

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
CENTRO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CEI)
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN
EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Factores de riesgos de Campylobacteriosis en niños menores de 1
año de edad de la ciudad de León, Nicaragua.

Autor:

Lic. Roberto José Herrera García.

Tutores:

Samuel Vílchez, PhD.

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Médicas

Erick Amaya, PhD.

Profesor Titular

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Médicas

Septiembre del 2020

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios, quien poco a poco fue dándome un día más de sabiduría y guiándome en el caminar de mi vida, dándome fuerzas para continuar y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi familia, quienes han estado apoyándome desde los inicios de mi formación profesional y han sido un pilar fundamental en lograr culminar mis metas.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito y aquellas que compartieron sus conocimientos para que yo pudiera alcanzar mis anhelos más deseados.

AGRADECIMIENTOS

Para alcanzar las metas de nuestras vidas, es fundamental tener a personas que funcionan como guía en el difícil camino de la formación profesional.

Por ello agradezco a:

Mis tutores, más que eso mis amigos, Dr. Samuel Vílchez y Dr. Erick Amaya, quienes se tomaron el tiempo y la dedicación de brindar sus conocimientos para la mejora en la construcción de mi tesis.

A todo el equipo de personas que colaboraron del proyecto SAGE quienes aportaron de una u otra manera tanto dentro como fuera del laboratorio, brindando la información necesaria en el avance de mi tesis.

Fuente de financiamiento:

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos [R01AI127845 y K24AI141744], el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León y al Centro de Enfermedades Infecciosas, UNAN – León.

RESUMEN

La *Campylobacteriosis* —una enfermedad bacteriana zoonótica observada en todo el mundo—. Informes recientes indican que especies de *Campylobacter* no *jejuni/coli* están emergiendo como causantes de gastroenteritis bacteriana en humanos. Por lo que, nos proyectamos a determinar la carga, características clínicas y los factores de riesgos determinantes para adquirir una infección sintomática por *Campylobacter spp* en niños hasta 1 año de edad. A la vez, investigar las especies de *Campylobacter* que circulan y están relacionadas a gastroenteritis en infantes.

En el periodo de junio 2017 a julio 2018, se colectaron datos demográficos de 173 niños entre 0 – 12 meses de edad, posteriormente, siguiendo un diseño de caso – control anidado, se seleccionaron 54 muestras de primeros episodios de diarrea por *Campylobacter spp* (Casos) y 108 no diarreicas (Controles), pareados por sexo y edad al momento del episodio. Muestras de heces recolectadas fueron ensayadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR *por sus siglas en inglés*). Se determinaron los factores de riesgos por medio de un análisis bivariado y de regresión logística multivariada.

Los 173 niños experimentaron 293 episodios de gastroenteritis, identificándose *Campylobacter spp* en el 20.1% de casos, con una tasa de incidencia de 11 por 10,000 personas – días, de los cuales las características clínicas de mayor frecuencia radicaron en diarrea, fiebre y vómito, y el 44% de los casos estaban coinfectados con al menos un virus entérico, incluidos Rotavirus, Norovirus, Sapovirus, Adenovirus y/o Astrovirus.

Como factor protector se observó el “Nivel de pobreza” [$P=0.02$, ORa=0.38, IC95% (0.16, 0.91)], por otro lado se identificaron como factores de riesgo la “presencia de aves de corral en el hogar” y “haber tenido un primer episodio de gastroenteritis por alguna otra causa” [$P=0.02$, ORa = 3.75, IC95% (1.44, 9.79); $P= 0.001$, ORa=3.33, IC95% (1.42, 7.78), respectivamente].

Fueron identificadas especies de *C. jejuni/coli* en un 66.1%, y especies no *jejuni / coli* en el 33.9% de los episodios de gastroenteritis. Entre las especies no *jejuni/coli* se logró identificar el 15% *C. concicus*, 5% *C. hyointestinalis*, 5% *C. vulpis* y 5% *C. hominis*. Siendo el caso de *C. vulpis* el primer caso reportado hasta el momento en humanos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
5. OBJETIVOS.....	8
5.1. Objetivo general:	8
5.2. Objetivos específicos:	8
6. MARCO TEÓRICO	9
6.1. HISTORIA.....	9
6.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	9
6.3. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO	10
6.4. EPIDEMIOLOGÍA	11
6.5. TRANSMISIÓN	13
6.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	14
6.7. FACTORES DE VIRULENCIA	14
6.8. PATOGENIA.....	17
6.9. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	18
6.10. RESISTENCIA.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1. Recolección y procesamiento de la muestra:	21
7.2. Extracción y purificación de ADN genómico.....	22
7.3. Ensayo de RT-PCR para la identificación de <i>Campylobacter spp</i> y <i>C. jejuni/coli</i> 23	
7.4. Secuenciación de Sanger para la identificación de especies de <i>Campylobacter</i>	25
7.5. Aspectos éticos:.....	26
7.6. Plan de análisis de los resultados:.....	26
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Incidencia, Características Clínicas y Carga de gastroenteritis por <i>Campylobacter spp</i>	29
8.2 Factores de riesgos de la Campylobacteriosis.....	31
8.3 Especies de <i>Campylobacter</i> que circulan en la población en estudio.....	33
9. DISCUSIÓN.....	34
10. CONCLUSIONES	37
11. REFERENCIAS	38
12. ANEXOS	45

1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis es una razón común de hospitalización en infantes y una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, siendo este grupo etario los que se ven afectados de manera desproporcionada.⁽¹⁾ Un estudio de revisión sistémica estima que cada año ocurren alrededor de 1.700 millones de episodios de Gastroenteritis Aguda Infecciosa y 700 mil muertes por esta causa en niños menores de cinco años de edad a nivel mundial.⁽²⁾ La Gastroenteritis Aguda Infecciosa se presenta mayormente en lactantes de países de medio y bajo ingresos, grupo en el cual aún representa la segunda causa de muerte infecciosa.⁽³⁾

Existe una diversidad de bacterias, virus y parásitos que puede causar Gastroenteritis Aguda Infecciosa.^(4, 5) Los agentes más frecuentemente involucrados varían de acuerdo a las condiciones socioeconómicas y sanitarias de la región y con la edad del paciente.⁽⁶⁾ En países con mejores condiciones sanitarias, por ejemplo Chile, tiende a predominar la etiología viral (Rotavirus y Norovirus), mientras que las bacterias (*Campylobacter spp*, *Salmonella* y *Shiguella spp*) son más frecuentes en zonas de medio bajos y bajos ingresos.^(5, 7) Sin embargo no es una regla, en Dinamarca se observa a *Campylobacter spp* como segunda casusa de gastroenteritis bacteriana en niños menores de 5 años de edad.⁽⁴⁾ Las variaciones por edad se explican por los cambios en hábitos alimentarios y conductas (fuente de contagio), adquisición de respuesta inmune efectiva y presencia de comorbilidades.⁽⁵⁾

Campylobacter es uno de los agentes etiológicos y principales causante de Gastroenteritis bacteriana en niños menores de cinco año de edad en países de medio y bajo ingresos.^(8, 9) *Campylobacter* es el segundo patógeno bacteriano de mayor incidencia encontrado en niños de 0 a 11 meses de edad y el tercero en niños de 12 a 24 meses de edad procedentes de las regiones de Asia, África y Sur América.⁽¹⁰⁾ Es poco frecuente que las Campylobacteriosis resulten en serias complicaciones post-infección tales como bacteremia⁽¹¹⁾, artritis reactiva^(12, 13) y síndrome de Guillain-Barré.^(14, 15)

La transmisión al ser humano principalmente es zoonótica, por contacto directo o indirecto, puesto que se transmite por productos alimenticios de origen animal^(16, 17), así

como carnes de aves de corral⁽¹⁸⁾, vacunos, porcinos⁽¹⁶⁾, ovinos⁽¹⁹⁾ y esporádicamente con mariscos.^(20, 21) También, está asociado con animales de compañía, como perros, gatos^(22, 23) y aves ⁽²⁴⁾. Por lo tanto, representa un mayor desafío de salud pública.

Este género incluye a más de 18 especies de las cuales *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son los patógenos comúnmente asociados con la enfermedad en humanos^(17, 25, 26). Sin embargo, también se han reportado que especies poco frecuentes ocasionan enfermedades en humanos tales como *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter troglodytis*, *Campylobacter upsaliensis* y *Campylobacter concisus*.⁽¹⁰⁾

En Nicaragua, un único estudio reportó la presencia de *Campylobacter spp* en niños con diarrea, haciendo uso de métodos clásicos de cultivo bacteriológico, reportando una prevalencia del 0.3% (1/337).⁽²⁷⁾ Estos métodos tradicionales de cultivo bacteriano para la detección de *Campylobacter spp* que involucran el aislamiento del microorganismo, requieren mucha experiencia, trabajo y tiempo, lo cual se traduce en una baja sensibilidad diagnóstica y una pobre valoración de la importancia de *Campylobacter spp*.⁽²⁸⁾ Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado nuevos métodos moleculares basados en la detección del ADN de *Campylobacter*, ya sea por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional o por PCR en Tiempo Real (RT – PCR).⁽²⁹⁾ Así, para poder investigar la verdadera carga de Campylobacteriosis y sus factores de riesgo, se plantea el presente estudio empleando un ensayo de alta sensibilidad y especificidad (RT- PCR) para la identificación de *Campylobacter spp* en el primer año de vida de infantes Leoneses, y su posterior identificación de especies en conjunto con secuenciación de Sanger.

2. ANTECEDENTES

En 1980, *Kuratsujil T* y colaboradores realizaron un estudio en el hospital de la ciudad de Yamato – Japón enfocado en la “Gastroenteritis por *Campylobacter* en niños”, observaron que 16 (4.3%) de 374 niños con diarrea, tuvieron *C. jejuni* identificados por método de cultivo bacteriológico, obteniendo así a *C. jejuni* como la tercer causa de gastroenteritis bacteriana en una población pediátrica de la ciudad de Yamato.⁽³⁰⁾

En 1987, *Carmona F* y colaboradores realizaron un estudio en Cali, Valle, Colombia, enfocado en “*C. jejuni* en niños con enfermedad diarreica aguda”, obtuvieron 31 (13.4%) muestras positivas para *C. jejuni* de 231 niños con diarrea aguda, utilizando el método de cultivo bacteriológico.⁽³¹⁾

En 1999-2000, *Kapperud G* y colaboradores llevaron a cabo un estudio prospectivo de casos y controles de Campylobacteriosis esporádica, en Noruega, por para identificar los factores de riesgo prevenibles y los factores potencialmente protectores. Se incluyeron 212 casos y 422 controles de población. En el análisis de regresión logística condicional, se encontró que los factores estaban asociados de manera independiente con un mayor riesgo de infección por *Campylobacter spp*: beber agua no potable, comer en barbacoas, comer aves de corral compradas semi-cruadas, tener exposición laboral a animales y comer carne de cerdo poco cocida. Los siguientes factores se relacionaron de forma independiente con una disminución del riesgo: comer cordero, comer frutas crudas o bayas y nadar. Además, el agua potable puede constituir el reservorio común que vincula la infección en humanos y animales, incluida las aves de corral y las aves silvestres.⁽³²⁾

En 2010, *Stein C* y colaboradores realizaron un estudio basado en edades específicas, orientado que “*Campylobacter spp* como la principal causa de gastroenteritis bacteriana y disentería en niños hospitalizados” en la región occidental de Galilea en Israel, obteniendo que de 99 niños hospitalizados con gastroenteritis bacteriana *Campylobacter spp* fue identificada utilizando cultivo bacteriológico de las heces diarreicas, como el mayor patógeno implicado en la gastroenteritis con 61% de los casos. En cuanto a la disentería *Campylobacter spp* fue el mayor de los patógenos encontrados, con 72% positivo para este patógeno de los 62 casos hospitalizados.⁽³³⁾

En ese mismo año en Nicaragua, se efectuó un estudio por *Becker S* y colaboradores, enfocado en “Etiología de la diarrea infantil después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus: un estudio prospectivo de base poblacional en Nicaragua,” encontrando *Campylobacter spp* en el 0.3% (1) de 337 niños que experimentaron al menos un episodio de diarrea. Estos resultados se obtuvieron haciendo uso del método de cultivo clásico bacteriológico.⁽²⁷⁾

En el 2012, *Lee G* y colaboradores, usando datos de una cohorte prospectiva del año, en la zona Peruana Amazona, de 442 niños de 0 a 72 meses, obtuvieron que en pacientes sintomáticos el 8,3% de los episodios de diarrea se asociaron con *Campylobacter spp* (tasa de incidencia bruta = 0,37 episodios / año) y el 4,9% de las muestras asintomáticas trimestrales fueron positivas para *Campylobacter spp*.⁽³⁴⁾

Diferentes estudios han mostrado evidencia que *Campylobacter* es una bacteria zoonótica, por ejemplo en 2012 se realizó un estudio de tipo transversal que identificó la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras fecales humanas y de ganado, elaborado por *Osbyer K* y colaboradores en una región de Cambodia. Se detectó mediante PCR convencional y se identificaron los factores de riesgo zoonóticos asociados con la positividad de *Campylobacter* en humanos. En total, se tomaron muestras de 681 humanos y 753 animales (pollos, patos, cerdos, ganado) de 269 hogares. Los niños menores de 16 años fueron más frecuentemente positivos para *Campylobacter* (19%) que los adultos (8%). *Campylobacter* fue altamente prevalente en cerdos (72%) y pollos (56%) y los factores de riesgo asociados con *Campylobacter* humanos se identificaron positivamente en toda la cadena de producción de carne: Cerdos y pollos de crianza.⁽³⁵⁾

