МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ИНФЕКЦИОЗНИ БОЛЕСТИ, ПАРАЗИТОЛОГИЯ И ТРОПИЧЕСКА МЕДИЦИНА

СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ - София

Д-р Валери Рангелов Велев

КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ – КЛИНИЧНО ПРОТИЧАНЕ, ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА И ЕТИОЛОГИЧНО ЛЕЧЕНИЕ

Дисертационен труд

за придобиване на научно-образователна степен „доктор“

Докторска програма „**Инфекциозни болести**“

Научен ръководител: Доц. д-р Атанас Мангъров, дм

Научен консултант: Проф. д-р Майда Тихолова, дм

2017

София

Използвани съкращения……4
Въведение…….....6
Глава I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР…….……7
- Диарийни заболявания по света……..7
- Диарийни заболявания в България…….10
- История…….12
- Микробиология…….....13
- Епидемиология…….16
- Патогенеза…… …23
- Клинично протичане……26
- Диагностика……. ……34
- Етиологично лечение и антибиотична резистентност…..40
- Превенция……..44

Глава II. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

1. **Цел и задачи**……..….46
2. **Материали и методи**…….…… 47
a. Пациенти…… …. .47
b. Клинични материали……. ……..48
c. Методи……50
- Анамнеза и епидемиологична анамнеза…….50
- Физикален статус…….....50
- Стандартни лабораторни изследвания……51
- Образни изследвания……51
- Специализирани тестове за етиологична диагноза……....51
- Статистически методи……..……..….59

3. **Резултати и обсъждане**……..……...62
a. Демографска характеристика на пациентите….....62
b. Клинична характеристика на инфекцията……..66
c. Случаи на извънчревни усложнения при кампилобактериозата…….…77

d. Клинично протичане в зависимост от вида на причинителя……..83
e. Етиологично лечение……86
6. Лабораторна диагностика…….……90
- Идентификация на *Campylobacter* spp. чрез ИХТ……..….90
- Изолиране на *Campylobacter jejuni/coli* от проби фецес….92
- Биохимична идентификация на *Campylobacter* spp……93
- Молекулярно-биологични методи за идентификация и диференциация на *Campylobacter jejuni/coli* ……98
Multiplex PCR анализ …….……....99
Eva Green Real-Time mPCR анализ ……...102
- Сравняване диагностичната стойност при ИХТ и Eva Green Real-Time mPCR метода……109
Изводи……..… ……..111
Приноси……. ……112
Книгопис…… …….114
Публикации във връзка с дисертационния труд ……136

Използвани съкращения:

На кирилица:

БЧИ – бактериална чревна инфекция

ВЧИ – вирусна чревна инфекция

ДНК – дезоксирибуноклеинова киселина

ЕС – Европейски съюз

ЕК – Европейска комисия

ИХТ – имунохроматографски тест

НРЛ – национална референтна лаборатория

НЦОЗА – Национален център за обществено здраве и анализи

ПКК – пълна кръвна картина

СБАЛИПБ – Специализирана болница за активно лечение по инфекциозни и паразитни болести

СЗО – Световна здравна организация

СПТ – свободно подвижна течност

СЖА – свободно живеещи амеби

СУЕ – скорост на утаяване на еритроцитите

Т3SS – Тип 3 секреторна система

Т4SS- Тип 4 секреторна система

На латиница:

CDT – цитолетален дистендинг токсин

CFU – колония образуваща единица

CPS – капсулен полизахарид

ECDC – Европейски център за контрол на заболяванията

EFSA – Европейска агенция по безопасност на храните

ELISA – Ензимосвързан сорбентен анализ

FAO – Агенция по храни и земеделски култури

FoodNet – Мрежа за контрол на болести пренасяни чрез храни

GBS – Синдром на Гилен-Баре

ICT (ICA) – имунохроматографски тест

LOS - липоолигозахарид

MLST – мултилокусно секвениране

PCR – полимеразно-верижна реакция

PFGE – пулсова гел-електрофореза

WHO - Световна здравна организация

ZOT – зонула оклуденс токсин

“Защо никога не съм виждал дракони?
— Защото никога не си вярвал, че съществуват!”

Тери Пратчет, „Цветът на магията“

Въведение

Ентеропатогенните бактерии са причинители на остри инфекциозни диарии, които са глобален здравен проблем. Всяка година се регистрират над 1,5 милиарда случаи на пациенти с диариен синдром. Все още диарийните заболявания, наред с пневмониите, са основна причина за смъртността при деца на възраст под 5 години, а от социално-икономическа гледна точка поглъщат огромен финансов ресурс на здравеопазните системи.

Campylobacter spp. са най-често съобщаваните причинители на бактериални гастроентерити в развитите страни, респективно кампилобактериозата се явява най-честата причина за остра диария от бактериален произход. През 2007 г. FoodNet от CDC изчисляват честотата на кампилобактериозите на 13 случая на 100 000 население, с прогноза да се достигне до 2-3 милиона души ежегодно. За жалост все още не разполагаме с точни систематизирани данни за кампилобактериозите в България, но според достъпната ни литература *Campylobacter* играе важна роля като бактериален причинител на ентероколити и у нас.

Кампилобактериозата протича от безсимптомно носителство или с дискретна симптоматика до гастроентерит с ясно изразена клинична картина. Най-често инфекцията протича с диария и фебрилитет, евентуално с повръщане, главоболие, болки в кръста, миалгия. Изпражненията са воднисти, тревисто зелени, често с кръв и слуз.

Заболяванията, причинени от *Campylobacter* обикновено са спорадични, рядко епидемични, като броя на случаите се увеличава през влажните и топли пролетно-летни месеци – март, април, май. Инфекцията

обикновено се проявявя няколко дни след консумация на недостатъчно термично обработена храна, предимно птиче месо или непастьоризирано мляко.

В нашата страна все още не се прилага рутинно изследване за *Campylobacter* spp. при диарийно болните, а когато се прави се използват класическите културелни методи. Те са бавни, трудоемки и капризни. Това води до забавяне на етиологичната диагноза, липсата на антибиотична терапия или напротив, полипрагмазия с прилагане на ненужни антибиотици.

Във връзка с липсата на точни епидемиологични данни за кампилобактериозите у нас, посочените клинико-диагностични и терапевтични затруднения, в този труд описваме въвеждането на бързите (имунохроматографски) тестове у сравнително голям брой хоспитализирани болни в детска възраст, проследяваме клиничното протичане на заболяването и верифицираме данните получени имунохроматографски чрез подбрани от нас съвременни молекулярно-биологични методи за идентифициране и диференциране на клинични щамове *Campylobacter*.

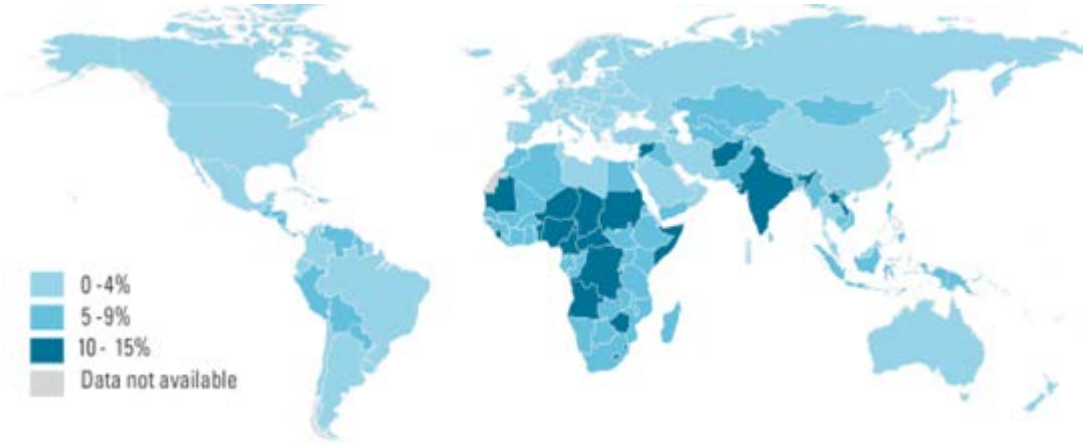
I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Campylobacter spp. се счита за най-честият причинител на остри бактериални гастроентерити в света, а основен симптом на кампилобактериозата е инфекциозната диария (*WHO/FAO, 2012; Tam C., et al., 2012; Vila J., et al., 2016*).

1. Диарийни заболявания по света

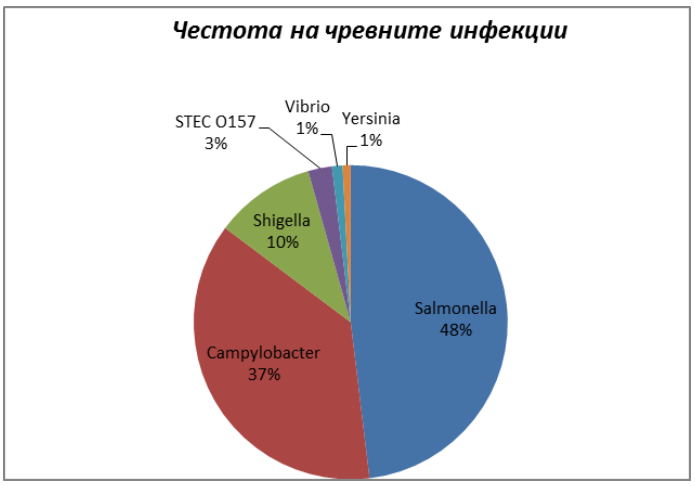
Инфекциозната диария е водеща причина за заболеваемост и смъртност при децата в световен мащаб (*Martines et al., 1991; Gomi, H., et al,. 2001*).

По данни на Световната здравна организация (СЗО) острите гастроентерити причиняват около 750 млн. диарийни епизода годишно, а в развиващите се страни водят до смъртта на над 4,5 млн. деца под 5 годишна възраст (*Murry and Lopez 1997*) (фиг.1). Основните мерки за намаляване на тази смъртност продължават да са класическите, успешни и лесно приложими, методики за рехидратация до които обаче достъпът в икономически изостаналите страни е все още неадекватен (*Boschi-Pinto et al,. 2008*).



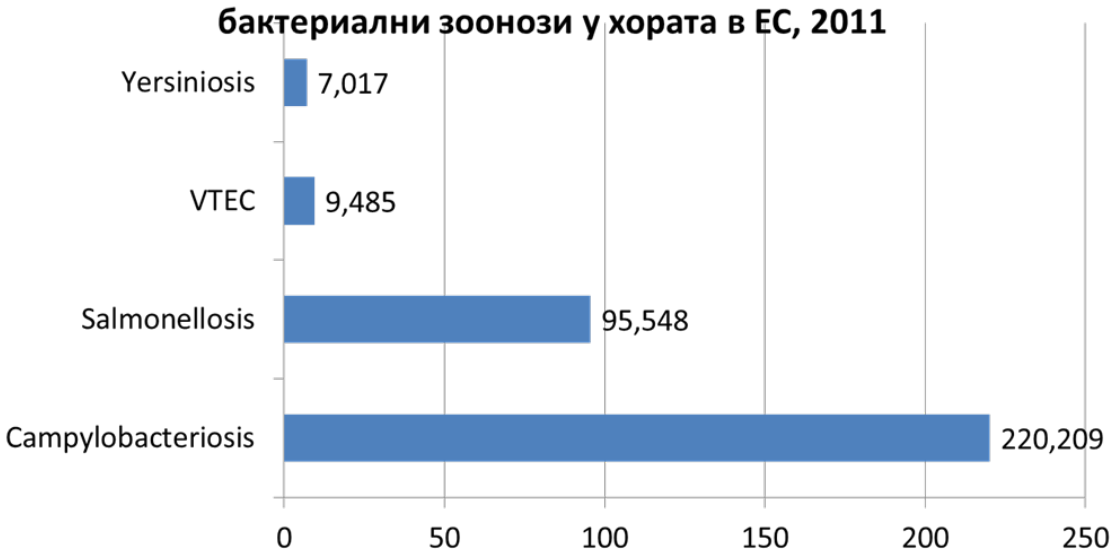
Фиг.1. Процент детска смъртност дължащ се на диария в различни райони на света (WHO, 2015).

Според мнозинството автори водещ етиологичен причинител на диарийни заболявания в ранна детска възраст са вирусите, в около 20 % от случаите причинители са бактерии, като водещи причинители са *Campylobacter* spp. и *Salmonella* spp. На протозои се дължат под 10 % от гастроентеритите (*Guarino A., et al,.2008; Friesema I., et al., 2012; Atkinson W., et al., 2012*) (Фиг. 2).



Фиг. 2. Етиология на острите бактериални чревни инфекции в световен мащаб към 2013 г. (WHO, 2014).

И в Европа водещата причина за детска смъртност наред с пневмониите остава диарията. Кампилобактериозата е най-често съобщаваната стомашно-чревна бактериална зооноза в цяла Европа (Фиг. 3).

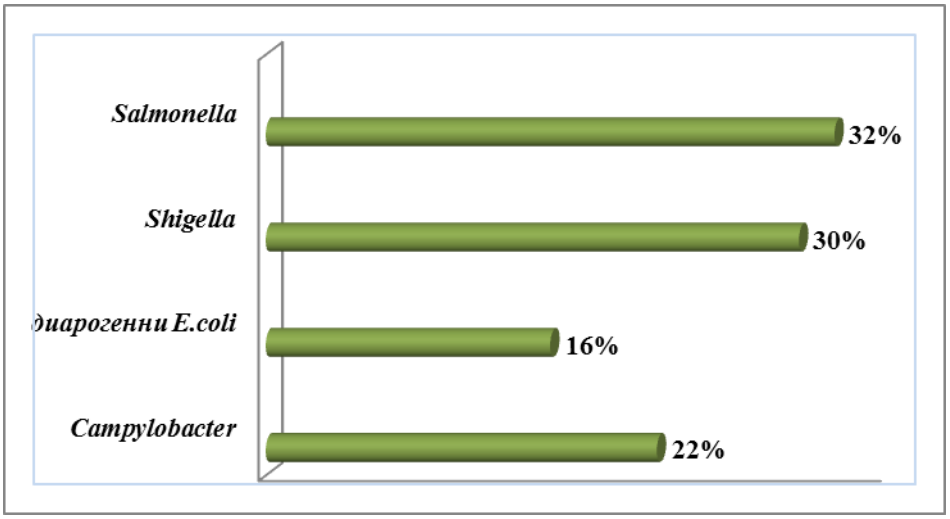


Фиг. 3. Официално регистрирани бактериални зоонози при хората в ЕС за 2011 г. (*ECDC Ann. Epid. Rep., 2013*)

За периода 2006 – 2009 г. средно по 50 на 100 хил. души заболяват от бактериалната зооноза. Тя се среща основно при деца под 5 години, като превалират заболелите от мъжки пол (144,34 мъже срещу 114,71 жени на 100 хил. души за 2009 г.).

2. Диарийни заболявания в България

В България най-засегнати от чревни инфекции са децата до 9 г. възраст, със своеобразен пик във възрастта 0 – 4 г. (заболяемост 3311,14‰$_{000}$ за 2014). При децата на възраст 5-19 г. заболяемостта спада, като в отделните групи варира между 958,09 и 244,10‰$_{000}$. (*ECDC, Stockholm Ann. Epid. Rep., 2015*). Чревните инфекции с неуточнени причинители продължават да са с висок дял - заемат 69,83% от общия брой инфекциозни заболявания на гастроинтестиналния тракт при децата (64,45-87,97%). Макар и кампилобактериозата да е в списъка на задължително регистриращите се заболявания, съществена част от случаите остават недиагностицирани или след диагностициране не се регистрирант официално (*Nedkova V. et al., 2008; Ivanova K., et al., 2010*; *EFSA Journal, 2013*). До момента все още не разполагаме със систематични данни за кампилобактериозите в България. Поради тази причина, според достъпната ни литература, представяме данни за термофилни *C. jejuni* и *C.coli* в етиологията на диарийни заболявания в София, за периода от 1987 г. до 2008 г. (фиг. 4).



Фиг 4. Етиологията на диарийни заболявания в София, за периода от 1987 до 2008 г.

Салмонелозите са най-често срещаните чревни бактериални инфекции в детската възраст в България. През последните 15 години се наблюдава намаляване на регистрираната заболяемост от салмонелни инфекции в страната, но ежегодно има плавно покачване на случаите на кампилобактериоза (*Ivanova K., et al.,2010*). Шигелозите вече се нареждат на трето място, а след тях по-честота следват йерсиниозите и ешерихиозите. В България адекватен активен надзор и систематични данни за инфекцията с *Campylobacter* практически липсват или са налични само за районна на София. Това до голяма степен се дължи на факта, че в микробиологичните лаборатории в страната диагностиката на кампилобактериозите се неглижира, като се приема че те протичат основно като самоограничаващи се гастроентерити. Поради това най-често и спорадичните случаи и епидемичните взривове се пропускат или не се докладват (*Boyanova L.,et. al.2004; Nedkova V. et al., 2008; Ivanova K., et al., 2010*).

3. История

Campylobacter spp. се описва като причинител на заболяване при хората едва през 70-те години на миналия век. Въпреки това, във ветеринарната медицина има съобщения за заболявания много по-рано. Ветеринарните лекари McFadyean и Stockman идентифицират в ембрионална тъкан на овце „неизвестна бактерия в ембрионите приличаща на вибрион" още през 1906 г. (*McFadyean, J., 1913*). Пръв Escherich публикува 3 статии през 1882 г. описващи бактериалните му проучвания върху фецес от 72 деца с диариен синдром. От 35 проби той изолира вибрион, който по-късно идентично описват и McFadyean и Stockman (*Butzler J. et al., 1973*). Първият документиран случай на кампилобактериоза у хора е хранителен взрив в Илиноиз през 1938 г., където се описва диарийно заболяване сред затворници консумирали мляко замърсено с фекалии. Бактериите обаче не биват култивирани успешно (*Levy A., 1946*). Позитивират се само бульонни култури заразени с кръв, поради факта че по това време селективните техники за култивиране не са разработени. По това време Elizabeth King, която също работи върху описанието на бактерия допуска, че той съвсем не е толкова рядък, а основен проблем са неефективните техники за култивиране. Екипът на King е първият, който подчертава значението на използваната температура за успеха на култивирането (*King E., 1957*). Изолирането на тези бактерии от пациенти, страдащи от стомашно-чревни заболявания и след нейните разработки става предимно от кръв, тъй като опитите за получаване на трайна култура от фекалиите на пациентите обикновено водели до замърсяване и растеж на колиформи (*Bokkenheuser, V.,* 1970). За да се избегне замърсяване, в исторически план се въвеждат два метода за изолиране на вибриони (*Campylobacter* spp.) – мембранен и с цефалотин. През 1968 г. в Брюксел е направен първият успешен опит за изолиране

на *Campylobacter*. Бактериите се изолират от фекалиите чрез филтрационна техника на селективни среди. За филтриране се използват мембранни филтри с големина на порите 0,64 μm – така през тях преминават малките видове от род *Campylobacter,* а останалите по-едри бактерии във фецеса се задържат (*Dekeyser P., et al., 1972*). Вторият метод се базира на откритието на резистентен на цефалотин щам, който е изолиран от кръвта на болни с диариен синдром. Cooper и Slee поставят дискове с цефалотин върху петрита с агар и посяват проби от 20 болни. *Campylobacter* е открит в зони с понижена концентрация на кислород около дискове с цефалотин (*Cooper A., 1971; Slee K., 1972*).

Техниките за изолиране *Campylobacter* spp. се доусъвършенстват от Skirrow, който инокулира фекални проби директно върху среда, допълнена с антибиотици с последващо инкубиране при 43°C податмосферни условия на 5% кислород, 10% въглероден диоксид и 85% азот (*Skirrow B., 1977*).

За разлика от ранните успешни разработки върху кампилобактериозите при хора в световен мащаб, в България едва през 1983 г. доц. Мая Марина и проф. Тягуненко успешно изолират *C. jejuni* от фекална проба на дете с ентероколит. Това е първият в страната случай на изолиран кампилобактер от човек. До тогава успешно се изолират *C. coli* и *C. fetus* единствено от животни (*Марина, 1985; Боянова и сътр. 1987*).

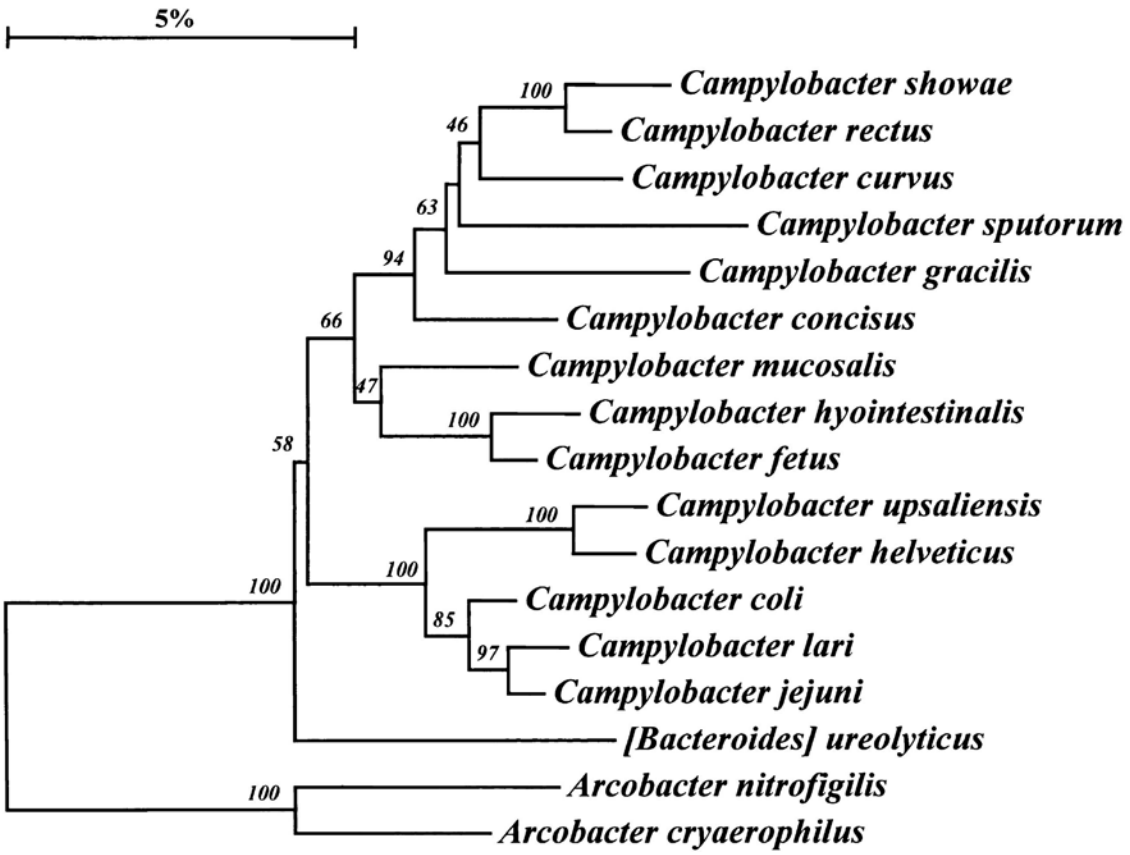
4. Микробиология

4.1. Таксономия

За филогенетичен анализ на разред *Campylobacterales* са използвани главно методи за секвениране на 16S рРНК участъци, чрез които са

разграничени семействата *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* и "*Nautilaceae*". Те са активно делящи се клетки, обикновено спирало-образни. Метаболитно и екологично разнообразни са, включват човешки и животински патогени, като повечето бактерии от разреда са микроаерофилни.

Род *Campylobacter* е част от Семейство *Campylobacterales* на клас протеобактерии и включва 17 вида, от които 4 са разделени на 2 подвида (Фиг. 5**)**. Върху систематиката на кампилобактер е работено и с множество други методи. Разработени са няколко серологични, които акцентират главно върху таксономията и епидемиологията на *C. jejuni* и *C. coli* (*Patton и Wachsmuth, 1992*). Също така за типизиране са използвани бактериофаги, плазмид-профилиране, и множество молекулярни ДНК-методи (импулсна гел-електрофореза, PCR - геномни отпечатъци, риботипизиране и др.), като тези методи са включвани и в редица епидемиологични проучвания (*Griffiths and Park,1990; Vandamme P., et al., 1991;Patton and Wachsmuth, 1992*).



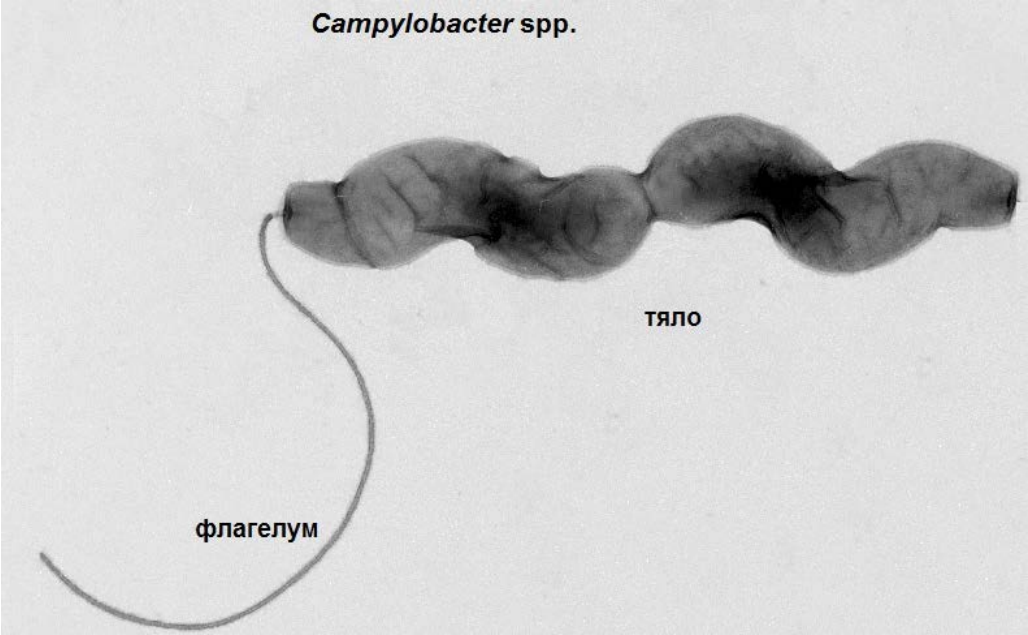
Фиг. 5. Филогенеза на род *Campylobacter*.

Метод на Neighbor-Joining.

Bar = 5% разлика в 16S рРНК нуклеотидни последователности.

4. 2. Биология и морфология

При повечето видове клетките са тънки S-образни или спирално извити пръчици с размери 0,2 – 0,8 μm x 0,5 – 5,0 μm. Неспорообразуващи са. Обикновено спиралите са една или повече, като могат да достигнат до 8. Само по изключение в стари култури клетките могат да са сферични. С многослойна полярна Грам-отрицателна мембрана са. Поради наличието на едно или повече камшичета на полюсите си са бързо подвижни, а заради формата си движенията са специфични подобно на въртене на тирбушон (фиг. 6).



Фиг. 6. Устройство на *Campylobacter* spp. (Institute of Food Research, USA, 2013)

Клетките са микроаерофилни, растат само при концентрация на 0_2 между 3% и 15% и на CO_2 35%. Оптималната температура за повечето видове е 35-37 °C, но *C. jejuni* и *C. coli* са термофилни и оптималната им температура за растеж е 42 °C. В огромното си мнозинство *Campylobacter* spp. са патогенни за животните и човека. Изолирани са от органи на гастро-интестиналния тракст, дихателната система, репродуктивната система, устната кухина на хора и животни (*Lefébure T. et al., 2009; BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology, 2005; On S., 2000*).

5. Епидемиология

Най-често е трудно да се проследи произходът на кампилобактериозата поради спорадичния характер на инфекцията и голямата роля която играе процесът кръстосано замърсяване (cross-contamination). Повечето здравни системи в света работят активно за да намалят честотата на тази хранителна инфекция, но макар да имат известен напредък, кампилобактериозата при хората все още е трудно предотвратимо заболяване.

Тъй като кампилобактериозата е зооноза, която се предава основно по хранителен и воден път, с нея в глобален мащаб са заети Световната здравна организация (World Health Organisation, WHO), Организацията по храните към ООН (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) и Световната организация за здраве при животните (World Organisation for Animal Health, OIE). Основните срещи на СЗО по отношение на инфекцията са през 2000 и 2002 година след няколко по-малки локални конференции. Постигнати са консенсуси за редица препоръки и е създаден Съвместен център за научни изледвания на кампилобакктериозата с основно звено в Уртрехт, Холандия (*WHO/FAO. The Global View of Campylobacteriosis, 2012*). През 2000 за пръв път е публикуван генома на *Campylobacter*, което позволява и бързото развитие на молекулярната епидемиология (*Manning, G., et al., 2001; Parkhill, J., et al., 2000*).

