

## IGM SEROKONVERZIJA NA CAMPYLOBACTER JEJUNI U PRVE DVE GODINE ŽIVOTA KOD DECE SA GASTROINTENSTINALNIM SIMPTOMIMA

Dara Jovanović<sup>1</sup>, Nevenka Ilić<sup>2</sup>, Dragoljub Đokić<sup>2,3</sup>, Slobodan Tošović<sup>1</sup>, Tijana Relić<sup>1</sup>, Dejan Baskić<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd

<sup>2</sup>Institut za javno zdravlje, Kragujevac

<sup>3</sup>Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu

## IGM SEROCONVERSION TO CAMPYLOBACTER JEJUNI IN THE FIRST TWO YEARS OF LIFE OF CHILDREN WITH GASTROINTESTINAL SYMPTOMS

Dara Jovanovic<sup>1</sup>, Nevenka Ilic<sup>2</sup>, Dragoljub Djokic<sup>2,3</sup>, Slobodan Tosovic<sup>1</sup>, Tijana Relic<sup>1</sup>, Dejan Baskic<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Municipal Institute for Public Health, Belgrade

<sup>2</sup>Institute for Public Health, Kragujevac

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Kragujevac

### SAŽETAK

*Campylobacter* je najčešća bakterija izolovana uzorkovanjem namirnica i smatra se najčešćim uzročnikom akutnih dijareja kod ljudi u svim uzrastima. U većini zemalja postoje podaci koji se odnose samo na sporadične slučajeve infekcije *Campylobacter*-om, koje su manifestovane akutnom dijarejom.

Cilj ovog rada je da se kod zdrave dece uzrasta do 2 godine koja su imala simptome gastrointestinalne bolesti, serološkom analizom utvrdi postojanje izloženosti *Campylobacter*-u jejuni.

Ispitivanu grupu je činilo 77 zdrave dece uzrasta do 2 godine, koja su pre trenutka ispitivanja u anamnezi imala podatak o postojanju gastrointestinalnih simptoma. Koncentracija IgM na *Campylobacter* jejuni u serumu određivana je ELISA metodom.

Od 77 dece uzrasta do 2 godine utvrđeno je postojanje IgM serumskih antitela na *Campylobacter* jejuni kod 32 deteta (42%), dok je granični rezultat nađen kod 11 dece (14%). Serokonverzija nastaje krajem prve godine života, a sva deca u drugoj godini života su bila IgM seropozitivna na *Campylobacter* jejuni. Kod seropozitivne dece najčešće su u anamnezi postojali simptomi u vidu izraženih grčeva (48%).

S obzirom na veliku učestalost i varijabilnost simptoma, infekcija *Campylobacter*om jejuni je veliki problem javnog zdravlja, te postoji neophodnost utvrđivanja protokola u dijagnostikovanju i lečenju, kao i s ciljem razvoja kontrole infekcije *Campylobacter*-om jejuni.

**Ključne reči:** odojče; gastrointestinalne bolesti; *Campylobacter* infekcije; *Campylobacter* jejuni; imunoglobulin M.

### UVOD

*Campylobacter species* je najčešća bakterija izolovana uzorkovanjem namirnica i smatra se najčešćim uzročnikom akutnih dijareja kod ljudi u svim uzrastima (1, 2). *Campylobacter jejuni* odgovoran je za nastanak nekih

### ABSTRACT

*Campylobacter* is the most common bacteria isolated when sampling food and it is considered to be the most common cause of acute diarrhoea in people of all ages. In most countries, there are only data related to sporadic cases of *Campylobacter* infection, which is manifested by acute diarrhoea.

The aim of this paper is to establish the existence of exposure to *Campylobacter jejuni* by serological analysis in healthy children under 2 years of age, who have previously had gastrointestinal symptoms.

The examined group consisted of 77 healthy children under two years of age, who had had a history record of the existence of gastrointestinal symptoms prior to testing. *Campylobacter* concentration of IgM in serum was determined by ELISA method.