A pesar que, los principales reportes de gastroenteritis por *Campylobacter* orientan que *C. jejuni* y *C. coli* son las principales especies asociada a la enfermedad en humanos, un estudio realizado por *Platts J* y colaboradores en 2014 en una cohorte desde el nacimiento (MAL – ED) compuesta por aproximadamente 2000 infantes enrolados (cumpliendo su primer año de vida en febrero del 2013) de 8 diferentes países, en donde ellos seleccionaron a Bangladesh, Perú y Tanzania, encontraron la presencia de *C. hyointestinalis* (52.8 %), *C. concisus* (3.7 %), *C. troglodytis* (33.9 %), *C. upsaliensis* (7.5 %) y *C. jejuni/coli* (3.8 %), resultados obtenidos por Enzima InmunoEnsayo, RT – PCR y secuenciación de especie específica.⁽³⁶⁾

Otro estudio realizado en New Delhi, India, por *Ghosh R* y colaboradores en 2016, dirigido a la búsqueda de “Perfiles clínicos y epidemiológicos de *Campylobacter* asociados a diarrea entre niños de New Delhi”. Utilizando el método de cultivo bacteriológico en las heces, encontraron a 32 (15.61%) muestras de heces diarreicas positivas para *Campylobacter spp.*⁽³⁷⁾

El aporte realizado por *Sainato R* y colaboradores en asociación con el Ministerio de Salud de Egipto, la Unidad de Investigación Médica Naval Número 3 (NAMRU-3) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en población pediátrica con diarrea en Egipto en 2018, dirigido a la “Epidemiología de la infección por *Campylobacter* entre niños en Egipto”. Observaron que de 1,057 niños captados, se encontraron 322 (30.5%) aislados de *Campylobacter* (189 *C. jejuni* y 127 *C. coli*), el aislamiento se realizó por método de cultivo bacteriológico de las heces diarreicas.⁽³⁸⁾

De la cohorte MAL-ED del 2018, *Rogawski E* y colaboradores. Utilizaron diagnósticos moleculares (RT - PCR) en muestras de heces no diarreicas para la detección de *Campylobacter spp*, obteniendo 8398 (28%) de 30,030 muestras.⁽³⁹⁾ Tomando como base nuevamente la cohorte MAL – ED, *Platts J* y colaboradores en ese mismo año se enfocaron en evaluar “La etiología, la carga y las características clínicas de la diarrea” en niños en entornos de bajos recursos, haciendo uso de métodos cuantitativos de diagnóstico molecular (RT – PCR), se seleccionaron 1715 infantes completados sus 2 años de edad, obteniendo 40406 muestras de heces para análisis por RT – PCR, la incidencia para *C. jejuni/coli* fue de 12.1 (por cada 100 niños al año), de los países involucrados se observó que la alta incidencia provenía de Perú.⁽¹⁰⁾

Campylobacter spp es un agente bacteriano responsable de muchas de las gastroenteritis bacteriana diagnosticadas en diversas partes del mundo, raramente puede ser causa de complicaciones graves tales como artritis reactiva, síndrome de Guillain-Barré y bacteremia. La carga y las especies que circulan en Latino América, específicamente en Nicaragua es poco conocida a pesar de que existe un estudio al respecto, sin embargo el dato reflejado por dicho estudio podría ser poco certero por el uso diagnóstico utilizado (cultivo bacteriológico), por lo que un estudio como el nuestro podría revelar la verdadera carga y especies circulantes en nuestro medio, gracias al uso del método molecular (RT – PCR) y secuenciación de Sanger.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies del género de *Campylobacter* están frecuentemente implicadas en gastroenteritis en humanos en países de bajo y mediano ingreso (*LMIC por sus siglas en inglés*), a la vez estas se reportan como infecciones zoonóticas siendo su principal vehículo de transmisión los alimentos de origen avícola y bovino. Entre los factores de riesgo asociados a gastroenteritis por *Campylobacter spp* en estos países están principalmente las malas condiciones higiénicas y la presencia de animales en el hogar. Sin embargo, la dinámica natural y factores asociados a las infecciones por *Campylobacter spp* no se comprende en su totalidad. Paralelamente, este género también se ha asociado a un déficit en el desarrollo físico y cognitivo de los infantes, así como a síndromes autoinmunes *i.e.*, Guillain-Barré. Adicionalmente, las especies *C. jejuni* y *C. coli* resaltan por estar dentro de los patógenos entéricos más frecuentes detectados en casos de gastroenteritis en los primeros años de vida, dejando a las otras especies de *Campylobacter* poco valoradas por no ser comúnmente reportadas como patógenas en humanos.

La descripción de la carga y consecuencias reales de la Campylobacteriosis se ha visto limitada en décadas por la baja sensibilidad de su ensayo diagnóstico como es el cultivo microbiológico clásico, sobre todo en países como Nicaragua. Sin embargo, el desarrollo de ensayos más sensibles como el RT-PCR, permite lograr una mejor valoración de la Campylobacteriosis. Así, con el presente estudio se pretende contribuir a la generación del conocimiento sobre la carga, características clínicas y los posibles factores que contribuyen a adquirir las infecciones por *Campylobacter spp* en niños de la ciudad de León, Nicaragua; mediante ensayos moleculares. Además, de la identificación de especies emergentes de *Campylobacter* asociadas a gastroenteritis y sus complicaciones.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la carga, las características clínicas, los factores de riesgos y las especies asociadas a gastroenteritis por *Campylobacter spp* en niños hasta 1 año de edad de la ciudad León, Nicaragua?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar la carga, las características clínicas, los factores de riesgos y las especies asociadas a gastroenteritis por *Campylobacter* spp en niños hasta 1 año de edad de la ciudad León, Nicaragua.

5.2. Objetivos específicos:

- ❖ Describir características clínicas y epidemiológicas de los niños en estudio.
- ❖ Investigar la presencia de *Campylobacter* spp en muestras diarreicas y no diarreicas de niños menores o iguales a 12 meses.
- ❖ Determinar el riesgo atribuible de *Campylobacteriosis* en niños hasta 1 año de edad con gastroenteritis.
- ❖ Evaluar si existe asociación entre las infecciones sintomáticas causadas por *Campylobacter* spp y las características clínicas-epidemiológicas como potenciales factores de riesgo.
- ❖ Establecer por medio del empleo de un ensayo de RT-PCR y secuenciación de Sanger que especies de *Campylobacter* circulan en la población en estudio.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. HISTORIA

El género *Campylobacter* fue descrita por primera vez en 1886 por el pediatra y bacteriólogo alemán Theodore Escherich (1857 – 1911),⁽⁴⁰⁾. Publico una serie de artículos en los que describió estas bacterias curvas o espirales presentes en el colon de los niños que habían muerto a causa de lo que él denominó como “cólera infantil”, no obstante Escherich creía que estas bacterias espirales no desempeñaban ningún papel etiológico.⁽⁴¹⁾

El género *Campylobacter* es una de las causas más comunes de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos, teniendo el puesto número 2 en todo el mundo.⁽⁴²⁾ Hacía mucho tiempo que habían sido descritas por Escherich, las bacterias no se aislaron con éxito a partir de muestras fecales humanas hasta el año 1972. Durante mucho tiempo se clasificaron entre los *vibrios*, pero Sebald y Veron propusieron el género *Campylobacter* en 1963 para estos bacilos delgados y curvos que difieren del cólera clásico y de los *vibrios* halófilos^(43, 44)

Las especies de *Campylobacter* no fueron reconocidas como patógenos humanos hasta la década de los 70s, Las especies de *Campylobacter* termofilicas entre las que se incluyen *C. jejuni* y *C. coli* se consideran como el origen más frecuente de gastroenteritis en el hombre; ocasionadas en su mayoría por *C. jejuni* (80%) *C. coli* (10%).⁽⁴⁵⁾

Hasta el año 1968 no se consiguió el aislamiento de *Campylobacter* en heces. Dekeyser y Butzler consiguieron el aislamiento de *C. jejuni* en sangre tras aplicar una técnica especial de filtración diferencial de heces a través de filtros e inoculación en un medio selectivo. Este primer cultivo fecal demostró que la infección intestinal era el origen de la bacteremia.⁽⁴⁶⁾

6.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

El análisis de la secuencia del ADN ribosómico 16S dentro del *phylum Proteobacteria* genera cinco clases diferenciadas, siendo una de ellas las Epsilonbacterias. Dentro de esta clase podemos encontrar la órden: *Campylobacterales*. El género de *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*.⁽⁴⁷⁾

Existen 25 especies y 8 subespecies diferentes descritas dentro del género *Campylobacter*. Desde el año 2009, se han descrito siete especies nuevas y se ha reclasificado la especie *Campylobacter lari* en dos subespecies (*sbsp*): *sbsp. lari* y *sbsp. concheus*⁽⁴⁸⁾ Su análisis filogenético mediante Amplified fragment length polymorphism (AFLP) y perfiles proteicos por SDS-PAGE las sitúa en grupos diferentes. Así mismo, se ha reclasificado la anteriormente denominada *Bacteroides ureolyticus* como *Campylobacter ureolyticus* (*C. ureolyticus*).⁽⁴⁹⁾

6.3. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO

Las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* son bacilos Gram negativos de aspecto delgado, capaces de crecer en una atmósfera de 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno (microaerofílicos). La mayoría de estas bacterias crecen a una temperatura de 37 °C, a excepción de *C. jejuni* que crece a 42 °C no formadores de esporas ni pigmentos, con morfología curvada o con tendencia a adoptar una forma espiral, aunque hay especies con aspecto de bacilos rectos. Pueden formar cadenas cortas que asemejan al microscopio una S o bien la forma de alas de gaviota. Las dimensiones se encuentran entre 0.5 y 5 µm de largo y 0.2-0.8 µm de ancho. La mayoría de las especies de *Campylobacter* producen catalasa, por otro lado *C. jejuni subsp. doylei* pueden reducir el nitrato a nitrito. *C. jejuni* es la única especie que hidroliza el sodio. *Campylobacter* obtiene su energía de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (Ciclo de Krebs) y no utiliza azúcares ni produce Indol. Con la excepción de *Campylobacter gracilis* (*C. gracilis*) (anteriormente *Bacteroides gracilis*), las especies de *Campylobacter* son oxidasa positivas.⁽⁴²⁾ Algunas especies de *Campylobacter* pueden crecer anaeróticamente en presencia de ciertos aceptores de electrones como fumarato, aspartato o nitrato.^(50, 51)

Una característica de este género es la aparición de formas cocoides en aquellos cultivos viejos y en las denominadas formas viables-no cultivables. Estas formas parecen ser una respuesta de la bacteria a condiciones de estrés como son la concentración de oxígeno atmosférico, temperaturas extremas o ausencia de nutrientes.⁽⁵²⁾ En este estado las bacterias poseen un metabolismo respiratorio y se suponen infectivas, pero no son cultivables en ningún medio de cultivo actual (lo cual no quiere decir que no sean realmente cultivables).⁽⁵³⁾

Respecto al metabolismo, son quimiorganotrofas respiratorias. La característica de ser microaerofílica se debe a que *C. jejuni* posee una enzima (Ribonucleotido reductasa) que es dependiente de oxígeno y necesaria en la síntesis de ADN.⁽⁵⁴⁾

Poseen diferentes reductasas, principalmente de tipo periplásmico que les permiten utilizar una variedad de aceptores finales de electrones además del oxígeno: nitratos, nitritos, sulfatos, fumarato, dimetilsulfóxido (DMSO), sulfitos, etc.^(54, 55) Estas enzimas de tipo reductasa, no solamente ayudan en la respiración de *Campylobacter* sino que en el caso de las nitrato y nitrito reductasas están implicadas en la detoxificación de formas reactivas de nitrógeno que pudieran formarse.⁽⁵⁵⁾

No fermentan u oxidan ningún carbohidrato, ya que carecen de la enzima fosfofructoquinasa para la fermentación de azúcares.⁽⁵⁶⁾ Sin embargo sí poseen el resto de enzimas de la oxidación de la glucosa y de las pentosas.^(57, 58) La única excepción en el metabolismo de azúcares es la existencia de algunas cepas de *C. jejuni* capaces de metabolizar la fucosa.⁽⁵⁹⁾

En la obtención de energía van a utilizar intermediarios del Ciclo de Krebs, pero sobre todo, aminoácidos como serina, aspartato, glutamato y prolina (fácilmente accesibles en el intestino de las aves). Adicionalmente, algunas cepas pueden metabolizar también la glutamina y la asparagina.⁽⁵⁹⁾

6.4. EPIDEMIOLOGÍA

La enteritis, causada por *Campylobacter*, es la forma más frecuente de diarrea aguda. Esta enfermedad es muy común en países industrializados, así como en los países en desarrollo, en los cuales se ha encontrado que afecta a la gente de todas las edades, teniendo una distribución binomial en niños menores de 4 años y adultos jóvenes de 15 a 44 años de edad.⁽⁶⁰⁾

C. jejuni es la bacteria más frecuentemente aislada como agente causante de diarrea. Se ha observado que las infecciones por estas bacterias son de tipo estacional, sobre todo en climas templados donde ocurre dos veces al año en verano e invierno.⁽⁶¹⁾

En los Estados Unidos, *Campylobacter* y *Salmonella* son las 2 causas más comunes de enfermedades transmitidas por los alimentos. En 2016, la incidencia de enteritis por *Campylobacter* confirmada por cultivo o pruebas de diagnóstico independientes del cultivo fue de 17.4 infecciones por cada 100,000 personas, lo que la convierte en la causa más comúnmente identificada de enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos. *Campylobacter* ha sido rastreado a través de la Red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por alimentos desde 1996 y ha sido una enfermedad reportada desde 2015. La mayoría de las infecciones por *Campylobacter* son leves y auto-limitadas, pero en 2016, el 20% de las infecciones reportadas resultaron en hospitalización y se identificaron 26 muertes atribuibles.⁽⁶²⁾

En los países en vías de desarrollo, la infección es hiperendémica (**Ver Tabla 1**) y la infección sintomática ocurre casi exclusivamente en bebés e infantes, que pueden infectarse repetidamente. Las infecciones posteriores tienden a ser asintomáticas, lo que hace que la enfermedad sintomática sea rara en niños mayores o adultos.⁽⁶³⁾

