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

АВТОРЕФЕРАТ

на 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

Дисертационният труд съдържа 138 стандартни страници. Онагледен е с 36 таблици и 35 фигури. Литературната справка съдържа 227 източника, от които 9 на кирилица и 218 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита на разширен съвет на Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина към Медицински университет – София на 06.04.2017 г.

Научно жури:

1. Доц. д-р Атанас Мангъров, дм
2. Доц. д-р Ивайло Еленков, дм
3. Проф. д-р Радка Комитова, дм
4. Доц. д-р Емилия Пантелеева, дм
5. Доц. д-р Олиана Бойкинова, дм

Резервни членове:

Проф. д-р Каменна Вутова, дм

Проф. д-р Марияна Стойчева, дмн

Публичната защита ще се състои на 04.09.2017 г. от 13.00 ч. в Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Северен павилион, бул. „Акад. Ив. Ев. Гешов“ 17, София.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата, СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Северен павилион, бул. „Акад. Ив. Ев. Гешов“ 17 и на интернет-страницата на МУ-София.

Номерацията на таблиците и фигурите в автореферата не отговаря на тази в дисертационният труд.

Изказвам благодарности:

На научният ми ръководител **Доц. Мангъров** за съветите и спокойната и ведра атмосфера, която създаде за да бъде успешен този труд. На научният ми консултант **Проф. Тихолова** за прецизността, както и за идеята за тази актуална тема.

На ръководството на болницата в лицето на **Проф. Червенякова** и **д-р Горанова**, които ми дадоха доверие в аванс.

На ръководителят на микробиологичната лаборатория в болницата **д-р Томова** и нейният екип, които бяха истински добронамерен партньор.

На **д-р Мария Павлова** от НЦЗПБ, приятел и колега, без която молекулярно-биологичните методи в този труд нямаше да бъдат факт.

На **Проф. Вутова** за съветите и подкрепата.

На моите учители, съветници и приятели от II-ро детско отделение – **д-р Алексиева, д-р Найденова, д-р Дървеняшка, д-р Илиева, д-р Илчова, на В. Цонкова** и блестящият и екип медицински сестри.

На всички колеги от болницата и катедрата за подкрепата и добронамерената атмосфера, която винаги създаваха.

На **д-р Янко Янков** и **д-р Яна Хараламбиева**, които ме вдъхновяват от студентските ми години до днес.

На моето семейство.

Съдържание:

Използвани съкръщения……..5

Въведение…….…7

Цел и задачи…….….9

Материали и методи…….....10

Резултати и обсъждане……...21

Изводи……..67

Приноси……68

Публикации във връзка с дисертационният труд……..…70

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*.

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. 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.

Използваха се комерсиални имунохроматографски тестове (ИХТ) на *CerTest Biotec*, Spain, белязани с моноклонално антитяло срещу родов антиген на *Campylobacter*. Изследването се извършваше съгласно инструкциите на производителя.

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.
В проучването бяха използвани и 8 животински референтни щама *Campylobacter* spp.

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 с размер на порите 0,45µm.
За реанимиране и обогатяване на щамовете използвахме течни хранителни среди Brainheart infusion (Applichem).
За субкултивиране използвахме въглен-базирани медии и *Campylobacter* blood-free agar (Oxoid).
За съхранение на щамовете приготвихме SKIMILK (SKIM MILK POWDER, Oxoid, England) според инструкциите на производителя.
Посевките се култивираха в микроаерофилна атмосфера (5%O2+10%CO2+ 85%N2) при 42 –43°C за 24 – 72 часа.

- **Методи**

- **Анамнеза и епидемиологична анамнеза**

Използвани са рутинните клинико-анамнестични методи в инфектологията и педиатрията.

- **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

a. 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.

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

- Каталазен тест: върху предметно стъкло се поставя едно йозе от изпитваната култура и капка 3% H2O2.
- Оксидазен тест: малко количество бактериална маса от съмнителени колонии се разтрива върху филтърна хартия, навлажнена с 1% разтвор на аминодиметилаланин. Появата на виолетово оцветяване на диска 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. Отчита се след 5 до 10 минуни. Положителна реакция: синьо. Отрицателна реакция: бледо жълто или сиво.
- 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. При положителна реакция индоксил ацетатът се хидролизира и се наблюдава промяна в синьо. Ако няма промяна в

цвета тестът се отчита като отрицателен. (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).

- 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.

- 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. 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 амплифицират консервативни гени: ***cad*F** е ген характерен за всички *Campylobacter* spp, ***hip*O** ген- за *C..jejuni* и ***asp***- ген - за *C.coli* (таб.1).
Двойките праймери бяха изпитани и оптимизирани поотделно, както следва: CadF заедно с asp и CadF заедно с hip*O* и след това едновременно в Multiplex PCR.

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. 1 . Използваните праймери и големината на техните ампликони.

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 най-често причина за гастроентерити.

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

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*, **ceuE F/R**, амплифициращи специфичен регион (72bp) от ген *ceuE* за *C. coli* и **camp F2/R2**, амплифициращи специфичен регион (108bp) от родов ген за *Campylobacter spp*.(таб.2).

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. 2. Секвенция на използваните праймери и големина на техните ампликони.

Бяха оптимизирани следните условия за целта на лабораторията:

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

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.

