

Д-р Мария Павлова, дб

д-р Валери Велев, дм

# **КАМПИЛОБАКТЕРИОЗИ**

## **КЛИНИЧНИ И ЛАБОРАТОРНИ ОСОБЕНОСТИ**

София, 2019

## Съдържание

Рецензия от доц. Виктория Лефтерова, дм .....	5
Рецензия от доц. Иван Н. Иванов, дм .....	7
<b>Въведение</b> (М. Павлова, В. Велев).....	9
<b>История на кампилобактериозите</b> (М. Павлова)	
<b>Биологична характеристика</b> (М. Павлова)	
<b>Епидемиология</b> (М. Павлова)	
<b>Патогенеза на кампилобактериозата</b> (В. Велев)	
<b>Клинично протичане на кампилобактериозата</b> (В. Велев)	
<b>Лабораторна диагностика на кампилобактериозите и идентификация на <i>Campylobacter</i></b> (М. Павлова)	
<b>Молекулярно-генетични методи за идентификация на <i>Campylobacter</i></b> (М. Павлова)	
<b>Имунохроматографски метод</b> (В. Велев)	
<b>Патогенетично лечение</b> (В. Велев)	
<b>Етиологично лечение</b> (В. Велев)	
<b>Антибиотична резистентност</b> (М. Павлова)	
<b>Превенция</b> (В. Велев)	

© д-р Мария Павлова, дб – автор, 2019

© д-р Валери Велев, дм – автор, 2019

Национален център по заразни и паразитни болести

ISBN 978-...-...-...-...

**Рецензия**  
**от доц. Виктория Лефтерова, дм, завеждащ отдел**  
**„Микробиология“ НЦЗПБ – София**

Предложеният ми за рецензия монографичен труд е съставен от двама автори работещи в областта на микробиологичните и клинични особености на чревните инфекции с акцент върху кампилобактериозата. Книжното тяло е с обем 106 стандартни страници, 228 литературни източника, от които 24 на кирилица; 15 от литературните източници са публикации на авторите, което доказва активното им участие в изработването на този научен труд.

Ентеропатогенните бактерии са причинители на остри инфекциозни диарии, които са глобален здравен проблем тъй като всяка година се регистрират близо 1,7 милиарда случаи на пациенти с диарийен синдром. Това показва актуалността на този труд, особено като се има в предвид, че в международен мащаб кампилобактериозата е най-честата бактериална чревна инфекция. За жалост у нас проблемът с кампилобактериозата е слабо проучен, активният надзор над инфекцията е непълен, а от клинична гледна точка най-често се разчита на самоограничаване на заболяването. В представеният ми за рецензиране труд авторите описват в биологичен и медицински план проблема, дават представа за историческия план в работата по откриването и диагностицирането на инфекцията и закономерно достигат до съвременните молекулярно-генетични и интимни механизми на заболяването. Авторите са изследвали над 120 щама *Campylobacter* с различен произход – клинични, животински и референтни. Идентификацията е извършена най-напред скринингово чрез имунохроматографски комерсиални тестове, а по-късно верифицирана чрез микроскопски, културелни и молекулярно-генетични методи. Авторите описват два мултиплени PCR – метода за изолиране и диференциране на *Campylobacter jejuni/coli*. Културелните и биохимични методи са онагледени със схематичен и снимков материал улесняващ възприемането на диагностичните

техники. Впечатляваща е високата степен на изолируемост на *Campylobacter spp.* – 33%. Разгледана е внушителна извадка от 520 деца хоспитализирани с диарийен синдром, като при над 30% от тях е доказана кампилобактериоза. Описано е клиничното протичане на заболяването, някои характерни усложнения във флоридния стадий на болестта, като основните клинични показатели са нагледно изобразени графично и обработени статистически. Доказано е безспорно предимството от ранно започване на етиологично лечение, което скъсява диарийният синдром и намалява наполовина болничния престой.

**Предвид гореизложеното, препоръчвам издаването на представеният ми за рецензиране монографичен труд под авторството на Мария Павлова и Валери Велев, редактирано от Валери Велев.**

София, 23.IV.2019 г.

## Рецензия

**от доц. Иван Николаев Иванов, дм, доктор по микробиология, НЦЗПБ – София**

*Campylobacter spp.* се счита за най-честият причинител на остри бактериални гастроентерити в света, а основен симптом на кампилобактериозата е инфекциозната диария. Във връзка с това представеният ми за рецензия монографичен труд представлява ценно помагало за клинично-диагностичната работа на българските микробиолози, инфекционисти, педиатри и всички които се интересуват от проблемите на кампилобактериозата.

Представеното ми за рецензиране книжно тяло на монографичния труд е съставено от 106 стандартни страници, с 228 референции от водещи български и международни автори. Трудът е изготвен от двама съавтори работещи в областта на инфекциозната чревна патология – д-р Мария Павлова и д-р Валери Велев. Ценността на този научен труд идва от факта, че в него е включен богат материал от собствените научни разработки на двамата автори, както в областта на културелната и молекулярно-генетична диагностика на инфекцията, така и в областта на нейното клинично протичане и съвременно терапевтично поведение.

Проучени са 520 деца с остра инфекциозна диария за над 5-годишен период. От тях 35% са диагностицирани с кампилобактериоза чрез скринингов имунохроматографски метод, който по-късно е потвърден културелно и/или молекулярно-генетично. Изключително ценно е описанието на внедрените и оптимизирани два PCR – базирани метода за изолация и диференциране на *Campylobacter jejuni/coli*. Лабораторните диагностични методи са детайлно описани и онагледени със снимков и графичен материал, което е отлична предпоставка за използването им от всички интересувачи се колеги в техните лаборатории. Проспективното проследяване на голям брой болни деца в болнична среда дава възможност детайлно да се опише клиничната картина на заболяването. Ценни са

двата представени случая на клинични усложнения при доказана кампилобактериоза – пурпура на Schonlein-Henoch и реактивен артрит.

Като висок принос на авторите оценявам и техните проучвания върху етиологичното лечение на кампилобактериозата. Същевременно, те отлично са систематизирали и съвременните познания за патогенетично лечение – главно проблема за рехидратация, което ще позволи на българските клиницисти качествено да се погрижат за своите пациенти с остра чревна патология.

**Предвид гореизложеното, препоръчвам издаването на представеният ми за рецензиране монографичен труд под авторството на Мария Павлова и Валери Велев, редактирано от Валери Велев.**

София, 17.IV.2019 г.

## ВЪВЕДЕНИЕ

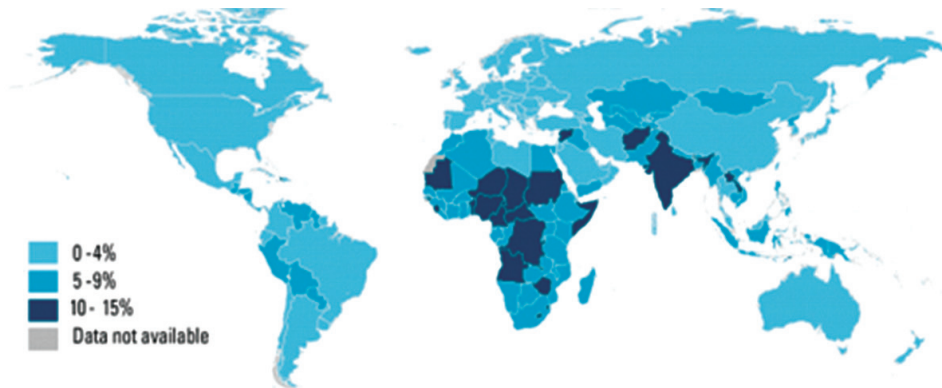
Ентеропатогенните бактерии са причинители на остри инфекциозни диарии, които са глобален здравен проблем тъй като всяка година се регистрират близо 1,7 милиарда случаи на пациенти с диарийен синдром. Инфекциозните диарии се предават по фекално-орален механизъм, протичат с лек до умерено тежък гастроентерит и / или ентероколит, но понякога с животозастрашаващи усложнения. Дехидратацията свързана с тях е една от водещите причини за смъртност при деца под 5-годишна възраст. В развиващите се страни са основната причина за хоспитализация на пациенти и разходи за здравеопазване.

*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 et al., 2012; Vila et al., 2016*).

### Диарийни заболявания по света

Инфекциозната диария е водеща причина за заболяемост и смъртност при децата в световен мащаб (*Martines et al., 1991; Gomi 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 орална рехидратация до които обаче достъпът в икономически изостаналите страни е все още неадекватен (*Boschi-Pinto et al., 2008*).

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



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

(Guarino et al., 2008; Friesema et al., 2012; Atkinson et al., 2012).

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. 2).



Фиг. 2. 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 превалят заболелите от мъжки пол (144,34 мъже срещу 114,71 жени на 100 хил. души за 2009 г.).

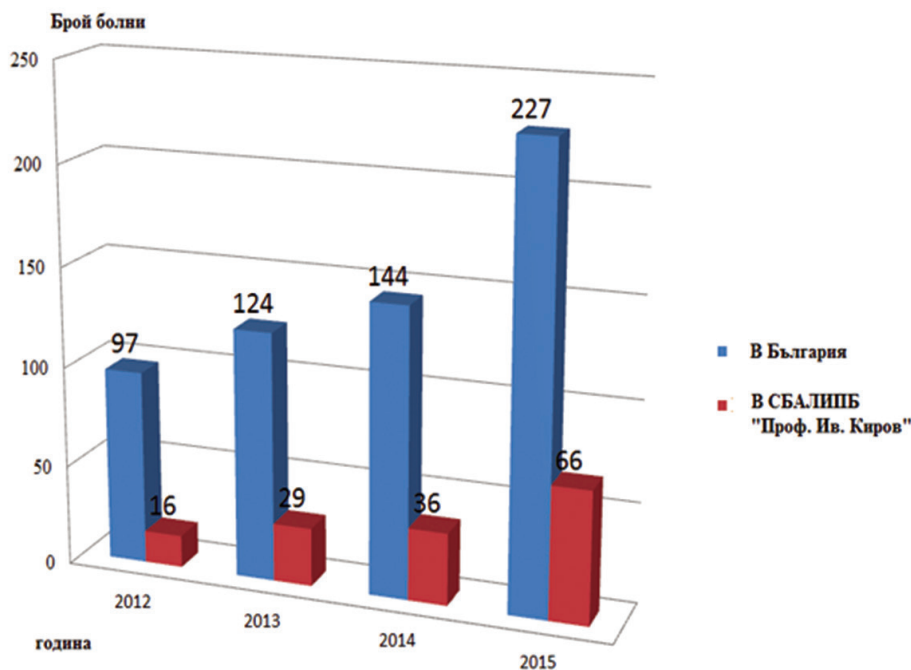
### Диарийни заболявания в България

В България най-засегнати от чревни инфекции са децата до 9 г. възраст, със своеобразен пик във възрастта 0–4 г. (заболеемост 3311,14‰ за 2014). При децата и младежите на възраст 5-19 г. заболеемостта спада, като в отделните групи варира между 958,09 и 244,10‰. (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 регистрират официално (Nedkova et al., 2008; EFSA Journal, 2013).

Салмонелозите са най-често срещаните бактериални чревни инфекции в детската възраст в България. През последните 15 години се наблюдава намаляване на регистрираната заболеемост от салмонелни инфекции в страната, но ежегодно има плавно покачване на случаите на кампилобактериоза (Ivanova et al., 2010; Велев, 2017). Шигелозите все още се нареждат на второ място, а след тях по-честота следват йерсиниозите и ешерихиозите. При нашите проучвания се оказва, че честотата на болните с кампилобактериоза е многократно по-висока сред диарийно болните, отколкото се подозира. В рамките на 4 години успяхме да докажем почти трикратно нарастване честотата на кампилобактериозата с целенасочено търсене. На фиг. 3 се вижда, че докато през 2012 г. СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ е съобщил само 16,5% от случаите на кампилобактериоза в България, то през 2015 г. на нашата работа се дължи доказването на 31% от случаите



на кампилобактериоза в държавата (Велев и сътр., 2016; Велев, 2017; Павлова, 2016).



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

За жалост все още в България адекватен активен надзор и систематични данни за инфекцията с *Campylobacter* практически липсват. Това до голяма степен се дължи на факта, че в микробиологичните лаборатории в страната диагностиката на кампилобактериозите се negliжира. Поради това най-често и спорадичните случаи и епидемичните взривове се пропускат или не се докладват (Boyanova et al., 2004; Nedkova et al., 2008; Ivanova et al., 2010).

## ВЪВЕДЕНИЕ

През 1886 г. немско-австрийският педиатър и професор Escherich, съобщава за наблюдението на микроорганизми, наподобяващи кампилобактери във фекални проби на деца с диария (Murray, 2002). Стокман и McFaydean през 1913 г., идентифицират микроорганизмите *Campylobacter* (тогава наречени *Vibrio*) в тъканите на фетуси на недоносени овце (Altekruse, et al., 2007). Едва през 1957 г. King описва изолирането на *Vibrio* микроорганизми от кръвни проби на деца с диария. 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 от фецес (Levy, 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, 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 колиформни (Bokkenheuser, 1970). Едва през 1972 г., *Campylobacter* spp. са изолирани от фекални проби от пациенти с диария (Kist, 1985).

У нас през 1983 г. доц. Мая Марина и проф. Тягуненко успешно изолират *C. jejuni* от фекална проба на дете с ентероколит. Това е първият до момента в страната случай на изолиран кампилобактер от човек. До тогава успешно се изолират *C. coli* и *C. fetus* от животни (Марина, 1985; Боянова и сътр., 1987).

Днес хранителните инфекции, причинени от представителите на род *Campylobacter*, са с честота 12.79 на 100 000 души, като са на второ място след *Salmonella* (14.92‰), последвани от *Shigella* (6.26‰), *Cryptosporidium* (2.67 ‰), шига-токсин продуциращи на *Escherichia coli* O157 (STEC O157) (1.20 ‰), шига токсин продуциращи *E. coli* различни от O157 (0.57 ‰), *Yersinia* (0.36‰), *Listeria* (0.27‰), *Vibrio* (0.24 ‰), и *Cyclospora* (0,03 ‰) (Friedman et al., 2001, Ailes et al., 2008, WHO, 2008. *Campylobacter Fact Sheet* № 255, *EFSA Journal*, 2009).

## БИОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

### Таксономия и класификация

Представителите на род *Campylobacter* принадлежат към семейство *Campylobacteriaceae* (Goossens et al., 1990; Skirrow 1998). Това семейство на бактерии обхваща два тясно свързани рода *Campylobacter* и *Arcobacter*. Род *Campylobacter* понастоящем се подразделя на 17 вида и 6 подвида.