Campylobacter spp. е изолиран от гастро-интестиналния тракт, репродуктивната система, устната кухина и др. на много животни и човек. *C. jejuni* е най-честият причинител при хората, като освен това може да се изолира като патоген и у редица животни – аборти при овцете (*Hedstrom O., et al., 1987*), причинява заболявания у говедата (*Welsh, R., 1984*), домашни птици (*Stephens C., et al., 1998*), кучета

(*Misawa N., et al., 2002*), коне (*Hong C., et al., 1989*) и др. У голяма част от животните обаче те не винаги причиняват заболяване.

5. 1. Резервоари на инфекцията

Птици

Според повечето автори, основният резервоар на *Campylobacter* са птиците, поради факта, че телесната им температура е много по-подходяща за развитието им от тази на бозайниците. Бактериите изглежда са най-добре адаптирани към птичите черва и затова са изолирани от множество диви и домашни видове (*Stephens C., et al., 1998; Newell D., et. al.,2000*). Най-разпространените видове сред птиците, особено сред бройлери и кокошки – носачки са *C. jejuni* и *C. coli.* (*Stoyanchev T., et al., 2007; Cox N., et al.,2002a*). Често са колонизирани и червата на пуйки, гъски, патици, щрауси (*Cox N. et al., 2000; Newell D., et. al.,2000*).

Campylobacter е широко разпространен и сред много видове диви птици (*Broman T., 2003*). Според някои автори обаче бактериите са разпределени неравномерно между видовете, като колонизацията много зависи от типа хранене на съответния вид птици (*Waldenström J., et al., 2002*). При дивите птици също се срещат най-често *C. jejuni* и *C. coli,* но и необичайно често се изолира *C. lari*. Повечето автори приемат, че дивите птици са важни резервоари водещи до инфектирането на селскостопански птици и човек (*Broman T. et al., 2004; Stoyanchev T., et al., 2007; Jore S., et al., 2010*).

Други животни

При говеда и овце превалира *C. jejuni*, а *C. coli* се изолира сравнително рядко. При свинете съотношението между двата вида е обратното и честотата на *C. coli* е значителна (*Guévremont E., et al.,* 2004). Кучетата и котките са чести носители на *Campylobacter,* като могат да имат или да нямат диария. Най-често от тях се изолира *C. upsaliensis*, като разбира се другата голяма част от изолатите както и при останалите животни си остават *C. jejuni* и *C. coli* (*Hald B., et al., 2004; Sandberg, M.,et al., 2002*). Множество автори подчертават все по-важната роля на компанийните животни (кучета и котки домашни любимци) за заразяване на хората, поради факта, че при тях кампилобактериозата обикновено е безсимптомна (*Tamborini A., et al., 2012*).

5.2. Кампилобактер в хранителни продукти

Всеизвестно е наличието на *Campylobacter* в цялата верига от производство на бройлери в света, като според редица автори контаминацията при замразено или прясно пилешкото месо варира от 7% до 85% (*Kramer, J., et al., 2000; Ma L., et al., 2014*). Докладвани са множество случаи на заразяване при консумация на термично обработено пилешко месо, но като се има предвид термолабилността на бактерия, най-вероятно тук става дума за лоши хигиенни практики при готвене и кръсосано замърсяване (*Quinones-Ramirez E., et al., 2000*). Когато говорим обаче за съвременните кулинарни тенденции и консумацията на по-специфични гурме – продукти като пилешки или гъши дроб, пастет и др., някои автори описват директно заразяване чрез консумация на птичи продукти и дават адекватни съвети за превенция (*Hutchison M. et al., 2015*).

Месото от други животни има по-малко епидемиологично значение, но въпреки това са описани някои случаи на заразяване. Най-вече с прясно говеждо, свинско и овче месо (*Kramer, J., et al., 2000).* Повечето автори са обединени около мнението, че макар *Campylobacter* да се среща често и в месо на други животни, те нямат толкова голямо епидемиологично значение колкото птиците, вероятно поради разликите при клане (*Ono, K., et al., 1999*).

Сравнително висока контаминация с *Campylobacter* е доказана при непастьоризираното краве мляко (*Huang H., et al., 2015*). Много рядко е откриван кампилобактер в други организми (някои морски черупчести) или зърнени храни и зеленчуци (*Park, C. et al., 1992*).

5.3. Епидемиология на кампилобактериозата при хора

Поради факта, че кампилобактериозата е най-широко разпространената бактериална зооноза сред хората в световен мащаб, множество автори работят върху нейната епидемиология. Видно е, че засега по-скоро се задават въпроси, отколкото предлагат отговори по отношение широкото разпространение на тази инфекция. Начина на живот, храненето и изобщо бита, особено в индустриализираните страни, вероятно са част от предпоставките за мащабите на кампилобактериозата при хората (*Kubota K., et al.,2011*) (фиг.7).

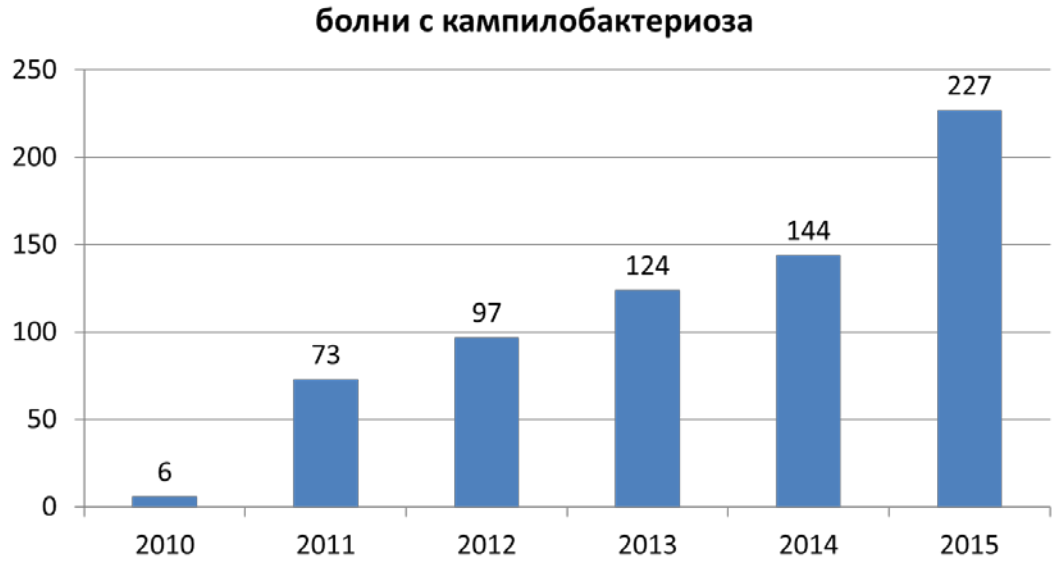


Фиг. 7. Схема за предаване на кампилобактерната инфекция при хора

В САЩ, при едно широкомащабно проучване за периода 1998 – 2008 г. е установено, че годишно има над 800 хил. случая на кампилобактериоза, а хоспитализациите по повод тази диагноза са над 8 хил. Редица изследвания доказват и водещата роля на *Campylobacter* за диария на пътуващите сред северно-американците (*Kendall M., et al. 2012*). В ЕС по данни на ECDC случаите на кампилобактериоза в страните-членки се увеличават ежегодно средно с около 10%. Според повечето експерти, това се дължи на по-добрата диагностика на заболяването в някои от страните. Разпределението на случаите съвсем не отговаря на големината на индустриализираните държави. Най-голям брой случаи за 2014 г. са регистрирани в Германия и Великобритания, а сравнително малко в други големи страни на общността като Франция, Италия и Полша (*EFSA Journal, 2015*). Тези диспропорции могат да означават както различия в обработването и контрола над хранителните продукти, главно бройлери, така и в надеждността на националните епидемиологични служби. У нас, в областта на хуманната медицина, публикуваните епидемиологични проучвания върху кампилобактериозата все още са изключително малко. За 2010 г. в България официално са регистрирани само 6 случая на

кампилобактериоза при хора (*НЦОЗА, 2011*), докато проучванията във ветеринарната медицина показват, че разпространението на *Campylobacter* spp. сред бройлерните стада у нас е близо 45 %. Това е ярко доказателство за неадекватното диагностициране на заболяването при хората тъй като резервоар на инфекцията съществува. Имайки предвид трудоемките и неособено ефективни културелни диагностични методи, става ясно защо повечето случаи на кампилобактериоза остават етиологично неуточнени. Интерес представляват данните за превалиране на *C. coli* над тези на *C. jejuni* в бройлерите у нас (*Гюров Б., и съавт., 2011*).

След присъединяването на България в ЕС страната ни се включи пълноценно в общата мрежа за надзор на зоонозите. От тогава, благодарение на подобрената диагностика, чрез макар и бавното навлизане в практиката и на други методи освен културелния, ежегодно потвърдените случаи на кампилобактериоза сред хора започват да нарастват (*НЦОЗА, 2016*), като за 2015 случаите са с почти 40% повече от тези за предходната година (фиг. 8).



Фиг. 8. Брой болни с кампилобактериоза в България за перода 2010 – 2015 г. (НЦОЗА, 2016)

В огромното си мнозинство кампилобактериозата има спорадичен характер, но в литературата има и някои добре документирани случаи на епидемични взривове. В повечето случаи те са свързани със замърсена вода, нерядко тези води са източници и на коинфекции - *Campylobacter* и друг чест патоген – вирус или протозой (*Chen J., et al., 2011; Melby, K., 2000*). Водата най-често се контаминира от фецес на заразени птици и едри селскостопански животни, а преживяването на *Campylobacter* в нея е свързано с възможността му да оцелява в еукариотни клетки без да бъде фагоцитиран. Те са от групата на свободно живеещите амеби (СЖА) (*Olofsson J., et al., 2013*).

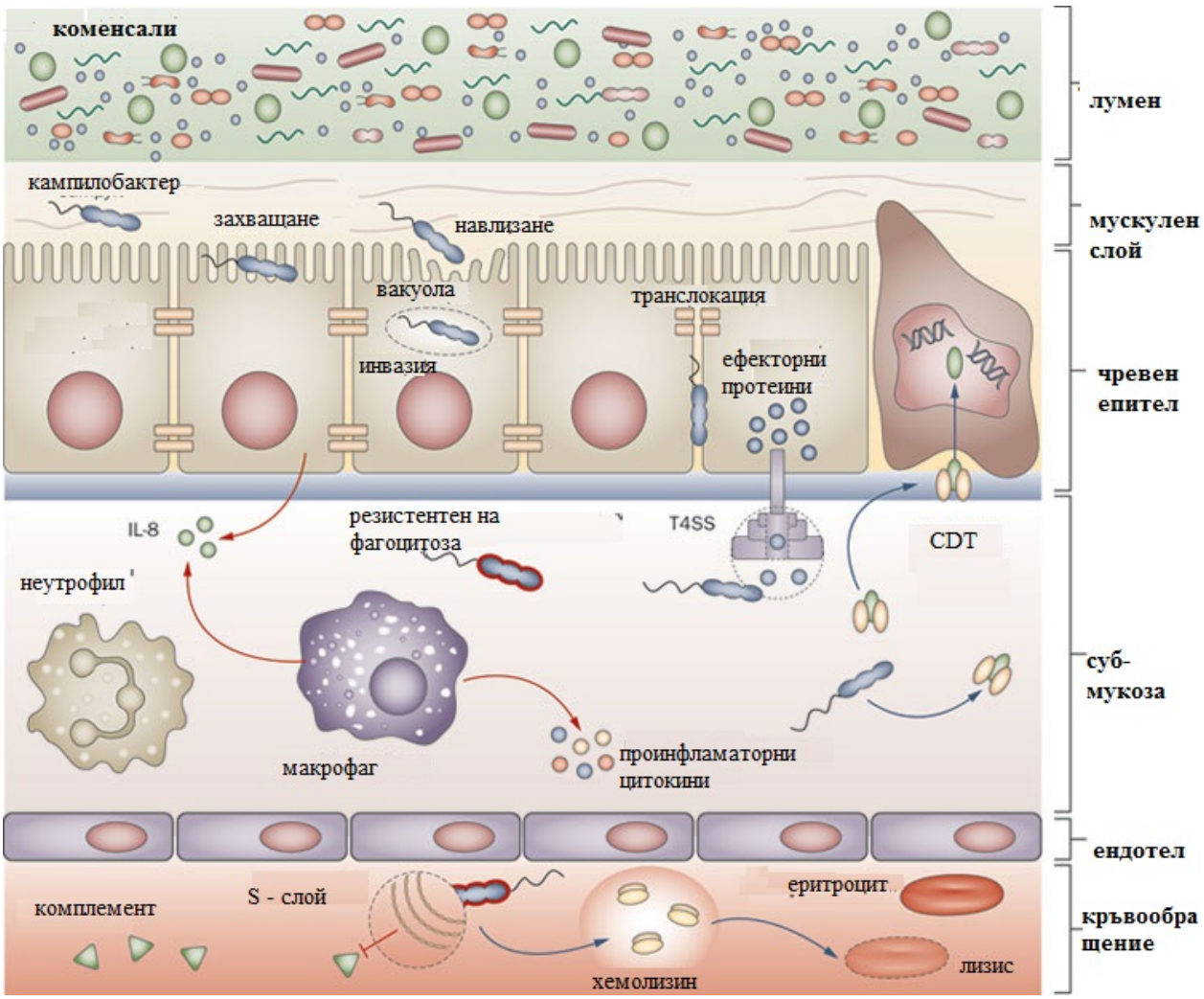
Има редица публикации сочещи плуването, т. е. отново контактът с езерна или речна вода, за рисков фактор (*Schonberg-Norio, D., et al., 2006*). Непастьоризираното мляко също е водещ рисков фактор за епидемии, докато консумацията на пилешко, говеждо или свинско най-често води до спорадемии (*Lehner, A. et al. 2000; Ma L., et al. 2014*).

6. Патогенеза на кампилобактериозата

При човек обикновено инфекцията с *Campylobacter* се проявява като остър гастроентерит. Въпреки голямата честота на заболяването в световен мащаб, и значението му както за хуманната така и за ветеринарната медицина, все още има редица неясноти относно интимните механизми на патогенезата.

Водещ симптом е диарията и до голяма степен патогенезата на диарийният синдром е обвързана с тази на *Campylobacter* – инфекцията. В зависимост от предизвикващият я механизъм, диарията бива осмотична, секреторна и инфекциозна (възпалителна). Увреждането на

епителa на червата поради бактериални, вирусни или паразитни патогени е най-често срещаната причина за диария – тук спада и инфекциозната диария с причинител *Campylobacter* spp. Епителa на храносмилателната система е защитен от увреди чрез редица механизми, които представляват стомашно-чревна бариера, но и тя може да бъде нарушена.От това следва ексудация на серум в лумена и неадекватна абсорбция (*Field M. 2003; Hodges. K., et al., 2010*). Дозата необходима за развитие на кампилобактериоза е сравнително ниска. Според проучвания на Black *et al., 1988* тя е около 500-800 колония-образуващи единици (cfu), а съвременни автори описват дори по-малка доза, между 100 и 500 cfu (*Alther T., et al., 2011*). За сравнение, при *Salmonella* или патогенни щамове на *E. coli* дозата е около 10^5 cfu (*O'Brien S., 2014*). В литературата има интересни проучвания според които дозата необходима за да се развие клиника е различна в зависимост от вида на причинителя. Сигнификантна разлика се описва от Allos при проучвания върху доброволци. Според експерименталните данни средната доза необходима за развитието на клинично проявена кампилобактериоза при 50% от доброволците предизвикана от *C. jejuni* е около 500 cfu, а от *C. coli* – двойно повече (*Allos B., 2011*). Това е и в основата на една от хипотезите обясняващи далеч по-широкото разпространение на *C. jejuni* в сравнение с *C. coli* (*Parkhill, J.,et al.,2000*). Повечето автори са единодушни, че *Campylobacter* атакува долните отдели на стомашно-чревния тракт (йейюнум, илеум, дебело черво – тоест, инвазира се главно тънкочревната и в по-малка степен дебелочревна лигавица. Основният токсин на бактерия е т. нар. cytolethal distending toxin (CDT), който индуцира апоптоза в ентероцитите на гостоприемника (*Dasti J., et al. 2010*) (фиг. 9). Една от причините за слабия напредък по отношение патогенезата на кампилобактериозата е липсата на универсален животински модел за работа in vivo (*Yao R., et al., 1997*).



Фиг. 9. *Campylobacter* са свързани с лигавицата бактерии, които имат способността да плуват през мукозния слой, който покрива чревния епител. Съществуват доказателства, които предполагат, че тези бактерии могат да се преместват през чревния епител или чрез транс-клетъчен маршрут (*C. foetus*) и / или чрез разрушаване на бариерата от плътни контакти (*C. concisus*). Emerging species могат да доставят ефекторни протеини в епителни гостоприемни клетки чрез предполагаем T4SS (*C. foetus*). S-слой медиира резистентност към фагоцитозата и серума (*C. rectus*). Emerging species също могат да генерират редица токсини, включително cytolethal distending токсин (*C. lari* и *C. upsaliensis*). Свързването на този токсин към повърхността на клетката гостоприемник инициира спиране на клетъчния цикъл и увреждане на ДНК. Други токсини са хемолизини, които имат капацитет за лизиране на червените кръвни клетки (*C concisus*). (Модификация по *Si Ming Man, 2011).*

7. Клинично протичане на кампилобактериозата

8.1. Чревна кампилобактериоза

Основните видове причиняващи заболяване при хората са *Campylobacter jejuni* и *C. coli.* Най-често инфекцията причинява остър диариен синдром, особено при деца под 5 годишна възраст. Смята се, че *Campylobacter* инфекцията се проявява в около 1% от популацията на Европа и Северна Америка (*Valérie R., et al., 2005; Chen J., et al., 2011; Havelaar A., et. al., 2013*).

Един от първите автори започващ големи проучвания върху клиничното протичане на кампилобактериозата, особено у деца, е белгиецът Butzler. Самостоятелно и в екип с изследователи от институт „Пастьор“ описва клиничната характеристика на инфекцията още в края на 70-те години на миналия век. Той описва кампилобактериозата в индустриализираните страни като остро и най-често самоограничаващо се заболяване, проявяващо се с диария, повишена температура и коремни болки. Подобна клинична картина обаче е характерна за повечето чревни инфекции и прави кампилобактериозата клинично неразличима от тях (*Butzler J. et al., 1973, 1979, 1982, 2004; Brandt K., et al., 2015*).

- **Диария**

Според *Butzler* заболяването обикновено започва след 2-5 дни инкубационен период и се маркира с остра водниста диария. Тъй като той описва повечето форми на инфекцията като самоограничаващи се, смята, че продължителността на диарийния синдром е средно 2-4 дни. В много случаи той описва свежа кръв, слуз и по-рядко гной в изпражненията, което според него говори за колоректално възпаление. Сигмоидоскопията обикновено разкрива нарушения на лигавицата – от

хиперемия и оток със или без хеморагии до мукозни разязвявания. Според проучванията на *Butzler,* патологичните примеси, кръв и слуз, се появяват в изхожданията на 2-3 ден от началото на болестта (*Butzler J. et al., 1973, 1982, 2004*). Някои автори имат виждане за по-дълъг инкубационен период – до 7 дни (*Ketley, J., 1995*), а други описват персистиране на диарията при малки деца и над 10 дни (*Schonberg-Norio, D., et al., 2006*). *Blaser* описва в работите си и тежко протичащи ентерити причинени от *Campylobacter* при които болните имат над 8 изхождания за денонощие (*Blaser, M., et al., 1981, 1982*). Тежкопротичащи кампилобактериози са описвани и у нас (*Боянова, Л., и съавт., 2004*; *Ковальова, В., и съавт., 2010*). Подобно на *Butzler* и други автори описват в разработките си по-голямата честота на инфекцията сред децата, особено в най-ранна възраст. При едно проучване на 71 полски деца с доказана лабораторно кампилобактериоза, най-голяма е честотата на заболелите във възрастовата група 1-3 г. Най-честият симптом при болните е отново воднистата диария – 90 %, като от тях кървава диария (хемоколит) имат - 43 %. Най-голяма честота на хемоколита е описана при децата под 1 г. (*Grzybowska-Chlebowczyk U., et al.,2013*). При едно голямо мултицентрово проучване на кампилобактериозата в Китай, се описва само 3% честота на кървавата диария при възрастни, докато воднистата диария без примеси остава в границите около 90 %. Това потвърждава данните на мнозинството автори, че примесите от кръв в изхожданията са най-чести в ранна детска възраст (*Gillespie I., et al., 2006; Chen J., et al., 2011*). Някои автори още през 90-те години сочат, че в част от изхожданията на болните с *Campylobacter*- инфекция, макар да няма макроскопски, може да има микроскопски примеси на кръв. Директната микроскопия, а по-късно и имунохроматографските методи доказват тази теза (*Lindblom G., et al., 1995*). В студия от 1997 г. Blazer прави известно диференциране в клиниката на диарийния синдорм при деца в зависимост от това дали са от развиваща се или индустриално

развита страна. Според него болните в индустриално развитите страни най-често имат т. нар. проста (секреторна) диария, а в развиващите се са с клиниката на възпалителна диария (*Blazer M., 1997*). Макар и рядко, кампилобактериозата без диария също е възможна и създава сериозни диагностични затруднения (*Vaidya G., et al., 2014*). Широко е описана вероятността кампилобактериозата да стои в основата на много случаи на т. нар. възпалителна чревна болест - inflammatory bowel disease (IBD) познати в нашата литература като болест на Крон и ХУХК или пък да е причина за тяхното обостряне (*Боянова, Л., и съавт., 2004*; *Zautner A., et al., 2014*). Съществуват и някои хипотези на единични колективи, че кампилобактериозата може да има роля в развитието на глутеновата ентеропатия в детска възраст (*Sabayan в., et al., 2007*). Описани са и случаи на безимптомна инфекция при хора (*Lee G., et al., 2013*).

- **Фебрилитет**

Според литературата, повишената температура е вторият по честота симптом при *Campylobacter*- инфекцията. Според *Butzler* в около 50% от случаите болните са с фебрилитет, като той обикновено предшества с 1-2 дни диарията и е съчетан с общо неразположение, безапетитие и други белези на интоксикацията. При деца под 5 г. често достига до 40 °C. Персистирането на фебрилитета според него, а и според други автори, може да продължи няколко дни след спиране на диарийния синдром дори при неусложнени форми (*Butzler J. et al., 1973, 1979, 1982; Mishu-Allos B. et al., 2001*). В проучването на полски деца посочено по-горе фебрилитетът е с по-ниска честота, около 43%, като най-чест симптом се явява при групата 1-3 г., а стойностите могат да достигат и хиперпиретичните 41 °C при кърмачета (*Grzybowska-Chlebowczyk U., et al., 2013).* Подобни стойности на честотата на фебрилните при кампилобактериоза, около 50%, дават и останалите автори работещи по

проблема, като при децата под 5 години често се описва и втрисане (*Gallay A., 2008; Lehoursa P., et al., 2012*).

- **Коремни болки**

Един от водещите симптоми наред с диарията и фебрилитета, който сочат всички автори, са силните коремни болки (*Butzler J. et al., 1973*, *Ковальова, В., и сътр., 2010*; *Chen J., et al., 2011; Lehoursa P., et al., 2012*). При вече цитираното по-горе полско проучване най-висока е честотата на коремните болки при по-големите деца (над 3 г.), докато при децата от групата 0 – 6 м. липсва. Това е логично, доколкото болката е субективен симптом и децата в ранна възраст по-скоро не могат да съобщят на родителя или лекаря за наличието и (*Grzybowska-Chlebowczyk U., et al., 2013*). При деца над 3 години и възрастни американски автори сочат честота на коремната болка около 90%, като статистически значими разлики не са намерени в зависимост от вида на причнителя (*Gillespie I., et al., 2002*). В редица случаи при тийнейджъри са описани толкова силни болки, че в диференциално-диагностичен план е влизала и диагнозата остър апендицит (*Brandt K. et al., 2015*). Подобни диагностични затруднения се явяват и в редките случаи, когато кампилобактериозата протича без диария, но с фебрилитет и силни коремни болки. Тогава и методите за образна диагностика могат да помогнат, но окончателно проблема се решава с поставянето на етиологична диагноза (*Ковальова, В., и сътр., 2010*; *Vaidya G., et al., 2014*).

- **Повръщане**

По отношение честотата на горно-диспептичният синдром авторите имат известни различия. В своите работи *Butzler* го описва като рядко,

независимо от възрастта на болните (*Butzler J. et al., 1973, 2004*). Според други автори, честотата му е сериозна – почти 50% от децата над 3 годишна възраст имат немотивирани от прием на храна или течности повръщания, а при възрастни е описана честота над 30% (*Gillespie I., et al., 2006*; *Grzybowska-Chlebowczyk U., et al., 2013).* Повръщането като симптом в съчетание със силни коремни болки и фебрилитет е още една от причините клиницистите да мислят и за остър хирургичен корем (ОХК) преди да поставят етиологичната диагноза (*Lehoursa P., et al., 2012*).

- **Други симптоми на интоксикацията**

При протичането на кампилобактериозата са описани още редица неспецифични симптоми, дължащи се вероятно на общата интоксикация на инфектирания организъм. Както при повечето заразни заболявания, още в продромалния стадии се описват адинамия и безапетитие (*Butzler J. et al., 1973, Blaser, M., et al., 1982*; *Gillespie I., et al., 2002*). Доста автори публикуват сравнително висока честота и на грипоподобна симптоматика – миалгия, артралгия и главоболие, особено при по-големи деца и възрастни (*Mishu-Allos B. et al., 2001; Ковальова, В., и сътр., 2010*; *Chen J., et al., 2011*).

От посоченото до тук следва, че в протичането на кампилобактериозата мнозинството автори не описват патогномонична симптоматика и различаването и от бактериални чревни инфекции с друг етиологичен причинител е невъзможно без лабораторна диагностика (*Butzler J. et al.,2004; Chen J., et al., 2011).*

8.2. Извънчревни форми на кампилобактериозата

- **Бактериемия**

Първият вид *Campylobacter* изолиран и култивиран от кръв е *Vibrio fetus*. Описан е при млада бременна жена с бактериемия (*Vinzent R., et al., 1947*). В по-нататъшни разработки са описани още доста видове, които могат да причинят бактериемия – *C. coli, C. concisus, C. hominis, C. jejuni C. lari, C.upsaliensis* (*Blaser, M. J. et al., 1986; Morris, C., et al., 1998; Man S., et al., 2011*). Днес е доказано, че термофилните видове *Campylobacter* се изолират много по-често от кръвта на болни хора отколкото *C. fetus* (*Nielsen H., et al., 2010*). Повечето автори приемат, че инвазивността при *Campylobacter* не е честа, но въпреки това се приема, че в около 1% от болните се развива бактериемия. Като се вземе предвид и фактът, че хемокултури се назначават само при високо фебрилни болни вероятността честотата на бактериемията да е още по-висока е голяма (*Samuel M., et al., 2004; Feodoroff B. 2012*).

Болните с бактериемия от *Campylobacter* най-често страдат от същата симптоматика като тези с чревната форма – фебрилитет, адинамия, миалгия, стомашно-чревна симптоматика; една голяма част от болните обаче може да нямат диария, според някой автори повече от половината (*Pacanowski J., et al., 2008*). Доста автори описват целулита като чест спътник на болни с бактериемия причинена от *Campylobacter*, като за това се „обвинява“ основно *C. fetus* (*Gazaigne L., et al., 2008*).

Съвременните проучвания сочат, че инфекции с *C. fetus* протичат рядко като чревна форма, бактериемията е водеща и най-често болните са имуносупресирани или възрастни, за разлика от инфекциите с *C. jejuni*/*C. coli*, протичащи най-често като ентерити (*Francioli P., et al., 1985; Gazaigne L., et al., 2008*). Някои автори установяват сравнително висока смъртност при болните с бактериемия – между 10 и 15% (*Fernández-Cruz A., et al., 2010*), но други дават доста по-оптимистични данни - около 4% (*Nielsen H, et al., 2010*).

- **Други извънчревни форми**

Освен споменатите вече бактериемия и целулит в научната литература са описани още множество извънчревни огнища на *Campylobacter* инфекцията – холецистит (*Udayakumar D., et al., 2009*; *Gupta A., et al., 2015*), менингити, менингоенцефалити, включително у новородени (*Tsoni K., et al., 2013; Ritchie P., et al., 1987*), перитонеални инфекции, абсцеси, панкреатити (*Adedeji A., et al., 2000; Kobayashi R., et al., 20014*). Чести са инфекциите на пикочните пътища, много по-рядко на дихателните пътища при имунокомпрометирани болни (*Blaser, M. J. et al., 1986*; *Tee W., et al., 1998*).

„При комбинация от диария и силна болка в гърдите, мислете и за *Campylobacter*“ е съветът на група спешни медици от САЩ публикували случаи на миокардит асоцииран с *C. jejuni* инфекция (*Panikkath R., et al., 2014*). Прекараната кампилобактериоза крие риск от развитието на реактивен артрит, същият може да се появи и като усложнение в хода на инфекцията според много автори (*Hannu T., et al., 2002*; *Zautner A., et al., 2014*).

