ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

მედიცინის ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა

საზოგადოებრივი ჯანდაცვა და ეპიდემიოლოგია

მაია მეტრეველი

„კამპილობაქტერიოზი გასტროენტერიტული ინფექციით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში და *Campylobacter* spp. მტარებლობა ქათმებში“

საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის

ავტორეფერატი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ***პაატა იმნაძე***

თბილისის ივ. ჯავახიშვილის სახ. სახელმწიფო
უნივერსიტეტის მედიცინის ფაკულტეტის პროფესორი
/მედიცინის დოქტორი

თბილისი

2022

აბსტრაქტი

კამპილობაქტერია ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ აღიარებულია, როგორც სურსათისმიერი, გასტროენტერიტების გამომწვევი ყველაზე ხშირად იდენტიფიცირებადი ბაქტერია მსოფლიოში. მის მიერ გამოწვეული დაავადება - კამპილობაქტერიოზი უმეტესად თვითმილევადია, თუმცა, მწვავე შემთხვევები საჭიროებს ანტიბიოტიკოთერაპიას. იგი ხასიათდება წყლიანი ან სისხლიანი დიარეით, ცხელებითა და მუცლის სპაზმით, იშვიათად ღებინებით. კამპილობაქტერიოზის ტვირთს მნიშვნელოვნად ამძიმებს ხანგძლივი, პოსტინფექციური, ავტოიმუნური სექველა, როგორიცაა გიენ-ბარეს სინდრომი და სხვა.

სადისერტაციო ნაშრომი წარმოადგენს საქართველოში პირველად განხორციელებულ *Campylobacter* spp.-ის კვლევას, ერთი მხრივ, ნაწლავური ინფექციების მქონე ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში და, მეორე მხრივ, ქათმებში, როგორც ინფექციის ძირითად რეზერვუარსა და წყაროში. მისი მიზანია, განსაზღვროს კამპილობაქტერიოზის ტვირთი გასტროენტერიტული ინფექციით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში, გამოავლინოს მისი სიხშირე და ეპიდემიოლოგიური ტრენდი სხვა ნაწლავურ ინფექციებთან მიმართებით და შეისწავლოს ადამიანისა და ფრინველის ნიმუშებიდან იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის ქართული შტამების ანტიბიოტიკური რეზისტენტობა და ფილოგენეტიკური მრავალფეროვნება.

კვლევის ფარგლებში, განხორციელდა წარმატებული თანამშრომლობა ეროვნულ დონეზე დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრთან, „თბილისის ბავშვთა ინფექციურ

კლინიკურ ჰოსპიტალთან“ და მეფრინველეობის ფერმებთან, ხოლო საერთაშორისო დონეზე „გერმანიის რისკის შეფასების ფედერალურ ინსტიტუტთან“ (BfR) და ჯორჯიის უნივერსიტეტის, მეფრინველეობის დეპარტამენტთან (აშშ, UGA).

2020-2021 წლებში, სულ შესწავლილია პაციენტთა 481 ფეკალისა და ქათმის ბრმა ნაწლავის 160 ნიმუში. *Campylobacter* spp.-ის დეტექცია და იზოლირება განხორციელდა სელექტიურ ნიადაგებზე ბაქტერიოლოგიური მეთოდით, ხოლო კულტურის შემდგომი იდენტიფიცირება, დადასტურება და სახეობრივი დიფერენცირება მოხდა ბიოქიმიური ტესტებითა და რეალურ დროში პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით (RT-PCR). გარდა ამისა, „სრული გენომის სექვენირებით“ (WGS) განხორციელდა *Campylobacter* spp-ის 204 ქართული შტამის მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევა და EUCAST-ის მიერ რეკომენდირებული, მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციების (MIC) მეთოდით შტამების ანტიმიკრობული მგძნობელობის შეფასება.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგებით, კამპილობაქტერიოზის წილმა დიარეული დაავადებებით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში, ქვეყნის მასშტაბით, შეადგინა 16.6% (95%CI[3.05, 20.8]) (თბილისი, ბათუმი, ქუთაისი), ხოლო თბილისში მისი სიხშრე და ეპიდემიოლოგიური ტრენდი სხვა ნაწლავურ ინფექციებთან მიმართებით აღმოჩნდა შემდეგი: ყველაზე ხშირად იდენტიფიცირებადი იყო *Shigella sonnei* 19.1% (95%CI[15.2, 23.4]), სიხშირით მეორე თერმოფილური *Campylobacter* spp. 12.3%(95%CI[9.2, 16.0]) და *Salmonella* spp.ს იდენტიფიცირება მოხდა საკვლევი ნიმუშების მხოლოდ 4.9% (95%CI[3.0, 7.6]). რაც შეეხება კამპილობაქტერიოზის

ტვირთს, ეპიდემიოლოგიური პირამიდის მეთოდით, დაავადების სავარაუდო ინციდენტობა თბილისის ბავშვთა პოპულაციაში შეფასდა, როგორც 6 შემთხვევა 1000 ბავშვზე წელიწადში. ამასთან, მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა *Campylobacter* spp.-ით ინფიცირებულ პაციენტთა მედიანური ასაკი (40 თვე) და *Shigella sonnei*-ით ინფიცირებული პაციენტთა მედიანური ასაკისგან (92 თვე). ეს განსხვავება სტატისტიკურად დაადასტურა მან-უიტნის ტესტმაც (U=994, p<0.001). შედეგად, კამპილობაქტერიოზი აღმოჩნდა ლიდერი ბაქტერია გასტროენტირიტული ინფექციებით ჰოსპიტალიზირებული სკოლამდელი ასაკის ბავშვებში.

საქართველოში იზოლირებულმა *Campylobacter* spp.-ის, როგორც კლინიკურმა, ასევე ფრინველის შტამებმა გამოვლინეს მაღალი ანტიბიოტიკური რეზისტენტობა ციპროფლოქსაცინისა და ტეტრაციკლინის მიმართ, ხოლო გენტამიცინის, ერითრომიცინისა და ქლორამფენიკოლისადმი ყველა შტამი იყო მგრძნობიარე. ერტაპენემის მიმართ *C. coli*-ს იზოლანტებმა აჩვენეს სხვადასხვა პროცენტით რეზისტენტობა, მაშინ როცა *C. jejuni* -ის შტამები იყვნენ სრულად მგრძნობიარე ამ ახალი თაობის ანტიბიოტიკური საშუალების მიმართ.

ანტიბიოტიკური რეზისტენტობის დეტერმინანტი წერტილოვანი მუტაციები აღმოჩნდა ფლორქინოლებისა და ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტული ყველა შტამის *gyr*A (T86I) და *tet*(O) გენებში. მულტირეზიტენტული შტამები უფრო ხშირი იყო ადამიანისა და ფრინველის ნიმუშებიდან იზოლირებულ *C. coli* -ში, ვიდრე *C. jejuni* -ში.

მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის შედეგად, *Campylobacter* spp.-ის ქართულ შტამებში აღმოჩნდა მულტილოკუსური სექვენირების ტიპების (ST) დიდი

ვარიაბელობა, მათ შორის სამი ახალი სექვენს ტიპი, რომლებიც განთავსდა PubMLST მონაცემთა ბაზაში. RT-PCR კვლევის შედეგად *Campylobacter* spp.-ის 204 შტამიდან 37.7% (n=77) იდენტიფიცირებული იყო *C. jejuni* და 62.3% (n=127) *C. coli*. აღსანიშნავია, რომ ფრინველის იზოლანტებში უჩვეულოდ დომინირებდა *C. coli*.

წარმოდგენილმა კვლევამ გამოავლინა კამპილობაქტერიოზის ენდემურობა ქვეყანაში. მისი შედეგები, საინტერესოა, როგორც სურსათის უვნებლობისა და ვეტერინარიის, ასევე საზოგადოებრივი ჯანდაცვის სექტორებისთვის.

მიმოხილვა

კამპილობაქტერიოზი თერმოფილური *Campylobacter* spp.-ით გამოწვეული დაავადებაა, რომელიც მსოფლიოში სურსათიმიერი დიარეებისა და გასტროენტერიტების გამომწვევ ყველაზე ხშირად იდენტიფიციერებად ოთხ ბაქტერიას შორისაა. *Campylobacter*-ის სახეობები მოძრავი, რკალისებრი, მიკროაერობული, გრამუარყოფითი ჩხირებია, რომლებიც ჩვეულებრივ არსებობენ მრავალი შინაური და ველური, თბილსისხლიანი ცხოველის გასტროინტესტინალურ ტრაქტში.

კამპილობაქტერიოზის არაერთი წყაროა ცნობილი, როგორიცაა: არაპასტერიზებული რძე, შინაური ცხოველები და სხვა. თუმცა, ევროპის სურსათის უვნებლობის ორგანოს (EFSA) მონაცემებით, ევროპაში კამპილობაქტერიოზის 20%-30% ასოცირდება ქათმის ხორცის მოხმარებასთან, ხოლო 50%-80% უკავშირდება ფრინველის რეზერვუარს.

კამპილობაქტერიოზი ძირითადად თვითმილევადი დაავადებაა, თუმცა შემთხვევების მნიშვნელოვანი ნაწილი (31%) საჭიროებს ანტიბიოტიკებით მკურნალობას. დაავადების ტვირთს მნიშვნელოვნად ამძიმებს, კამპილობაქტერიოზისთვის დამახასიათებელი, გახანგძლივებული, აუტოიმუნური სექველა, როგორიცაა: რეაქტიული ართრიტი, გაღიზიანებული ნაწლავის სინდრომი და გინ-ბარეს სინდრომი.

საქართველოში კამპილობაქტერიოზის დიაგნოზირება არ ხდება, რადაგან კლინიკური ლაბორატორიების სტანდარტულ, პროცედურულ, დიაგნოსტიკურ კვლევებში ამ ბაქტერიის იდენტიფიცირება არ ხორციელდება. აქედან გამომდინარე, ქვეყანაში უცნობია კამპილობაქტერიოზის სიხშირე და დაავადების ტვირთი. მაშინ როცა, საგანგაშოდ

მაღალია „სავარაუდო ინფექციური წარმოშობის დიარეებსა“ და „სავარაუდო სურსათისმიერი მოშხამვების“ სტატისტიკა, განსაკუთრებით კი - ბავშვთა პოპულაციაში.

მსოფლიოში ბაქტერიების მულტირეზისტენტული შტამების აღმოცენება და გავრცელება საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის მნიშვნელოვან გამოწვევად რჩება. ევროკავშირის ბევრ ქვეყანაში დაფიქსირებულია მეხორცული მიმართულების ქათმებში (ბროილერში) და ადამიანის ნიმუშებიდან გამოყოფილი *C.jejuni*-ის იზოლატებში რეზისტენტობის ზრდა ტეტრაციკლინისა და ციპროფლოქსაცინის მიმართ.

საქართველოში ანტიმიკრობული რეზისტენტობის (ამრ) ზედამხედველობის მონაცემები საზოგადოებრივი ჯანდაცვის სისტემაში მწირია, ხოლო სურსათის წარმოებისა და ვეტერინარიის სექტორებში თითქმის არ არსებობს.

წარმოდგენილი სადისერტაციო შრომის მიზანია, განსაზღვროს კამპილობაქტერიოზის ტვირთი გასტროენტერიტული ინფექციით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში, გამოავლინოს მისი სიხშირე და ეპიდემიოლოგიური ტრენდი სხვა ნაწლავურ ინფექციებთან მიმართებით და შეისწავლოს ადამიანისა და ფრინველის ნიმუშებიდან იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის ქართული შტამების ანტიბიოტიკური რეზისტენტობა და ფილოგენეტიკური მრავალფეროვნება.

