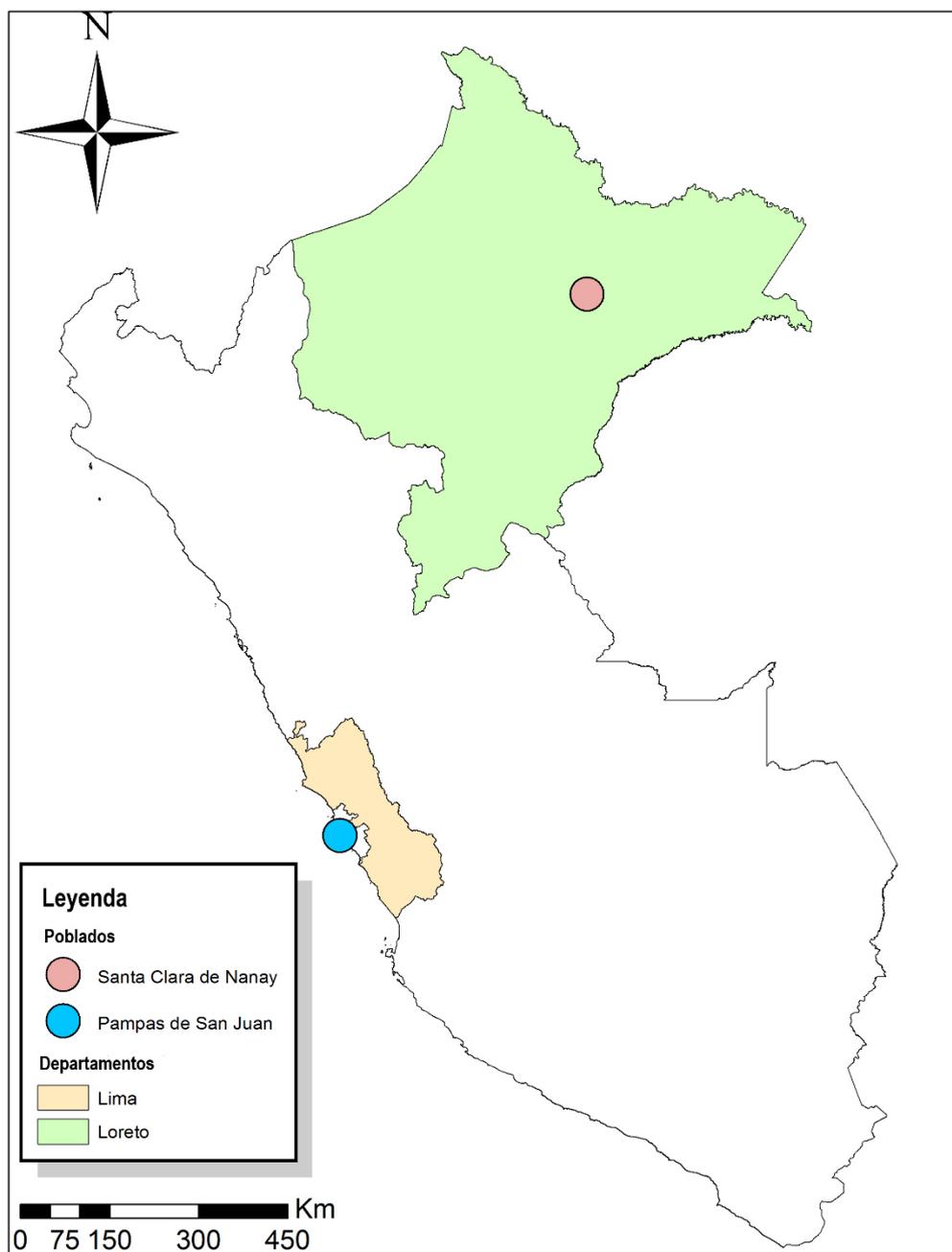


Figura 5. Ubicación de los poblados donde se realizaron los muestreos. En la región costera: PP.JJ. Pampas de San Juan de Miraflores en el departamento de Lima; en la región Amazónica: Comunidad de Santa Clara de Nanay en el departamento de Loreto.

4.9 Cultivo y confirmación de especie

4.10 Cultivo

Los aislamientos fueron sembrados sobre la superficie del medio Columbia-Blood Agar (CBA) suplementado con 5 % de sangre de carnero (Butzler, 2004). Las placas con el medio sembrado fueron incubadas a 42 °C por 24 a 72 horas en condiciones de microaerofilia, 5 % de O₂, 10 % de CO₂ y 85 % de N₂.

Los cultivos en los cuales se halló contaminantes fueron purificados mediante la técnica del filtro, descrita por Skirrow. Los cultivos en los cuales no se observó crecimiento fueron enriquecidos en caldo Tioglicolato bajo las mismas condiciones de incubación anteriormente descritas. Los medios de enriquecimiento en los cuales se observó turbidez y, adicionalmente, un halo de crecimiento un centímetro por debajo de la superficie, fueron sembrados nuevamente mediante la técnica del filtro (Skirrow, 1977).

4.11 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó tomando una asada de cultivo bacteriano y se resuspendió en 100 µL de grado biología molecular en un microtubo de 1,5 mL de capacidad. La muestra fue sometida a shock térmico, con una exposición a 100 °C por 10 minutos y luego 10 minutos en hielo. Luego, la muestra fue centrifugada a 14000 rpm (revoluciones por minuto) a 4 °C por 10 minutos. Después de la centrifugación se tomó todo el sobrenadante, evitando tomar el precipitado, y se transfirió a un nuevo microtubo el cual fue etiquetado con el código de la muestra, fecha de extracción y tipo de muestra. Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su análisis.

El ADN fue cuantificado mediante el espectrofotómetro *NanoDrop* 2000, la concentración de ADN se ajustó a 200 ng/µL, utilizando agua de grado biología molecular como diluyente, de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

*Donde: C= concentración, V= volumen

4.12 Identificación y confirmación de especie

La identificación de especies se llevó a cabo mediante un PCR múltiple que amplifica una región conservada del gen *glyA* (que codifica una serina hidroximetiltransferasa) que permite identificar a *C. jejuni* y *C. coli* (Rashid *et al.*, 2000). En cada reacción se incluyó un control positivo de *C. jejuni* (ATCC 33560), control positivo de *C. coli* (ATCC 33559) y un control negativo (*E. coli* DH5 α). Los volúmenes de reacción y las condiciones de reacción de la PCR se encuentran detalladas en la Tablas 2 y 3, respectivamente.

Todos los productos de la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2 % diluido en buffer TBE 1X (tris-borato-EDTA), los geles fueron previamente teñidos con 15 μ L de *Syber Safe*. Se tomaron 2 μ L del producto de la PCR y se mezclaron con 8 μ L de colorante de carga, dicha mezcla se colocó en los pocillos del gel. Las condiciones de electroforesis fueron: 120 voltios por 1 hora y 30 minutos aproximadamente, en geles de 10 x 14 cm. El análisis de la electroforesis se llevó a cabo en el digitalizador de imágenes *GelDoc XR+* mediante el software *Quantity One*. Los resultados de la PCR fueron categorizados de la siguiente forma: bandas con un peso molecular de 773 pares de bases (pb) corresponden a *C. jejuni*; bandas con peso molecular de 364 pb corresponden a *C. coli*; la ausencia de bandas se consideró como muestras negativas para *C. jejuni* o *C. coli*.

Tabla 2. Reactivos y volúmenes empleados en el PCR, volúmenes empleados en una reacción.

| Reactivo | Secuencias | Volumen (μ L) |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Amplitaq Master Mix 360 | - | 11,0 |
| Agua de PCR | - | 8,0 |
| Primer 364F (10 μ M) | AGACAAATAAGAGAGAATCAG | 1,0 |
| Primer 364R (10 μ M) | TAGGCATTATTTTTACCCCTATAGACAG | 1,0 |
| Primer 773F (10 μ M) | ACAACTTGGTGACGATGTTGTA | 1,0 |
| Primer 773R (10 μ M) | CAATCATGDGCDATATGASAATAHGCCAT | 1,0 |
| Muestra de ADN | - | 2,0 |
| Total | | 25,0 |

Tabla 3. Protocolo de amplificación del gen *glyA* para la identificación de *C. jejuni* y *C. coli* mediante PCR.

| Temperatura | Tiempo | Ciclos | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------|----------|--------|---------------|---------------|--------|
| 95 °C | 1 minuto | 1 | Paso 5 | | |
| Paso 1 | | | 94 °C | 1 minuto | |
| 94 °C | 1 minuto | | 56 °C | 1 minuto | 2 |
| 64 °C | 1 minuto | 1 | 72 °C | 1 minuto | |
| 72 °C | 1 minuto | | Paso 6 | | |
| Paso 2 | | | 94 °C | 1 minuto | |
| 94 °C | 1 minuto | | 54 °C | 1 minuto | 30 |
| 64 °C | 1 minuto | 2 | 72 °C | 1 minuto | |
| 72 °C | 1 minuto | | Paso 7 | | |
| Paso 3 | | | 72 °C | 10 minutos | |
| 94 °C | 1 minuto | | 4°C | Indeterminado | |
| 60 °C | 1 minuto | 2 | | | |
| 72 °C | 1 minuto | | | | |
| Paso 4 | | | | | |
| 94 °C | 1 minuto | | | | |
| 58 °C | 1 minuto | 2 | | | |
| 72 °C | 1 minuto | | | | |

4.13 Tipificación capsular

Los aislamientos que fueron identificados a nivel molecular como *C. jejuni* fueron tipificados por una PCR múltiple para la determinación de tipos capsulares. Para ello se tomó como muestra el ADN previamente extraído. Los volúmenes de reacción se detallan en la tabla 4; la lista de *primers* de cada mezcla maestra, así como el tamaño de producto amplificado se detallan en la tabla 5; las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 6.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados en el PCR, volúmenes utilizados para una reacción.

| Reactivo | Volumen (µL) |
|-------------------------|--------------|
| Amplitaq Master Mix 360 | 12,5 |
| Agua | 9,0 |
| Mezcla primers (1 µM) | 1,0 |
| Muestra de ADN | 2,5 |
| Total | 25,0 |

La PCR de identificación capsular amplificó 36 genes distintos: 35 correspondientes a genes involucrados en la biosíntesis de las CPS (Poly et al., 2011, 2015) y 1 gen conservado que codifica una UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa, el gen *lpxA* (Klena et al., 2004), como control interno de amplificación e identificación de especie. Debido a la cantidad de primers utilizados, las mezclas maestras fueron divididas en cuatro: mezcla alfa (α), mezcla beta (β), mezcla gamma (γ) y mezcla delta (δ) (Tabla 5), los genes diana se encuentran descritos en el Anexo 1 (Poly et al., 2015).

4.14 Electroforesis y determinación del tipo capsular

Todos los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2,5 % diluida en buffer TBE 1X, el gel fue teñido con 15 μ L de *Syber Safe* previo a su solidificación. Se tomaron 2 μ L del producto de PCR y se mezcló con 8 μ L de colorante de carga, dicha mezcla se colocó en los pocillos del gel. En cada electroforesis se incluyó los productos de PCR de las cuatro mezclas maestras, por cada muestra, y un control negativo. Las condiciones de electroforesis fueron: 90 voltios por 3 horas y 30 minutos en geles de 10 x 14 cm. Una vez concluido el tiempo se analizaron los geles en el digitalizador de imágenes *GeiDoc XR+* mediante el software *Quantity One*. Aquellas muestras que no presentaron bandas o cuyas bandas fueron más débiles que el control positivo interno, fueron excluidas del análisis (Tabla 17).

Para determinar el tipo capsular, se consideró el peso molecular de la banda correspondiente a la mezcla maestra y comparando la distancia recorrida de la banda en cuestión con las bandas de una escalera molecular de 100 pares de bases. Sin embargo, al momento de la interpretación de resultados se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- La PCR no es capaz de distinguir entre los productos de los complejos capsulares HS4A y HS4B, por lo que se le denominó complejo capsular HS4.
- El tipo capsular HS15 (325 pb, mezcla alfa) tiene reacción cruzada con los tipos capsulares HS5/31 (857 pb), HS45 (129 pb, mezcla gama) y HS58 (89pb, mezcla delta). Entonces se tuvo en cuenta los siguientes criterios: Si la PCR dio como resultado un producto de 129 pb en la

mezcla gama se consideró como HS45, sin embargo, si se obtuvo un producto de 129 pb y otro de 857 pb, entonces fue considerado como HS5/31. Si la PCR dio como resultado un producto de 325 pb y otro de 857 pb se consideró sólo como HS15 (Poly *et al.*, 2011, 2015).

4.15 Análisis demográfico y estadístico

El análisis de los datos obtenidos fue realizado en Stata versión 16.0, análisis complementarios fueron realizados en Microsoft Excel 2016.