Доказано е, че C. *jejuni, C. coli, C. fetus* и не рядко *C. upsaliensis* причиняват септичен аборт и неонатален сепсис. Обикновено абортът настъпва при бременни прекарали агресивна форма на чревната инфекция с последващ сепсис (*Simor A., et. al., 1986*). Други видове (*C. rectus* и *C. curvus*) са свързани с преждевременно раждане и ниско тегло на новороденото (*Mendz G., et al., 2014*).

- **Гилен-Баре синдром (GBS)**

През 1982 г. независимо една от друга се публикуват две статии предполагащи връзката между острата възпалителна полиневропатия, наречена синдром на Гилен-Баре и инфекцията с *C. jejuni* (*Molnar G. et al., 1982; Rhodes K., et al., 1982*). Много скоро след това редица други автори са категорични, че GBS може да бъде едно от тежките усложнения на *Campylobacter* инфекцията, а рискът е изчислен около 1-3 случая на 10 хил. болни с кампилобактериоза (*Tam C., et al., 2006; Ковальова, В., и сътр., 2010*). Уточнено е, че някои серотипове на *C. jejuni* предизвикват GBS много по-често от други (*Lardone R., et al., 2016*).

- **Хиперсензитивни васкулити**

Тази форма на васкулит засяга най-малките по размер кръвоносни съдове (артериоли, венули и капиляри), най-често тези на кожата. Началото на този васкулит може да бъде "отключено" от алергична реакция, но най-често причината е инфекциозен агент. Описани са множество хиперсензитивни васкулити настъпващи в хода или непосредствено след преболедуването от кампилобактериоза. Най-често се публикуват данни за пурпура на Schoenlein - Henoch, уртикария - васкулит, нодозен периартериит и др. (*Apostolopoulos P., et al., 1999; Nagaratnam N., et al., 1990*).

9. Диагностика на кампилобактериозата

9.1. Културелен метод (мембранна микрофилтрационна техника)

Все още културелният метод е „златен стандарт“, респективно – референтен метод в диагностиката на инфекцията. Методът е наречен микрофилтрационна мебранна техника поради използването на специфични мембрани с микропори (*Nachamkin I., et al.,2008*). Изпълнението на метода е следното: върху обикновен кръвен агар със стерилна пинсета се поставя мембранния филтър (0.45 или 0.65 микрона) и върху него се накапват 10 - 15 капки от течно изпражнение (ако не е течно се разрежда в физиологичен разтвор). Бактериите се оставят да мигрират през филтъра за ~ 30 минути на стайна температура. След попиване на капките, филтърът се отстранява и петрито се култивира в агар на микроаерофилна атмосфера. През всяка пора на мембраната преминава по една клетка *Campylobacter*, поради което се наблюдава растеж на отделни колонии, както е изобразено на фигура 23 в раздел Резултати и обсъждане. *Campylobacter jejuni* и *C. coli* са взискателни микроорганизми, поради което за изолирането им се използват хранителни среди с различни обогатяващи съставки. Към тях се прибавят и антимикробни вещества за подтискане на съпътстващата чревна флора. На таблица 1 е даден състава на някой от най-популярните комерсиални среди.

СРЕДА	БАЗА	СЪСТАВ
Селективна среда на Marshal	Brain heart infusion agar /BHIA	7% конска кръв, налидиксова киселина10mg/l триметоприм 5mg/ ванкомицин 3mg/l амфотерицин B 2 mg/l
Кръвен агар на Skirrow	База за кръвен агар №2 /Oxoid	7% лизирана конска кръв, налидиксова киселина10mg/l триметоприм 5mg/ ванкомицин 10mg/l амфотерицин B 2 mg/l полимиксин B 2500IU/l
Селективна среда на Dent	Колумбия агар /Oxoid/	7% лизирана конска кръв, триметоприм 5mg/ ванкомицин 10mg/l, амфотерицин B 5 mg/l полимиксин B 2500IU/l, цефзулодин 5mg/l

Таб. 1. Състав на най-популярните хранителни среди за култивиране на *Campylobacter* spp.

Campylobacter са микроаерофили понеже растат само при наличие на висока влажност и състав на атмосферата от 10% CO_2 и 5% O^2. Видовете *C. jejun, C. doylei, C. lari* и *C. coli* са наречени "термофилни", тъй като имат оптимална температура на растеж 42 °C (*Jeremy H., et al., 1995;Wardak S., et al., 2009*). Културелният метод обаче е скъп, твърде трудоемък, отнема дълго време, около 72 часа, и често средите се замърсяват от чревната флора (*Jeremy H., et al., 1995*).

На таблица 2 са показани биохимичните характеристики на термофилните бактерии. Това е една от методиките за тяхното идентифициране до вид, чрез следване на т. нар биохимичен алгоритъм. В ежедневната практика, основно за целите на епидемиологията, е важно диференцирането между *C. jejuni* и *C. coli*. Единственият биохимичен тест, който се прави е пурат теста за хидролиза. Изолатите

на *C. jejuni* имат способността да хидролизират пурат, докато на *C. coli* нямат (*Lastovica A., 2006*).

ВИД	**C.*jejuni***				**C.*coli***		**C.*lari***	
Биотип	I	II	III	IV	I	II	II	
Хидролиза на натриев хипурат	+	+	+	+	-	-	-	
Бърз тест за продукция на H_2S	-	-	+	+	-	-	+	+
Хидролиза на ДНК	-	+	-	+	-	+	-	+
Чувствителност към нелидиксова киселина	S				S		R	

Таб.2. Биохимични характеристики на термофилните видове *Campylobacter*.
S- чувствителен, R- нечувствителен

Използваният в миналото метод чрез оцветяване по Грам и директно микроскопиране на фецес на фозово-контрастен микроскоп има не толкова висока чувствителност (64-90%), въпреки, че е с висока специфичност (98%) и е изоставен (*Mshana E., et al., 1998*).

9.2. Имунологични методи

По отношение на имунологичните методи все още се използва ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) за откриване на специфични серумни антитела от класовете IgA, IgG, и IgM. За максимална специфичност на серологичната диагностика, трябва да има повишени

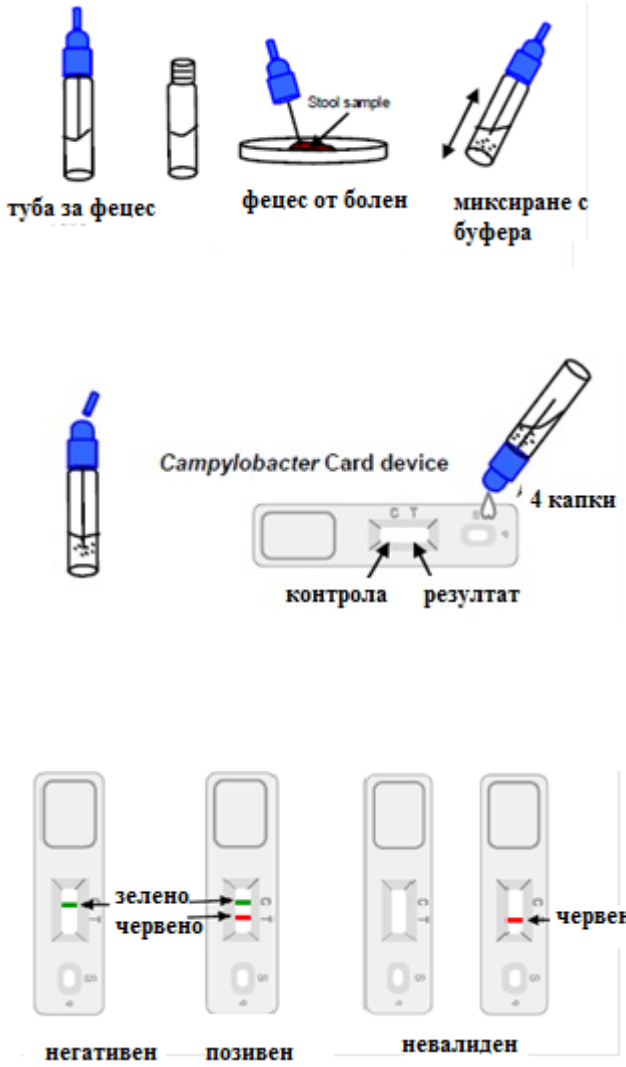
титри на поне два имуноглобулинови класове за диагностициране на скорошна инфекция от *Campylobacter* (*Taylor et al., 2004*) и въпреки тези резултати трябва да се има предвид, че чувствителността на анализа е сравнително ниска, а кръстосаните фалшиво-положителни реакции - чести (*Kuhn K., et al., 2012*).

- **Имунохроматографски метод (immunochromatographic card test - ICT)**

Както вече беше описано, културелният филтрационен метод има редица недостатъци, а молекулярно-биологичните методи изискват специфични реактиви, апаратура и обучен персонал. При имунохроматографският метод всички посочени по-горе недостатъци са избегнати, като той позволява едновременно бърза, чувствителна, специфична и евтина диагностика с лесни за използване консумативи буквално „при леглото на болния“ (*Regnath T., et al., 2014*).

ICT използван в тези случаи е качествен имунохроматографски анализ за определяне на *Campylobacter* във фекални проби. Мембраната е предварително намазана с моноклонални антитела, в зоната на тестовата линия, срещу антигени на *Campylobacter*. По време на тестването, пробата реагира с цветния конюгат (anti-*Campylobacter* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres), който е предварително изсушен на тест ленти. Сместа се движи нагоре по мембраната чрез капилярно движение. Когато пробата навлезе в мембраната цветните частици мигрират. В случай на положителен резултат специфичните антитела, които са на мембраната ще уловят цветния конюгат. Сместа продължава да се движи през мембраната на имобилизираното антитяло, поставени в контрола група, винаги се появява зелена оцветена ивица. Наличието на

тази зелена лента служи за проверка, че се добавя достатъчен обем, че се получава правилен поток и като вътрешен контрол на реактивите (Фиг. 10). Производителите на всички познати до момента комерсиални бързи тестове съобщават за около и над 99% чувствителност и специфичност. Някои автори съобщават за ниска чувствителност на бързите тестове (*Black E.,et al.,1988*) и задължителната необходимост от верифицирането им с културелен метод. Съвременни автори обаче са провеждали множество сравнителни анализи между различни диагностични тестове, показващи добрата надеждност на имунохроматографските китове (*Kawatsu K. et al., 2008; Regnath T., et al., 2014*). В едно проучване на болни от кампилобактериоза с три диагностични метода – културелен, серологичен (IAE) и ICT, германски автори демонстрират надеждността на последните, като акцентират на вероятността някои положителни от ICT проби да не поникнат при посявка поради капризността на *Campylobacter*. Макар в редки случаи да има и фалшиво позитивни резултати при част от ICT, се посочва че новата генерация имунохроматографски тестове има съществено по-висока чувствителност и специфичност (*Granato P., et al. 2010; Floch P., et al., 2012*).



Фиг. 10. Практическа постановка при работа с бърз тест

9.3. Молекулярно – биологични методи

Прилагането на молекулярно-биологичните (генетични) методи при диагностиката на кампилобактериозата е особено полезно не само поради високата чувствителност и специфичност, но и поради възможността за видова диференциация за нуждите на класическата и молекулярната епидемиология. Трудното култивиране на *Campylobacter* spp. и високата му чувствителност също са предпоставка за все по-

честото използване на генетичните методи в случаи на диагностични затруднения и нужда от верифициране на други по-малко чувствителни методи (*Persing , D. et al., 1993;Павлова М., и съавт., 2015; Павлова М., 2016*).

Полимеразно- верижна реакция (PCR) е метод, изобретен от Кери Мулис през 1983 г. и променил необратимо експерименталната биология и медицината. Теоретичната постановка е описана още през 1971 г., но до реалното приложение на диагностичния метод минават над 10 години заради нуждата от усъвършенстване на техниката с въвеждането на термостабилна ДНК полимераза от бактерията *Thermus aquaticus* –Taq – полимераза (*Mullis K.,et al.,1987; King N.,2010*). Това са техники базирани на нуклеиновите киселини и откриват специфични за патогена ДНК или РНК-участъци, поради което при тях е възможна и диагностика с представители на *Campylobacter* spp. които могат да са нежизнеспособни и некултивируеми и в този случай културелните методи са безсилни (*Nooshin A., et al., 2015*).

Съществуват няколко вариации на PCR-методите в зависимост от броя на участващите двойки праймери, броя гени, които се търсят, протичането в реално време и нуждата или не от гел-електрофореза (*Espy M., et al., 2006; Al Amri Abiola A., et al., 2007;Randall L., et al., 2010*).

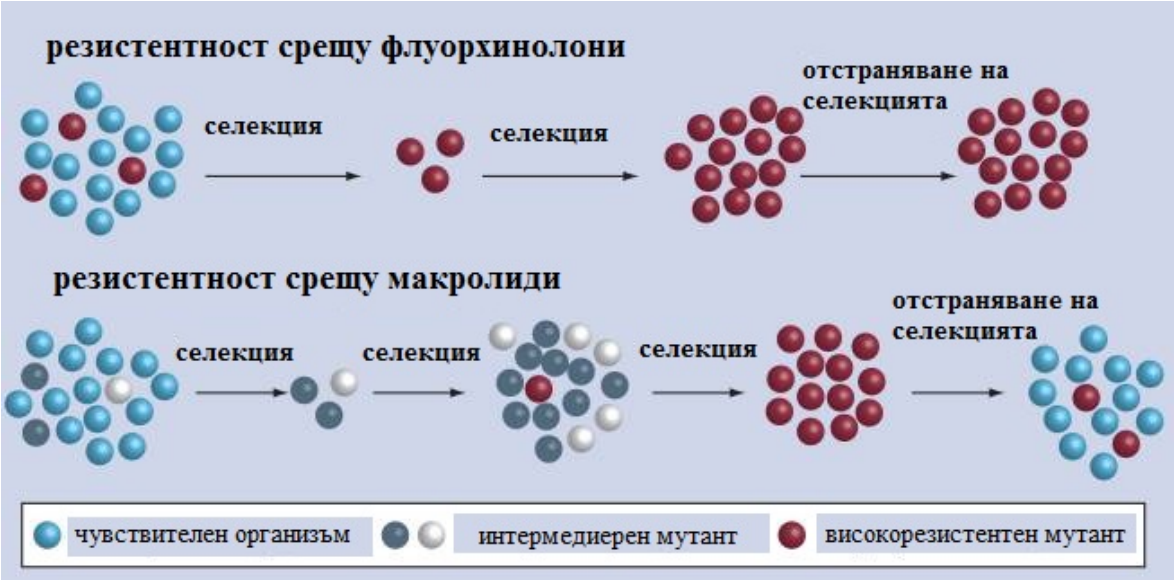
10. Етиологично лечение на кампилобактериозата и антибиотична резистентност

Относно етиологичното лечение на кампилобактериозата съществуват редица полярни мнения. Още през ’70-те Butzler я определя като остра самоограничаваща се инфекция, която обикновено не изисква антибактериално лечение. На същото мнение е и другият изтъкнат клиницист Skirrow. Според тях кампилобактериозата протича като леко

или средно-тежко диарийно заболяване и преминава само със симптоматично лечение за около седмица (*Skirrow M., 1977; Butzler J., 1979*). След задълбочаване на проучванията върху инфекцията с *Campylobacter* и описването на редица по-тежки форми и усложнения част от авторите препоръчват етиологично лечение при по-тежко протичане. Crushell и съавт., а в последствие и Butzler, препоръчват започване на антибактериална терапия при болни с хемоколит или продължаваща над 7 дни диария, както и при всички имунокомпрометирани (*Crushell E., et al., 2004; Butzler J., 2004*). Днес има и школи препоръчващи ранно започване на антибактериално лечение. Още в началото на ’90-те се появяват проучвания според които времето на боледуване се скъсява при започване на антибиотичното лечение още в първите дни, след етиологично доказване на инфекцията. Екип педиатри от Университета на Вирджиния публикуват данни за съкращаване периода на боледуване и ерадикиране на бактерия от фецес за 5 дни. Същото проучване доказва и с 30% по-ниска вероятност за релапс на заболяването (*Williams D., et al., 1989*). Wistrom и съавт. пък описват саниране на фецеса за 7 дни при 83% от проследените болни лекувани антибиотично срещу 62 % от децата получавали плацебо (*Wistrom J., et al.,1992*). Най-широко използваните при инфекцията с *Campylobacter* антибактериални средства са флуорхинолони и макролиди. За жалост още в началото на ’90-те започна да се описва нарастваща резистентност на някои щамове към хинолоните във ветеринарната, а по-късно и в хуманната медицина (*Endtz H., et al.,1991*). Антибиотичната възприемчивост е по-висока при щамове на *C. jejuni*, независимо дали са изолирани от животни или хора. В едно немско проучване щамове на *C. jejuni* са чувствителни към ципрофлоксацин, тетрациклин и нелидиксова киселина съответно 56,0%, 51,3% и 56,0%, докато резистентността на щамове *C. coli* към същите антибиотици е съответно 73,0%, 44,0%, 74,6% (*El-Adawy H., et al., 2015*).

За целия ЕС се докладва сравнително висока резистентност на щамовете към ципрофлоксацин, което е тревожно поради факта, че той е средство на избор в много случаи на тежко протичащи хранителни токсикоинфекции. Средно 47.4% от изолатите на *Campylobacter* в ЕС са резистентни на ципрофлоксацин (www.*eurosurv. edit. team*, *2014*).

Резистентността към флуорхинолоните се дъжи на два синергични механизма – инактивиране на целта на антибиотика и ефлукс (оттичане) на антибиотика (*Iovine N., 2013*). В началото на 2000 г. стана ясно, че резистентността към хинолоните за около десетилетие е скочила драстично и вече започва да се наблюдава сериозна подобна картина и при макролидите (*Gupta A., et al., 2004; Gibreel A., et al., 2007*). *Campylobacter* проявява резистентност към макролидите по множество механизми освен инактивиране на целта и ефлукс – ензимни и ДНК-промени, промени в мембранната пропускивост и др.(*Alfredson D., et al., 2007*; *Iovine N., 2013*). Резистентност към макролидите се открива много по-често при *C. coli*, отколкото при други видове. Според някои автори вероятно причината е, че тилозин (който е от същата група) се използва като растежен фактор при свинете (*Gibreel A., et al., 2006*). Турски колектив описва по-висока резистентност при *C. coli* не само по отношение на макролидите, но и по отношение на хинолоните (*Lutgen, E., et al., 2009*). В Австралия пък, където флуорохинолоните не са лицензирани за употреба в производството на храни с животински произход, *C. jejuni* остава чувствителен на флуорохинолони (*Marinou I., et al., 2012)*. Днес са известни основните разлики в селектирането на мутантни щамове срещу флуорхинолони и макролиди и поради това е ясна причината за по-ранно възникващата и бързо разпространяваща се резистентност срещу хинолоните (фиг. 11) (*Luangtongkum T., et al., 2009; Cui M., et al., 2016*).



Фиг. 11. Модел за селектиране на резистентни щамове *Campylobacter* спрямо флуорхинолони и макролиди (модификация по *Luangtongkum T.,* 2009).

Флуорохинолон-устойчивите мутанти се развиват бързо по време на лечение с антибиотици и щамовете продължават да персистират дори след отстраняване селектирането. Развитието на макролидн-устойчиви мутанти включва многоетапен процес и изисква продължително излагане на антибиотика. След като селекцията се отстрани, макролид- резистентните мутанти не могат да се конкурират с макролид-податливите *Campylobacter* щамове и броят им бързо намалява.

Съвсем скоро, през февруари 2017, СЗО съобщи списъка на най-проблемните в световен мащаб бактерии, за които спешно е необходимо разработването на нови антибиотични молекули, като флуорхинолон-резистентните *Campylobacter* spp. са поставени на четвърто място в категорията „висок приоритет“. В последните години все по-често се съобщава и за мултирезистентни щамове на *Campylobacter* spp. (*Lee B., et al., 2005; Marinou I., et al., 2012*). Тези данни потвърждават факта, че *Campylobacter* – инфекцията ще е сред новите терапевтични предизвикателства пред клиницистите на XXI$^{-ви}$ век.

11. Превенция

Разчетите до момента сочат, че инфектирането на 50 - 80% от хората става чрез пилешко месо (*EFSA, 2011*). Като се има предвид тясната връзка на кампилобактериозата с пилетата, основната стратегия за превенция на заболяването се явява изработването на стратегии за контрол на инфекцията в индустрията на питиче месо (*Wagenaar J., et al., 2013*). Първа линия на борба се явява хоризонталното предаване на *Campylobacter* между пилетата във фермата, което става изключително бързо. За разлика от него, вертикално предаване на инфекцията от колонизирана птица на потомството и чрез репродуктивната система е изключително рядко. Обикновено човешкият фактор е този, който внася *Campylobacter* в местообитанието на бройлерите; най-често ако един и същи персонал във фермата се грижи за добитък и птици. Като се има предвид всичко това, са били изследвани редица стратегии, насочени към намаляване на *Campylobacter* - колонизацията при домашни птици, включително използването на бактериоцини, бактериофаги и пробиотици (*Newell D., et al., 2011*).

В последните години се експериментира и с редица кандидати за ваксини срещу *Campylobacter* при пилетата. Описани са флагеларни протеини, формалин-инактивирани *C. jeuni*, убити *C. jeuni*. Тези продукти са били доставяни през носа, устата или интраперитонеално, като нито един от тях не предотвратява колонизацията на пилетата с *Campylobacter*. На този етап подкожното апликиране на мембранни протеини се смята за най-надежден метод върху който си заслужава да бъде работено и в бъдеще (*Annamalai T., et al., 2013; Riddle M., et al., 2016*).

Разглеждайки различни аспекти на инфекцията с *Campylobacter* не можем да не стигнем до извода за огромното и значение за редица области на човешкото здраве и икономика. Безспорно е сериозното и

непрекъснато увеличение на честотата на тази инфекция във времето и усложняване на боледуването, особено при деца и имунокомпрометирани болни. В голяма част от слаборазвитите индустриални райнони на света нямаме достатъчно точни епидемиологични данни за адекватна оценка степента на кампилобактериозата сред населението. България, която от 2007 г. е член на ЕС, все още реформира и стандартизира националните си мрежи за надзор на това заболяване. Липсата на ранна етиологична диагностика води до непознаване характеристиката на заболяването, изкривяване на епидемиологичните данни в национален мащаб и най-вече неадекватни терапевтични подходи при рискови групи като деца и имуносупресирани болни.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Изхождайки от честотата на кампилобактериозата, респективно важността на *Campylobacter* spp. като патоген, и недостатъчните теоретически и практически разработки по проблема в България, си поставихме следната цел:

Цел

Да проследим клиничните особености на заболяването при деца, да въведем масово приложението на имунохроматографските тестове верифицирайки диагностичната им стойност с тази на оптимизирани от нас молекулярно-биологични методи и да демонстрираме ползите от ранното започване на етиологично лечение.

Задачи

1. Да проследим клиничното протичане и евентуалните усложнения на заболяването при деца от 0 до 14 г.

2. Да въведем масовото използване на имунохроматографски (бързи) тестове „при леглото на болния“ .

3. Доказване предимствата от ранното започване на етиологичното лечение.

4. Изолиране и фенотипно определяне на щамове *Campylobacter* spp. от хоспитализирани пациенти с диариен синдром.

5. Да оценим и сравним диагностичните възможности на имунохроматографските тестове с тези на апробирани и оптимизирани от нас молекулрярни методи.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

- **Материали**

1. Пациенти

Проследени са проспективно 520 пациенти, на възраст от 0 до 14 години, хоспитализирани в Детска инфекциозна клиника на СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ за периода март 2012 – септември 2016. При подбора на участниците в изследването са взети предвид критериите на ЕК за диагностициране на кампилобактериозата (Case definition adopted by the European Commission in its decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC) и Campylobacteriosis Guideline (Washington State Department of Health, 2014). Чрез имунохроматографски тестове са изследвани фекални проби от 520-те хоспитализирани деца всяко от които беше с диария и минимум два от следните симптоми/признаци:

- фебрилитет
- коремна болка
- патологични примеси във фецеса
- епидемиологични данни за кампилобактериоза (консумация на пилешко месо или непастьоризирано мляко, контакт с животни).

2. Клинични материали изследвани за *Campylobacter* spp.

Депонираният фецес е взет в стерилни контейнери, като се избягваше попадане на патологични примеси (слуз и/или кръв) в тях при наличието им. Изследването за наличие на *Campylobacter* spp. по имунохроматографският метод се извършваше в микробиологичната лаборатория на СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ или в стационара на клиниката. Използваха се комерсиални имунохроматографски тестове (ИХТ) на *CerTest Biotec,* Spain белязани с моноклонално антитяло срещу антиген на *Campylobacter*. Изследването се извършваше съгласно инструкциите на производителя.

За контроли по отношение специфичността на ИХТ използвахме референтни щамове на някои бактерии и клинични изолати: *S. enteritidis, S. suberu, S agona, Y. enterocolitica.*

3. Клинични материали изследвани за *Campylobacter jejuni / coli* и референтни щамове

От пациентите позитивни за *Campylobacter* spp. по ИХТ, се изпращаше депониран фецес за културелно и молекулярно – биологично изследване извършвани в НРЛ „Чревни инфекции“ на НЦЗПБ – София от М. Павлова (ръководител доц. П. Петров). Посявките на фецесите се извършваха до 6 часа след взимането им, без използването на консервант или транспортна среда.

В проучването бяха използвани и 8 животински референтни щама *Campylobacter* spp., предоставени от Националният диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт "Проф. д-р Г.

Павлов" - София. Като положителна контрола бяха използвани щамовете: ATCC 33560 - *C. jejuni* и C-14.2 - *C.coli,* изпратени по WHO GFN EQAS от Staten Seruminstitute, Дания.

Като отрицателни контроли при изпитване на специфичността на праймерите в Eva Green Real-time mPCR анализа бяха използвани ДНК от други (хетероложни) микроорганизми, всеки от които е референтен щам: *Y. enterocolitica*; *E. coli* stx 1d; *E. coli* O104; *Sh. flexneri*; *S. typhi*; *S. enteritidis Cl. difficile*; *S. aureus* tox C.

4. Хранителни среди за реанимиране и култивиране

Посявките на фецесите се извършваха на обикновен кръвен агар с 10% дефибринирана овнешка кръв (БулБио–ЕООД, НЦЗПБ) по мембранен способ с нитроцелулозни мембрани (Sartorius Stedim Biotech GmbH 37070 Goettingen, Germany) с размер на порите 0,45µm. Върху филтрите се накапваше течната проба фецес. Ако пробата не е течна, се суспендираше във физиологичен разтвор, за да се улесни преминаването на подвижните кампилобактерни клетки през порите на филтъра. След попиване на пробата (10 – 20 мин.), мембраната се отстраняваше и посявките се култивираха.

За реанимиране и обогатяване на щамовете използвахме течни хранителни среди Brainheart infusion (Applichem).

За субкултивиране използвахме въглен-базирани медии - Karmali *Campylobacter* Agar (HIMEDIA) и *Campylobacter* blood-free agar (Oxoid).

За съхранение на щамовете приготвихме SKIMILK (SKIM MILK POWDER, Oxoid, England) според инструкциите на производителя. Също така и 15 % глицеринов бульон на BHI.

Посевките се култивираха в микроаерофилна атмосфера (5%O2+10%CO2+ 85%N2), която се генерира от газ-пак – „Хелико Кампи Пак“ (фирма Цветика, София) в анаробен джар (Oxoid USA, Columbia, MD) при 42 –43°C за 24 – 72 часа. Отчитането се извършваше ежедневно.

- **Методи**

- **Анамнеза и епидемиологична анамнеза**

Използвани са рутинните клинико-анамнестични методи в инфектологията и педиатрията във връзка с остро настъпило заразно заболяване, характерни клинични особености за стомашно-чревна инфекция, интоксикация и определяне степен на дехидратация.
Във връзка с епидемиологичната анамнеза се задаваха въпроси свързани с хранителните навици на болния и с консумацията на храни с животински произход непосредствено преди заболяването (месни продукти, главно пилешко месо, мляко), наличие на домашни любимци, контакти с болни.

- **Физикален статус**

Снемане на общ физикален статус с насоченост към оплакванията от страна на стомашно-чревния тракт.

- **Стандартни лабораторни изследвания –** ПКК, СУЕ, културелно изследване за *Salmonella* spp., *Shigella* spp., ентеропатогенни *E. coli*.

- По клинични показания: фецес за ротавирусен антиген, химично изследване на нестерилна урина, изследване за чревни паразити чрез нативни и обогатителни методи, CRP и др.

- **Образни изследвания –** по клинични показания: абдоминална ехография, обзорна рентгенография на корем.

5. Специализирани тестове за етиологична диагноза

а. Имунохроматографски тест (ИХТ)

С бърз едностъпков ИХТ (*CerTest Biotec*, Spain) за кампилобактерен антиген са изследвани всички 520 проби фецес от хоспитализирани пациенти с диариен синдром в Детска клиника на СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ според инструкциите на производителя. В „диагностичното кладенче“ се накапваха 4 капки фецес разтворен в екстрахиращ буфер, изчакваше се 4 - 8 мин., и се отчиташе реакцията антиген-антитяло по специфичното оцветяване.

b. Фенотипни методи за идентификация на термофилни *Campylobacter* spp.