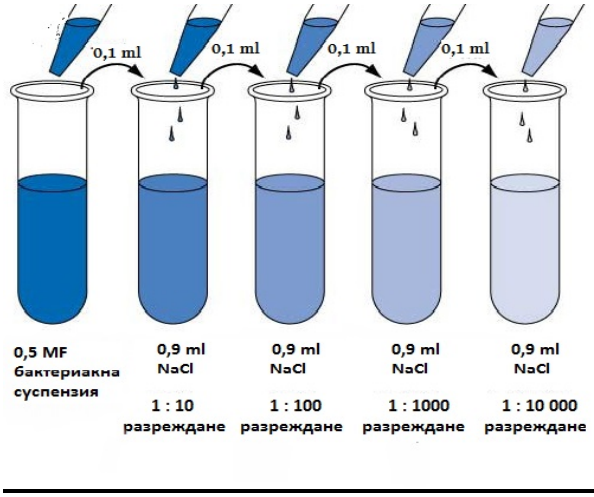
- **Валидиране на Eva Green Real-time mPCR метода за едновременно откриване и разграничаване на *C. jejuni / coli* директно от проба фецес**

С цел валидиране на оптимизираните условия на Eva Green Real-time mPCR метода, бяха тествани аналитичната му чувствителност и специфичност.

Във връзка с аналитичната чувствителност бяха изготвени серия десетократни разреждания на бактериална ДНК - суспензия от референтни щамове *C. jejuni* и *C.col* (фиг.1). По 10 µ*l* от всяко

разреждане бяха изкуствено инокулирани във фецеси, отрицателни за кампилобактер с цел да се определят CFU / ml (единици образуващи колонии).

$$\textbf{CFU / ml} = \left(\frac{\textbf{броя на колониите X фактора на разреждане}}{\textbf{обема на културираната суспензия}} \right)$$



Фиг. 1. Изготвяне на 10-кратни бактериални разреждания за определяне на аналитична чувствителност на Eva Green Real-time mPCR метода.

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

- **Статистически методи**

Данните бяха обработени със статистически пакет на SPSS 19.0.1:

а) Параметрични методи

- Т- тест
- ANOVA

б) Непараметрични методи

- Тест на Фишер
- Тест на Стюдънт

с) Дескриптивни методи

- Вариационен анализ
- Честотен анализ
- Кростабулации признаци
- Статистическа проверка на хипотези
- Корелационен анализ

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. 3. Истинност при изчисляване на критериите за оценка на тестваните методи.

Позитивна предиктивна стойност (PPV) – изразява вероятността един позитивен тестови резултат да е истински позитивен. **PPV = (a + b) ; a**

Негативна предиктивна стойност (NPV) **–** изразява вероятността един негативен тестови резултат да е истински негативен. **NPV = (c + d) ; d**

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

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

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

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

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

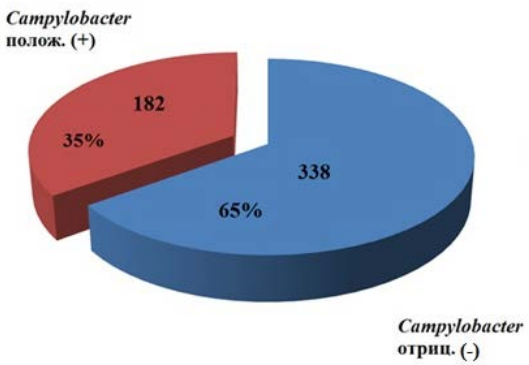
„Образован е този човек, който е способен да види аналогии. Невежата всеки път вижда нещо съвършено ново.“

Зигмунд Граф

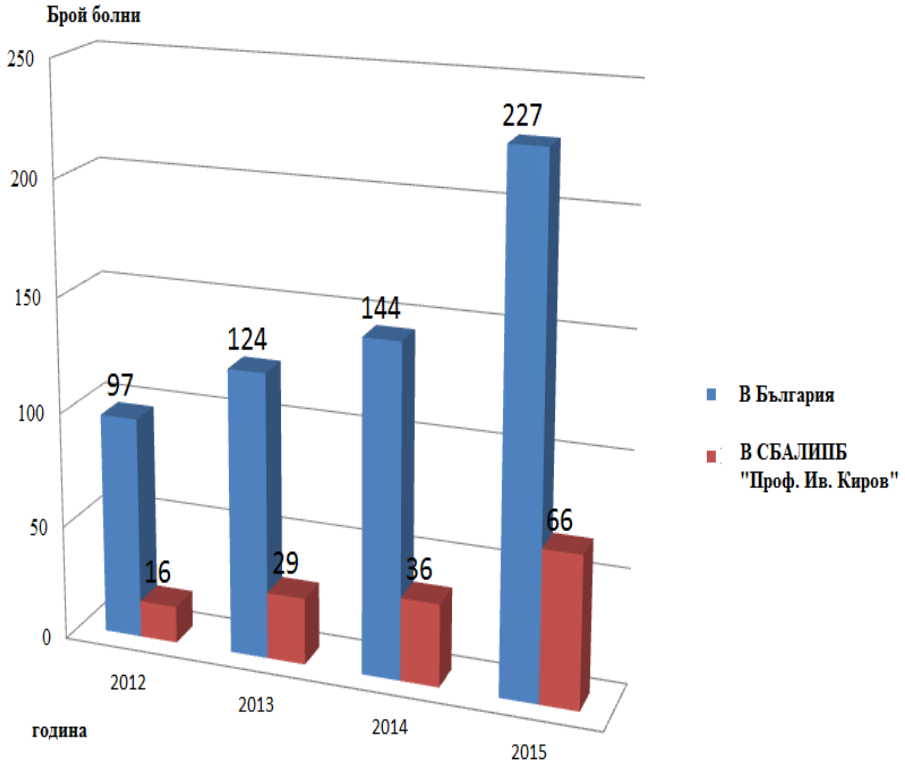
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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.2). Както е видно от фигура 3 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.3).