Най-често съобщаваните при човешките инфекции са *C. jejuni* (подвид *jejuni*) и *C. coli*., докато *C. lari* и *C. upsaliensis* са докладвани много по-рядко. Видът *C. jejuni* се подразделя на два подвида – *C. jejuni* подвид *jejuni* и *C. jejuni* подвид *doylei* (Марамски и сътр., 2009; Persing, 2004).

Докато диагностиката на инфекцията се е основавала изключително на културелни методи с използване на селективна среда, изглежда, че над 95% от кампилобактериозите са причинени от *C. jejuni*. Въпреки това, с подобрения в методите за изолиране и идентифициране, други свързани с тях видове, като например *C. upsaliensis* (Lastovica et al., 2002; Lauwers et al., 1991), *C. lari* (Kiehlbauch et al., 1991), *C. fetus* *nogbug fetus*, *C. jejuni* *nogbug doylei*, *C. concisus* (Vandamme et al., 1992), *Arcobacter butzleri* и *A. skirrowii* са били изолирани от пациенти с диария (Dediste et al., 1998; Vandamme et al., 2005).

Включвайки новооткритите видове на род *Campylobacter* в *International Journal of Systematic Bacteriology* е публикувана следната класификация:

- I. *Campylobacter fetus* ssp. *Fetus*  
*Campylobacter fetus* ssp. *Venerealis*
- II. *Campylobacter hyointestinalis*
- III. *Campylobacter jejuni* ssp. *Jejuni*  
*Campylobacter jejuni* ssp. *Doylei*
- IV. *Campylobacter coli*
- V. *Campylobacter laridis*
- VI. *Campylobacter upsaliensis*



VII. *Campylobacter cinaedi*

VIII. *Campylobacter fennelliae*

IX. *Campylobacter cryaerophila*

X. *Campylobacter nitrofigilis*

XI. *Campylobacter spurotum*

*Campylobacter spurotum biovar spurotum*

*Campylobacter spurotum biovar bubulus*

*Campylobacter spurotum biovar fecalis*

XII. *Campylobacter mucosalis*

XIII. *Campylobacter concisus*

В род *Campylobacter* са включени следните таксономични видове:

***C. jejuni***, който се разделя на на два подвида:

– ***C. jejuni subsp. jejuni*** – главен причинител на диарийни заболявания при човека и е установен като нормален обитател в стомашночревния тракт на редица животни, използвани за храна – птици, говеда, прасета, кози. *C. jejuni subsp. jejuni* също е причинител на септицемии, менингити, аборти при човека и сериозни невролгични и автоимунни заболявания като синдром на Guillain-Barre, Schonlein-Henoch пурпура и др. При животните *C. jejuni subsp. jejuni* може да причини гастроентерити и хепатити (Велев и сътр., 2015; Snelling et al., 2005; Humphrey et al., 2007).

Някои от основните фенотипни разлики между подвидовете биват:

– ***C. jejuni subsp. doylei*** е изолиран само при човека от стомашни язви, фецес и кръв. Той се отличава от *C. jejuni subsp. jejuni* по това, че не редуцира нитратите до нитрити.

– ***C. coli*** – се среща в 5–10% от случаите на диарийни заболявания, причинени от *Campylobacter*, като в някои региони достига 40%. Може да причини септицеми и аборти при човека. При животните се свързва с хепатит. *C. coli* е близко родствен с *C. jejuni*, като те се различават биохимично по теста хидролиза на натриев хипурат, при която *C. coli* дава отрицателна реакция. Срещат се обаче и щамове *C. jejuni* подвид

*jejuni*, които не хидролизират натриев хипурат (Snelling et al., 2005).

– ***C. lari*** е вид, причиняващ гастроентерити и септицемии при хората. Изолиран е от фекални проби на чайки, принадлежащи към род *Larus*, откъдето идва и името му (Snelling et al., 2005).

– ***C. upsaliensis*** – изолиран е от хора с диарийни заболявания, септицемии, спонтанни аборти и хемолитико - уремичен синдром. Този микроорганизъм се отнася към групата на каталазо-отрицателните или даващи слабо положителна реакция кампилобактерии.

Видовете *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis* са наречени „термофилни“, тъй като оптималната им температура на растеж е 42°C.

– ***C. concisus*** – фенотипно и генетично много различен от останалите видове, първоначално е изолиран при периодонтити, както и при случаи на диарийни заболявания при човека.

– ***C. curvus*** – друг вид, който се свързва с периодонтални заболявания, описани са и редки случаи на диарийни заболявания при човека и септицемии.

– ***C. fetus*** – този вид се разделя на два подвида – *C. fetus* подвид *fetus* и *C. fetus* подвид *venerealis*. Представлява сериозен икономически проблем за ветеринарната медицина, тъй като причинява аборти при овце, говеда с последващо безплодие. *C. fetus* подвид *fetus* причинява диарийни заболявания, септицемии, както и аборти и при човека (Schmidt et al., 1980).

– ***C. lanienae*** – е изолиран от фецеси на безсимптомни работници в кланици. Необходими са по-задълбочени проучвания за установяване разпространението на този вид при различните видове животни като свине, овце, говеда, домашни любимци и други. *C. lanienae* е много близко родствен до *C. hyointestinalis* подвид *lawsonii* и фенотипно е трудно да се разграничат (Snelling et al., 2005).

– ***C. gracilis*** – е доста различен от останалите кампилобактери, неподвижен е, расте в анаеробна атмосфера и е

единствения оксидаза отрицателен вид от род *Campylobacter*. Срещат се при белодробни и дълбоки мекотъканни инфекции при човек, перитонити, бактериемии (*Snelling et al., 2005*).

– *C. hominis* – е неподвижен и растящ в анаеробна атмосфера вид. Изолиран е от фекални проби на хора, без признаци на диарийни заболявания и се предполага, че е част от нормалната флора в устата на човека.

– *C. helveticus* и много близко родствения с него *C. upsaliensis* са установени, както при здрави, така и с диарийни заболявания кучета и котки.

– *C. hyointestinalis* – се разделя на два подвида – *C. hyointestinalis* подвид *hyointestinalis*, изолиран от хора с диарийни заболявания, също така от здрави и с диария свине и говеда. *C. hyointestinalis* подвид *lawsonii* главно е изолиран от стомаси на свине и се свързва с улцеративни заболявания. Характерно за него е, че продуцира сяроводород на тройно захарен агар.

– *C. rectus* – причинява периодонтити и гингивити при човека. Изолиран е и при белодробни абсцеси. Не расте в микроаерофилна среда, само в анаеробна.

– *C. mucosalis* – не е изолиран от хора. Причинява пролиферативен ентерит при свине. Расте в анаеробни условия.

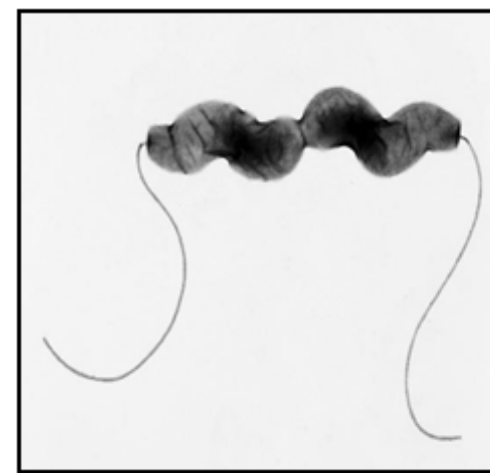
– *C. sputorum* с три биовара – биовар *sputorum* (каталаза и уреаза отрицателен) се среща в кореновите канали на зъбите, като е изолиран и при случаи на диарийни заболявания, абсцеси и кожни лезии. Останалите два биовара – *bubulus* и *paraureolyticus* нямат отношение към човешката патология (*Schmidt et al., 1980*).

– *C. showae* – се среща в устната кухина на човека. Изолиран е от зъбните плаки и инфектирани коренови канали. Характерно за този вид е, че има до пет униполярно разположени ресни.

Нови видове класифицирани в род *Campylobacter*, през последните години, са следните: *C. canadensis* и *C. avium*, изолирани от птици; *C. peloridis* от фецес на хора, диализна течност и стриди; *C. cuniculorum*, *C. lari subsp. concheus* и *C. lari subsp. lari*, изолирани от зайци (*Snelling et al., 2005*).

## Морфология

Името на род *Campylobacter* идва от гръцката дума *campylos*, която означава „извит“. *Campylobacter spp.* са малки грам-отрицателни пръчки, които се отличават със значителен полиморфизъм. Наблюдават се клетки с S-образна форма или спираловидни бактерии (0,2-0,5  $\mu\text{m}$  широки и 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  дълги) със заострени краища (*Snelling et al., 2005*). Притежават единични полярни камшичета в един или двата срещуположни полюса на бактериалната клетка, придаващи характерно винтообразно движение (Фиг. 4). Не образуват капсули или спори (*Gazaigne et al., 2008*). Под въздействие на антибиотиците в селективните среди понякога се наблюдават много дълги клетки или вериги от неразделящи се бактерии. Клетъчната стена на представителите на род *Campylobacter* е изградена от липополизахарид с химичен състав, подобен на грам-отрицателните чревни бактерии. Той съдържа O-странична верига, липид А и сърцевинна верига (*Rautelin et al., 1999; Nakari et al., 2008*).



Фиг. 4. Електронномикроскопска снимка на *C. jejuni*, показваща спиралната морфология и полярни камшичета на микроорганизма, ROSLIN (The University of Edinburgh).

## Метаболизъм

Бактериите от род *Campylobacter* не ферментират или окисляват въглехидрати. Те черпят енергия от усвояването на аминокиселини и междинни трикарбоксилни киселини. *Campylobacter* spp. са оксидаза и каталаза положителни. Въпреки това те са особено чувствителни на супероксиди и свободни радикали. Повечето щамове на *C. jejuni* могат да хидролизират хипурат, което осигурява основата за едно от клиничните изпитвания за разграничаване на *C. jejuni* от другите термофилни кампилобактери (Murray, 2002). Въпреки това е възможно да се идентифицират погрешно щамове *C. jejuni*, които нямат способността да хидролизират хипурат (Blaser et al., 2008; Nachamkin et al., 1998). Две отделни финландски проучвания показват, че хипуратнегативните щамове трябва да се верифицират с PCR анализ, който ще потвърди наличието или липсата на ген за хидролиза на натриев хипурат, независимо от фенотипната му изява (Olson et al., 2008; Guerrant et al., 2001).

*C. coli* расте оптимално при 35-37°C, но обикновено растежът е неуспешен, защото повечето клинични лабораторни протоколи изискват температура на инкубация 42°C. Поради възискателния характер на кампилобактерите, а също и трудностите, свързани със събиране, транспортиране и култивиране на тези бактерии все още много от случаите на кампилобактериози у нас остават неидентифицирани.

### Културелна характеристика

Кампилобактерните клетки са чувствителни към външни фактори, например кислород, сушене, замразяване, загряване, дезинфектанти, киселинни условия (pH < 5.0) и соленост. Растат сравнително бавно и са възискателни. Както вече беше споменато, видовете *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis* са наречени „термофилни“, тъй като имат оптимална температура на растеж 42–43°C. Останалите нетермофилни видове растат

добре при 37°C. Термофилните *Campylobacter* spp. са микроаерофили и изискват наличие на висока влажност и атмосфера на 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> и 85% N<sub>2</sub>. Такава атмосфера се осигурява по химичен път с газогенераторни пакети (газ-пак пакети) в херметически затворени анаеростати (джарове) в присъствие или не на палладиев катализатор, като се инициират от отварянето им или чрез добавяне на вода директно към газ-пак пакета. Някои от видовете като *C. sputorum*, *C. mucosalis*, *C. curvus*, *C. rectus* и *C. hyointestinalis* изискват анаеробна атмосфера с повишено съдържание на H<sub>2</sub> – 10% CO<sub>2</sub>, 6% H<sub>2</sub> и 84% N<sub>2</sub>. Те не растат в микроаерофилната среда, подходяща за термофилните кампилобактерии (Snelling et al., 2005).

През 1972 г. Dekeyser и Butzler разработват първия метод за изолиране на *Campylobacter* spp. от фекални проби, наречен мембанно-микрофилтрационен. Малките размери и активната подвижност на кампилобактерите позволяват преминаването им през мембрани с размер на порите 0,45–0,65 µm, като задържат съпътстващите ги гъби, бактерии и едри частици от пробата. Но този метод се оказва твърде тромав и през 1977 г. Martin Skirrow описва проста директна техника, която представлява пряко култивиране на фекални проби върху кръвен агар с лизирана 5–10% конска или овнешка кръв и съдържащ антибиотиците *Vancomycin*, *Polymyxin B* и *Trimethoprim*. Петритата се инкубират при 43°C в микроаерофилна атмосфера, съдържаща 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 85% N<sub>2</sub>. От тогава са направени няколко методологични модификации, като по този начин се позволява универсална приемственост на такива варианти на стандартните методи, които позволяват на диагностичните микробиологични лаборатории рутинно да изолират *Campylobacter* spp. от фекални проби (Skirrow et al., 2000; Skirrow et al., 1993).

Bolton и сътр. установяват, че активният въглен е ефективен заместител на кръвта. Те предлагат селективна среда без добавяне на кръв. Освен въглен средата съдържа натриев дезоксихолат, Cefazolin, феро-сулфат, натриев пируват и натриевметабисулфид.

Подобрените методи за изолиране довеждат до публикуването на първия доклад за честотата на кампилобактериозите при хората, който води до лавина от епидемиологични изследвания и вследствие на това до осъзнаването, че *Campylobacter spp.* са значителен проблем за общественото здраве, както за развитите, така и за развиващите се страни (Killeen et al., 2007; Bartels et al., 2007).

За успешно изолиране на *Campylobacter spp.* от клинична проба фецес критични са селективната среда и оптималните условия на околната среда. Има редица селективни среди, препоръчани за изолиране на *Campylobacter spp.* (Табл. 1).

Някои проучвания показват, че за да се постигне най-добра изолация на *Campylobacter spp.* от фекални проби, е добре да се използват паралелно две различни селективни среди, в това число или CCDA или CSM, като една от медиите, може да увеличи растежа на *Campylobacter spp.* с 10 до 15 %. Антимикробни средства като cefalotin, присъстващи в състава на някои селективни среди, са инхибитори на някои щамове на *Campylobacter* и поради това среди съдържащи cefalotin вече не се препоръчват за първично изолиране (Murray et al, 2007).