За потвърждаващите тестове се нуждаехме от чиста култура:

- *Каталазен тест:* върху предметно стъкло се поставя едно йозе от изпитваната култура и капка 3% H_2O_2.
- *Оксидазен тест:* малко количество бактериална маса от съмнителени колонии се разтрива върху филтърна хартия, навлажнена с 1% разтвор на аминодиметилаланин (оксидазен реагент). Появата на виолетово или тъмносиньо оцветяване на диска в рамките на 10 - 20 секунди се отчита като положителна реакция.
- *Хидролиза на натриев хипурат:* в 1ml разтвор на натриев хипурат се суспендира едно йозе от съмнителната култура и се култивира на 37º С за 2 часа. След което бавно се накапват 200 µl 3,5 % нинхидрин, като се образува двуфазен разтвор. Отчита се след 5 до 10 минуни. Положителна реакция: тъмно лилаво / синьо. Отрицателна реакция: бледо жълто или сиво (фигура 26 в раздел Резултати и обсъждане).
- *Хидролиза на индоксил ацетат:* върху диск, предварително напоен с индоксил ацетат, се разтрива едно йозе бактериална маса от съмнителната култура. Дискът се навлажнява с физиологичен разтвор или стерилна дестилирана вода. При положителна реакция индоксил ацетатът се хидролизира и се наблюдава промяна в синьо оцветяване в рамките на 5 - 10 мин. Ако няма промяна в цвета, хидролиза не се е състояла и тестът се отчита като отрицателен (фигура 27 в раздел Резултати и обсъждане) *(ISO 10272-1:2006 AND ISO/TS 10272-2:2006).*

6. Молекулярно - биологични методи за идентификация и диференциация на *C. jejuni / coli*

- Изолиране на бактериална ДНК от свежа култура

За изолиране на ДНК от свежа култура беше използван лизиращ буфер PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA). След центруфугиране се отделяше супернатантата с екстрахираната бактериална ДНК и след изготвяне на работна концентрация изолираните нуклеинови киселини се съхраняваха на - 20 ˚ C.

- Изолиране на бактериална ДНК директно от среда за запазване на щамове SINMILK

Запазените щамове в SinMilk се размразяват на 4 ˚C с цел да се запази виталитетът на бактериалните клетки. Количеството на размразената проба се дели на две равни части – едната се реанимира с глицеринов бульон на BHI, а другата се центруфугира след добавяне на NaCl. По нататък се следва протоколът за изолиране на бактериална ДНК от свежа култура (виж по-горе).

- Изолиране на бактериална ДНК директно от проба фецес

Съхраняваната с етанол проба фецес центрофугираме на 8 000 rpm за 5 мин., изхвърляме супернатантата и работим с утайката от фецес. Вортексираме за около10 сек. и прехвърляме в колонки с колектор на

QIAGEN. Изолираната бактериална ДНК остава в епруветката в работна концентрация и се съхранява на - 20 ˚C.

а) Multiplex PCR анализ за идентификация и диференциация на *C. jejuni / coli* от култура

- **Оптимизиране на Multiplex PCR анализа**

Въведени и изпитани бяха три двойки праймери за идентификация и видова диференциация на щамове *C. jejuni* и *C.coli*, а също така за доказване специфична ДНК в клиничен материал от фецес. Праймерите описани от Nayak R. et al. и Linton D. et al. амплифицират консервативни гени: ***cad*F** ($16S_p$ДНК) ген - характерен за всички *Campylobacter* spp, ***hip*O**– хипуриказа ген- за *C..jejuni* и ***asp***-аспартокиназа ген - за *C.coli*, чиито секвенции са представени на таблица 3.

Ген	Секвенция	ампликон	източник
*cad*F - F	**TTGAAGGTAATTTAGATATG**	400bp	Nayak et al., 2005
*cad*F- R	**CTAATACCTAAAGTTGAAAC**		
*hip*O– F	**GAAGAGGGTTTGGGTGGTG**	735bp	Linton et al., 1997
*hip*O– R	**AGCTAGCTTCGCARAATAACTTG**		
asp – F	**GGTATGATTTCTACAAAGCGAG**	500bp	Linton et al., 1997
asp - R	**ATAAAAGACTATCGTCGCGTG**		

Таб. 3. Секвенция на използваните праймери и големина на техните ампликони.

Двойките праймери бяха изпитани и оптимизирани поотделно, както следва: CadF заедно с asp и CadF заедно с hipO и след това едновременно в Multiplex PCR.

След протичане на реакцията се провеждаше детекция на продуктите чрез стандартна агарозна елктрофореза и капилярна гел-електрофореза.

- **Определяне на чувствителност и специфичност на метода**

За определяне на чувствителността беше изолирана бактериална ДНК от референтни щамове *C. coli* и *C. Jejuni* и се изготвиха се десетократни падащи разреждания. С различните концентрации бактериална ДНК тествахме чувствителността на метода, т.е. коя е най-ниската концентрация, която Multiplex PCR анализа ще отчете.

За определяне специфичността на метода бяха подбрани ДНК от различни (хетероложни) микроорганизми, които са сред най-често изолираните причинители на ентероколити: *Y. enterocolitica*; *E. coli* stx1d; *E. coli* O104; *Sh. flexneri*; *S. typhi*; *S. enteritidis*, *Cl. difficile*; *S. aureus* toxC. Като положителна контрола бяха използвани щамовете: ATCC 33560 - *C. jejuni* и C-14.2 - *C.coli*.

b. Eva Green Real-time mPCR анализ за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно от проба фецес

Методът позволява наблюдаване на реакцията в реално време, без необходимост от визуализация чрез електрофореза, като запазва основното предимство на техниката – възможността разграничаване на няколко двойки праймери в една ракция.

Апробираният PCR метод за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно от проба фецес е базиран на три двойки праймери, които до сега не са включвани заедно в обща PCR реакция. Праймерите **- AB F2/R2,** амплифициращи специфичен регион (74bp) от *cj041* ген за *C. jejuni*, и **ceuE F/R**, амплифициращи специфичен регион (72bp) от ген *ceuE* за *C. coli*, са публикувани от Jun Kawase et al. Докато двойката праймери **camp F2/R2**, амплифициращи специфичен регион (108bp) от родов ген за *Campylobacter spp.*са публикувани от *Botteldoorn N.et al*., които изследват и доказват кампилобактери във фецеси от пилета. Секвенциите на праймерните двойки са представени на таблица 4.

ген	секвенция	ампликон	източник
16S рДНК	**CACGTGCTACAATGGCATAT**	108 bp	Botteldoorn et al.,
	GGCTTCATGCTCTCGAGTT		
ceuE- F	**CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG**	72 bp	Jun Kawase et al.,
ceuE- R	**AGCTATCACCCTCATCACTCATACTAATAG**		
cj041-F	**GATACCTTAAGTGCAGCCTGTGA**	74 bp	Jun Kawase et al.,
cj041-R	**ACGCCTAAACCTATAGCTCCTTC**		

Таб. 4. Секвенция на използваните праймери и големина на техните ампликони.

Тъй като за първи път трите двойки праймери, описани по-горе, ще участват в обща PCR реакция, то избраният от нас PCR метод следва да

бъде оптимизиран и адаптиран според условията на лабораторията. За целта бяха оптимизитани следните условия:

- **Оптимизиране на температурата на анийлинг (Ta) на Eva Green Real-time mPCR метода**

Целта на оптимизацията е да се установи тази температура на хибридизация на праймерите, при която родовите и видовите пикове от амплификацията след Eva Green Real-time mPCR да са ясно разграничими.

- **Оптимизиране условията на Eva Green Real-time mPCR анализа чрез метод на Тагучи**

Приложихме методът на Тагучи за успешно определяне на оптималните условия за SYBR Green-базирани количествени PCR анализи. Тагучи - методът спестява време, разходи и усилия при оптимизацията на количествени PCR анализи, които са базирани на анализи в реално време, където се отчитат резултати по време на всеки цикъл.

- **Валидиране на Eva Green Real-time mPCR метода за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно от проба фецес**

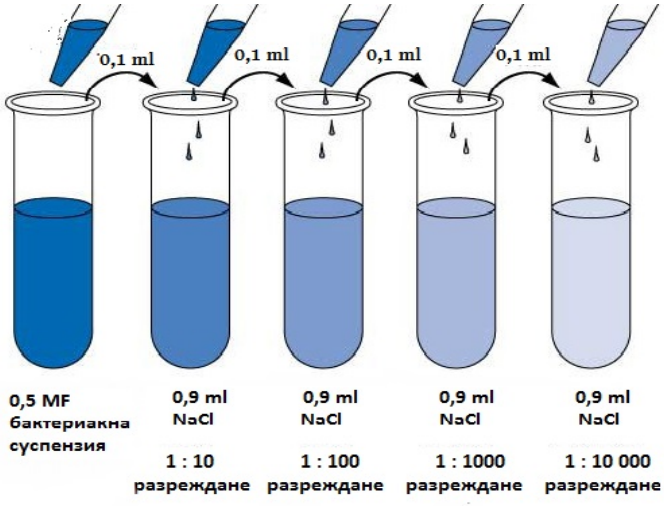
С цел валидиране на оптимизираните условия на Eva Green Real-time mPCR метода за откриване и определяне на най-честите причинители на кампилобактериози (*C. jejuni* и *C. coli),* бяха тествани аналитичната му чувствителност и специфичност.

- **Определяне на аналитична чувствителност mPCR метода**

За целта бяха изготвени серия разреждания на 10-кратна бактериална суспензия от референтни щамове *C. jejuni* и респективно на *C.coli* във физиологичен разтвор (фиг. 12). С 10 µ*l* от всяко разреждане бяха изкуствено инокулирани фецеси, отрицателни за кампилобактер. За екстракцията на ДНК бе използван QIAamp DNA Blood Mini Kit. От всяко 10-кратно разреждане бяха разсяти по 10 µ*l* бактериална суспензия на обикновен кръвен агар с 10 % овнешка кръв и култивирани при микроаерофилни условия на 42˚ С за 24 часа, с цел да се определят CFU / ml (единици образуващи колонии).

CFU / ml = (броя на колониите Х фактора на разреждане)

обема на културираната суспензия



Фиг. 12. Изготвяне на 10-кратни бактериални разреждания за определяне на аналитична чувствителност на Eva Green Real-time mPCR метода.

За определяне на аналитичната чувствителност на Eva Green Real-time mPCR анализа бяха използвани десетократни разреждания на

бактериалните ДНК, изолирани от изкуствено инокулираните фецеси с падащи разреждания на бактериални суспензии на *C. jejuni* и *C. coli*.

- **Определяне на аналитична специфичност на mPCR метода**

За целта бяха подбрани ДНК от различни (хетероложни) микроорганизми, които са сред най-често изолираните причинители на ентероколити: *Y. enterocolitica*; *E. coli* stx1d; *E. coli* O104; *Sh. flexneri*; *S.* Typhi; *Cl. difficile*; *S. aureus* toxC. Като положителна контрола бяха използвани щамовете: ATCC 33560 - *C. jejuni* и C-14.2 - *C.coli*.

За определяне на аналитичната специфичност на Eva Green Real-time mPCR анализа бяха използвани десетократни разреждания на бактериалните ДНК.

- **Статистически методи**

Данните бяха обработени със статистически пакет на SPSS 19.0.1:

- Графичен анализ – за визуализация на получените резултати

а) Параметрични методи

- Т- тест – за проверка на хипотези за различие между средните аритметични на две независими извадки
- Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) - за проверка на хипотези за различие

б) Непараметрични методи

- Тест на Фишер – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи
- Тест на Стюдънт – за сравнение на две независими извадки

c) Дескриптивни методи

- Вариационен анализ – за изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване
- Честотен анализ
- Кростабулации – за търсене на връзка между категорийни признаци
- Статистическа проверка на хипотези
- Корелационен анализ – за определяне степента на взаимозависимост между две променливи

- **Статистически методи и критерии за оценка на лабораторни методи**

РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД		
брой позитивни	**брой негативни**	**РЕЗУЛТАТИ ОТ ТЕСТ МЕТОД**
a	**b**	**брой позитивни**
c	**d**	**брой негативни**

Таб. 8. Истинност при изчисляване на критериите за оценка на тестваните методи.

Позитивна предиктивна стойност (PPV) – изразява вероятността един позитивен тестови резултат да е истински позитивен. $\mathbf{PPV = \frac{(a + b)}{a}}$ **;**

Негативна предиктивна стойност (NPV) **–** изразява вероятността един негативен тестови резултат да е истински негативен. $\mathbf{NPV = \frac{(c + d)}{d}}$ **;**

Чувствителност на тестовия метод - изразява вероятността истински позитивните проби да бъдат коректно определени от тествания метод = $\mathbf{\frac{(a + c)}{a}}$ **;**

Специфичност на тестовия метод - изразява вероятността истински негативните проби да бъдат коректно определени от тествания метод = $\mathbf{\frac{(b + d)}{d}}$ **;**

Фалшиво негативен резултат - изразява вероятността истински позитивна проба да е била определена неточно от тествания метод = $\mathbf{\frac{(a + c)}{c}}$ **;**

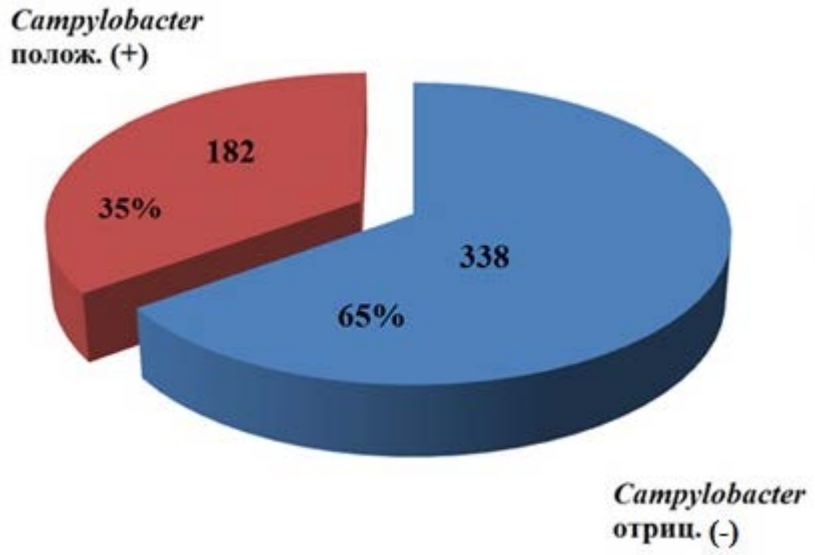
Фалшиво позитивен резултат - изразява вероятността истински негативната проба да е била определена неточно от тествания метод = $\mathbf{\frac{(a + d)}{a}}$ **;**

- Метод на Тагучи – позволява да се проектира контрола върху качеството на процеси нечувствителни към влиянието на променливи фактори

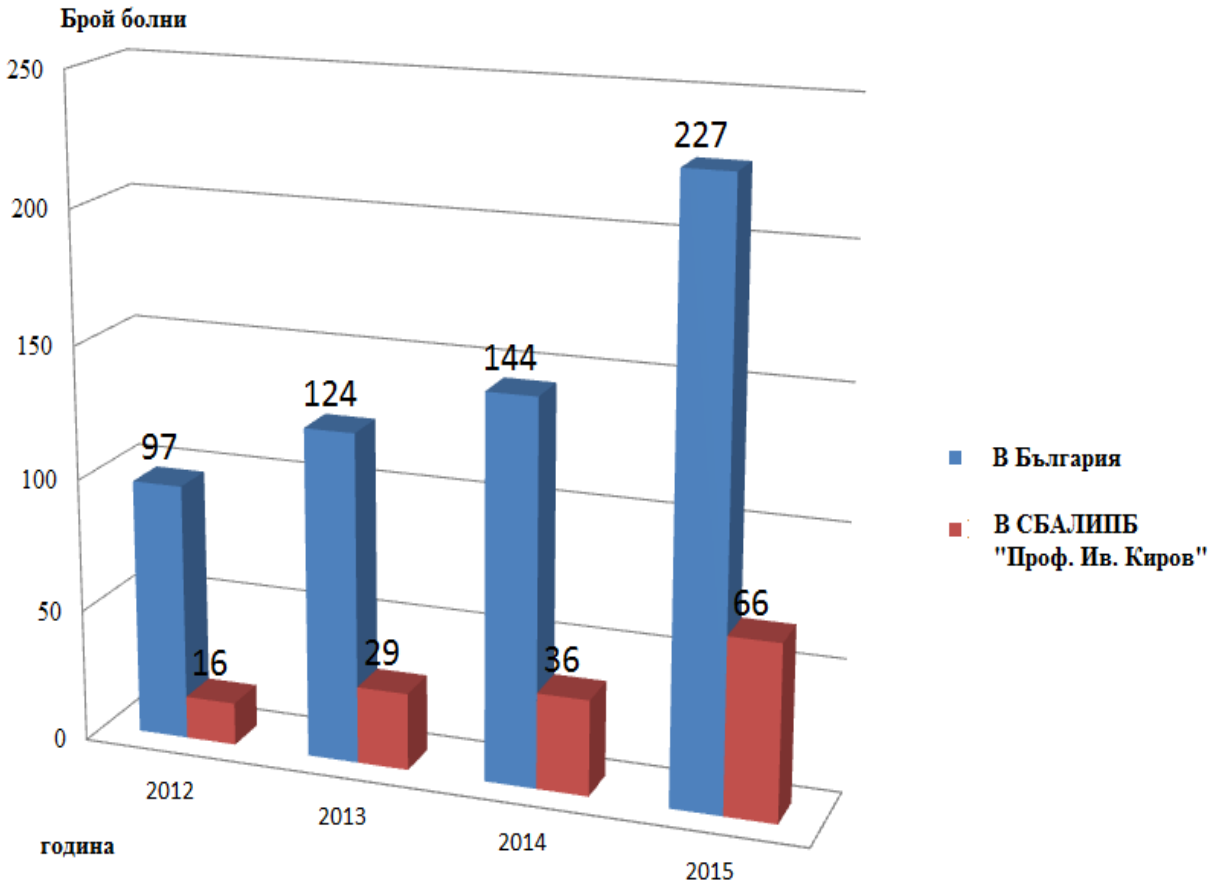
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Демографска характеристика на пациентите

В хода тази работа от изледваните 520 болни от 0 – до 14 години, 182 (35%) се позитивираха чрез ИХТ за кампилобактериоза (фиг.13). Както е видно от фигура 14 с времето диагностичните възможности в страната се подобряват. Това до голяма степен се дължи и на нашата работа. Докато през 2012 г. СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ е съобщил само 16,5% от случаите на кампилобактериозата в България, то през 2014 г. те вече са над 25%. През 2015 г. на нашата работа се дължи доказването на 31% от случаите на кампилобактериоза в държавата.



Фиг. 13. Разпределение на положителните и отрицателни ИХТ за кампилобактериоза.



Фиг. 14. Разпределение на случаите на кампилобактриоза за периода 2012 – 2015 (на национално ниво и доказани в СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“

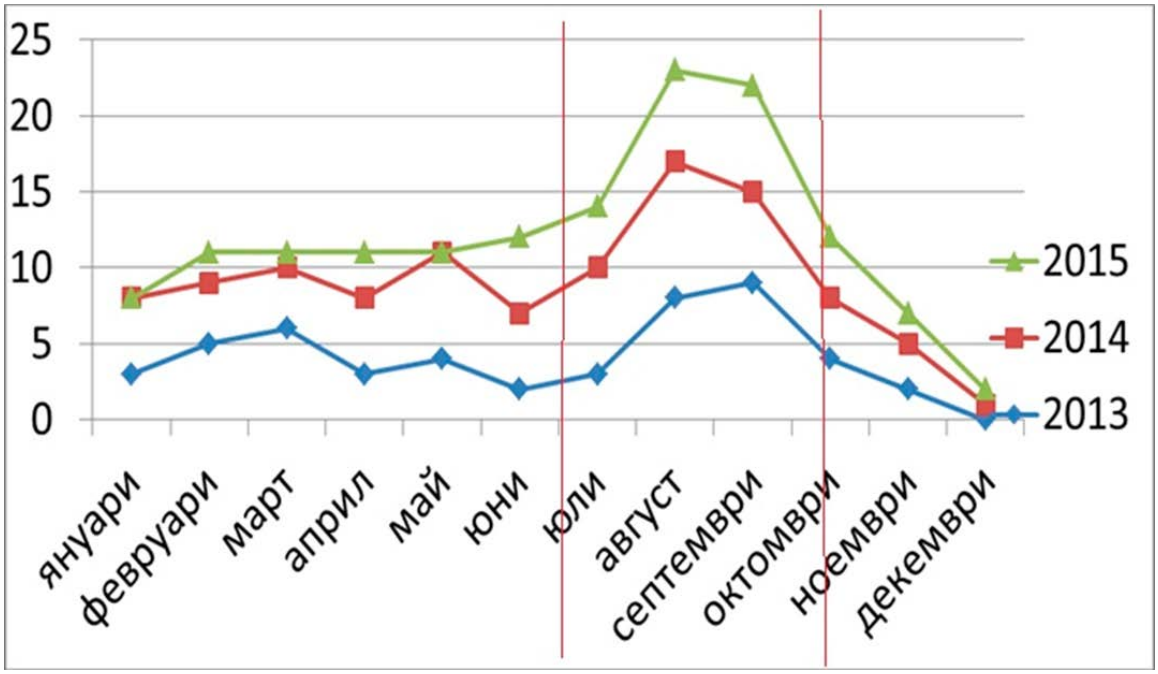
Изследвани фактори		брой	%	валиден %
пол	мъже	88	48,1%	48,1%
	жени	94	51,9%	51,9%
възраст	0 – 1 г.	45	24,9%	24,9%
	2 – 5 г.	80	44,2%	44,2%
	6 – 10 г.	45	24,3%	24,3%
	над 10 г.	12	6,6%	6,6%
Общо пациенти		**182**		

Таб. 6. Разпределение на пациентите по пол и възраст.

При разпределението на 182 пациенти позитивни за кампилобактериоза чрез ИХТ установихме равенство между мъжкия и женския пол - мъже – 88 (48,1%) и жени 94 (51,9%). Тези резултати са в съответствие с данните на повечето световни автори, които или описват тенденцията за паритет между половете или за лек превес на заболяемостта при мъжкия пол. По отношение на възрастовите групи, както в световен мащаб така и у нас, тенденцията е да боледуват предимно деца до 5 годишна възраст. Както е видно от таблица 6, като обединим първата и втората възрастова категория, 125 (68,8%) от болните са на възраст до 5 г., като най-висока е заболяемостта във възрастовата група 2-5 години (44,2%). Склонни сме да отдадем по-ниската заболяемост в групата на кърмачетата (24,9%) на фактора хранене. От една страна

кампилобактериозата е типична хранителна инфекция, а от друга децата в този възрастов диапазон сравнително рядко се срещат с храна различна от майчината кърма. В унисон с повечето литературни източници, деца над десет години сравнително рядко попадаха в нашето изследване – те са едва 12 (6,6%). Това вероятно се дължи на подобряване на хигиенните навици с възрастта или на вече прекарана кампилобактерна инфекция и създаден протективен имунитет.

По отношение сезонността на протичане на инфекцията, данните ни напълно съвпадат с тези на мнозинството автори. Пиковете са през топлите и влажни месеци – в нашия случай от юли до началото на октомври (таб. 7).



Таб. 7. Честотата на кампилобактериозата в зависимост от сезонността (2013-2015).

II. Клинична характеристика на инфекцията

1. Диариен синдром

- **Интензивност на диарийният синдром**

Поради факта, че в достъпните ни публикации по проблема кампилобактериозата без диария е сочена като голямо изключение, а и защото в нашата работа описваме протичането на инфекцията при хоспитално болни, всички проучени от нас деца бяха с диариен синдром. В нашето изследване си поставихме за задача да проучим интензитета на диарията за различните възрастови категории използвайки метода на кростабулациите. Както е видно от таблица 8 диарията е най-интензивна при най-малките пациенти. Във възрастовата група 0-1 г. 22 (12,2%) от болните имат между 5 и 10 изхождания за 24 часа и същият процент болни – над 10 изхождания. В групата на 2-5 годишните заболяването също протича със сравнително интензивен диариен синдром – 45 (24,9%) от децата са с между 5 и 10 изхождания за денонощие. При децата в категорията 6-10 години превалират между 3-5 изхождания за денонощие – 31 (17,1%), а у най-големите няма нито едно дете с над 10 изхождания за 24 часа.

възраст към брой изхождания					
			честота на изхожданията		
			3-5	**5-10**	**Над 10**
възраст	**0-1**	Count	1	**22**	**22**
		% of Total	0,6%	12,2%	12,2%
	2-5	Count	21	**45**	14
		% of Total	11,6%	24,9%	7,7%
	6-10	Count	**31**	9	4
		% of Total	17,1%	5,0%	2,2%
	Над 10	Count	7	5	**0**
		% of Total	3,9%	2,8%	0,0%

Таб. 8. Интензитет на диарията за всяка възрастова група за денонощие.

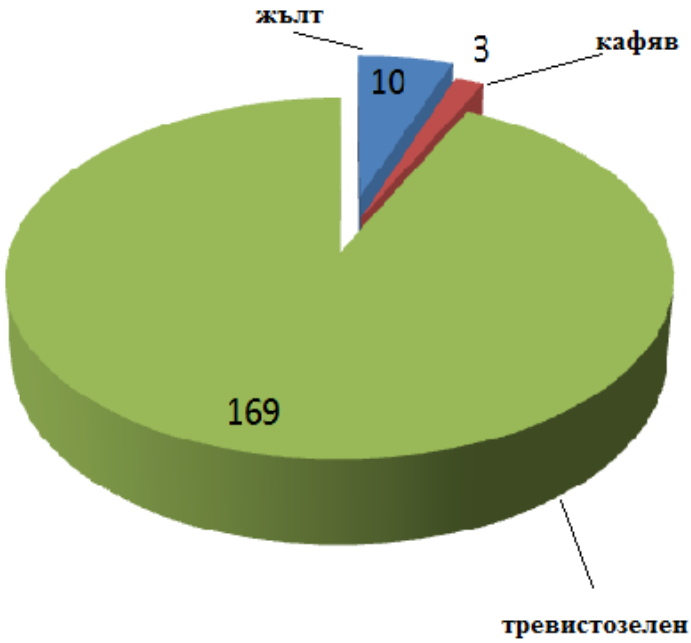
- **Характеристика на изхожданията**

При много голяма част от болните в изхожданията имаше патологични примеси – 112 (61,9%) от болните деца имаха поне веднъж по време на боледуването си кръв и слуз в изхожданията си, а 47 (26%) – само кръв. Както е видно от таблица 9 огромният брой от децата с кампилобактериоза имат хемоколит – 159 (87,36%). Само 13 (6,6%) от наблюдаваните от нас болни имаха примеси на слуз, без кръв, а 10 (5,5%) имаха диарийни изхождания без патологични примеси. Според *M. Blazer,* един от авторите с множество статии по проблемите на кампилобактерозата в детска възраст, примесите от кръв в изхожданията са по-характерни за деца в индустриално развиващите се страни и не са толкова типични за Европа и Северна Америка. В случая ние отчитаме точно обратната тенденция.

честота на патологични примеси				
		брой	процент	Валиден процент
вид примеси	**без**	10	5,5%	5,5%
	кръв	**47**	**26,0%**	26,0%
	слуз	13	6,6%	6,6%
	кръв+слуз	**112**	**61,9%**	61,9%

Таблица 9. Честота и вид на патологичните примеси в изхожданията.

При 169 (92,8%) от болните изхожданията бяха през повечето време с характерен тревистозелен цвят, само при 10 (5,5%) той беше лимоненожълт, а при 3 (1,6%) останаха кафеникави (фиг. 15).



Фиг. 15. Преобладаващ цвят на диарийните изхождания.

2. Коремни болки и тенезми

В нашето проучване установихме сравнително висока честота на болковия синдром. Както се вижда от таблица 13 при 124 (68,1%) от болните се срещаха коремни болки, като при 20 (11,0%) тези болки се съчетаваха временно и с тенезми. Според *I. Gillespie* и редица други американски автори, коремните болки при деца над 3 г. и възрастни се срещат в 90% от случаите. Ние приемаме това и смятаме, че по-ниският процент в нашето проучване се дължи на факта, че в него участват и кърмачета, а коремните болки са субективен симптом и той трябва да бъде съобщен от болния, а не просто подозиран. В този случай ние проучихме и честотата на коремните болки за различните възрастови групи и потвърдихме тенденцията тя да е по-висока при по-големи деца.

Както е видно на таблица 10 от децата в диапазона 2-5 години – 59 (32,6%) и в групата 6-10 години 36 (19,9%) са с коремни болки. Тенезмите са редки и се срещат само при деца над 6 години (таб. 11).

коремни болки и тенезми				
		брой	процент	Валиден процент
Болки /тенезми	**да**	**104**	**57,5%**	57,5%
	не	58	31,5%	31,5%
	болки + тенезми	20	11,0%	11,0%
	общо с болки	**124**	**68,1%**	68,1%

Таб. 10. Честота на коремните болки и тенезмите при всички болни.