Фиг. 2. Разпределение на положителните и отрицателни ИХТ за кампилобактериоза.



Фиг. 3. Разпределение на случаите на кампилобактриоза за периода 2012 – 2015 (на национално ниво и доказани в СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“

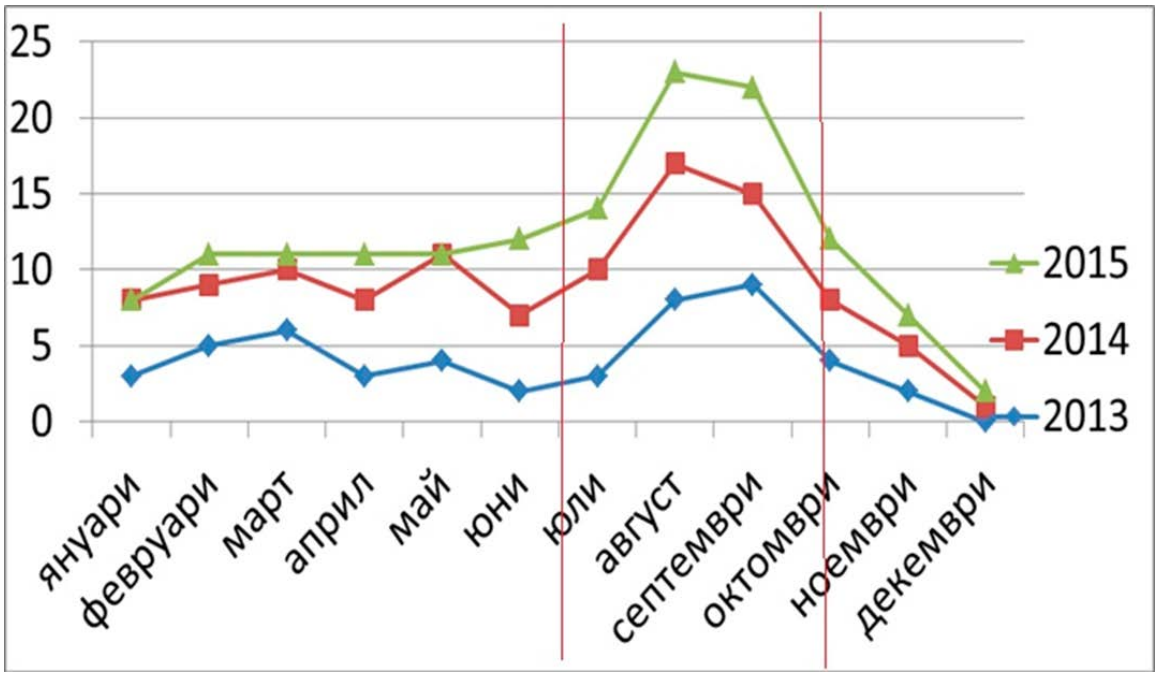
Изследвани фактори		брой	%	валиден %
пол	мъже	88	48,1%	48,1%
	жени	94	51,9%	51,9%
възраст	0 – 1 г.	45	24,9%	24,9%
	2 – 5 г.	80	44,2%	44,2%
	6 – 10 г.	45	24,3%	24,3%
	над 10 г.	12	6,6%	6,6%
Общо пациенти		**182**		

Таб. 4. 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 4, 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. 5).



Таб. 5. 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 6 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. 6. Интензитет на диарията за всяка възрастова група за денонощие.

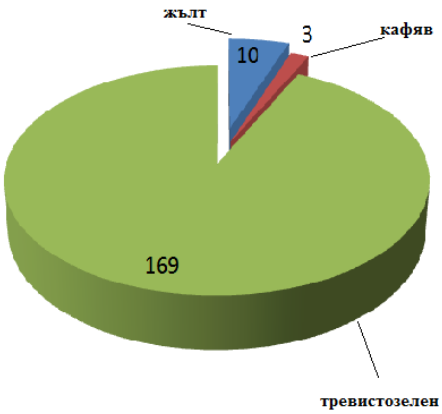
- **Характеристика на изхожданията**

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 7 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.

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 7. 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. 4).



Фиг. 4. 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 8 при 124 (68,1%) от болните се срещаха коремни болки. 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. 9).

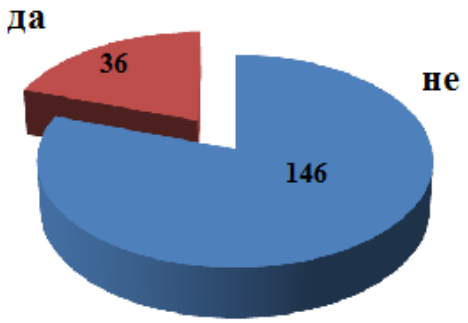
коремни болки и тенезми				
		брой	процент	Валиден процент
Болки /тенезми	**да**	**104**	**57,5%**	57,5%
	не	58	31,5%	31,5%
	болки + тенезми	20	11,0%	11,0%
	общо с болки	**124**	**68,1%**	68,1%

Таб. 8. 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. 9. 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 фигурата по-долу при 36 (19,9%) от проследяваните от нас деца е извършена подобна консултация по повод съмнение на ОХК.