Табл. 1. Селективни среди за изолиране на *Campylobacter spp.*

ХРАНИТЕЛНА СРЕДА	СЪСТАВ
Blood-Free, Charcoal-Based Selective Medium (CSM)	Колумбия ага + суплементи: vancomycin, cefoperazone, cikloheksimid
Campy-BAP	Бруцела агар + суплементи: trimethoprim, polymycin B, cefalotin, vancomycin и amfotericin B + 10 % овнешка кръв. *) cefalotin може да инхибира някои видове кампилобактер.
Campy, Blood-Free, Karmali Agar	Въгленова среда със следните суплементи: cefoperazone, vancomycin и amfotericin B
Campy-Blood-Free CAT	Суплементи: cefoperazone, teikoplanin, amfotericin B. Препоръчва се за изолиране на <i>C. upsaliensis</i> .
Campy Cefex Agar	Бруцела агар + конска кръв + cefoperazone и cikloheksimid
Campy-CVA	Бруцела агар + суплементи: cefoperazone, vancomycin и amfotericin B + 5 % овнешка кръв.
CCDA	Модифициран въгленов цефоперазон дезоксихолат агар. Без кръв. По-малко инхибира от другите селективни медии.
Modified Skirrow's Media	Колумбия ага + 7% конска кръв + суплементи: vancomycin vancomycin, trimethoprim и polymycin B.



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 изследвания на кампилобактериозата с основно звено в Утрехт, 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 et al., 2001).

*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, 1984), домашни птици (Stephens et al., 1998), кучета (Misawa et al., 2002), коне (Hong et al., 1989) и др. У голяма част от животните обаче те не винаги причиняват заболяване.

### – 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 птиците черва и затова са изолирани от множество диви и домашни видове (Stephens et al., 1998; Newell et al., 2000). Най-разпространените видове сред птиците, особено сред бройлери и кокошки – носачки са *C. jejuni* и *C. coli*. (Stoyanchev et al., 2007; Cox et al., 2002a). Често са колонизирани и червата на пуйки, гъски, патици, щрауси (Cox et al., 2000).

*Campylobacter* е широко разпространен и сред много видове диви птици (Broman, 2003). Според някои автори обаче бактериите са разпределени неравномерно между видовете, като колонизацията много зависи от типа хранене на съответния вид птици (Waldenström 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 et al., 2004; Stoyanchev et al., 2007).

### – Други животни

При говеда и овце превалява *C. jejuni*, а *C. coli* се изолира сравнително рядко. При свинете съотношението между двата вида е обратното и честотата на *C. coli* е значителна (Guõremont 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 et al., 2004; Sandberg 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 et al., 2012*). Според редица автори в Съединените щати около 15% от случаите на кампилобактериоза могат да бъдат приписани на контакта с домашни любимци (*Stehr-Green et al., 1987*).

### 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% (*Марамски и сътр., 2090; Kramer et al., 2000*). 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 т. нар. кръстосано замърсяване (*Quinones-Ramirez 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 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 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 et al., 1999*).

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

Доказано е, че мухите имат важно епидемиологично значение като механичен преносител на *Campylobacter*, като имат основно значение за замърсяването на хранителните продукти през летните месеци (*Gordon et al., 2005*).

### 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 се 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 et al., 2011*) (фиг.5).



Фиг. 5. 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 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% (*Марамски и сътр, 2009; Daskalov et al., 2012*). 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 *S. coli* над тези на *S. jejuni* в бройлерите у нас (*Гюров и съавт., 2011*).

## 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 епитела на червата поради бактериални, вирусни или паразитни патогени е най-често срещаната причина за диария – тук спада и инфекциозната диария с причинител *Campylobacter* spp. Епитела на храносмилателната система е защитен от увреди чрез редица механизми, които представляват т. нар. стомашно-чревна бариера, но и тя може да бъде нарушена. От това следва ексудация на серум в лумена и неадекватна абсорбция (*Hodges et al., 2010*). Инфекциозната доза необходима за развитие на кампилобактериоза е сравнително ниска. Според някои проучвания тя е около 500-800 колония-образуващи единици (cfu), а съвременни автори описват дори по-малка доза, между 100 и 500 cfu (*Alther et al., 2011*). За сравнение, при *Salmonella* или патогенни щамове на *E. coli* дозата е около 10<sup>5</sup> cfu (*O'Brien, 2014*). В литературата има интересни проучвания според които дозата необходима за да се развие клиника е различна в зависимост от вида *Campylobacter*. 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 *S. jejuni* е около 500 cfu, а от *S. coli* – двойно повече (*Allos, 2011*). Това е и в основата на една от хипотезите обясняващи далеч по-широкото разпространение на *S. jejuni* в сравнение с

*C. coli* (Parkhill et al., 2000). Повечето автори са единодушни, че *Campylobacter* атакува долните отдели на стомашно-чревния тракт (йейюлум, 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 et al., 2010) Една от причините за слабия напредък по отношение патогенезата на кампилобактериозата е липсата на универсален животински модел за работа in vivo (Yao et al., 1997).

## КЛИНИЧНО ПРОТИЧАНЕ НА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗАТА

### Чревна кампилобактериоза

Основните видове причиняващи заболяване при хората са *Campylobacter jejuni* и *C. coli*, като най-често инфекцията причинява остър диаричен синдром. Смята се, че *Campylobacter* инфекцията се проявява в около 1% от популацията на Европа и Северна Америка (Valörie et al., 2005; Havelaar et al., 2013).

Един от първите автори започнал големи проучвания върху клиничното протичане на кампилобактериозата, особено у деца, е белгиецът Butzler. Самостоятелно и в екип с изследователи от институт „Пастър“ 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 et al., 1973, 1982, 2004; Brandt 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. Сигмодоскопията обикновено разкрива нарушения на лигавицата – от хиперемия и оток с или без хеморагии до мукозни раззвявания. Според проучванията на Butzler, патологичните примеси, кръв и слуз, се появяват в изхожданията на 2-3 ден

от началото на болестта (Butzler et al., 1973, 2004). Някои автори имат виждане за по-дълъг инкубационен период – до 7 дни (Ketley, 1995), а други описват персистиране на диарията при малки деца и над 10 дни (Schonberg-Norio et al., 2006). Blaser описва в работите си и тежко протичащи ентерити причинени от *Campylobacter* при които болните имат над 8-10 изхождания за денонощие (Blaser et al., 1982). Тежкопротичащи кампилобактериози са описвани и у нас (Боянова и съавт., 2004; Ковалцова и съавт., 2010; Велев и съавт., 2015, 2017). 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 лабораторно доказана кампилобактериоза, най-голяма е честотата на заболелите във възрастовата група 1-3 години. 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 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 et al., 2006; Chen et al., 2011). Както е видно от таблица 8 диарията е най-интензивна при най-малките пациенти. При нашите проучвания върху 182 хоспитализирани деца с лабораторно доказана кампилобактериоза, диарията беше най-интензивна при най-малките болни. Във възрастовата група 0-1 г. 22 (12,2%) от болните имаха между 5 и 10 изхождания за 24 часа и същият процент болни – над 10 изхождания. В групата на 2-5 годишните заболяването също протичше със сравнително интензивен диарийен синдром – 45 (24,9%) от децата бяха с между 5 и 10 изхождания за денонощие. При децата в категорията 6-10 години преваляраха между 3-5 изхождания за денонощие – 31 (17,1%), а у най-големите нямаше нито едно дете с над 10

изхождания за 24 часа. 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. Само 10 (5,5%) от наблюдаваните от нас деца имаха диарийни изхождания без патологични примеси (Велев., 2017; Velev et al., 2018).

Макар и рядко кампилобактериозата без диария също е възможна и създава сериозни диагностични затруднения (Vaidya 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 и съавт., 2004; Zautner et al., 2014). Съществуват и някои хипотези на единични колективи, че кампилобактериозата може да има роля в развитието на глютеневата ентеропатия в детска възраст (Sabayan et al., 2007).

#### – 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 et al., 1973, 1979, 1982; Mishu-Allos 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 et al., 2013). В нашето проучване всички 182 деца бяха фебрилни в различна степен. Преобладаваха стойности в диапазона 38,1–39°C – 85

(46,4%) от децата, а над 39,1°C – 87 (48,1%). Само 11 (5,5%) от болните деца бяха субфебрилни през целия период на боледуването (Велев, 2017)

#### – Коремни болки

Един от водещите симптоми наред с диарията и фебрилитета, който сочат всички автори, са силните коремни болки (Butzler J. et al., 1973, Ковалъова, В., и сътр., 2010; Chen J., et al., 2011). 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 причинителя (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 (Ковалъова, В., и сътр., 2010; Vaidya G., et al., 2014). В нашето проучване също установихме сравнително висока честота на болковия синдром - при 124 (68,1%) от болните се срещаха коремни болки, като при 20 (11,0%) тези болки се съчетаваха временно и с тenezми. От децата в диапазона 2-5 години имахме данни за коремни болки при 59 (32,6%), а в групата 6-10 години 36 (19,9%) бяха с коремни болки. В определени случаи коремните болки бяха толкова интензивни, че преди или по време на престоя на детето в клиниката минимум веднъж се наложи документирана консултация с детски хирург, а в някои случаи и об-

разна 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 (Велев В., 2017).

#### – 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). 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%) имаха немотивирани повръщания. Съгласни сме с описаната от някои автори тенденция, броят на повръщанията да е по-голям в по-ранна възраст (Велев В., 2017).

#### – 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 стадий се описват адинамия и безапетитие (Butzler et al., 1973, Blaser et al., 1982; Gillespie 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 et al., 2001; Ковалъова и сътр., 2010; Chen et al., 2011).



При нашите болни 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 сравнително рядко и то само в комбинация с фебрилен пристъп (Велев, 2017).

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

## 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 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 et al., 1986; Man et al., 2011). Днес е доказано, че термофилните видове *Campylobacter* се изолират много по-често от кръвта на болни хора отколкото *C. fetus* (Nielsen 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 честота-

та на бактериемията да е още по-висока е голяма (Samuel et al., 2004; Feodoroff, 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 някои автори повече от половината (Pacanowski et al., 2008). Доста автори описват целулитите като чест спътник на болни с бактериемия причинена от *Campylobacter*, като за това се „обвинява“ основно *C. fetus* (Gazaigne et al., 2008).

Съвременните проучвания сочат, че инфекции с *C. fetus* протичат рядко като чревна форма, бактериемията е водеща и най-често болните са имunosупресирани или възрастни, за разлика от инфекциите с *C. jejuni/C. coli*, протичащи най-често като ентерити (Gazaigne et al., 2008). Някои автори установяват сравнително висока смъртност при болните с бактериемия – между 10 и 15% (Fernández-Cruz et al., 2010), но други дават доста по-оптимистични данни – около 4% (Nielsen 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 et al., 2009; Gupta et al., 2015), менингити, менингоенцефалити, включително у новородени (Tsoni et al., 2013; Ritchie et al., 1987), перитонеални инфекции, абсцеси, панкреатити (Adedeji et al., 2000; Kobayashi et al., 20014). Чести са инфекциите на пикочните пътища, много по-рядко на дихателните пътища при имунокомпрометирани болни (Blaser et al., 1986; Tee 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 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 (*Zautner 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 прекарвали агресивна форма на чревната инфекция с последващ сепсис (*Simor et. al., 1986*). Други видове (*C. rectus* и *C. curvus*) са свързани с преждевременно раждане и ниско тегло на новороденото (*Mendz 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 et al., 1982; Rhodes 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 (*Ковалъова и сътр., 2010*). Уточнено е, че някои серотипове на *C. jejuni* предизвикват GBS много по-често от други (*Lardone et al., 2016*).

### – Хиперсензитивни васкулити

Тази форма на васкулит засяга най-малките по размер кръвоносни съдове (артериоли, вени и капилляри), 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* – *Hepoch*, уртикария – васкулит, нодозен периартериит и др. (*Велев и сътр., 2015; Apostolopoulos et al., 1999*).

По време на нашите проучвания при хоспитализирани деца с кампилобактериоза наблюдавахме типичен случай на пурпура на *Schoenlein* – *Hepoch* в хода на чревната инфекция.

### Клиничен случай:

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, контактено, адекватно. Интоксигирано, субфебрилно до 37.6°C. С хеморагичен обрив по торса, седалището и крайниците (фиг. 6). С белези на дехидратация. Корем – с меки стени, палпаторно болезнен перитумбиликално, 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. Нормални показатели от изследването на урината, без еритроцити в седимента. От микробиологичните и вирусологични изследвания се позитивира само имунохроматографският тест за кампилобактер. Изследването по-късно беше верифицирано културелно и чрез *Multiplex PCR*, като се определи щам *C. jejuni*.

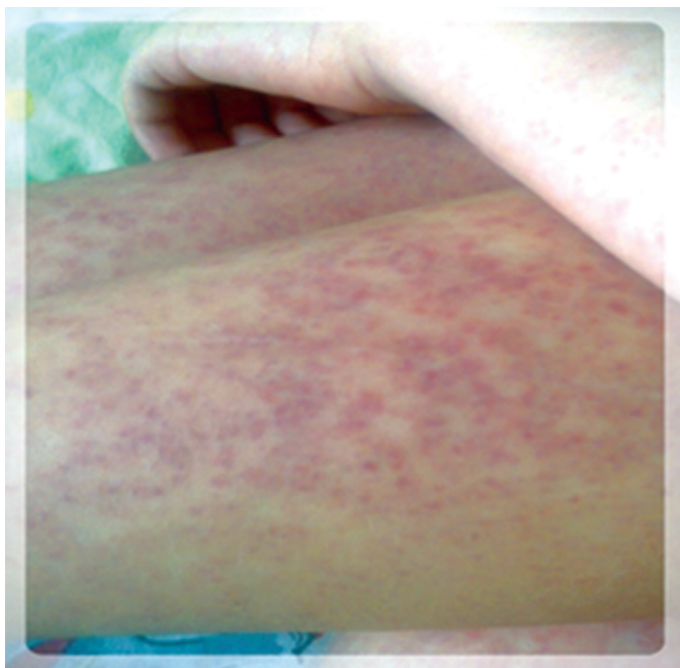
От данните до момента приехме, че се касае за кампилобактериоза в хода на която е настъпило усложнение – *Hepoch-Schoenlein* пурпура. Налице бяха и задължителните клинични критерии за хиперсензитивния васкулит – хеморагичен обрив без тромбозопения, коремни болки, ставен синдром.

Няколко часа след постъпването детето стана фебрилно до 38.5°C, в изхожданията се появиха примеси от кръв, а хеморагичният обрив започна бързо да конfluира, 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.

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. Контролната хемограма показва липса на левкоцитоза, тенденция към преодоляване на анемията и намаляване на СУЕ. 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. 6. Хеморагичен обрив по долни крайници при дете с кампилобактериоза и Непосch-Schonlein пурпура (сн. В. Велев, 2014).

## ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА НА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА *Campylobacter spp.*

Повечето причинители на хранителни токсикоинфекции, гастроентерити и ентероколити предизвикват сходни клинични симптоми, включително и кървави диарии. Диагнозата на кампилобактериозите се определя с изолиране на патогена от свежи фекални проби или извършване на различни комерсиални имунологични или молекулярни тестове на клинична проба фецес, за да се определи наличието на патоген, специфични антитела срещу него или негова ДНК.