4.16 Análisis de frecuencias y diferencia de proporciones

Se realizó un análisis de las frecuencias absolutas y acumuladas de los tipos capsulares por lugar de estudio, sintomatología y edad; con los resultados obtenidos en Stata y se generaron gráficos de barras en Microsoft Excel. Además, se calcularon las proporciones por sintomatología y género, la variable edad se subdividió en dos grupos: participantes de 0 – 24 y 25 a 72 meses de edad; con los resultados obtenidos se realizó un test de diferencia entre proporciones bajo la siguiente hipótesis:

- $H_0: p_1 - p_2 = 0$
- $H_A: p_1 - p_2 \neq 0$

Siendo p_1 y p_2 las proporciones que se desean comparar tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$z = \frac{(\hat{p}_1 - \hat{p}_2) - (p_1 - p_2)_0}{\hat{\sigma}_{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}}$$

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de diferencias entre las proporciones de los tipos capsulares encontrados en este estudio, que a su vez fueron divididas por lugar de estudio, y las observadas en el resto del mundo, que también fueron divididas entre economías de países desarrollados y países en vías de desarrollo, de acuerdo a una revisión sistemática realizada por Pike y colaboradores (2013); este análisis incluyó todos los estudios conducidos desde el desarrollo del serotipado de Penner hasta el año 2012. Esta revisión sistemática tomó en cuenta sólo aquellos reportes publicados en revistas

indizadas publicadas en idioma inglés, y considerando los siguientes términos de búsqueda: “Campylobacter”, “Penner” y “Serotype”; se excluyeron las revisiones y publicaciones que no sean en inglés. El análisis realizado por Pike y colaboradores consideró 21394 muestras en total, de las cuales 1222 muestras provienen de países en vías de desarrollo y 20 172 muestras provienen de países desarrollados (ver anexo 3) (Pike *et al.*, 2013). Con los resultados obtenidos se realizó un test de diferencia entre proporciones bajo la siguiente hipótesis:

- $H_0: p_1 - p_2 = 0$
- $H_A: p_1 - p_2 \neq 0$

Siendo p_1 y p_2 las proporciones que se compararon tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$z = \frac{(\hat{p}_1 - \hat{p}_2) - (p_1 - p_2)_0}{\hat{\sigma}_{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}}$$

4.17 Análisis de riesgos relativos

Se realizó un análisis de Riesgo Relativo (RR) utilizando un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés), con los siguientes componentes:

- Componente aleatorio: variable respuesta (CPS), con distribución de Poisson.
- Componente sistemático: variable explicativa (edad, en meses).
- Función vínculo: logarítmica

Siendo las variables empleadas:

- Variable dependiente:
 - Cápsula polisacárida, cualitativa politómica nominal.
- Variables independientes:
 - Edad, cuantitativa continua.
 - Lugar de estudio, cualitativa dicotómica.
 - Sintomatología, cualitativa dicotómica
 - Género, cualitativa dicotómica.

Se aplicó el análisis de RR mediante el GLM en los tipos capsulares HS3, HS4 y HS15, por ser los tipos capsulares más frecuentes, y al total de tipos capsulares identificables por PCR bajo la siguiente fórmula:

$$RR(X) = \frac{\lambda(X = x + 1)}{\lambda(X = x)} = \exp(\beta_x)$$

Adicionalmente, los modelos fueron ajustados a las variables género, sintomatología y lugar de estudio para determinar su influencia en los RRs modelados. Se asignaron valores a las variables dicotómicas: género (masculino=1, femenino=2), sintomatología (asintomático=1, sintomático=2) y lugar de estudio (Pampas de San Juan=1, Santa Clara de Nanay=2).

A un nivel de significancia del 95%, el riesgo relativo aumenta cuando $RR > 1$ y disminuye cuando $RR < 1$. Tenemos el mismo riesgo cuando $RR = 1$.

Tabla 5. Juego de primers, tamaño (en pb) y tipo capsular reconocido de los cuatro grupos de mezclas empleados: Alfa, beta, gamma y delta.

| Mezcla Alfa | Tamaño (pb) | Tipo capsular reconocido | Mezcla Beta | Tamaño en pb | Tipo capsular reconocido |
|-------------------|--------------|--------------------------|-------------------|--------------|--------------------------|
| HS2 | 62 | HS2 | HS1 | 610 | HS1 y HS1/44 |
| HS3 | 149 | HS3 | HS4B ^b | 652 | HS4 complejo B |
| HS4A ^a | 370 | HS4 complejo A | HS8 | 342 | HS18 y HS17 |
| HS6 | 185 | HS6 y HS7 | HS12 | 201 | HS12 |
| HS10 | 229 | HS10 | HS21 | 801 | HS21 |
| HS15 | 325 | HS15, HS31 y HS58 | HS23/36 | 161 | HS23 y HS36 |
| HS19 | 450 | HS19 | HS27 | 280 | HS27 |
| HS41 | 279 | HS41 | HS31 | 857 | HS5 y HS31 |
| HS53 | 251 | HS53 | HS42 | 440 | HS42 |
| HS63 | 520 | HS63 | HS57 | 100 | HS57 |
| HS33A | 819 | HS33 y HS35 | | | |
| Mezcla Gamma | Tamaño en pb | Tipo reconocido capsular | Mezcla Delta | Tamaño en pb | Tipo capsular reconocido |
| HS9 | 278 | HS9 | HS11 | 540 | HS11 |
| HS18 | 653 | HS18 | HS32 | 420 | HS32 |
| HS22 | 216 | HS22 | HS40 | 636 | HS40 |
| HS29 | 185 | HS29 | HS52 | 170 | HS52 |
| HS37 | 541 | HS37 | HS55 | 341 | HS55 |
| HS44 | 148 | HS44 | HS58 | 85 | HS58 |
| HS45 | 128 | HS45 | HS60 | 241 | HS60 |
| <i>lpxA</i> | 331 | <i>C. jejuni</i> | | | |

^a El complejo HS4A representa: HS4, HS13, HS16, HS43, HS50, HS62, HS64 y HS65.

^b El complejo HS4B representa HS16 y HS64.

Tabla 6. Protocolo de amplificación para el PCR múltiple de tipificación capsular.

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Número de ciclos |
|---------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C | 5 minutos | 1 |
| | Paso 1 | | |
| | 94 °C | 40 segundos | |
| Amplificación | 54 °C | 30 segundos | 29 |
| | 72 °C | 45 segundos | |
| | Paso 2 | | |
| Extensión final | 72 °C | 2 minutos | 1 |

V. RESULTADOS

5.1 Identificación molecular

Se analizaron 401 (60,48 %) aislamientos de *Campylobacter jejuni* obtenidos a partir de 220 pacientes pediátricos, que incluyen 228 (61,96 %) aislamientos de Pampas de San Juan y 173 (60,7 %) aislamientos de Santa Clara de Nanay. 262 (39,52 %) aislamientos no fueron considerados para el análisis de tipificación capsular, de los cuales 187 aislamientos no fueron recuperados por técnicas convencionales de cultivo y enriquecimiento y 35 aislamientos no pudieron ser confirmados como *C. jejuni* mediante PCR. De los aislamientos que fueron sometidos a tipificación capsular, 228 (56,86 %) aislamientos provinieron de Pampas de San Juan y 173 (43,14 %) aislamientos de Santa Clara de Nanay, con respecto al total de aislamientos tipificados (Anexo 4).

5.2 Distribución de los tipos capsulares

Se encontró 24 tipos capsulares distintos, de los cuales el complejo capsular HS4 y los tipos HS3 y HS15 fueron los más prevalentes con 12,27 %, 10,81 % y 8,73 % del total de tipos capsulares, respectivamente (Figura 6). En Pampas de San Juan, el complejo HS4 (14,13 %) y el tipo capsular HS15 (10,95 %) fueron los más prevalentes, en contraste, el tipo capsular más prevalente en Santa Clara de Nanay fue el HS3 (14,14 %), seguido por el complejo capsular HS4 (9,6 %) (Figura 7), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre proporciones (Anexo 5). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las proporciones de los tipos capsulares encontrados entre edad y sintomatología (figuras 8 y 9, anexos 6 y 7, respectivamente). Además, los tipos capsulares HS45 y HS42 fueron encontrados solamente en las muestras aisladas en Pampas de San Juan, mientras que, los tipos capsulares HS37 y HS55 fueron hallados solamente en Santa Clara de Nanay (Anexo 4). Es importante resaltar la prevalencia de los tipos capsulares HS2 (5 %) y HS41 (5,6 %).

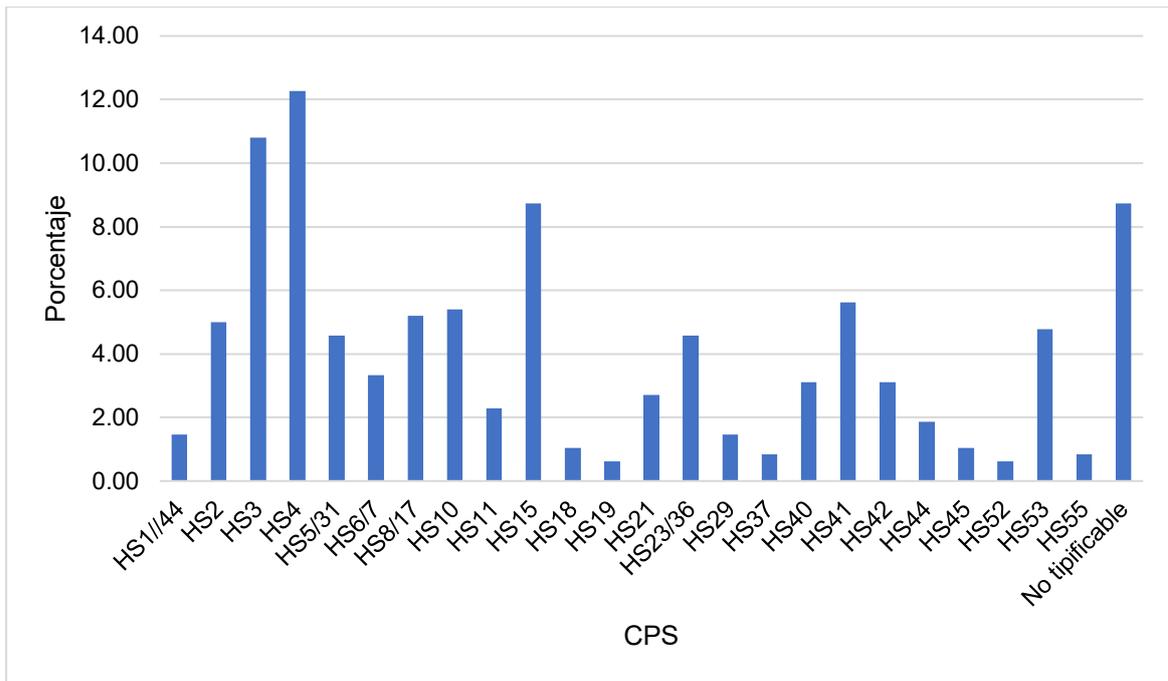


Figura 6. Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en las muestras analizadas.

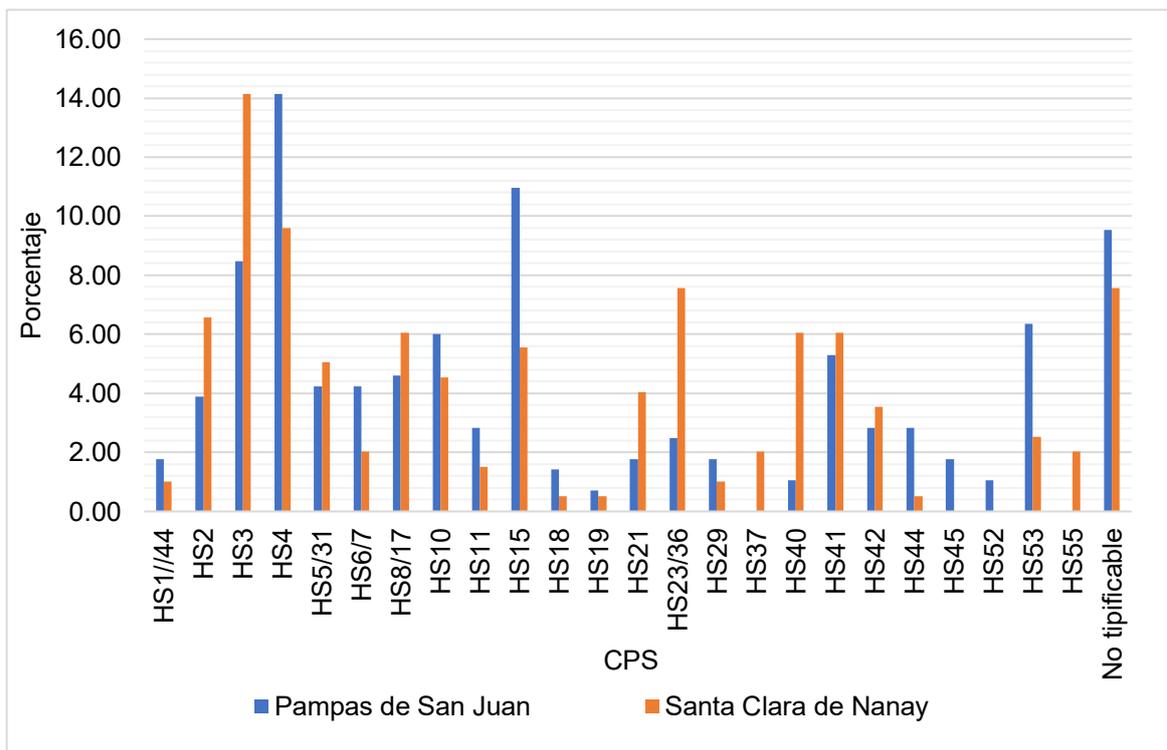


Figura 7. Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en cada lugar de estudio.