пациенти консултирани с коремен хирург

На таблица 10 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. 10. Съмнение за ОХК спрямо възрастта на болните.

3. Горно-диспептичен синдром

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. 11).

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. 11. Честота на повръщанията за 24 ч. спрямо възрастта.

4. Токсикоинфекцозен синдром (ТИС)

- **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 °C бяха 85 (46,4%), а над 39,1 °C – 87 (48,1%). Само 11 (5,5%) от болните деца бяха субфебрилни (таб. 12).

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

Таб. 12. 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 13 личи, че в кърмаческа възраст най-много болни са били поне веднъж с фебрилитет над 39,1 °C – 36 (19,9%). При болните в диапазона 2-5 г. преобладава фебрилитет 38,1 - 39 °C – 41 (22,7%), голяма част от тях обаче са и високофебрилни – 31 (19,9%) са имали фебрилна реакция на стойност над 39,1 °C. Сравнително малка част от децата между 6 и 10 г. са с фебрилитет над 39,1 °C – 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. 13).

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. 13. 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. 14). Преобладаваха втрисането и главоболието съответно при 51 (28,2%) и 15 (8,3%). 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.

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. 14. 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. Като е видно от таблица 15 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. 15. 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.

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 16 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 понижениият 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. 16. 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 17 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. 17. 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. Интоксикирано, субфебрилно до 37.6 °C. С хеморагичен обрив по торса, седалището и крайниците (фиг. 5). 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. 6).

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. 7). 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.

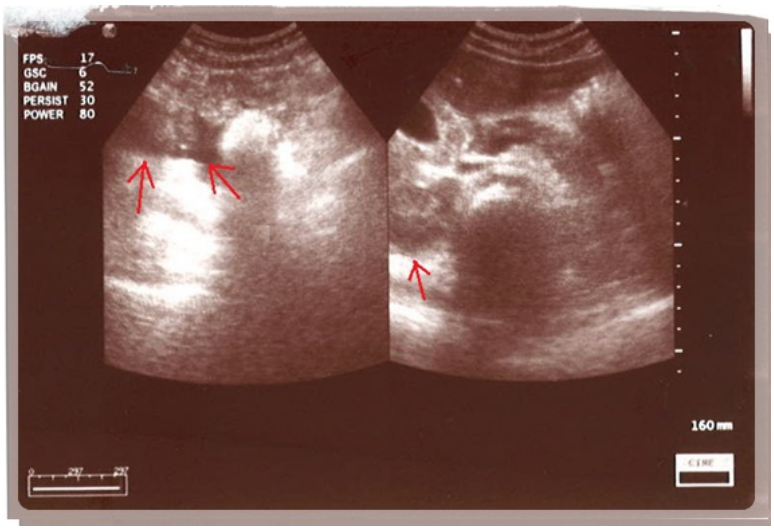




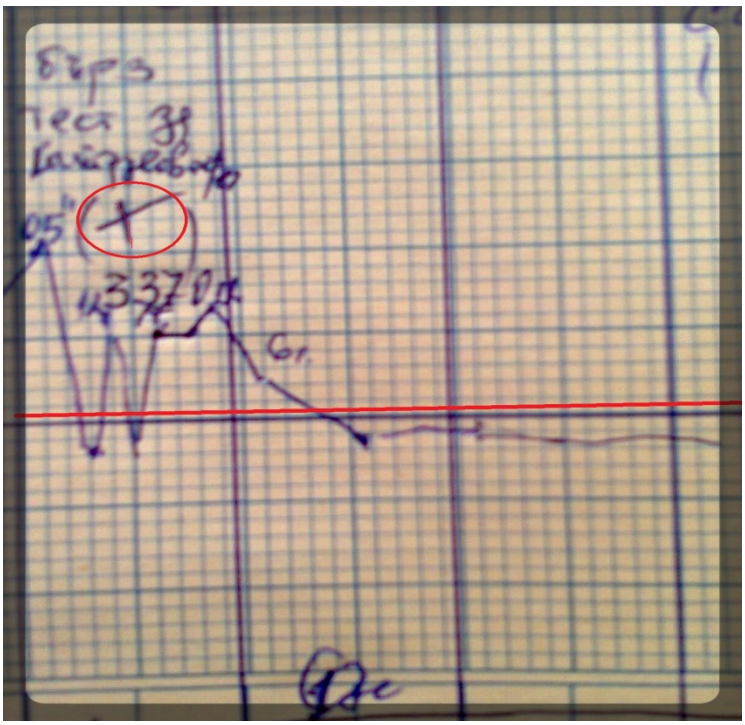
Фиг. 5. Хеморагичен обрив по седалищни части и долни крайници при дете с кампилобактериоза и Henoch-Schonlein пурпура.

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



Фиг. 6. Снимка от коремна ехография при дете с кампилобактериоза и Henoch-Schonlein пурпура (СПТ е показана със стрелки).



Фиг. 7. Снимка на температурния лист показващ бързото овладяване на фебрилитета след диагностичното уточняване с бърз тест и започване на антибиотично лечение.

- **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. Интоксикиран, фебрилен до 38 °C. 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.