Tabla 1: distribución de casos de *Campylobacter* por alimentos. Betelgeux, S.L. *Campylobacter* la bacteria discreta

Año	Lugar	Nº de casos	Alimento implicado	Referencia
2013	Pennsylvania, EE.UU	8	Leche cruda	CDC (2013d)
2010	Northumberland, Reino Unido	24	Paté de hígado de pollo	Inns et al.(2010)
2009	Creta, Grecia	37	Agua de grifo	Karagiannis et al (2010)
2007	Columbia Británica, Canadá	225	Ingestión de lodo en una carrera de mountain bike	Stuart et al (2010)
2007	Reros, Noruega	105	Agua de grifo no tratada	jakopanec et al (2008)
2007	Kansas, EE.UU	68	Queso fresco	CDC (2009)
2005	Australia	11	Preparaciones conteniendo pollo	Black et al (2006)
2005	Copenhague, Dinamarca	79	Ensalada de pollo	Mazick et al (2006)
2003	Madrid, España	81	Natillas	Jiménez et al (2005)

6.5. TRANSMISIÓN

C. jejuni y *C. coli* se transmiten por vía fecal-oral, se pueden propagar por contacto directo y en fómites, entre ellos el agua y el alimento. Además, *C. jejuni* se puede encontrar presente en las secreciones vaginales, los fetos abortados, y las membranas fetales de las ovejas que abortan. Las carnes con poca cocción, de aves y otros animales, constituyen fuentes de infección para las mascotas. Las moscas domésticas pueden actuar como vectores mecánicos. Los humanos se pueden infectar al ingerir carnes con poca cocción de aves y otros animales, leche cruda, almejas crudas, alimentos contaminados o agua no clorada, y después del contacto con ganado o mascotas infectados. Se observan portadores asintomáticos en muchas especies de animales domésticos; los humanos no suelen convertirse en portadores.⁽⁶⁴⁾

Las especies de *Campylobacter* no toleran condiciones de calor o sequedad pero pueden sobrevivir por algún tiempo en ambientes húmedos. *C. jejuni* puede sobrevivir unas pocas semanas hasta unos pocos meses bajo condiciones de humedad y oxígeno-reducido a 4 °C; pero solo unos pocos días a temperatura ambiente. Algunas cepas también soportan temperaturas de -20 °C. Además, esta especie puede permanecer viable hasta 9 días en las heces, 3 días en la leche, y de 2 a 5 días en el agua. Puede sobrevivir en las secreciones vaginales o en las pasturas durante varios días bajo condiciones de campo. Tanto *C. jejuni* como *C. coli* pueden permanecer activas en las camas húmedas de aves de corral durante períodos prolongados. *C. fetus* puede sobrevivir 24 horas en el estiércol líquido y hasta 20 días en el suelo.⁽⁶⁴⁾

En el otoño de 2017 en Estados Unidos, se asoció un brote multiestatal de *Campylobacter* resistente a múltiples fármacos a los cachorros vendidos a través de una cadena nacional de tiendas de mascotas.⁽⁶⁵⁾ La transmisión de persona a persona es más rara, pero los cuidadores de niños u otras personas que usan pañales tienen un mayor riesgo. La transmisión sexual también se ha reportado, especialmente en hombres que tienen sexo con hombres.⁽⁶⁶⁾

Los individuos con HIV (SIDA) tienen un alto riesgo de adquirir la infección por *Campylobacter*, además de que ésta puede ser invasiva.⁽³²⁾

6.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección gastrointestinal por lo general es auto-limitada. Se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre, dolor abdominal, calambres y retortijones. Es la infección más común que se presenta, siendo el prototipo de las *Campylobacterias*: *C. jejuni*.^(61, 67) En los EUA se ha estimado que cada año existen 2.1 a 2.4 millones de casos humanos infectados por *Campylobacter*, caracterizada por diarrea, fiebre y dolor abdominal, son los síntomas más comunes.⁽⁶⁸⁾

El periodo de incubación es de 2 a 5 días, pero puede extenderse hasta los 10 días. Se ha observado que el 50% de los pacientes con diarrea es precedido por un periodo febril, malestar generalizado, mialgia, dolor abdominal y fiebre que puede llegar a los 40 °C. Es habitual que se presente un periodo con fiebre, cefalea, mialgia y malestar general entre 12 y 24 h, antes del inicio de los síntomas.^(61, 67, 69)

6.7. FACTORES DE VIRULENCIA

La respuesta de los pollos a la colonización por *C. jejuni*, no conduce a la respuesta inflamatoria patológica que se observa en humanos. *C. jejuni* puede colonizar pollos en números extremadamente altos, hasta 10¹⁰ unidades formadoras de colonias por gramo de intestino colonizado. El sitio primario de la colonización en las aves son las criptas del intestino delgado cerca de la unión ileal, donde *C. jejuni* se encuentra en la capa de moco cerca de las células epiteliales. Se ha observado una ligera inhibición de la invasión en células epiteliales humanas por *C. jejuni* en presencia de mucus intestinal de aves, lo que sugiere que la mucosidad podría contribuir a la naturaleza asintomática de la colonización en las aves.⁽⁷⁰⁾ Una de las diferencias clave entre la infección en los seres humanos y los pollos por *C. jejuni* es el aparente aumento del número de bacterias que pueden invadir las células epiteliales en el humano.⁽⁷⁰⁾ Esto sugiere que tanto la adherencia bacteriana y la invasión en las células epiteliales pueden ser etapas críticas que son esenciales para el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, la identificación de los mecanismos implicados en estos procesos es la clave para el desarrollo de terapias para el tratamiento de las infecciones, así como mejorar nuestra comprensión de la patogénesis.⁽⁷¹⁾

Los factores de virulencia (**Ver Tabla 2**) que más se han relacionado con el desarrollo de la patogenia son la motilidad por la presencia de flagelos codificados por genes *flaA* y *flaB*, la capacidad de adherencia y colonización se han identificado los genes *cadF*, *racR* y *dnaJ* que participarían en la expresión de esta característica, los genes *virB11*, *ciaB* y *pldA* el cual codifica una proteína implicada en la síntesis de una membrana de fosfolipasa exterior que se ha relacionado con la invasión celular⁽⁷²⁾, la expresión de citotoxinas en la cual participarían por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* y el gen *wlaN* que ha sido involucrado en la expresión de los “*mimics*” de gangliosidos en el síndrome de Guillian-Barré.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ *Campylobacter* se caracteriza por su rapidez y la motilidad la cual es mediada por flagelos polares; estas estructuras han sido reconocidas como cruciales para la patogénesis. Los flagelos están compuestos de una gran proteína la flagelina, que es codificada por el gen *flaA*, y la flagelina menor codificada por *flaB*, y son altamente homólogas.⁽⁷⁶⁾ Estudios recientes atribuyen al flagelo una participación la expresión del Síndrome de Guillain Barre⁽⁷⁷⁾ por lo que es probable que el flagelo tenga una incidencia mayor en distintos ámbitos de la patogenia. Respecto de la invasión en *Campylobacter* se ha asociado con diferentes proteínas. Se ha descrito la identidad de sólo una de las proteínas *Cia*, *Ciab*, los genes *racR* y *dnaJ* son determinantes para la colonización de *Campylobacter* y, presumiblemente, se expresan en respuesta a las condiciones del micro ambiente intestinal, tales como las diferencias de temperatura entre el medio ambiente y del intestino.⁽⁷⁸⁾ Luego de la invasión, existe producción de citotoxinas las cuales provocan inflamación celular disminuyendo la capacidad de absorción del intestino. *Campylobacter spp* produce una toxina de distensión citoletal (CDT), la cual también es producida por un grupo diverso de otras especies bacterianas, incluyendo *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* y *Helicobacter hepaticus*. La toxina causa arresto en la transición del ciclo celular G1 / S o G2 / M. La holotoxina activa es un complejo compuesto de 3 proteínas codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*.⁽⁷⁰⁾ *cdtB* es conocido por ser el componente tóxico, la microinyección o transfección de esta subunidad solo en las células huésped conduce a los efectos que se observan con la holotoxina. Se cree que *cdtB* actúa como una ADNasa, ya que comparte similitud con una familia de proteínas de ADNasa I. *cdtB* se localiza en el núcleo de las células huésped, provocando daños en el ADN eucariótico. Las funciones de *cdtA* y *cdtC* en esta familia de toxinas no son claras.⁽⁷¹⁾

Se han identificado una serie de proteínas en *C. jejuni* como adhesinas. Este grupo incluye *CadF*, *CapA*, *JlpA* y la proteína principal de la membrana externa (MOMP). Konkel y col. han identificado a *CadF*, que es una proteína de 37-kDa que facilita la unión de *Campylobacter* a Fibronectina. Un estudio reveló la importancia de *CadF* para la colonización, puesto que *Campylobacter* mutantes *cadF* fueron incapaces de colonizar a los pollos.⁽⁷¹⁾ Otro factor de virulencia importante, es el Lipopolisacarido (LPS), que tiene actividad endotóxica típica, como la presente en las Enterobacterias. La estructura del antígeno “O” del LPS contiene ácido siálico, semejante al que se observa en los gangliósidos humanos. Su presencia en las cepas aisladas de pacientes con síndrome de Guillain-Barré sugiere un papel de *Campylobacter* en la patogenia de esta enfermedad, al probablemente inducir una respuesta autoinmune contra los gangliósidos humanos. Es así como la mayoría de los pacientes que desarrollan el síndrome de Guillain-Barré después de una enteritis por *C. jejuni* tienen anticuerpos IgG que reaccionan con los glangliosidos GM1, GD1a y GQ1b.^(73, 74)

Secuencia de los partidores, tamaño del amplificado y temperatura de alineamiento utilizados en los PCR para detección de los genes de virulencia.⁽⁷⁵⁾

Tabla 2: Factores de virulencia

Factores de virulencia	Papel que desempeña el mecanismo de patogenicidad
Presencia de flagelos	Motilidad, adherencia, colonización del hospedero, secreción e invasión, secreción de proteínas (Cia (<i>Campylobacter</i> invasión antígenos), FlaC, FspA2)
Cápsula	Capsula de polisacárido.
Lipopolisacarido (LPS)	Actividad endotóxica típica.
Producción de proteínas citotóxicas	Intervienen en el desarrollo clínico de la enfermedad.
Toxinas extracelulares	Actividad citopática y enterotoxinas clásicas parecidas a las de la <i>E. coli</i> .
Toxina distentora citoletal	Codificada para 3 genes (<i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> y <i>cdtC</i>) ocasiona distensión y su muerte.
Plásmido pVir	Codifica para un sistema de secreción tipo IV, participa en invasión celular.
Gen hipO	Codifica para una hipuricasa, principal gen para la identificación de cepas.

6.8. PATOGENIA

Existen múltiples organismos y factores del hospedador que permiten la infección por *Campylobacter* en humanos. Los estudios en voluntarios sanos, así como los datos de observación de los brotes, han demostrado que el inóculo requerido para causar la enteritis por *Campylobacter* en humanos puede ser tan bajo como 500 organismos.⁽⁷⁹⁾ La interrupción de la barrera del ácido gástrico permite que la flora patógena, como *Campylobacter*, sobreviva y florezca. Por lo tanto, los pacientes con acidez gástrica reducida, incluidos aquellos que reciben inhibidores de la bomba de protones, pueden tener un mayor riesgo de infección con *Campylobacter*.⁽⁸⁰⁾ El período de incubación es relativamente corto, con un intervalo de 1 a 7 días, con un promedio de 3 días. Un mayor inóculo puede dar lugar a períodos de incubación más cortos. La infección se establece típicamente en el íleon distal y el colon e inicialmente causa una diarrea no inflamatoria. A esto le sigue una etapa localmente invasiva que conduce al daño celular y la inflamación que puede presentarse con disentería, que a veces es seguida por la translocación a través del epitelio intestinal, causando linfadenitis e infección extraintestinal. Histológicamente, la infección es idéntica a la salmonelosis o la shigelosis y está marcada por una inflamación aguda de la mucosa y un edema, que puede incluir la infiltración de la lámina propia y la formación de abscesos en la cripta.⁽⁸¹⁾

Los mecanismos exactos de la infección no se comprenden completamente, pero se han identificado varios factores de virulencia, como flagelos, plásmidos, adhesinas y factores quimiotácticos.⁽⁸²⁾ La infección inicial se establece cuando las bacterias se adhieren a las células epiteliales intestinales a través de filamentos parecidos a fimbrias. La colonización del tracto gastrointestinal se ve facilitada por flagelos y factores quimiotácticos. Las flagelinas de *Campylobacter* no parecen provocar citoquinas proinflamatorias, lo que puede permitir a *Campylobacter* evadir una respuesta inmune innata, diferenciándola de otros patógenos intestinales, incluida la *Salmonella*.⁽⁸³⁾ Hay una variedad de otras proteínas de superficie y adhesinas que facilitan la colonización y la invasión de las células epiteliales intestinales. Algunos aislamientos de *Campylobacter* contienen un plásmido de alto peso molecular, *pVir*, que se ha asociado con heces con sangre y se cree que contribuye a la invasión.⁽⁸⁴⁾

La respuesta inmune a la infección por *Campylobacter* parece ser principalmente humoral. El nivel de inmunoglobulina (Ig) en suero específico para *Campylobacter* aumenta rápidamente durante las primeras 2 semanas después de la infección y luego disminuye lentamente durante el próximo mes. Los niveles de anticuerpos IgM e IgG aumentan más lentamente y alcanzan un máximo de 2 a 3 semanas después del desarrollo de los síntomas.⁽⁸⁵⁾