коремни болки към възраст						
			възраст			
			0-1	**2-5**	**6-10**	**над 10**
Коремни болки	**да**	Count	4	**59**	**36**	5
		% of Total	2,2%	**32,6%**	**19,9%**	2,8%
	не	Count	41	16	0	0
		% of Total	22,7%	8,8%	0,0%	0,0%
	Болки+ тенезми	Count	0	5	**8**	**7**
		% of Total	0,0%	2,8%	**4,4%**	**3,9%**

Таб. 11. Честота на коремните болки и тенезмите за различните възрастови категории.

В определени случаи коремните болки бяха толкова интензивни, че преди или по време на престоя на детето в клиниката минимум веднъж се е наложила документирана консултация с детски хирург, а в някои

случаи и образна диагностика (коремна ехография и/или обзорна графия на корем). В 42% от случаите при абдоминална ехография се наблюдаваше свободно подвижна течност (СПТ) в коремната кухина – показател за сериозен възпалителен процес. Както е видно от фигура 16 при 36 (19,9%) от проследяваните от нас деца е извършена подобна консултация по повод съмнение на ОХК.



Фиг.16. Брой деца консултирани с коремен хирург.

На таблица 12 е видно, че сме подозирали ОХК при по-големите деца – главно тези над 6 годишна възраст.

съмнение за ОХК към възраст						
			възраст			
			0-1	**2-5**	**6-10**	**над 10**
съмнение за ОХК	**да**	Count	1	9	**15**	**12**
		% of Total	0,6%	5,0%	**8,3%**	**6,1%**
	не	Count	44	72	29	1
		% of Total	24,3%	39,2%	16,0%	0,6%

Таб. 12. Съмнение за ОХК спрямо възрастта на болните.

3. Горно-диспептичен синдром

По отношение на симптома повръщане авторите в достъпната ни литература имат по-сериозни различия. Няколко автори, включително

Butzler го описват като рядко, независимо от възрастта на болните, а според други автори, сред които и *Gillespie*, честотата му е сериозна – почти 50% от децата над 3 годишна възраст имат немотивирани от прием на храна или течности повръщания, а при възрастни е описана честота над 30%. В нашата работа ние сме склонни да се съгласим с факта, че честотата на повръщанията е значителна. Сред проучените от нас деца с кампилобактериоза 74 (40,6%) имат немотивирани повръщания. Съгласни сме с описаната от някои автори тенденция, броят на повръщанията да е по-голям в по-ниска възраст. Във възрастовата група до 1 г. най-много деца имат над 3 повръщания за денонощие – 21 (11,6%), а децата в категорията 2-5 г. имат най-често между 1 и 3 повръщания за 24 часа – 22 (12,2%). Болните от 6 до 10 г. имат до 3 повръщания, и то само 8 (4,4%) от тях. При най-големите, над 10 г., повръщания почти не се наблюдават (таб. 13).

повръщане към възраст						
			възраст			
			0-1	**2-5**	**6-10**	**над 10**
честота на повръщане	**без**	Count	11	50	36	11
		% of Total	6,1%	27,6%	19,9%	6,1%
	1-3	Count	**11**	**22**	8	1
		% of Total	**6,1%**	**12,2%**	4,4%	0,6%
	3-5	Count	**21**	2	0	0
		% of Total	**11,6%**	1,1%	0,0%	0,0%
	над 5	Count	2	7	0	0
		% of Total	1,1%	3,3%	0,0%	0,0%

Таб. 13. Честота на повръщанията за 24 ч. спрямо възрастта.

4. Токсикоинфекцозен синдром (ТИС)

От биологична гледна точка ТИС е защитна проява на макроорганизма спрямо антигените и токсините на микроорганизмите, които го атакуват.

Той се изразява неспецифично най-често с фебрилитет, главоболие, миалгия, артралгия, адинамия и др.

- **Фебрилитет**

Като основен симптом на ТИС и инфекциозните заболявания, и като показател за тежестта на инфекцията, разгледахме стойностите на фебрилитета. Всички диагностицирани от нас болни бяха фебрилни в различна степен. Преобладаваха фебрилните и високофебрилните пациенти – в диапазона 38,1 - 39 °С бяха 85 (46,4%), а над 39,1 °С – 87 (48,1%). Само 11 (5,5%) от болните деца бяха субфебрилни (таб. 14).

фебрилитет				
		брой	процент	валиден процент
Стойност на фебрилитета °С	**37-38**	11	5,5%	5,5%
	38,1-39	**85**	**46,4%**	46,4%
	над 39,1	**87**	**48,1%**	48,1%

Таб. 14. Фебрилитет при болните с кампилобактериоза.

Разгледахме и фебрилната реакция спрямо възрастта на болните, като установихме описаната от повечето световни автори закономерност – най-малките деца да са най-високофебрилни. От таблица 15 личи, че в кърмаческа възраст най-много болни са били поне веднъж с фебрилитет над 39,1 °С – 36 (19,9%). При болните в диапазона 2-5 г. преобладава фебрилитет 38,1 - 39 °С – 41 (22,7%), голяма част от тях обаче са и високофебрилни – 31 (19,9%) са имали фебрилна реакция на стойност над 39,1 °С. Сравнително малка част от децата между 6 и 10 г. са с фебрилитет над 39,1 °С – само 17 (8,8%), а при тези на 10 г. само 4

(2,2%) са били с тези стойности на температурата. Субфебрилни са останали пренебрежимо малко болни – 8 (4,4%) от групата на 2-5 годишните и 2 (1,1%) от тези над 6 г. Налага се изводът, че наред с диарията с примеси на кръв, фебрилитетът е водещ симптом при кампилобактериозата и фебрилната реакция достига сериозни стойности при най-малките болни (таб 15).

фебрилитет към възраст						
			възраст			
			0-1	**2-5**	**6-10**	**над 10**
Стойност на фебрилитета °C	**37-38**	Count	0	8	2	0
		% of Total	0,0%	4,4%	1,1%	0,0%
	38,1-39	Count	9	**41**	**26**	8
		% of Total	5,0%	**22,7%**	**14,4%**	4,4%
	над 39,1	Count	**36**	**31**	17	4
		% of Total	**19,9%**	**17,1%**	8,8%	2,2%

Таб. 15. Стойности на фебрилитета в зависимост от възрастта.

- **Други симптоми на интоксикация**

Втрисане, главоболие, миалгия

За да придобием по-ясна представа за ТИС при болните с кампилобактериоза проследихме честотата и на други три водещи симптома – втрисане, главоболие и миалгия. Тези симптоми на интоксикация се срещаха в различна честота и комбинация при проучваните от нас болни (таб. 16). Преобладаваха втрисането и главоболието като изолирани симптоми съответно при 51 (28,2%) и 15

(8,3%). Понятието „изолирани“ приемаме за по-скоро условно, тъй като всички проследени от нас болни бяха фебрилни в различна степен. При нито едно болно дете не срещнахме втрисане или главоболие без фебрилитет. Не получихме и сигурни доказателства за главоболие в афебрилните периоди. За симптома главоболие, който наблюдавахме само в 15 (8,3%) от болните влизаме в известни противоречия с по-голямата част от авторите пишещи по проблема. Те го приемат за един от водещите симптоми, но при нас той е застъпен срвнително рядко и то само в комбинация с фебрилен пристъп. Останалите комбинации от симптоми на ТИС са представени на таблица 16.

интоксикация				
		брой	процент	валиден процент
симптом	**без ***	41	22,7%	22,7%
	втрисане	**51**	**28,2%**	28,2%
	главоболие	**15**	**8,3%**	8,3%
	миалгия	11	6,1%	6,1%
	главоболие+миалгия	29	16,0%	16,0%
	втрисане+миалгия	6	3,3%	3,3%
	втрисане+главоболие	16	8,8%	8,8%
	втрисане+главоболие+миалгия	12	6,6%	6,6%

*Пациентите в категория „без“ са фебрилни

Таб. 16. Някои симптоми на ТИС при болни с кампилобактериоза.

За да добием и тук представа за зависимостта на интоксикацията от възрастта разгледахме ТИС по възрастови категории. При кърмачетата най-често срещнахме втрисане – 27 (14,9%), като за останалите симптоми нямаме данни. Това е лесно обяснимо в тази най-ранна възраст тъй като освен фебрилитета и втрисането, нямаме други симптоми на ТИС, които да са обективни и да могат да бъдат

наблюдавани от лекаря или съобщени от родителя. Във възрастта от 2-5 г. отново се среща главно втрисането, но срещаме и 8 (4,4%) главоболие, както и 10 (5,5%), които съобщават за комбинацията от главоболие и миалгия. При по-големите, 6-10 г., се срещат у 13 (7,2%) главоболие и миалгия, но у най-големите, над 10 г. тези симптоми стават по-редки – 6 (3,3%). Като е видно от таблица 17 при най-големите деца симптоматиката на ТИС е и най-бедна, което е в съответствие с твърденията на повечето световни автори.

интоксикация към възраст						
			възраст			
			0-1	**2-5**	**6-10**	**над 10**
симптоми на интоксикация	**без ***	Count	18	19	4	0
		% of Total	9,9%	10,5%	2,2%	0,0%
	втрисане	Count	**27**	**23**	1	0
		% of Total	**14,9%**	**12,7%**	0,6%	0,0%
	главоболие	Count	0	**8**	**6**	1
		% of Total	0,0%	**4,4%**	**3,3%**	0,6%
	миалгия	Count	0	7	4	0
		% of Total	0,0%	3,9%	2,2%	0,0%
	главоболие+ миалгия	Count	0	**10**	**13**	**6**
		% of Total	0,0%	**5,5%**	**7,2%**	**3,3%**
	втрисане+ миалгия	Count	0	5	1	0
		% of Total	0,0%	2,8%	0,6%	0,0%
	втрисане+ главоболие	Count	0	6	8	2
		% of Total	0,0%	3,3%	4,4%	1,1%
	втрисане+ главоболие+ миалгия	Count	0	2	7	3
		% of Total	0,0%	1,1%	3,9%	1,7%

*Пациентите в категория „без“ са фебрилни

Таб. 17. Разпределение на симптомите на ТИС по възрастови групи.

От обобщените до тук данни за клиничното протичане на инфекцията се налагат изводите, че при децата с кампилобактериоза водещи симптоми са кървава диария, фебрилитет и интоксикация, като тежестта на симптоматиката е в пряка зависимост от възрастта. Най-малките прекарват инфекцията най-тежко – с по-интензивна диария и по-тежка интоксикация, с повече повръщания. Коремните болки при нашите болни са сравнително чести и не са за пренебрегване, особено у по-големите деца, където не рядко могат да имитират ОХК и да доведат до сериозни диференциално-диагностични затруднения. До подобни затруднения могат да доведат и повръщанията, които според нашите данни са по-чести от описваното в достъпната ни литература. Именно комбинацията от фебрилитет, коремни болки и повръщане наложи консултацията с детски хирург при част от нашите болни, въпреки наличието на диариен синдром (фиг. 16).

5. Параклинични изследвания

- **Пълна кръвна картина и СУЕ**

На всички проучвани от нас болни бяха изследвани показателите ПКК и СУЕ. Както е видно от таблица 18 директните маркери за възпалителен процес (левкоцитоза и увеличено СУЕ) не са характерни за заболяването. Тук влизаме в сериозно противоречие с повечето български автори според които и при кампилобактериозата, подобно на останалите бактериални инфекции, левкоцитозата и увеличено СУЕ са правило. Единственият индиректен показател за възпаление в случая е пониженият хемоглобин, който се среща изключително често – при 49,7% от нашите болни. Приемаме, че липсата на директни възпалителни промени в кръвта се дължи на острата инфекция, но ранно изследване на показателите, поради което имунните механизми все още

не са сработили. Тази ни теза се подкрепя от изследването на острофазови белтъци. По клинични показания изследвахме CRP при осем деца и при всички той беше повишен.

Параклиника - кръв				
		честота	**процент**	**валиден процент**
Показатели	Левкоцитоза	1	0,6 %	0,6%
	Увеличено СУЕ	3	1,7 %	1,7%
	Понижен хемоглобин	**90**	**49,7 %**	49,7%
	Без промени	**88**	**48,4 %**	48,4 %
	Total	182	100 %	100 %

Таб. 18. Промени в някои показатели за възпаление при рутинно изследване на кръв.

- **Химично изследване на урина**

При изследването на нестерилна урина се интересувахме главно от наличието на кетотела чрез които предценявахме лабораторно наличието на дехидратация. Урина изследвахме по клинични показания при 62 (34,1%) от децата позитивни за кампилобактериоза. Както е видно от таблица 19 мнозинството от тях (82,3%) имаха в различна степен кетотела, което показваше сериозна степен на дехидратация.

Параклиника - урина				
		честота	**процент**	**валиден процент**
Показатели	Без кетотела	11	17,7 %	17,7 %
	С кетотела	**51**	**82,3 %**	82,3 %
	Total	62	100 %	100 %

Таб. 19. Промени при изследване на урината по отношение наличието на кетотела.

6. Случаи на извънчревни усложнения при кампилобактериоза

От описаните в литературните източници системни усложнения на кампилобактериозата ние имахме наблюдавахме две – случай на Henoch-Schonlein пурпура и случай на реактивен артрит.

- **Случай на кампилобактериоза усложнена с Henoch-Schonlein пурпура**

Касае се за момче на 4 г., което заболява остро ден преди хоспитализацията с многократни воднисти изхождания с примеси на слуз, гадене без повръщане и коликообразни коремни болки. Около 24 часа след започване на диарията се появил обрив по тялото и крайниците.

При постъпването детето беше в увредено общо състояние. В съзнание, контактно, адекватно. С подчертана адинамия. Интоксикирано, субфебрилно до 37.6 °С. С хеморагичен обрив по торса, седалището и крайниците (фиг. 17). С белези на дехидратация. Не се палпираха увеличени периферни лимфни възли. Дихателна система – нос – проходим; чисто везикуларно дишане без прибавени хрипове. Сърдечно съдова система – ритмична сърдечна дейност, ясни тонове, тахикардично до 124 уд./мин. Корем – с меки стени, палпаторно болезнен периумбиликално, с много жива чревна перисталтика. Без данни за хепатоспленомегалия. При хоспитализирането са направени следните изследвания: ПКК и СУЕ; нестерилна урина; взети фекални проби за културелно изследване за *Salmonella, Shigella* и ентеропатогенни *E. coli* и за имунохроматографско изследване на *Campylobacter* и *Rotavirus*.

От кръвната картина установихме нискостепенна левкоцитоза, хипохромна анемия и ускорено СУЕ (таб. 18). Нормални показатели от изследването на урината, без еритроцити в седимента. От микробиологичните и вирусологични изследвания се позитивира само имунохроматографският тест за кампилобактер. Изследването беше верифицирано културелно и чрез Multiplex PCR, като се определи щама *C. jejuni*.

От клинико-анамнестичните данни, статуса и лабораторните изследвания приехме, че се касае за кампилобактериоза в хода на която е настъпило усложнение – Henoch-Schonlein пурпура. Налице бяха и задължителните клинични критерии за хиперсензитивния васкулит– хеморагичен обрив без тромбоцитопения, коремни болки, ставен синдром.

Няколко часа след постъпването детето стана фебрилно до 38.5 °C, в изхожданията се появиха примеси от кръв, а хеморагичният обрив започна бързо да конфлуира, особено интензивно в седалищните части. Прибавиха се болки и оток по коленните и глезенните стави. Поради засилване на коремните болки се направи абдоминална ехография – с данни за СПТ (фиг. 18).

Лечението бе започнато незабавно след постъпване в стационара с венозни вливания на глюкозо-солеви разтвори, и еднократна апликация на метилпреднизолон. С оглед кампилобактерната инфекция се започна терапия с перорален макролид (Clarithromycin 2x7,5 мг/кг. т.м.). Още на 48-я час интензивността на диарийният синдром намаля, а кръвта от изхожданията изчезна. Обривът започна да избледнява. Фебрилитетът овладяхме около 36 час след започване на антибиотичното лечение (фиг. 19). Контролната хемограма показа липса на левкоцитоза, тенденция към преодоляване на анемията и намаляване на СУЕ (таб. 20). Повторният бърз тест за кампилобактериоза беше негативен. На 3-ти ден от началото на лечението детето беше трайно афебрилно, без ставен

синдром и значително редуциран обрив. Диарийният синдром беше овладян.

Детето се изписа здраво по отношение на чревната инфекция и се насочи към детски ревматолог за консултация и наблюдение.

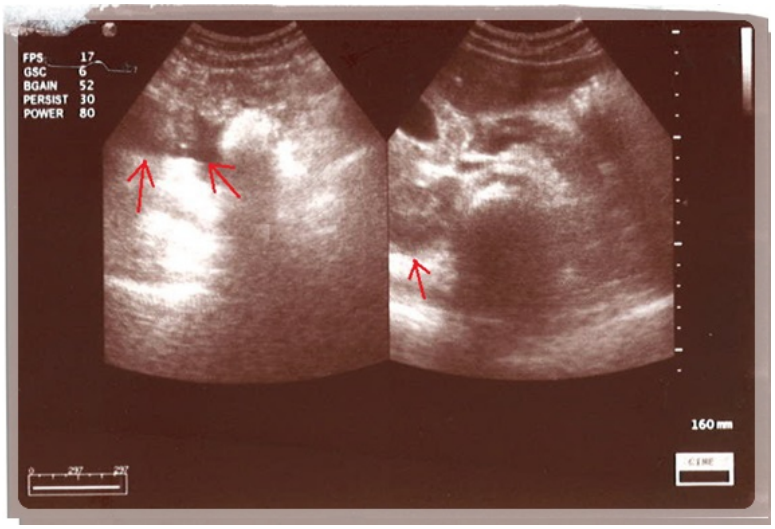




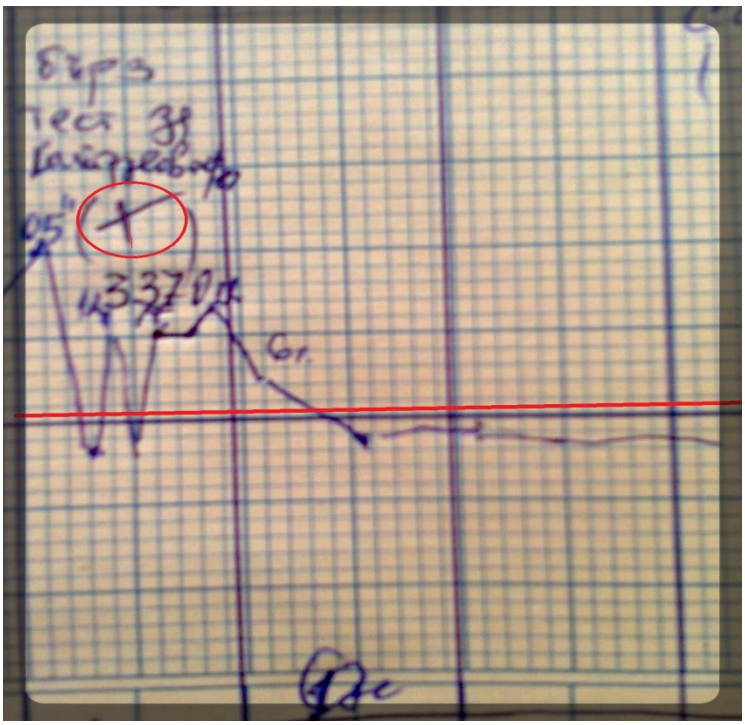
Фиг. 17. Хеморагичен обрив по седалищни части и долни крайници при дете с кампилобактериоза и Henoch-Schonlein пурпура.

дата	Leu	Er	Hb	Hct	Tr	Ly %	Mo %	Gr %	СУЕ
23.05.2014	12.1	4.5	113.0	32.2	283.0	17.9	5.3	76.8	30
25.05.2014	8.2	5.4	119.0	35.2	334.0	29.3	5.0	65.7	15

Таб. 20. Показатели в динамика от ПКК при дете с кампилобактериоза и Henoch-Schonlein пурпура (преди и след започване на антибиотично лечение).



Фиг. 18. Снимка от коремна ехография при дете с кампилобактериоза и Henoch-Schonlein пурпура (СПТ е показана със стрелки).



Фиг. 19. Снимка на температурния лист показващ бързото овладяване на фебрилитета след диагностичното уточняване с бърз тест и започване на антибиотично лечение.

В представения случай детето е с коремна болка и хемоколит, като тези два симптома биха могли да се интерппретират и като израз на кампилобактериозата, но и като симптоми специфични за коремната форма на васкулита. Поради факта, че още на 2-ри ден от началото на етиологичната терапия хемоколитът и коремната болка бяха овладяни трайно, приехме че се касае за кожно-ставна форма на васкулит, а абдоминалната симптоматика е била израз на чревната инфекция.

- **Случай на кампилобактериоза усложнена с реактивен артрит**

Касае се за момче на 3 г., което заболява остро около три дни преди хоспитализацията с многократни воднисти изхождания с примеси на

слуз, а в последствие и жилки кръв. Повърнало еднократно, започнали спастични коремни болки.

При приема пациентът беше в увредено общо състояние. С подчертана адинамия. Интоксикиран, субфебрилен до 38 °С. С подчертани белези на дехидратация. Не се палпираха увеличени периферни лимфни възли. Нормален статус по отношение на дихателна и сърдечно-съдова система. Корем – с меки стени, палпаторно болезнен по хода на колона и периумбиликално, с много жива чревна перисталтика. При хоспитализирането са направени следните изследвания: ПКК и СУЕ; взети фекални проби за културелно изследване за *Salmonella, Shigella* и ентеропатогенни *E. coli* и за имунохроматографско изследване на *Campylobacter* и *Rotavirus*.

От кръвната картина установихме единствено нискостепенна хипохромна анемия. От микробиологичните и вирусологични изследвания се позитивира само имунохроматографският тест за кампилобактер. По-късно изследването беше верифицирано – културелно остана без разстеж, но чрез Eva Green Real- time mPCR се определи вида *C. jejuni.*

Около 24 часа след постъпването се прибавиха болка и оток по дясна колянна става. Към започнатото лечение с венозни вливания на глюкозо – солеви разтвори и Clarithromycin се добавиха и венозни апликации на метилпреднизолон. Фебрилитетът и диарийният с-м се овладяха до 48 час, а преди изписването на третия ден ставният синдром беше значително редуциран.

Детето се изписа здраво по отношение на чревната инфекция и се насочи към детски ревматолог за консултация и наблюдение.

6. Клинично протичане в зависимост от вида на причинителя

В достъпната ни литература не срещнахме сериозни насочени проучвания върху евентуалните разлики в протичането на инфекцията в зависимост от таксономичния вид на причинителя. Поради това си поставихме за задача да проучим клиничната характеристика на кампилобактериозата предизвикана от *C. jejuni* и *C. coli*.

На 112 от всички 182 болни деца с положителен ИХТ беше взет депониран фецес в стерилен контейнер и изследван културелно и чрез два молекулярно-биологични метода - Multiplex PCR и/или EvaGreen Real-time mPCR. От тях 98 (87,5%) бяха положителни и по двата молекулни метода или само по EvaGreen Real-time mPCR.

Получихме следните резултати от молекулярните методи:

- *C. jejuni* – 73/112 (65,1%)
- *C. coli* – 19/112 (17,0%)
- *Campylobacter* spp. – 6 (5,3%)

Използвахме дисперсионен анализ (ANOVA) за определяне на евентуални статистически значими разлики между групите изследвани лица по четири променливи: брой изхождания за 24 часа, коремни болки, повръщане за 24 часа и фебрилитет при влиянието на фактора „вид кампилобактер“.

Както е видно от данните на таблица 21 a) и b) по отношение на три от променливите: коремни болки, повръщане и фебрилитет не се откриват статистически значими разлики при различните видове кампилобактер. По отношение на симптома „брой изхождания за 24 часа“ открихме статистически значима разлика, а именно – средният брой изхождания

при инфектираните с *C. coli* е почти двойно по-голям от тези с *C. jejuni* (F = 11,327 и Sig.= ,000).

Дескриптивен анализ									
						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
брой изхождания	***C.jejuni***	73	**1,7606**	,68587	,08140	1,5982	1,9229	1,00	3,00
	C. coli	19	**2,4737**	,61178	,14035	2,1788	2,7686	1,00	3,00
	C. spp.	6	2,5714	,78680	,29738	1,8438	3,2991	1,00	3,00
	Total	98	1,9588	,74885	,07603	1,8078	2,1097	1,00	3,00
коремни болки	***C. jejuni***	73	1,7887	1,09434	,12987	1,5297	2,0478	1,00	4,00
	C. coli	19	1,5789	,96124	,22052	1,1156	2,0422	1,00	4,00
	C. spp.	6	1,2857	,48795	,18443	,8344	1,7370	1,00	2,00
	Total	98	1,7113	1,04042	,10564	1,5016	1,9210	1,00	4,00
повръщане	***C. jejuni***	73	1,5493	,78901	,09364	1,3625	1,7361	1,00	4,00
	C. coli	19	1,5789	,96124	,22052	1,1156	2,0422	1,00	4,00
	C. spp.	6	2,8571	1,06904	,40406	1,8684	3,8458	1,00	4,00
	Total	98	1,6495	,90186	,09157	1,4677	1,8313	1,00	4,00
фебрилитет	***C. jejuni***	73	3,4085	,57514	,06826	3,2723	3,5446	2,00	4,00
	C. coli	19	3,3684	,59726	,13702	3,0805	3,6563	2,00	4,00
	C. spp.	6	3,8571	,37796	,14286	3,5076	4,2067	3,00	4,00
	Total	98	3,4330	,57567	,05845	3,3170	3,5490	2,00	4,00

Таб. 21 а)

ANOVA						
		Sum of Squares	**df**	**Mean Square**	**F**	**Sig.**
брой изхождания	Between Groups	**10,454**	2	5,227	**11,327**	**,000**
	Within Groups	**43,381**	94	,461		
	Total	53,835	96			
коремни болки	Between Groups	2,026	2	1,013	,935	,396
	Within Groups	101,891	94	1,084		
	Total	103,918	96			
повръщане	Between Groups	11,016	2	5,508	7,720	,001
	Within Groups	67,066	94	,713		
	Total	78,082	96			
фебрилитет	Between Groups	1,381	2	,691	2,133	,124
	Within Groups	30,433	94	,324		
	Total	31,814	96			

Таб. 21 а). Изследване на влиянието на фактора „вид кампилобактер“ върху: 1) брой изхождания; 2) коремни болки; 3) повръщане; 4) фебрилитет а) дескриптивен анализ и б) ANOVA.

В следствие от този анализ не бихме могли да твърдим, че има сериозни различния в протичането на заболяването в зависимост от конкретния вид на причинителя, но данните за сравнително по-интензивен диариен синдром при *C. coli* – инфекцията биха могли да послужат като основа за по-нататъшни проучвания в тази област. Знанията за интимните патогенетични механизми на кампилобактериозата все още са крайно недостатъчни, но в достъпната ни литература открихме проучвания на *B. Allos* върху доброволци относно средната доза бактериални клетки необходима за развитието на клинично проявена кампилобактериоза. Според него средната доза е около 500 cfu за *C. jejuni* и двойно повече за *C.coli*. Тъй като всички наши пациенти са с клинично проявена инфекция възможно е именно по-високата доза бактериални клетки, респективно токсини, да е в основата на по-голямата честота на изхожданията при заразените с *C.coli*.

III. Етиологично лечение

По отношение на етиологичното лечение на чревната кампилобактериоза в литературата съществуват доста противоречия. Педиатърът Butzler я определя като остра самоограничаваща се инфекция, която обикновено не изисква антибактериално лечение. На същото мнение е и другият изтъкнат клиницист Skirrow. Според тях кампилобактериозата протича като леко или средно-тежко диарийно заболяване и преминава само със симптоматично лечение за по-малко от седмица. Crushell препоръчва започване на антибактериална терапия при болни с хемоколит или продължаваща над 7 дни диария, както и при всички имунокомпрометирани. Екип педиатри от Университета на Вирджиния публикуват данни за съкращаване периода на боледуване и ерадикиране на бактерия от фецес за 5 дни при използване на макролиди. Макар и в консенсуса на българските инфекционисти да се препоръчва антибиотично лечение при кампилобактериозата, у нас различните школи действат по коренно противоположни начини и редица клиники предприемат по-скоро „изчаквателно поведение“. Нашите преки наблюдения, въз основа на които изградихме и хипотезата си е, че хоспитално болните с кампилобактерна инфекция са обикновено в средно-тежко и тежко състояние и етиологичното лечение е наложително още в самото начало на заболяването с оглед скъсяване времето на боледуване и предотвратяване на евентуални извънчревни усложнения.

За нашето проучване разделихме децата диагностицирани лабораторно като позитивни за *Campylobacter* spp. в две групи – такива при които лечението с АБ започна до края на 24 час от постъпването в клиниката 94 (51,9%) и такива при които или не сме прилагали етиологично лечение или то е започнало след 24 час – 88 (48,1%). Втората група

пациенти бяха главно деца при които етиологичната диагноза беше поставена късно. Всички тях условно нарекохме „група без антибиотично лечение“ (таб. 22). Всички лекувани етиологично бяха на терапевтични дози Clarithromycin (2 x 7,5 mg/kg т.м.).