კვლევის მეთოდოლოგია

ეთიკური დასკვნა - სადისერტაციო ნაშრომის კლინიკური კვლევის კომპონენტზე ეთიკური დასკვნა წარმოადგინა „თბილისის ბავშვთა ინფექციური კლინიკური საავადმყოფოს“ სამედიცინო ეთიკის კომისიამ (15.06.2020), ხოლო დკსჯ - კვლევის ეთიკის საბჭომ მოახდინა პროექტის კვლევის პროტოკოლისა და სხვა სათანადო დოკუმენტაციის შეფასება და დაასკვნა, რომ კვლევის პროტოკოლის მიხედვით საკვლევი პირების უფლებები და კეთილდღეობა ადექვატურად იყო დაცული (28.12.2021).

კვლევის დიზაინი - 2020 წლის ივნისიდან 2021 წლის სექტემბრის ჩათვლით „თბილისის ბავშვთა ინფექციური საავადმყოფოდან“ და დკსჯ-ს დაავადებათა ეპიდზედამხედველობის სისტემის მეშვეობით შეგროვდა ადამიანის 481 ფეკალური ნიმუში საქართველოს ოთხი დიდი ქალაქიდან: თბილისი - 405, ბათუმი – 49, ქუთაისი - 25 და გორი - 2. კვლევის შერჩევაში მოყვნენ ჰოსპიტალიზირებული, ბავშვთა ასაკის პაციენტები მწვავე, ანთებითი დიარეით, რომელებსაც აღენიშნებოდათ შემდეგი სიმპტომები: ცხელება მუცლის სპაზმით, ღამის დიარეა, ლეიკოციტები განავალში, მწვავე სისხლიანი დიარეა ან ჰემოგლობინზე დადებითი განავალი.

აღნიშნული პაციენტების ნიმუშების ტესტირება, ბაქტერიოლოგიური მეთოდით, ხორციელდებოდა კლინიკების ლაბორატორიებში სხვა ენეტეროპათოგენებზე. ბათუმის, ქუთაისისა და გორის საყრდენი სადგურები, *Campylobacter* spp.-ის ბაქტერიული მეთოდით კვლევისთვის აგზავნიდნენ მხოლოდ იმ ნიმუშებს, რომლებშიც ვერ ხდებოდა ეტიოლოგიური აგენტის იდენტიფიცირება, ხოლო „თბილისის ბავშვთა ინფექციური კლინიკური

საავადმყოფოდან“ იგზავნებოდა კვლევის შერჩევის კრიტერიუმში მოხვედრილი ყველა პაციენტის ნიმუში. წარმოდგენილ სადოქტორო ნაშრომში გამოყენებულია აღნიშნული კლინიკის ლაბორატორიის მიერ *Salmonella* spp. და *Shigella* spp.-ს კვლევის შედეგები და პაციენტთა მეტა მონაცემები.

ნაშრომში ასევე წარმოდგენილია *Campylobacter* spp. კვლევა ფრინველის ნიმუშებში. რისთვისაც 2020 წლის თებერვლიდან 2021 წლის სექტემბერამდე: თბილისის, დიღმის ცოცხალ ცხოველების ბაზარის“ სასკლაოზე შეგროვდა ქათმის ბრმა ნაწლავის 110 ნიმუში (შემდგომში „ოჯახური“ ქათმის ნიმუში) და აღმოსავლეთ საქართველოში მდებარე, საშუალო ზომის მეფრინველეობის ფერმიდან 50 ნიმუში (ე.წ. „ინდუსტრიული“ ქათმის ნიმუში). აღსანიშნავია, რომ კვლევის ფარგლებში შეგროვებული ადამიანისა და ფრინველის ნიმუშები კორელაციაში იყო ერთმანეთთან პერიოდისა და ლოკაციის მიხედვით.

კლინიკური ნიმუშების ტრანსპორტირება ხორციელდებოდა აღებიდან არაუმეტეს 24 საათში, უმეტესად ქერი-ბლეერის სატრანსპორტო ნიადაგით, 4-6◦C-ზე, ხოლო ფრინველის ნიმუშები გადაიტანებოდა ყინულით კონტეინერებში და იტესტებოდა არაუმეტეს 3-6 საათის განმავლობაში.

***Campylobacter* spp.-ს იზოლირება და იდენტიფიცირება** განხორციელდა ISO 10272-1:2017 ნაწილი C-ის შესაბამისად „მოდიფიცირებულ ნახშირის, ცეფოპერაზონის, დეოქსიქრორიდის სელექტიურ აგარზე (mCCDA), ხოლო კლინიკური ნიმუშებისთვის მეორე სელექტიურ ნიადაგად გამოყენებოდა CROMagar *Campylobacter*. ნიმუშების 20%-ის დაექვემდებარა „პრესტონის ბულიონში“ (Preston broth) გამდიდრებას. ფინჯნების ინკუბირება განხორციელდა 42°C-

ზე, მიკრო-ანაერობულ გარემოში (O2-5%, CO2 -15%, N2 -80%) 48 საათის განმავლობაში. საეჭვო კოლონიის ნაცხის პრეპარატის გრამის მეთოდით შეღებვის შემდგომ ვახდენდით მის მიკროსკოპირებას. დამატებით, *Campylobacter* spp.-ის საეჭვო კოლონიების დადასტურებას ვახდენდით ბიომერიქსის აპი-კამპის ბიოქიმიური სისტემის ტესტების სისტემით (Biomerieux system ApiCampy). *Campylobacter* spp.-ის იზოლირებული კოლონიების შენახვა ხორციელდებოდა კრიო სინჯარებში 10%-იანი გლიცერინ-ბრუცელას ბულიონში – 80°C-ზე შემდგომი კვლევებისთვის.

***Campylobacter* spp.-ს სახეობრივი დიფერენცირება და დადასტურება რეალურ დროში პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქციით (Real-Time PCR).** საქართველოში იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ს 220 შტამის, რომელთაგანაც 60 იყო იზოლირებული პაციენტთა ნიმუშებიდან და 160 ფრინველის ბრმა ნაწლავის შიგთავისიდან, შემდგომი კვლევა გაგრძელდა გერმანიის რისკის შეფასების ფედერალური ინსტიტუტის კამპილობაქტერიის რეფერალურ ლაბორატორიაში (BfR NRL- *Campylobacter*).

Campylobacter spp. იზოლანტების სახეობრივი დიფერენცირება განხორციელდა RT-PCR მეთოდით. რისთვისაც, დნმ-ის ექსტრაქციისთვის იზოლატების უჯრედული მასის რესუსპენზირებას ვახდენდით 5%-იან Chelex 100 resin. მიღებული სუსპენზიის თერმულ ლიზისს ვახორციელებდით 95°C ზე 15 წუთის განმავლობაში და შემდგომ ვაცენტრიფუგებდით 5 წთ. (14,000 × g). მიღებული ბაქტერიული დნმ-ის შემცველი 2.5 მკლ ნალექს, 1:100 განზავებით, ვიყენებდით შემდგომი PCR ანალიზისთვის.

RT-PCR რეაქციაში გამოყენებული ოლიგოების საბოლოო კონცენტრაცია იყო 300 nM, 100 nM ფლუორესცენტრული

მუქი-ქვენჩერ პრობები და 1U Platinum Taq დნმ პოლიმერაზა; რეაქციაში გამოყენებული იყო ფლუორესცენტული საღებავების კომბინაცია FAM *C. jejuni-ის map*A-სთვის და, JOE *C. coli-ის ceu*E -თვის და Cy5 *C. lari*-ის *gyr*A-სთვის, ხოლო ამპლიფიკაციის კონტროლად ემატებოდა IPC-ntb2 პლაზმიდის 25 ასლი.

***Campylobacter* spp.-ს ანტიმიკრობული მგრძნობელობის ტესტირებისთვის (ამრ)** - *Campylobacter* spp.-ის სუფთა კულტურებიდან ვამზადებდით სუსპენზიას 2–8 × 10^5 კოლონიის წარმომქმნელი ერთეული/მლ-ში და კათიონით კორექტირებულ მიულერ ჰილტონის ბულიონში (Cation-supplemented Mueller–Hinton broth), რომელსაც დამატებული ჰქონდა 5% ხბოს ჩანასახის შრატი. MIC-ები დეტერმირებული იყო ევროპულ, სტანდარტიზებულ, მიკროტიტრული ფირფიტის ფორმატში EUCAMP3. ტესტირებაში გამოყენებული იყო ეპიდემიოლოგიური ზღვრული სიდიდეები (ECOFFs), რომელიც დადგენილია ანტიმიკრობული მგძნობელობის ტესტირების ევროპული კომიტეტის მიერ (https://mic.eucast.org/Eucast2). *Campylobacter* spp. - სთვის ECOFFs არის შემდეგი: 16 mg/mL (CHL), 0.5 mg/mL (CIP), 0.5 mg/mL (ETP) და 2 mg/mL (GEN). ERY და TET სთვის სახეობებითვის სპეციფიური ECOFFs იქნა მიჩნეული, კერძოდ *C. jejuni* 4 mg/mL (ERY) და 1 mg/mL (TET), ხოლო *C. coli-სთვის* 8 mg/mL (ERY) და 2 mg/mL (TET). ინოკულირებული ფირფიტების ინკუბირება ხორციელდებოდა 44 ± 4 სთ, 37ºC-ზე მიკროაერობულ გარემოში. MIC-ები (mg/L) გაანალიზება ხდებოდა ნახევრადავტომატური მოწყობილობით (Sensititre Vizion system).

***Campylobacter* spp.-ს შტამების სრული გენომის სექვენირება (WGS).** 12-18 - საათიანი კულტურებიდან გემონური დნმ-ის ექსტრაქცია ხორციელდებოდა PureLink Genomic DNA Mini Kit გამოყენებით. დნმ რაოდენობრივი შეფასება ხდებოდა ფლუორიმეტრიულად Qubit 3.0 Fluorometer-ით (dsDNA HS Assay Kit 0.2–100 ng), ხოლო ხარისხობრივი სპექტრული ანალიზით (NanoDrop Spectrophotometer). ტესტისთვის დნმ-ის ბიბლიოთეკა მომზადდა Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation Kit-ით მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად, ყველა რეაგენტის მოცულობების განახევრებით. დაწყვილებული ბოლოების (paired-ended) სექვენირება განხორციელდა Illumina MiSeq სისტემაზე (2x151 ციკლი) MiSeq Reagent Kit v3 (600 ციკლი) გამოყენებით. პირველადი მონაცემების დამუშავება და de-novo აწყობა მოხდა AQUAMIS პაიპლაინის v1.3.8 საშუალებით. აწყობილი გენომის კონტიგების ხარისხი ავტომატურად შეფასდა teQuilR შიდა პაიპლაინით.

ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობები გამოქვეყნდა NCBI ბაზაში. ფილოგენეტიკური ანალიზის შესასრულებლად გამოყენებულ იქნა Ridom Seqsphere+ v8.2.0. cgMLST სქემით აწყობილი გენომის კონტიგების წინასწარ განსაზღვრულ 1343 სამიზნე გენზე 98%-იანი იდენტობითა და რეფერენტული თანმიმდევრობის NC_002163.1.gb ერთ-ერთ ალელთან (*C. jejuni* NCTC 11168) 98% დაფარვით. მინიმუმ 95% „კარგი სამიზნეები“ იქნა ნაპოვნი cgMLST-ზე დაფუძნებული ანალიზისთვის წინასწარ შეთავაზებული cgMLST სქემით.