6.9. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico se utilizan cultivos de las heces o, con menor frecuencia, la sangre. Se puede realizar un diagnóstico presuntivo mediante la detección de la motilidad rápida característica utilizando microscopía de campo oscuro o de contraste de fases. Se pueden observar bacilos Gram negativos curvos o rectos en preparaciones teñidas por el método de Gram. El diagnóstico definitivo se obtiene mediante el aislamiento del agente causal; no obstante, *Campylobacter* es frágil y no siempre puede ser identificado. Los medios selectivos o las técnicas de filtración mejoran las posibilidades de aislarla. Se utilizan pruebas bioquímicas, pruebas de antígenos y análisis de endonucleasa de restricción de ADN para la identificación de las especies y las cepas.⁽⁶⁴⁾

También se dispone de ensayos en base a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ELISA para la detección rápida o la confirmación de los cultivos.⁽⁶⁴⁾

El uso de Pruebas diagnósticas Independiente de Cultivos (CIDT), incluidas las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, están aumentando.⁽⁶²⁾ Estas pruebas son generalmente más sensibles y tienen tiempos de respuesta más rápidos que los diagnósticos tradicionales basados en la cultura. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa identifica a *Campylobacter* en las heces del 20% al 40% más frecuentemente que los métodos basados en cultivos.⁽⁸⁶⁾ Las cepas de *Campylobacter* se pueden identificar a nivel de especie con una secuenciación del gen ARNr 16S.⁽⁸⁷⁾

Las pruebas serológicas se pueden usar para detectar una infección reciente por *Campylobacter* en pacientes con artritis reactiva o Síndrome de Guillain Barre que tienen estudios de heces negativos. Los estudios serológicos no son útiles en el diagnóstico de infección aguda por *Campylobacter*.⁽⁸⁸⁾

6.10. RESISTENCIA

Las fluoroquinolonas también pueden ser un tratamiento eficaz para la infección por *Campylobacter*, pero la resistencia es cada vez más común (**Ver Tabla 3**), lo que limita la efectividad de estos agentes para esta indicación. En el pasado, se pensaba que esta resistencia era, en parte, atribuible al uso de quinolona en alimentos para aves, pero esta práctica ha sido prohibida en los Estados Unidos desde 2005. Los datos de Estados Unidos de 2014 indicaron que la resistencia a la ciprofloxacina estaba presente en el 27% de Aislamientos de *C jejuni* y 36% de *C. coli*.⁽⁸⁸⁾ La resistencia es significativamente mayor fuera de los Estados Unidos y es importante tener en cuenta en los viajeros.⁽⁸⁹⁾ Afortunadamente, la resistencia a los macrólidos sigue siendo rara en los Estados Unidos.

Tabla 3: Susceptibilidad por CMI de *Campylobacter* aislada de heces diarreicas

Antibiótico	CMI50 (mg/l)	CMI90 (mg/l)	Intervalo (mg/l)	Resistencia (%)
Ofloxacino	4	32	< 0,06 ≥ 128	61,7
Moxifloxacino	2	8	≤ 0,06 - 16	37
Azitromicina	0,25	0,5	≤ 0,06 - 16	2
Eritromicina	0,5	2	≤ 0,06 - 8	3,7
Clindamicina	0,25	4	≤ 0,06 - 4	4,4
Ampicilina	2	8	≤ 0,06 ≥ 128	4,9
Amoxicilina-ac clavulanico	0,5	2	≤ 0,06 - 4	0
Tetraciclina	32	>128	≤ 0,06 ≥ 128	61,7

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Caso – Control anidado.

Área de estudio: Áreas aledañas de la ciudad de León – Nicaragua.

Período de estudio: De Junio del 2017 a Julio del 2018.

Población: 444 infantes activos en la cohorte del proyecto Sapovirus Gastroenteritis (SAGE).

Muestra: Se analizaron 293 muestras de heces provenientes de 173 (38.96 %) niños hasta 1 año de edad.

Definición de casos: Niños con diarrea positivos para *Campylobacter spp.*

Definición de controles: Niños sin diarrea.

Muestreo: Probabilístico, pareado por sexo, peso al nacer, ruta del parto y edad al momento de la diarrea.

Para el objetivo de describir las características clínicas de niños menores de 12 meses de edad que padecen de gastroenteritis: Se analizaron 59 episodios de diarrea con presencia de *Campylobacter spp.*

Para el objetivo de determinar la presencia de *Campylobacter spp* en niños menores de 12 meses: Se analizaron un total de 293 episodios de diarreas, provenientes de 173 niños hasta 1 año de edad.

Para los objetivos de establecer asociación entre las infecciones sintomáticas causadas por *Campylobacter* y las características clínicas-epidemiológicas como potenciales factores de riesgo e identificar fracción atribuible de las infecciones causadas por *Campylobacter*: se analizaron 54 episodios de diarrea con presencia de *Campylobacter* (Casos) y 108 heces no diarreicas (Controles).

Para el objetivo de determinar las especies de *Campylobacter* que circulan en la población en estudio: se analizaron 59 muestras positivas para *Campylobacter spp.*, por RT – PCR y secuenciación de Sanger.

Criterios de inclusión:

- ✓ El o la recién nacida pesó 2000 gr o más al nacimiento (Caso y Control).

- ✓ El niño(a) padeció al menos un episodio de diarrea en su primer año de vida para seleccionar los casos.

Criterios de exclusión:

- ✓ El o la recién nacida tiene una condición de salud especial* desde nacimiento.
- ✓ Hay otro(a) niño (a) en el hogar ya enrolado en este estudio.

* EXCLUIR si el niño(a) presenta cualquiera de las siguientes condiciones de salud especial: Este criterio es fundamentado debido a que el niño o niña requiere cuidados especiales para su desarrollo.

- VIH/SIDA
- Enfermedad genética como Síndrome de Down

Aprobación del estudio: Este estudio fue aprobado por los Comité de Ética o Juntas de Revisión Institucional de UNAN-León (IRB # Acta No. 2-2017) y la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill (IRB # 16-2079). (**Ver anexo. Imagen 1**)

Fuente de información: Se solicitó al tutor del niño o niña llenar un consentimiento informado y estar de acuerdo con el mismo, para posteriormente poder solicitar la información que fue colectada por entrevista directa a los padres y/o tutores de los niños mediante un cuestionario o por vía telefónica que se realizó durante visitas semanales y mensuales a cada niño involucrado en el estudio.

7.1. Recolección y procesamiento de la muestra:

Recolección de las muestras de heces: Las muestras de heces fueron colectadas una vez cada mes, sin embargo, también se colectaron muestras de heces diarreicas de las visitas semanales, de los niños que padecían la afectación.

Recolección de información: Los datos clínicos y epidemiológicos de los niños fueron colectados durante las visitas semanales y mensuales. También se colectó una ficha adicional para cuando los niños presentaron diarrea.

Transporte de la muestra: Las muestras fueron transportadas en el pañal desechable utilizado por cada niño, dentro de una bolsa Zip-Lock estéril, dentro de un termo a +4°C aproximadamente, al Laboratorio del Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI),

Departamento de Microbiología y parasitología, ubicado en el campus médico de la UNAN – León.

Procesamiento y Almacenamiento de la muestra: Las muestras de heces y las diarreicas se almacenaron en crioviales de 2.0 ml con PBS 1X y en crioviales de 2.0 ml sin PBS 1X a -20° C hasta su análisis. Al llegar el día de análisis fueron colocadas a -10° C y por ultimo a +4° C por una hora respectivamente antes de su procesamiento.

7.2. Extracción y purificación de ADN genómico

Se utilizó el método de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit (Cat # 51604 para 50 análisis).

Paso 1: Se incorporaron glass beads 212-300 µm a este método de extracción con el objetivo de facilitar un poco más la maceración de las muestras de heces.

Paso 2: Todas las muestras fueron colocadas en Coolrack antes de utilizarlas, con el fin de mantener las muestras a temperaturas óptimas de viabilidad.

Paso 3: Se agregaron 0.03 gramos de 212-300 µm glass beads en crioviales de 1.8 ml.

Paso 4: Posteriormente se pesó 180-220 mg de la muestra de heces y se añadieron en crioviales de 1.8 ml.

NOTA: A) En algunos casos se emplearon heces re-suspendidas en PBS 1X, se extraían 200 µl de la suspensión y se añadían en crioviales de 1.8 ml (Que contienen el buffer InhibitEX y las glass beads).

Paso 5: Se añadió 1.0 ml de buffer InhibitEX a cada criovial con la muestra.

Paso 6: Se colocaron los crioviales con la suspensión, en Vortex BEAD MILL (Fisher) por 1 minutos.

Paso 7: Se calentaron la suspensión a 70°C por 5 minutos en baño maría.

Paso 8: Fueron mezcladas por BEAD MILL por 15 segundos y se centrifugaron la muestra a 14,000 rpm por 1 minutos.

Paso 9: Se añadieron 15 µL de Proteinasa K en un nuevo criovial de 1.8 ml y se agregaron 200 µL del sobrenadante obtenido en el paso 7.

Paso 10: Se adicionaron 200 µL de Buffer AL y se Vortea por 15 segundos.

Paso 11: Se incubaron a 70°C por 10 minutos en baño maría. Posteriormente se centrifugaron brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo.

Paso 12: Se agregaron 200 µL de etanol (96-100%) al lisado y se mezclaron por vortex. Se centrifugaron brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo.

Paso 13: Cuidadosamente se agregaron 600 µL del lisado obtenido en el paso 11 a la columna mini spin previamente. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector de 2 ml y se descartaron los tubos que contenían el filtrado.

Paso 14: Se abrieron cuidadosamente las columnas y se agregaron 500 µL de Buffer AW1. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Se colocaron las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml y se descartaron los tubos que contenía el filtrado.

Paso 15: Se abrieron cuidadosamente las columnas y agregaron 500 µL de Buffer AW2. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 3 minutos. Se colocaron las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml y descartaron los tubos que contenían el filtrado.

Nota: Se centrifugaron a 14,000 rpm por 3 minutos nuevamente. Este paso ayudó a eliminar restos de Buffer AW2.

Paso 16: Al finalizar se transfirieron las columnas de QIAamp a un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado. Se abrieron cuidadosamente las columnas y se añadieron 200 µL de Buffer ATE directamente en la membrana. Se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto para eludir el ADN.

Paso 17: El ADN eludido fue guardado a -20 °C hasta su análisis.

7.3. Ensayo de RT-PCR para la identificación de *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli*

Para el análisis por el método de RT-PCR se utilizaron Primers y Sondas descritas a continuación: (**Ver Tabla 4**).

Tabla 4: Descripción de Primers y Sondas.

ENSAYO	PRIMER & PROBE SEQUENCES (5' → 3')
<i>Campylobacter spp.</i> RT-PCR	Forward primer CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT Reverse primer GGC TTC ATG CTC TCG AGT T Sonda 56-FAM/CAG AGA ACA /ZEN/ ATC CGA ACT GGG ACA /3IABkFQ/
<i>C. coli and C. jejuni</i> RT-PCR	Forward primer CTG CTA AAC CAT AGA AAT AAA ATT TCT CAC Reverse primer CTT TGA AGG TAA TTT AGA TAT GGA TAA TCG Sonda 56-JOEN/CAT TTT GAC /ZEN/ GAT TTT TGG CTT GA/3IABkFQ

Los Primers fueron utilizados a concentración de trabajo de 10 µM y el Probe a 5 µM, para una concentración final de 0.4 µM y 0.2 µM respectivamente, en un volumen final de reacción de 25 µL.

Preparación del MasterMix y preparación del plato.

Se mezclaron los Primers, las sondas, el agua libre de nucleasas y el MasterMix 2.0 para obtener un volumen de 24 µL para *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli* (Ver tabla 5 (*Campylobacter spp.*)). Se homogenizó la mezcla y se centrifugó brevemente antes de agregar la muestra. Se siguieron las indicaciones a continuación:

- 1) En el cuarto blanco, se descongelaron los reactivos y se colocaron en coolrack.
- 2) Se centrifugaron brevemente los Primers y Sondas y se colocaron en coolrack.
- 3) Se determinaron el número de reacciones (N) por ensayo. Fue necesario hacer reacciones extras para controles mezcla y por efecto de dilución.
- 4) La mezcla se prepara a como se indica. (Ver tabla 5)

Tabla 5: Mezcla para RT – PCR (*Campylobacter spp.*).

COMPONENTES	VOL (µL) / RXN.
Taq Environmental Master Mix 2.0	12.5
Mix Primer Campy 16S (10 µM)	1
Probe Campy 16S (5 µM)	1
Agua libre de nucleasas	9.5
ADN	1
Volumen total	25

Para la mezcla de RT – PCR para *C. jejuni/coli* los Primer y Probe “Campy16S” fueron sustituidos por los Primer y Probe para “*C. jejuni/coli*”

Programa de amplificación.

Se utilizó el equipo para RT – PCR LightCycler® 96 System Instrument de la compañía ROCHE para la amplificación y el análisis de las muestras. Empleando un programa de amplificación a como se describe a continuación: (Ver figura 1)

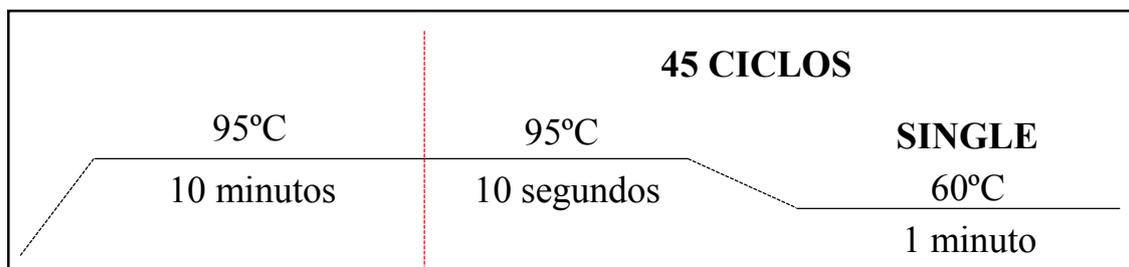


Figura 1: Programa de amplificación para *Campylobacter 16S* y *Campylobacter jejuni/coli*

7.4. Secuenciación de Sanger para la identificación de especies de *Campylobacter*.

Para el análisis por Secuenciación de Sanger se utilizaron Primers descritos en la **Tabla 6**. La mezcla del master mix para la secuenciación se detalla en la **Tabla 7**.