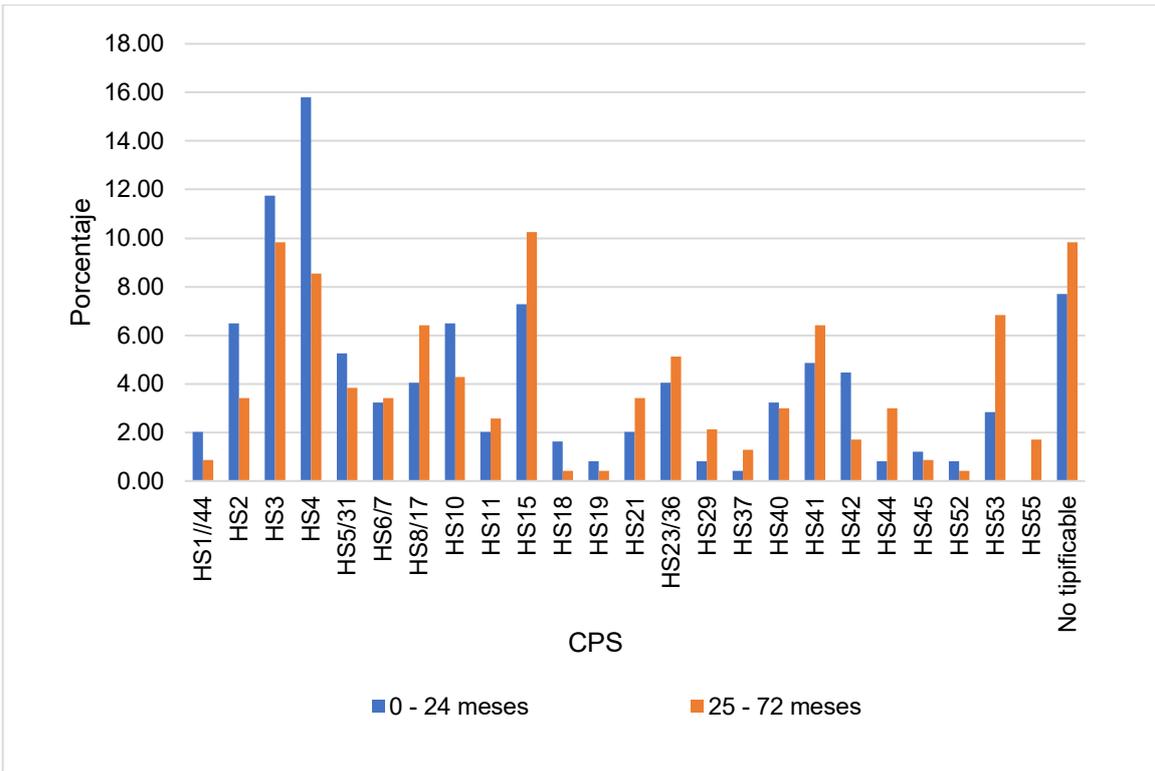


Figura 8. Porcentaje total de los tipos capsulares hallados en pacientes de 0 a 24 y 25 a 72 meses de edad.

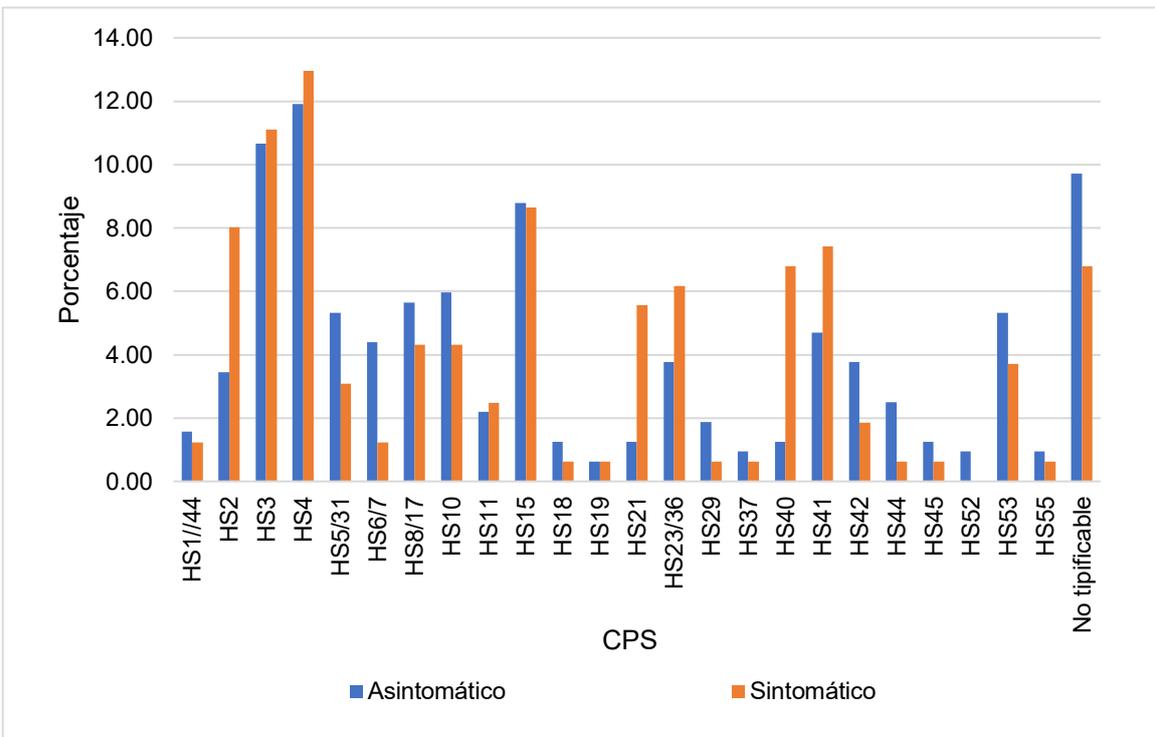


Figura 9. Porcentaje total de los tipos capsulares por sintomatología.

5.3 Análisis de RR

Se evaluó el RR de infección por *C. jejuni* con tipos los capsulares complejo HS4 y los tipos capsulares HS3 y HS15, por ser los más frecuentes en este estudio. Se encontró que el tipo capsular HS15 se encontraba asociado con una disminución del 49 % de riesgo de infección por *C. jejuni* en niños comparado con niñas, ajustado por edad (Tabla 7). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre géneros en el RR de infección por microorganismos con los tipos capsulares complejo HS4 (Tabla 8) y HS3 (Tabla 9). Se encontró que el riesgo de infección por *C. jejuni* se incrementa con la edad para los tipos capsulares HS15, ajustado por género (Tabla 7), y el complejo HS4 (Tabla 8). No obstante, no se encontró diferencias significativas en las tasas de infección en los primeros años de vida de los pacientes analizados en este estudio.

No se encontró asociación significativa entre la presentación clínica (sintomáticos y asintomáticos) y los tipos capsulares complejo HS4, HS3 y HS15. No obstante, es importante destacar que se encontró una asociación significativa entre los aislamientos con tipos capsulares tipificables y el riesgo relativo de infección por *C. jejuni*, ajustado por lugar de estudio y sintomatología (Tabla 10).

Tabla 7. Análisis RR en función al tipo capsular HS15 por edad, ajustado por género, sintomatología y lugar de estudio.

| Factor | RR | valor p | RR ajustado | valor p |
|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------|
| Edad | 1.04 (0.99 - 1.10) | 0.062 | 1.05 (1.01 - 1.09) | 0.005 |
| Género | | 0.042 | | 0.034 |
| | Femenino | 1.00 | 1.00 | |
| | Masculino | 0.53 (0.29 - 0.98) | 0.51 (0.28 - 0.95) | |
| Sintomático | | 0.529 | | 0.484 |
| | No | 1.00 | 1.00 | |
| | Sí | 0.82 (0.45 - 1.51) | 0.81 (0.44 - 1.47) | |
| Lugar de estudio | | 0.556 | | 0.445 |
| | Santa Clara de Nanay | 1.00 | 1.00 | |
| | Pampas de San Juan | 0.84 (0.47 - 1.50) | 0.80 (0.45 - 1.43) | |

Tabla 8. Análisis RR en función al tipo capsular HS4 por edad, ajustado por género, sintomatología y lugar de estudio.

| Factor | RR | valor p | RR ajustado | valor p |
|----------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| Edad | 0.78 (0.64 - 0.95) | 0.014 | 0.78 (0.64 - 0.95) | 0.014 |
| Género | | 0.391 | | 0.610 |
| Femenino | 1.00 | | 1.00 | |
| Masculino | 0.79 (0.46 - 1.36) | | 0.87 (0.52 - 1.48) | |
| Sintomático | | 0.724 | | 0.479 |
| Asintomático | 1.00 | | 1.00 | |
| Sintomático | 1.09 (0.66 - 1.83) | | 1.19 (0.74 - 1.91) | |
| Lugar de estudio | | 0.118 | | 0.388 |
| Santa Clara de Nanay | 1.00 | | 1.00 | |
| Pampas de San Juan | 0.64 (0.38 - 1.12) | | 0.79 (0.47 - 1.34) | |

Tabla 9. Análisis RR en función al tipo capsular HS3 por edad, ajustado por género, sintomatología y lugar de estudio.

| Factor | RR | valor p |
|----------------------|--------------------|---------|
| Edad | 1.01 (0.95 - 1.08) | 0.739 |
| Género | | 0.254 |
| Femenino | 1.00 | |
| Masculino | 1.38 (0.79 - 2.40) | |
| Sintomatología | | 0.325 |
| Asintomático | 1.00 | |
| Sintomático | 1.32 (0.76 - 2.31) | |
| Lugar de estudio | | 0.135 |
| Santa Clara de Nanay | 1.00 | |
| Pampas de San Juan | 1.54 (0.88 - 2.69) | |

Tabla 10. Análisis RR en función a CPS por edad, ajustado por género, sintomatología y lugar de estudio.

| | RR | valor p | RR ajustado | valor p |
|----------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| Edad | 0.91 (0.84 - 0.98) | 0.011 | 0.92 (0.87 - 0.98) | 0.005 |
| Género | | 0.256 | | 0.193 |
| Femenino | 1.00 | | 1.00 | |
| Masculino | 0.89 (0.72 - 1.09) | | 0.89 (0.74 - 1.06) | |
| Sintomatología | | 0.001 | | 0.886 |
| Asintomático | 1.00 | | 1.00 | |
| Sintomático | 0.70 (0.57 - 0.86) | | 1.02 (0.76 - 1.37) | |
| Lugar de estudio | | <0.001 | | <0.001 |
| Santa Clara de Nanay | 1.00 | | 1.00 | |
| Pampas de San Juan | 0.54 (0.45 - 0.65) | | 0.55 (0.41 - 0.73) | |

5.4 Re infecciones y tipos capsulares

De los 220 participantes incluidos en el análisis, 146 de ellos sufrieron infecciones múltiples y recurrentes. En la región amazónica, 60 pacientes experimentaron episodios repetidos de infecciones por *C. jejuni*, los pacientes fueron infectados entre 2 y 6 veces a lo largo de los 4 años de duración del estudio, los intervalos de infección tuvieron una variación entre una infección y la subsiguiente—de 1 a 180 semanas. Aquellos individuos con infecciones repetidas, 85 % (n = 34) de las infecciones fueron causadas por cepas de diferente tipo capsular, mientras que, solamente el 15% (n = 6) participantes sufrieron infecciones recurrentes por cepas con un mismo tipo capsular. En Pampas de San Juan de Miraflores, 86 pacientes sufrieron infecciones repetidas por *C. jejuni*, de 2 a 15 infecciones dentro de los 15 meses de duración que tuvo el estudio. Las infecciones múltiples tuvieron un rango de 4 días entre la primer a la subsiguiente como el tiempo mínimo a 60 días como el periodo más largo entre infecciones recurrentes. De los 86 pacientes, 65 de ellos fueron analizados por la PCR múltiple para identificación de capsulas polisacáridas, de este grupo, 85 % (n = 55) pacientes fueron infectados por *C. jejuni* con un tipo capsular distinto en cada reinfección (5 semanas entre una infección y la subsiguiente), mientras que 15 % (n = 10) individuos experimentaron infecciones recurrentes con aislamientos con un mismo tipo capsular.