Четири основни диагностични методи позволяват откриване на инфекциите от *Campylobacter*:

1. фекална и кръвна култура
2. откриване на серумни антитела
3. откриване на антигени във фекални проби
4. молекулярно-генетични (молекулярно-биологични) методи

### Събиране и транспортиране на проби

За културелно изследване на *Campylobacter spp.* на пациенти със симптоми на стомашно-чревна инфекция е необходима свежа фекална проба, която до 2 часа трябва да бъде предоставена в микробиологичната лаборатория. Ако се очаква забавяне на повече от два часа, пробата трябва да се събира с помощта на тампони и да се транспортира в полусолидна модифицирана транспортна среда Cary-Blair. Модифицираната Cary-Blair среда съдържа редуциращи агенти и е най-подходящата транспорта среда, както за *Campylobacter spp.*, така и за други чревни патогени. Получените проби следва да се обработват веднага, или се съхраняват при 4°C, но не повече от 3 дни. За да се избегнат температурни разлики, пробите трябва да се съхранява в хладилник само когато не могат да се обработят в същия ден, в противен случай трябва да се

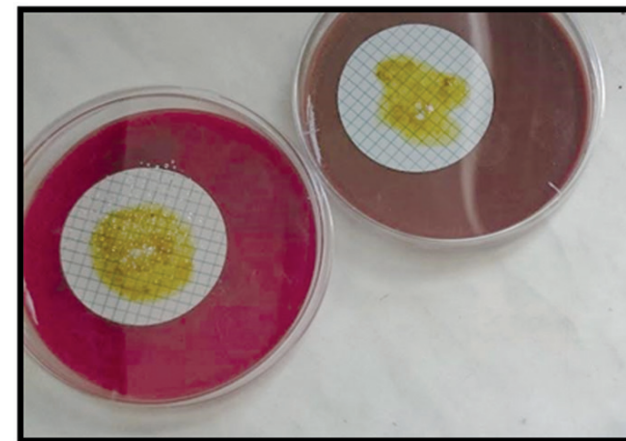
съхраняват при стайна температура. Когато пробите се предоставят в лабораторията и са съхранявани при 4°C, трябва да се темперират до стайна температура преди обработката, за да се избегне температурен шок (Павлова, 2016a; Павлова, 2016b; CDC, FoodNet, MMWR., 2009).

### Мембранна микрофилтрационна техника

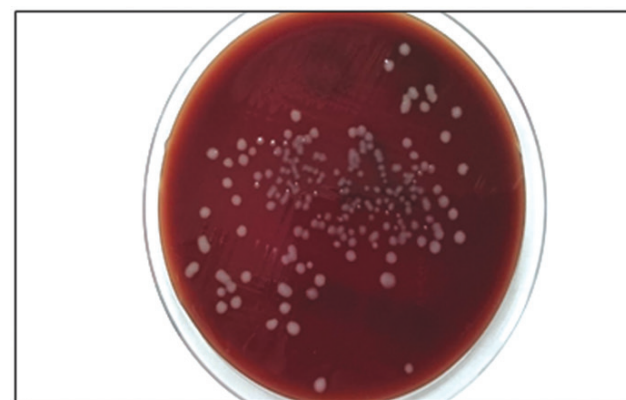
Мембранната филтрационна техника е първият неселективен метод, приложен за изолиране на *Campylobacter spp.* от фекални проби. Методът е разработен от Steele и McDermott, като премахва необходимостта от селективна среда. Този метод е много полезен за изолиране на чувствителни на антибиотици от селективните среди видове *Campylobacter*. Методът не изисква използването на скъпи селективни среди, което го прави достъпен за лаборатории с по-малко ресурси. Изпълнението на метода е следното: върху обикновен кръвен агар със стерилна пинсета се поставя мембранный филтър (0.45 или 0.65 микрона) и върху него се накапват 10–15 капки от течна изпражнение (ако не е течна се разрежда в физиологичен разтвор), както е изобразено на фигура 7. Трябва да се внимава да не се позволи на суспензията да не попадне извън ръба на филтъра. 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 джар с микроаерофилна атмосфера при 42°C (Иванова, 1991; Sjogren et al., 1987; Nachamkin et al., 2008). През всяка пораз на мембраната преминава по една клетка *Campylobacter*, поради което се наблюдава растеж на отделни колонии, както е изобразено на фигура 8 (Павлова, 2016).

*C. upsaliensis* е другият най-чест причинителна диарийни заболявания след за *C. jejuni* и *C. coli*. Той обаче е чувствителен към повечето антимикуробни вещества, съдържащи се в селективните среди и неговото изолиране е възможно само с филтрационна техника.

Тъй като представителите на род *Campylobacter* са термофилни, температурата за оптималния им растеж е по-висока



Фиг. 7. Посявки на течни проби фецес на обикновен кръвен агар с 10% дефибринирана овнешка кръв по мембранен способ с нитроцелулозни мембрани (сн. М. Павлова, 2015)



Фиг. 8. Култура *C. jejuni* на обикновен кръвен агар (сн. М. Павлова, 2015)

от температурите, често използвани в клиничните лаборатории 35–37°C. Понякога се наблюдава растеж при 37° С на някои редки видове от *Campylobacter*. Въпреки това, оптималната температура на растеж на *Campylobacter* е 42°C с помощта на селективни среди за изолиране и/или филтрационна техника (Павлова, 2016; Иванова, 1991; Nachamkin et al., 2008).

## Фенотипна идентификация

Кампилобактерните клетки произвеждат сиви, плоски, неправилни по форма колонии, често розово-бежови. Някои колонии, като тези на *C. jejuni*, са сиви и леко мукозни, докато други колонии могат да проявяват т. нар. опашат ефект. Колониите могат също така да са кръгли, изпъкнали, блестящи, с размери 1–2 µm в диаметър. Поради това, е важно да се извършва оцветяване по Грам на съмнителните колонии, за да се избегне евентуално погрешна идентификация на *Campylobacter spp.*

Видими колонии на *Campylobacter spp.* обикновено се появяват на твърди хранителни среди в рамките на 24 до 48 часа при 42°C. Малък е броят положителни проби, получени от продължително инкубиране. Затова се препоръчва инкубация до 48 часа за рутинна диагностика.

Среда за набогатяване не се препоръчва за изолиране на патогена, защото заразените хора обикновено отделят 106–109 CFU *Campylobacter* на всеки грам от изпражненията.

*Campylobacter spp.* са биохимично неактивни. Всички, освен *C. gracilis*, продуцират оксидаза. Всички редуцират нитратите до нитрити, освен *C. jejuni subsp. doyley*. Хидролизата на натриев хипурат е типична за вида *C. jejuni*, като с този тест той се отдиференцира от *C. coli*, който дава отрицателна реакция. Срещат се обаче и щамове *C. jejuni subsp. jejuni* (около 1,6%), които не хидролизират натриев хипурат (Totten, 1987). В тези случаи най-точни се явяват генетичните методи, свързани с доказване на хипуриказа – *hipO* ген при *C. jejuni* и аспартокиназа – *asp* ген при *C. coli* (Snelling et al., 2005; Linto et al., 1997).

Повечето от видовете продуцират каталаза като тези, които са каталаза отрицателни сформират „каталазо-отрицателна групата“, а именно това са: *C. mucosalis*, *C. sputorum* биотип *sputorum*, *C. sputorum* биовар *paraureolyticus*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. upsaliensis*, *C. hominis*, *C. helveticus*. По-подробна биохимична диференциация на *Campylobacter spp.* е представена в таблица 2.

Табл. 2. Биохимични характеристики на кампилобактери

Биохимичен признак	<i>C.jejuni</i>	<i>C.jejuni subsp. doylei</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsalie</i>
Каталаза	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+
Хидролиза на хипурат	на +	V	-	-	-
Индоксил ацетат	+	+	+	-	+
Растеж на 42°C	+	-	+	+	+
Растеж на Мак Конки агар	+	-	+	+	-
Чувствителност на nalidixic acid	V	S	S	R	S
Чувствителност на cefalotin	R	S	R	R	S

Днес се знае, че чувствителността или резистентността към nalidixic acid и cefalotin, може да даде противоречиви резултати и не е надежден метод за идентифициране на *C. jejuni* (Murray et al., 2007; Daskalov et al., 2012).

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

Необходима е чиста култура за потвърждаващите тестове, които извършихме:

- Каталазен тест: върху предметно стъкло се поставя едно йозе от изпитваната култура и капка 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Оксидазен тест: малко количество бактериална маса



от съмнителни колонии се разтвива върху филтърна хартия, навлажнена с 1% р-р. 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 37°C за 2 часа. След което бавно се накапват 200 µl 3,5 % нинхидрин, като се образува двуфазен разтвор. Отчита се след 5 до 10 минути. Положителна реакция: тъмно лилаво / синьо. Отрицателна реакция: бледо жълто или сиво.

– Хидролиза на индоксил ацетат: върху диск, предварително напоен с индоксил ацетат, се разтвива 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 (*ISO 10272-1:2006 AND ISO/TS 10272-2:2006*).

При нашата работа диференцирахме фенотипно 62 фецеца с оказаните методи. Съответно 38 наши щамове, както и 24 от изпратените за потвърждаване изолати на *Campylobacter spp.* от различни микробиологични лаборатории в страната. Всички изолирани от нас щамове, както и тези за потвърждаване бяха каталаза и оксидаза позитивни. От резултатите на извършените тестове за хидролиза на натриев хипурат и индоксил ацетат 45 (45/62) щамове показаха положителна реакция за хидролиза на натриев хипурат и 13 (13/62) щамове показаха положителна хидролиза на индоксил ацетат, докато при 10 (10/62) щамове двата теста бяха отрицателни.

Фенотипно бяха определени 22 (22/39) изолата като *C. jejuni* и 8 (8/39) изолата като *C. coli* и 9 (9/39) изолата като *Campylobacter spp.* От изпратените за потвърждаване щамове *Campylobacter spp.* 22 (22/24) щамове биохимично са определени като *C. jejuni* и 2 (2/22) щамове като *C. coli*. При 56 (56/114)

проби фецеца растеж липсваше, тези проби са отчетени като културелно отрицателни за *Campylobacter spp.* Имаме и 17 (17/114) проби фецеца съхранявани при –20°C, които не изследвахме културелно (*Павлова, 2016*).

### Серологично изследване

Установяването на кампилобактериоза може да се осъществява и чрез използването на 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 класа 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 ниска. В допълнение, съпоставяйки серумни проби, с най-малко четирикратни промени в титъра на антитела показват остра кампилобактериоза (*Strid et al., 2001*). Обикновено IgG антителата остават високи за по-дълги периоди от време, до няколко месеца при някои пациенти поради което определянето на титъра на IgG самостоятелно е недостатъчно за диагностициране на остра инфекция (*Linton et al., 1997*). От друга страна, повишени титри на IgA и IgM обикновено се откриват при пациенти с активна кампилобактерна инфекция (*Gilbert et al., 2003*). Редица автори описват и фалшиво-положителни резултати дължащи се на кръстосана реактивност с антигени на други Грам-отрицателни бактерии (*Kuhn et al., 2012*).

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА *Campylobacter spp.*

### Полимеразно верижна реакция (PCR)

PCR-базираните анализи позволяват бърза и точна идентификация и диференциация на няколко чревни патогени до ниво вид от една-единствена проба фецес. Някои от тях, като Real-time PCR анализите, позволяват отчитането на резултатите в релано време. При множество проведени проучвания, в които различни PCR анализи са сравнявани за чувствителност и специфичност, е установено, че повечето от генетичните методи са надеждени (*Debruyne et al., 2008*). Доказано е, че конвенционалните културелни методи са по-малко чувствителни сравнение с Multiplex PCR анализите. Но цената и обема на работа на тези методи, както и липсата на бактериален изолат за допълнителни анализи, са посочени като недостатъци в сравнение с техниките за култивиране (*Павлова, 2016; Meinersmann et al., 1997; Bessède et al., 2011*).

### МОЛЕКУЛЯРНИ МЕТОДИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *C. coli* / *jejuni*

*C. jejuni* и *C. coli* са най-честите причинители за гастроентерит при хората в развитите страни. Въпреки че средите на Skirrow са ефективни за лабораторно изолиране на кампилобактери от човешки изпражнения, то те са по-малко подходящ за изолати от животни и околната среда, поради наличието на контаминирани видове.

Независимо подобрените методи за култивиране на кампилобактери, все още има редица ограничения. Методите са бавни и в случаи на изследване на фекални проби се изисква до 48 часа за получаване на предполагаем изолат, който след това изисква потвърждение чрез използване на фенотипни методи. В случай на проби от храни, в които броят на

клетките може да е нисък сред голям брой друга конкурентна флора, се изисква набогатяване на културата в течни среди, за да се възстанови поне малък брой клетки преди посяването на твърда селективна среда. Това може да удължи процеса на откриване с до пет дни, необходими за постигане на резултат.

Ограниченията на културелните методи довеждат до разработването на алтернативни методи за откриване на кампилобактери в храни и фекални проби. Разработването на редица специфични за кампилобактерите тестове е улеснило идентифицирането на предполагаемите изолати *Campylobacter spp.*, което осигурява по-бърза видова диагностика в сравнение с конвенционалните тестове (*Giesendorf et al., 1992*).

Още с откриването си PCR анализът е повлиял върху почти всички области на биологията и по-специално е бил използван за откриване на микробни патогени в широка гама от видове проби. Първото приложение на PCR за специфично откриване на *C. jejuni* и *C. coli* е разработен през 1992 г. (*Lehner et al., 2000*). Анализът насочен към ген за флагелин, специфичен за двата вида *C. jejuni* и *C. coli*, и детектира успешно 30–60 бактерии в PCR реакция в контаминирани човешки фекални проби. Този доклад също демонстрира потенциала на PCR метода да открива много малък брой кампилобактерни клетки. Въпреки това, подготовката на пробите и използването на гел-електрофореза за откриване на продуктите на PCR реакцията, изискват манипулации, възпрепятстващи прехода на тези методи от научните изследвания до рутинните микробиологични лаборатории.

Адаптирането на PCR анализите в хибридираща микрочипа увеличава специфичността и чувствителността на откриване. Lawson и сътр. разработват панел от PCR – ELISA тестове, които използват при мащабно изследване за откриване на *Campylobacter spp.* при пациенти с гастроентерит (*Olsen et al., 2001*). Методът позволява идентификация и диференциация на *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* и *C. lari*. Резултатите от PCR – ELISA анализите са сравнени с конвенционалните методи за

култивиране и демонстрират, че методът открива кампилобактери в културелно-отрицателни фекални проби и по-важното е , че открива смесени инфекции с повече от един вид кампилобактер. Анализите са предоставили информация за вида, както и количеството му, които не се постигат с култура. Обаче авторите отбелязват, че PCR анализът е по-скъп и трудоемък метод, отколкото култивирането. Използването на такива анализи могат да се окажат полезни в бъдещи мащабни епидемиологични изследвания на кампилобактериози и да предостави доказателства за ролята на *Campylobacter spp.*, различни от *C. jejuni* и *C. coli*, в инфекциите при човешка.