ანტიმიკრობული რეზისტენტობის დეტერმინანტებისა და პლაზმიდური მარკერების პროგნოზირება აწყობილი გენომის კონტიგებში განხორციელდა BakCharak პაიპლაინით v2.0. პაიპლაინის ინსტრუმენტები მოიცავდა: ABRicate v1.0.1,

AMRFinderPlus v3.6.15-ს და მასთან დაკავშირებულ მონაცემთა ბაზას, აგრეთვე ანტიმიკრობული პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის დეტერმინანტებს, პლაზმიდების პროგნოზირებისთვის Platon v1.1.0-ს და პლაზმიდურ blaster ინსტრუმენტს. BLAST შედეგები გაიფილტრა კონტიგის სიგრძის სულ მცირე 20%-იანი დაფარვით.

შედეგების სტატისტიკური ანალიზი - განხორციელდა SPSS 21.0 ვერსიის გამოყენებით. სარწმუნოობის 95%-იანი ინტერვალები განისაზღვრა *Campylobacter* spp.-ს სიხშირის პროცენტული მაჩვენებლებისათვის. აგრეთვე, სტატისტიკურად გაანალიზდა თბილისის კლინიკური ნიმუშების კვლევის შედეგები. კერძოდ, სამი პათოგენიდან თითოეულით ინფიცირების კავშირი პაციენტთა ასაკობრივი ჯგუფების კატეგორიებთან შეფასდა მან-უიტნის U (Mann–Whitney U) ტესტის გამოყენებით. გარდა ამისა, შანსის შეფარდება (Odds Ratio (OR) გამოვითვალეთ კვლევაში არსებული ორი სხვადასხვა სელექტიური ნიადაგის გამოყენებასა და მიკროორგანიზმის ზრდის მაჩვენებლებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო ასოცირების ჰიპოთეზის შესამოწმებლად.

Campylobacter spp. შტამების ანტიბიოტიკური რეზისტენტობის ანალიზის შედეგების სტატისტიკური ანალიზისთვის ECOFFs მაჩვენებლების მიხედვით მოხდა შტამების კატეგორიზაცია მგძნობიარე და რეზისტენტულ ფორმებად დამოკიდებული ცვლადის დიქოტომიზაციით - „რეზისტენტული vs. მგძნობიარე (რეფერენტული [reference] კატეგორია)". ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის საფუძველზე შემუშავდა დამატებითი გამოსავალი ცვლადი კატეგორიებით „2-3-ჯერადი რეზისტენტობა".

ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტულობასა (დამოკიდებული ცვლადი) და სავარაუდო პრედიქტორებს (მატრიქსის წყაროს ცვლადები (ადამიანი vs. ქათამი (რეფერენტული [reference] კატეგორია) და ბაქტერიის სახეობებისთვის (*C. coli vs. C. jejuni* (რეფერენტული [reference] კატეგორია) შორის კავშირის დეტექციისათვის მრავლობითი ლოგისტიკური რეგრესია, ხოლო დამოუკიდებელი პრედიქტორული მოდელის შესაქმნელად ფორვარდერი შერჩევის მეთოდი (Forward selection (Forward LR [Likelihood Ratio]) method) გამოვიყენეთ. გამოვითვალეთ ნაგელკერკის ფსევდო R კვადრატი (Nagelkerke pseudo R Square) და არასტანდარტული ბეტა კოეფიციენტი (B). შანსის შეფარდება 95%-იანი სარწმუნოობის ინტერვალით შეფასდა, როგორც B კოეფიციენტის ექსპონენციალური ფუნქცია (Exp [B]). ყველა სტატისტიკურ ანალიზში ნულოვანი ჰიპოთეზის მართებულობის ალბათობა <5%-ზე ($p<0.05$) მიჩნეულია სტატისტიკურად სარწმუნოდ.

<u>კვლევის შედეგები და მათი ანალიზი</u>

კამპილობაქტერიოზის წილი დაუდგენელი ეტიოლოგიის, ბაქტერიული დიარეული ინფექციით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში საქართველოში - წარმოდგენილი სადოქტორო კვლევის ფარგლებში ჩვენ შევეცადეთ დაგვედგინა კამპილობაქტერიოზის სიხშირე „დაუდგენელი ეტიოლოგიის“, ბაქტერიული, დიარეული დაავადებით ჰოსპიტალიზირებულ ბავშვებში, საქართველოს სამი დიდი ქალაქის მონაცემებით. შედეგად 378 „დაუდგენელი ეტიოლოგიის“ ნიმუშიდან 16.6% (95%CI[13.05, 20.8] (n=63)) აღმოჩნდა დადებითი *Campylobacter* spp.-ზე. ამასთან, თბილისში კამპილობაქტერიოზის სიხშირე იყო 17.2 %

(95%CI[13.1, 21.9] (n=302/52)), ბათუმში 16.3% (95%CI[7.3, 29.7] (n=49/8)) და ქუთაისში 12% (95%CI[2.5, 31.2] (n=25/3)).

გარდა ამისა, 2020 ივლისიდან 2021 ივლისამდე (1 წლის განმავლობაში) „თბილისის ბავშვთა ინფექციური კლინიკური საავადმყოფოდან“ შემოსული 382 ნიმუშის საფუძველზე, ჩვენ შევეცადეთ შეგვედარებინა სამი ენტეროპათოგენის (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. *Shigella* spp.) სიხშირეები საკვლევ პოპულაციაში და გაგვეანალიზებინა ამ პათოგენებით ინფიცირებულ პაციენტთა ასაკობრივი განაწილება და მათი სეზონურობა თბილისში.

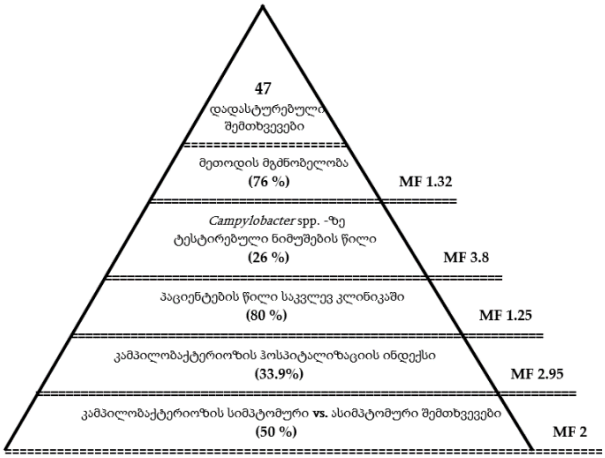
382 ფეკალის ნიმუშიდან, 139 ნიმუში (36.4%) დადებითი იყო სამიდან რომელიმე სამიზნე პათოგენზე. ნიმუშებში არცერთი შერეული ინფექცია არ აღმოჩნდა. საკვლევ პოპულაციაში ენტეროპათოგენურ ბაქტერიებს შორის ყველაზე ხშირი იყო *Shigella sonnei* (19.1% (95%CI[15.2, 23.4] n=73), სიხშირით მეორე იყო თერმოფილური *Campylobacter* spp. (12.3% (95%CI[9.2, 16.0] n=47) და ბოლოს, *Salmonella* spp. (4.9% (95%CI[3.0, 7.6] n=19). თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ შემთხვევათა ნახევარზე მეტში 63.6% (n=243), ეტიოლოგიური აგენტის იდენტიფიცირება ვერ მოხერხდა.

საკვლევ ჯგუფში მოხვდვენენ პაციენტები მწვავე ჰემოკოლიტით, სისხლიანი დიარეითა და ცხელებით, ან გახანგრძლივებული წყლიან/ლორწოვანი დიარეით. დაავადების სიმპტომების გამოვლენიდან ჰოსპიტალიზაცამდე დრო საშუალოდ შეადგენდა 5 დღეს. პაციენტთა სქესობრივი განაწილება იყო თითქმის თანაბარი: მდედრობითი 55% (n=26) და მამრობითი 45% (n=21). მათი ასაკი მერყეობდა 2 თვიდან 211 თვემდე (17 წელი) და მედიანური ასაკი იყო 52 თვე. ლაბორატორიულად

დადასტურებული დიაგნოზის მქონე პაციენტების მედიანური ასაკი კი 71 თვეს შეადგენდა. აქვე აღსანიშნავია, რომ პაციენტების 32 % იყო 2 წლამდე ასაკის და 61% იყო სკოლამდელი ასაკის ბავშვი.

აღსანიშნავია, რომ *Campylobacter* spp. ინფექციის მქონე პაციენტთა ასაკობრივი განაწილება (მედიანური ასაკი 40 თვე (IQR)22–95) მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა *Shigella sonnei*-ით ინფიცირებული პაციენტების მედიანურ ასაკისგან (მედიანა 92 თვე (IQR) 52–140)), რაც სტატისტიკურად დაადასტურა მან-უიტნის ტესტმაც, სადაც U=994 და p<0.001. თუმცა მსგავსი სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება ვერ გამოვლინდა კამპილობაქტერიოზით დაავადებული პაციენტების ასაკსა და სალმონელოზის დიაგნოზის მქონე ბავშვთა ასაკს შორის. გამომდინარე იქიდან, რომ კვლევის დიაპაზონი მოიცავდა წელიწადის ყველა სეზონს, შევეცადეთ გაგვეანალიზებინა სამივე ინფექციის სიხშირეების სეზონურობა. როგორც ცნობილია, ნაწლავურ ინფექციებს ახასიათებს მკვეთრად გამოსახული სეზონურობა, თუმცა ჩვენს კვლევაში მკვეთრი სეზონურობის ტენდენცია არ გამოვლინდა.

ეპიდემიოლოგიური პირამიდის მეთოდით მოვახდინეთ კვლევის შედეგების თბილისის ბავშვთა პოპულაციაზე ექსტრაპოლაცია, რათა შგვეფასებინა სამიზნე პოპულაციაში კამპილობაქტერიოზის სავარაუდო ინციდენტობა. ეპიდემიოლოგიურ პირამიდაში განისაზღვრა მონაცემთა კორექტირების 5 დონე. თითოეულ დონეზე ლიტერატურული წყაროებიდან ან/და სტატისტიკური ინფორმაციიდან გამოვთვალეთ შესაბამისი კოეფიციენტი, იგივე მულტიპლიკატორული ფაქტორები (MFs).



გრაფიკი 1. ეპიდემიოლოგიური პირამიდა - კამპილობაქტერიოზის სავარაუდო ტვირთი თბილისის ბავშვთა პოპულაციაზე.