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 дескриптивен 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 таблици 19 и 20 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).

Таб. 19

Изследване на влиянието на фактора „вид кампилобактер“ върху: 1) брой изхождания; 2) коремни болки; 3) повръщане; 4) фебрилитет

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

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. 20 Изследване на влиянието на фактора „вид кампилобактер“ върху: 1) брой изхождания; 2) коремни болки; 3) повръщане; 4) фебрилитет

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.

III. Етиологично лечение

По отношение на етиологичното лечение на чревната кампилобактериоза в литературата съществуват доста противоречия. Butzler и Skirrow я определят като остра самоограничаваща се инфекция, която обикновено не изисква антибактериално лечение. Crushell препоръчва започване на антибактериална терапия при болни с хемоколит или продължаваща над 7 дни диария. 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 хоспитализираните 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. 21). 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%

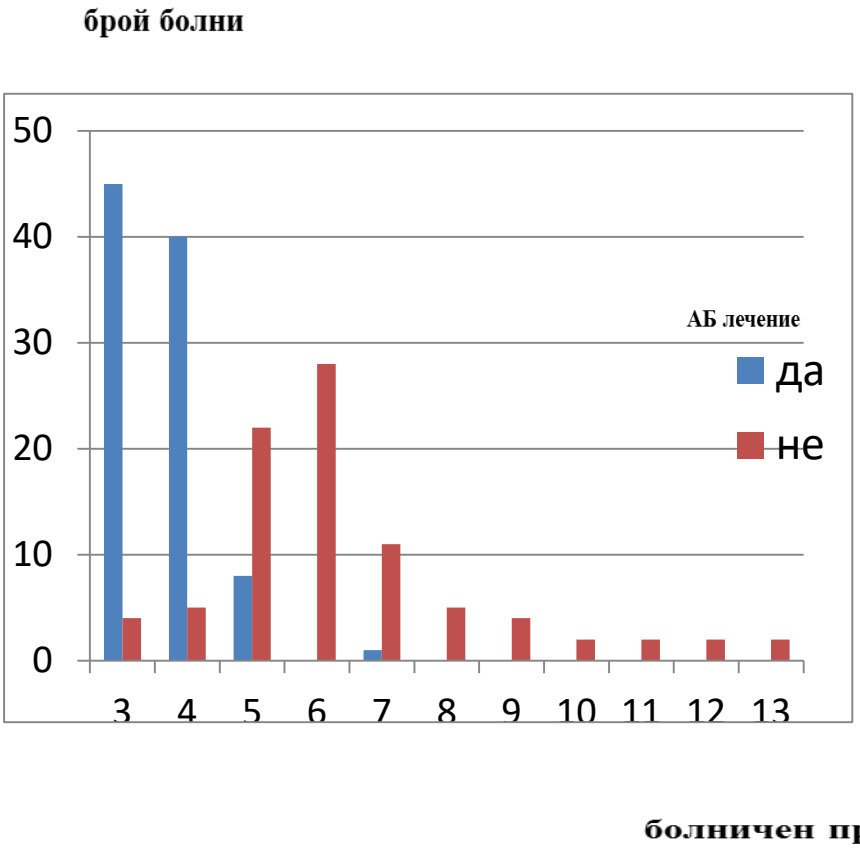
Таб. 21. Разпределение на болните в зависимост от антибиотичното лечение (АБ).

Както е видно от таблица 22 и фигура 8, 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. 22. Болничен престой (в дни) в зависимост от антибиотичното лечение.



фиг.8

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. 23).

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. 23. 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. 24 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

24 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. 24 b 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.

„Когато експериментът е успешен, не го повтаряй!“

Лабораторен закон на Файт

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. 9 a, b).



a) **b)**

Фиг. 9. Имунохроматографски тест за кампилобактер a) положителен, b) отрицателен.

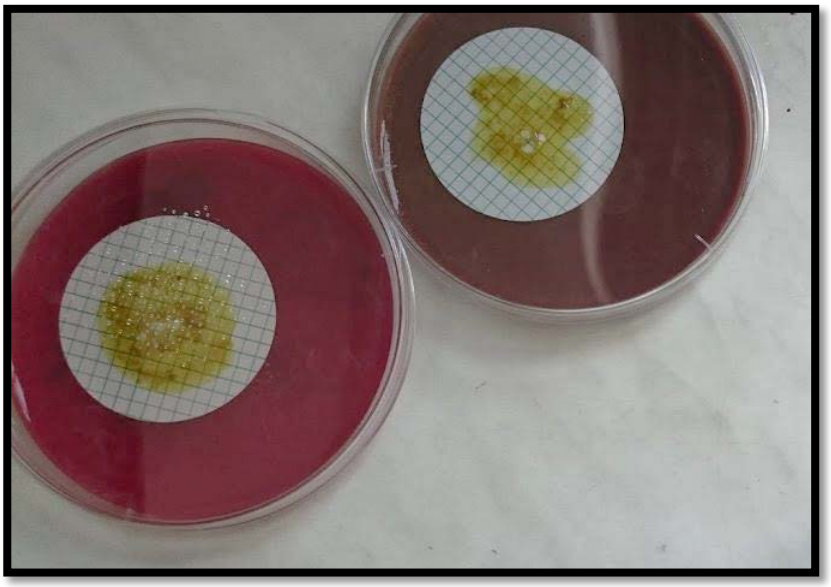
Получените резултати показаха сравнително висока честота на кампилобактериозата сред хоспитализираните деца с ентероколити. Почти ¼ от изследваните от нас болни бяха позитивни за чревната инфекция.