5.5 Análisis comparativo porcentual entre Perú y el resto del mundo

El análisis de las diferencias estadísticas entre proporciones de las frecuencias absolutas y acumuladas de las CPS halladas en Perú y los frecuencias absolutas y acumuladas globales demostraron que las CPS difieren significativamente en algunos tipos capsulares.

Se observaron diferencias significativas en función a la frecuencia absoluta global del complejo HS3 y la frecuencia absoluta en Pampas de San Juan de Miraflores, Santa Clara de Nanay y la frecuencia acumulada en Perú. De igual forma, se observó diferencias significativas en las frecuencias absolutas de los tipos capsulares HS15 y HS53 en Pampas de San Juan de Miraflores y en la frecuencia acumulada en Perú (tabla 11).

Tabla 11. Análisis de diferencia de proporciones entre las frecuencias absolutas (Pampas de San Juan y Santa Clara de Nanay) y frecuencias acumuladas (Perú) en función a las frecuencias absolutas a nivel mundial.

| Tipo Capsular | Pampas de San Juan | Santa Clara de Nanay | Perú |
|---------------|--------------------|----------------------|--------|
| HS1/44 | 0.602 | 0.711 | 0.518 |
| HS2 | 0.352 | 0.467 | 0.223 |
| Complejo HS3 | 0.035 | <0.001 | <0.001 |
| Complejo HS4 | 0.833 | 0.490 | 0.522 |
| HS15 | <0.001 | 0.153 | <0.001 |
| HS23/36 | 0.870 | 0.077 | 0.293 |
| HS53 | 0.004 | 0.629 | 0.018 |

Se observaron diferencias significativas entre las frecuencias absolutas del complejo HS3 en Pampas de San Juan, Santa Clara de Nanay en función a la frecuencia absoluta observada en países desarrollados, así como la frecuencia acumulada en Perú (tabla 12).

Asimismo, se observaron diferencias significativas entre las frecuencias absolutas del complejo capsular HS3 y el tipo capsular HS15 y las frecuencias absolutas observadas en países en vías de desarrollo. También se observaron

diferencias significativas entre las frecuencias acumuladas del complejo capsular HS3, el tipo capsular HS15 y países en vías de desarrollo (tabla 13).

Tabla 72. Análisis de diferencia de proporciones entre las frecuencias absolutas (Pampas de San Juan y Santa Clara de Nanay) y frecuencias acumuladas (Perú) en función a las frecuencias absolutas en países desarrollados.

| Tipo Capsular | Pampas de San Juan | Santa Clara de Nanay | Perú |
|---------------|--------------------|----------------------|--------|
| HS1/44 | 0.574 | 0.693 | 0.488 |
| HS2 | 0.260 | 0.336 | 0.129 |
| Complejo HS3 | 0.029 | <0.001 | <0.001 |
| Complejo HS4 | 0.571 | 0.365 | 0.293 |

Tabla 8. Análisis de diferencia de proporciones entre las frecuencias absolutas (Pampas de San Juan y Santa Clara de Nanay) y frecuencias acumuladas (Perú) en función a las frecuencias absolutas en países en vías de desarrollo.

| Tipo Capsular | Pampas de San Juan | Santa Clara de Nanay | Perú |
|---------------|--------------------|----------------------|-------|
| HS1/44 | 0.743 | 0.795 | 0.671 |
| HS2 | 0.867 | 0.791 | 0.999 |
| Complejo HS3 | 0.213 | 0.004 | 0.007 |
| Complejo HS4 | 0.174 | 0.824 | 0.251 |
| HS15 | 0.007 | 0.594 | 0.025 |
| HS23/36 | 0.906 | 0.351 | 0.733 |
| HS53 | 0.376 | 0.956 | 0.587 |

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta la presencia de siete tipos capsulares de *Campylobacter jejuni*, que incluye a los complejos capsulares HS4 (12,3 %), HS3 (10,8 %), HS15 (8,7 %), HS41 (5,6 %), HS10 (5,4 %), HS8/17 (5,2 %) y HS2 (5 %), representando más del 53 % del total de infecciones en las poblaciones pediátricas de dos regiones geográficas en Perú, una costera en Pampas de San Juan de Miraflores, Lima, y otra amazónica, en Santa Clara de Nanay, Loreto. Aunque estos lugares de estudio difieren en condiciones medioambientales, son similares entre sí en referencia a deficientes sistemas de sanidad, estado socio-económico y el contacto directo con aves de corral, todos factores que predisponen a la infección por este microorganismo. En Tailandia, utilizando la misma técnica de tipificación capsular, se observó que los 6 tipos capsulares más frecuentes acumularon más del 65 % del total de aislamientos (Poly *et al.*, 2015). En Egipto los 7 tipos capsulares más frecuentes sumaron más del 59 % de aislamientos tipificables (Sainato *et al.*, 2018). En los Estados Unidos, con un estudio con un número más limitado de muestras, se encontró que 4 tipos capsulares aportaron más del 63 % de aislamientos (Garrigan *et al.*, 2014). En Hawái, los 4 tipos capsulares más frecuentes representaron el 51 % del total de aislamientos (Ewers *et al.*, 2018). Recientemente, en el departamento de Loreto, Perú, los 5 tipos capsulares más frecuentes contribuyeron con el 49 % del total de aislamientos (Neitenbach *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran en concordancia con los hallazgos reportados en las diferentes regiones estudiadas, en todos los estudios se puede apreciar que un número reducido de tipos capsulares contribuyen con más del 50 % del total de aislamientos tipificados, con implicancias significativas para el desarrollo de una vacuna capsular que prevenga la infección por *C. jejuni*.

En este estudio se observó una distribución relativamente homogénea de un número reducido de tipos capsulares circulantes en Perú, siendo los tipos capsulares complejo HS4, complejo HS3, HS15, HS41, HS10, complejo HS8/17 y HS2 los más frecuentes. En concordancia con los hallazgos de este estudio, los tipos capsulares HS2, complejo HS3 y complejo HS4 se encontraban entre los tipos capsulares más frecuentes en los estudios realizados utilizando el PCR

múltiple de tipificación capsular en Estados Unidos (Garrigan *et al.*, 2014), Hawái (Ewers *et al.*, 2018), Tailandia (Poly *et al.*, 2015), Egipto (Sainato *et al.*, 2018) y Perú (Neitenbach *et al.*, 2019); así como también en las frecuencias globales observadas que utilizaron la técnica de serotipificación desarrollada por Penner (Pike *et al.*, 2013). Es importante resaltar las diferencias observadas en el presente estudio, los tipos capsulares HS15 y HS41 se encuentran entre los más frecuentes; no así en las frecuencias globales observadas (Pike *et al.*, 2013), ni en los estudios realizados en Estados Unidos (Garrigan *et al.*, 2014), Tailandia (Poly *et al.*, 2015) y Hawái (Ewers *et al.*, 2018). Sin embargo, en los estudios realizados en Egipto y Perú, las frecuencias observadas el tipo capsular HS15 son similares a las observadas en nuestro estudio. Además, en el presente estudio se observa una frecuencia superior a la encontrada en todos los estudios realizados hasta el momento con relación al tipo capsular HS41, es importante destacar que este tipo capsular se encuentra asociado al SGB (Heikema *et al.*, 2015) y que recientemente se encontraron 4 aislamientos de *C. jejuni* con este tipo capsular en pacientes con el SGB, aunque el número de muestras es insuficiente para concluir que *C. jejuni* es responsable del brote del SGB en Lima el 2019 (Alarico *et al.*, 2019), estudios adicionales podrían dar mayores luces al respecto. Las diferencias observadas en este estudio y otros estudios pueden explicarse por el aislamiento regional, además de la escasa información de los tipos capsulares circulantes en América del Sur y en nuestro país.

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre los tipos capsulares en participantes sintomáticos o asintomáticos. Algunos estudios han demostrado que la cápsula de *C. jejuni* juega un rol importante en la virulencia del patógeno (Bacon *et al.*, 2001; Maue *et al.*, 2013), no obstante, no se ha encontrado evidencia de que se encuentre asociada a la sintomatología (Crofts *et al.*, 2018; Guerry *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018; Neitenbach *et al.*, 2019), como también se ha demostrado en este estudio. Aunque en este estudio no se observó una asociación entre las capsulas y la sintomatología, se encontró que a mayor edad existe un mayor riesgo de ser infectado por un microorganismo con el tipo capsular HS15. Se sabe que las infecciones por *C. jejuni* son más frecuentes en niños menores de 2 años (Amour *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2013;

Platts-Mills y Kosek, 2014a), lo que podría sugerir que los tipos capsulares más prevalentes influyen sobre la distribución de la prevalencia en niños mayores de 2 años, sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre la prevalencia de los tipos capsulares en los participantes de 0 – 24 y 25 – 72 meses de edad, esta asociación podría verse influenciada por el diseño de estudio, co – infecciones y el tamaño de muestra, por lo tanto es necesario realizar más estudios que confirmen este hallazgo.

Debido a la relación que tienen los tipos capsulares con el SGB (Heikema *et al.*, 2015) y el rol estructural en una vacuna capsular conjugada bajo desarrollo (Poly *et al.*, 2018), es necesario determinar las frecuencias absolutas y acumuladas de los tipos capsulares a nivel global y establecer diferencias y similitudes entre las regiones estudiadas, sobre todo en aquellas regiones donde las prevalencias son altas y la información es escasa o nula (Pike *et al.*, 2013). Para tal fin es que se determinó que tipos capsulares circulantes en Perú tienen frecuencias similares o diferentes a los circulantes en países desarrollados, países en vías de desarrollo y a nivel global.

El análisis de diferencia entre proporciones reveló que no existen diferencias significativas entre las proporciones observadas en Pampas de San Juan y las observadas en Santa Clara de Nanay. En relación a las similitudes observadas con países en vías de desarrollo, no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias absolutas y acumuladas de los tipos capsulares complejo HS1/44, HS2, complejo HS4, complejo HS23/36 y HS53. Respecto al análisis comparativo llevado a cabo con países desarrollados, de forma similar, no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias absolutas de los tipos capsulares HS1/44, HS2 ni el complejo HS4; ni en las diferencias acumuladas a nivel global con los tipos capsulares HS1/44, HS2, complejo HS4, ni el complejo HS23/36. Estos resultados van en concordancia con lo reportado previamente (Ewers *et al.*, 2018; Garrigan *et al.*, 2014; Neitenbach *et al.*, 2019; Poly *et al.*, 2015; Sainato *et al.*, 2018), con excepción de los tipos capsulares complejo HS23/23 y HS53. Es de gran importancia resaltar las implicancias de estos hallazgos, una vacuna multivalente debería considerar, con la información recopilada hasta el momento, los tipos capsulares

HS1/44, HS2 y el complejo HS4, debido a las frecuencias observadas a nivel global; además, también es importante resaltar que estos mismos tipos capsulares se encuentran asociados al SGB. No obstante, también se hace necesario destacar las diferencias significativas, en todos los análisis se puede observar diferencias significativas con el tipo capsular complejo HS3. En el análisis comparativo entre países en vías de desarrollo y regiones, las diferencias son menores; sólo se observó que 1 de los 7 tipos capsulares, HS15 y el complejo HS3 en Pampas de San Juan de Miraflores y Santa Clara de Nanay, respectivamente, presentan diferencias significativas con las frecuencias absolutas observadas en países en vías de desarrollo; mientras que en las frecuencias acumuladas estos dos tipos capsulares, complejo HS3 y HS15, presentan diferencias significativas con las frecuencias observadas en los países en vías de desarrollo. Respecto al análisis comparativo entre los datos presentados en este estudio y las frecuencias absolutas y acumuladas de países desarrollados, el análisis se llevó a cabo sólo para los tipos capsulares complejo HS1/44, HS2, complejo HS3 y complejo HS4; en estos tipos capsulares sólo se observó diferencias significativas entre las frecuencias absolutas y acumuladas, a nivel regional y nacional, con el tipo capsular complejo HS3. Debido a la naturaleza multifactorial de la diversidad y distribución de los tipos capsulares circulantes, es complicado atribuir uno o más factores a las diferencias observadas. Por consiguiente, es probable que los diseños de estudio, tamaños muestrales, co – infecciones, brotes y exposición a animales reservorios de *C. jejuni* influyan las diferencias observadas.