○ პირამიდის ფუძეს, ქმნის კამპილობაქტერიოზის სიმპტომური შემთხვევების წილი, რომელიც პაციენტების დაახლოებით 50%-ში მიმდინარეობს. შედეგად MF=2 (100/50=2);

○ კამპილობაქტერიოზის ჰოსპიტალიზაციის ინდექსის გამოთვლა მოხდა ლიტერატურულ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, რომელთა თანახმადაც ევროპულ ქვეყნებში კამპილობაქტერიოზის დიაგნოზით ჰოსპიტალიზაციის მაჩვენებელი არის 33.9%, შედეგად MF = 2.95;

○ „თბილისის ბავშვთა ინფექციური კლინიკური საავადმყოფოში“ პაციენტების ჰოსპიტალიზირების პროცენტული წილი არის 80%, რასაც შეესაბამება MF =1.25;

○ კვლევის პერიოდში (2020 ივლისიდან 2021 ივლისამდე), კლინიკაში სულ ჰოსპიტალიზირებული იყო 1450 პაციენტი, კვლევაში მოხვდა 382 პაციენტის ნიმუში, ანუ 26%, შედეგად ვიღებთ კოეფიციენტს MF=3,8;

○ *Campylobacter* spp.-ს დეტექციის მიზნით გამოყენებული ტესტირების მეთოდის მგძნობელობის მედიანური

მაჩვენებელი არ აღემატება 76%, MF 1.32;

○ ეპიდემიოგიური პირამიდის წვერი შეესაბამება ინფექციის ლაბორატორიულად დადასტურებული შემთხვევებს. ეს მაჩვენებელი იყო *Campylobacter* spp.-ს დადებითი შემთხვევების რიცხვი - 47.

ეპიდემიოლოგიურ პირამიდაში ხუთივე დონეზე დადგენილი კოეფიციენტების გამოყენებით (MFs=2*2.95*1.25*3.8*1.32=37) დადგინდა, რომ თბილისის ბავშვთა პოპულაციაში კამპილობაქტერიოზის „ნამდვილი შემთხვევები“, სავარაუდოდ, შეიძლება იყოს დაახლოებით 1800 წელიწადში. თუ გავითვალისწინებთ, რომ 2020 წელს თბილისში ბავშვთა საერთო რაოდენობა იყო 283 400, ეს მაჩვენებელი შეესაბამება 1:1500 შემთხვევას წელიწადში, ანუ შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ამ მეთოდით გამოთვლილი სავარაუდო ინციდენტობა 6-ია 1000 ბავშვიდან.

***Campylobacter* spp.-ის ქართული შტამების დადასტურება და სახეობრივი დიფერენცირება მოვახდინეთ RT-PCR მეთოდით.** საქართველოში იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის 220 შტამის, საიდანაც 60 იყო კლინიკური ნიმუშებიდან, ხოლო 110 „ოჯახური“ და 50 „ინდუსტრიული“ ქათმის ნიმუშებიდან, კვლევა გაგრძელდა გერმანიის რისკის შეფასების ფედერალური ინსტიტუტის, კამპილობაქტერიის რეფერალურ ლაბორატორიაში (BfR NRL-*Campylobacter*). ტრასპორტირების შემდეგ მოხერხდა 220 დან 92%-ის (n=204) რეკულტივირება. 16 ინოკულუმიდან, საიდანაც ბაქტერიის კულტურა ვეღარ მოვიღეთ, გენეტიკური კვლევა განხორციელდა PCR მეთოდით, უშუალოდ ბულიონში შენახული ბაქტერიულ მასალაზე. შედეგად, 12 მათგანში აღმოჩნდა *C. coli* (n=4/12) ან *C. jejuni* (n=3/12), ხოლო ხუთი იყო შერეული კულტურა 41% (n=5/12).

RT-PCR მეთოდით მოვახდინეთ საქართველოში იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის 204 შტამის სახეობრივი დიფერენცირება. შედეგები განაწილდა შემდეგნაირად: 37.7% (n=77) იდენტიფიცირებული იყო როგორც *C. jejuni* და 62.3% (n=127) როგორც *C. coli*. ამასთან, განსხვავებული იყო სახეობრივი შედგენილობა სხვადასხვა მატრიქსებში, კერძოდ ბავშვების ფეკალებიდან გამოყოფილ კლინიკურ ნიმუშებში დომინირებდა *C. jejuni*-ᲗᲐ 82.5% (n=47/57), შესაბამისად, *C. coli* იყო 17.5% (n=10/57); მაშინ როცა, ფრინველის იზოლანტებში დომინანტური სახეობა იყო *C. coli*: „ოჯახური“ ქათმის იზოლატებში ის შეადგენდა 74.2% (n=72/97), ხოლო „ინდუსტრიული“ ქათმის ბრმა ნაწლავის იზოლანტებში *C. coli* 90% (n=45/50) *და C. jejuni* იყო მხოლოდ 10% (n=5/50).

საქართველოში გამოყოფილი *Campylobacter* spp.-ის შტამების ანტიმიკრობული რეზისტენტობის კვლევა სამი სხვადასხვა მატრიქსიდან („ოჯახური ქათმის“, „ინდუსტრიული ქათმისა“ და ადამიანის ფეკალებიდან) იზოლირებულ *C. jejuni*-სა და *C. coli* შტამების განხორციელდა 6 ანტიბიოტიკურ პრეპარატზე. ორივე, როგორც კლინიკურ ასევე ფრინველის იზოლანტებში გამოვლინდა მაღალი რეზისტენტობა ციპროფლოქსაცინისა და ტეტრაციკლინის მიმართ, ხოლო გენტამიცინის, ერითრომიცინისა და ქლორამფენიკოლის მიმართ ყველა ტესტირებული შტამი იყო მგძნობიარე.

ცხრილი 1. სამი სხვადასხვა მატრიქსიდან („ოჯახური ქათმის“, „ინდუსტრიული ქათმისა“ და ადამიანის ფეკალებიდან) იზოლირებული *Campylobacter jejuni* და *Campylobacter coli* შტამების ანტიმიკრობული მგრძნობელობის კვლევის შედეგები.

ანტიბიოტიკი	ECOFF (μg/ml) (R>)		რეზისტენტული შტამების რაოდენობა და (%)							
			„ოჯახური“ ქათამი (n = 97)		„ინდუსტრიული“ ქათამი (n = 50)		კლინიკური (n = 57)		Total (n = 204)	
	C.jejuni	*C.coli*	*C.jejuni* (n = 25)	*C.coli* (n = 72)	*C.jejuni* (n = 5)	*C.coli* (n = 45)	*C.jejuni* (n =47)	*C.coli* (n =10)	*C.jejuni* (n =77)	*C. coli* (n =127)
ქლორამფენიკოლი	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0
ციპროფლოქსაცინი	0.5	0.5	20 (80%)	69 (96%)	5 (100%)	45 (100%)	41 (87%)	9 (90%)	66 (86%)	123 (97%)
ერითრომიცინი	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0
ერტაპენემი	0.5	0.5	0	27 (37%)	0	37 (82%)	0	6 (60%)	0	70
გენტამიცინის	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ტეტრაციკლინი	1	2	18 (72%)	52 (72%)	4 (80%)	45 (100%)	17 (36%)	8 (80%)	39 (51%)	105 (83%)

ცხრილის განმარტება: ECOFF, ეპიდემიოლოგიური ზღვრული სიდიდები, რომლებიც განსაზღვრავს ანტიმიკრობული ნივთიერებების მიმართ რეზისტენტობას (www.EUCAST.org); R>, მგრძნობელობის მაქსიმალური კონცენტრაცია (MIC); ნებისმიერი MIC, რომელიც აღემატება ამ კონცენტრაციას განისაზღვრება, როგორც რეზისტენტული. მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული, რომ ECOFF ერითრომიცინისთვის და ტეტრაციკლინისთვის განსხვავდება Campylobacter-ის სახეობებისთვის. n, ტესტირებული იზოლატების რაოდენობა; ცხრილში რიცხვები აბსოლიტურ სიდიდეებშია და ასახავს რეზისტენტული იზოლატების რაოდენობას; ფრჩხილებში, რეზისტენტული იზოლატების პროცენტული მაჩვენებლები.

ერტაპენემისთვის, როგორც ადამიანის, ასევე ფრინველის *C. coli*-ს შტამებმა აჩვენეს სხვადასხვა პროცენტით რეზისტენტობა. „ოჯახური“ ქათმის შტამების - 37%, „ინდუსტრიულის“ 82% და კლინკურის 60%. ამასთან, ერტაპენემის მიმართ რეზისტენტული *C. coli*-ს შორის, რეზისტენტობის დადგენილი ზღვარს ზემოთ, MIC 1 მკგ/მლ მნიშვნელობის იყო 89% (n=62), შტამების 10%-ში (n=7) MIC=2 მკგ/მლ და ერთ შტამს ჰქონდა MIC მნიშვნელობა 4 მკგ/მლ. ერტაპენემის მიმართ რეზისტენტული შტამებიდან MIC ≥2 მკგ/მლ მნიშვნელობებით იყო „კლინიკური“ ნიმუშებიდან სამი შტამი, „ოჯახური“ ქათმის ნიმუშებიდან იზოლირებული ოთხი და „ინდუსტრიული“ ქათმისგან იზოლირებული ერთი შტამი. რაც შეეხება, *C. jejuni*-ის

შტამებს, ისინი სრულად მგრძნობიარე იყო ერტაპენემის მიმართ.

მთლიანობაში, *C.coli*-ს იზოლატები იყო ნაკლებად „სრულად მგრძნობიარე“ (3/127, 2,4%) ყველა ანტიბიოტიკური საშუალების მიმართ, ვიდრე *C. jejuni*-ს (9/77, 7%). აქედან „ოჯახური“ ქათმისგან და კლინიკური ნიმუშებიდან იზოლირებული 6-6 შტამი იყო სრულად მგძნობიარე ყველა ტესტირებული ანტიბიოტიკური პრეპარატის მიმართ, მაშინ როცა „ინდუსტრიული“ ფრინველიდან იზოლირებული არც ერთი შტამი არ იყო „სრულად მგძნობიარე“.

საქართველოში იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის შტამების ანტიმიკრობული საშუალებების მიმართ რეზისტენტობის ტესტირების შედეგების სტატისტიკური ანალიზით გამოვლინდა, რომ ციპროფლოქსაცინისა (OR = 5.1 CI 95% [1.6, 16.7]), და ტეტრაციკლინის (OR = 4,6 CI 95% [2.5, 8.8]) მიმართ რეზისტენტობის შანსი *C. coli*-ის უფრო მაღალი იყო, ვიდრე *C. jejuni*-ს. ამასთან, კლინიკური ნიმუშების იზოლატები უფრო ნაკლებად რეზისტენტულია ტეტრაციკლინის მიმართ, ვიდრე ფრინველის ნიმუშების იზოლანტები (OR=0.18 CI 95% [0.1, 0.4]). ციპროფლოქსაცინის მიმართ კი, ადამიანისა და ფრინველის შტამების რეზისტენტობას შორის, სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა.

საერთო ჯამში, *C. coli*-ს ორი ან მეტი ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტობის 18.5-ჯერ მეტი შანსი აქვს ვიდრე *C. jejuni* -ს (OR 18.5 (95%CI [7.7, 44.8]). იგივე შეინიშნებოდა კლინიკურ შტამებშიც, სადაც *C. coli*-მ ორი ან მეტი ანტიმიკრობული საშუალებების მიმართ რეზისტენტობის 17.4-ჯერ მეტი შანსი აჩვენა *C. jejuni*-სთან შედარებით (OR 17.4 (95%CI [2.03,

150.1]); რაც შეეხება ფრინველის ნიმუშებს, *C. coli*-ს შემთხვევაში ორ ან მეტ ანტიბიოტიკზე რეზისტენტობის შანსი 7.9-ჯერ მეტია, ვიდრე *C. jejuni*-ს ანალოგიური მაჩვენებლები (OR 7.5 (95% CI [2.6, 24.6]).