Out of 77 children under the age of two, the existence of serum IgM antibodies to *Campylobacter jejuni* was confirmed in 32 children (42%), while the borderline result was found in 11 children (14%). Seroconversion occurs during the first year of life, and all children in the second year of life were IgM seropositive for *Campylobacter jejuni*. In the histories of seropositive children the most common symptoms had the form of heavy cramps in 48%.

Considering the high incidence and variability of symptoms, the acquisition of *Campylobacter jejuni* is a major public health problem and there is a need to establish precise epidemiological data primarily in order to develop acquisition control of *Campylobacter jejuni*.

**Key words:** infant; gastrointestinal diseases; *Campylobacter* infections; *Campylobacter jejuni*; immunoglobulin M.

autoimunih bolesti, kao što je reumatoidni artritis i Guillain-Barre-ov sindrom (3). U 50 % slučajeva, izvor zaraze je sveže pileće meso, a ostalih 50% izvori su kontaminirana crvena mesa, sveže mleko, sir, morski plodovi, pijača voda i drugo (4, 5). U razvijenim zemljama infekcija *Campylobacter jejuni* kod ljudi se manifestuje

težom kliničkom slikom (teške dijareje praćene krvavljenjem, temperaturom i dehidracijom), dok se u zemljama u razvoju uglavnom opisuju lakši klinički oblici (abdominalni bol uz ređe stolice bez prisustva krvi) (6).

S obzirom da infekciju *Campylobacter jejuni* izaziva vrlo mala količina bakterija (manje od 500 mikroba) (7) prenos sa osobe na osobu je vrlo lak, a naročito kod dece. U većini zemalja, među kojima je i naša zemlja, postoje podaci koji se odnose na sporadične slućajeve infekcije *Campylobacter jejuni*, koje su manifestovane akutnom dijarejom. Na osnovu istraživanja SZO širom sveta, utvrđeno je da je stopa izolacije *Campylobacter jejuni* iz stolice kod dece uzrasta do 2 godine sa dijarejom 4 do 38,8% (8, 9). U zemljama u razvoju, u grupi dece bez simptoma, *Campylobacter jejuni* je izolovan u 14,9% (10), dok je u razvijenim zemljama to bio slućaj u 0,5% (11).

U zemljama u razvoju zdrava deca i odrasli su u svom okruženju konstantno izloženi antigenima *Campylobacter jejuni*, što za posledicu ima pojavu serumskih antitela veoma rano u životu. Utvrđeno je, da je nivo antitela na *Campylobacter jejuni* mnogo viši kod dece koja žive u zemljama u razvoju, a utvrđeni su i blaži klinički oblici bolesti u odnosu na decu iz razvijenih zemalja (12). O patogenezi kampilobakterioze i razvoju posledičnog protektivnog imuniteta u toku infekcije, danas se vrlo malo zna (13).

Cilj našeg rada je da se kod zdrave dece uzrasta do 2 godine koja su imala simptome gastrointestinalne bolesti, serološkom analizom utvrdi postojanje izloženosti *Campylobacter jejuni*.

## MATERIJAL I METODE

Ispitivanu grupu je činilo 77 zdrave dece uzrasta do 2 godine, koja su pre ispitivanja u anamnezi imala podatak o postojanju gastrointestinalnih tegoba (recidivantne ređe stolice, recidivantno povraćanje, kolike jakog intenziteta koje su prisutne i posle 3. meseca života i slabije napredovanje u težini). Deca su uz saglasnost roditelja uključivana u studiju prilikom sistematskog pedijatrijskog pregleda, neposredno pre vakcinacije ili revakcinacije. Podaci o ispoljenim simptomima gastrointestinalne bolesti dobijani su iz anketnih podataka od roditelja, kao i iz pedijatrijskog kartona.