La técnica de hemaglutinación pasiva desarrollada por Penner hace más de 30 años, considerada como el “gold estándar” para la tipificación de *C. jejuni*, requiere de antisueros y otros reactivos que son limitados a pocos laboratorios a nivel mundial (Poly *et al.*, 2015), de esta forma reduciendo la posibilidad de tipificar a *C. jejuni* mediante esta técnica. Además de lo antes mencionado, existen algunos kits comerciales de tipificación capsular que no incluyen todos los serotipos, proporcionando información epidemiológica incompleta (Pike *et al.*, 2013). Una limitación adicional de la técnica es la capacidad de *C. jejuni* de modular variablemente la expresión de la CPS (Bacon *et al.*, 2001), lo que explicaría el porcentaje de aislamientos no tipificables. Adicionalmente, la región

de biosíntesis de la CPS se encuentra entre las tres regiones hipervariables del genoma de *C. jejuni*, con capacidad de generar combinaciones variables de genes de biosíntesis de la CPS que repercuten en su estructura final (Sahin *et al.*, 2017). La técnica empleada en el presente trabajo elimina la limitación de acceder a los anti sueros de tipificación capsular y de la expresión variable de la CPS. Enfoques similares han sido desarrollados para la tipificación capsular de patógenos como *Klebsiella pneumoniae* Cowan *et al.* 1960 (*Enterobacteriaceae*) (Chen *et al.*, 2014; Cowan *et al.*, 1960; Turton *et al.*, 2010), estreptococos del grupo B (Poyart *et al.*, 2007) y variedades invasivas de *Streptococcus pneumoniae* Chester 1901 (*Streptococcaceae*) (Chester, 1901; Iraurgi *et al.*, 2010). Estas técnicas son utilizadas en países como España (Iraurgi *et al.*, 2010) y países de América Latina (Dias *et al.*, 2007) debido a su simplicidad y practicidad.

En la técnica de serotipificación convencional el porcentaje de aislamientos no tipificables es de alrededor del 14 % (Pike *et al.*, 2013), mientras que en este estudio se encontró que el 9 % del total de muestras analizadas no son tipificables mediante esta técnica. Enfoques similares encontraron que el 2,94 % de muestras no fueron tipificables en los Estados (Garrigan *et al.*, 2014), el 2,02 % en Tailandia (Poly *et al.*, 2015), 11,8 % en Egipto (Sainato *et al.*, 2018) y 5 % en Perú (Neitenbach *et al.*, 2019). Los porcentajes de aislamientos tipificables utilizando el PCR múltiple son menores que los reportados utilizando la técnica convencional de serotipificación y cercanos a los reportados en Egipto (Sainato *et al.*, 2018) y el reportado en Perú (Neitenbach *et al.*, 2019) mediante PCR, no obstante, los porcentajes son elevados si lo comparamos con los observados en Tailandia (Poly *et al.*, 2015) y los Estados Unidos (Garrigan *et al.*, 2014). No existe información relacionada a la estabilidad espacio-temporal de las CPS, teniendo en cuenta que *C. jejuni* es un transformante natural, es probable que se generen diversas combinaciones de tipos capsulares con mosaicos genéticos que le proporcionen características de virulencia incrementadas (Karlyshev *et al.*, 2005), como lo observado en un clon de *C. jejuni* SA en los Estados Unidos, con serotipo HS1/8 y un mosaico genético de varios tipos capsulares distintos (Sahin *et al.*, 2017). Esto sólo realza la necesidad de continuar realizando estudios epidemiológicos moleculares que

permitan determinar de forma rápida, más precisa y de mayor alcance los tipos capsulares circulantes en países endémicos.

En este estudio la mayoría de participantes que sufrieron reinfecciones por *C. jejuni*, fueron infectados por un microorganismo con un tipo capsular distinto en cada ocasión (92 %), esto podría sugerir un cierto nivel de protección inmunitaria luego de cada infección. Resultados similares fueron descritos por Miller y colaboradores (Miller *et al.*, 2005), en su estudio se describen una cantidad relativamente baja de tipos capsulares, entre ellos los tipos capsulares HS1/44, HS2 y el complejo HS4, que infectan a niños con edades comprendidas entre los 0 y los 4 años de edad. Además, también se ha observado que los anticuerpos IgG contra *C. jejuni* incrementan con la edad (Linneberg *et al.*, 2003), lo cual demuestra una inmunidad adquirida a este microorganismo.

Por el contrario, los participantes que tuvieron infecciones repetidas por *C. jejuni* con tipos capsulares idénticos en cada reinfección representan el 8 % del total. Hallazgos similares se han descrito en diversos estudios, entre ellos, en un estudio de voluntarios inmunocompetentes a ser infectados por *C. jejuni* CG8421 no se observó protección ante un desafío con una cepa homóloga, a pesar de encontrar títulos elevados de anticuerpos IgG e IgA después de la primera infección (Kirkpatrick *et al.*, 2013). En otro estudio se observó que un paciente inmunocompetente no desarrolló respuesta inmune adquirida después de una reinfección por *C. jejuni* (Baqar *et al.*, 2010). De forma similar, no se observó un incremento de citoquinas proinflamatorias ni anticuerpos contra *C. jejuni* CG8421 (Fimlaid *et al.*, 2014) La ausencia de respuesta ante la infección por *C. jejuni* se ha observado en aquellas personas que se encuentran en los extremos etarios (Peterson, 1994). Además, es posible que algunos pacientes sean portadores asintomáticos y que sigan excretando al microorganismo por varias semanas, estudios han reportado casos similares (Baqar *et al.*, 2010). En un caso aún más resaltante, un paciente excretó por diez años una cepa de *C. jejuni* ST45 y aunque no fueron reportados datos sobre respuesta inmune, se observó la evolución del microorganismo ante los diferentes antimicrobianos recetados al paciente, así como 129 polimorfismos de nucleótido simples no-sinónimas y 29 mutaciones por inserción-delección, generando un total de 159

proteínas diferentes entre los diversos clones aislados a lo largo de los diez años (Bloomfield *et al.*, 2018).

Los hallazgos del presente estudio tienen implicancia a nivel epidemiológico e inmunológico. Los datos aquí reportados son de relevancia para el desarrollo de una vacuna capsular conjugada, permitirán determinar que estrategias a seguir para el desarrollo de la misma y así generar una vacuna que incluya los tipos capsulares más prevalentes circulantes en diversas regiones, sobre todo en aquellas donde las prevalencias de infecciones por *C. jejuni* son elevadas. Además, como se mencionó previamente, existen algunos tipos capsulares asociados al SGB (Heikema *et al.*, 2015), algunos de ellos son prevalentes en el presente estudio, en particular el tipo capsular HS41 que ha sido recientemente reportado en aislamientos de *C. jejuni* en un brote importante del SGB en Lima el año 2019 (Alarico *et al.*, 2019; Gavilán *et al.*, 2019). Los hallazgos aquí reportados contribuirían a guiar en las medidas a tomar por parte de las autoridades sobre las medidas de vigilancia y control de brotes importantes de este microorganismo y, de esta forma, reducir su impacto en la salud pública.

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró que sólo siete tipos capsulares, complejo HS4 (12,3%), complejo HS3 (10,8%), HS15 (8,7%), HS41 (5,6%), HS10 (5,4%), complejo HS8/17 (5,2%) y HS2 (5%), representan el 53% del total de aislamientos.

No se observó asociación estadística significativa entre los tipos capsulares y la sintomatología, edad y lugar de estudio en las muestras analizadas.

Se observó diferencias significativas entre las frecuencias observadas en Perú y a nivel mundial sólo con los tipos capsulares complejo HS3, HS15 y HS53. Esto tiene implicancias epidemiológicas y en las consideraciones a tener en cuenta en el desarrollo de una vacuna capsular conjugada.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de vigilancia prospectivos en hospitales, sobre todo en pacientes pediátricos, que incluyan la detección todos los tipos capsulares de *C. jejuni*.

Para determinar la estabilidad espacio temporal de los tipos capsulares, se recomienda analizar aislamientos de *C. jejuni* de años anteriores de muestras fecales humanas y de aves de corral.

Debido a la asociación entre los tipos capsulares y el SGB, se recomienda realizar estudios prospectivos de los tipos capsulares de *C. jejuni* aislados en muestras fecales de pacientes con este síndrome.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarico, M.J.L., Vargas, J.A.D. la C., and Gutiérrez, M. del S.A. (2019). Síndrome de Guillain-Barré, brote epidémico en el Perú en junio de 2019. *Salud Pública de México* 61, 556–557.
- van Alphen, L.B., Wenzel, C.Q., Richards, M.R., Fodor, C., Ashmus, R.A., Stahl, M., Karlyshev, A.V., Wren, B.W., Stintzi, A., Miller, W.G., et al. (2014). Biological Roles of the O-Methyl Phosphoramidate Capsule Modification in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 9.
- Amour, C., Gratz, J., Mduma, E., Svensen, E., Rogawski, E.T., McGrath, M., Seidman, J.C., McCormick, B.J.J., Shrestha, S., Samie, A., et al. (2016). Epidemiology and Impact of *Campylobacter* Infection in Children in 8 Low-Resource Settings: Results From the MAL-ED Study. *Clin Infect Dis* 63, 1171–1179.
- Bachtiar, B.M., Coloe, P.J., and Fry, B.N. (2007). Knockout mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium–host interactions. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49, 149–154.
- Bacon, D.J., Szymanski, C.M., Burr, D.H., Silver, R.P., Alm, R.A., and Guerry, P. (2001). A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology* 40, 769–777.
- Baqar, S., Tribble, D.R., Carmolli, M., Sadigh, K., Poly, F., Porter, C., Larsson, C.J., Pierce, K.K., Guerry, P., Darsley, M., et al. (2010). Recrudescence of *Campylobacter jejuni* Infection in an Immunocompetent Adult following Experimental Infection with a Well-Characterized Organism. *Clin Vaccine Immunol* 17, 80–86.
- Baserisalehi, M., and Bahador, N. (2011). Chemotactic behavior of *Campylobacter* spp. in function of different temperatures (37 °C and 42 °C). *Anaerobe* 17, 459–462.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., and Blaser, M.J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157, 472–479.
- Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B., and Wang, W.L. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J. Clin. Microbiol.* 11, 309–313.
- Bloomfield, S.J., Midwinter, A.C., Biggs, P.J., French, N.P., Marshall, J.C., Hayman, D.T.S., Carter, P.E., Thornley, C., Yap, R., and Benschop, J. (2018). Long-term Colonization by *Campylobacter jejuni* Within a Human Host: Evolution, Antimicrobial Resistance, and Adaptation. *J Infect Dis* 217, 103–111.
- Bolton, F.J., and Coates, D. (1983). Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 115–125.

- Burnham, P.M., and Hendrixson, D.R. (2018). *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle. *Nature Reviews Microbiology* 1.
- Butzler, J.-P. (2004). *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 868–876.
- Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., and Dehaen, F. (1973). Related vibrio in stools. *The Journal of Pediatrics* 82, 493–495.
- Castellani, A., and Chalmers, A.J. (1919). *Manual of Tropical Medicine* (New York, NY: William Wood and CO.).
- Champion, O.L., Karlyshev, A.V., Senior, N.J., Woodward, M., La Ragione, R., Howard, S.L., Wren, B.W., and Titball, R.W. (2010). Insect Infection Model for *Campylobacter jejuni* Reveals That O-methyl Phosphoramidate Has Insecticidal Activity. *J Infect Dis* 201, 776–782.
- Chart, H., Frost, J.A., Oza, A., Thwaites, R., Gillanders, S., and Rowe, B. (1996). Heat-stable serotyping antigens expressed by strains of *Campylobacter jejuni* are probably capsular and not long-chain lipopolysaccharide. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 635–640.
- Chen, L., Chavda, K.D., Findlay, J., Peirano, G., Hopkins, K., Pitout, J.D.D., Bonomo, R.A., Woodford, N., DeLeo, F.R., and Kreiswirth, B.N. (2014). Multiplex PCR for Identification of Two Capsular Types in Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4196–4199.
- Chester, F.D. (1901). *A manual of determinative bacteriology* (New York, NY: The MacMillan).
- Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O., and Obi, C.L. (2002). Human *Campylobacteriosis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis* 8, 237–243.
- Corcionivoschi, N., Clyne, M., Lyons, A., Elmi, A., Gundogdu, O., Wren, B.W., Dorrell, N., Karlyshev, A.V., and Bourke, B. (2009). *Campylobacter jejuni* Cocultured with Epithelial Cells Reduces Surface Capsular Polysaccharide Expression. *Infect. Immun.* 77, 1959–1967.
- Corcoran, A.T., Annuk, H., and Moran, A.P. (2006). The structure of the lipid anchor of *Campylobacter jejuni* polysaccharide. *FEMS Microbiology Letters* 257, 228–235.
- Cowan, S.T., Steel, K.J., Shaw, C., and Duguid, J.P. (1960). A Classification of the *Klebsiella* Group. *Microbiology*, 23, 601–612.
- Crofts, A.A., Poly, F.M., Ewing, C.P., Kuroiwa, J.M., Rimmer, J.E., Harro, C., Sack, D., Talaat, K.R., Porter, C.K., Gutierrez, R.L., et al. (2018). *Campylobacter jejuni* transcriptional and genetic adaptation during human infection. *Nature Microbiology* 3, 494–502.