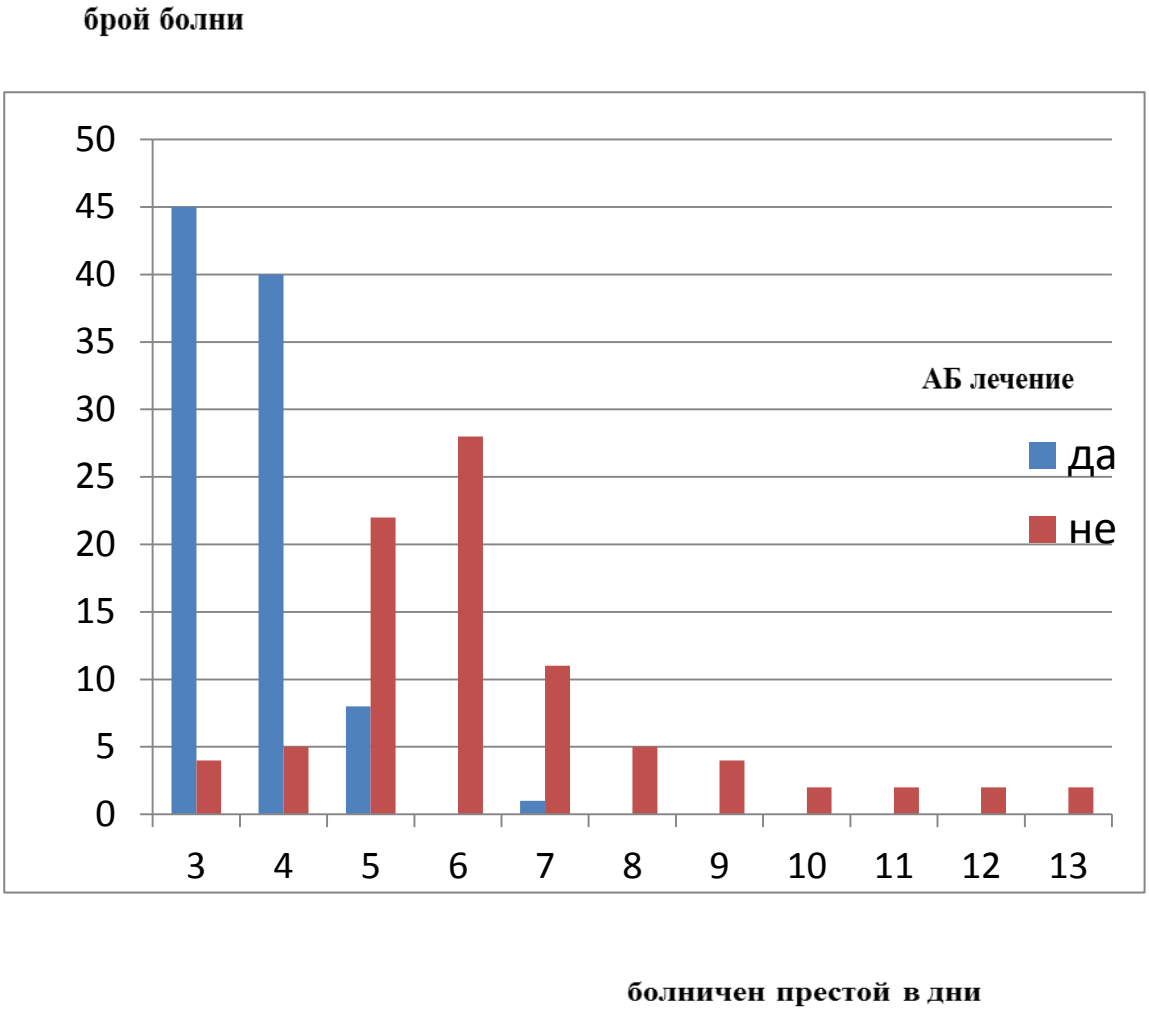
антибиотично лечение				
		брой	процент	Валиден процент
Започнато АБ лечение в първите 24 часа	**да**	94	51,9%	51,9%
	не	88	48,1%	48,1%

Таб. 22. Разпределение на болните в зависимост от антибиотичното лечение (АБ).

Както е видно от таблица 23 и фигура 20, при болните със започнато антибиотично лечение в първите 24 часа от постъпването болничният престой е намален значително – 45 (24,9%) от тях са изписани на трети ден, 40 (22,1%) на четвърти ден и едва 1 (0,6%) на седми ден. В същото време при болните в групата „без антибиотично лечение“ на трети ден са изписани само 4 (2,2%), а мнозинството са изписани на пети – 22 (12,2%) и шести ден – 28 (15,5%). Тоест чрез метода на кростабулациите установхме, че болничният престой се скъсява почти два пъти при ранно започване на етиологично лечение.

лечение към болничен престой												
			болничен престой в дни									
			3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00	11,00	12,00	13,00
АБ	**да**	Count	45	40	8	0	1	0	0	0	0	0	0
		% of Total	24,9%	22,1%	4,4%	0,0%	0,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	не	Count	4	5	22	28	11	5	4	2	2	2	2
		% of Total	2,2%	2,8%	12,2%	15,5%	6,1%	2,8%	2,2%	1,1%	1,1%	1,1%	1,1%

Таб. 23. Болничен престой (в дни) в зависимост от антибиотичното лечение.



Фиг. 20. Болничен престой (в дни) в зависимост от антибиотичното лечение.

Чрез същия метод отчетохме и времето за което се овладява диарийният синдром в зависимост от прилагането или не на етиологично лечение. При пациентите с ранно започнато антибиотично лечение диарийният синдром спира най-често около 2-ри ден след започването му – 54 (52,4%), докато при тези без етиологично лечение само 7 (6,8%) са с овладяна диария по-същото време (таб. 24).

лечение към спиране на диарията						
			спиране на диарията в дни			
			1,00	**2,00**	**3,00**	**4,00**
АБ	**да**	Count	34	54	4	1
		% of Total	33,0%	52,4%	2,9%	1,0%
	не	Count	0	7	4	0
		% of Total	0,0%	6,8%	3,9%	0,0%

Таб. 24. Спиране на диарийният синдром в зависимост от антибиотичното лечение.

И за двете променливи (болничен престой и спиране на диарията) използвахме и дисперсионен анализ (дескриптивен и ANOVA) като резултатите се потвърдиха като статистически значими (F=13,292; Sig = ,000 и F=71,234; Sig=,000). Стойностите са дадени в таб. 25 а) и b).

Дескриптивен анализ									
						95% Confidence Interval for Mean			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
спиране на диарията (дни)	**да**	92	**1,6848**	,59169	,06169	1,5622	1,8073	1,00	4,00
	не	11	**2,3636**	,50452	,15212	2,0247	2,7026	2,00	3,00
болничен престой (дни)	**да**	94	**3,6383**	,73105	,07540	3,4886	3,7880	3,00	7,00
	не	87	**6,6552**	3,38199	,36259	5,9344	7,3760	3,00	28,00

а)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	**F**	**Sig.**
спиране на диарията (дни)	Between Groups	4,528	1	4,528	**13,292**	**,000**
	Within Groups	34,404	101	,341		
	Total	38,932	102			
болничен престой (дни)	Between Groups	411,228	1	411,228	**71,234**	**,000**
	Within Groups	1033,357	179	5,773		
	Total	1444,586	180			

b)

Таб. 25. Дисперсионен анализ (ANOVA). Влияние на антибиотичното лечение върху спиране на диарията и болничният престой.

В унисон с тези данни категорично препоръчваме при съмнение за кампилобактериоза ранно диагностициране с бързи тестове и незабавно започване на подходящо етиологично лечение.

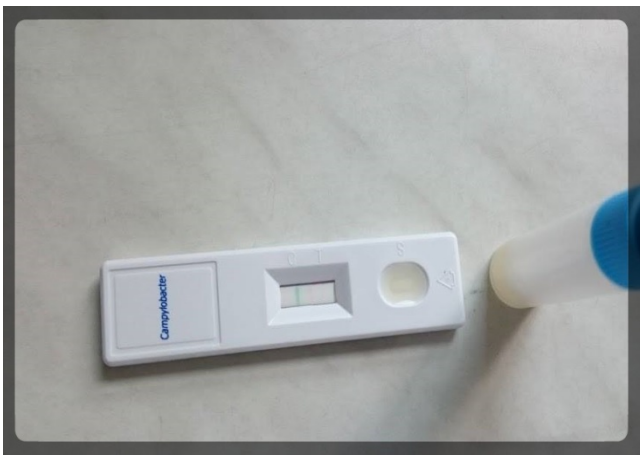
IV. Лабораторна диагностика

1. Идентификация на *Campylobacter* spp. чрез ИХТ

Във връзка с дисертационният труд чрез имунохроматографски метод са изследвани депонирани фецеси от 520 хоспитализирани деца с диариен синдром. При 182 (35%) от тях ИХТ беше позитивен за *Campylobacter* spp. (фиг. 21 a, b).



a)



b)

Фиг. 21. Имунохроматографски тест за кампилобактер а) положителен, б) отрицателен.

Получените резултати показаха сравнително висока честота на кампилобактериозата сред хоспитализираните деца с ентероколити. Почти ¼ от изследваните от нас болни бяха позитивни за чревната инфекция.

За контролна група използвахме 40 фецеса от деца с доказани други етиологични агенти – *Salmonella* spp. (*S. enteritidis*, *S. agona*) *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Rotavirus*, *Blastocystis hominis*. Щамовете бяха получени от Национална микробиологична колекция- България, клинични изолати на *S.enteritidis*, включително замразени от нас

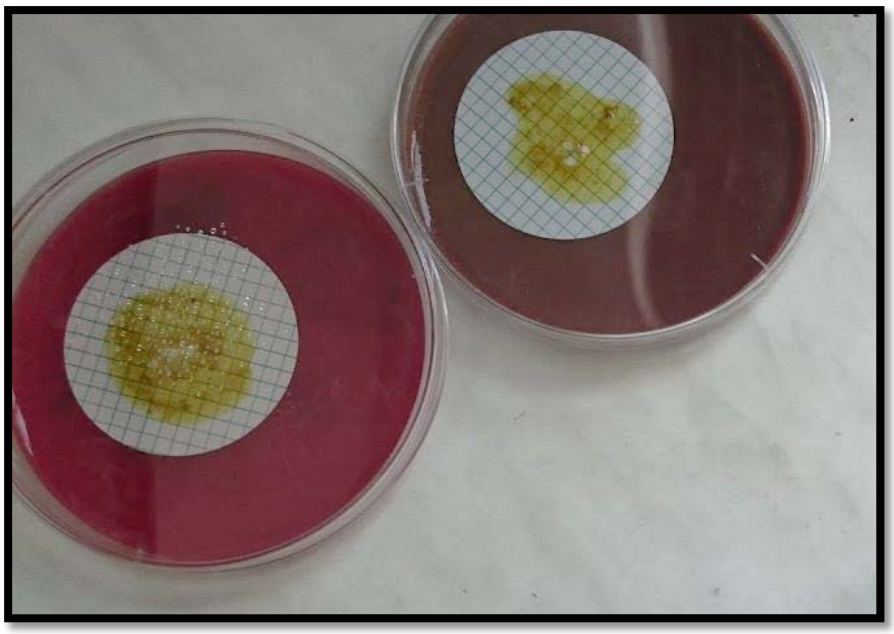
щамове. Клиничните щамове на *Salmonella* spp. бяха идентифицирани и групирани чрез ресничестите си антигени по схемата на Кауфман –Уайт с използване на слайд аглутинация на стайна температура (фиг. 22). От контролната група само един тест на болен от салмонелоза с причинител *S. enteritidis* се позитивира. След верификация с Eva Green Real-time PCR се установи, че ИХТ е дал фалшиво позитивен резултат. В случая не бяхме изненадани тъй като срещнахме няколко литературни източника според които фалшивоположителните резултати при ИХТ, макар и редки, са възможни именно при инфекция със *Salmonella* spp. (*Wadl M., et al., 2009*).



Фиг. 22. Слайд-аглутинация на клиничен щам *S. enteritidis* с положителен резултат в дясно.

2.. Изолиране на *C. jejuni* и *C. coli* от проби фецес

Посявките на фецесите се извършиха на обикновен кръвен агар с 10% дефибринирана овнешка кръв по мембранен способ с нитроцелулозни мембрани с размер на порите 0,45 μm. Посевките се култивираха в микроаерофилна атмосфера (5%O2+10%CO2+ 85%N2), генерирана от газ-пак в анаробен джар при 42 – 43° С за 24 – 72 часа (фиг. 23).



Фиг. 23. Посявки на течни проби фецес на обикновен кръвен агар с 10% дефибринирана овнешка кръв по мембранен способ с нитроцелулозни мембрани.

Повечето от културелно изолираните *Campylobacter spp*. са 48-часови култури. Всички щамове изолирани с мембраните бяха в чист вид. От тези резултати следва, че чрез мембранно-филтрационната техника е възможно изолирането на *Campylobacter spp.* в чиста култура.

3. Идентификация на *Campylobacter spp.*

- Идентификация на твърда хранителна среда

На обикновен кръвен агар с 10 % овнешка кръв кампилобактерните колонии са леко розови, кръгли, изпъкнали, гладки и лъскава, с правилен ръб (фиг. 24).

На въглен-базирани медии като Karmali Campylobacter Agar, характерните колонии са сивкави, плоски и навлажнени, с тенденция да пълзят, като може да имат метален блясък (фиг. 25).



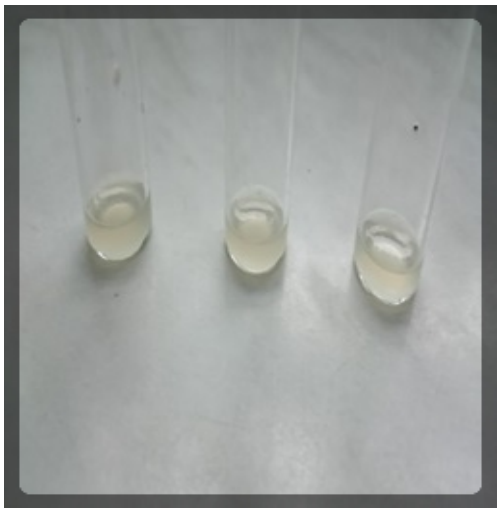
Фиг. 24. Култура *C. jejuni* на обикновен кръвен агар.



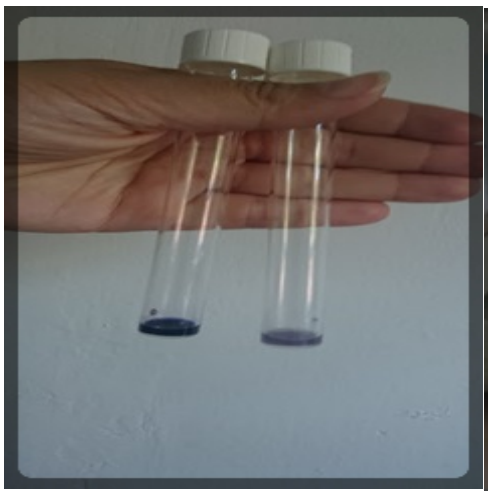
Фиг. 25. Култура *C. jejuni* на селективна среда Karmali Campylobacter Agar.

- **Фенотипна идентификация на термофилни *Campylobacter spp.***

От всички 520 клинични щама фецес положителни за *Campylobacter* spp. по ИХМ бяха 182. От тях 112 (61,53%) бяха изпратени за фенотипна идентификация на базата на биохимични тестове по методиката оказана в раздел материали и методи точка 5 b. Тук бяха използвани още 6 животински щама предоставени от НЦВМИ и 6 щама от колекцията на НЦЗПБ. Щамовете с растеж бяха 54, всички каталаза и оксидаза позитивни. От резултатите на извършените тестове за хидролиза на натриев хипурат и индоксил ацетат 35 (35/54) щама показаха положителна реакция за хидролиза на натриев хипурат и 11 (11/ 54) щама показаха положителена хидролиза на индоксил ацетат, докато при 8 (8/ 54) щама двата теста бяха отрицателени (фиг. 26 и 27).



а.



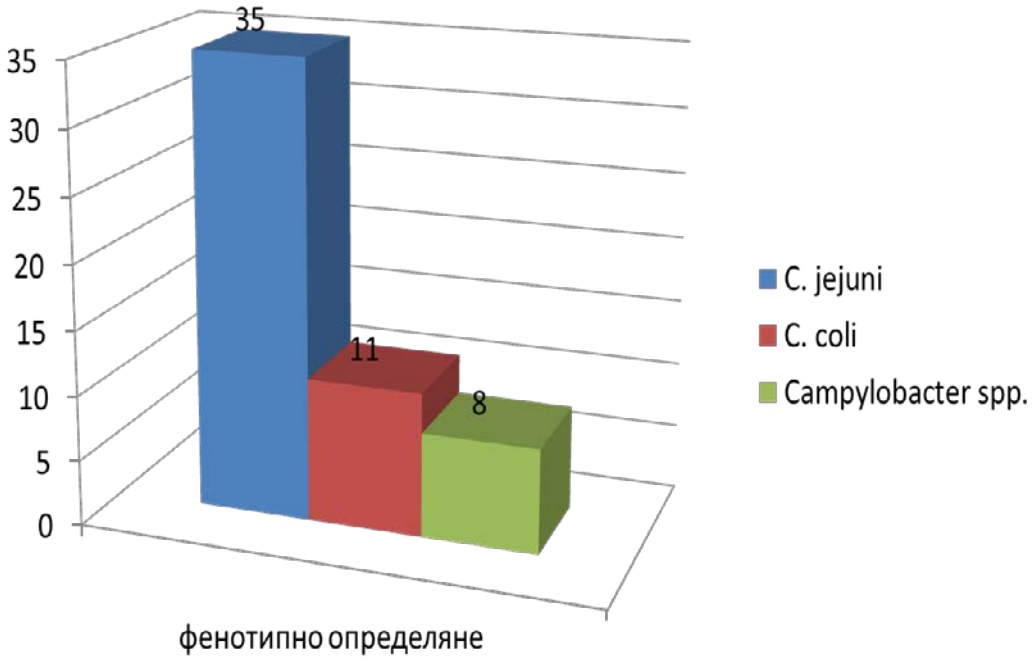


b. **c.**

Фиг. 26. Тест за хидролиза на натриев хипурат. а) След двучасово инкубиране на 37˚C пробите са накапани с нинхидрин. b) Положителен тест за хидролиза на натриев хипурат. c) Отрицателен тест за Хидролиза на натриев хипурат.



Фиг. 27. Положителен тест за хидролиза на индуксил ацетат. Наблюдава се промяна на цвета в синьо.



Фиг. 28 . Резултати от фенотипно определяне на изолати *Campylobacter* spp.

Тоест от всички 124 проби 54 (43%) бяха с растеж, като от тях 35 (64,8%) се определиха като *C. jejuni*, 11 (20,3 %) *C. coli* и 8 (14,8%) не се диференцираха до вид – *Campylobacter* spp. (фиг.28). Интерес предизвиква високият процент на изолируемост на изолати *Campylobacter* spp. Обикновено за Европа, по литературни данни, този процент не надвишава 10% (*Wardak S., et al.,2009*). Има известна вероятност това да се дължи на факта, че в случая се работи само с позитивни чрез ИХТ фецеси, но при всички положения заслужава по-нататъшно обсъждане.

7. Изолиране на бактериална ДНК за PCR-базирани анализи

Традиционно проби директно от изпражненията се считат за проблемни поради PCR инхибиране от хемоглобин, билирубин и други биологични замърсители. Протоколът за изолиране на ДНК от проба фецес, оптимизиран от нас, демонстира висока ефективност за екстракция и премахване на известни инхибитори.

Ние оптимизирахме метод за изолиране на бактериална ДНК директно от средата със запазеният щам, тъй като някои от съхранените кампилобактерни щамове в SkiMilk при - 20˚ C, не растяха след реанимирането им. По този начин успяхме генетично да потвърдим всички замразени щамове *Campylobacter* spp. от колекцията на НЦЗПБ, и част от изпратените от СБАЛИПБ. От свежи култури с лизиращ ензим PrepMan бяха изолирани 93 проби ДНК.

По протокола, оптимизиран в лаборатория „Антибиотична резистентност“ на НЦЗПБ (ръководител Доц. Ив. Иванов) за изолиране на бактериална ДНК от проба фецес е изолирана ДНК от всички фекални проби. Процесът на изолация отнема около 1,5 часа. Концентрираната ДНК беше спектрофотометрично измерена с GeneQuant pro (GE Health Care, USA) при $\lambda = 260$ nm. Изолираните ДНК се съхраняват на - 20˚ C.

8. Молекулярно-биологични методи за идентификация и диференциация на *C. jejuni / coli*

В лабораторната част на този труд в отдел „Микробиология“ на НЦЗПБ бяха разработени, оптимизирани и внедрени два PCR-базирани метода - **Multiplex PCR** анализ за идентификация и диференциация на *C. jejuni /*

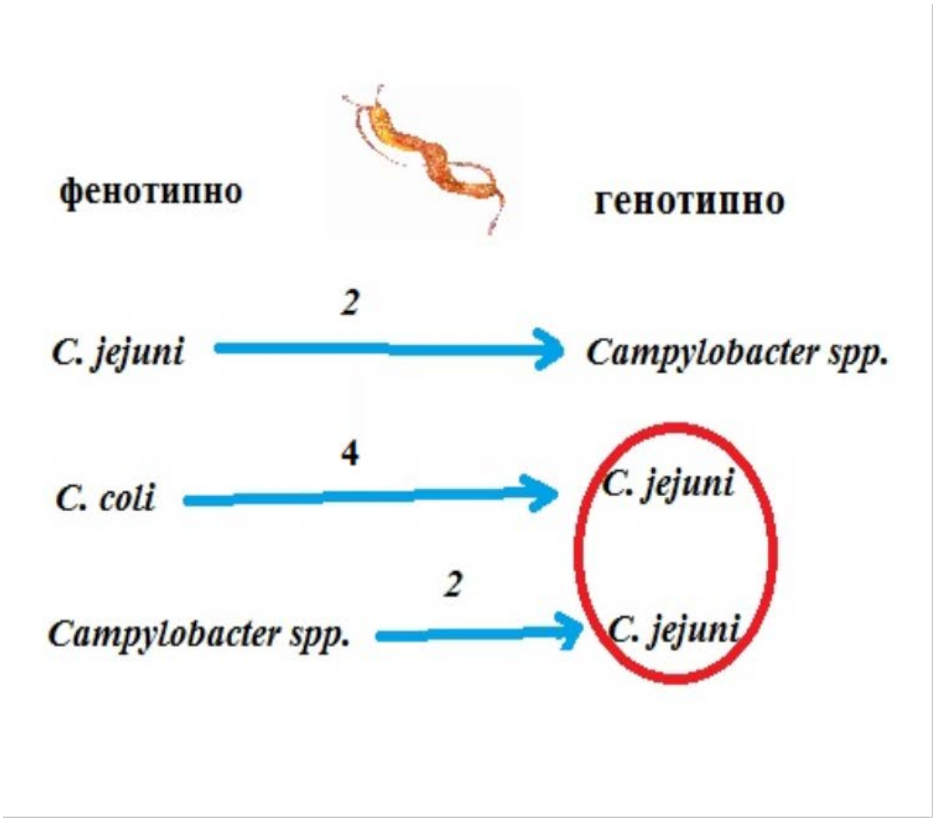
coli от култура и **EvaGreen Real-time mPCR** анализ за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно от проба фецес.

- **Multiplex PCR анализ за идентификация и диференциация на *C. jejuni / coli* от култура**

От видовете *Campylobacter* - *C. jejuni* и *C. coli* са със специален клиничен интерес. *C. jejuni* е най-често изолираният бактериален ентеропатоген от проби фецес на пациенти с остра диария, а *C. coli* е вторият най-разпространен сред *Campylobacter* spp., изолиран от пациенти с бактериални чревни инфекции. Разпределянето на тези видове в България е неизвестено, тъй като идентификация на изолатите обикновено не се практикува в микробиологичните лаборатории, а молекулярни методи с тази насоченост липсват. Multiplex PCR анализът беше разработен, оптимизиран и приложен за идентификация на клинични изолати *C. jejuni / coli*. Идентификацията на изолатите се осъществява чрез амплификация на консервативни гени: cadF ген (16S рДНК), характерен за всички *Campylobacter* spp, hipO ген за *C. jejuni* и asp ген за *C.coli*. Всички PCR продукти от анализа беха разделяни на капилярна гел-електрофореза или стандартна агрозна електрофореза.

Чрез първият метод на базата на мултиплексна конвенционална PCR реакция потвърдихме идентификацията на 87 проби позитивни за кампилобактер чрез ИХТ, като от тях 65 (74,8%) се определиха като *C. jejuni*, 14 (16,1%) *C. coli* и 6 (6,8%) не се диференцираха до вид – *Campylobacter* spp. Интерес предизвиква идентифицията на една проба от смесен тип *C. coli / jejuni.*

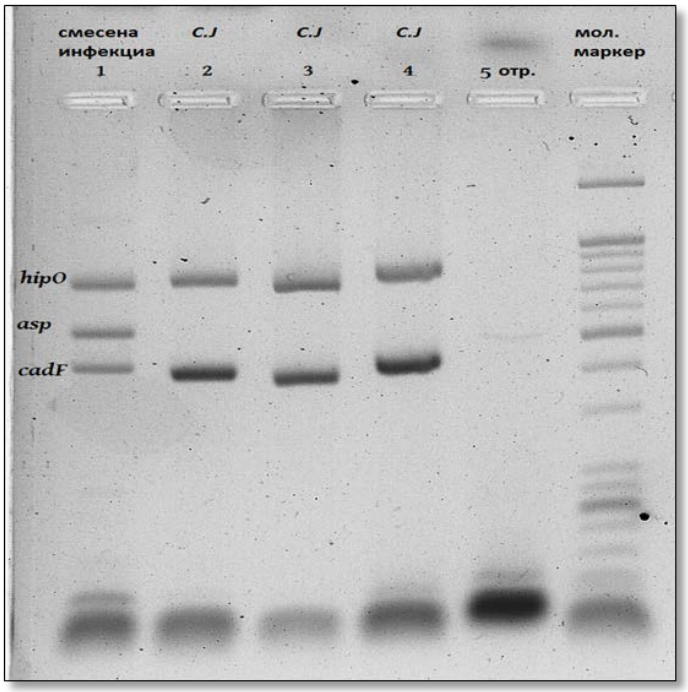
Резултатите от молекулярно-биологичната диференциация на *C. coli* и *C. jejuni* се различават с тези от биохимичното определяне при 8 от клиничните изолата (фиг. 29).



Фиг. 29. Разлики между фенотипното и молекулярно-биологичното определяне при 7 клинични щама.

Генетично потвърдени като отрицателни за *Campylobacter* spp. бяха 2 щама *C. jejuni*. Два от изолатите, биохимично определени като *C. coli*, въз основа на положителни тестове за индоксил ацетат и отрицателни тестове за хидролиза на натриев хипурат и два изолата определени като *Campylobacter spp.*, които са показали отрицателни тестове за натриев хипурат и индоксил ацетат, генетично бяха потвърдени като *C. jejuni*, с амплификация на *cadF* и *hipO* гените. Както беше споменато по-горе, генът хипуриказа е възможно да не се експресира и реакцията хидролиза на натриев хипурат да е фалшиво орицателна фенотипната диференциация да е неточна.

Интерес правят получените генетични резултати за щам, който е фенотипно определен като *C. jejuni*, но резултатите от агарозната гел-електрофореза потвърдиха амплификация на трите гена- родов (*cadF*) и двата видови (*hipO* и *asp*), представени на фигура 30. Тези резултати биха могли да се интерпретират като смесена кампилобактерна инфекция от *C. jejuni* и *C. coli*, но и като замърсяване на ниво култура.



Фиг. 30. Резултати от агарозна гел-електрофореза след Multiplex PCR анализ на щамове *Campylobacter spp.* На старт 1 се наблюдават амплифицирани родов и два видови гена, които са резултат за смесена инфекция. На стартовете 2, 3 и 4 - *C. jejuni,* старт 5- отрицателна проба за *Campylobacter spp.*

След оптимизация разработеният метод Multiplex PCR за идентификация и диференциация на *C. coli / jejuni* от култура беше тестван по отношение на аналитичната си специфичност и чувствителност. Специфичността на праймерите при оптимизираните условия бе определена спрямо всички налични щамове *C.coli / jejuni*., както и от набор ДНК на хетероложни микроорганизми, които са сред най-често изолираните причинители на ентероколити. Наблюдавахме амплификация на гените *cadF, asp* и *hipO* само при кампилобактерните щамове.