Tabla 6: Descripción de Primers y Sondas.

Primer	Secuencia
Primer Campy 16S_FOR	5' GGATGACACTTTTCGGAGC 3'
Primer Campy 16S_REV	5' CATTGTAGCACGTGTGTC 3'

Los Primers fueron utilizados a concentración de trabajo de 20 µM, para una concentración final de 0.2 µM en un volumen final de reacción de 25 µL.

Tabla 7: Mezcla para secuenciación de Sanger RT – PCR (especies de *Campylobacter*).

COMPONENETES	VOL (µL) / RXN.
Hot start tag MM (Qiagen)	12.5
Campy 16S FOR (20 uM)	0.25
Campy 16S REV (20 uM)	0.25
Agua libre de nucleasas	7
ADN	5
Volumen total	25

Programa de amplificación (Figura 2).

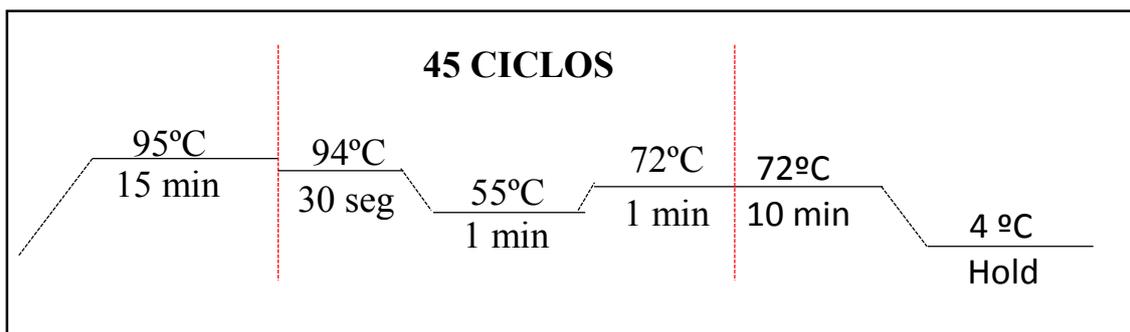


Figura 2: Programa de amplificación para secuenciación de *Campylobacter* especies.

Las secuencias resultantes se blastearon en el banco de genes digital de la base de datos Genbank (Búsqueda de alineación local básica) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7.5. Aspectos éticos:

- Se utilizaron los permisos concedidos por el comité de ética al estudio de cohorte SAGE (Ver Anexo Imagen #1), para los mismos propósitos de este estudio. El cual contiene un consentimiento informado solicitando permiso y explicando los objetivos del estudio a los tutores de los niños, los cuales serán tratados con absoluta confidencialidad.
- Para la recolección de datos fueron manejados por personal capacitado para su fin.
- La información adquirida por los tutores mediante formularios, fueron guardados en oficina bajo llave.
- Los datos del estudio fueron utilizados únicamente para fines investigativos y educativos.
- Los nombres de los participantes del estudio fueron reemplazados por códigos para mantener total anonimato.

7.6. Plan de análisis de los resultados:

Los datos de laboratorio y epidemiológicos fueron introducidos en una base de datos diseñada en el programa SPSS, Inc. Chicago IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 21.0.0. Las características clínicas y epidemiológicas fueron presentadas como medidas de frecuencias para datos cualitativos (nominal u ordinal) y

medidas de tendencia central ($\chi \pm DS$) para datos cuantitativos. La incidencia absoluta de las infecciones por *Campylobacter spp* fue calculada como número de casos nuevos (infecciones por *Campylobacter spp*) dividido entre la población en estudio, el resultado obtenido fue multiplicado por 10,000. Se realizó cruce entre variables epidemiológicas y variables de laboratorio, siguiendo un análisis univariado para eliminar variables de confusión. Se utilizaron tablas de contingencias 2 X 2 para la prueba de Chi cuadrado (X^2) y probabilidad de riesgo como medida de asociación a un nivel de confianza del 95% y una significancia empleando un valor $P \leq 0.05$.

Los factores de riesgo clínico-epidemiológicos y los datos de infecciones por *Campylobacter spp* fueron determinados usando un sistema de regresión log-binomial donde las variables fueron ensayadas individualmente en el modelo antes mencionado (Si estas resultasen estadísticamente significativas $P \leq 0.05$). Además, se estimó la asociación entre *Campylobacter spp* y heces diarreicas versus no diarreicas utilizando la Regresión de Poisson. También adaptamos el Índice de necesidades básicas empleado por el Instituto Nacional de Información sobre el Desarrollo de Nicaragua (<https://www.inide.gob.ni/>) para identificar a los niños que viven en la pobreza, en función de la construcción del hogar, el estado económico y el nivel educativo de los miembros del hogar. Las especies fueron determinadas en el banco de genes digital de la base de datos Genbank (Búsqueda de alineación local básica) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Operacionalización de variables

Variable	Concepto	Valor
<i>Características generales</i>		
Sexo	Conjunto de características fenotípicas y genéticas que diferencian en hombre y mujer	Masculino Femenino
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Número del mes que corresponde con la edad de la recolección de datos y muestra
Lactancia materna	Proceso por el que la madre alimenta con leche a su hijo (bebé) a través de sus senos.	Si. No. Se niega a responder
<i>Características epidemiológicas</i>		
Fuente de agua	Fuente de abastecimiento de agua para consumo humano.	Agua potable Agua de pozo comunitario Agua purificada

		Otro
Tratamiento a agua de consumo	Utilización de técnicas de purificación de agua para consumo (ej. Filtro de agua, hervir, utilización de cloro, filtro de arena o barro, etc.	Nunca A veces Siempre
Lavado o desinfección de las manos	Frotación de las manos previamente enjabonada o desinfectadas con productos químicos con el objetivo limpieza y eliminación de microorganismos	Si. No. Se niega a responder
Lugar de deposición de excretas	Recipiente o lugar que sirve para depositar las excretas	Letrinas Inodoro Otro
Animales que viven en el domicilio.	Animales o mascotas que habitan en el misma casa de habitación	Ninguno, perro, gato, gallina, cerdo, vaca, loro, otros.
Nivel de pobreza	Nivel socioeconómico en función de la construcción del hogar, el estado económico y el nivel educativo de los miembros del hogar.	No pobre Pobre Extremadamente pobre
<i>Características clínicas</i>		
Infección	Colonización del organismo por gérmenes patógenos, que se establecen y se multiplican dentro del hospedero.	Infección sintomática Infección asintomática
Campylobacteriosis	Infección comúnmente zoonótica causada por el género <i>Campylobacter spp</i>	Positivo Negativo
Sangre visible en heces	Presencia de sangre visible en la materia fecal (Deposiciones de color rojizas o negras)	Si. No.
Episodios de Diarrea	Deposición de 3 o más veces al día (o una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, >7
Hospitalización	Ingreso de una persona enferma a un hospital para su diagnóstico, tratamiento y curación por parte del personal médico.	Si. No. Se niega a responder
Hidratación intravenosa (IV)	Administración de sustancias líquidas directamente en una vena, permitiendo el acceso inmediato al torrente sanguíneo para suministrar líquidos y/o medicamentos.	Si. No. Se niega a responder
Días de hidratación IV	Cantidad de días en que el paciente ha recibido hidratación intravenosa	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, >10
Uso de antibiótico	Uso de sustancia antimicrobiana utilizada con la finalidad de eliminar o impedir el crecimiento de los microorganismos sensibles	Si. No. No sabe/Se niega a responder
Días de terapia antimicrobiana	Cantidad de días en que el paciente ha recibido terapia antimicrobiana	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, >10

8. RESULTADOS

8.1 Incidencia, Características Clínicas y Carga de gastroenteritis por *Campylobacter spp*

Para determinar la frecuencia de *Campylobacter spp* en las muestras diarreicas, se analizaron un total de 293 episodios que experimentaron 173 niños durante su primer año de vida, encontrándose *Campylobacter spp* en 59 (20.1 %) muestras, y calculándose una tasa de incidencia por 10,000 personas – días = 11. Cabe mencionar que 49 niños tuvieron una muestra positiva y 5 niños tuvieron dos muestras positivas para *Campylobacter spp*, respectivamente, estos últimos reflejaron un mínimo y un máximo de 1.1 y 5.6 meses respectivamente entre un episodio y otro.

De los 59 casos de *Campylobacter spp*, 55 (93%) se asociaron con diarrea, que duró una media de seis días, y los cuatro restantes tuvieron vómitos solamente. Catorce (24%) se asociaron con vómitos, con una duración promedio de 2 días (**Tabla # 8a**). Se observó sangre en las heces en seis (10%) episodios. Veintiún casos (36%) recibieron atención en una clínica de atención primaria, nueve (15%) en el área de emergencias y dos (3%) fueron hospitalizados. Casi la mitad (44%) de los casos estaban coinfectados con al menos un virus entérico, incluidos rotavirus, norovirus, sapovirus, adenovirus y/o astrovirus. Veintisiete (46 %) recibieron medicamentos para tratar los síntomas de la gastroenteritis, principalmente antibióticos y probióticos (**Tabla # 8a**).

Tabla # 8a. Características clínicas de Campylobacteriosis en niños 2017-2018

Características clínicas (n=59)	n (%) o media (IQR)
Presencia de diarrea	55 (93.2)
Duración media de diarrea por día	6.0 (4.0, 7.5)
Media de número máximo de deposiciones de heces en 24 horas	6.0 (5.0, 7.5)
Presencia de vomito	14 (23.7)
Duración media en días	1.5 (1.0, 3.6)
Fiebre	18 (30.5)
Sangre en las heces	6 (10.2)
Recibe atención primaria en clínica	21 (35.6)
Recibe atención en el hospital	2 (3.4)
Recibe atención en el área de emergencia	9 (15.3)
Recibe zinc	17 (28.8)
Recibe liquido intravenoso	1 (1.7)
Recibe medicación en los últimos 7 días	32 (54.2)
Razón por la que recibe otros medicamentos	
Para el tratamiento de la gastroenteritis	27 (45.8)
Para el tratamiento de otra enfermedad	9 (15.3)
Co-infección con virus entérico (5 perdidos)	24 (44.4)
Rotavirus (5 perdidos)	13 (24.1)
Sapovirus (5 perdidos)	6 (11.1)

Norovirus (5 perdidos)	6 (11.1)
Astrovirus (5 perdidos)	3 (5.6)

Luego, para estimar la proporción de casos de gastroenteritis que fueron atribuibles a *Campylobacter spp*, seleccionamos al azar a 90 niños de los 173 que experimentaron gastroenteritis y 90 controles de la misma edad sin gastroenteritis en los 28 días anteriores al inicio del caso. Un total de 24 (26.7%) de los casos de gastroenteritis fueron positivos para *Campylobacter spp.*, en comparación con 5 (5.6%) de los controles. La probabilidad de gastroenteritis por *Campylobacter spp* fue 6.18 veces mayor en niños con diarrea que en niños controles (IC 95%: 2.24, 17.07). En todas la muestras de estos 180 niños, el 22,4% (IC 95%: 11.19, 32.11) de los casos de gastroenteritis podrían atribuirse a la infección por *Campylobacter spp*.

Además de lo anteriormente descrito, resulta muy interesante resaltar que los episodios de gastroenteritis asociados con *C. jejuni/coli* mostraron una mayor duración de la diarrea y vómitos en comparación con los episodios de gastroenteritis por especies *no jejuni/coli* (Tabla # 8b). Sin embargo, las otras especies de *Campylobacter* tendieron a tener una mayor frecuencia de deposiciones en un período de 24 horas ($P = 0.07$), así mismo la madre y/o tutores de estos niños mostraron tener más probabilidades de buscar tratamiento en un centro de salud, cabe mencionar que ningún niño infectado con otras especies de *Campylobacter* experimentó heces con sangre.

Tabla # 8b. Características clínicas de *C. jejuni/coli* comparado con otras especies de *Campylobacter*

Características clínicas n (%) o media (IQR)	<i>C. jejuni/coli</i> (n=39)	Otras especies ^a (n=20)	Valor- P
Presencia de diarrea	37 (94.9)	18 (90.0)	0.5
Duración media de diarrea por día	6.7 (4.0, 8.0)	4.0 (3.0, 6.5)	0.04
Media de número máximo de deposiciones de heces en 24 horas	6.0 (5.0, 7.0)	6.6 (6.0, 8.0)	0.07
Presencia de vomito	9 (23.1)	5 (25.0)	1.0
Duración media en días	2.0 (1.0, 4.0)	1.0 (1.0, 1.0)	0.2
Fiebre	11 (28.2)	7 (35.0)	0.6
Sangre en las heces	6 (15.4)	0 (0.0)	0.09
Recibe atención primaria en clínica	11 (28.2)	10 (50.0)	0.1
Recibe atención en el hospital	2 (5.1)	0 (0.0)	0.5
Recibe atención en el área de emergencia	5 (12.8)	4 (20.0)	0.5
Recibe zinc	10 (25.6)	7 (35.0)	0.5
Recibe líquido intravenoso	1 (2.6)	0 (0.0)	1.0
Recibe medicación en los últimos 7 días	19 (48.7)	13 (65.0)	0.2
Razón por la que recibe otros medicamentos			
Para el tratamiento de la gastroenteritis	15 (38.5)	12 (60.0)	0.1
Para el tratamiento de otra enfermedad	6 (15.4)	3 (15.0)	1.0
Co-infección con virus entérico (5 perdidos)	19 (54.3)	5 (26.3)	0.08
Rotavirus (5 perdidos)	8 (22.9)	5 (26.3)	1.0
Sapovirus (5 perdidos)	5 (14.3)	1 (5.3)	0.4

Norovirus (5 perdidos)	5 (14.3)	1 (5.3)	0.4
Astrovirus (5 perdidos)	3 (8.6)	0 (0.0)	0.5

^a Incluye otras especies *C. concisus* (n=3), *C. hyointestinalis* (n=1), *C. hominis* (n=1), *C. vulpis* (n=1), and indeterminado (n=14)

Valor – P: Datos significativos ≤ 0.05 .