C.jejuni-ის შტამებში მულტირეზისტენტობის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი ასოციაცია გამოვლინდა იზოლაციის წყაროსთან. კერძოდ, რეზისტენტობის შანსი ორი ან მეტი ანტიბიოტიკის მიმართ *C. jejuni*-ის ქათმის იზოლატებში 4,5-ჯერ მეტი იყო ადამიანის ნიმუშებიდან გამოყოფილ შტამებთან შედარებით (OR 4.5, 95% CI[1.7, 12.1]).

კამპილობაქტერიის სახეობები და სახვადასხვა მატრიქსის იზოლატები, როგორც დამოკიდებული ცვლადები, დაექვემდებარა ლოგისტიკური რეგრესიის ანალიზს ორი ან მეტი ანტიმიკრობული საშუალებისადმი რეზისტენტობის კავშირის შესამოწმებლად. ორივე ცვლადი შენარჩუნდა რეგრესიის საბოლოო მოდელში, როგორც დამოუკიდებელი ცვლადი. ნაგელკერკეს (Nagelkerkes) ფსევდო R კვადრატი იყო 0,435. რაც მიუთითებს, რომ დამოკიდებული ცვლადების ვარაიბელობის 43%-ზე მეტი განპირობებულია დამოუკიდებელი ცვლადების მოდელით.

ანალოგიურად, მრავლობითი ლოგისტიკური რეგრესიით გამოვლინდა სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი კავშირი პრედიქტორულ მოდელსა (კამპილობაქტერიის სახეობები და სახვადასხვა მატრიქსის იზოლატები) და ტეტრაციკლინის რეზისტენტობას შორის. ორივე ცვლადი შენარჩუნდა საბოლოო მოდელში, როგორც დამოუკიდებელი პრედიქტორები. ნაგელკერკეს (Nagelkerkes) ფსევდო R კვადრატის მიხედვით 0,204 მიუთითებს, რომ, რეგრესიის მოდელით შესაძლებელია აიხსნას დამოკიდებული

ცვლადის (ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტობა) ვარიბელობის 20%-ზე მეტი.

***Campylobacter* spp. ქართული შტამების ფილოგენეტიკური მრავალფეროვანების** შესასწავლად გავაანალიზეთ *Campylobacter*-ის ორმოცი შტამის სრული გენომური სექვენსები (WGS). აქედან ოცი შტამი იყო ფრინველის, ხოლო დანარჩენი ოცი ადამიანის ნიმუშებიდან; ათ-ათი *C. jejuni* და *C. coli* თითოეული მატრიქსიდან. ფრინველის იზოლატებში შედიოდა როგორც „ოჯახური“ ქათმის ნიმუშებიდან (n=14), ასევე „ინდუსტრიული“ ქათმებიდან (n=6) გამოყოფილი შტამები. სექვენირების შედეგად მიღებული პირველადი მონაცემების მულტილოკუსური სექვენირებით ტიპირების ფილოგენეტიკური ანალიზით, რომელიც დაფუძნებული იყო 1343 გენურ ალელებზე მივიღეთ მულტი-ლოკუსური სექვენირების ტიპების (ST) დიდი მრავალფეროვნება (n=24). მათ შორის სამი უცნობი შტამი, რომლებსაც ახასიათებდა *unc*A ალელის არსებობა და/ან იყო ახალი ST-ტიპი. *C. jejuni* (n=22) მიეკუთვნა 15 განსხვავებულ ST-ტიპს, ხოლო *C. coli* (n=18) 9 სხვადასხვა ST-ტიპს. ყველაზე ხშირი ST-ტიპები იყო: ST-855 (n=6), ST-356 (n=4) და ST-902 (n=3). *C. coli* ST-ტიპების უმრავლესობა დაჯგუფდა საერთო კლონურ კომპლექსში ST-828 (17/18). ახალი ST-ტიპები და მათი შესაბამისი ალელური კომბინაციები განთავსდა PubMLST მონაცემთა ბაზაში.

სექვენირებული შტამების შეზღუდული რაოდენობის მიუხედავად, ჩვენ ვიპოვეთ სამი ახალი სექვენსკლასტერი. ამ კლასტერებიდან ერთ-ერთი (ST-855) მოიცავდა ოთხ უაღრესად მსგავს *C.coli*-ის შტამს, მაქსიმალური ორი cgMLST ალელის განსხვავებებით „ინდუსტრიული“ ქათმის ნიმუშიდან, რომლებიც აღებული იყო 2021 წლის ივნის/ივლისში ფრინველის სამი სხვადახსვა პარტიიიდან.

კიდევ ორი *C. jejuni* კლასტერი, თითოეული ორი შტამით, რომლებიც იდენტიფიცირებულია ადამიანის იზოლატორებს შორის, ეკუთვნოდა ST-356 ტიპს და დაშორებული იყო ერთმანეთისგან 226 ალელის სხვაობით. ამ კლასტერებიდან ერთ-ერთი მოიცავდა 2021 წლის სექტემბერსა და ოქტომბერში ბავშვებისგან იზოლირებულ *C. jejuni*-ს ორ შტამს, რომლებიც შეიცავდნენ იდენტურ cgMLST წყვილებს და მეორე კლასტერი მოიცავდა ბავშვების ნიმუშებიდან იზოლირებულ *C. jejuni*-ს ორ შტამს, გამოყოფილს 2021 წლის ივლისსა და სექტემბერში.

Campylobacter-ის თვრამეტი იზოლატი (45%) ატარებდა პლაზმიდებს, რაც Platon და BLAST ანალიზით NCBI RefSeq პლაზმიდურ მონაცემთა ბაზის გამოყენებით, პროგნოზირებული იყო როგორც ეპიქრომოსომული ელემენტები. ყველა პლაზმიდს ჰქონდა ცნობილ *Campylobacter* spp.-თან ჰომოლოგიის მინიმუმ 20%.

WGS ანალიზმა ასევე გამოავლინა რეზისტენტობის დეტერმინანტი გენები, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ფენოტიპური ანალიზით მიღებულ შედეგებზე. კერძოდ, *tet*(O) გენის არსებობა, რაც განაპირობებს ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტობას, გამოვლინდა ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტულ ყველა შტამში (70%, n=28/40), ხოლო ყველაზე გავრცელებული მუტაცია *gyr*(A) გენში (T86I) იდენტიფიცირებული იყო ციპროფლოქსაცინის მიმართ რეზისტენტული ყველა იზოლატში (90% (n = 36/40)). bla_{OXA-61} ოჯახის გენების არსებობა (OXA-193, OXA-452, OXA-460, OXA-461, OXA-489, OXA-594), რომლებიც განაპირობებენ რეზისტენტობას ბეტა-ლაქტამებს მიმართ დაფიქსირდა 75% (n = 30/40) შტამში. გარდა ამისა, ჩვენ აღმოვაჩინეთ *aadE*-Cc გენი სამ *C.coli*-ში, რომელიც, სავარაუდოდ, ანიჭებს

ბაქტერიას რეზისტენტობას სტრეპტომიცინის მიმართ, მაგრამ ვინაიდან EUCAMP3 ფირფიტა არ შეიცავს სტრეპტომიცინსა და ამპიცილინს ფენოტიპურად მათ მიმართ მგძნობელობა არ შეგვისწავლია. L22 რიბოსომური ცილის 50S_L22_A103V მუტაცია AMRFinder-Plus მონაცემთა ბაზაში განიმარტა, როგორც მაკროლიდების რეზისტენტობის მიმართ სავარაუდო მარკერი. იგი აღმოჩნდა გამოკვლეული შტამების 30%-ში (n=12/37). ყველა იზოლატი მგრძნობიარე იყო ერითრომიცინის მიმართ. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ერტაპენემის მიმართ რეზისტენტობის გენეტიკური მექანიზმი ჯერ კიდევ უცნობია. Platon-ის პრედიქტორის მიხედვით, რეზისტერნტობის ყველა დეტერმინანტი ლოკალიზებული იყო ქრომოსომაში.

***Campylobacter* spp.-ს სელექტიური ნიადაგების mCCDA და CHROMagar *Campylobacter* -ის** გამოყენებამ მნიშვნელოვნად გაზარდა ნიმუშებიდან *Campylobacter* spp. დეტექციისა და იზოლაციის ალბათობა. კერძოდ, mCCDA ნიადაგზე დადებითი იყო n=28, ხოლო CHROMagar *Campylobacter*-ზე n=39. ამრიგად, 47 დადებითი ნიმუშიდან mCCDA-მ აჩვენა ცრუ უარყოფითი შედეგები ან გადაზრდილი იყო ფონური მიკრობიოტით ნიმუშების 30%-ში (n=12); 7 შემთხვევაში ეს ნიადაგი არ იყო გამოყენებული. მაშინ როდესაც, CHROMagar *Campylobacter* -ისთვის ცრუ უარყოფითი შედეგი მივიღეთ 17%-ში (n=8).

სელექტიური ნიადაგების ეფექტიანობის შედარებამ გამოავლინა შანსის შეფარდება (OR) 1.4, 95% კონფიდენციალობის ინტერვალით (CI) 1.1-დან 1.7-მდე, p=0.038, რაც გამოხატავს CHROMagar *Campylobacter*-ის უკეთეს მოქმედებას mCCDA-სთან შედარებით.

დასკვნები და რეკომენდაციები

- საქართველოში კამპილობაქტერიოზის წილი „დაუდგენელი ეტიოლოგიის“ დიარეებში და მისი ტვირთი ბავშვთა პოპულაციაზე საკმაოდ მაღალია;
- თბილისის მასშტაბით კამპილობაქტერიოზი აღმოჩნდა სიხშირით მეორე ინფექცია დიარეული დაავადებების მქონე ბავშვებში და გასტროენტერიტების გამომწვევი ლიდერი ბაქტერია მცირე ასაკის, სკოლამდელ ბავშვთა პოპულაციაში;
- კვლევის მონაწილეთა ინფიცირების სავარაუდო გზა, გარდა არასათანადოდ მომზადებული ფრინველის ხორცისა, შესაძლოა ყოფილიყო უნებლიე კონტაქტი ცხოველების ფეკალებთან სათამაშო მოედნებზე;
- *Campylobacter* spp.-ით ინფიცირებული ბავშვთა ასაკი აღმოჩნდა სტატიტიკურად სარწმუნოდ ნაკლები შიგელოზის მქონე ბავშვთა ასაკთან შედარებით, მაშინ როცა, ასეთი სარწმუნო ასაკობრივი განსხვავება არ გამოვლინდა კამპილობაქტერიოზისა და სალმონელოზისა და სალმონელოზისა და შიგელოზის დიაგნოზის მქონე პაციენტებს შორის;
- ეპიდემიოლოგიური პირამიდით კამპილობაქტერიოზის შედეგების ექსტრაპოლაციამ თბილისის ბავშვთა პოპულაციაზე დაავადების სავარაუდო ინციდენტობა შეაფასა როგორც 6 შემთხვევა 1000 ბავშვზე წელიწადში. რაც გვაძლევს დასკვნის გაკეთების საშუალებას, რომ *Campylobacter* spp. არის ენდემური ინფექციის გამომწვევი აგენტი ქვეყანაში და კამპილობაქტერიოზის წილი დიარეულ დაავადებებში ბავშვთა პოპულაციაში საკმაოდ მაღალია;
- კლინიკურ ნიმუშებში დომინანტური სახეობა აღმოჩნდა *C. jejuni*, მაშინ როცა, ფრინველის იზოლატებში უჩვეულოდ მაღალი იყო *C. coli*-ის სიხშირე. ჩვენი ვარაუდით,