Първият доклад на PCR анализ за откриване на кампилобактери в храни се извършва от Giesendorf (*Hänninen et al., 2003*). Описват PCR метод за бързото и чувствително откриване на *Campylobacter spp.* в пилешки продукти. Анализът се прилага за откриване на *Campylobacter spp.* в двете – естествено замърсени и изкуствено заразени проби на пилешко кожата с последващо набогатяване на културата от пробите в продължение на 18 часа в *Preston enrichment broth*. Анализът показва минимална граница на откриване от 25 CFU *Campylobacter spp.* на грам тъкан след 18 часово набогатяване. Използването на PCR за откриване на кампилобактер в храни е възпрепятствано от относително голям размер на пробата (25g в повечето рутинни процедури за изпитване) в сравнение с крайния обем на пробата в PCR анализа (1–5µL). За да замени конвенционалните методи на култивиране, PCR анализът трябва да има граница на откриване достатъчно чувствителна, за да може да се открие една единствена клетка *Campylobacter* в 25 g храна.

За биологично амплифициране на броя присъстващи клетки са използвани много PCR-базирани изследвания с набогатяване на културата преди прилагане на PCR анализа. Има много допълнителни доклади за PCR анализи за откриване на *Campylobacter spp.* в редица видове проби включително храни, води, и други проби от околната среда. Тези анализи могат да бъдат полезни като допълнение към обогатяването на културата, чрез намаляване на общото време на откриването, като два или повече дни.

В един от експериментите си, de Boer оценява култивирането, включително с обогатяване, с три различни RT-PCR метода за детекция. Взети са 962 проби от домашни птици и бройлери и са подложени на: детекция за *Campylobacter jejuni* чрез откриване последователността на консервативния ген *hipO*, детекция за *glyA*, ген отговарящ за *Campylobacter coli* и участък от 16S rDNA последователност насочен към *Campylobacter spp.* Последният е насочен към поне 4 термотолерантни кампилобактера: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* и *C. lari*. Сравнението на тези три PCR подхода със „златния стандарт“ култивиране с обогатяване има убедителни данни в подкрепа на RT-PCR – по-бърза и по-специфична диагностика. Молекулярната диагностика открива за около 2 часа почти четири пъти повече положителни уникални проби отколкото култивирането. При култивиране се позитивират 55 проби, а чрез молекулярните методи 215. Освен това, около 60% от уникалните проби при култивирането са открити само след обогатяване (*De Boer et al., 2015*).

Един от най-важните PCR-базирани методи за молекулярно генетична диагностика, който се използва в клиничната лаборатория е Real-time PCR-полимеразна верижна реакция или PCR в реално време. Вариант на този анализ може да бъде количествен PCR известен като qPCR (*Ferreira-Gonzalez et al., 2007; Killeen et al., 2007*). По-голямата част от клиничните приложения на тази техника е свързана с откриване и / или количествено определяне на ДНК или РНК на инфекциозни микроорганизми. Тези анализи се използват за бързо определянето в клиничната микробиология при идентифициране и количествено определяне на бактерии, вируси, гъби и паразити от различни клинични проби като

## КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА PCR-базирани АНАЛИЗИ

50



кръв, култура, урина, гръбначномозъчна течност, фецеси и други. Тези бързи PCR анализи се прилагат за идентифициране или изключване на клинично значими микроорганизми. Осигуряват ранно диагностициране с повишени чувствителност и специфичност, също така предоставят терапевтична информация за избора на антимикробни препарати и не на последно място, предоставят ценна за клиницистите прогностична информация (Willison et al., 2005). Резултатите от тези qPCR анализи могат да бъдат получени до часове, вместо за дни, нужни за традиционните микробиологично култивиране и изпитване на антибиотична чувствителност (Иванов, 2010). Особено ценни са за чувствителни и трудни за култивиране микроорганизми като *Campylobacter* spp., където вероятността да останат неоткрити чрез традиционните културелни методи е голяма. Освен това, количествените PCR анализи предоставят информация, която може да бъде от решаващо значение за контрол на антимикробната терапия (Bala et al., 2016). Real-time PCR и qPCR технологиите са революционни в клиничната медицина, предоставяйки бърза лабораторна информация, която може да спаси животи и да подобри качеството на лечение на пациентите (Carter et al., 2007; Vandamme et al., 1991).

Клиничните лаборатории често използват валидирани тестове наречени „home-brew“ анализи (домашно приготвени). Тези анализи са оптимизирани и валидирани на място, в изследователската или в клиничната лаборатория, като валидирането е трудоемък процес, отнемащ време. Анализ за детекция на кампилобактериози, който отчита *Campylobacter* spp. в над 99% от случаите на ентероколити при човека, би бил важен клиничен метод тъй като по-бързата и точна диагностика корелира с по-добра терапия и по-ниски разходи за здравеопазване.

Разработените Real-time PCR анализи за *Campylobacter* spp. са предназначени за осигуряването на бързо откриване и идентифициране на клинично значими агенти на инфекцията. Многобройни молекулни методи са описани в литерату-

рата, включително конвенционални PCR анализи, Real-time PCR анализи за различни *Campylobacter* spp. (Павлова, 2015).

До момента в нашата страна няма масово прилагани молекулярни клинични изследвания за кампилобактер, тъй като методите са ограничени от сложност, липса на специфично технологично оборудване, липса на обучен персонал и други технически въпроси, които са пречка за подобряване качеството на микробиологичните изследвания в българските микробиологични лаборатории.

В проведените от нас проучвания изолирахме ДНК от свежи култури и от проби фецес за два вида молекулярно-генетичен анализ, които бяха оптимизирани за нашата лаборатория.

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

Въведени и изпитани бяха три двойки праймери за идентификация и видова диференциация на щамове *C. jejuni* *C. coli*, а също така за доказване специфична ДНК в клиничен материал фецес. Праймерите описани от Nayak и сътр. и Linton и сътр. амплифицират консервативни гени: *cadF* (16SpДНК) ген – характерен за всички *Campylobacter* spp, *hipO*– хипуриказа ген – за *C.jejuni* и *asp* – аспартокиназа ген – за *C.coli*, чиито секвенции са представени на таблица 3 (Nayak et al., 2005; Linton et al., 1997).

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.

Всички PCR продукти при методите за доказване бяха разделяни чрез стандартна агарозна електрофореза или капилярна гел-електрофореза.

Чувствителността на метода беше определена чрез десетократни разреждания на ДНК от референтни щамове *C. coli* и *C. jejuni* разтворени в буфер. Чрез различните концентрации бактериална ДНК тествахме коя е най-ниската концентра-

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

Ген	Секвенция	ампцион	източник
<i>cadF</i> - F	<b>TTGAAGGTAATTTAGATATG</b>	400bp	<i>Nayak et al., 2005</i>
<i>cadF</i> - R	<b>СТААТАССТАААГТТГАААС</b>		
<i>hipO</i> - F	<b>GAAGAGGGTTTGGGTGGTG</b>	735bp	<i>Linton et al., 1997</i>
<i>hipO</i> - R	<b>AGCTAGCTTCGCARAATAACTTG</b>		
<i>asp</i> - F	<b>GGTATGATTTCTACAAAGCGAG</b>	500bp	<i>Linton et al., 1997</i>
<i>asp</i> - R	<b>АТААААГАСТАТСТГТСТГТСТГ</b>		

ция, 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: *Yersinia enterocolitica*; *Escherichia coli stx1d*; *E. coli O104*; *Shigella flexneri*; *Salmonella typhi*; *Clostridium difficile*; *Staphylococcus aureus toxC*. Като положителна контрола бяха използвани щамове: АТСС 33560 – *C. jejuni* и С-14.2 – *C. coli*.

Чрез апробирания от нас метод на базата на мултиплексна конвенционална PCR реакция потвърдихме идентификацията на 49 изолата, от които 39 (39/49) *C. jejuni*, 3 (3/49) *C. coli* и 1 (1/49) *Campylobacter spp.*, както и на 85 фенотипно определени щамове от колекцията на НЦЗПБ, от които 22 (22/85) *C. jejuni*, 9 (9/85) *C. coli* и 15 (15/85) *Campylobacter spp.* Интерес предизвиква идентификацията на една проба от смесен тип *C. coli / jejuni* (фиг. 8).

Резултатите от генетичната диференциация на *C. coli* и *C. jejuni* се различават с тези от биохимичното определяне

при 37 от колекционерските щамове и при 5 от клиничните изолата (табл. 4).

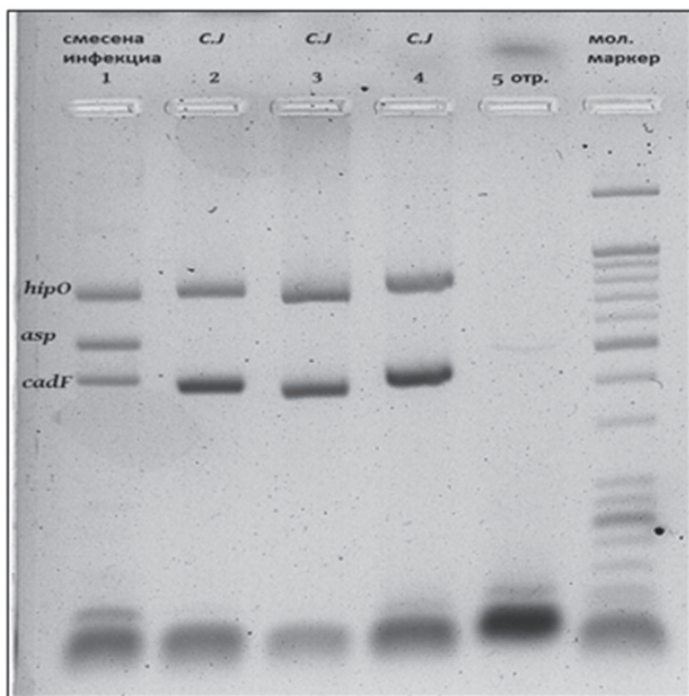
Три от изолатите, биохимично определени като *C. coli*, въз основа на положителни тестове за индоксил ацетат и отрицателни тестове за хидролиза на натриев хипурат и два изолата определени като *Campylobacter spp.*, които са показали отрицателни тестове за натриев хипурат и индоксил ацетат, генетично бяха потвърдени като *C. jejuni*, с амплификация на *cadF* и *hipO* гените *C. jejuni* притежава гена хипуриказа – *hipO*, но е възможно този ген да не се експресира и при фенотипно диференциране реакцията хидролиза на натриев хипурат да е фалшиво отрицателна (*Pavlova et al., 2016; Nayak et al., 2005; Linton et al., 1997*). Поради същата причина има разминаване във фенотипното и молекулярно диференциране на щамове от колекцията на НЦЗПБ.

Табл. 4. Резултати от Multiplex PCR за потвърждаване на клинични изолати *Campylobacter spp.*

Биохимична идентификация на клинични изолати (n = 49)	брой	Генетично определяне на клинични изолати	
<i>Campylobacter spp.</i>	3 (3/49)	<i>C. jejuni</i>	2 (2/3)
		отрицателен за <i>Campylobacter spp.</i>	1 (1/3)
<i>C. jejuni</i>	38 (38/49)	<i>C. jejuni</i>	34 (34/38)
		отрицателен за <i>Campylobacter spp.</i>	3 (3/38)
<i>C. coli</i>	7 (7/49)	<i>C. coli</i>	3 (3/7)
		отрицателен за <i>Campylobacter spp.</i>	1 (1/7)

От изложените данни става ясно, че генетичното диференциране на *C. jejuni / coli* е по-надежден метод от фенотипния. Ние препоръчваме Multiplex PCR метода като потвърдителен за изолати *Campylobacter spp.* и едновременно успешно диференциращ *C. jejuni* и *C. coli*.

Интерес правят получените генетични резултати за един от щамовете, който е фенотипно определен като *C. jejuni*, но резултатите от агарозната гел-електрофореза потвърдиха амплификация на трите гена – родов (*cadF*) и двата вида (*hipO* и *asp*), представени на фигура 9. На този етап тези резултати биха могли да се интерпретират като смесена кампилобактерна инфекция от *C. jejuni* и *C. coli*, но също така могат да бъдат представени и като замърсяване на ниво култура или ДНК.



Фиг. 9. Резултати от агарозна гел-електрофореза след Multiplex PCR анализ на щамове *Campylobacter* spp. На старт 1 се наблюдават амплифицирани родов и два вида гена, които са резултат за смесена инфекция. На стартовете 2, 3 и 4 – *C. jejuni*, старт 5 – отрицателна проба за *Campylobacter* spp.

### EvaGreen 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*, и **ceuE F/R**, амплифициращи специфичен регион (72bp) от ген *ceuE* за *C. coli*, са публикувани от Jun Kawase и сътр. Докато двойката праймери **camp F2/R2**, амплифициращи специфичен регион (108bp) от родов ген за *Campylobacter* spp. са публикувани от Botteldoorn N. и сътр., които изследват и доказват кампилобактери във фецеси от пилета. Секвенциите на праймерните двойки са представени на таблица 5.

Табл. 5. Секвенция на използваните праймери и големина на техните ампликони

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

Тъй като за първи път трите двойки праймери, описани по-горе, ще участват в обща PCR реакция, избраният PCR метод беше оптимизиран и адаптиран според условията на Референтна лаборатория „Чревни инфекции“ към НЦЗПБ. За целта беше оптимизирана температурата на анилинг



(Та) на Eva Green Real-time mPCR метода. Целта на оптимизацията е да се установи тази температура на хибридизация на праймерите, при която пиковите от амплификацията след Eva Green Real-time mPCR да са ясно разграничими родов от видов пик на амплифицирания продукт. За целта отново използвахме десетократни разреждания на ДНК от няколко различни проби (включително положителни и отрицателни контроли за *C. jejuni / coli*).

Приложихме и метода на Тагучи за успешно определяне на оптималните параметри за SYBR Green-базирани количествени PCR анализи. Количествените полимеразни верижни реакции (QPCR) са широко прилагани в молекулярната биология, например за скрининг на инфекциозни патогени като *Shigella spp.*; *E. coli*; *Salmonella spp.*; *Campylobacter spp.* и други. Тагучи методът спестява време, разходи и усилия при оптимизацията на qPCR анализи, които са базирани на анализи в реално време, където се отчитат резултати по време на всеки цикъл (*Thanakiatkrai et al., 2012*).

За определяне аналитична чувствителност mPCR метода бяха изготвени серия разреждания на 10-кратна бактериална суспензия от референтни щамове *C. jejuni* и респективно на *C. coli* във физиологичен разтвор. С 10 µl от всяко разреждане бяха изкуствено инокулирани фецеси, отрицателни за кампилобактер. От всяко 10-кратно разреждане бяха разсяти по 100 µl бактериална суспензия на обикновен кръвен агар с 10% овнешка кръв и култивирани при микроаерофилни условия на 42°C за 24 часа, с цел да се определят CFU / ml (единици образуващи колонии).