8.2 Factores de riesgos de la Campylobacteriosis

Para completar el análisis de factores de riesgo en un diseño caso-control, seleccionamos 108 controles y 54 casos para una muestra analítica final de 162 niños. Estos fueron pareados por sexo infantil, la raza, el peso al nacer, la ruta del parto, la edad gestacional y la educación materna. El análisis mostró que los controles eran más propensos que los casos a residir en hogares "pobres" o "extremadamente pobres" ($P = 0.02$). Los casos fueron significativamente más propensos que los controles a tener al menos un ave de corral en el hogar ($P = 0.02$). En el grupo de los casos se observaron 30 viviendas categorizadas como no pobres y de ellas 10 tenían aves de corral en sus hogares, por otro lado se clasificaron 23 viviendas como pobres o extremadamente pobres de los cuales solo 5 tenían aves de corral, además haber experimentado un episodio de gastroenteritis previo por cualquier causa ($P = 0.001$), y tuvieron contacto con alguna persona dentro o fuera del hogar que experimentaba gastroenteritis ($P = 0.02$) (**Tabla # 9**). Aunque no fue estadísticamente significativo con $P > 0.05$, el 20.4% de los casos versus el 13.9% de los controles informaron haber compartido un envase con una persona en la semana anterior al episodio.

Tabla # 9. Características del primer caso de Campylobacteriosis comparado con los controles.

Características n (%) o media (STD)	Casos (n=54)	Controles (n=108)	valor P
Edad media de los casos de Campylobacteriosis (en meses)	5.8 (3.0)	5.4 (3.0)	0.4
Sexo (% Femenino)	26 (48.1)	56 (51.9)	0.7
Raza (% Latino/Mestizo)	54 (100.0)	107 (99.1)	0.5
Ruta de parto (% Parto vaginal)	33 (61.1)	57 (52.8)	0.3
Edad gestacional al nacer (en semanas completadas)	38.6 (1.2)	38.5 (1.1)	0.7
Peso medio al nacer (en gramos)	3,156 (463)	3,138 (415)	0.8
Año medio de la madre al nacimiento del niño (en años)	23.8 (5.4)	24.5 (5.4)	0.4
Nivel educativo materno (9 perdidos)			
Completó educación primaria	13 (24.5)	28 (28.0)	
Completó educación secundaria	28 (52.8)	40 (40.0)	0.4
Completó la universidad / escuela vocacional	12 (22.6)	27 (27.0)	
Analfabeto	0 (0)	5 (5.0)	
Madre empleada en el momento del nacimiento del niño. (6 perdidos)			
No formalmente empleada	37 (69.8)	77 (74.8)	
Experto	4 (7.5)	6 (5.8)	
No capacitado	5 (9.4)	4 (3.9)	0.8
Estudiante	4 (7.5)	10 (9.7)	
Otro	3 (5.7)	6 (5.8)	

Campylobacteriosis en niños menores de 1 año de edad León – Nicaragua

<i>Índice de pobreza (% pobre o extremadamente pobre) (2 perdidos)</i>	25 (46.3)	70 (66.0)	0.02
<i>Índice de hacinamiento (> 2.5 personas / habitación) (3 perdidos)</i>	16 (29.6)	33 (31.4)	0.8
<i>Piso no de tierra</i>	37 (68.5)	74 (68.5)	1.0
<i>Composición de la pared (% Ladrillo / Cemento)</i>	42 (77.8)	90 (83.3)	0.4
<i>Electricidad (% Si)</i>	54 (100.0)	108 (100.0)	N/A
<i>Fuente de agua (% municipal en casa)</i>	45 (83.3)	90 (83.3)	1.0
<i>Tipo de saneamiento (% Baño interior)</i>	38 (70.4)	73 (67.6)	0.7
<i>Saneamiento compartido (inodoro/letrina) con otras casas</i>	3 (5.6)	4 (3.7)	0.7
<i>Algún almacenamiento de agua en el hogar</i>	38 (70.4)	68 (63.0)	0.4
<i>Siempre usa ≥1 medios efectivos de purificación de agua</i>	14 (25.9)	25 (23.1)	0.7
<i>Interrupción de fuente de agua la semana pasada</i>	5 (9.3)	14 (13.0)	0.5
<i>Algún animal en el hogar:</i>			
<i>Perro</i>	31 (57.4)	59 (54.6)	0.7
<i>Gato</i>	11 (20.4)	23 (21.3)	0.9
<i>Aves de corral</i>	15 (27.8)	14 (13.0)	0.02
<i>Cerdos</i>	3 (5.6)	4 (3.7)	0.7
<i>Vaca</i>	0 (0.0)	1 (0.9)	1.0
<i>Cabra</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A
<i>Conejo</i>	4 (7.4)	5 (4.6)	0.5
<i>Aves</i>	7 (13.0)	11 (10.2)	0.6
<i>Tortuga</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A
<i>Ratón</i>	3 (5.6)	10 (9.3)	0.4
<i>Murciélago</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A
<i>Otros</i>	7 (13.0)	11 (10.2)	0.6
<i>Practica apropiadamente el momento de lavado de manos (2 Perdidos)</i>	44 (83.0)	80 (74.8)	0.2
<i>Usa alcohol desinfectante de manos en casa (% Usado algunas veces)</i>	14 (25.9)	25 (23.1)	0.7
<i>Alguna vez ha amamantado</i>	53 (98.1)	108 (100.0)	0.2
<i>Actualmente está amamantando</i>	43 (79.6)	85 (78.7)	0.9
<i>Edad media de introducción de cualquier alimento / bebida suplementaria (en semanas)</i>	3.5 (3.1)	3.3 (1.4)	0.7
<i>Puntaje Z promedio de peso para la edad</i>	0.62 (1.0)	0.59 (0.92)	0.8
<i>Puntaje Z promedio de longitud para la edad</i>	0.28 (1.4)	0.45 (1.3)	0.4
<i>Puntaje Z promedio de IMC para la edad</i>	0.65 (1.2)	0.47 (1.2)	0.4
<i>Comió fruta / verdura cruda la semana pasada</i>	23 (42.6)	54 (50.0)	0.4
<i>Comió mariscos la semana pasada</i>	2 (3.7)	4 (3.7)	1.0
<i>Comió fuera de casa la semana pasada</i>	8 (14.8)	15 (13.9)	0.9
<i>Compartió una botella o taza con otra persona la semana pasada</i>	11 (20.4)	15 (13.9)	0.3
<i>Otro niño en casa en pañales</i>	7 (13.0)	22 (20.4)	0.2
<i>Asistió a un evento social la semana pasada.</i>	11 (20.4)	31 (28.7)	0.3
<i>Asistió a la guardería la semana pasada</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A
<i>Conoció / jugó con un niño fuera de casa la semana pasada (2 Perdidos)</i>	12 (22.6)	35 (32.7)	0.2
<i>Uso transporte público la semana pasada</i>	20 (37.0)	35 (32.4)	0.6
<i>Fue a nadar la semana pasada</i>	2 (3.7)	1 (0.9)	0.3
<i>Tuvo contacto con cualquier persona con diarrea y / o vómitos, dentro o fuera del hogar, la semana pasada (1 Perdido)</i>	9 (17.0)	5 (4.6)	0.02
<i>Vacunación para rotavirus completada (2 Perdidos)</i>	31 (58.5)	55 (51.4)	0.4
<i>Primer episodio de gastroenteritis (de alguna causa)</i>	25 (46.3)	22 (20.4)	0.001

N/A = No Aplica

En un modelo de regresión logística condicional que se ajusta a los predictores de gastroenteritis para *Campylobacter spp*, se observó que los factores como “aves de corral en el hogar” (OR: 3.75, IC 95%: 1.44, 9.79), y haber tenido un “episodio de gastroenteritis previo” por cualquier causa (OR: 3.33, IC 95%: 1.42, 7.78), fueron predictores significativos para gastroenteritis aguda por *Campylobacter spp*. Mientras que el “nivel de pobreza” (OR: 0,38; IC del 95%: 0,16 a 0,91) fue un factor protector significativo para no padecer gastroenteritis aguda por *Campylobacter* (**Tabla # 10**).

Tabla # 10. Predictor crudo y condicional de gastroenteritis por *Campylobacter spp*.

Características	OR Crudo (95% CI)	OR Ajustado (95% CI) [‡]
Índice de pobreza (Pobre vs no pobre)	0.39 (0.18, 0.83)	0.38 (0.16, 0.91)
Aves de corral	2.29 (1.06, 4.95)	3.75 (1.44, 9.79)
Primer episodio de gastroenteritis (De alguna causa)	3.55 (1.66, 7.60)	3.33 (1.42, 7.78)
Tiene contacto con alguna persona dentro o fuera de la casa con gastroenteritis en la semana pasada [‡]	4.17 (1.27, 13.65)	---

[‡] Modelo ajustado por grupo de edad de 3 meses, diferencia de edad residual entre casos y controles después del emparejamiento, índice de pobreza, pollo en el hogar y episodio previo de gastroenteritis.

[‡] El contacto con una persona que experimenta gastroenteritis se excluyó del cálculo OR ajustado debido a tamaños de celda ≤ 5 .

8.3 Especies de *Campylobacter* que circulan en la población en estudio.

En base a los análisis por secuenciación de Sanger, se logró identificar que *C. jejuni / coli* eran las especies correspondientes en 39 (66.1 %) de las 59 muestras de heces positivas para *Campylobacter spp*, y las muestras restantes eran especies no *C. jejuni/coli*. Entre ellas identificamos seis especies siendo la principal *C. concisus* (**Tabla # 11**). También, resulta muy notorio la identificación por primera vez de la especie *C. vulpis Italy* en una muestra de heces de origen humano. De las 14 muestras restantes, encontramos una coincidencia menor al 40% de identidad resultante en el banco de datos de NCBI GenBank (BLAST) con otra especie de *Campylobacter spp*, por ende fueron asignadas como indeterminadas.

Tabla # 11: Identificación de especies de *Campylobacter* por método de Sanger.

Especies de <i>Campylobacter</i>	Número de Muestras
<i>Campylobacter concisus</i>	3
<i>Campylobacter sp. 'vulpis_Italy'</i>	1
<i>Campylobacter hominis</i>	1
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	1
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	39
TOTAL	45

9. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en nuestro país contribuyen a la literatura que respalda la importancia de las especies comúnmente conocidas hasta la más rara de *Campylobacter* causante de enfermedades en humanos, puesto que los datos de América Central han sido escasos.⁽¹⁰⁾ Calculamos una tasa de incidencia de 11 por 10,000 personas – días y la frecuencia observada de *Campylobacter spp* en niños menores o iguales a 1 año de edad con gastroenteritis fue del 20.1 %, 70 veces mayor que el estudio anteriormente realizado en Nicaragua (2010)⁽²⁷⁾, donde se reportó una frecuencia del 0.3%. Esta enorme diferencia probablemente se deba al método empleado en ambos estudios, destacando la importancia de la alta sensibilidad que tienen los métodos moleculares en comparación al cultivo clásico.

Menores frecuencias que el nuestro (20.1 %) fueron encontrados en el hospital universidad Gondar, Noreste de Etiopía (2013)⁽⁹⁰⁾, Mwanza, Norte de Tanzania (2014)⁽⁹¹⁾ y Nueva Delhi, India (2016)⁽⁹²⁾ (15.4%, 9.7% y 15.61% respectivamente), resultados obtenido utilizando cultivos bacteriológicos clásicos, demostrando que el método molecular por RT – PCR proporciona mejores resultados que el método clásico por cultivo. Sin embargo, un estudio realizado en Camboya (2016)⁽³⁵⁾, encontró el 12% de prevalencia para *Campylobacter spp* utilizando PCR-convencional, esta diferencia podría explicarse por la población en estudio que en estos casos fueron niños hasta 5 años de edad y el método empleado, que a pesar de que ambos son métodos moleculares, indica que el RT – PCR es más sensible que el método por PCR convencional.

Sin embargo, nuestros resultados son comparables con la Cohorte MAL-ED (2018)⁽³⁹⁾ que fue del 28% utilizando el mismo método de RT – PCR. Además es importante mencionar que en el estudio MAL-ED fueron analizadas muestras que involucran países de Asia, África y América del sur, exceptuando países de Centroamérica, sin embargo ahora nuestro estudio aporta pequeños datos de esta región puesto que se enfocó en el departamento de León de Nicaragua. Por otro lado, en Dinamarca (2018)⁽⁹³⁾ y en Egipto (2018)⁽³⁸⁾ encontraron frecuencias más altas (56.24% y 42.9 % respectivamente), utilizando el método molecular por PCR convencional, esto se debe a que son países endémicos para *Campylobacter spp*.

Los resultados de este caso control anidado en América Central respaldan hallazgos recientes de que *Campylobacter* es un contribuyente significativo a la carga de la

gastroenteritis entre los infantes en países de bajo y medianos ingresos.⁽⁹⁴⁾ Se observa que *Campylobacter no-jejuni / coli* en esta población causa gastroenteritis que puede ser clínicamente menos grave que *C. jejuni / coli*, observando que la duración de la diarrea causada por este último es de mayor duración ($P = 0.04$). Por otro lado, aunque no fue significativo ($P = 0.09$), se observó la presencia de sangre en las heces, en donde solamente la especie de *C. jejuni / coli* fue identificado.