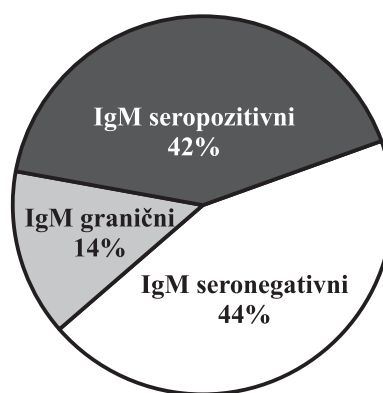
Koncentracija sIgM na *Campylobacter jejuni* određivana je u uzorcima seruma ELISA metodom (Serion ELISA classic, Institut Virion\Serion GmbH -Würzburg, Germany). U okviru metodološkog izvođenja testa eliminiše se IgM ukrštena reaktivnost sa RF. Koncentracija sIgM antitela preraćunata je softverskom analizom (*Single-point quantification using the 4PL method*). Pozitivan rezultat je koncentracija sIgM antitela na *Campylobacter jejuni* od 60U/ml, granićni od 40 do 60 U/ml, a negativni < 40 U/ml.

Statistićka obrada: za ispitivanje zavisnosti kategorijskih promenljivih korišćen je Hi-kvadrat test. Za utvrđivanje povezanosti između varijabli korišćen je Spearman test korelacije. Za statistićku obradu dobijenih rezultata korišćen je programski paket SPSS.

## REZULTATI

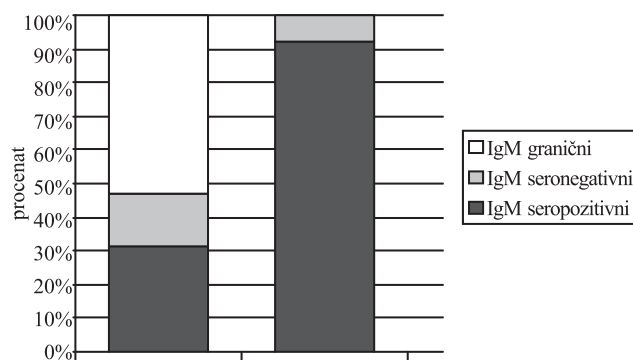
Ispitivanu grupu je činilo 77 dece sa gastrointestinalnim tegobama srednjeg uzrasta 9,3 meseca (5–24 meseca), 41 dećak i 36 devojćica.

Od 77 dece uzrasta do 2 godine utvrđeno je postojanje sIgM serumskih antitela na *Campylobacter jejuni* kod 32 deteta (42%), dok je granićni rezultat nađen kod 11 dece (14%).



Grafikon 1. Ućestalost IgM odgovora na *Campylobacter jejuni* kod dece u prve dve godine života sa ranijim prisustvom recidivantnih GIT simptoma IgM

IgM seropozitivna i granićna deca na *Campylobacter jejuni* bila su srednjeg uzrasta 11,6 meseci, dok su seronegativna deca bila znatno mlađa, srednji uzrast 6,3 meseca. Postoji statistićki znaćajna povezanost između uzrasta i koncentracije sIgM na *Campylobacter jejuni* ( $r=0,718$ ,  $p=0,000$ ). U prvoj godini života bilo je 53,1% IgM seronegativne dece, dok su u drugoj godini sva deca imala IgM serokonverziju ( $n=11/12$  seropozitivnih i  $n=1/12$  granićnih) ( $p=0,000$ ).

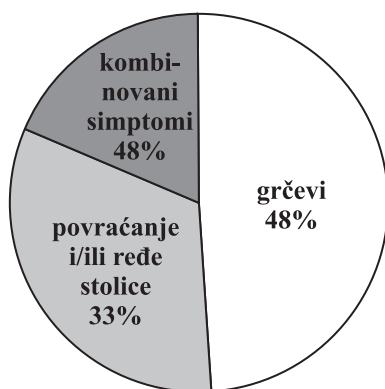


Grafikon 2. Ućestalost IgM seropozitivnosti na *Campylobacter jejuni* u prvoj i drugoj godini života

U grupi IgM seronegativne dece 32% (n=11/34) bilo je na prirodnoj ishrani u trenutku ispitivanja, dok je u grupi seropozitivne dece to bio slučaj u 20,9% dece (n=9/43) (p=0,191).