Определяне на аналитична специфичност на mPCR метода отново стана чрез подбрани ДНК от различни (хетероложни) микроорганизми като при Multiplex PCR – метода.

В рамките на част от нашето проучване чрез разработения метод бяха изследвани 69 проби фецес от хоспитализирани пациенти с остра диария на възраст 0–12 години. От тях 39 бяха положителни, като 36 (36/39) *C. jejuni*, 2 (2/39) *C. coli* една проба положителна едновременно за *C. jejuni* и

*coli*, представена на фигура 10. Също така бяха потвърдени 18 клинични изолата, всичките генетично бяха определени като *C. jejuni*. Амбулаторно изследвани бяха 14 проби фецес, от които само една беше положителна и генетично определена като *C. jejuni*. Всяка една от пробите е изследвана и културелно за потвърждаване резултатите на молекулярно диагностичния метод.

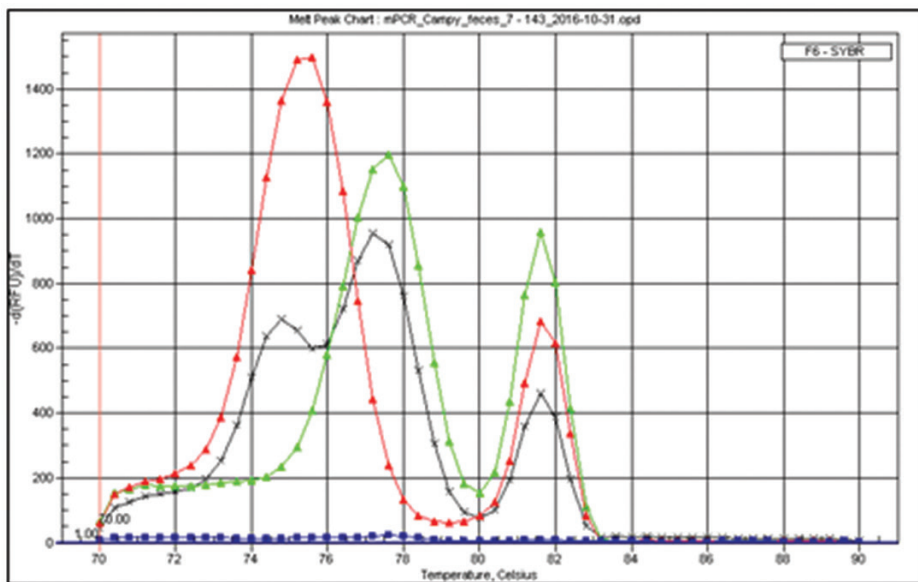
Освен всички клинични проби фецес и тествани клинични изолати, надеждността на метода на Eva Green Real-time PCR анализа бе изпитана и с 18 референтни щама, 9 от които *C. coli* и 9 щама *C. jejuni*, изпратени от Instant Institute, Дания и микробиологична лаборатория на Диагностичния ветеринарно-медицински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

Впечатление правят получените положителни резултати от молекулярно генетичния метод на 12 проби фецес, от които за 11 (11/12) *C. jejuni* и 1 (1/12) *C. coli*, но култура от същите проби не бе изолирана успешно. 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 умрели. Друга причина за липсата на кампилобактерна култура може да бъдат непостигнати, нужните за растеж, микроаерофилни условия. Според достъпните ни литературни данни, някои от видовете чувствителните 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°C, 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 профи фецес 9 (9/17) са генетично определени като *C. jejuni* и 8 (8/17) са генетично потвърдени като отрицателни за *Campylobacter spp.*

Чрез предложението от нас метод успешно доказахме кампилобактер в замразени фецеси, в проби на повече от 12 часа,

в минимално количество проби (~ 100 µl), от анален секрет, което прави метода необходим за нуждите на микробиологичните лаборатории (Павлова и сътр., 2016).

Интерес предизвикват резултатите от анализа на една от клиничните проби фецес при която генетично се доказва инфекция от смесен тип – *C. jejuni* и *C.coli*. Доказването на такъв тип инфекция е предизвикателство за класическата методика, докато за Eva Green real-time mPCR анализа това е предимство (фиг. 10).



Фиг. 10. 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 предложението 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 раз-

пространение на *C. jejuni* и *C. coli*, препоръчваме търсенето им във всички материали на болни с диарийен синдром, наред с изследването за други патогенни чревни бактерии.

## Генотипизиране

**Пулсовата гел-електрофореза – Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)** се счита за „златен стандарт“ сред молекулярните методи за типизиране на различни клинично значими бактерии. Тя е най-често използваният подход за характеризирание на бактериални изолати в огнища на епидемии, тъй като притежава отлични дискриминационни свойства, отлична способност за типизиране, отлична възпроизводимост в рамките на лабораторията, а и не на последно място е сравнително евтин метод. Протоколите за PFGE са стандартизирани и с възможност за междулабораторно сравнение, основани на PulseNet или Harmony (Clark et al., 2012; Goering et al., 2010).

Методиката на PFGE анализа се базира на фрагментиране на високо пречистена геномна ДНК проба, от рестрикционна ендонуклеаза, която разрязва ДНК на рядко срещани сайтове в генома на съответните бактериални видове. Получените рестрикционни фрагменти, които са предимно големи, могат да бъдат разделени в агарозен гел чрез електрофореза, като електрическото поле в гела се сменя периодично. Отделените ДНК фрагменти се визуализират в гела като бандове, които образуват определен профил PFGE. Във Финландия, някои PFGE профили преобладават в човешки и пилешки изолати. PFGE се използва успешно в много изследвания на взривове на *Campilobacter spp.* (Daskalov et al., 2012).

**Multilocus sequence typing (MLST)** е метод за определяне на генотипа, чрез който се секвенират седем консервативни (housekeeping) локуса в геномите на *C. coli* и *C. jejuni* и позволява определяне на специфичния тип последователност (ST) за бактериален щам (Wassenaar et al., 2000; Korczak et al., 2009). Седемте консервативни гена за MLST на *C. coli* и

*C. jejuni* са *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* и комбинираният алелен профил на тези гени определя секвенционния тип на бактериите. ST клоналните комплекси / ST CCS / се състоят от STs с най-малко четири алели, общи с основния генотип. Основното предимство на този секвениращ метод, сравнение с PFGE метода, е че резултатите от различни лаборатории могат лесно да бъдат сравнени и MLST данните от различни изследователски групи са достъпни и сравними онлайн – <http://pubmlst.org/campylobacter/>.

**Типизиране на флагелин – *fla*-typing.** Методът е базиран на анализа Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP – полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти или секвениране на генни локуси за флагелин със строго консервативни или вариабилни региони (*Meinersmann et al., 1997*). Обаче липсата на международна стандартизация и възможност за съпоставимост между лабораториите, ограничава широкото приложение на този метод. Съвсем наскоро *fla*-typing секвенционна база стана допълнителна част от метода на MLST типизитане (*Wassenaar, 2000; Korczak et al., 2009*).

**Риботипиране** е метод за генотипизиране, включващ агарозена гел-електрофореза на разкъсаната геномна ДНК и Southern blot хибридизация с проба, специфична за рРНК гени. Основният недостатък на този метод е по-ниската дискриминационно способност сравнение с тази на други методи за генотипизиране (*Clark et al., 2012*).

Моногo други методи за определяне на генотипа на щамове *Campylobacter spp.* са разработени, но по-горе споменатите са най-широко прилагани.

Сподед достъпната ни литература генотипизиращи методи за щамове *Campylobacter spp.* в България не са прилагани. Разработени и внедрени са различни типизиращи техники за редица патогени – PFGE на *Salmonella spp* (*Ацева и сътр., 2009*), MLVA и риботипиране на *C. difficile* (*Добрева и сътр., 2013*), MLST на *C. difficile* (*Толчаков, 2012*), но данни за проучваните от нас кампилобактери липсват.

## ИМУНОХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОД (immunochromatographic card test – ICT)

Както вече беше описано, микрофилтрационната техника е трудоемка, а молекулярно-биологичните методи изискват специфични реактиви, апаратура и обучен персонал. При имунохроматографският метод (ИХМ) 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 et al., 2014*).

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 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 (*Regnath et al., 2014*). 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 et al. 2010; Floch et al., 2012*).

В нашето проучване изследвахме депониран фецес от 520 хоспитализирани деца с диарийен синдром чрез имунохроматографски тест, като 182 болни (35%) се позитивираха за кампилобактериоза. От тези 182 проби подложихме 112 на верификация чрез Eva green Real-time PCR. Общо 98 (87,5%) от клиничните изолати бяха потвърдени като положителни (*Pavlova et al., 2017a; Pavlova et al., 2017b*).

За сравнение на средни стойности между променливите ИХМ и Eva green Real-time PCR използвахме статистическият метод Т – тест. Намерихме 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 диагностичните възможности на ИХМ и Eva Green Real-time PCR метода PCR е много малка (Velev et al., 2018).

В този смисъл получените от нас данни са в корелация с твърденията на други автори (Regnath et al., 2013), според които диагностичните възможности на съвременните ИХТ са значителни и работата с тях чувствително може да облекчи дейността на клинициста при необходимостта от вземане на бързи решения за терапевтичното поведение.

## ПАТОГЕНЕТИЧНО ЛЕЧЕНИЕ

При всички чревни инфекции основен симптом са диарията и/или повръщането вследствие на които настъпва различна по степен дехидратация на организма. Освен дехидратация, най-често настъпва и деминерализация поради загуба на соли – натриеви, калиеви, хлориди. Вследствие на това киселинно-алкалното равновесие се измества в най-често в посока метаболитна ацидоза, а при обилни повръщания – в посока метаболитна алкалоза поради загуба на бикарбонати. В по-тежките случаи тези състояния са декомпенсирани, тъй като буферните системи на организма имат своя лимит. На първо място при чревните инфекции, независимо от етиологичния причинител, стои патогенетичното лечение с възстановяване обема на загубените течности и киселинно-алкалното състояние на организма. Това е т. нар. рехидратация, която в зависимост от състоянието на болния може да се извърши с орални рехидратиращи разтвори (ОРР), а в по-тежките състояния, съчетани и с повръщане – парентерална рехидратация с парентерални рехидратиращи разтвори (ПРР).

### – Орална рехидратираща терапия

При по-леките степени на дехидратация и когато пациентът е в състояние да приема течности през устата, това е препоръчваното лечение от водещите школи. Най-физиологичният начин за рехидратация е оралният. Извършва се с изотонични разтвори с унифицирано съдържание по СЗО:

- Калиев хлорид 1.5 г.
- Натриев бикарбонат 2.5 г.
- Натриев хлорид 3.0 г.
- Глюкоза на прах 10 г.
- Разтварят се в 1 л. вода

Тези разтвори, с малки вариации, но винаги изотонични, могат да се намерят в аптечната мрежа под различни търговски наименования. При приема им няма максимално дозово ограничение – „колкото повече, толкова по-добре“. Поради

диспептичната симптоматика, обикновено болните имат гаде-не и приемат по-трудно разтворите. Препоръчва се това да става бавно, често по малки количества – тип „глътка – почивка“.

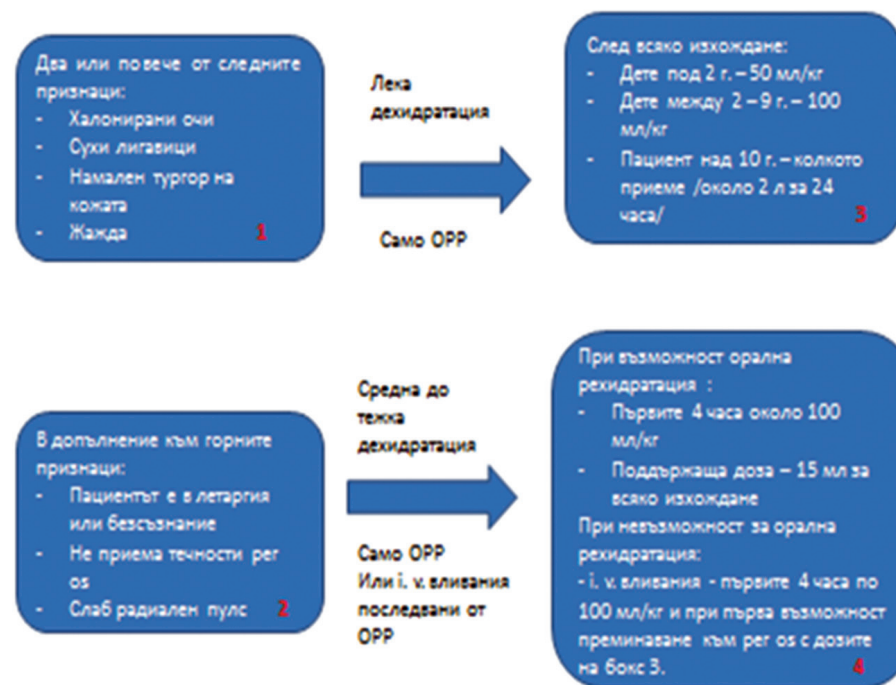
При леките степени на дехидратация, дете до 2 г. би трябвало да приема минимум 50 мл от разтвора за всяко изхождане първите 4 часа, след което да започне да приема по 10 мл (чаена лъжица) на изхождане за да поддържа текущите загуби. Деца между 2 и 9 г. трябва да приемат през първите 4 часа от лечението минимум 100 мл. на изхождане, а после да продължат с по около една чаена лъжица. Деца на 10 г. и възрастни е редно да изпиват минимум 1.5 – 2.0 л от разтвора за денонощие, като 1/4 от дозата трябва да се изпие в първите 4 часа.

Тежките степени на дехидратация, обикновено 2-ра към 3-та степен и болните с хиповолемичен шок, както и тези с упорити повръщания трябва да бъдат рехидратирани парентерално. В тези случаи, най-често свързани с големи загуби на калии, използваме модифицирани от нас разтвори – за деца над 1 г и възрастни Serum Glucosae 5% 500 ml с ампула Solutio Natrii chloridum 10% 15 ml. Този разтвор е подходящ за пациенти с тежка дехидратация, хипокалиемия, хипонатриемия и ацидоза. Дори и количеството калии да е нормално, този разтвор е безопасен, излишният калии се отделя чрез урината. Единственото противопоказание за вливането му е нарушената бъбречна функция. Често нашите пациенти са тежко дехидратирани от което следват олигурия или дори анурия. Тогава започваме рехидратацията с готов разтвор Рингер или само със Serum Glucosae 5% 500 ml. При възстановяване на бъбречната функция заменяме разтвора с горепосочения. При деца под една година и болни с тежка метаболитна ацидоза рехидратацията протича с модифициран от нас разтвор на СЗО подходящ за венозно приложение („банка на Мангърв“, Мангърв, 1986):

- Serum Glucosae 5% 200 ml
- Solutio Natrii chloridum 10%
- Solutio natrii bicarbonici 8,4 % 15 ml
- Solutio Glucosae 5% ad 500 ml

Така създадената банка е основно средство за рехидратация и в случаите в които алкално-киселинното равновесие не може да бъде изследвано. Компенсира както метаболитната ацидоза, така и метаболитната алкалоза и е основно средство на избор при дехидратирани кърмачета.