La distribución en cuanto al género de los participantes en nuestro estudio refleja que no existe asociación ($P = 0.7$) para contraer Campylobacteriosis. Por otro lado, en Morogoro, Tanzania (2016)⁽⁹⁵⁾ quienes si encuentran asociación ($P = 0.046$), que nos dice que el género masculino esta mayormente propenso a adquirir la Campylobacteriosis.

La presencia de aves de corral fue el predictor independiente más fuerte de gastroenteritis por *Campylobacter spp* (OR: 3.75, IC 95%: 1.44, 9.79), seguido de experimentar un episodio de gastroenteritis previo por cualquier otra causa (OR: 3.33, IC 95%: 1.42, 7.78). Diferentes estudios reportan que las infecciones entéricas previas pueden modificar o perturbar la composición del microbioma intestinal, lo que puede alterar la susceptibilidad a *Campylobacter spp* y dar lugar a la colonización y manifestación entérica.^(96, 97) Por último se encontró que la pobreza era un factor protector contra gastroenteritis por *Campylobacter spp* (OR: 0,38; IC del 95%: 0,16 a 0,91). Dado el importante papel de las aves de corral en la transmisión de *Campylobacter spp*, nuestro hallazgo podría explicarse por el hecho de que los hogares con más ingresos económicos pueden tener más oportunidades para el consumo de aves de corral y, por lo tanto, un mayor riesgo de exposición, que no fue capturado en nuestro estudio. Se necesitan más datos para comprender la relación entre pobreza y la gastroenteritis con respecto a la Campylobacteriosis en países de bajos y medianos ingresos como el nuestro.

El 33.9 % de los casos de gastroenteritis por *Campylobacter* eran especies no *jejuni / coli*, de los cuales se identificaron entre ellos el 15 % *C. concisus* y 5 % *C. hyointestinalis*, al igual del estudio MAL–ED en países de medios ingresos (Bangladesh, Perú y Tanzania, en 2014)⁽³⁶⁾ encontraron aislados similares como *C. hyoinstestinalis* (52.8 %) y *C. concisus* (3.7 %), con la diferencia que nosotros encontramos *C. hominis* y *C. vulpis*.

Entre las otras especies de *Campylobacter*, *C. concisus*, *C. ureolyticus*, *C. upsaliensis* y *C. lari* son conocidas como especies de *Campylobacter* "emergentes" para subrayar su creciente reconocimiento como patógenos humanos.^(99, 102) De hecho, algunos estudios

han informado que la prevalencia de *C. concisus* y *C. upsaliensis* es comparable a *C. jejuni / coli*, entre los niños que experimentan gastroenteritis.^(103, 104) *C. hyointestinalis* y *C. hominis*, cada uno de los cuales se detectó en un niño en nuestro estudio, son menos comunes y rara vez se han informado en estudios previos de gastroenteritis sintomática.⁽¹⁰⁵⁾

Un estudio de 2018 documentó por primera vez a *C. vulpis* en caninos en Italia.⁽¹⁰⁶⁾ Nuestro estudio es el primer informe publicado de *C. vulpis* en humanos. El episodio duró 10 días sin vómitos, fiebre, heces con sangre o coinfecciones virales. Este niño también había experimentado un episodio de gastroenteritis aproximadamente dos meses antes del episodio de *Campylobacter*, que se determinó negativo para *Campylobacter spp* a través de RT – PCR. Aves de corral y perros estaban presentes en el hogar en el momento de la infección, lo que puede sugerir que el niño experimentó contaminación con la cepa canina. Se necesita más investigación para comprender si *C. vulpis* puede infectar directamente y causar síntomas de gastroenteritis en humanos.

Hubo varias limitaciones en nuestro estudio, primero de las muestras positivas para especies que no son *Campylobacter jejuni / coli*, muchas no pudieron ser identificadas. Esto refleja la necesidad de utilizar tecnología de punta que permita la identificación fiable de especies raras o nuevas de *Campylobacter*, como el recién informado "*Candidatus Campylobacter infans*" en el Estudio Global Multicéntrico Entérico (GEMS).⁽¹⁰⁷⁾ Esto puede conducir al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para detectar especies raras de *Campylobacter* que son cada vez más importantes para comprender la carga global de Campylobacteriosis. Además, debido a la baja prevalencia de factores de riesgo potencialmente importantes, como el contacto con otra persona que experimentó gastroenteritis la semana anterior al episodio, no todos los factores de riesgo podrían ajustarse en el modelo logístico condicional. Finalmente, como se encontró en otros entornos en países de bajo y medianos ingresos⁽⁹⁴⁾, la prevalencia de co-infecciones en esta población fue alta (40.6 %) y hace que sea difícil atribuir todas las características clínicas observadas a la infección por *Campylobacter*. Sin embargo, las infecciones por *Campylobacter* tienen un impacto perjudicial en la salud infantil incluso cuando no causan episodios de gastroenteritis.⁽¹⁰⁸⁾ Para abordar esto, calculamos un fracción atribuible de la población para comunicar más claramente el impacto en la salud pública de *Campylobacter spp* y la proporción de gastroenteritis que podría eliminarse con una prevención efectiva de la Campylobacteriosis.

10. CONCLUSIONES

Las infecciones por *Campylobacter spp* contribuyen sustancialmente a la gastroenteritis infantil en León, Nicaragua, con especies *no jejuni/coli* frecuentemente detectadas. La reducción del contacto con las aves de corral en el hogar y las intervenciones para prevenir la gastroenteritis por cualquier causa puede reducir la Campylobacteriosis en este entorno. Los hallazgos principales en los que basamos la conclusión del presente estudio se resumen a continuación:

1. Un total de 173 niños experimentaron 293 episodios de diarrea durante el primer año de vida, estimándose una incidencia de 11 por 10,000 personas – días de infecciones por *Campylobacter spp*. De los 293 episodios se encontró que 59 (20.1 %) niños fueron positivos para *Campylobacter spp*.
2. Las características clínicas de la Campylobacteriosis en infantes leoneses de mayor frecuencia radican en diarrea, fiebre y vómito. En relación con las características clínicas presentadas entre las especies se observa que *C. jejuni/coli* posee una media de 2.7 días más que las especies *no jejuni/coli*, de duración del episodio.
3. Se logró determinar la fracción atribuible de gastroenteritis por *Campylobacter spp*, encontrándose que el 22,4% de los episodios podrían atribuirse a la infección por *Campylobacter spp*.
4. Los factores de riesgos como la presencia de “aves de corral en el hogar” y haber tenido un “episodio de gastroenteritis previo” por cualquier causa, fueron predictores significativos para gastroenteritis aguda por *Campylobacter spp*. Mientras que el “nivel de pobreza” fue un factor protector significativo para no padecer gastroenteritis aguda por *Campylobacter spp*.
5. Por último, se identificaron especies de *C. jejuni/coli* en un 66.1%, y especies *no jejuni/ coli* en un 33.9% de los episodios de gastroenteritis. Entre las especies *no jejuni/coli* se lograron identificar las siguientes especies *C. concicus*, *C. hyointestinalis*, *C. vulpis* y *C. hominis*. Siendo el caso de *C. vulpis* el primer caso reportado hasta el momento en humanos.

11. REFERENCIAS

1. Clare Onyon, Tom Dawson. Gastroenteritis. *Paediatrics and Child Health*. 2018;28(11):527-32.
2. Christa L. Fischer Walker, Igor Rudan, *et al.* Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet (London, England)*. 2013;381(9875):1405-16. PubMed PMID: 23582727. Epub 04/12. eng.
3. Li Liu, Hope L. Johnson, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*. 2012;379(9832):2151-61.
4. Bente Olesen, Jacob Neimann, *et al.* Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):3636-41. PubMed PMID: 16081890. eng.
5. Karen L. Kotloff, James P. Nataro, *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*. 2013;382(9888):209-22.
6. Glynis Kolling, Martin Wu, *et al.* Enteric pathogens through life stages. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:114-. PubMed PMID: 22937528. eng.
7. Miguel O'ryan, Yalda Lucero, *et al.* An update on management of severe acute infectious gastroenteritis in children. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2010 2010/06/01;8(6):671-82.
8. Claudio F. Lanata, Christa L. Fischer-Walker, *et al.* Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS one*. 2013;8(9):e72788-e. PubMed PMID: 24023773. eng.
9. A. Yalda Lucero. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014;25(3):463-72.
10. James A. Platts-Mills, Jie Liu, *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *The Lancet Global Health*. 2018;6(12):e1309-e18.
11. Celia Paucar Miranda, Giovanna Ugarte Silva, *et al.* Bacteriemia por *Campylobacter coli* en paciente con inmunodeficiencia primaria. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2014;75:379-80.
12. Julia Manasson, Nan Shen, *et al.* Gut Microbiota Perturbations in Reactive Arthritis and Postinfectious Spondyloarthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2018;70(2):242-54. PubMed PMID: 29073348. Epub 01/03. eng.
13. Janet E. Pope, Adriana Krizova, *et al.* *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2007;37(1):48-55. PubMed PMID: 17360026. Epub 03/13. eng.
14. Soltani Zahra Ebrahim, Rahmani Farzaneh, *et al.* Autoimmunity and cytokines in Guillain-Barré syndrome revisited: review of pathomechanisms with an eye on therapeutic options. *European Cytokine Network*. 2019 03/01;30(1):1-14.
15. Morales Óscar Phillips. Actualización en el Síndrome de Guillain-Barré. *Revista Medica Sinergia*. 2019 10/01;4(11).
16. The Center for Food Security and Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics. *Campylobacteriosis*. 2005;Enteritis por *Campylobacter*, Enteritis vibriónica, Vibriosis.

17. Humphrey T, O'Brien S, *et al.* Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol.* 2007 (117):237 - 57.
18. Maud Carron, Yu-Mei Chang, *et al.* Campylobacter, a zoonotic pathogen of global importance: Prevalence and risk factors in the fast-evolving chicken meat system of Nairobi, Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2018;12(8):e0006658.
19. M. A. Raji, J. O. Adekeye, *et al.* Bioserogroups of Campylobacter species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. *Small Ruminant Research.* 2000 2000/08/01/;37(3):215-21.
20. A. M. Mayr, S. Lick, *et al.* Rapid Detection and Differentiation of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, and Campylobacter lari in Food, Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Food Protection.* 2010;73(2):241-50.
21. F. E. I. Wang, L. I. N. Jiang, *et al.* Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Major Foodborne Pathogens in Imported Seafood. *Journal of Food Protection.* 2011;74(9):1451-61.
22. K. Bojanić, A. C. Midwinter, *et al.* Isolation of Campylobacter spp. from Client-Owned Dogs and Cats, and Retail Raw Meat Pet Food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses and Public Health.* 2017 2017/09/01;64(6):438-49.
23. Saam Torkan, Behnam Vazirian, *et al.* Prevalence of thermotolerant Campylobacter species in dogs and cats in Iran. *Veterinary medicine and science.* 2018;4(4):296-303. PubMed PMID: 30168285. Epub 08/31. eng.
24. Ludovico Dipineto, Luca Borrelli, *et al.* Campylobacter coli infection in pet birds in southern Italy. *Acta veterinaria Scandinavica.* 2017;59(1):6-. PubMed PMID: 28061877. eng.
25. World Health Organization Who Department of Communicable Disease Surveillance And Response. The increasing incidence of human campylobacteriosis report and proceeding of a WHO consultation of experts. 2001.
26. Hannu T, Mattila L, *et al.* Campylobacter-triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford).* 2002 (41):312 - 8.
27. Sylvia B D, Filemon B, *et al.* Etiology of Childhood Diarrhea Following Rotavirus Vaccine Introduction: A Prospective, Population-Based Study in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(11):1156 - 63.
28. Lund M, Nordentoft S, *et al.* MadsenDetección de Campylobacter spp. En muestras fecales de pollo mediante PCR en tiempo real. *J Clin Microbiol.* 2004 (42):5125 - 32.
29. Ridley A, Allen V. enfoque de PCR en tiempo real de laDG Newellpara la detección de fuentes ambientales de cepas de pollylobacter que colonizan cepas de Campylobacter *Apl Reinar Microbiol.* 2008 (74):2492 - 504.
30. Tadatoshi K, Shunichi S, *et al.* Campylobacter Gastroenteritis in Children. *Acta Paed Jap.* 1980.
31. Fabio C, Luis A, *et al.* CAMPYLOBACTER JEJUNI EN NINOS CON ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA *BIOMEDICA.* 1987;7:1 - 2.
32. G. Kapperud. [Campylobacter infection. Epidemiology, risk factors and preventive measures]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke.* 1994 1994/03//;114(7):795-9. PubMed PMID: 8009498. nor.
33. Stein-Zamir, Et Al. Campylobacter is the leading cause of bacterial gastroenteritis and dysentery in hospitalized children in the Western Galilee Region in Israel. *Epidemiol Infect.* 2010.
34. Lee G, Pan W, *et al.* Symptomatic and Asymptomatic Campylobacter Infections Associated with Reduced Growth in Peruvian Children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1).