ფრინველის ნიმუშების ინოკულუმების დიდი უმრავლესობა თავიდანვე შეიცავდა *Campylobacter* spp.-ის ორივე სახეობას, ხოლო ტრანსპორტირებისა და რეკულტივირების შემდეგ *C. coli*-ის უკეთესი გადარჩენისა და ზრდის უნარის გამო იგი აღმოჩნდა დომინანტური სახეობა კვლევის შედეგებში;

- *Campylobacter* spp.-ის ქართული შტამების ანტიმიკრობული მგძნობელობის პროფილების გაანალიზებით გამოვლინდა, რომ ეროვნულ დონეზე ამრ-ის პრევენციისა და კონტროლის პროგრამების ნაკლებობის მიუხედავად, საქართველოში იზოლირებული *Campylobacter* spp.-ის ამრ პროფილები მეტ-ნაკლებად მსგავსია სხვა ევროპული ქვეყნების მონაცემებისა;
- ადამიანისა და ქათმის ნიმუშებიდან *C. jejuni*-სა და *C. coli-ის* 40 შტამის გენომების სექვენირების შედეგად აღმოჩნდა მულტი-ლოკუსური სექვენირების ტიპების (ST) დიდი მრავალფეროვნება (n=24). მათ შორის სამი უცნობი შტამი. სექვენირებული შტამების შეზღუდული რაოდენობის მიუხედავად, ჩვენ ვიპოვეთ სამი ახალი სექვენს კლასტერი, რაც *Campylobacter* spp.-ს ენდემურ ბუნებაზე მიუთითებს საქართველოში;
- ანტიმიკრობული მგძნობელობის ფენოტიპური კვლევის შედეგები გაამყარა რეზისტენტობის გენეტიკური დეტერმინანტების გამოვლენამ. კერძოდ, *tet*(O) გენი აღმოჩნდა ტეტრაციკლინის მიმართ რეზისტენტულ ყველა შტამში, ხოლო მუტაცია *gyr*(A) გენში (T86I) იდენტიფიცირებული იყო ციპროფლოქსაცინის მიმართ რეზისტენტული ყველა იზოლატში.

- **რეკომენდირებულია განხორციელდეს:**

- კამპილობაქტერიოზის გამომწვევისა (*Campylobacter* spp.) და მისი ანტიბიოტიკური რეზისტენტობის სახელმწიფო მონიტორინგისა და ზედამხედველობის პროგრამები, როგორც საზოგადოებრივი ჯანდაცვის, ასევე სურსათის წარმოების სექტორებში;

- *Campylobacter* spp.-ის მიმართ უფრო ფართომასშტაბიანი სამეცნიერო კვლევები, როგორც სურსათის უვნებლობისა და ვეტერინარიის, ასევე საზოგადოებრივი ჯანდაცვის საკითხებზე პასუხის გასაცემად, როგორებიცაა:

  - ✓ კამპილობაქტერიის ინციდენტობის ფართომაშტაბიანი ეპიდემიოლოგიური კვლევა, მოსახლეობის სხვადასხვა ასკობრივ ჯგუფებში;
  - ✓ *Campylobacter* spp.-ს ინფექციის წყაროებისა და ტრანსმისიის გზების კვლევა, მათ შორის, ძუძუთი კვებაზე მყოფ ჩვილებში;
  - ✓ *Campylobacter* spp.-ის მულტირეზისტენტული, ერითრომიცინისა და/ან ციპროფლოქსაცინის მიმართ, ასევე გენტამიცინისა და ერტაპენემის მიმართ რეზისტენტული იზოლატების სრული გენომური სექვენირება; ამრ დეტერმინანტების, მათი გენეტიკური მდებარეობისა და ჰორიზონტალური ტრანსმისიის პოტენციალი განსაზღვრა.

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Medical Faculty

Doctoral Education Program in Public Health and Epidemiology

Maia Metreveli

Campylobacteriosis in Hospitalized Children With Gastrointestinal Infection and Colonization of *Campylobacter* spp. in Poultry Flocks

Dissertation Abstract

Submitted in Fulfilment of the Requirements of

Doctor of Public Health and Epidemiology

Scientific supervisor: ***Paata Imnadze MD, PhD***

TSU Professor, Head of Public Health Department

Tbilisi

2022

Declaration

For the presented dissertation „ Campylobacteriosis in Hospitalized Children With Gastrointestinal Infection and Colonization of *Campylobacter* spp. in Poultry Flocks“, I declare that the dissertation is my own work, to the best of my knowledge. I referenced other authors and source in accordance with academic rules and ethical conduct.

Acknowledgment

My PhD dissertation would not have been possible without my supervisors Dr. Paata Imnadze and international consultant Dr. Kerstin Stingl. They guided my PhD research and assisted in publishing results in printed papers. They helped broaden my views, knowledge, and understanding of food born infections and epidemiology. I am very grateful for their dedication. I would like to give my special thanks to Dr. Liana Tevzade for sharing her immense microbiological laboratory experience and skills. She spent many hours hard at work with me at the lab in her late 80th.

As a final note, I would like to extend my appreciation to the members of the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) and the staff of the Richard Lugar Public Health Research Center in Tbilisi and Scientific Research Center of Agriculture for their kind support.

This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation (SRNSF), grant number PHDF_19_1542 ‘Study of Antibiotic Resistance Patterns of *Campylobacter* spp. Isolated from Diarrheal Cases and Poultry Samples in Georgia’.

Abstract

According to the World Health Organization, *Campylobacter* spp. is the leading foodborne pathogen causing bacterial gastroenteritis globally. Campylobacteriosis is characterized by diarrhea, fever, and abdominal cramps. Mostly, it is self-limited, but severe cases require antibiotic treatment. Moreover, postinfection autoimmune sequelaes, like Guillain-Barré increase the burden of the disease.

This doctoral thesis presents the first study of *Campylobacter* spp. in human and poultry samples in Georgia. The study aims to provide the first systematic data on campylobacteriosis among hospitalized children with bacterial gastroenteritis and to reveal the recent epidemiologic trends in comparison to other gastroenteric pathogens. In addition, it presents antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in human and poultry samples isolated in Georgia.

The study benefited from successful cooperation with the National Center for Disease Control and Public Health (NCDC), Tbilisi Children Infection Diseases Clinical Hospital and poultry companies at the national level and with the German Federal Institute of Risk Assessment (BfR) and the Department of Poultry Scinces of the University of Georgia in Athens (US, UGA) at the international level.

In total, 481 human fecal and 160 chicken ceca samples were collected and tested in 2020–2021. Culture-based bacteriological methods were followed by biochemical tests and real-time polymerase chain reaction methods for bacterial identification, confirmation, and species discrimination. In addition, 204 isolates were tested for their resistance to six antimicrobials using the microdilution method (MIC- EUCAST). The genetic determinants

of resistance and phylogenetic diversity of the isolates were investigated with whole genome sequence analysis.

The share of campylobacteriosis among hospitalized children with acute diarrheal illnesses was 16.6% on the country level, 95% CI [3.05, 20.8]. Comparison of epidemiologic trends of three main gastroenteric pathogens in Tbilisi revealed that *Shigella sonnei* was the most frequently isolated bacteria (19.1%, 95%CI [15.2, 23.4]), followed by *Campylobacter* spp. (12.3%, 95%CI [9.2, 16.0]) and *Salmonella* spp. (4.9%, 95%CI [3.0, 7.6]).

The estimated burden of campylobacteriosis by epidemiological pyramid method resulted in a putative annual incidence of 6 per 1,000 children in Tbilisi. In addition, the age distribution of the patients with *Campylobacter* spp. infection was significantly different from that of the patients infected with *Shigella sonnei*. Moreover, *Campylobacter* spp. was the leading bacterial agent of diarrhea in hospitalized children in the preschoolers (42%).

The antimicrobial susceptibility study showed the highest resistance against ciprofloxacin and tetracycline, irrespective to the isolation matrix and *Campylobacter* species, whereas all tested isolates were sensitive toward gentamicin, erythromycin, and chloramphenicol. For ertapenem, both human and poultry *C.coli* strains showed some percentage of resistance, however *C.jejuni* isolates were fully susceptible to this antimicrobial.

The point mutations in *gyrA* (T86I) and *tet* (O) genes were detected as resistance determinants for (fluoro)quinolone and tetracycline resistance, respectively. Multiresistance was more frequently observed in *C.coli* than in *C.jejuni*. Besides, the Georgian strains showed high variability of multilocus sequence types, including three novel sequence types. It is worth mentioning that untypically

the major species in poultry isolates was *C.coli*, whereas *C.jejuni* dominated human samples.

The presented study revealed the endemic nature of the *Campylobacter* spp. infection in the country. The multisectoral outcomes of the presented study might be useful at food safety, veterinary, and public health sectors of the country.

Introduction

Campylobacteriosis is a disease caused by thermotolerant *Campylobacter* spp. It is one of the four leading causes of diarrhea worldwide and is considered the most common cause of foodborne bacterial gastroenteritis. *Campylobacter* species are motile, curved, microaerobic, gram-negative rods that commonly reside in the intestinal tract of many wild and domestic warm-blooded animals. The predominant species isolated from human infections and other matrices is *Campylobacter jejuni*, followed by *C. coli*, but also other *Campylobacter* spp. have been associated with human disease, including *C. lari* and *C. uppsaliensis*.

Many sources of *Campylobacter* have been identified, such as raw milk and domestic animals, but broilers and broiler meat are the most important. EFSA estimates that chicken meat consumption accounts for 20-30% of campylobacteriosis in the EU, with 50-80% of cases linked to the house as a whole.

Although campylobacteriosis usually resolves on its own, recent reports have shown that a substantial proportion (31%) of reported *Campylobacter* infections were treated with antibiotics, likely to be infections with a serious outcome. In addition, *Campylobacter* infections can cause long-term autoimmune sequelae such as reactive arthritis, irritable bowel syndrome, and Guillain-Barré syndrome.

In high-income countries, surveillance of campylobacteriosis cases is most often implemented by reporting laboratory-diagnosed infections in the population. While laboratory confirmation of enteric infections is routinely performed in high-income countries, most low- and middle-income countries (LMICs) do not have routine diagnosis. However, preliminary data suggest that

Campylobacter is among the top five causes of diarrheal disease in children in Asian countries.

Campylobacter has never been studied or isolated in Georgia. Due to the demanding growth conditions, the bacteria are not cultured in standard procedural examinations of clinical diagnostic laboratories. Therefore, the incidence and burden of campylobacteriosis are unknown in the country. Meanwhile, official statistics of "diarrhea and gastroenteritis of suspected infectious origin" and foodborne illness in the country remain alarmingly high, especially among the child population, at 92% and higher.

In addition, the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria continues to be a global public health concern. An increase *C. jejuni* resistance against tetracycline and ciprofloxacin in broiler and human isolates has been detected in several EU countries. AMR surveillance data from Georgia are scarce in the public health system and lacking in the food and veterinary sectors. On the path of EU integration, in 2020, the regulation for the monitoring of zoonoses and agents of zoonoses, based on 2003/99/EC, entered into force in Georgia. According to this regulation, monitoring of antimicrobial resistance must be carried out at the level of primary production and/or at other stages of the food chain. The regulation covers zoonoses including *Campylobacter* spp.; however, the implementation of the regulation is not yet underway.