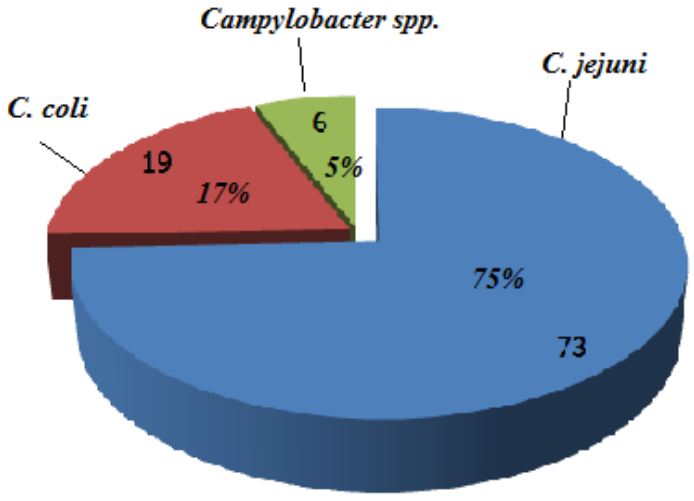
От изложените данни става ясно, че молекулярно-биологичното диференциране на *C. jejuni / coli* е по-надеждно от фенотипното. Препочъчваме Multiplex PCR като високочувствителен и специфичен потвърдителен метод за изолати *Campylobacter* spp. и едновременно успешно диференциращ *C. jejuni* и *C. coli*. Неговите недостатъци са в това, че изисква предварително култивиране на кампилобактерните микроорганизми и визуализиране чрез гел-електрофореза.

• Eva Green Real-time mPCR анализ за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно в проба фецес

Откриването и идентифицията на *Campylobacter* spp. продължава да бъде проблем в рутинната дейност на микробиологичните лаборатории. Взискателният характер на кампилобактерните клетки, както и липсата на практически умения за видовото определяне на бактерия затруднява

откриването им в проби фецес. Невъзможността за точно и бързо откриване и идентифициране на тези микроорганизми затруднява диагностицирането на кампилобактериозите и изкривява съобщаваните епидемиологични данни. В тази връзка използвайки клиничните щамове положителни по имунохроматографският метод апробирахме молекулярно-диагностичен алгоритъм за откриване и диференциране на най-често изолираните кампилобактерни видове - *C. jejuni* и *C. coli* директно в проба фецес чрез Eva Green Real-time PCR анализ.

В рамките на дисертационния труд чрез разработения от нас метод EvaGreen Real-time mPCR бяха изследвани 112 от пробите фецес от хоспитализирани пациенти с остра диария в СБАЛИПБ. От тях потвърдихме идентификацията на 98 клинични изолата, от които 73 (73/98) *C. jejuni*, 19 (19/98) *C. coli* и 6 (6/98) *Campylobacter spp*. (фиг. 31). Всяка една от пробите е изследвана и културелно за потвърждаване резултатите на молекулярно диагностичния метод.

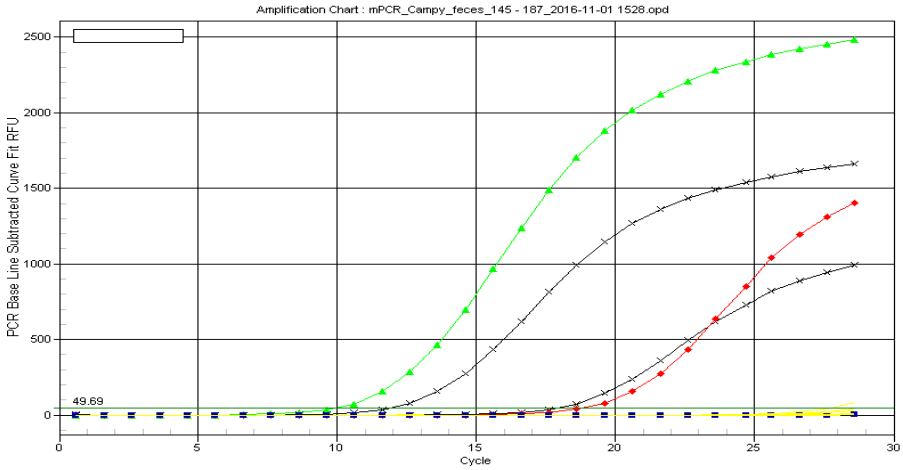


Фиг. 31. Резултати от Eva Green Real-time mPCR за 112 проби на хоспитализирани болни с диариен синдром в СБАЛИПБ.

Освен всички клинични проби фецес надеждността на метода на Eva Green Real-time PCR анализа бе изпитана и с 18 референтни щама, 9 от които *C. coli* и 9 щама *C. jejuni*, изпратени от Instant Institute, Дания и микробиологична лаборатория на НДНИВМИ.

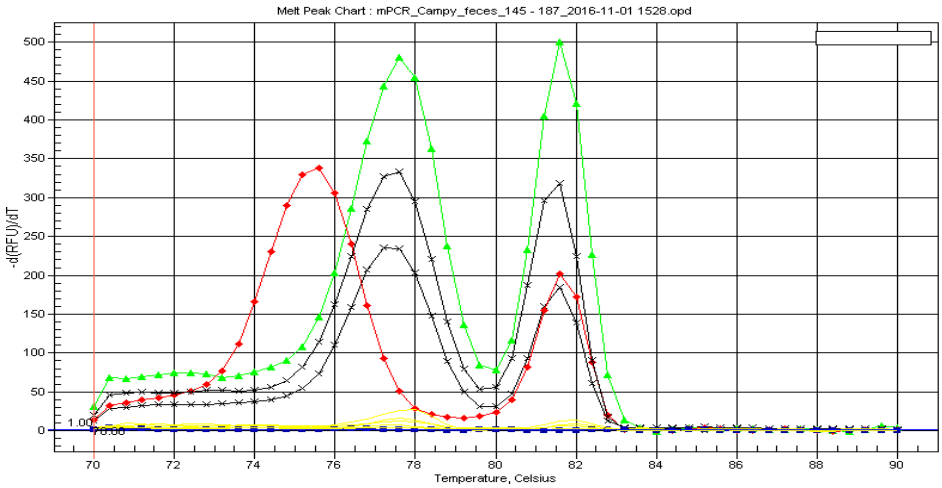
Интерес представлява сравнително по-високата честота на *C. coli* (17%) сред нашите болни, в сравнение със средната стойност изолирана в ЕС (около 10%). Тези данни обаче са в съзвучие с даваните от българските автори данни за превалиране на заразеността от *C. coli* в бройлерите и бройлерните стада у нас (*Гюров и съавт., 2011*).

Впечатление правят получените полжителни резултати от молекулярно биологичния метод на 12 проби фецес, от които за 11 (11/ 12) *C. jejuni* и 1 (1/12) *C. coli* от култура не бе изолирано успешно нищо (фиг. 32 и 332). Това явление може да се обясни с недостатъчно количество проба за изолиране на патогена, или стара, на повече от 5 часа проба, в която кампилобактерните клетки, поради чувствителността си към кислород, вече са загинали. Друга причина за липсата на кампилобактерна култура може да липсват нужните за растеж микроаерофилни условия. Според достъпните ни литературни данни, някои от видовете са чувствителни и на антибиотици от селективната среда за изолиране, могат да се подтиснат и да липсва растеж. Но именно поради тази причина не сме използвали селективни медии за първична изолация. Тук е мястото да изтъкнем, че при 17 от изследваните проби липсва изолат, защото тези фецеси са съхранявани при -20˚ С, след което е невъзможно култивирането им, но за Eva Green Real-time mPCR анализа това не е проблем и диагностиката е напълно възможна. От изследваните замразени проби фецес 9 (9/ 17) са генетично определени като *C. jejuni* и 8 (8/17) са отрицателни за *Campylobacter* spp.



Фиг. 32. Амплификация на гените, характеризиращи *C. jejuni - AB*, *C. coli - ceuE* за и *Campylobacter spp - campF2/R2*.

- Позитивна контрола *C. jejuni;*
- Позитивна контрола *C. coli;*
- Отрицателна контрола ddH_2O;
- Положителни проби за C. jejuni;
- Отрицателни проби за *Campylobacter spp.*

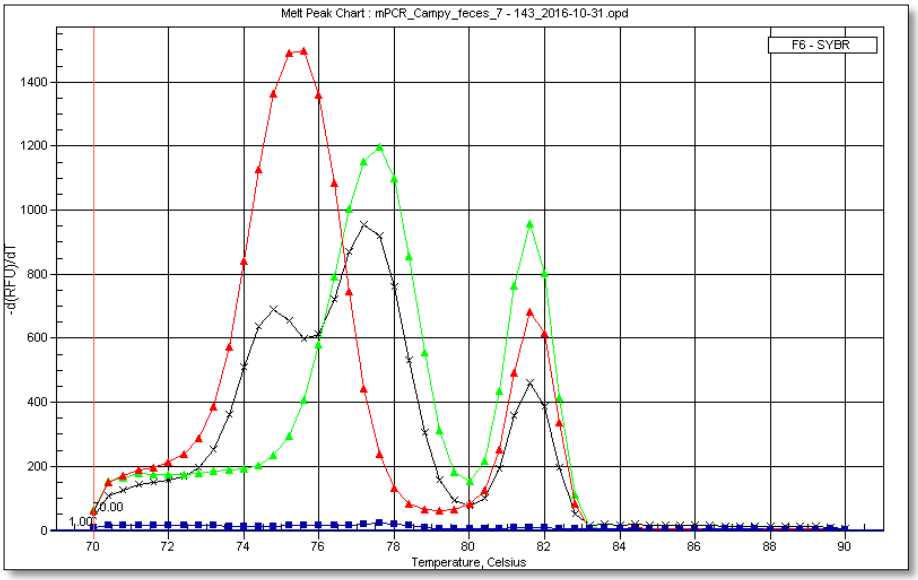


Фиг. 33. Резултати от Real-time mPCR за откриване на *Campylobacter* в проби фецес. Наблюдават се положителни проби за *C. jejuni*, както и отрицателни проби за *Campylobacter spp.:*

- Позитивна контрола *C. jejuni;*
- Позитивна контрола *C. coli;*
- Отрицателна контрола ddH_2O;
- Положителни проби за C. jejuni;
- Отрицателни проби за *Campylobacter spp.*

Чрез предложеният от нас метод успешно доказахме кампилобактер в замразени фецеси, в проби на повече от 12 часа, в минимално количество проби (~ 100 µl), от т. нар. анален смив (фецес взет чрез тампон), което прави метода особено удачен за нуждите на микробиологичните лаборатории.

Интерес предизвикват резултатите от анализа на споменатата вече клинична проба фецес при която молекулярно-биологично се доказва инфекция от смесен тип - *C. jejuni* и *C.coli.* Доказването на такъв тип инфекция е предизвикателство за класическата PCR- методика, докато за Eva Green real-time mPCR анализа не се явява диагностичен проблем (фиг. 34).



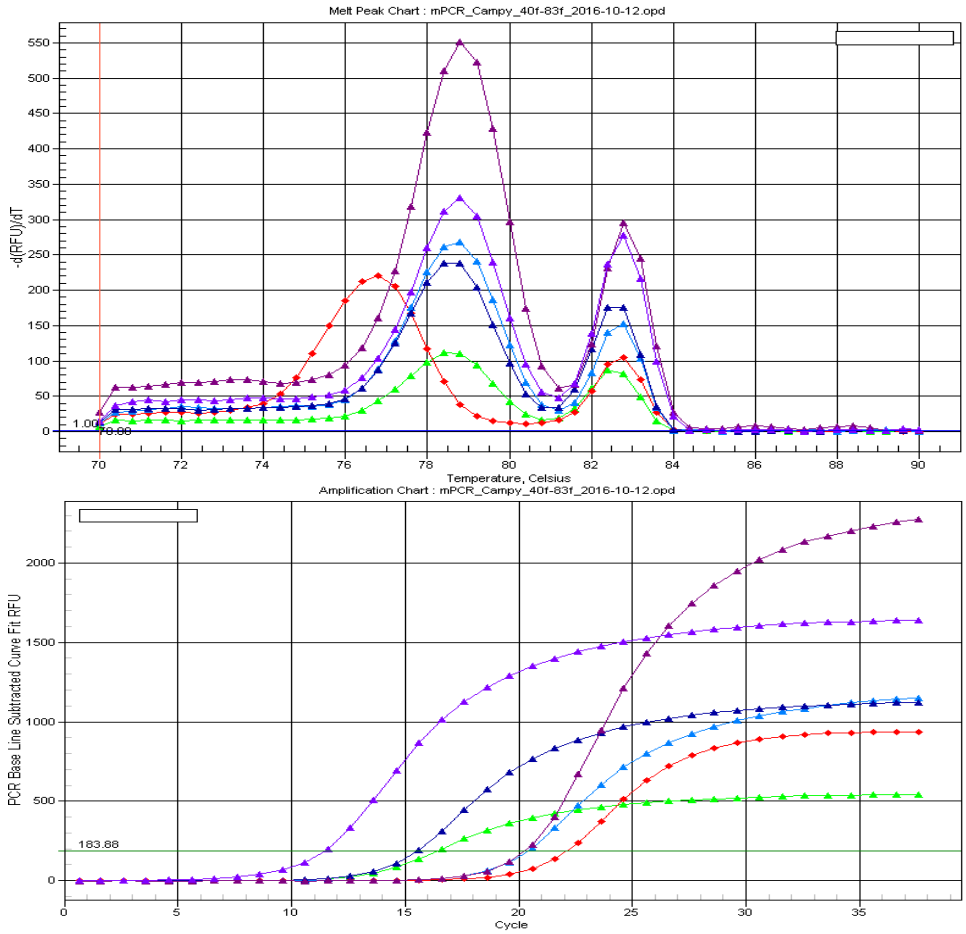
Фиг. 34. Анализ на резултати от Real-time mPCR анализ. Наблюдава се едновременна амплификация на гените за двата вида - *C. jejuni* и *C.coli* в една клинична проба фецес.

Резултатите от настоящото изследване показват, че с бъдещото утвърждаване на предложеният от нас метод, успешно може да се откриват и едновременно разграничават най-честите причинители на кампилобактериози – *C. jejuni* и *C.coli* директно в проба фецес, както и тези от смесен тип.

Изхождайки от клиничното значение и широкото разпространение на *C. jejuni* и *C. coli,* препоръчваме търсенето им във всички материали на болни с диариен синдром, чрез имунохроматографски метод наред с изследването за други патогенни чревни бактерии. При диагностични затруднения, както и за нуждите на епидемиологията, препоръчваме категорично използването на Eva Green real-time mPCR анализа пред конвенционалните PCR – методи.

- **Определяне на диагностична чувствителност и специфичност на метода**

Eva green Real-time PCR анализът е разработен за откриване на *C. jejuni* и *C. coli* директно във фекални проби, от пациенти с диариен синдром. След оптимизация на разработения метод беше доказано, че този тест има 100% чувствителност и 100% специфичност, приложен на 17 културелно позитивни за кампилобактер проби фецес и 14 културно отрицателени за каямпилобактер фекални проби. Извършено беще и второ проучване с проби фецес на доказано болни с чревни инфекции, причинени от *C. difficile*, *S. enteritidis, E. coli* O6, *H. pylori,* Rotavirus Кръстосани реакции не бяха наблюдавани. Диагностичната специфичност и чувствителност в тези случаи е 100 % (фиг. 35).



Фиг. 35. Резултати от аналитичен Real-time PCR за определяне на специфичност на метода. Наблюдава се амплификация само при положителните контроли:

- Позитивна контрола *C. jejuni;* Позитивна контрола *C. coli;*
- Положителна проба фецес (лаб.№ 173) за *C. jejuni;*
- Положителна проба култура (лаб.№ 173) за *C. jejuni;*
- Положителна проба фецес (лаб.№ 69) за *C. jejuni;*
- Положителна проба култура (лаб.№ 69) за *C. jejuni;*

9. Сравняване на диагностичната стойност при ИХТ и Eva Green Real-time PCR метода

За сравнение на средни стойности между променливите ИХТ и Eva green Real-time PCR използвахме статистическят метод Т – тест.

Както е видно от таблица 36 а) и b) има статистически значима разлика между двете променливи, тоест между двата диагностични теста при Sig.< 0,05 и t > 3. Използвайки калкулатора* за стойността на Cohen's *d* (отразяваща големината на разликата между две променливи) изчислихме **Cohen's *d* = 0.346,** което всъщност говори, че разликата между дагностичните възможности на ИХТ и Eva Green Real-time PCR метода PCR е много малка.

*Калкулатор за Cohen's**:** http://www.cognitiveflexibility.org/effectsize/

Статистика за двойка променливи					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
променлива	**ИХТ**	,1	112	,09949	,00893
	PCR	,8661	112	,34211	,03233

а)

Корелации за двойка променливи				
		N	Correlation	Sig.
променлива	**ИХТ & PCR**	112	-,037	,696

Изпитване за двойка променливи									
		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		**t**	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
променлива	**ИХТ - PCR**	,12500	,35830	,03386	,05791	,19209	**3,692**	111	,000

b)

Таб. 36. Сравнение на стойностите на променливите ИХТ и Eva green Real-time PCR чрез Т-тест.

В този смисъл получените от нас данни са в корелация с твърденията на други автори (*T. Regnath, K. Kawatsu*), според които диагностичните възможности на съвременните ИХТ са значителни и работата с тях чувствително може да облекчи дейността на клиницист при необходимостта от вземане на бързи решения за терапевтичното поведение.

Преимуществата на Eva Green Real-time mPCR метода пред методите нуждаещи се от култивиране:

1. Методът има висока чувствителност и специфичност.
2. Сравнително лесно се определят причинителите на инфекцията – *Campylobacter spp*., за които методите на култивиране са трудни за изпълнение и отнемат минимум 2 дни.
3. Възможна е едновременна диагностика и видово определяне на *C. coli/ jejuni* с еднократно изследване в една проба, при което отпада необходимостта от специфични хранителни среди за изолиране на клетъчни култури.
4. Анализът се извършва в минимално количество проба.

Преимуществата на имунохроматографският метод пред Eva Green Real-time mPCR:

1. Лесно изпълнение и лесна интерпретация без необходимост от обучен персонал.
2. Изпълнение веднага, „при леглото на болния“, с резултат до 10-та минута.
3. Липса на необходимост от скъпи реактиви и апаратура.

ИЗВОДИ

1. Кампилобактериозата е широко разпространено заболяване сред хоспитализираните деца с диариен синдром.
2. Най-засегнати са децата до 5 г. възраст.
3. Клиничното протичане на инфекцията е по-тежко в по-малките възрастови групи.
4. Най-характерните симптоми за заболяването са хемоколит, фебрилитет, коремни болки и повръщане и това го прави клинично неразличимо от останалите инвазивни чревни инфекции.
5. В българската популация горно-диспептичният синдром се среща с по-голяма честота.
6. Не открихме категорични доказателства за разлики в клиничното протичане при инфектирани с *C. jejuni* и *C. coli*.
7. Установихме, че при ранно започване на антибактериално лечение болничният престой и диарийният синдром се скъсяват почти двукратно.

8. Фенотипната характеристика на изолираните в България щамове *C. jejuni* и *C. coli* е типична за род *Campylobacter*, но честотата на *C. coli* у нас е сравнително по-висока от средната в ЕС.
9. Оптимизираният и валидиран EvaGreen Real-time PCR метод за едновременно откриване и диференциране на *C. jejuni* и *C. coli* директно от проба фецес е с висока чувствителност (100%) и специфичност (100%).
10. ИХТ сравнени с оптимизираният от нас Eva Green Real-time PCR имат добри диагностични възможности и е препоръчително масовото им прилагане в ежедневната практика при болни с диариен синдром.

ПРИНОСИ

Научни приноси с теоретичен характер

1. Доказахме висока честота на инфекцията с *Campylobacter* при хоспитализирани деца с диариен синдром у нас.
2. Описахме детайлно протичането на кампилобактериозата при хоспитализирани деца в България.
3. Документирахме два случая на кампилобактериоза с извънчревни усложнения.
4. Установихме, че фенотипната характеристика на изолираните в България клинични щамове *C. jejuni* и *C. coli* не се различава съществено от тези в чужбина.
5. Описахме сравнително по-висока честота на инфекцията с *C. coli* сравнена с тази в ЕС.

Научни приноси с приложен характер

1. Установихме необходимостта от ранно започване на антибактериално лечение при болните с кампилобактериоза.
2. Установихме , че фенотипният метод е недостатъчно надежден за видова диференциация на *C. jejuni /coli* .
3. Оптимизирахме за България Eva Green Real-time mPCR метод за едновременно откриване и диференциране на *C. jejuni* и *C. coli* директно от проба фецес отличаващ се с висока чувствителност (100%) и специфичност (100%).
4. Сравнихме диагностичната стойност на ИХТ и Eva Green Real-time mPCR при клинични щамове и установихме добри предпоставки за масово навлизане на имунохроматографската диагностика на кампилобактериозата у нас.

Книгопис:

1. Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2011.

2. EFSA Journal 2015;13(12):4329,191 pp.

3. EFSA Journal 2013;11(4):3129, 250 pp.

4. EFSA. 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA J 9:2105.

5. EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2011; EFSA Journal 2013;11: 3129.

6. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2014. Reporting on 2012 surveillance data and 2013 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2015.

7. Eurosurveillance editorial team. European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. Euro Surveill. 2014; 19(12):20748.

8. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.

9. WHO/FAO. The Global View of Campylobacteriosis. Utrecht, Netherlands, 2012,1:69.

10. WHO/FAO. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens. Microbiological Risk Assessment Series No. 11; 2012.

11. Боянова, Л., Спасова, З., Янева, П. и съавт. *Campylobacter* инфекция при остър ентероколит и обостряне на хронични чревни заболявания. Съвр. мед. 2004; LV (No 2): 18-24.

12. Боянова, Л., М. Марина, Т.Цаловска, Ю. Стефанова. Изолиране на *Campylobacter jejuni* от болни с ентероколитен синдром, ЕМИ, 1987, 4, 16 - 19.

13. Гюров Б., Даскалов Х., Найденов В., и съавт. Разпространение на Campylobacter spp. в бройлерни стада и бройлери. Сборник доклади и постери „Юбилейна научна сесия 110 години НДНИВМИ“, 2011, 74-80.

14. Ковальова, В., Диков, И., Плочев К. и съавт. Нашият опит с инфекцията, причинена от *Campylobacter*. Мединфо, 2010, 10, 1-3.

15. Марина, М. Изолиране на *Campylobacter jejuni* от дете с остър ентероколит. ЕМИ, 1985, 2, 62 - 67.

16. Павлова П. Молекулярни методи за идентификация на ентеропатогенни бактерии. Медицински преглед, 2016, 52, 17-23.

17. Павлова, М., Е. Добрева, К. Иванова, Г. Асева, Ив. Н. Иванов, П. Петров, Т. Кантарджиев. Multiplex PCR метод за идентификация и диференциране на клинични изолати *Campylobacter jejuni* и *C. coli*. Наука и младост, МУ- Пловдив, 2015, 125- 129.

18. Павлова, М. Молекулярни методи за идентификация и типизиране на *Campylobacter jejuni/coli*. Дис. труд за ОНС „доктор“, София, 2017.

19. Железова, Г., Боянова, Л. Взаимодействие на *Campylobacter jejuni* с човешки полиморфонуклеарни клетки. Науката за хранене в опазване на човешкото здраве. Издание на Българското научно дружество по хранене и диететика. П.Р. Божидар Попов, София, ИК “Бленда”, 2004,83-86.

20. Adedeji A., Subudhi C., Gokal R. et al. *Campylobacter jejuni* bacteremia, peritonitis, and exacerbation of chronic pancreatitis in a patient on CAPD: case report and literature review. Perit Dial Int. 2000, 20(6):794-6.

21. Al Amri Abiola A., Senok C., Abdulrahman Y. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. – J Med Microbio, 2007, 10, 1350-1355.

22. Alexandrescu M., Coman G., Ene L. et al. Human infection with *Campylobacter jejuni/coli*. Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol. 1984;29:245-57.

23. Alther T., Bereswill S., Glunder G. et al. Campylobacteriosis of man: livestock as reservoir for *Campylobacter* species. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2011, 54, 728-34.

24. Alfredson D., Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. FEMS Microbiol Lett. 2007 (2):123-32.

25. Allos, B. Microbiology, pathogenesis, and epidemiology of *Campylobacter* infection. www.uptodate.com. Public Health Agency of Canada, 2011.

26. Annamalai T., Pina-Mimbela R., Kumar A. et al. Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of Campylobacter jejuni colonization in chickens. Poult Sci. 2013, 92:2201–2211.

27. Atkinson W., Wolfe S., Hamborsky J., et al. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 12th ed., second printing. Washington DC: Public Health Foundation, 2012.

28. Apostolopoulos P., Vafiadis-Zouboulis E., Delladetsima I. et al. Henoch-Schönlein purpura associated with *Campylobacter* enterocolitis. J Clin Gastroenterol. 1999; (4):346-7.

29. Batz M., Hoffmann S., Morris J. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. J Food Prot. 2012.75:1278–1291.

30. Barrero-Tobon A., Hendrixson D. Identification and analysis of flagellar coexpressed determinants (Feds) of *Campylobacter jejuni* involved in colonization. Mol Microbiol. 2012; 84(2):352-69.

31. Bachtiar B., Coloe P., Fry B. Knockout mutagenesis of the kpsE gene of Campylobacter jejuni 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007; 49, 149-54.

32. Batchelor, R., Pearson, B., Friis, L. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology.* 2004, 150, 3507–3517.

33. Bell J., Manning D. Evaluation of *Campylobacter jejuni* colonization of the domestic ferret intestine as a model of proliferative colitis. Am J Vet Res. 1991;52(6):826-32.

34. Beery J., Hugdahl M., Doyle M. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 1988; 54(10): 2365–2370.

35. Bokkenheuser V., *Vibrio fetus* infection in man. I. Ten new cases and some epidemiologic observations. Am J Epidemiol, 1970, 91**,** 400-9.

36. Boyanova L., Gergova G., Spassova Z., et al. *Campylobacter* infection in 682 bulgarian patients with acute enterocolitis, inflammatory bowel disease, and other chronic intestinal diseases. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2004, 49: 71-74

37. Boschi-Pinto C., Velebit L., Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. Bulletin of the World Health Organization, 2008, 86: 657-736.

38. Botteldoorn N., Van Coillie E., Piessens V. et. al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. J Appl Microbiol. 2008; 105(6):1909-18.

39. Bopp, C., Birkness, K., Wachsmuth, I. et al. In vitro antimicrobial susceptibility, plasmid analysis, and serotyping of epidemic-associated *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology 1985, 21, 4–7.

40. Brandt K., Antunes M., Gisélia A. Acute diarrhea: evidence-based management. Jornal de Pediatria, 2015, 91: S36–S43.

41. Broman, T., Waldenström, J., Dahlgren, D. et al. Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from

migrating birds and humans. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96, 834–843.

42. Broman, T. *Campylobacter jejuni* and wild birds. Umeå University, Umeå, 2003, 55 pp.

43. Bruns D. Fundamental of Molecular Mycrobiology Diagnostics.,St. Louise, Saunders, 2007, 25-35.

44. Black R., Levine M., Clements M. et al. Experimental *Campylabaeter jejuni* infections in humans. The Journal of Infectious Diseases. 1988, 157:472-478.

45. Blaser, M. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. J Infect Dis. 1997 ; 2:S103-5.

46. Blaser, M. et al. Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics. J. Infect. Dis. 1986, 153, 552–559.

47. Blaser M., Duncan D., Warren G. et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection of adult mice. Infect. Immun. 1983, 39:908–916.

48. Blaser, M., Reller B. *Campylobacter* enteritis. The New England Journal of Medicine 1981, 305:1444-1452.

49. Butzler J. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect. 2004;10(10):868-76.

50. Butzler J. *Campylobacter* enteritis. Infection. 1982; 2:S67-9.

51. Butzler J. et al. *Campylobacter fetus* infection in children. J Pediatr. 1979;94(2):340-1.

52. Butzler J., Dekeyser P., Detrain M., et al. Related vibrio in stools. J Pediatr, 1973, 82**,** 493-5.

53. Cascales, E. Christie, P. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003; 1, 137–149.

54. Chen J., Sun X., Zeng Z et. al.. *Campylobacter* enteritis in adult patients with acute diarrhea from 2005 to 2009 in Beijing, China. Chin Med J, 2011, 124:1508–1512.

55. Choo L., Saleha A., Wai S. et al. Isolation of *Campylobacter* and *Salmonella* from houseflies (*Musca domestica*) in a university campus and a poultry farm in Selangor, Malaysia. Trop Biomed. 2011, 1:16-20.

56. Coleman W., Tsongalis G. Diagnostics for the clinical laboration. Humana Press; 2005.

57. Cox, N., Stern, N., Craven, S et al. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in the cecal droppings of turkeys during production. Journal of Applied Poultry Research, 2000; 9: 542–545.

58. Cox, N., Stern, N., Hiett, K. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. Avian Diseases, 2002a, 46, 535–541.

59. Cooper A., Slee J. Human infection by Vibrio fetus. Med J Aust, 1971, 1**,** 1263-7.

60. Crushell E., Harty S., Sharif F. et al. Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? Pediatr Res 2004; 55: 3–12.

61. Cui M., Wu C., Zhang P. et al. Development of Multiplex-Mismatch Amplification Mutation-PCR Assay for Simultaneous Detection of *Campylobacter jejuni* and Mutation in gyrA Gene Related to Fluoroquinolone Resistance. Foodborne Pathog Dis. 2016, 1; 24-35.

62. Dasti J., Tareen A., Lugert R. et al. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. Int J Med Microbiol. 2010, 300(4):205-11.