35. K. Osbjer, S. Boqvist, *et al.* Risk factors associated with Campylobacter detected by PCR in humans and animals in rural Cambodia. *Epidemiol Infect.* 2016;144:2979–88.
36. James A. Platts-Mills, Jie Liu, *et al.* Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014;52(4):1074-80. PubMed PMID: 24452175. Epub 01/22. eng.
37. Roumi G, Beena U. dirigido a la búsqueda de “Perfiles clínicos y epidemiológicos de Campylobacter asociados a diarrea entre niños de New Delhi”. *Int J Enteric Pathog.* 2016;158(3).
38. Atef E, Fre De Ric P. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Epidemiology of Campylobacter Infections among Children in Egypt Rebecca Sainato. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(2):581 - 5.
39. Elizabeth T, Jie Liu, *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study *Lancet Glob Health* 2018. 2018;109(18).
40. Shulman S.T, Friedmann H.C, *et al.* Theodor Escherich: The first pediatric infectious Diseases physician. *Clin Infect Dis.* 2007;45(8):1025 - 9.
41. Burzler J.P. Campylobacter, from obscurity to celebrity. *clinical microbiology and infection.* 2004;10(10):868 - 76.
42. Centros Para El Control Y Prevencion De Enfermedades. Red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por los alimentos (FoodNet): Informe de vigilancia de FoodNet 2015 (Datos finales) . Atlanta, GA : Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE UU, CDC. 2017.
43. Sebald M, Veron M. Base DNA content and classification of vibrios. *Ann inst Pasteur.* 1963;105:897 - 910.
44. Henry R. Ethymologi: Campylobacter. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1313.
45. Aesan. Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutricional con relación a las medidas de control para reducir la presencia de Campylobacter spp. En carne fresca de aves (pollos). *Revista del comité científico.* 2012;16:21 - 5.
46. Butzler J-P, Oosterom J, *et al.* Campylobacter: pathogenecity and significance in foods. *Int J Food Microbiol.* 1991 (12):1 - 8.
47. Gupta R. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales). *BMC Genomics.* 2006;7(167).
48. Lies Debruyne, Stephen L. W. On, *et al.* Novel Campylobacter lari-like bacteria from humans and molluscs: description of Campylobacter peloridis sp. nov., Campylobacter lari subsp. concheus subsp. nov. and Campylobacter lari subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2009;59(5):1126-32.
49. P. Vandamme, L. Debruyne, *et al.* Reclassification of Bacteroides ureolyticus as Campylobacter ureolyticus comb. nov., and emended description of the genus Campylobacter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2010;60(9):2016-22.
50. Edit Urbán, Gabriella Terhes, *et al.* Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe.* 2010 2010/06/01;16(3):283-8.

51. Véron M, Lenvoisé-Furet A. Anaerobic respiration of fumarate as a differential test between *Campylobacter fetus* and *Campylobacter jejuni*. *Current Microbiology*. 1981;6:349.
52. J. M. Cappelier, J. Minet, *et al.* Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(11):5154-7. PubMed PMID: 10543837.
53. Margie D. Lee, Diane G. Newell. *Campylobacter* in Poultry: Filling an Ecological Niche: SPIE; 2006. 9 p.
54. Michael J. Sellars, Stephen J. Hall, *et al.* Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *Journal of bacteriology*. 2002;184(15):4187-96. PubMed PMID: 12107136.
55. Marc S. Pittman, Karen T. Elvers, *et al.* Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Molecular Microbiology*. 2007;63(2):575-90.
56. Derrick E. Fouts, Emmanuel F. Mongodin, *et al.* Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS biology*. 2005;3(1):e15-e. PubMed PMID: 15660156. Epub 01/04.
57. J. Parkhill, B. W. Wren, *et al.* The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 2000 02/10/online;403:665.
58. Jyoti Velayudhan, David J. Kelly. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*. 2002;148(3):685-94.
59. Martin Stahl, Lorna M. Friis, *et al.* L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(17):7194-9. PubMed PMID: 21482772. Epub 04/11.
60. Akitoye O. Coker, Raphael D. Isokpehi, *et al.* Human *Campylobacteriosis* in developing countries. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(3):237-44. PubMed PMID: 11927019.
61. M. B. Skirrow. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. *International Journal of Food Microbiology*. 1991 1991/01/01/;12(1):9-16.
62. Marder Ep, Cieslak Pr, *et al.* Incidencia y tendencias de la infección con patógenos transmitidos comúnmente a través de los alimentos y el efecto de un mayor uso de pruebas de diagnóstico independientes de la cultura en la Red de vigilancia activa de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos, 10 sitios de EE . UU., 2013-2016 *Morb Mortal Wkly* 2017;66(15):397 - 403.
63. James A. Platts-Mills, Margaret Kosek. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(5):444-50. PubMed PMID: 25023741.
64. The Center for Food Security and Public Health. *Campylobacteriosis Enteritis por Campylobacter, Enteritis vibriónica, Vibriosis*. 2005:1.
65. Centros Para El Control Y Prevencion De Enfermedades (Cdc). Brote multiestado de infecciones por *Campylobacter* resistentes a múltiples fármacos relacionadas con el contacto con cachorros de tiendas de mascotas 2017.

66. Gaudreau C, Rodrigues C, *et al.* Brote de larga duración de *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni* resistente a eritromicina y ciprofloxacina de 2003 a 2013 en hombres que tienen sexo con hombres, Quebec, Canadá *Clin Infect Dis.* 2015;61(10):1549 - 52.
67. T.M Wassenaar. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Lett Appl Microbiol.* 2011 (53):253 - 63.
68. Tauxe Rv. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrial nations. In: Nachamkin I, . *Washington ASM* 1992.
69. Karmali Ma, Fleming Pc. *Campylobacter* enteritis in children. *J Pediatr* 1979 (94):522 - 7.
70. Kathryn T. Young, Lindsay M. Davis, *et al.* *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology.* 2007 09/01/online;5:665.
71. Tadhg O Cróinín, Steffen Backert. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2012;2:25-. PubMed PMID: 22919617.
72. Josiane Da S. Quetz, Ila F. N. Lima, *et al.* *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *Journal of Medical Microbiology.* 2012;61(4):507-13.
73. Willison H. The immunobiology of Guillain-Barré Syndromes. *Journal Pripher Nervous System.* 2005;10(2):94 - 112.
74. Riny Janssen, Karen A. Krogfelt, *et al.* Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clinical microbiology reviews.* 2008;21(3):505-18. PubMed PMID: 18625685.
75. Kaisar A. Talukder, Mohammad Aslam, *et al.* Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of clinical microbiology.* 2008;46(4):1485-8. PubMed PMID: 18287317. Epub 02/20.
76. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 2007 (15):456 - 61.
77. R. S. Tsang, G. Figueroa, *et al.* Flagella as a potential marker for *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré syndrome. *Journal of clinical microbiology.* 2001;39(2):762-4. PubMed PMID: 11158146.
78. Michael E. Konkel, John D. Klena, *et al.* Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of bacteriology.* 2004;186(11):3296-303. PubMed PMID: 15150214.
79. Negro Re, Levine Mm, *et al.* Infección experimental por *Campylobacter jejuni* en humanos *J Infect Dis* 1988;157(3):472- 9.
80. K. R. Neal, H. M. Scott, *et al.* Omeprazole as a risk factor for *campylobacter* gastroenteritis: case-control study. *BMJ (Clinical research ed).* 1996;312(7028):414-5. PubMed PMID: 8601113.
81. Van S, Duursma Jp, *et al.* Colitis por *Campylobacter* : hallazgos inmunohistoquímicos histológicos y ultraestructurales. *Gut* 1985;26(9):945 - 51.
82. Bolton Dj. *Campylobacter* virulencia y factores de supervivencia. *Alimento Microbiol* 2015 (48):99 - 108.
83. Zoete Mr, Keestra S, *et al.* Reconstitución de un sitio de unión al receptor 5 similar a Toll en la flagelina de *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem.* 2010;285(16):12149 - 58.
84. Tracz Dm, Keelan M, *et al.* Virus y diarrea sanguinolenta en enteritis por *Campylobacter jejuni*. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(6):838 - 43.

85. Blaser Mj, Duncan D. Respuesta del anticuerpo sérico humano a la infección por *Campylobacter jejuni* medida en un ensayo inmunoenzimático *Infect Immun*. 1984;44(2):292 - 8.
86. Paolo Bonilauri, Lia Bardasi, *et al.* Detection of Food Hazards in Foods: Comparison of Real Time Polymerase Chain Reaction and Cultural Methods. *Italian journal of food safety*. 2016;5(1):5641-. PubMed PMID: 27800434.
87. Gregor Gorkiewicz, Gebhard Feierl, *et al.* Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(6):2537-46. PubMed PMID: 12791878.
88. Centers for Disease Control And Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2014 (Final Report).Atlanta, GA: U. *Department of Health and Human Services*. 2016.
89. Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni*: case-case analysis as a tool for elucidating risks at home and abroad. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(4):561 - 8.
90. Ayalew Lengerh, Feleke Moges, *et al.* Prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter* species among under five diarrheic children at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics*. 2013/05/21;13(1):82.
91. Anna-Pendo Deogratias, Martha F. Mushi, *et al.* Prevalence and determinants of *Campylobacter* infection among under five children with acute watery diarrhea in Mwanza, North Tanzania. *Archives of Public Health*. 2014 2014/05/30;72(1):17.
92. Roumi Ghosh, Beena Uppal, *et al.* Clinical Profile and Epidemiology of *Campylobacter* Associated Diarrhea Among Children in New Delhi, India. *Int J Enteric Pathog*. 2016;4(3):5-35684.
93. Katrin Gaardbo Kuhn, Eva Møller Nielsen, *et al.* Determinants of sporadic *Campylobacter* infections in Denmark: a nationwide case-control study among children and young adults. *Clinical epidemiology*. 2018;10:1695-707. PubMed PMID: 30538574. eng.
94. James A. Platts-Mills, Sudhir Babji, *et al.* Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*. 2015;3(9):e564-e75.
95. Idrissa S. Chuma, Hezron E. Nonga, *et al.* Epidemiology and RAPD-PCR typing of thermophilic campylobacters from children under five years and chickens in Morogoro Municipality, Tanzania. *BMC infectious diseases*. 2016;16(1):692-. PubMed PMID: 27871251. eng.
96. Chad K. Porter, David R. Tribble, *et al.* Infectious Gastroenteritis and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2008;135(3):781-6.
97. C. Kampmann, J. Dicksved, *et al.* Composition of human faecal microbiota in resistance to *Campylobacter* infection. *clinical microbiology and infection*. 2016;22(1):61.e1-.e8.
98. Taranjit Kaur, Jatinder Singh, *et al.* *Campylobacter troglodytis*; sp. nov., Isolated from Feces of Human-Habituated Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(7):2366.
99. Nadeem O. Kaakoush, Natalia Castaño-Rodríguez, *et al.* Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):687-720. PubMed PMID: 26062576. eng.

100. Barbara A. Piperata, Seungjun Lee, *et al.* Characterization of the gut microbiota of Nicaraguan children in a water insecure context. *American Journal of Human Biology*. 2020 2020/01/01;32(1):e23371.
101. Khorshed Alam, Albert Lastovica, *et al.* Clinical Characteristics and Serotype Distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Diarrhoeic Patients in Dhaka, Bangladesh, and Cape Town, South Africa. *Bangladesh Journal of Microbiology*. 2008 06/10;23.
102. M. A. Raji, J. O. Adekeye, *et al.* Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association*. 2000 2000/08//;37(3):215-21. PubMed PMID: 10867319. eng.
103. K. N. Stanley, J. S. Wallace, *et al.* The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle and calves. *Journal of Applied Microbiology*. 1998 1998/09/01;85(3):472-80.
104. J. Baker, M. D. Barton, *et al.* *Campylobacter* species in cats and dogs in South Australia. *Australian Veterinary Journal*. 1999 1999/10/01;77(10):662-6.
105. Si Ming Man. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011 12/01;8:669-85.
106. F. De Massis, P. Calistri, *et al.* *Campylobacter* infection occurrence in canine population in Italy. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018;73:146.
107. Xiaoming Bian, Jolene M. Garber, *et al.* *Campylobacter* Abundance in Breastfed Infants and Identification of a New Species in the Global Enterics Multicenter Study. *mSphere*. 2020;5(1):e00735-19. PubMed PMID: 31941810. eng.
108. Elizabeth T. Rogawski, Jie Liu, *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *The Lancet Global Health*. 2018;6(12):e1319-e28.

12. ANEXOS



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN - León

Comité de Ética para Investigaciones Biomédicas (CEIB)
"Dr. Uriel Guevara Guerrero"
FWA00004523 / IRB00003342

León, 18 de enero de 2017

ACTA No. 2

Miembros Fundadores

- Dr. Uriel Guevara Guerrero
Médico Patólogo
- Dr. Jaime Granera Soto
Médico y Sacerdote
- Dra. Nubia Pacheco Solís
Médico y Dermatóloga

Comité Ejecutivo

- Dra. Nubia Pacheco Solís
Presidenta
- Dr. Efrén Castellón C.
Vice - Presidente
- Dr. Orlando Morales N.
Secretario

Miembros alternos

- Dr. Jorge Alemán Pineda
- MSc. Irella Romero S.
- Dr. William Ugarte

Dra. Sylvia Becker-Dreps
Dr. Filemón Bucardo
Investigadores
Sus Manos

Estimados Doctores:

El CEIB les comunica que recibió su trabajo de Investigación para que sea analizado por este Comité, titulado: "Historia natural, inmunidad y patrones de transmisión de sapovirus en una cohorte de niños nicaragüenses, seguidos desde el nacimiento". Después de haber efectuado dicha revisión se determina lo siguiente: **Se aprueba la conducción de dicha Investigación, basados en que cumple con los principios delineados en la Declaración de Helsinki y reúne los principios éticos básicos.**

Como Comité de Ética, valoramos muy positivamente la importancia de este trabajo y esperamos que sus resultados sean positivos. Copia de esta carta debe estar presente en el Protocolo e informe final.

Sin otro particular, nos es grato suscribirnos.

Atentamente,

DRA. NUBIA A. PACHECO SOLÍS
Presidenta del CEIB
Facultad de CC. MM.

DR. ORLANDO MORALES N.
Secretario del CEIB
Facultad de CC. MM.

DRA. MERCEDES CÁCERES, PhD
Vice-Decano
Facultad de Ciencias Médicas

Cc: Archivo
NPS/rhl

A la libertad por la Universidad

Fundado en la Facultad de Ciencias Médicas UNAN - León Nicaragua Abril de 1995 comiteticunanteon@gmail.com Telef: 2311-4675

Expiration data 13/03/2017 IRB00003342

Imagen 1: Carta de comité de ética aprobada.