- Debruyne, L., Gevers, D., and Vandamme, P. (2008). Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In *Campylobacter*, (ASM Press), pp. 3–26.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., and Sternon, J. (1972). Acute Enteritis Due to Related *Vibrio*: First Positive Stool Cultures. *J Infect Dis.* 125, 390–392.
- Dias, C.A., Teixeira, L.M., Carvalho, M. da G., and Beall, B. (2007). Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of Medical Microbiology* 56, 1185–1188.
- Ewers, E.C., Anisowicz, S.K., Ferguson, T.M., Seronello, S.E., Barnhill, J.C., Lustik, M.B., Agee, W., Washington, M.A., Nahid, M.A., Burnett, M.W., et al. (2018). Antibiotic resistance, molecular characterizations, and clinical manifestations of Campylobacteriosis at a military medical center in Hawaii from 2012–2016: a retrospective analysis. *Scientific Reports* 8, 1–9.
- Ferrero, R.L., and Lee, A. (1988). Motility of *Campylobacter jejuni* in a Viscous Environment: Comparison with Conventional Rod-shaped Bacteria. *Microbiology* 134, 53–59.
- Fimlaid, K.A., Lindow, J.C., Tribble, D.R., Bunn, J.Y., Maue, A.C., and Kirkpatrick, B.D. (2014). Peripheral CD4+ T Cell Cytokine Responses Following Human Challenge and Re-Challenge with *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 9.
- Fitzgerald, C. (2015). *Campylobacter*. *Clinics in Laboratory Medicine* 35, 289–298.
- Firdich, E., Biboy, J., Adams, C., Lee, J., Ellermeier, J., Giolda, L.D., DiRita, V.J., Girardin, S.E., Vollmer, W., and Gaynor, E.C. (2012). Peptidoglycan-Modifying Enzyme Pgp1 Is Required for Helical Cell Shape and Pathogenicity Traits in *Campylobacter jejuni*. *PLOS Pathogens* 8, e1002602.
- Gao, B., Vorwerk, H., Huber, C., Lara-Tejero, M., Mohr, J., Goodman, A.L., Eisenreich, W., Galán, J.E., and Hofreuter, D. (2017). Metabolic and fitness determinants for in vitro growth and intestinal colonization of the bacterial pathogen *Campylobacter jejuni*. *PLOS Biology* 15, e2001390.
- Garrigan, C., Ettela, A., Poly, F., Guerry, P., and Nachamkin, I. (2014). Distribution of *Campylobacter jejuni* capsular types, 2007–2012, Philadelphia, PA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 80, 204–206.
- Gavilán, R., Escalante-Maldonado, O., Vences-Rosales, F., Vidal-Anzardo, M., and Miraval, M. (2019). Investigación de laboratorio de los casos de Síndrome Guillain-Barré en el Perú (Peru: Instituto Nacional de Salud).
- Gilbert, M., Mandrell, R.E., Parker, C.T., Li, J., and Vinogradov, E. (2007). Structural Analysis of the Capsular Polysaccharide from *Campylobacter jejuni* RM1221. *ChemBioChem* 8, 625–631.
- Guerry, P., Poly, F., Riddle, M., Maue, A.C., Chen, Y.-H., and Monteiro, M.A. (2012). *Campylobacter* Polysaccharide Capsules: Virulence and Vaccines. *Front Cell Infect Microbiol* 2.

Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., et al. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine* 12, e1001923.

Hazeleger, W.C., Wouters, J.A., Rombouts, F.M., and Abee, T. (1998). Physiological Activity of *Campylobacter jejuni* Far below the Minimal Growth Temperature. *Appl Environ Microbiol* 64, 3917–3922.

Heikema, A.P., Islam, Z., Horst-Kreft, D., Huizinga, R., Jacobs, B.C., Wagenaar, J.A., Poly, F., Guerry, P., Belkum, A. van, Parker, C.T., et al. (2015). *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain–Barré syndrome. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 852.e1-852.e9.

Heyndrickx, M., Lebbe, L., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Forsyth, G., Nazli, S., Ali, N., and Berkeley, R.C.W. (1998). A polyphasic reassessment of the genus *Aneurinibacillus*, reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Staufffer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and emended descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 331–331.

Hofreuter, D. (2014). Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol* 4.

Hofreuter, D., Novik, V., and Galán, J.E. (2008). Metabolic Diversity in *Campylobacter jejuni* Enhances Specific Tissue Colonization. *Cell Host & Microbe* 4, 425–433.

Ikeda, N., and Karlyshev, A.V. (2012). Putative mechanisms and biological role of coccoid form formation in *Campylobacter jejuni*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2, 41–49.

Iraurgui, P., Torres, M.J., Gandia, A., Vazquez, I., Cabrera, E.G., Obando, I., Garnacho, J., and Aznar, J. (2010). Modified sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of invasive pneumococci recovered from Seville. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1504–1507.

Jeon, B., Muraoka, W., Scupham, A., and Zhang, Q. (2009). Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 63, 462–468.

Jones, F.S., Orcutt, M., and Little, R.B. (1931). Vibrios (*Vibrio jejuni*, n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med* 53, 853–863.

Joshua, G.W.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V., and Wren, B.W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 152, 387–396.

Kaakoush, N.O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H.M., and Man, S.M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 687–720.

- Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N.A., Lastovica, A.J., and Wren, B.W. (2000). Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Molecular Microbiology* 35, 529–541.
- Karlyshev, A.V., McCrossan, M.V., and Wren, B.W. (2001). Demonstration of Polysaccharide Capsule in *Campylobacter jejuni* Using Electron Microscopy. *Infect Immun* 69, 5921–5924.
- Karlyshev, A.V., Champion, O.L., Churcher, C., Brisson, J.-R., Jarrell, H.C., Gilbert, M., Brochu, D., St Michael, F., Li, J., Wakarchuk, W.W., et al. (2005). Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. *Molecular Microbiology* 55, 90–103.
- Kelly, D.J. (2008). Complexity and Versatility in the Physiology and Metabolism of *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter*, Third Edition 41–61.
- Kendall, J.J., Barrero-Tobon, A.M., Hendrixson, D.R., and Kelly, D.J. (2014). Hemerythrins in the microaerophilic bacterium *Campylobacter jejuni* help protect key iron–sulphur cluster enzymes from oxidative damage. *Environmental Microbiology* 16, 1105–1121.
- Keo, T., Collins, J., Kunwar, P., Blaser, M.J., and Iovine, N.M. (2011). *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. *Virulence* 2, 30–40.
- Kim, S., Vela, A., Clohisey, S.M., Athanasiadou, S., Kaiser, P., Stevens, M.P., and Vervelde, L. (2018). Host-specific differences in the response of cultured macrophages to *Campylobacter jejuni* capsule and O-methyl phosphoramidate mutants. *Veterinary Research* 49, 3.
- Kirkpatrick, B.D., Lyon, C.E., Porter, C.K., Maue, A.C., Guerry, P., Pierce, K.K., Carmolli, M.P., Riddle, M.S., Larsson, C.J., Hawk, D., et al. (2013). Lack of Homologous Protection Against *Campylobacter jejuni* CG8421 in a Human Challenge Model. *Clin Infect Dis* 57, 1106–1113.
- Klena, J.D., Parker, C.T., Knibb, K., Ibbitt, J.C., Devane, P.M.L., Horn, S.T., Miller, W.G., and Konkel, M.E. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5549–5557.
- Kosek, M., Yori, P.P., Pan, W.K., Olortegui, M.P., Gilman, R.H., Perez, J., Chavez, C.B., Sanchez, G.M., Burga, R., and Hall, E. (2008). Epidemiology of Highly Endemic Multiply Antibiotic-Resistant Shigellosis in Children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics* 122, e541–e549.
- Leach, S., Harvey, P., and Wait, R. (1997). Changes with growth rate in the membrane lipid composition of and amino acid utilization by continuous cultures of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 631–640.

- Lee, G., Yori, P., Olortegui, M.P., Pan, W., Caulfield, L., Gilman, R.H., Sanders, J.W., Delgado, H.S., and Kosek, M. (2012). Comparative effects of vivax malaria, fever and diarrhoea on child growth. *Int J Epidemiol* 41, 531–539.
- Lee, G., Pan, W., Yori, P.P., Olortegui, M.P., Tilley, D., Gregory, M., Oberhelman, R., Burga, R., Chavez, C.B., and Kosek, M. (2013). Symptomatic and Asymptomatic *Campylobacter* Infections Associated with Reduced Growth in Peruvian Children. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2036.
- Leon-Kempis, M.D.R., Guccione, E., Mulholland, F., Williamson, M.P., and Kelly, D.J. (2006). The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Molecular Microbiology* 60, 1262–1275.
- Levin, R.E. (2007). *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology* 21, 271–347.
- Linneberg, A., Østergaard, C., Tvede, M., Andersen, L.P., Nielsen, N.H., Madsen, F., Frølund, L., Dirksen, A., and Jørgensen, T. (2003). IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: The Copenhagen Allergy Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 847–853.
- Maue, A.C., Mohawk, K.L., Giles, D.K., Poly, F., Ewing, C.P., Jiao, Y., Lee, G., Ma, Z., Monteiro, M.A., Hill, C.L., et al. (2013). The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. *Infection and Immunity* 81, 665–672.
- Maue, A.C., Poly, F., and Guerry, P. (2014). A capsule conjugate vaccine approach to prevent diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10, 1499–1504.
- McNally, D.J., Jarrell, H.C., Li, J., Khieu, N.H., Vinogradov, E., Szymanski, C.M., and Brisson, J.-R. (2005). 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* 272, 4407–4422.
- McNally, D.J., Jarrell, H.C., Khieu, N.H., Li, J., Vinogradov, E., Whitfield, D.M., Szymanski, C.M., and Brisson, J.-R. (2006). 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* 273, 3975–3989.
- McNally, D.J., Lamoureux, M.P., Karlyshev, A. V., Fiori, L.M., Li, J., Thacker, G., Coleman, R.A., Khieu, N.H., Wren, B.W., Brisson, J.R., et al. (2007). Commonality and biosynthesis of the O-methyl phosphoramidate capsule modification in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 28566–28576.
- Meier-Stauffer, K., Busse, H.-J., Rainey, F.A., Burghardt, J., Scheberl, A., Hollaus, F., Kuen, B., Makristathis, A., Sleytr, U.B., and Messner, P. (1996). Description of *Bacillus thermoaerophilus* sp. nov., To Include Sugar Beet Isolates and *Bacillus*

brevis ATCC 12990†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *46*, 532–541.

Michael, F. St., Szymanski, C.M., Li, J., Chan, K.H., Khieu, N.H., Larocque, S., Wakarchuk, W.W., Brisson, J.-R., and Monteiro, M.A. (2002). The structures of the lipooligosaccharide and capsule polysaccharide of *Campylobacter jejuni* genome sequenced strain NCTC 11168. *European Journal of Biochemistry* *269*, 5119–5136.

Miller, G., Dunn, G.M., Reid, T.M., Ogden, I.D., and Strachan, N.J. (2005). Does age acquired immunity confer selective protection to common serotypes of *Campylobacter jejuni*? *BMC Infectious Diseases* *5*, 66.

Monteiro, M.A., Baqar, S., Hall, E.R., Chen, Y.-H., Porter, C.K., Bentzel, D.E., Applebee, L., and Guerry, P. (2009). Capsule Polysaccharide Conjugate Vaccine against Diarrheal Disease Caused by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* *77*, 1128–1136.

Myers, J.D., and Kelly, D.J. (2005). A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* *151*, 233–242.

Neitenbach, B., Poly, F., Kuroiwa, J., Burga, R., Olortegui, M.P., Guerry, P., Kosek, M., and Porter, C.K. (2019). *Campylobacter jejuni* capsule types in a Peruvian birth cohort and associations with diarrhoeal disease severity. *Epidemiology & Infection* *147*.

Nyati, K.K., and Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. *Biomed Res Int* *2013*.

Oberhelman, R.A., Gilman, R.H., Sheen, P., Cordova, J., Taylor, D.N., Zimic, M., Meza, R., Perez, J., LeBron, C., Cabrera, L., et al. (2003). *Campylobacter* transmission in a Peruvian shantytown: a longitudinal study using strain typing of *campylobacter* isolates from chickens and humans in household clusters. *J. Infect. Dis.* *187*, 260–269.

Oberhelman, R.A., Gilman, R.H., Sheen, P., Cordova, J., Zimic, M., Cabrera, L., Meza, R., and Perez, J. (2006). An Intervention-Control Study of Corraling of Free-Ranging Chickens to Control *Campylobacter* Infections Among Children in a Peruvian Periurban Shantytown. *Am J Trop Med Hyg* *74*, 1054–1059.

On, S.L.W., Miller, W.G., Houf, K., Fox, J.G., and Vandamme, P. (2017). Minimal standards for describing new species belonging to the families *Campylobacteraceae* and *Helicobacteraceae*: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* *67*, 5296–5311.

Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., et al. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* *403*, 665–668.