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*. 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.

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. 10).



Фиг. 10. 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. 11).

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. 12).



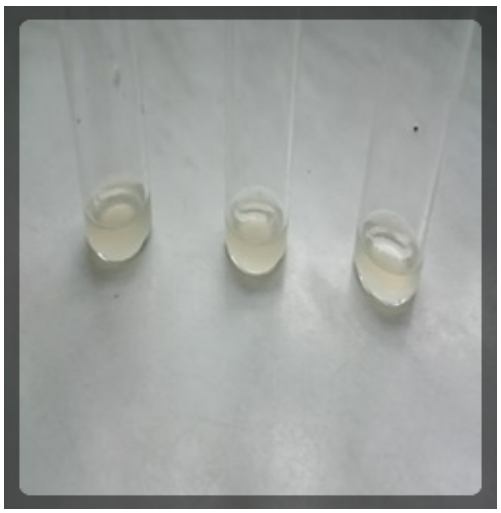
Фиг. 11. Култура *C. jejuni* на обикновен кръвен агар.



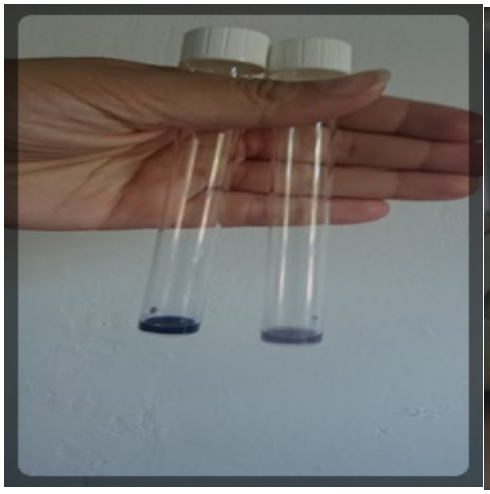
Фиг. 12. Култура *C. jejuni* на селективна среда Karmali Campylobacter Agar.

- **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 и 6 референтни 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. 13 и 14).



a.



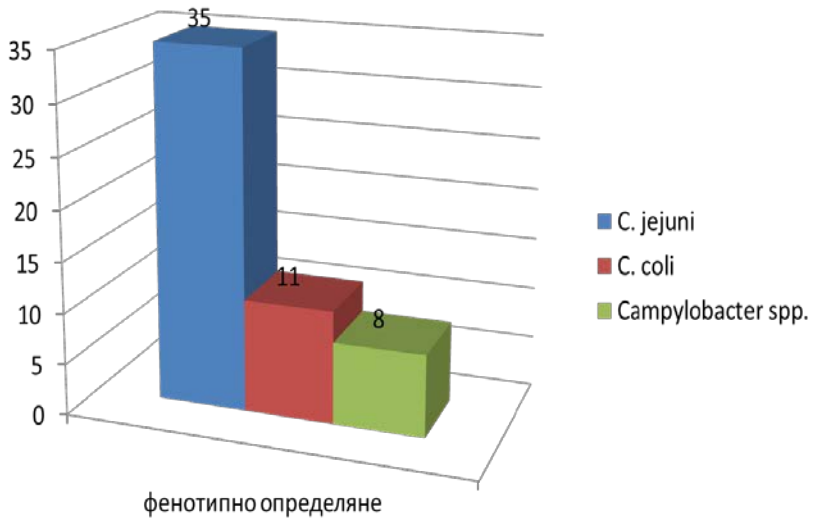


b. **c.**

Фиг. 13. Тест за хидролиза на натриев хипурат. а) След двучасово инкубиране на 37˚С пробите са накапани с нинхидрин. b) Положителен тест за хидролиза на натриев хипурат. с) Отрицателен тест за Хидролиза на натриев хипурат.



Фиг. 14. Положителен тест за хидролиза на индуксил ацетат. Наблюдава се промяна на цвета в синьо.



Фиг. 15. Резултати от фенотипно определяне на изолати *Campylobacter* spp.

Тоест от всички 118 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.15). 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˚ С, 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˚ С.

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.