Nije postojala statistički značajna razlika u IgM seropozitivnosti na *Campylobacter jejuni* među polovima (p=0,167), kao i u odnosu na ruralni ili urbani stil života (p=0,221).

Od ukupno 43 deteta kod kojih je utvrđena koncentracija IgM antitela na *Campylobacter jejuni* viša od 40 U/ml (granični + pozitivni) najčešće su u anamnezi postojali simptomi u vidu izraženih grčeva 48% (n=21/43), izolovani simptomi recidivantnog povraćanja i postojanja ređih stolica javili su se kod 33% dece (n=14/43), dok su se simptomi kombinovali kod 19% dece (n=8/43) (grafikon 3).



Grafikon 3. Učestalost i vrsta GIT simptoma kod IgM seropozitivne dece na *Campylobacter jejuni*

## DISKUSIJA

Nedostatak praćenja i nadgledanja kampilobakterioza na nacionalnom nivou, ne dozvoljava utvrđivanje pravog javno-zdravstvenog značaja *Campylobacter species* u zemljama u razvoju. U svakodnevnom kliničkom radu u našoj zemlji *Campylobacter* se ne identifikuje klasičnom bakteriološkom analizom u okviru koprokulture, već je neophodno da se izolacija traži ciljano. S obzirom na to da se u svakodnevnom radu nismo susreli sa podacima o kampilobakteriozama usled izostanka bakterioloških pregleda stolice na *Campylobacter* kod dece sa dijarejom i nedostatka važećeg pravilnika o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica koji ne obuhvata ispitivanje namirnica na *Campylobacter species*, učestalost IgM seropozitivnosti na ovu bakteriju, kod dece uzrasta do 2 godine sa prethodno prisutnim gastrointestinalnim simptomima, od preko 50% smatra se izuzetno visokom. Ipak, ukoliko je poznato da se u razvijenim zemljama u kojima postoji obaveza ispitivanja namirnica na *Campylobacter spp.* ova bakterija smatra jednim od najčešćih uzročnika trovanja hranom (1), onda i ne iznenadjuje visok procenat seropozitivnosti u našoj ispitivanoj grupi.

Izloženost dece *Campylobacter*-u raste u drugoj polovini prve godine života, kada deca prelaze na mešovitu ishranu koja na našem podneblju između ostalog podrazumeva i konzumiranje piletine. Stanford i saradnici su ispitujući učestalost *Campylobacter* infekcije u uzrastu od 0 do 4 godine utvrdili najčešće javljanje u uzrastu od 12 do 23 meseca (15). Nigerijski autori navode da je infekcija *Campylobacter jejuni* retka pre 6. meseca života i ukazuju na protektivni uticaj dojenja u okviru uvođenja beby friendly programa u smislu zaštite od infekcije *Campylobacter jejuni* (12, 16). Švedski autori su utvrdili prisustvo sIgA antitela u majčinom mleku koja imaju ulogu u zaštiti odojčeta od *Campylobacter* infekcija (17). U našem ispitivanju dojenje nije imalo protektivni uticaj na ovu infekciju.

Očekivano je da deca iz seoskih sredina budu češće inficirana *Campylobacter*-om, s obzirom na blizak kontakt sa životinjama, uzgajanje živine, ishranu jajima i mlečnim proizvodima (6, 18, 19). U našem istraživanju nismo utvrdili razliku u učestalosti seropozitivnosti na *Campylobacter jejuni* između dece sa sela i dece koja žive gradskim stilom života. Australijski autori takođe nisu utvrdili povezanost izolacije *Campylobacter*-a iz stolice sa geografskom distribucijom, kao ni sa socio-ekonomskim statusom (14).