- Parte AC (2018) LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:1825–1829.
- Pascoe, B., Méric, G., Murray, S., Yahara, K., Mageiros, L., Bowen, R., Jones, N.H., Jeeves, R.E., Lappin-Scott, H.M., Asakura, H., et al. (2015). Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolve from divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. *Environ Microbiol* 17, 4779–4789.
- Penner, J.L., and Hennessy, J.N. (1980). Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* 12, 732–737.
- Penner, J.L., Hennessy, J.N., and Congi, R.V. (1983). Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2, 378–383.
- Pequegnat, B., Laird, R.M., Ewing, C.P., Hill, C.L., Omari, E., Poly, F., Monteiro, M.A., and Guerry, P. (2017). Phase-Variable Changes in the Position of O-Methyl Phosphoramidate Modifications on the Polysaccharide Capsule of *Campylobacter jejuni* Modulate Serum Resistance. *J. Bacteriol.* 199, e00027-17.
- Peterson, M.C. (1994). Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *West J Med* 161, 148–152.
- Pike, B.L., Guerry, P., and Poly, F. (2013). Global Distribution of *Campylobacter jejuni* Penner Serotypes: A Systematic Review. *PLoS One* 8.
- Platts-Mills, J., and Kosek, M. (2014a). Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Current Opinion in Infectious Diseases* 27, 444–450.
- Platts-Mills, J.A., and Kosek, M. (2014b). Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27, 444–450.
- Poly, F., Serichantalergs, O., Schulman, M., Ju, J., Cates, C.N., Kanipes, M., Mason, C., and Guerry, P. (2011). Discrimination of Major Capsular Types of *Campylobacter jejuni* by Multiplex PCR[∇]. *J Clin Microbiol* 49, 1750–1757.
- Poly, F., Serichantalergs, O., Kuroiwa, J., Pootong, P., Mason, C., Guerry, P., and Parker, C.T. (2015). Updated *Campylobacter jejuni* Capsule PCR Multiplex Typing System and Its Application to Clinical Isolates from South and Southeast Asia. *PLoS One* 10.
- Poly, F., Noll, A.J., Riddle, M.S., and Porter, C.K. (2018). Update on *Campylobacter* vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 0, 1–12.
- Pope, J.E., Krizova, A., Garg, A.X., Thiessen-Philbrook, H., and Ouimet, J.M. (2007). *Campylobacter* Reactive Arthritis: A Systematic Review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 37, 48–55.
- Poyart, C., Tazi, A., Réglie-Poupet, H., Billoët, A., Tavares, N., Raymond, J., and Trieu-Cuot, P. (2007). Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 45, 1985–1988.

- Preston, M.A., and Penner, J.L. (1987). Structural and antigenic properties of lipopolysaccharides from serotype reference strains of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* *55*, 1806–1812.
- Rashid, S.T.A., Dakuna, I., Louie, H., Ng, D., Vandamme, P., Johnson, W., and Chan, V.L. (2000). Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-Like Species Based on the *glyA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology* *38*, 1488–1494.
- Roberts, I.S. (1996). The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* *50*, 285–315.
- Rollins, D.M., and Colwell, R.R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* *52*, 531–538.
- Sahin, O., Terhorst, S.A., Burrough, E.R., Shen, Z., Wu, Z., Dai, L., Tang, Y., Plummer, P.J., Ji, J., Yaeger, M.J., et al. (2017). Key Role of Capsular Polysaccharide in the Induction of Systemic Infection and Abortion by Hypervirulent *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* *85*.
- Sainato, R., ElGendy, A., Poly, F., Kuroiwa, J., Guerry, P., Riddle, M.S., and Porter, C.K. (2018). Epidemiology of *Campylobacter* Infections among Children in Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *98*, 581–585.
- Schnee, A.E., and Petri, W.A. (2017). *Campylobacter jejuni* and associated immune mechanisms: short-term effects and long-term implications for infants in low-income countries. *Curr Opin Infect Dis* *30*, 322–328.
- Sebald, M., and Veron, M. (1963). Base DNA Content And Classification Of *Vibrios*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* *105*, 897–910.
- Sellars, M.J., Hall, S.J., and Kelly, D.J. (2002). Growth of *Campylobacter jejuni* Supported by Respiration of Fumarate, Nitrate, Nitrite, Trimethylamine-N-Oxide, or Dimethyl Sulfoxide Requires Oxygen. *J. Bacteriol.* *184*, 4187–4196.
- Shigematsu, M., Umeda, A., Fujimoto, S., and Amako, K. (1998). Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *Journal of Medical Microbiology* *47*, 521–526.
- Skarp, C.P.A., Hänninen, M.-L., and Rautelin, H.I.K. (2016). *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection* *22*, 103–109.
- Skirrow, M.B. (1977). *Campylobacter enteritis*: a “new” disease. *Br Med J* *2*, 9–11.
- Smibert, R.M. (1981). The Genus *Campylobacter*. In *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 609–617.
- Sørensen, M.C.H., Alphen, V., B, L., Frodor, C., Crowley, S., Christensen, B.B., Szymanski, C.M., and Brøndsted, L. (2012). Phase Variable Expression of Capsular

Polysaccharide Modifications Allows *Campylobacter jejuni* to Avoid Bacteriophage Infection in Chickens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.

Stahl, M., Butcher, J., and Stintzi, A. (2012). Nutrient Acquisition and Metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol* 2.

Stahl, M., Fridrich, E., Vermeulen, J., Badayeva, Y., Li, X., Vallance, B.A., and Gaynor, E.C. (2016). The Helical Shape of *Campylobacter jejuni* Promotes In Vivo Pathogenesis by Aiding Transit through Intestinal Mucus and Colonization of Crypts. *Infect. Immun.* 84, 3399–3407.

Szymanski, C.M., and Gaynor, E. (2012). How a sugary bug gets through the day. *Gut Microbes* 3, 135–144.

Szymanski, C.M., King, M., Haardt, M., and Armstrong, G.D. (1995). *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect Immun* 63, 4295–4300.

Szymanski, C.M., Michael, F.S., Jarrell, H.C., Li, J., Gilbert, M., Larocque, S., Vinogradov, E., and Brisson, J.-R. (2003). 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.* 278, 24509–24520.

Taylor, Z.W., and Raushel, F.M. (2018). Cytidine Diphosphoramidate Kinase: An Enzyme Required for the Biosynthesis of the O-Methyl Phosphoramidate Modification in the Capsular Polysaccharides of *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry.*

Taylor, Z.W., Brown, H.A., Narindoshvili, T., Wenzel, C.Q., Szymanski, C.M., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2017a). Discovery of a Glutamine Kinase Required for the Biosynthesis of the O-Methyl Phosphoramidate Modifications Found in the Capsular Polysaccharides of *Campylobacter jejuni*. *Journal of the American Chemical Society* 139, 9463–9466.

Taylor, Z.W., Brown, H.A., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2017b). Biosynthesis of Nucleoside Diphosphoramidates in *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry* 56, 6079–6082.

Thibault, P., Logan, S.M., Kelly, J.F., Brisson, J.-R., Ewing, C.P., Trust, T.J., and Guerry, P. (2001). Identification of the Carbohydrate Moieties and Glycosylation Motifs in *Campylobacter jejuni* Flagellin. *J. Biol. Chem.* 276, 34862–34870.

Thomas, M.T., Shepherd, M., Poole, R.K., Vliet, A.H.M. van, Kelly, D.J., and Pearson, B.M. (2010). Two respiratory enzyme systems in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 contribute to growth on l-lactate. *Environmental Microbiology* 13, 48–61.

Turton, J.F., Perry, C., Elgohari, S., and Hampton, C.V. (2010). PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of Medical Microbiology* 59, 541–547.

- Velayudhan, J., and Kelly, D.J. (2002). Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148, 685–694.
- Velayudhan, J., Jones, M.A., Barrow, P.A., and Kelly, D.J. (2004). I-Serine Catabolism via an Oxygen-Labile I-Serine Dehydratase Is Essential for Colonization of the Avian Gut by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 72, 260–268.
- Véron, M., and Chatelain, R. (1973). 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* 23, 122–134.
- Whitfield, C. (2013). Structure and Assembly of *Escherichia coli* Capsules. *EcoSal Plus* 1.
- Willis, L.M., and Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research* 378, 35–44.
- Wong, A., Lange, D., Houle, S., Arbatsky, N.P., Valvano, M.A., Knirel, Y.A., Dozois, C.M., and Creuzenet, C. (2015). Role of capsular modified heptose in the virulence of *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 96, 1136–1158.
- Wren, B.W., Linton, D., Dorrell, N., and Karlyshev, A.V. (2001). Post genome analysis of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 36S-44S.
- Wright, J.A., Grant, A.J., Hurd, D., Harrison, M., Guccione, E.J., Kelly, D.J., and Maskell, D.J. (2009). Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology* 155, 80–94.
- Yori, P.P., Lee, G., Olórtegui, M.P., Chávez, C.B., Flores, J.T., Vasquez, A.O., Burga, R., Pinedo, S.R., Asayag, C.R., Black, R.E., et al. (2014). Santa Clara de Nanay: The MAL-ED Cohort in Peru. *Clin Infect Dis* 59, S310–S316.
- Young, N.M., Brisson, J.-R., Kelly, J., Watson, D.C., Tessier, L., Lanthier, P.H., Jarrell, H.C., Cadotte, N., Michael, F.S., Aberg, E., et al. (2002). Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 277, 42530–42539.
- Yuki, N. (2012). Guillain–Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist’s journey. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 88, 299–326.

X. ANEXOS

Tablas suplementarias.

Anexo 1. Heptosas y genes diana reconocidos en cada tipo capsular por el PCR múltiple de tipificación capsular.

| Tipo capsular | Genes MeOPN | Genes de Heptosas | Genes de Desoxi-heptosas | Estructura de la heptosa |
|---------------|-------------|-------------------|--------------------------|--|
| HS6/7 | - | - | - | N/A |
| HS9 | - | - | - | N/A |
| HS21 | - | - | - | N/A |
| HS27 | - | - | - | N/A |
| HS38 | - | - | - | N/A |
| HS55 | - | - | - | N/A |
| HS57 | - | - | - | N/A |
| HS1 | + | - | - | N/A |
| HS18 | + | - | - | N/A |
| HS19 | + | - | - | N/A |
| HS22 | + | - | - | N/A |
| HS37 | + | - | - | N/A |
| HS63 | + | - | - | N/A |
| HS2 | + | + | - | 6-O-Me-D-glicero-l-gluco-Hepp |
| HS33/35 | + | + | - | N/A |
| HS8/17 | - | + | + | N/A |
| HS11 | - | + | + | N/A |
| HS12 | - | + | + | N/A |
| HS32 | - | + | + | N/A |
| HS40 | - | + | + | N/A |
| HS41 | - | + | + | 6-Desoxi-β-D-altro-Hepp |
| HS42 | - | + | + | N/A |
| HS45 | - | + | + | N/A |
| HS53 | - | + | + | 6-Desoxi-α y β-D-mano-Hepp |
| HS58 | - | + | + | N/A |
| HS60 | - | + | + | N/A |
| HS3 | + | + | + | 6-Desoxi-α-D-ido-Hepp |
| HS4 complejo | + | + | + | 6-Desoxi-β-D-ido-Hepp |
| HS5/31 | + | + | + | N/A |
| HS10 | + | + | + | N/A |
| HS15 | + | + | + | 6-Desoxi-α-gulo-Hepp |
| HS29 | + | + | + | N/A |
| HS23/36 | + | + | + | 6-Desoxi-α-D-ido-Hepp 6-Desoxi-3Me-α-D-altro-Hepp D-glicero-α-D-altro-Hepp 3Me-D-glicero-α-D-altro-Hepp |
| HS44 | + | + | + | N/A |
| HS52 | + | + | + | N/A |

*N/A: No aplica

Anexo 2. Primers utilizados en cada mezcla maestra para la identificación de los tipos capsulares en el PCR múltiple de tipificación capsular.