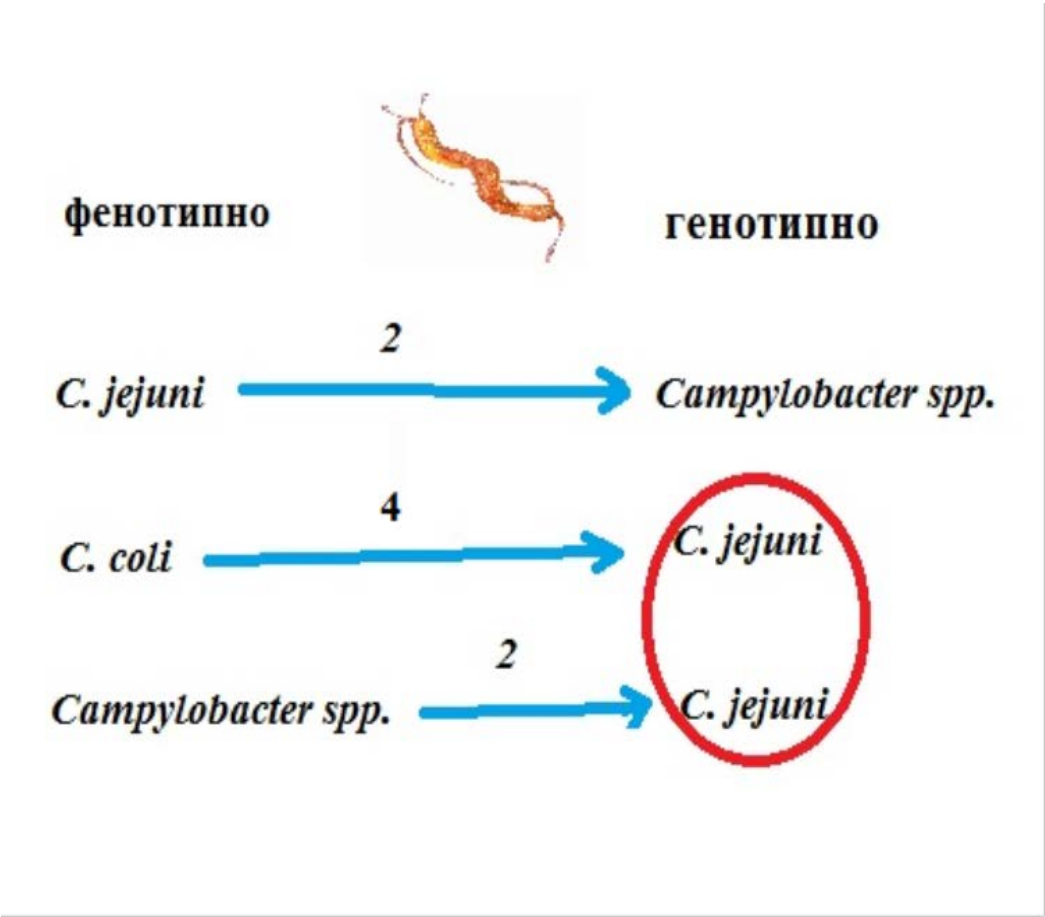
• Multiplex PCR анализ за идентификация и диференциация на *C. jejuni / coli* от култура

От видовете *Campylobacter* - *C. jejuni* и *C. coli* са със специален клиничен интерес. 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, hip*O* 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*.

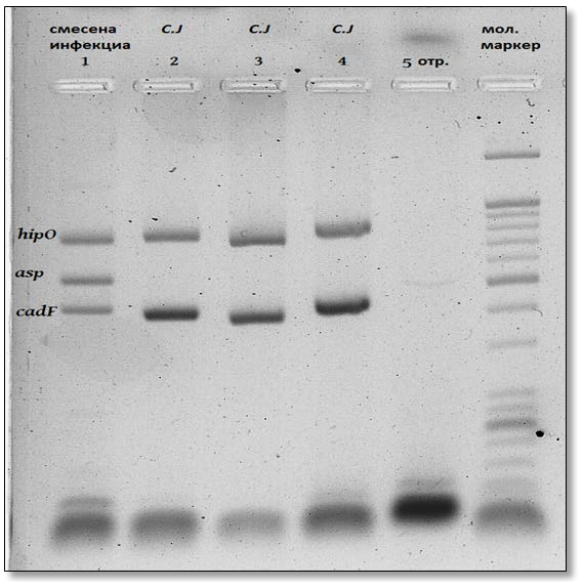
Резултатите от молекулярно-биологичната диференциация на *C. coli* и *C. jejuni* се различават с тези от биохимичното определяне при 8 от клиничните изолата (фиг. 16).



Фиг. 16. 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 17. 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. 17. 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.

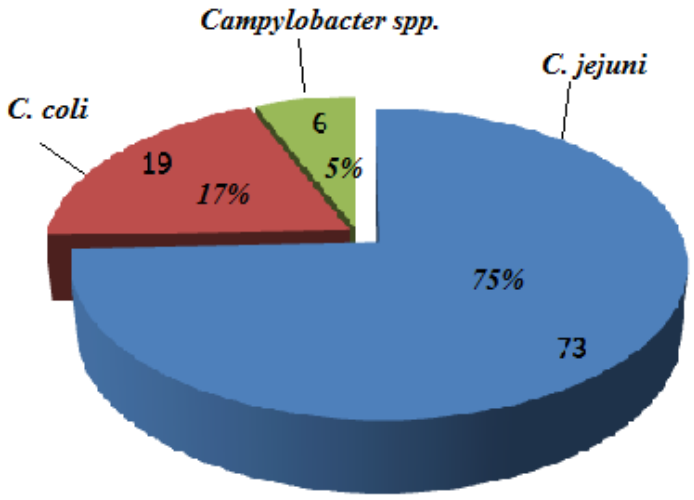
От изложените данни става ясно, че молекулярно-биологичното диференциране на *C. jejuni / coli* е по-надеждно от фенотипното. Препочъчваме Multiplex PCR като високочувствителен и специфичен потвърдителен метод за изолати *Campylobacter* spp. и едновременно успешно диференциращ *C. jejuni* и *C. coli*. 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. 18). Всяка една от пробите е изследвана и културелно за потвърждаване резултатите на молекулярно диагностичния метод.