U studiji Adekunle i Cokera nije utvrđeno prisustvo *Campylobacter sp.* u stolici zdrave dece bez dijareje, uzrasta 0-36 meseci. Autori smatraju da je *Campylobacter jejuni* uvek patogen, a da grupe asimptomatskih pacijenata sa izolovanim *Campylobacter*-om predstavljaju infekcije u fazi oporavka, a njihovu učestalost od oko 15% tumače lošijim higijenskim statusom i kontaktom sa životinjama, što je karakteristika zemalja u razvoju, a malu učestalost dece u razvijenim zemljama povezuju sa dobrim higijenskim uslovima (15).

Najčešće opisani simptomi kod dece sa simptomima enteritisa izazvanog *Campylobacter jejuni* infekcijom su vodene dijareje (93,2%), abdominalni bol (92,0%), povišena temperatura (81,2%) i povraćanje (46,1%) (20). Međutim, klinički spektar ove bolesti obuhvata i blage, samoograničavajuće i neinflamatorne oblike (13). Ponavljana infekcija sa kliničkim ispoljavanjem bolesti ili bez toga i u odsustvu ponovnog izlaganja bakteriji, ukazuje na to da uneseni patogen nije kompletno eliminisao domaćin, najčešće usled insuficijentnog imunološkog odgovora (21), što je i karakteristika imuniteta u odojačkom periodu. U našoj ispitivanoj grupi od 32 IgM seropozitivna deteta samo je dvoje imalo podatak u anamnezi o hospitalizaciji zbog enterocolitisa, ali pri tome nije tražena ciljano analiza stolice na prisustvo *Campylobacter jejuni* u stolici. Ostala deca sa prolivima i povraćanjem nisu imala teške akutne oblike gastrointestinalne bolesti, koji bi zahtevali hospitalizaciju. Kod oko polovine IgM seropozitivne dece na *Campylobacter*

*jejuni* u anamnezi postoji jedino podatak o prethodno ispoljenim rekurentnim izraženim grčevima. Termin „infantilna kolika“ opisuje kompleks simtoma u vidu paroksizmalnog bola u stomaku, prevashodno intestinalnog porekla i izražen plač odojčeta (22). Progutani vazduh, hrana sa dosta ugljenih hidrata, ali i ljutnja i uzbuđenje mogu uzrokovati kolike odojčeta. S druge strane, infekcija, alergija na hranu i subokuzija i okluzija creva mogu imitirati infantilne kolike (22). Kao najčešće objašnjenje nastanka infantilnih kolika navodi se ekstenzivna distenzija creva nastala usled nakupljanja gasova. Nije jasno da li bi u okviru neinflamatornih oblika ili subkliničke manifestacije infekcije *Campylobacter jejuni*, postojala mogućnost stvaranja gasnih kolekcija koje bi uzorkovale nastanak kolika. Ispitivanjima na animalnim modelima je pokazano da *Campylobacter* uzokuje translokaciju neinvazivnih bakterija (23), te bi poremećaj normalne intestinalne flore kod odojčadi mogao dovesti do ispoljavanja distenzije i izraženih kolika u okviru blagih, neinflamatornih oblika kampilobakterioze.

*Campylobacter* infekcija je veliki problem javnog zdravlja sa kompleksnom epidemiologijom, ekstenzivnim rezervoarima i višestrukim faktorima rizika. Adekvatan pristup u utvrđivanju postojanja enteralnih infekcija kod odojčadi i male dece ima veliki značaj u preventivnoj strategiji i optimalnom lečenju nejasnih stanja koja bi mogla biti uzrok intestinalnim infekcijama (24).

## DODATAK I ZAHVALNOST

Istraživanje je sprovedeno u okviru projekta „Kad porastem biću zdrav“ Instituta za javno zdravlje u Kragujevcu.