Венозната рехидратация също протича в две фази: възстановителна, около 4 часа, и поддържаща, като принципите и дозите са представени във **фиг. 11**. Принципът на продължителност е лесен: „венозната рехидратация се преустановява, когато изчезнат белезите на дехидратация“ (Мангърв, 1986); при първа възможност се преминава към парентерална рехидратация.



Фиг. 11. Принципи на оралната и парентерална рехидратация

### – Антидиарийни средства и пробиотици

В световните практики, а и в българския консенсус за лечение на остри чревни инфекции, се подхожда с големи резерви

към антидиарийните средства. Категорично не препоръчваме използването на антимоноцитни медикаменти при инфекциозна диария, независимо от възрастта на пациентите. Те имат краткотраен положителен ефект след което най-често диарията се завръща със същия или по-голям интензитет; според повечето автори удължават периода на боледуването. В ранна детска възраст, при остри бактериални чревни инфекции, биха могли да предизвикат и тежки състояния като субилеус или септицемия. Препоръчваме единствено използването на антисекреторния препарат Racecadotril, но само при строги показания: доказана вирусна етиология на чревната инфекция, липса на повръщане и трудно овладяващ се интензитет на диарийният синдром. (Тихолова и сътр., 2007; Guerrant et al., 2001).

В нашата работа ние сме прилагали пробиотици с местни щамове при всички деца с патологични примеси в изхожданията – кръв и слуз. Приемаме, че те са добро допълнение към терапията на бактериалните чревни инфекции, но само когато съдържат местни щамове, прилагат се в достъчно високи дози и не се съчетават с антибиотична терапия. Прилагането на пробиотик и антибактериално средство, независимо от разликите във времето в което се прилагат (според много клиницисти пробиотикът се прилага до 2 часа след антибиотика) за нас е лишено от терапевтичен смисъл и изглежда да е по-скоро комерсиално. Съветваме пациентите си да започнат пробиотичен курс едва след завършване на антибиотичното лечение или в края на острата фаза на диарийното заболяване. При пациенти с вирусна етиология на чревната инфекция смятаме пробиотиците за ненужни (Велев и сътр., 2014, 2017).

## ЕТИОЛОГИЧНО ЛЕЧЕНИЕ

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 et al., 1977; Butzler, 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 et al., 2004; Butzler, 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 ерадикаране на бактерия от фецес за 5 дни. Същото проучване доказва и с 30% по-ниска вероятност за релапс на заболяването (Williams 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 получаващи плацебо (Wistrom et al., 1992). Най-широко използваните при инфекцията с *Campylobacter* антибактериални средства са флуорхинолони и макролиди.

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“. Всички лекувани етиологично бяха на терапевтични дози Clarithromycin (2 x 7,5 mg/kg т.м.).

Както е видно от таблица 6, 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 установихме, че болничният престой се скъсява почти два пъти при ранно започване на етиологично лечение.

Табл. 6. Болничен престой (в дни) в зависимост от антибиотичното 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	1
		% of Total	2,2%	2,8%	12,2%	15,5%	6,1%	2,8%	2,2%	1,1%	1,1%	1,1%	1,1%

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 (Велев и сътр., 2015).

В унисон с тези данни категорично препоръчваме при съмнение за кампилобактериоза ранно диагностициране с бързи тестове и незабавно започване на подходящо етиологично лечение. Категорично не приемаме нуждата от започване на емпирично антибактериално лечение, при неуточнени чревни инфекции, преди да са известни резултатите от поне един лабораторен тест. Това може да бъде показано само в редките случаи на много тежко, животозастрашаващо, протичане на чревната инфекция (Velev et al., 2018).



## АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

Още в началото на '90-те години на миналия век започна да се описва нарастваща резистентност на някои щамове към хинолоните във ветеринарната, а по-късно и в хуманната медицина (Endtz 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 et al., 2015).

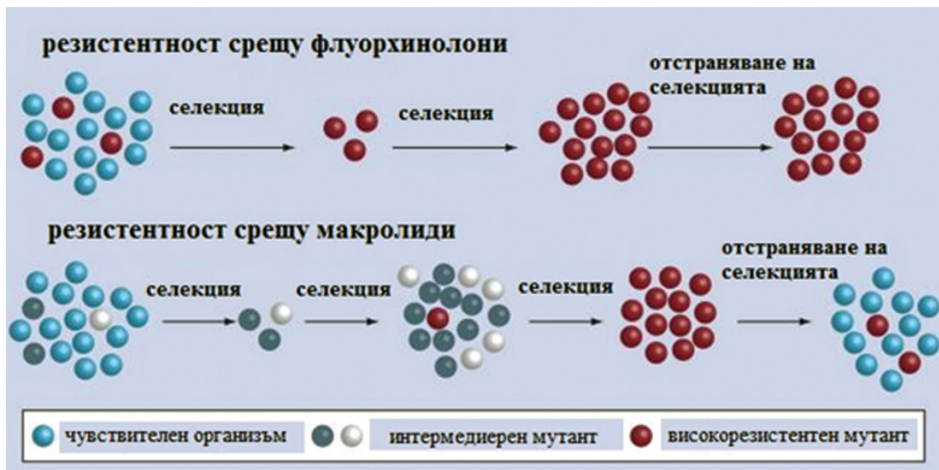
За целия ЕС се докладва сравнително висока резистентност на щамовете към ципрофлоксацин, което е тревожно поради факта, че той е средство на избор в много случаи на тежко протичащи бактериални хранителни инфекции. Средно 47,4% от изолатите на *Campylobacter* в ЕС са резистентни на ципрофлоксацин (www.eurosurv. edit. team, 2014). Подобни предварителни данни описахме и ние проучвайки клинични изолати чрез дисково-дифузионен метод (Velev et al., 2018).

Причината за високата устойчивост на флуорохинолони изглежда е обичайната употреба на ветеринарни антибиотици във фармакологичното лечение на домашни птици. Поради това в Съединените щати употребата на флуорохинолони при отглеждане на домашни птици беше оттеглена през 2005 г. В Австралия, където тази употреба не е одобрена, резистентността към тези лекарства е рядка (Hakanen et al., 2003). Неотдавнашно проучване, публикувано през 2015 г. от Ghunaim et al. показва, че устойчивостта към еритромицин на *C. jejuni* е относително ниска: само 8,6% от изолатите са резистентни, докато 63,2% са резистентни на ципрофлоксацин. В Полша са публикувани по-ниски нива на резистентност – (40%) и само 2% в Австралия (Nelson et al., 2007)

Резистентността към флуорохинолоните се дължи на два синергични механизма – инактивиране на целта на антиби-

отика и ефлукс (оттичане) на антибиотика (Iovine, 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 et al., 2004). *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 et al., 2007; Iovine, 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 et al., 2006). Турски колектив описва по-висока щ5-резистентност при *C. coli* не само по отношение на макролидите, но и по отношение на хинолоните (Lutgen 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 et al., 2012). Днес са известни основните разлики в селектирането на мутантни щамове срещу флуорохинолони и макролиди и поради това е ясна причината за по-ранно възникващата и бързо разпространяваща се резистентност срещу хинолоните (фиг. 11) (Luangtongkum et al., 2009; Cui et al., 2016).

През февруари 2017, СЗО съобщи списъка на най-проблемните в световен мащаб бактерии, за които спешно е необходимо разработването на нови антибиотични молекули, като флуорохинолон-резистентните *Campylobacter spp.* са поставени на четвърто място в категорията „висок приоритет“. В последните години все по-често се съобщава и за мулти-резистентни щамове на *Campylobacter spp.* (Lee et al., 2005; Marinou et al., 2012). Поради това, търсенето на алтернативи за етиологично лечение е цел на много изследователски групи. Екипът на Francesca Schiaffino и Margaret Kosek от „Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health“ в САЩ издаде в края на 2018 свой труд в който описа кохорта от 303



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 персистерат 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.

деца проследени от раждането до 5-годишна възраст. Проучените от тях изолати, при диарийни епизоди в които е изолиран *Campylobacter spp.*, са 3175. Те също описват висока резистентност на *C. jejuni* и *C. non-jejuni* към ципрофлоксацин и макролиди. Проучванията им обаче установяват много висока чувствителност на *Campylobacter spp.* към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина – 94% от клиничните щамове са чувствителни на нея (Schiaffino et al., 2018).

Тези данни потвърждават факта, че *Campylobacter* – инфекцията ще е сред новите терапевтични предизвикателства пред клиницистите на XXI век.

## 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 пилешко месо (Wagenaar 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 местобитанието 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 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. jejuni*, убити *C. jejuni*. 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 et al., 2013; Riddle 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 райони 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 имunosупресирани болни.

## Книгопис

1. Асева Г., Механизми на резистентност при клинични изолати *Salmonella enterica subspecies enterica* от нетифните серотипове. Дисертация, 2009, 1 – 139.
2. Боянова, Л., М. Марина, Т. Цаловска, Ю. Стефанова. Изолиране на *Campylobacter jejuni* от болни с ентероколитен синдром, ЕМИ, 1987, 4, 16 - 19.
3. Велев В., Н. Дървеняшка, Н. Найденова, В. Илчова, И. Томова, С. Алексиева и М. Тихолова. Кампилобактериоза и салмонелоза – диференциалнодиагностично проучване при деца. Български медицински журнал 2014, VIII, № 2.
4. 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, с. 52-54
5. Велев, В., Н. Найденова, Н. Дървеняшка, В. Илчова, И. Томова, К. Иванова, А. Мангъргов и М. Тихолова. Проучвания на чревната кампилобактериоза при деца Детски и инфекциозни болести, 6, 2014, №1, с. 3-6.
6. Велев, В. Кампилобактериоза. Детски и инфекциозни болести, 7, 2015, №2, с. 34-37.
7. Велев В., 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.
8. Велев В. Кампилобактериоза в детска възраст – клинично протичане, лабораторна диагностика и етиологично лечение. Дисертационен труд за ОНС „Доктор“, МУ – София, 2017.
9. Гюров Б., Даскалов Хр., Найденов В., Марамски А., Разпространение на *Campylobacter spp.* в бройлерни стада и бройлери. 110 години НДНИВМИ – сборник доклади и постери, 2011, 74 – 80.
10. Добрева Е., Молекулярно-биологични проучвания за характеризиране на клинични изолати *Clostridium difficile*. Дисертация. 2013, 1 – 115.



11. 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.

12. Иванов И. Н., Молекулярни методи за откриване, идентификация и типизиране на особено опасни бактериални патогени. Дисертация за ОНС „Доктор“, 2010, 1 – 124.

13. Иванова К., Изолиране и микробиологична характеристика на щамове *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli*. Дисертация за ОНС „Доктор“. 1991, 1– 143.

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

15. Мангъргов А., Съвременна рехидратираща терапия при острите чревни инфекции в кърмаческа и ранна детска възраст. Дисертация За ОНС „Доктор“, 1986, 1-154.

16. Марамски А., Даскалов Хр., Резистентност на *Campylobacter spp.* изолирани от кланични трупове на бройлери. НДНИВМИ – 108 години обществено полезна научноизследователска и приложна дейност, сборник научни доклади – Ветеринарномедицински институт, Първо издание, 2009, 4–44.

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

18. Тихолова, М., М. Ненова, М. Стойчева-Въртигова. Лечение на острите чревни инфекциозни заболявания при възрастни и деца. Консенсус на Българското дружество по инфекциозни болести. Медицински преглед, 2007, 1, 105 – 110.

19. Павлова М., Молекулярни методи за идентификация на ентеропатогенни бактерии. Медицински преглед, ЛП, 2016, № 3.

20. Павлова М., Молекулярни методи за типизиране на ентеропатогенни бактерии. Медицински преглед, ЛП, 2016, № 4.

21. Павлова М. Молекулярни методи за идентификация и типизиране на *Campylobacter coli/ jejuni*. Дисертационен труд за ОНС „Доктор“, НЦЗПБ, 2016.

22. Симеоновски И., В. Левтерова, Л. Бизева, М. Димова, Д. Мерджанов, Ц. Велинов, Т. Кантарджиев, Молекулярни методи за доказване на бактериални причинители на инфекции на горните дихателни пътища, придобити в обществото. Медикарт, Пулмология и Педиатрия, 2014, брой 5, 5–8.

23. Ailes, E., Demma, L., Hurd, S., Hatch, J., Jones, T.F., Vugia, D., Cronquist, A., Tobin- D'Angelo, M., Larson, K., Laine, E., Edge, K., Zansky, S., Scallan, E. 2008. Foodborne Pathogens and Disease. 5(3): 329-337.

24. Altekruse, Sean F., Stern, Norman J., Fields, Patricia I., Swerdlow, David L. 1999. *Campylobacter jejuni*- An Emerging Foodborne Pathogen. Emerging Infectious Diseases, 5: CDC. 2008. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Through Food-10 States, 2007. MMWR Weekly, 57(14):366-370.

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

26. 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.

27. 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.

28. 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.

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

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



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

32. Bala, M., Singh, V., Philipova, I., Bhargava, A., Joshi, N.C., Unemo, M. Gentamicin in vitro activity and tentative gentamicin interpretation criteria for the CLSI and calibrated dichotomous sensitivity disc diffusion methods for *Neisseria gonorrhoeae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016, Vol: 71 (7), 1856 – 1859.

33. Bessède E, Delcamp A, Sifrè E, Buissonnière A, Mègraud F. New methods for detection of *Campylobacter*s in stool samples in comparison to culture. J Clin Microbiol 2011;49:941-4.

34. Blaser MJ, Perez GP, Smith PF, Patton C, Tenover FC, Lastovica AJ, Wang WI. Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: host factors and strain characteristics. J Infect Dis 1986;153:552-9.

35. Bartels, C.L. and G. J. Tsongalis. 2007. Best Practices in Molecular Pathology: Molecular Diagnostic Testing Improves Patient Management From Diagnosis Through Therapy. ADVANCE/Laboratory, 19: 32-38.

36. Bolton F., Coates D., et al. Comparison of selective medium for isolation of *C. jejuni/ coli*. J. Clin. Microbiol. 1983, 36, 78-83.

37. Boyanova L, Gergova G, Spassova Z, Koumanova R, Yaneva P, Mitov I, Derejian S, Krastev Z. *Campylobacter* infection in 682 bulgarian patients with acute enterocolitis, inflammatory bowel disease, and other chronic intestinal diseases. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; 49(1):71-4.