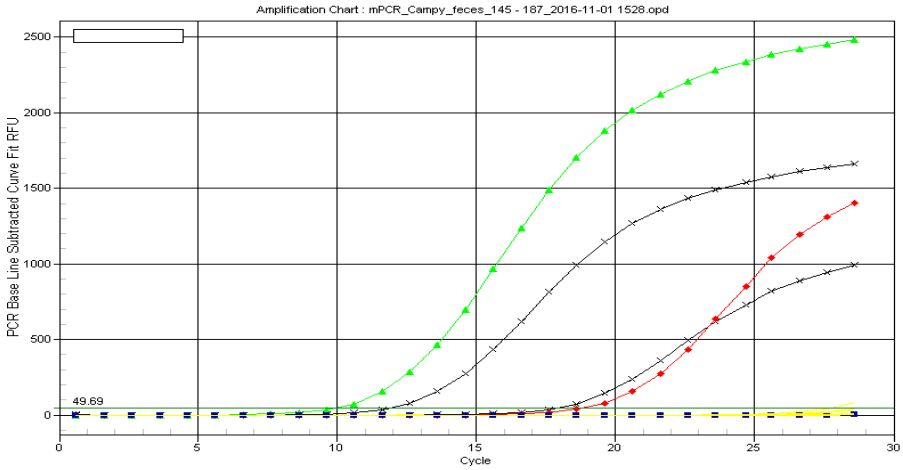


Фиг. 18. Резултати от Eva Green Real-time mPCR за 112 проби на хоспитализирани болни с диариен синдром в СБАЛИПБ.

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*.

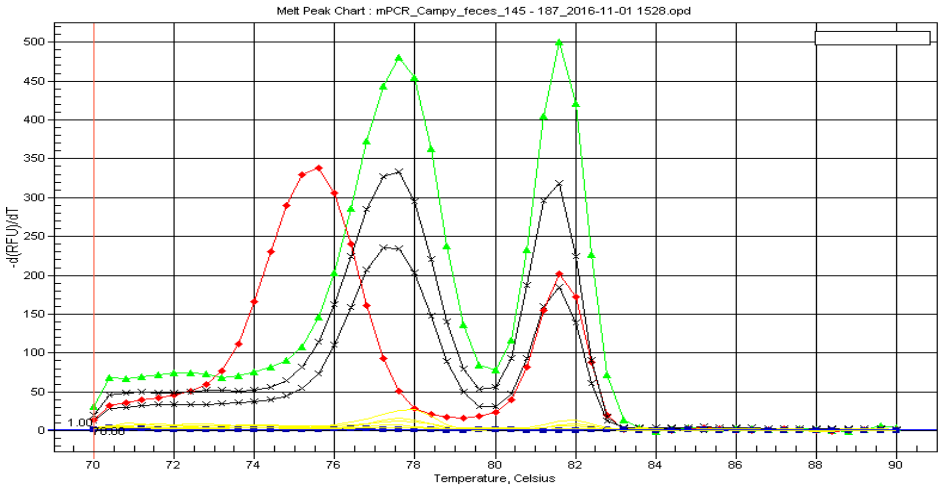
Интерес представлява сравнително по-високата честота на *C. coli* (17%) сред нашите болни, в сравнение със средната стойност изолирана в ЕС (около 10%). Тези данни обаче са в съзвучие с даваните от българските автори данни за превалиране на заразеността от *C. coli* в бройлерите и бройлерните стада у 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.19 и 20). 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. 19. 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.*

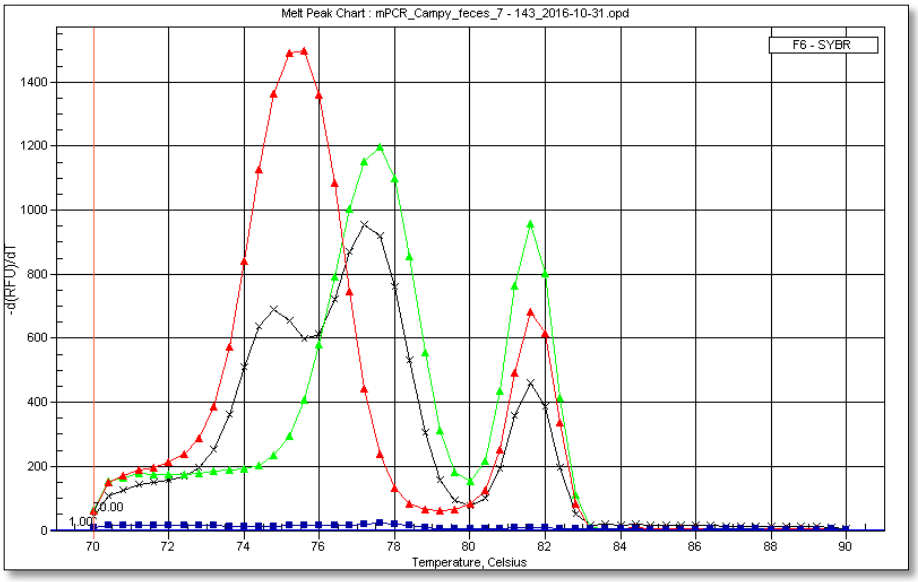


Фиг. 20. Резултати от Real-time mPCR за откриване на *Campylobacter* в проби фецес. Наблюдават се положителни проби за *C. jejuni*, както и отрицателни проби за *Campylobacter spp.:*

- 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. 21).



Фиг. 21. 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 кампилобактер 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 %.

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 25 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

25 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

25 b)

Таб. 25. 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 щ
а
м
о

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.

Научни съобщения във връзка с дисертационния труд

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, 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.

5. 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.

6. **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.