## SKRAĆENICE

GIT – gastrointestinalni simptomi

IgM – imunoglobulin klase M

sIgM – specifični imunoglobulin klase M

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

RF – reuma faktor

## LITERATURA

- Westrell T, Ciampa N, Boelaert F, et al. Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. Euro Surveill 2009;22;14(3). pii: 19100.
- Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, et al. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. Clin Infect Dis 2004;38 (Suppl 3):S285–96.
- Van koningsveld R, Rico R, Gerstenbluth I, et al. Gastroenteritis-associated Guillain-Barre' syndrome on the Cari-bbean island Curacao. Neurology 2001; 56:1467–72.
- Neal KR, Slack RCB. The autumn peak in campylobacter gastroenteritis: are the risk factors the same for travel and UK acquired campylobacter infections? J Publ Hlth Med 1995;17: 98–102.
- Adak GK, Cowden JM, Nicholas S, Evans HS. The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of campylobacter infection. Epidemiol Infect 1995; 15:15–22.
- Oberhelman RA, and Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In: Nachamkin I. and Blaser M. J. *Campylobacter*; 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2000: 139–53.
- Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Br Med J (Clin Res Ed) 1981;282:1584.
- Rao MR, Naficy AB, Savarino SJ, et al. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. Am J Epidemiol 2001;154:166–73.
- Le Roux E, Lastovica AJ. The Cape Town Protocol: how to isolate the most campylobacters for your dollar, pound, franc, yen, etc. In: Lastovica AJ, Newell DG, Lastovica EE, editors. Proceedings of the 9th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Cape Town: Institute of Child Health; 1998: 30–3.
- Megraud F, Boudraa G, Bessaoud K, et al. Incidence of *Campylobacter* infection in infants in western Algeria and the possible protective role of breast feeding. Epidemiol Infect 1990;105:73–8.
- De Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Bartelds AIM, van Duynhoven YTHP. Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2001;7:82–91.
- Coker A. Human Campylobacteriosis in Developing Countries. Emerg Infect Dis 2002; 8(3):237–43.
- Al-Mahmeed A, Senok AC, Ismaeel AY, Bindaayna KM, Tabbara KS, Botta GA. Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolates in Bahrain. J Med Microbiol 2006 ;55(Pt 7):839–43.
- Stafford R, Tenkate T, McCall B. A five year review of campylobacter infection in Queensland. Comm Dis Intell 1996; 20: 478–82.

15. Adekunle O, Coker AO, Kolawole DO. Incidence, isolation and characterization of *Campylobacter* species in Osogbo. *Biology and Medicine* 2009; 1(1):24–7.
16. Bilenko N, Ghosh R, Levy A, Deckelbaum RJ, Fraser D. Partial breastfeeding protects Bedouin infants from infection and morbidity: prospective cohort study. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17(2):243–9.
17. Torres O, Cruz JR. Protection against *Campylobacter* diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. *Acta Paediatr* 1993 ;82(10):835–8.
18. Mellou K, Sourtzi P, Tsakris A, Saroglou G, Velonakis E. Risk factors for sporadic *Campylobacter jejuni* infections in children in a Greek region. *Epidemiol Infect* 2010; 24:1–7. [Epub ahead of print].
19. Tenkate TD, Stafford RJ. Risk factors for campylobacter infection in infants and young children: a matched case-control study. *Epidemiol Infect* 2001;127:399–404.
20. Wang SC, Chang LY, Hsueh PR, Lu CY, Lee PI, Shao PL et al. *Campylobacter* enteritis in children in northern Taiwan--a 7-year experience. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41(5):408–13.
21. Baqar S, Tribble DR, Carmolli M, et al. Recrudescence of *Campylobacter jejuni* infection in an immunocompetent adult following experimental infection with a well-characterized organism. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(1):80–6.
22. Behrman R. First year feeding problems. In: Nelson Textbook of Pediatrics. 14<sup>th</sup> ed. W.B Saunders Company, 1992: 127–9.
23. Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 2009;1(1):2.
24. Lu L, Baldeon ME, Savidge T, Pothoulakis C, Walker WA. Development of microbial-human enterocyte interaction: cholera toxin. *Pediatr Res* 2003;54(2):212–8.