63. De Wit, M. A., Hoogenboom-Verdegaal, A. M., Goosen, E. S., Sprenger, M. J. & Borgdorff, M. W. 2000. A population-based longitudinal study on the incidence and disease burden of gastroenteritis and *Campylobacter* and *Salmonella* infection in four regions of The Netherlands. European Journal of Epidemiology 16**,** 713–718.

64. Dediste A., Vandenberg O., Vlaes L. et al. Evaluation of ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1085–1090.

65. Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler JP., et al. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. J Infect Dis 1972; 125: 390-2.

66. Dingle K., Colles F., Wareing D. et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2001;39:14-23.

67. El-Adawy H., Ahmed MF., Hotzel H. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* recovered from organic turkey farms in Germany. Poult Sci. 2015, 11 :2831-7.

68. Endtz H., Ruijs G., van Klingeren B. et al. Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother 1991 ;27:199-208.

69. Euzéby, J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (updated 13 July, 2005) http://www.bacterio.net

70. Espy M., Uhl L., Sloan M. et al. Real-Time PCR inClinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. – Clin Microbiol Rev, 2006, 1, 165-56.

71. Feodoroff B. Severe *Campylobacter* infections in Finland. 2012, Acad. Diss., Helsinki, Finland

72. Fernández-Cruz A., Muñoz P., Mohedano R. et al. *Campylobacter* bacteremia: clinical characteristics, incidence, and outcome over 23 years. Medicine (Baltimore) 2010;89:319-30.

73. Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. J. Clin. Invest. 2003; 111:931–943.

74. Fox J., Rogers A., Whary M. et al. Gastroenteritis in NF-κB-Deficient Mice Is Produced with Wild-Type *Camplyobacter jejuni* but Not with *C. jejuni* Lacking Cytolethal Distending Toxin despite Persistent Colonization with Both Strains. Infect Immun. 2004; 72(2): 1116–1125.

75. Floch P., Goret J., Bessède E. et al. Evaluation of the positive predictive value of a rapid Immunochromatographic test to detect *Campylobacter* in stools. Gut Pathog. 2012; 4: 17.

76. Francioli P., Herzstein J., Grob. et al. *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* bacteremia. Arch Intern Med 1985;145:289-92.

77. Friesema I., de Boer R., Duizer E., et al. Etiology of acute gastroenteritis in children requiring ospitalization in The Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:405–15.

78. Friedman C., Hoekstra R., Samuel M. et al. Campylobacter Case-Control Study Risk Factors for Sporadic Campylobacter Infection in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. Clin Inf Dis. 2004:38 (3), 285-296.

79. Gallay A., Bousquet V., Siret V. et al. Riskf actors for acquiring sporadic Campylobacter infection in France: results from a national case-controlstudy. J. Infec .Dis. 2008;197:1477–84.

80. Gazaigne L., Legrand P., Renaud B. *Campylobacter fetus* bloodstream infection: risk factors and clinical features. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:185-9.

81. George G. et al., BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology. Second Edition. 2005, Vol. 2: 1145-1166.

82. Gomi, H., Jiang, Z., Adachi, J., at al. In vitro antimicrobial susceptibility testing among bacterial pathogens enteropathogens causing travellers diarrhoea in four areas of the world. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2001, 45: 212-216.

83. Gibreel A., Wetsch N., Taylor D. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother 2007;3212-6.

84. Gibreel A., Taylor D. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother 2006;243-55.

85. Guarino A., Albano F., Ashkenazi S., et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2008;46: S81–122.

86. Gupta S. Infectious disease: Something in the water. Nature. 2016, 18;533: S114-5.

87. Gupta A., Tse L. Successful conservative management of campylobacter cholecystitis occurring post chemotherapy and rituximab: a rare disease entity. N Z Med J. 2015;128:110-2.

88. Gupta A., Nelson J., Barrett T. et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. Emerg Infect Dis 2004;10:1102-9.

89. Guerry P., Szymanski C. *Campylobacter* sugars sticking out. Trends Microbiol. 2008;16(9):428-35.

90. Guerry P., Ewing C., Schirm M. et al. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. Mol Microbiol. 2006;60(2):299-311.

91. Guévremont, E., Higgins, R., Quessy, S. Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. Journal of Food Protection, 2004; 67: 228–234.

92. Guerry P., Ewing C., Hickey T. et al. Sialylation of lipooligosaccharide cores affects immunogenicity and serum resistance of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 2000;68:6656-62.

93. Grzybowska-Chlebowczyk U., Kalita B., Flak-Wancerz A. et al. Clinical course of *Campylobacter* infections in children. Pediatria Polska, 2013, 88: 329-334.

94. Granato P., Chen L., Holiday I. et. al. Comparison of premier CAMPY enzyme immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY tests with culture for laboratory diagnosis of *Campylobacter* enteric infections. J Clin Microbiol. 2010, 48, 4022–4027.

95. Griffiths L., Park A. *Campylobacter*‘s associated with human diarrhoeal disease. J. Appl. Bacteriol. 1990, 69: 281–301.

96. Gillespie I., O’Brien S., Frost J. et al. Investigating vomiting and/or bloody diarrhoea in *Campylobacter jejuni* infection. Journal of Medical Microbiology. 2006, 55, 741–746.

97. Gillespie I., O’Brien S., Frost J. et al. A Case-Case Comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Infection: A Tool for

Generating Hypotheses. Emerging Infectious Diseases, 2002, (9), 937-942.

98. Havelaar A., Ivarsson S., Lofdahl M. et al. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. Epidemiol Infect. 2013, 141:293–302.

99. Hannu T., Mattila L., Rautelin H. et al. *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: a population-based study. Rheumatology (Oxford),2002;41:312-8.

100. Hald, B., Pedersen, K., Wainø, M. et al. Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42, 2003–2012.

101. Hedstrom, O., Sonn, J., Lassen, E. et al. Pathology of *Campylobacter jejuni* abortion in sheep. Veterinary Pathology 1987, 24, 419–426.

102. Huang H., Brooks B., Lowman R. et al. *Campylobacter* species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada. Can J Microbiol. 2015, 61: 701-21.

103. Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol 2007;117:237-57.

104. Hong, C., Donahue, J. Campylobacteriosis in an aborted equine fetus. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1989, 194, 263–264.

105. Hutchison M., Harrison D., Richardson I. et al. A Method for the Preparation of Chicken Liver Pâté that Reliably Destroys *Campylobacters*. Int J Environ Res Public Health. 2015, 12:4652-69.

106. Hodges. K., Gill R. Infectious diarrhea. Cellular and molecular mechanisms Gut Microbes 2010; 1:1, 4-21.

107. Iovine N. Resistance mechanisms in C*ampylobacter jejuni.* Virulence. 2013; 4(3): 230–240.

108. Iovine N. Innate immunity in *Campylobacter* infections. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*, 3rd ed. 2008. ASM Press, Washington, DC. p. 333-350.

109. Ivanova K., Marina, M. Petrov P. et al. Campylobacteriosis and other bacterial gastrointestinal diseases in Sofia, Bulgaria for the period 1987 – 2008. Euro Surveill. 2010;15(4):19474.

110. Jasti A., Selmi C., Sarmiento-Monroy J. et al. Guillain-Barré syndrome: causes, immunopathogenic mechanisms and treatment. Expert Rev Clin Immunol. 2016; 21:1-15.

111. Jani, A. Cotter, P. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe.* 2010; 8, 2–6.

112. Janssen R., Krogfelt K., Cawthraw S. et al. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. Clinical microbiology reviews. 2008; 21(3):505-18.

113. Jeeyeon L., Jimyeong H., Sejeong Ki. et al. Quantitative Microbial Risk Assessment for *Campylobacter* spp. on Ham in Korea. Korean J Food Sci Anim Resour. 2015; 35(5): 674–682.

114. Jeremy H., Sara E., Norman A. *Campylobacter jejuni*. The new England journal of Medicine. 1995;333:1374–9.

115. Jore S., Viljugrein H., Brun E. et al. Trends in Campylobacter incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. Prev Vet Med. 2010; 93(1):33-41.

116. Kawase J., Etoh Y., Ikeda T. et. al. An Improved Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Assay for Analysis of 24 Target Genes from 16 Bacterial Species in Fecal DNA Samples from Patients with Foodborne Illnesses. pn J Infect Dis. 2016; 69(3):191-201.

117. Karlyshev A., Ketley J., Wren B. The *Campylobacter jejuni* glycome. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(2):377-90.

118. Karlyshev A., McCrossan M., Wren B. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. Infect Immun. 2001;69(9):5921-4.

119. Kawatsu K. Kumeda Y., Taguchi M. et al. Development and evaluation of immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human stool specimens. J Clin Microbiol. 2008;1226-31.

120. Kendall M., Crim S., Fullerton K. et al. Travel-associated enteric infections diagnosed after return to the United States, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009. Clin Infect Dis, 2012, 54:S480–S487.

121. Ketley, J.Virulence of *Campylobacter* species: A molecular genetic approach. Journal of Medical Microbiology 1995, 42:312-327.

122. Kobayashi R., Matsumoto S., Yoshida Y. Case of acute pancreatitis associated with *Campylobacter enteritis*. World J Gastroenterol. 2014 ;20(23):7514-7.

123. Kuhn K., Falkenhorst G., Ceper T. et al. Detection of antibodies to *Campylobacter* in humans using enzyme-linked immunosorbent assays: a review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 ;74:113-8.

124. Kramer, J., Frost, J., Bolton, F et al. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. Journal of Food Protection 2000, 63, 1654–1659.

125. Kittl S., Heckel G., Korczak B. et al. Source attribution of human *Campylobacter* isolates by MLST and *fla*-typing and association of genotypes with quinolone resistance. PLoS One. 2013;8(11):e81796.

126. King N. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2010; Vol. 630.

127. Lardone R., Yuki N., Irazoqui F. et al. Individual Restriction Of Fine Specificity Variability In Anti-GM1 IgG Antibodies Associated With Guillain-Barré Syndrome. Sci Rep. 2016;6:19901.

128. Lastovica A. Emerging Campylobacter spp.: the tip of the iceberg. Clin Microbiol Newsl 2006, 28:49–56.

129. Lee G., Pan W., Yori P. et al. Symptomatic and Asymptomatic Campylobacter Infections Associated with Reduced Growth in Peruvian Children. PLOS Neglected Tropical Disease, 2013,7, 1-9.

130. Lee B., Reimers N., Barnes H. et al. Strain persistence and fluctuation of multiple-antibiotic resistant *Campylobacter coli* colonizing turkeys over successive production cycles. Foodborne Pathog Dis 2005, 2:103-110.

131. Lehoursa P., Aladjidic N., Sarlangue J. Infections a` *Campylobacter* chez l'enfant. Archives dePe´diatrie. 2012; xxx:1-6.

132. Lehner, A., Schneck, C., Feierl, G. Et al. Epidemiologic application of pulsed-field gel electrophoresis to an outbreak of *Campylobacter jejuni* in an Austrian youth centre. Epidemiology and Infection, 2000, 125, 13–16.

133. Levy A., A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. J. Inf. Dis. 1946, 18: 243-258.

134. Lefébure T., Stanhope M. Pervasive, genome-wide positive selection leading to functional divergence in the bacterial genus *Campylobacter*. Genome Res 2009,19:1224-32.

135. Liu F., Lee H., Lan R. et al. Zonula occludens toxins and their prophages in *Campylobacter* species. Gut Pathogens 2016, 8:43.

136. Lindblom G., Sjogren E., Hansson-Westerberg J. et al. *Campylobacter psaliensis, C.sputorum sputorum* and *C.concisus* as common causes of diarrhoea in Swedish children. Scand. J. Infect. Dis. 1995, 27, 187–188.

137. Lozano R., Naghavi M., Foreman K., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet, 2012, 380:2095–128.

138. Louis, V., Gillespie, I., O'Brien, S. et al. Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. Applied and Environmental Microbiology 2005, 71, 85–92.

139. Luangtongkum T., Jeon B., Han J. et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol. 2009; (2):189-200.

140. Lutgen, E., McEvoy, J., Sherwood, J. et al. Antimicrobial resistance profiling and molecular subtyping of *Campylobacter* spp. from processed turkey. BMC Microbiology 2009, 9:203.

141. Mahendran V., Liu F., Riordan S. et al. Examination of the effects of *Campylobacter* concisus zonula occludens toxin on intestinal epithelial cells and macrophages. Gut Pathog. 2016, 8:18.

142. Ma L., Wang Y.,, Shen J. et al. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. Int J Food Microbiol. 2014;181:77-84.

143. Man S. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. Nature Rev./Gastroent. & Hepat. 2011,8,669-685

144. Manning, G., Duim, T., Wassenaar, J., et al. Evidence for a genetically stable strain of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67:1185-1189.

145. Marinou I., Bersimis S., Ioannidis A. et al. Identification and antimicrobial resistance of *campylobacter* species isolated from animal sources. Front Microbiol. 2012, 24;3:58.

146. Martines J. et al. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten- year update. Bulletin of the World Health Organization, 1992, 70: 705-714.

147. Martines, J. et al. Diarrheal diseases. In: Jamison,D.T. & Mosley, W.H., ed. Evolving health sector priorities in developing countries. Washington, DC,World Bank, 1991, pp. 1-49.

148. Mendz G., Petersen R., Quinlivan J. et al. Potential involvement of *Campylobacter curvus* and *Haemophilus parainfluenzae* in preterm birth. BMJ Case Rep 2014, 5, 46-48.

149. Melby, K., Svendby, J., Eggebø, T. et al. Outbreak of *Campylobacter* infection in a subartic community. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2000, 19, 542–544.

150. Murry, C. J. L. and Lopez, AD. Mortality by causes for eight regions of the world; global burden of disease study. Lancet, 1997, 349: 1269-1276.

151. Muller L., Jensen T., Petersen R,. et al. Imported fresh sugar peas as suspected source of an outbreak of *Shigella sonnei* in Denmark, April-May 2009. Euro surveillance bulletin europeen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin, 2009, 14(24).

152. McFadyean J., Report of the departmental committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. 1913, Part III.

153. Morris, C., Scully, B., Garvey, G. *Campylobacter lari* associated with permanent pacemaker infection and bacteremia. Clin. Infect. Dis. 1998, 27, 220–221.

154. Misawa, N., Kawashima, K., Kondo, F. Isolation and characterization of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea. Veterinary Microbiology, 2002, 87, 353–364.

155. Mshana E., Joloba L., Kakooza A. et al. Role of microscopic examination of stool specimens in the diagnosis of *Campylobacter* infection from children with acute diarrhoea in Tanzania Journal of Health Research. 1998;12:0–3.

156. Mullis K., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335–350.

157. Mishu-Allos B. *Campylobacter jejuni* infections: update onemerging issues and trends. Clin Infect Dis 2001; 32: 1201–1206.

158. Molnar G., Mertsola J., Erkko M. Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter* infection. Br Med J (Clin Res Ed) 1982;285:652.

159. Nayak R., Stewart T., Nawaz M. et. al. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. Mol Cell Probes. 2005 (3):187-93.

160. Nagaratnam N., Goh T., Ghoughassian D. *Campylobacter jejuni*-induced vasculitis. Br J Clin Pract. 1990; (12):636-7.

161. Naz, N. (2014) Reinvestigation into the mechanisms of Campylobacter jejuni invasion of intestinal epithelial cells. Doctoral thesis, London School of Hygiene & Tropical Medicine.

162. Nachamkin I., Liu J., Li M. *Campylobacter jejuni* from Patients with Guillain-Barre´ Syndrome Preferentially expresses a GD1a -Like Epitope. Infection and Immunity, 2002, p. 5299–5303.

163. Nedkova V., Komitova R., Popova V., et al. Diarrheal Etiology in Children Under Five in Bulgaria - A Prospective Study - Preliminary Results. International Journal of Infectious Diseases 2008, 12, (1), e80.

164. Newell D., Elvers K., Dopfer D. et al. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. Appl Environ Microbiol. 2011, 77:8605–8614.

165. Newell, D., Shreeve, J., Toszeghy, M. et al. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. Applied and Environmental Microbiology. 2001, 67, 2636–2640.

166. Nielsen H., Hansen K., Gradel K. Bacteraemia as a result of *Campylobacter* species: a population-based study of epidemiology and clinical risk factors. Clin Microbiol Infect 2010;16:57-61.

167. Nooshin A., Zendehbad B., Alipour A et al. Wild-bird feces as a source of *Campylobacter jejuni* infection in children's playgrounds in Iran. – Food Control 2015, 50,378-381.

168. O'Brien S. Foodborne Diseases: Prevalence of Foodborne Diseases in Europe. Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food Safety, 2014,1: 302-311.

169. Oh E., Kim J. , Jeon B. Stimulation of biofilm formation by oxidative stress in Campylobacter jejuni under aerobic conditions. Virulence. 2016, Jun 7, 1: 34-37.

170. Olofsson J., Axelsson-Olsson D., Brudin L. et al. *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. PLoS One. 2013 Nov 6;8(11)

171. Ono, K., Yamamoto, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. International Journal of Food Microbiology 1999.47, 211–219.

172. Pacanowski J., Lalande V., Lacombe K. *Campylobacter* bacteremia: clinical features and factors associated with fatal outcome. Clin Infect Dis 2008;47:790-6.

173. Park, C., Sanders, G. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. Canadian Journal of Microbiology 1992. 38, 313–316.

174. Panikkath R., Costilla V., Hoang P. et al. Chest pain and diarrhea: a case of *Campylobacter jejuni*-associated myocarditis. J Emerg Med. 2014 ;(2):180-3.

175. Patton, M., Wachsmuth K. Typing Schemes: are current methods useful? *In* Nachamkin, Blaser and Tompkins (Editors), *Campylobacter jejuni*. Current Status and Future Trends, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992, pp. 110–128.

176. Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhoea. Gastroenterology, 2009, 136: 1874–86.

177. Petersen, L., Nielsen, E., Engberg, J., et al. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. Applied and Environmental Microbiology, 2001a. 67, 3115–3121.

178. Persing, D. et al. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications, Mayo Foundation, US, 1993, 51-88.

179. Pope J., Krizova A., Garg A. et al. Campylobacter reactive arthritis: a systematic review. Semin Arthritis Rheum. 2007 (1):48-55.

180. Prakash P., Mishra P. Evaluation of Nested PCR in Diagnosis of Typhoid Fever. – J Clin Microbiol 2005, 43, 431-432.

181. Pin C., Reuter M., Pearson B. et al. Comparison of different approaches for comparative genetic analysis using microarray hybridization. – Applied Microbiol Biotechnol 2006, 72, 852-859.

182. Quinones-Ramirez E., Vazquez-Salinas, C., Rodas-Suarez, O. et al. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. Journal of Food Protection 2000, 63, 117–119.

183. Randall L., Lemma F., Rodgers J. et al. Development and evaluation of internal amplification controls for use in a real-time duplex PCR assay for detection of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. J Med Microbiol. 2010, (Pt 2):172-8.

184. Regnath T., Ignatius R. Accurate detection of *Campylobacter* spp. antigens by immunochromatography and enzyme immunoassay in routine microbiological laboratory. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2014;(3):156-8.

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

186. Ritchie P., Forbes J., Steinbok P. Subdural space *Campylobacter* infection in a child. CMAJ. 1987; 137(1): 45–46.

187. Rhodes K., Tattersfield A. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter* infection. Br Med J (Clin Res Ed) 1982;285:173-4.

188. Roberson B., Nicholson A. New microbiology tools for public health and their implications. – Annu Rev Public Health, 26, 2005, 281-302.

189. Sabayan B., Foroughinia F., Imanieh M. Can *Campylobacter jejuni* play a role in development of celiac disease? A hypothesis. World J Gastroenterol. 2007; 13(35): 4784–4785.

190. Sadkowska-Todys M., Kucharczyk B. Campylobacteriosis in Poland in 2012. Przegl Epidemiol. 2014, 68:239–241, 249–251.

191. Samuel M., Vugia D., Shallow S. et al. Emerging Infections Program FoodNet Working Group.Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. Clin Infect Dis 2004;38:S165-74.

192. Sandberg, M., Bergsjø, B., Hofshagen, M. et al. Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. Preventive Veterinary Medicine, 2002; 55, 241.

193. Sebald M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Ann Inst Pasteur 1963;105: 897-910.

194. Schonberg-Norio, D., Sarna S., Hanninen L. Strain and host characteristics of *Campylobacter jejuni* infections in Finland. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 754–760.

195. Stoyanchev T., Vashin I., Ring Ch. et al. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry products for sale on the Bulgarian retail market. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 2007, 3, 285–288.

196. Skirrow M., McFadyean J. and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. Clin Infect Dis, 2006, 43**,** 1213-7.

197. Skirrow B. Campylobacter enteritis: a "new" disease. Br Med J. 1977;2:9-11.

198. Szymanski C., Yao R., Ewing C. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. Mol Microbiol. 1999;32(5):1022-30.

199. Soumet D., Rivoal K., Ermel G. et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. – Applied Microbiology, 1999, 29, 406-410.

200. Slee, K. Human vibriosis and endogenous infection? Australian Journal Of Medical Technology. 1972, 3, 7.

201. Smith, T. The etiological relation of Spirilla (*V. foetus*) to bovine abortion. J. Exp. Med. 1919, 30: 313-323.

202. Smith, T. Taylor, M. Some morphological and biological characters of the Spirilla (Vibrio fetus, n. sp.) associated with the disease of the fetal membranes in cattle". J Exp Med. , 1919, 30 : 299–311.

203. Snyder, J.D. & Merson, M. H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of the active surveillance data. Bulletin of the World Health Organization, 1982, 60: 605-613.

204. Simor A., Karmali M., Jadavji T. et al. Abortion and perinatal sepsis associated with *Campylobacter* infection. Rev Infect Dis, 1986, 8:397–402.

205. Stephens, C., On, S., Gibson, J. An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. Veterinary Microbiology, 1998, 61: 183–190.

206. Tam C., Rodrigues L., Viviani L. et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. Gut. 2012;61:69-77.

207. Tam C., Rodrigues L., Petersen I. et al. Incidence of Guillain-Barré syndrome among patients with *Campylobacter* infection: a general practice research database study. J Infect Dis 2006;194:95-7.

208. Tamborini A., Casabona L., Viñas M. et al. *Campylobacter* spp.: prevalence and pheno-genotypic characterization of isolates recovered from patients suffering from diarrhea and their pets in La Pampa Province, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2012 44(4):266-71.

209. Tee W., Mijch A. *Campylobacter jejuni* bacteremia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected

patients: comparison of clinical features and review. Clin Infect Dis 1998;26:91-6.

210. Tsoni K., Papadopoulou E., Michailidou E. *Campylobacter jejuni* meningitis in a neonate: a rare case report. J Neonatal Perinatal Med. 2013;6(2):183-5.

211. Udayakumar D., Sanaullah M. Campylobacter cholecystitis. Int J Med Sci. 2009;6(6):374-5.

212. Vaidya G., Sharma A., Khorasani-Zadeh A. et al. Enterocolitis without diarrhoea in an adult patient: a clinical dilemma. BMJ Case Rep. 2014, 4.

213. Vandamme P., Falsen E., Rossau R. et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. nov. Int J Syst Bacteriol 1991;41:88-103.

214. Valérie R., Louis I., Gillespie A. et al. Temperature driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. Appl Environ Microbiol 2005;71: 85–92.

215. Vila J., Oliveira I., Zboromyrska Y. et al. Traveller's diarrhea. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016; 34(9):579-584.

216. Wardak S., Duda U., Krasowska D. et al. *Campylobacter* spp. as a leading cause of human bacterial gastroenteritis in selected region of Poland. Przegl Epidemiol 2009;63:531–7.

217. Wadl M., Pölzler T., Flekna G. et al., Easy-to-use rapid test for direct detection of *Campylobacter* spp. in chicken feces. J Food Prot. 2009, 72(12):2483-8.

218. Waldenström, J., Broman, T., Carlsson, I. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds dagger. Applied and Environmental Microbiology 2002, 5911–5917.

219. Wagenaar J., French N., Havelaar A. Et al. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? Clin Infect Dis 2013, 57:1600–1606.

220. Wassenaar, T. Newell, D. Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol 2000, 66,1-9.

221. Welsh R. *Campylobacter jejuni* abortion in a heifer. Journal of the American Veterinary Medical Association 1984;185, 549–551.

222. Wistrom J., Jertborn M., Ekwall E. et al. Empiric treatment of acute diarrheal disease with norfloxacin: a randomized, placebo-controlledstudy. Swedish Study Group. Ann Intern Med 1992; 117:202–8.

223. Williams D., Schorling J., Barrett L. et al. Early Treatment of *Campylobacter jejuni* Enteritis. Antimicrobal agents and Hemotherapy,1989, 248-250.

224. Yao R., Burr D., Guerry P. et al. CheY-mediated modulation of Campylobacter jejuni virulence. Mol Microbiol. 1997;23(5):1021-31.

225. Yan W., Chang N., Taylor D. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. J Infect Dis 1991;163:1068- 72.

226. Young K., Davis L., Dirita V. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(9):665-79.

227. Zautner A., Johann C., Strubel A. et al. Seroprevalence of campylobacteriosis and relevant post-infectious sequelae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; (6):1019-27.

Научни трудове по темата на дисертацията

Реални публикации

1. **В. Велев,** Н. Найденова, Н. Дървеняшка, В. Илчова, И. Томова, К. Иванова, А. Мангъров и М. Тихолова. Проучвания на чревната кампилобактериоза при деца. Детски и инфекциозни болести, 6, 2014, 3-6.
2. **Велев В.,** С. Алексиева, Н. Найденова, Н. Дървеняшка, В. Илчова, И. Томова, М. Тихолова. Пурпура на Шонлайн-Хенох у дете с кампилобактериоза – клиничен случай. Педиатрия, 3, 2015, 52-54.
3. **В. Велев**. Кампилобактериоза. Детски и инфекциозни болести, 7, 2015, 2, 34-37.
4. Pavlova MR, Dobreva EG, Ivanova KI, Asseva GD, Ivanov IN, Petrov PK, **Velev VR,** Tomova II, Tiholova MM, Kantardjiev TV. Multiplex PCR Assay for Identifiacation and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. Folia Med. 2016; 58(2):95-100.
5. **В. Велев**, М. Павлова, И. Томова, Е. Добрева, М. Тихолова, Т. Червенякова. Предимства на имунохроматографската диагностика и етиологичното лечение при хоспитализирани болни с кампилобактериоза. Наука инфектология и паразитология, 2, 5-11, 2016.
6. М. Павлова, **В. Велев**, Е. Добрева, К. Иванова, Г. Асева, П. Петров, Т. Кантарджиев. EvaGreen Real-Time PCR за доказване на *Campylobacter jejuni/coli* директно от клинична проба фецес. MedicalMagazine, 36, 58-64, 2016.
7. **V. Velev**, M. Pavlova, A. Mangarov, P. Petrov, I. Ivanov, T. Tomov, K. Vutova. Diagnostics and therapeutic bechaviour in patients with campylobacteriosis. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 2017 (in press) **IF_{2016}0.233**

Участия в научни форуми

1. **В. Велев**, Н. Найденова, Н. Дървеняшка, В. Илчова, И. Томова, А. Мангъров, М. Тихолова. Клинични и терапевтични проучвания на кампилобактериозата у деца (постер). XI Национален конгрес по инфекциозни болести, София, 11-13 октомври 2012 г.
2. **В. Велев**, Н. Найденова, Н. Дървеняшка, В. Илчова, И. Томова, К. Иванова, А. Мангъров, М. Тихолова. Проучвания на чревната кампилобактериоза при деца (доклад). XI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, 9 – 11 май 2013 г.

3. **Велев В.**, Алексиева С., Найденова Н., Дървеняшка Н., Илчова В., Томова И., Тихолова М. Случай на кампилобактериоза усложнен с болест на Шонлайн – Хенох (постер). IX Национална конференция по инфекциозни болести, Ст. Загора, 09 – 11 октомври, 2014 г.

4. **В. Велев,** Св. Алексиева, Н. Найденова, Н. Дървеняшка, Т.Томов, М. Павлова, И. Томова, К. Иванова, А. Мангъров, М. Тихолова. Клинико-диагностични и терапевтични проблеми на кампилобактериозата в детска възраст (доклад). XIV Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, 12 – 14 май 2016 г.

5. **В. Велев,** Св. Алексиева, Н. Найденова, Н. Дървеняшка, М. Никандров, М. Павлова, И. Томова, К. Иванова, А. Мангъров, М. Тихолова. Съвременни подходи в диагностиката и лечението на чревната кампилобактериоза (постер). Национална конференция по гастроентерология, Сл. бряг, 02-04 юни, 2016.

6. Dinkova M., Pavlova M., Mirtschew A., Dobreva E., **Velev V**. Investigation of *Campylobacter* infections in children (доклад премиран с **първа награда**). International Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, 10-15 October, 2016.

7. **В. Велев**, М. Павлова, И. Томова, Е. Добрева, М. Тихолова, Т. Червенякова. Предимства на имунохроматографската диагностика и етиологичното лечение при хоспитализирани болни с кампилобактериоза (постер). X Национален конгрес по инфекциозни болести, София, 06-08 октомври, 2016 г.