| Tipo capsular | Tamaño del producto* | Primer forward | Primer reverse |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Mezcla alfa | | | |
| HS2 | 62 | CAGCATTGGAGGATTTACAATATAT | CATCCTAGCACAACTCACTTCA |
| Complejo HS3 | 149 | GGTAAGGTTGATTCTGGGTTAAT | AGATTAGGCCAAGCAATGATAA |
| HS4 A | 370 | TATATTTGGTTAGGGATCCA | CCTAACATATCATACACTACGGT |
| HS6/7 | 185 | CATACATTTGCTTTCAGATTCTTTAC | ACACGCCTATTGTTGTTGTTT |
| HS10 | 229 | TCTTATGCAGCACGCTGAT | CAAATTCATCGACTAGCCACT |
| HS15/31/58 | 325 | ACAGGTAATAAAATGTGCGAGTTT | ATGCATCTGCAACATCATCC |
| HS41 | 279 | CTTACATATGCTGGTAGAGATGATATG | TGCAATCTCTAAAGCCCAAG |
| HS53 | 251 | AGGCAAGCAGGAATTGTTT | TTAATTGCTCTTTGGCAATCTT |
| HS19 | 450 | CGAGGATGAAAATGCCTCAA | GGCAACAAACAAACATATTCAGA |
| HS63 | 522 | AAATTTGTTTTTCATATTTTACGG | TTAGGTGCGGTTACCAAAGG |
| HS33/35 | 819 | GTAGCGGATCAGCAGCATTAA | CATCAAAATCATCTTTTAAACACCAA |
| Mezcla beta | | | |
| HS1 | 610 | TTGGCGGTAAGTTTTTGAAGA | GCAAGAGAAACATCTCGCCTA |
| HS4 B | 652 | GTGGACATGGAAGTGGGACT | AAAACGTTTTAAAGTCAGTGGAAA |
| HS8/17 | 342 | TTCACGTGGAGGATTATTGG | TTGAACATTTTCATGTGTATTCCCTA |
| HS23/36 | 161 | GCTTGGGAGATGAATTTACCTTTA | GCTTTATATCTATCCAGTCCATTATCA |
| HS42 | 440 | ATGGTAAAACCGGCATTTCA | ATGCTTCAGTTCACCCAAA |
| HS57 | 100 | GGGGTAAAATAGCCAATTTCCA | CCAACAAGCCATATTTGTTTTTC |
| HS12 | 201 | GGAGGTAAAACGATATTCTCCTTAAA | TGAAGATTTTGAATGGATGTGTG |
| HS27 | 280 | GAATAAATATTGCTTCCATACCTTTCAA | GCAAAATGAGAATCTCCACCA |
| HS21 | 801 | TGGATGGGATATTGATGACAA | CCCTGGAAGAGTATGGGACA |
| HS5/31 | 857 | GGCAAAGAGCTTTATTTTGTGA | GCCGTAGCAACATCAAATACA |
| Mezcla gama | | | |
| HS44 | 148 | AGAAGATGCACTAGGCTCTAG | GCTATCTAATTCATCCCTG |
| HS5/32/45/60 | 128 | TCCACTTGGGATGAAAAGGA | ACCGCATACTTTGAGCCTGT |
| HS29 | 185 | CCCATATTTAAACAATGGAGTGA | TCATACTTTGAAAAACATTATCTGGA |
| HS22 | 216 | TCATGGAGCTGGAACAACAG | GCTGGAACCTCTTTTGCAATC |
| HS9 | 278 | AAAACATTTAGCTTGATTTTACCTTGG | GCGAAAAGACGGATTGTTTCA |
| HS37 | 541 | TGGATGAAGGGGACTTATGG | TGGTTTGAAGAGCATCAGCA |
| HS18 | 653 | CAGCTATAAATCATGGGTATTGGA | GTAATCAATACATTTTTCCTTGCTT |
| lpxA | 331 | ACAACCTTGGTGACGATGTTGTA | CAATCATGDGCDATATGASAATAHGCCAT |
| Mezcla delta | | | |
| HS32/58 | 85 | TCCGGAAAAATTTTATTTAGATTCTC | AACAATACCAGGATACCAATCTTCA |
| HS52 | 170 | AAAACACGCTATTAATCATGGTGAC | ATGTAGGCCAAGTTATACAACCTTTT |
| HS60 | 241 | GAAATCATTTTTATGATATTGTGGTT | TCACAGTCACAATAAATAGCCAAA |
| HS55 | 341 | GAGATGGTGGTGGTCATCAA | ACGTTGCAACCAATCCTTTG |
| HS32 | 420 | GCATACCAGATGGCTTTGG | AATGCAGCGTGCTTCTTATTT |
| HS11 | 540 | GAATTGGACATAACCACGGAAT | ATGCAAAGTGACATATTCTCC |
| HS40 | 636 | CAACCTTGGATGACAATAGAGA | ACCGTCAATATCATCAGGATTTA |

Anexo 3. Porcentajes de tipos capsulares identificados por serología a nivel mundial (Pike *et al.* 2013).

| CPS | Porcentajes observados | | |
|---------|---|------------------------------------|----------------------|
| | Países en vías de desarrollo (n = 20172) | Países desarrollados (n = 1222) | Total (n = 21394) |
| HS4 | 8,2 | 17,5 | 15,3 |
| HS2 | 5,0 | 16,5 | 13,5 |
| HS1/44 | 5,0 | 9,0 | 8,2 |
| HS11 | - | 3,5 | 3,1 |
| HS5/31 | 4,3 | 2,6 | 2,9 |
| HS8/17 | 3,5 | 2,8 | 2,8 |
| HS6/7 | - | 2,9 | 2,4 |
| HS3 | 3,7 | 2,1 | 2,2 |
| HS23/36 | 3,3 | - | 1,7 |
| HS53 | 2,9 | - | 0,7 |
| HS15 | 2,9 | - | 1,1 |

Anexo 4. Tabla resumen de las características demográficas del Pampas de San Juan de Miraflores y Santa clara de Nanay.

| | Población (n) | Género | | Edad (meses) | Muestras diarreicas | Muestras no diarréicas | No cultivables | No C. <i>jejuni</i> | Removidos |
|---|------------------|------------------|-----------------|-------------------|------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|-----------|
| | | Masculino (%) | Femenino (%) | | | | | | |
| Pampas de San Juan de Miraflores | 99 | 44.6 | 55.4 | 27.4 +/- 17.77 | 45 | 333 | 109 | 6 | 35 |
| Santa Clara de Nanay | 174 | 42.4 | 57.6 | 29 +/- 17.14 | 202 | 83 | 78 | 29 | 5 |
| Total | 273 | | | 28.2 +/- 17.54 | 247 | 416 | 187 | 35 | 40 |

Anexo 5. Proporción de los tipos capsulares por lugar de estudio.

| CPS | Localidad | | Valor p | I.C. | |
|----------------|--------------------|-------------|---------|---------|--------|
| | Pampas de San Juan | Santa Clara | | | |
| HS1//44 | 1.77 | 1.01 | 0.9387 | -0.1725 | 0.1885 |
| HS2 | 3.89 | 6.57 | 0.7699 | -0.2039 | 0.1499 |
| HS3 | 8.48 | 14.14 | 0.5283 | -0.2265 | 0.1145 |
| HS4 | 14.13 | 9.60 | 0.6271 | -0.1258 | 0.2158 |
| HS5/31 | 4.24 | 5.05 | 0.9202 | -0.1864 | 0.1684 |
| HS6/7 | 4.24 | 2.02 | 0.9396 | -0.2526 | 0.2346 |
| HS8/17 | 4.59 | 6.06 | 0.8674 | -0.1919 | 0.1619 |
| HS10 | 6.01 | 4.55 | 0.8730 | -0.1613 | 0.1913 |
| HS11 | 2.83 | 1.52 | 0.9011 | -0.1659 | 0.1919 |
| HS15 | 10.95 | 5.56 | 0.6012 | -0.1209 | 0.2289 |
| HS18 | 1.41 | 0.51 | 0.9415 | -0.1709 | 0.1889 |
| HS19 | 0.71 | 0.51 | 0.9836 | -0.1782 | 0.1822 |
| HS21 | 1.77 | 4.04 | 0.8252 | -0.2009 | 0.1569 |
| HS23/36 | 2.47 | 7.58 | 0.6384 | -0.2281 | 0.1261 |
| HS29 | 1.77 | 1.01 | 0.9387 | -0.1725 | 0.1885 |
| HS37 | 0.00 | 2.02 | - | - | - |
| HS40 | 1.06 | 6.06 | 0.7284 | -0.2296 | 0.1296 |
| HS41 | 5.30 | 6.06 | 0.9287 | -0.1846 | 0.1686 |
| HS42 | 2.83 | 3.54 | 0.9381 | -0.1848 | 0.1708 |
| HS44 | 2.83 | 0.51 | 0.8905 | -0.1564 | 0.2024 |
| HS45 | 1.77 | 0.00 | - | - | - |
| HS52 | 1.06 | 0.00 | - | - | - |
| HS53 | 6.36 | 2.53 | 0.7362 | -0.1385 | 0.2165 |
| HS55 | 0.00 | 2.02 | - | - | - |
| No tipificable | 9.54 | 7.58 | 0.8352 | -0.1548 | 0.1928 |

Anexo 6. Proporción de los tipos capsulares por edad.

| CPS | Edad en meses (%) | | Valor p | I.C. | |
|----------------|-------------------|---------|---------|--------|--------|
| | 0 - 24 | 25 - 72 | | | |
| HS1//44 | 2.02 | 0.85 | 0.9266 | -0.175 | 0.1946 |
| HS2 | 6.48 | 3.42 | 0.7506 | -0.136 | 0.1959 |
| HS3 | 11.74 | 9.83 | 0.8197 | -0.15 | 0.1904 |
| HS4 | 15.79 | 8.55 | 0.4582 | -0.1 | 0.2402 |
| HS5/31 | 5.26 | 3.85 | 0.9123 | -0.164 | 0.1844 |
| HS6/7 | 3.24 | 3.42 | 1.0000 | -0.088 | 0.0882 |
| HS8/17 | 4.05 | 6.41 | 0.8254 | -0.191 | 0.1509 |
| HS10 | 6.48 | 4.27 | 0.8237 | -0.148 | 0.1882 |
| HS11 | 2.02 | 2.56 | 0.9165 | -0.194 | 0.1735 |
| HS15 | 7.29 | 10.26 | 0.7330 | -0.198 | 0.1382 |
| HS18 | 1.62 | 0.43 | 0.8866 | -0.117 | 0.1572 |
| HS19 | 0.81 | 0.43 | 0.9201 | -0.128 | 0.1479 |
| HS21 | 2.02 | 3.42 | 0.9125 | -0.18 | 0.1603 |
| HS23/36 | 4.05 | 5.13 | 0.9107 | -0.183 | 0.1631 |
| HS29 | 0.81 | 2.14 | 0.9266 | -0.195 | 0.1746 |
| HS37 | 0.40 | 1.28 | - | - | - |
| HS40 | 3.24 | 2.99 | 1.0000 | -0.173 | 0.173 |
| HS41 | 4.86 | 6.41 | 0.9103 | -0.182 | 0.1622 |
| HS42 | 4.45 | 1.71 | 0.8515 | -0.16 | 0.1995 |
| HS44 | 0.81 | 2.99 | 0.8744 | -0.207 | 0.167 |
| HS45 | 1.21 | 0.85 | 1.0000 | -0.178 | 0.178 |
| HS52 | 0.81 | 0.43 | 0.9201 | -0.128 | 0.1479 |
| HS53 | 2.83 | 6.84 | 0.7053 | -0.218 | 0.1378 |
| HS55 | 0.00 | 1.71 | - | - | - |
| No tipificable | 7.69 | 9.83 | 0.8225 | -0.193 | 0.153 |

Anexo 7. Proporción de los tipos capsulares por sintomatología.

| CPS | Sintomatología | | Valor p | I.C. | |
|----------------|----------------|-------------|---------|---------|--------|
| | Asintomático | Sintomático | | | |
| HS1//44 | 1.57 | 1.23 | 0.9685 | -0.1827 | 0.1907 |
| HS2 | 3.45 | 8.02 | 0.6335 | -0.2283 | 0.1363 |
| HS3 | 10.66 | 11.11 | 0.9648 | -0.1825 | 0.1745 |
| HS4 | 11.91 | 12.96 | 0.9019 | -0.1879 | 0.1659 |
| HS5/31 | 5.33 | 3.09 | 0.8397 | -0.1635 | 0.2075 |
| HS6/7 | 4.39 | 1.23 | 0.8290 | -0.1532 | 0.2172 |
| HS8/17 | 5.64 | 4.32 | 0.8958 | -0.1710 | 0.1970 |
| HS10 | 5.96 | 4.32 | 0.8665 | -0.1674 | 0.2014 |
| HS11 | 2.19 | 2.47 | 0.9746 | -0.1907 | 0.1846 |
| HS15 | 8.78 | 8.64 | 0.9827 | -0.1785 | 0.1825 |
| HS18 | 1.25 | 0.62 | 0.9534 | -0.1807 | 0.1947 |
| HS19 | 0.63 | 0.62 | 1.0000 | -0.1854 | 0.1854 |
| HS21 | 1.25 | 5.56 | 0.7236 | -0.2298 | 0.1438 |
| HS23/36 | 3.76 | 6.17 | 0.7950 | -0.2085 | 0.1605 |
| HS29 | 1.88 | 0.62 | 0.9261 | -0.1737 | 0.1997 |
| HS37 | 0.94 | 0.62 | 0.9771 | -0.1823 | 0.1883 |
| HS40 | 1.25 | 6.79 | 0.6751 | -0.2406 | 0.1306 |
| HS41 | 4.70 | 7.41 | 0.7673 | -0.2098 | 0.1558 |
| HS42 | 3.76 | 1.85 | 0.8713 | -0.1696 | 0.2076 |
| HS44 | 2.51 | 0.62 | 0.9047 | -0.1671 | 0.2051 |
| HS45 | 1.25 | 0.62 | 0.9534 | -0.1807 | 0.1947 |
| HS52 | 0.94 | 0.00 | - | - | - |
| HS53 | 5.33 | 3.70 | 0.8758 | -0.1688 | 0.2008 |
| HS55 | 0.94 | 0.62 | 0.9771 | -0.1823 | 0.1883 |
| No tipificable | 9.72 | 6.79 | 0.7721 | -0.1526 | 0.2106 |