38. 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.

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

40. 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.

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

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

43. 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.

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

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

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

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

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

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

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

51. Cardinale, E., Rose, V., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Rivoal, K., Mead, G., Salvat, G.: Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter spp.* isolated from poultry and humans in Senegal. J. Appl. Microbiol., 2006; 100:209-217.

52. Carter, J.E. Nelson, J.J., and K.N. Mizell. 2007. Abdominal Pain in an 8-Year-Old Male. LABMEDICINE. 38(6): 357-360.

53. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Food—10 States 2008. MMWR. April 10, 2009; 58 (13):333-337.

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. Daskalov Hr., Maramski, A. Prevalence and factors affecting the presence of *Campylobacter* spp. in broiler carcasses in Bulgaria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2012; 36(5): 539-545.

59. Dediste A, Aeby A, Ebraert A et al. Arcobacter in stools: clinical features diagnosis and antibiotic susceptibility. In: Lastovica AJ, Newell DG, Lastovica EE, eds. *Campylobacter, Helicobacter and related organisms*. Cape Town: Institute of Child Health, University of Cape Town, 1998; 436–439. 67.

60. De Boer P, Rahaoui H, Leer J, Montijn C, van der Vossen M. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: A comparison to classic culturing and enrichment. *Food Microbiology* 51 (2015) 96-100.

61. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:406-10.

62. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJ, Urwin R, Maiden MC. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39:14-23.

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

66. 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.

67. 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.

68. Euzèby, J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (updated 13 July, 2005) <http://www.bacterio.net>

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

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

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

72. 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.

73. 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.

74. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2014. Reporting on 2012

surveillance data and 2013 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2015.

75. 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.

76. Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Laganà P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. J Prev Med Hyg. 2017;58(2):E79-E92.

77. Fernández-Cruz A, Munoz P, Mohedano R, Valerio M, Marin M, Alcalà L, Rodríguez-Crèixems M, Cercenado E, Bouza E. *Campylobacter* bacteremia: clinical characteristics, incidence, and outcome over 23 years. Medicine (Baltimore) application. J. Infect. Dis. 163:1068–1072.

78. Fitzgerald, C., J. Whichard, and I. Nachamkin. 2008. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 227–243. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC. 2010;89:319-30.

79. FSA: The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal, 2010; 8: 1496.

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

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

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

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

84. 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.

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

86. Gazonne L, Legrand P, Renaud B, Bourra B, Taillandier E, Brun-Buisson C, Lesprit P. *Campylobacter fetus* bloodstream infection: risk factors and clinical features. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:185-9.

87. Giesendorf B.A., Quint W.G., Henkens M.H., Stegeman H., Huf F.A., Niesters H.G., Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction, Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) 3804–3808.

88. Goossens H, Vlaes L, De Boeck M et al. Is „*Campylobacter upsaliensis*“ an unrecognized cause of human diarrhoea? Lancet 1990; 335: 584–586. 58.

89. Guerrant, R. L., T. Van Gilder, T. S. Steiner, N. M. Thielman, L. Slutsker, R. V. Tauxe, T. Hennessy, P. M. Griffin, H. L. DuPont, R. B. Sack, P. I. Tarr, M. Neill, I. Nachamkin, L. B. Reller, M. T. Osterholm, M. L. Bennish, and L. K. Pickering. 2001. Practice guidelines for managing infectious diarrhea. Clin. Infect. Dis. 32:331–351.

90. Gally A., Bousquet V., Siret V. et al. Risk factors for acquiring sporadic *Campylobacter* infection in France: results from a national case-control study. J. Infect. Dis. 2008;197:1477–84.

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

92. Gordon L., Nichols Fly. Transmission of *Campylobacter*. Emerg Infect Dis. 2005;11: 361–364.

93. Gomi, H., Jiang, Z., Adachi, J. et 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.

94. 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.



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

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

97. 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.

98. Hakanen A, Jousimies-Somer H, Siitonen A, Huovinen P, Kotilainen P. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates in travelers returning to Finland: association of ciprofloxacin resistance to travel destination. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:267–270

99. Hindiyeh M, Jense S, Hohmann S, Benett H, Edwards C, Aldeen W, Croft A, Daly J, Mottice S, Carroll KC. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool specimens by an enzyme immunoassay and surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the greater Salt Lake City area. *J Clin Microbiol* 2000;38:3076-9.

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

101. Hung Wui Ho, Hee-jin Dong, Woohyun Kim, et al., Genetic relationship of *Campylobacter jejuni* isolates from different sources by PFGE and flaA typing. *J. Prev. Vet. Med.*, 2015, Vol 39, № 1: 23 – 26;

102. 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.

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

104. Hald, B., Pedersen, K., Waino, 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.

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

106. 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.

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

108. ISO 10272-1:2006 AND ISO/TS 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.

109. Ivanova K., Marina M., Petrov P., Kantardjiev T. Campylobacteriosis and other bacterial gastrointestinal diseases in Sofia, Bulgaria for the period 1987-2008. *Euro Surveill*. 2010;15(4):pii=19474.

110. Iovine N. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*. 2013; 4(3): 230–240.

111. 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.

112. 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.

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

114. 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.



115. 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.
116. 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.
117. Kaldor J, Pritchard H, Serpell A, Metcalf W. Serum antibodies in *Campylobacter* enteritis. J Clin Microbiol 1983;18:1-4.
118. Kärenlampi R, Hänninen ML. Survival of *Campylobacter jejuni* on various fresh produce. Int J Food Microbiol 2004;97:187-95.
119. Karmali M.A., Simor A.E., Roscoe M., Fleming P.C., Smith S.S. & Lane J. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J. Clin. Microbiol., 23, 456–459.
120. Killeen, A.A and E. Lyon. 2007. Design and Operation of a Molecular Diagnostics Laboratory, p. 91-98. In Bruns, D.E, Ashwood, E.R. and C.A. Burtis. Fundamentals of Molecular Diagnostics. Saunders Elsevier. St. Louis, MO.
121. Kulkarni SP, Lever S, Logan JM, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. J Clin Pathol 2002;55:749-53.
122. 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.
123. Karlyshev A., Ketley J., Wren B. The *Campylobacter jejuni* glycome. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(2):377-90.
124. Karlyshev A., McCrossan M., Wren B. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. Infect Immun. 2001;69(9):5921-4.
125. 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.

126. King N. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2010; Vol. 630.
127. Lastovica, A. J., and B. M. Allos. 2008. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, p. 123–149. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed.
128. Lehner A, Schneck C, Feierl G, Pless P, Deutz A, Brandl E, Wagner M. Epidemiologic application of pulsed-field gel electrophoresis to an outbreak of *Campylobacter jejuni* in an Austrian youth centre. Epidemiol Infect 2000;125:13-6.
129. Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. & Stanley, J., PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, Journal of Clinical Microbiology, Vol.35, 2568–2572, 1997;
130. 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.
131. 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.
132. Lehoursa P., Aladjidic N., Sarlangue J. Infections à *Campylobacter* chez l'enfant. Archives de Pédiatrie. 2012; xxx:1-6.
133. Levy A., A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. J. Inf. Dis. 1946, 18: 243-258.
134. 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.
135. Meinersmann RJ, Helsel LO, Fields PI, Hiett KL. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by fla gene sequencing. J Clin Microbiol 1997;35:2810-4.

136. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. ASM Press, American Society of Microbiology. Washington, DC. 2007.

137. 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.

138. 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.

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

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

141. 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.

142. 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).

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

144. Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ. *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, American Society for Microbiology. Washington, DC. 2008.

145. Nakari UM, Puhakka A, Siitonen A. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:513-8.

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

147. 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.

148. Nelson J, Chiller T, Powers J, Angulo F. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry; a public health success story. Clin Infect Dis. 2007;44:977-980.

149. 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.

150. 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.

151. 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.

152. 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.

153. 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.

154. 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)

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

156. 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.

157. 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.

158. Olson, C. K., S. Ethelberg, W. van Pelt, and R. V. Tauxe. 2008. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations, p. 163–189. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.

159. Pavlova M, Velev V, Dobрева E, Asseva G, Ivanov I, Petrov P, Mangarov A, Tomova I, Kantardjiev T. Optimization of Eva Green real-time mPCR for differentiating *C. jejuni / coli* directly from feces. *Bratis Med J*, 2017; 118 (11), 702-704.

160. Pavlova Maria, Veleri Velev, Elina Dobрева, Galina Asseva, Atanas Mangarov, Ivelina Tomova and Todor Kantardjiev. Advantages of Eva Green real-time mPCR compared to culture methods for differentiating *C. jejuni / coli* directly from feces. *Merit Res. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 5(5) pp. 259-262.

161. Pavlova M., Elina G. Dobрева, Katucha I. Ivanova, Galina D. Asseva, Ivan N. Ivanov, Peter K. Petrov, Valeri R. Velev, Ivelina I. Tomova, Maida M. Tiholova, Todor V. Kantardjiev. Multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Folia Medica* 2016, 58(2); 95-100.

162. Penner JL, Hennessy JN. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* 1980;12:732-7.

163. Philipova, I., Laboratory-based diagnosis of gonococcal and genitourinary chlamydial infections. 2014, PIPD, Vol: 42 (1), 19 – 25.

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

165. 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.

166. 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.

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

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

169. 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.

170. 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.

171. Rautelin H, Jusufovic J, Hänninen ML. Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:9-12.

172. 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.

173. 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.

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

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



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

177. Stehr-Green J., Schantz P. The impact of zoonotic diseases transmitted by pets on human health and the economy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1987;17:1-15.

178. Saito, S., Yatsuyanagi, J., Harata, S., Ito, Y., Shinagawa, K., Suzuki, N., Amano, K., Enomoto, K.: *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile, and human diarrheal samples in Japan: comparison of serotypes and genotypes. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2005; 45: 311-319.

179. Schiaffino F , Colston JM , Paredes Olortegui M, Francois R, Pisanic N, Burga R, Penataro Yori P, Kosek MN. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp. in a Pediatric Cohort Study. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Nov 12.

180. Schenberg-Norio D, Mattila L, Lauhio A, Katila ML, Kaukoranta SS, Koskela M, Pajarre S, Uksila J, Eerola E, Sarna S, Rautelin H. Patient-reported complications associated with *Campylobacter jejuni* infection. Epidemiol Infect 2010;138:1004-11.

181. Sjogren E., Lindblom G.B. & Kaijser B. (1987). Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. J. Clin. Microbiol., 25, 1966-1968.

182. Skirrow M., Blaser M., Clinical aspects of *Campylobacter* infection, in: Nachamkin I., Blaser M. (Eds.), *Campylobacter*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2000, pp. 69-88.

183. Skirrow M.B., *Campylobacter* enteritis: a „new“ disease, BMJ 2 (1977) 9-11.

184. Skirrow MB. Infection with *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9th edn, Vol. 3. London: Arnold, 1998; 567-580. 61.

185. Stoyanchev T., Vashin I., Ring Ch., Atanassova V., Detection of *Campylobacter* using standard culture and PCR of

16s rRNA gene in freshly chilled poultry and poultry products in a slaughterhouse. Trakia Journal of Sciences, Vol. 2, No. 3, pp 59-64, 2004.

186. Strid MA, Engberg J, Larsen LB, Begtrup K, Molbak K, Kroghfelt KA. Antibody responses to *Campylobacter* infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:314-9.

187. 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.

188. 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.

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

190. Tam CC, Higgins CD, Neal KR, Rodrigues LC, Millership SE, O'Brien SJ. *Campylobacter* Case-Control Study Group. Chicken consumption and use of acid-suppressing medications as risk factors for *Campylobacter* enteritis, England. Emerg Infect Dis 2009;15:1402-8.

191. Thanakiatkrai P, Welch L. Using the Taguchi method for rapid quantitative PCR optimization with SYBR Green I. Int J Legal Med. 2012;126(1):161-5.

192. Taylor BV, Williamson J, Luck J, Coleman D, Jones D, McGregor A. Sensitivity and specificity of serology in determining recent acute *Campylobacter* infection. Intern Med J 2004;34:250-8.

193. 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.

194. Tissari P, Rautelin H. Evaluation of an enzyme immunoassay-based stool antigen test to detect *Campylobacter*



jejuni and *Campylobacter coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:171-5.

195. 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.

196. Tamborini A., Casabona L., Vinas 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.

197. 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.

198. Urumova V., Stoyanchev T., Lyutskanov M., Daskalov Hr., Vashin Iv., Maramski A. Antimicrobial sensitivity of *Campylobacter jejuni* poultry isolates from the republic of Bulgaria. *J. Fac. Vet. Med. Istambul Univ.* 2014; 40(1):29-34.

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

200. Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb.nov. and *Arcobacter skirrowii* sp.nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 451–455. 55.

201. Vandenberg O, Dediste A, Vlaes L et al. *Arcobacter* species: an unusual intestinal pathogen in childhood [abstract P 36.006]. In: Program and abstracts of the 10th International Congress on Infectious Diseases. Singapore: International Society for Infectious Diseases, 2002, 86. 68.

202. Velev V, Pavlova M, Ivanov IN, Mangarov A, Kantardjiev T. (2018) Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Campylobacter*. *J Appl Microb Res.* Vol: 1, Issu: 2 (17-19).

203. Velev V., M. Pavlova, A. Mangarov, P. Petrov, I. Ivanov, T. Tomov, K. Vutova. Diagnostics and therapeutic behaviour in patients with campylobacteriosis. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 2018, Vol. 71, No3, pp.417-423.

204. Velev Valeri, Maria Pavlova, Atanas Mangarov, Ivan Ivanov and Todor Kantardjiev. Establishment of campylobacter infection with immunochromatographic test. *Merit Res. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 5(11) pp. 597-599.

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

206. 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.

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

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

209. Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1-9.

210. Willison, H. J. 2005. The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 10:94–112.

211. World Health Organization, 2008, *Campylobacter* Fact Sheet #255, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>.

212. 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.

213. Wadl M., Pözlner 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.

214. 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.

215. 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.

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

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

218. Williams D., Schorling J., Barrett L. et al. Early Treatment of *Campylobacter jejuni* Enteritis. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 1989, 248-250.

219. Yan, W., N. Chang, and D. E. Taylor. 1991. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. J. Infect. Dis. 163:1068–1072.

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

221. 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.

**д-р Мария Павлова, дб    д-р Валери Велев, дм**

**КАМПИЛОБАКТЕРИОЗИ**  
**КЛИНИЧНИ И ЛАБОРАТОРНИ**  
**ОСОБЕНОСТИ**

Българска  
Първо издание

Редактор:  
**д-р Валери Велев, дм**

Компютърно оформление  
**Николай Тодоров**

Формат: 70/100/16

Печатни коли: 5,25

**Национален център по заразни и паразитни болести**  
София, 2019

ISBN 978—...—...—...—.