The aim of our study was to provide the first systematic data on the prevalence of campylobacteriosis in hospitalized children with acute inflammatory diarrhea; and to reveal recent epidemiological trends compared to the currently tested intestinal bacteria *Salmonella* and *Shigella* in Tbilisi. Also, the study reports the first data on the genetic diversity of *Campylobacter* spp. strains from

human stool and poultry samples isolated in Georgia based on the whole genome sequencing analysis and identifies antimicrobial resistance patterns of *C. jejuni* and *C. coli* including their genetic determinants. The study supports future monitoring programs for in-depth analysis of thermotolerant *Campylobacter* spp. in Georgia to improve food safety.

Materials and Methods

This study was approved by the Tbilisi Children Infectious Diseases Clinical Hospital Institutional Ethics Committee in 2020. In addition, the Institutional Review Board of the National Center for Disease Control and Public Heath conducted an evaluation of the project "Study of campylobacteriosis in hospitalized children with acute inflammatory diarrhea" protocol and relevant documentation.

Totally, 481 human stool samples were collected from June 2020 till September 2021 from at the Tbilisi Children Infectious Diseases Clinical Hospital, also through the NCDC Disease Surveillance System from the three main cities of Georgia: Batumi, Kutaisi and Gori. Out of this, 405 were from Tbilisi, Batumi– 49, Kutaisi-25 and 2 samples from Gori clinics. Acute inflammatory diarrhea was defined as acute diarrhea accompanied by at least one of the following symptoms and/or laboratory findings: fever with abdominal cramping, nighttime diarrhea, leukocyte-positive stool, acute bloody diarrhea or hemoglobin-positive stool. The samples were previously (or in parallel) tested at the clinics' laboratories for occurrence of *Salmonella* and *Shigella* and those, where no pathogen was identified sent to the NCDC-Lugar Center. Unlike, Tbilisi Children Infectious Diseases Clinical Hospital sent the samples despite the identification status. Also, it provided

information of occurrence *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. at the samples, and metadata of the patient for further analysis.

Additionally, 110 chicken caeca samples were collected at Digomi live animal market in Tbilisi (later mentioned as "backyard" chicken samples) and 50 samples from medium-sized poultry farm, located at eastern Georgia (later called "industrial" chicken samples) from February 2020 until September 2021. The human and poultry samples correlated in time and space. While, chicken cecal samples were transported in plastic bags on ice and analyzed within 3–6 h after sampling.

In order to guarantee high sensitivity, in particular, for *Campylobacter* spp. detection, samples were transported on Cary-Blair medium (Biolife Italiana S.r.l., Milan, Italy) at cooling temperatures and analyzed within 24 h after sampling.

Detection and Identification of *Campylobacter* spp. was performed according to ISO 10272-1:2017 part C on modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA). In addition, for the clinical samples, *Campylobacter* Chromogenic agar was applied as an additional second selective medium to increase sensitivity. Less than 20% of the clinical samples were enriched with Preston broth).

Chicken ceca were aseptically cut and the content mixed. One 1 µL loop of the cecal material was directly streaked on the mCCDA agar plate and distributed over the surface by using a fresh loop. The human stool samples were treated similarly but in addition to mCCDA a second selective plate was used. Incubation was performed at 42 °C in a microaerobic gas mixture consisting of 85% nitrogen, 10% carbon dioxide and 5% oxygen.

Suspicious colonies were sub-cultured on Columbia Blood Agar. Confirmation of colonies was initially performed applying the Biomerieux system ApiCampy. In addition, colonies were observed by microscopy after Gram-straining. All isolates were stored at –80 °C for further characterization.

***Campylobacter* Confirmation and Species Differentiation was done at the National Reference Laboratory for *Campylobacter* at BfR Germany.** Totaly 220 strains, from which 160 were derived from chicken and 60 from human sources, were tested by real-time PCR. For this purpose, Cell material of isolates was resuspended in 5% Chelex 100 resin and heated for 15 min at 95 ◦C for thermal lysis. Cell debris was centrifuged for 5 min at 14,000×g, and the supernatant containing bacterial DNA was used for PCR analysis at a volume of 2.5 µL. For species identification, the RT PCR method was used, with the fluorophore combination FAM, JOE, TAMRA and Cy5. Oligos in HPCL-grade at final concentrations of 300 nM, 100 nM dark-quenched probes and 1U of Platinum Taq DNA polymerase were used. In short, specific fragments of the *map*A, the *ceu*E and the *gyr*A gene, specific for *C. jejuni, C. coli* or *C. lari*, respectively, were targeted. As amplification control, 25 copies of the IPC-*ntb*2 was applied.

204 *Campylobacter* Georgian Isolates were tested for Antimicrobial Susceptibility (AMR) according to the prescriptions given in (CID) (EU) 2020/1729. For this purpose, strains were subcultured on Columbia blood agar for 24 ± 2 h at 42 °C under microaerobic atmosphere (5% O^2, 10% CO^2, 85% N_2). Cation-supplemented Mueller–Hinton broth supplemented with 5% fetal calf serum was inoculated with 2–8 × 10^5 colony forming units/mL. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using the European standardized microtiter plate format EUCAMP3.

Antimicrobials tested included chloramphenicol (CHL; 2–64 mg/L), erythromycin (ERY; 1– 512 mg/L), gentamicin (GEN; 0.25–16 mg/L), ciprofloxacin (CIP; 0.12–32 mg/L), tetracycline (TET; 0.5–64 mg/L) and ertapenem (ETP; 0.12–4 mg/L). Epidemiological cut-off values (ECOFFs) were taken from the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; https://mic.eucast.org/Eucast2. For *C.* spp. ECOFFs were as follows: 16 mg/L (CHL), 0.5 mg/L (CIP), 0.5 mg/L (ETP) and 2 mg/L (GEN). For ERY and TET, species-specific cut-off values were used (4 or 8 mg/L (ERY) and 1 or 2 mg/L (TET) for *C. jejuni* or *C. coli*, respectively).

Incubation was performed for 44 ± 4 h at 37 °C under microaerobic atmosphere. MICs (mg/L) were semi-automatically analyzed using the Sensititre Vizion system.

For Whole Gemone Seuqensing genomic DNA was extracted from *Campylobacter* strains sub-cultured overnight using the PureLink Genomic DNA Mini Kit. DNA libraries were prepared using the Illumina DNA Prep, (M) Tagmentation Kit according to manufacturer's instructions, but with using half of the volume of all reagents. Paired-end sequencing was performed on the Illumina MiSeq System (2 × 151 cycles) using the MiSeq Reagent Kit v3. Trimming and de novo assembly of raw reads were carried out using the AQUAMIS pipeline v1.3.8. The quality of the assembled genome contigs was automatically evaluated using the teQuilR in-house pipeline. Sequences were published within the BioProject No. PRJNA844526 at the NCBI sequence read archive (SRA). Ridom Seqsphere+ v8.2.0 was used to perform phylogenetic analysis on assembled genome contigs using the cgMLST scheme of 1343 gene targets previously defined with 98% required identity and 98% required percentage of coverage to one of the alleles of

the reference sequence NC_002163.1.gb (*C. jejuni* NCTC 11168). At least 95% "good targets" were found for cgMLST-based analysis using the previously proposed cgMLST scheme. New MLST alleles and MLST-ST types were uploaded to PubMLST (www.pubmlst.org). Prediction of antimicrobial resistance determinants and plasmid markers within assembled genome contigs was performed by using the BakCharak pipeline v2.0. Tools in the pipeline include ABRicate v1.0.1 and its associated database for antimicrobial resistance determinant, as well as Platon v1.1.0 for plasmid prediction and plasmid blaster, a tool that performs a BLAST analysis against the NCBI RefSeq plasmid database. BLAST results were filtered with at least 20% coverage of the contig length.

Statistical Analyses were performed using SPSS. The Mann–Whitney test applied for comparing the age distribution of the patients infected with either bacterial pathogen. The Odds Ratio was calculated to find the statistical evidence of the efficiency of selective media.

Isolates were categorized into susceptible and resistant, using the epidemiological cut-off values as mentioned in Section 2.3. The dependent variable was resistant vs. susceptible (reference category) to the antimicrobial in question. In addition to the individual antimicrobial, an outcome variable "2-3-fold resistance" was defined for an isolate resistant against two or three tested antimicrobials. This means that first, isolates were categorized according to their MIC and the epidemiological cut-off value (ECOFF) as sensitive or resistant towards every individual antimicrobial and second, the number of resistances per isolate was counted and those with 2 or more resistances were defined as displaying "2-3-fold resistance".

Multiple logistic regression with forward selection was used to establish independent predictors for tetracycline resistance (variables of matrix source (human vs. Chicken (reference category)) and bacterial species (*C. coli* vs. *C. jejuni* (reference category)) were included). A Nagelkerke R Square and a non-standardized beta coefficient (B) were calculated. An odds ratio with 95% confidence interval (CI) was calculated as an exponential of the B coefficient (Exp [B]). For all analyses, p-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

As mentioned above, totally 481 human stool samples were collected at Tbilisi Children Infectious Diseases Clinical Hospital and through the NCDC Disease Surveillance System and sent to the NCDC-Lugar Center, for *Campylobacter* spp. identification.

Incidence of Campylobacteriosis at the Hospitalized Children With Acute Diarrheal Illnesses and Gastroenteritis

In order, to determine the share of campylobacteriosis at the section "diarrhea and gastroenteritis of suspected infectious origin" of the official statistics, we evaluated the frequencies of *Campylobacter* spp. among the samples, where no pathogen was identified while tested at the clinics. As a result, out of the 378 "unidentified" samples, totally 16.6% (95% CI [13.05, 20.8] (n=63)) were positive for *Campylobacter* spp. from the three big cities of Georgia.

Besides, based on the 382 stool samples, from Tbilisi Children Infectious Diseases Clinical Hospital, collected during a year (July 2020- July 2021) we studied epidemiological trend of the three

main diarrhea-causing bacteria, patients' age distribution and seasonality of campylobacteriosis in Tbilisi.

Out of the 382 stool samples, 139 specimens (36.4%) were positive for any of the three tested enteric pathogens. There were no samples with mixed infection. Among enteropathogenic bacteria, *Shigella sonnei* was the most common (19.1%, 95%CI [15.2, 23.4] n=73), followed by thermophilic *Campylobacter* spp. (12.3%, 95%CI [9.2, 16.0%] n=47) and *Salmonella* spp. (4.9%, 95%CI [3.0, 7.6%] n=19). However, in more than half of the cases (n=243, 63.6%), the etiological agent was not detected.

The patients were hospitalized either with an acute hemocolitis with bloody diarrhea and high fever for three days or with prolonged diarrhea containing water, mucus and blood. The average hospitalization time was 5 days. Almost all patients had the following symptoms: hemocolitis, fever, abdominal pain, tenesmus and rarely vomiting. 55% of the patients were girls n = 26, 45% n = 21 boys. The age of the patients varied from 2 months up to 211 months (~17 years). The median age of all patients was 52 months, while 71 months was the median of the subset of patients with the identified pathogen. Thirty-two percent of the patients were up to 2 years old, and 61% were preschoolers.

The distribution of the patients' ages with *Campylobacter* spp. infection (median 40 months (IQR 22–95)) was significantly different compared to patients infected with *Shigella sonnei* (median 92 months (IQR 52–140)) using the Mann–Whitney test with $U = 994$ and $p < 0.001$. However, the difference of the patient age with campylobacteriosis was not significantly important from that with salmonellosis (median age 57 months IQR 27–123), $U = 374$, $p = 0.3$), and of patients with salmonellosis compared to shigellosis ($U = 534$, $p = 0.124$).

We further analyzed whether any seasonality was observed for enteric pathogen infection in children in Tbilisi. For this purpose, the prevalence was categorized by month of sampling. There was no obvious seasonal difference in the number of detected campylobacteriosis and salmonellosis cases, although the overall number of samples was low. In contrast, shigellosis appeared to be predominant during autumn until the beginning of winter. It is noted that almost all patients were citizens of Tbilisi, where the seasonal temperature is significantly different.

An epidemiological pyramid was set in a way to extrapolate the results of the study to the Tbilisi children's population in order to estimate the "true prevalence" of campylobacteriosis. Multiplication factors (MFs), a measure of the magnitude of underestimation, were taken directly from the literature or derived from statistical information. The pyramid shows estimated incidence data at five levels:

- ✓ Symptomatic campylobacteriosis: Although *Campylobacter* is rarely identified in the stools of healthy persons, depending on the population studied, as many as 50% of persons who are infected during outbreaks were asymptomatic. Taking this number into account, the calculated MF is 2.
- ✓ Hospitalization rate of campylobacteriosis: In European countries, the proportion of hospitalized patients due to campylobacteriosis is around 33.9%, which derives a MF of 2.95.
- ✓ Fraction of patients at the study hospital: The Tbilisi Children Clinical Hospital of Infectious Diseases is the main hospital for gastroenteric illnesses in the city; therefore, around 80% of children patients were hospitalized at this location, corresponding to an MF of 1.25.

- ✓ Fraction of tested samples for campylobacteriosis: The annual number of patients at the Tbilisi Children Clinical Hospital of Infectious Diseases with acute bacterial inflammatory diarrhea was 1450, from which 26% (n=382) of the samples were tested for Campylobacter spp. in this study (MF 3.8).
- ✓ Sensitivity of the laboratory method: For the identification of Campylobacter from stool samples, we applied the standard culture-based laboratory method, estimated to have a median sensitivity of 76%, leading to an MF of 1.32.
- ✓ Laboratory confirmed cases were delivered by the presented study. They constitute the tip of the pyramid.

To estimate the "true number" of the infection, the number of confirmed cases delivered in the study is multiplied by the MFs indicated above (MFs = 1.32 × 3.8 × 1.25 × 2.95 × 2 = 37). Hence, the "true incidence" of campylobacteriosis among the Tbilisi children's population might be around 1800 cases annually. Given a total number of 283.400 children in Tbilisi in 2020, this refers to 1:1500 cases annually or an incidence of around 6 per 1000.

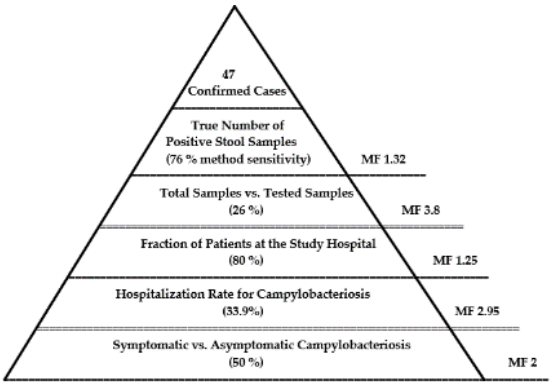


Figure 1. Epidemiological pyramid for the estimation of the true number of campylobacteriosis cases among children in Tbilisi.

Campylobacter spp. Species Identification by RT-PCR

Totaly 220 isolates—160 derived from chicken and 60 from human sources were transported to BfR for farther caracterization. However, 16 of them were non-culturable, but *Campylobacter* spp. was still detectable by RT-PCR. At twelve of the inoculums, *C. coli* were at 4/12 and *C. jejuni* - 3/12 and mixed cultures of *C. coli* and *C. jejuni* in five cases (41%, n = 5/12).

Out of 204 strains re-cultured, 37.7% (n = 77) were identified as *C. jejuni* and 62.3% (n = 127) as *C. coli* applying real-time PCR. The distribution of isolated species differed between human stool samples and cecal chicken samples.

From the isolates of backyard chicken, 25.8% were identified as *C. jejuni* (n = 25/97) and 74.2% (n = 72/97) as *C. coli*; in cecal samples from industrial chicken, *C. coli* was even more dominant with 90% (n = 45/50). In contrast, out of 57 clinical strains of children stool samples, 82.5% (n = 47/57) were identified as *C. jejuni* and 17.5% (n = 10/57) as *C. coli*.

Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Isolates.

All isolates were tested for their resistance to the six antimicrobials chloramphenicol, ciprofloxacin, ertapenem, erythromycin, gentamicin and tetracycline according to the European standardized EUCAMP3 plate format. All tested strains were sensitive towards gentamicin, erythromycin and chloramphenicol. Resistance in both human and poultry isolates and in both bacterial species was highest against ciprofloxacin and tetracycline.

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from three different sources.

Antimicrobial	ECOFF (µg/mL) (R>)		No. (%) of Resistant Isolates							
			Backyard Chicken (n = 97)		Industrial Chicken (n = 50)		Human (n = 57)		Total (n = 204)	
	C. jejuni	*C. coli*	*C. jejuni* (n = 25)	*C. coli* (n = 72)	*C. jejuni* (n = 5)	*C. coli* (n = 45)	*C. jejuni* (n = 47)	*C. coli* (n = 10)	*C. jejuni* (n = 77)	*C. coli* (n = 127)
Chloramphenicol	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0.5	0.5	20 (80%)	69 (96%)	5 (100%)	45 (100%)	41 (87%)	9 (90%)	66 (86%)	123 (97%)
Erythromycin	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0
Ertapenem	0.5	0.5	0	27 (37%)	0	37 (82%)	0	6 (60%)	0	70
Gentamicin	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetracycline	1	2	18 (72%)	52 (72%)	4 (80%)	45 (100%)	17 (36%)	8 (80%)	39 (51%)	105 (83%)

ECOFF, epidemiological cut-off for definition of resistance against antimicrobial substances (EUCAST.org); R>, maximal MIC that represents sensitivity; any MIC exceeding this concentration is defined as resistant. Note that ECOFF for erythromycin and tetracycline differs for Campylobacter species. n, number of tested isolates; numbers in table represent numbers of resistant isolates; in brackets, percentage of resistant isolates.

Both human and poultry *C. coli* strains showed resistance against ertapenem—37% of the strains from backyard chicken, 60% of human isolates and 82% of industrial chicken strains, while *C. jejuni* isolates were fully susceptible to this antimicrobial. Among the ertapenem-resistant *C. coli*, 89% (n = 62) had a MIC value of 1 µg/mL, just above the current cut-off value, 10% (n = 7) displayed a MIC of 2 µg/mL and a single strain had a MIC of 4 µg/mL. From the strains with MIC values ≥2 µg/mL ETP, three were derived from human samples, four from backyard chicken and one from industrial chicken. Overall, isolates of *C. coli* were less frequently fully susceptible (3/127, 2.4%) than isolates of *C. jejuni* (9/77, 11.6%), with each six strains isolated from backyard poultry and human samples and lack of susceptible strains among the industrial isolates.

C. coli were more likely resistant—compared to *C. jejuni*-against ciprofloxacin (OR 5.1, 95%CI [1.6, 16.7]) and tetracycline (OR 4.6, 95% CI [2.5, 8.8]). In addition, isolates from clinical samples were less likely resistant to tetracycline compared to chicken isolates (OR 0.18, 95%CI [0.1, 0.4]). No statistically significant difference

was observed for resistance to ciprofloxacin between human and poultry isolates. Overall, *C. coli* was 18.5 times more likely resistant against two or more antibiotics compared to *C. jejuni* (OR 18.5, 95%CI [7.7, 44.8]). The same was observed in clinical isolates, where *C. coli* was 17.4 times more likely resistant to two or more antimicrobials than *C. jejuni* (OR 17.4, 95%CI [2.03, 150.1]); for poultry samples *C. coli* OR showed 7.9 times more probability to have resistance against two or more antibacterial agents compared to *C. jejuni* (OR 7.9, 95%CI [2.6, 24.6]). There was a significant association of multi-resistance probability with isolation source in *C. jejuni* strains. In particular, the probability of resistance against two or more antimicrobials for chicken isolates of *C. jejuni* was 4.5 times higher compared to human isolates (OR 4.5, 95%CI [1.7, 12.1]); however, we did not find a significant association between clinical and chicken isolates for *C. coli* species, probably due to low number of *C. coli* isolates from human stool samples. Additionally, no statistically significant difference was found for the presence of two or more resistances in *C. jejuni* or in *C. coli* isolates from industrial compared to backyard chicken. Variables of bacterial species and isolates were subjected to logistic regression analysis to test association with resistance to two or more antimicrobials as dependent variables. Both variables were retained in the final model as independent variables. The Nagelkerke pseudo R squared was 0.435 indicating that more than 43% of the variability of dependent variables is due to the independent variables model. Multi-variate logistic regression was performed with two variables which showed significant association with tetracycline resistance. Both variables, bacterial species and sample sources were retained into final model as independent predictors. The regression model can explain more than 20% of the variation in the dependent variable (tetracycline resistance), according to the Nagelkerke

pseudo R squared of 0.204. In other words, the predictive model, consisting of the variables “bacterial species” and “sample sources”, can explain 20% of the variability of the dependent variable “tetracycline resistance”. Alternatively, this means, that the remaining 80% of the variability of the dependent variable could be explained with variables that were not measured within the study and/or are not identified as a possible predictor for the outcome variable. Nagelkerkes R squared 43% for the dependent variable “2-3-fold resistance” can be interpreted in the same way.

Phylogenetically Diversity of Georgian *Campylobacter* spp. Isolates

We additionally analyzed forty *Campylobacter* strains by whole-genome sequencing, twenty derived from poultry and another twenty from human samples, approximately each ten *C. jejuni* and *C. coli* per matrix. The poultry isolates were both from backyard samples (n = 14) and from industrial chicken (n = 6). After de novo assembly of the raw reads, multi-locus sequence type analysis (MLST, based on 7 housekeeping genes) and, for more precise resolution, the core-genome MLST (cgMLST) scheme based on the comparison of 1343 gene alleles was used for phylogenetic analysis. Missing cgMLST loci were pairwise ignored. As expected, we obtained a high variability of multi-locus sequence types (ST, n = 24), including three strains with either unknown *unc*A allele and/or unknown ST-type. The *C. jejuni* (n=22) belonged to 15 different ST-types, while the *C. coli* (n=18) displayed 9 different ST-types (Fig. 3). The most frequent ST-types were ST-855 (n=6), ST-356 (n=4), and ST-902 (n=3). The *C. coli* ST-types most frequently grouped within the common clonal complex ST-828 (17/18).

Within the limited number of sequenced strains, we even found three sequence clusters. One of this clusters (ST-855) included four

highly similar *C. coli* strains from industrial chicken, collected in June/July 2021 during three independent samplings, with maximal two cgMLST allele differences. Two further *C. jejuni* clusters with each two strains identified among the human isolates belonged both to ST-type 356 and were separated from each other by 226 allele difference. One of these clusters included two *C. jejuni* strains isolated from children in September and October 2021, harboring identical pairwise cgMLST. The other cluster included two *C. jejuni* strains isolated from children in July and September 2021.

Eighteen *Campylobacter* isolates (45%) putatively carried plasmids (Supplementary Material Table S2), since contigs of the whole genome assembly were predicted as epichromosomal elements by Platon and BLAST analysis using the NCBI RefSeq plasmid database. All plasmids had at least 20% coverage of homology to known *Campylobacter* spp. plasmids, except for BfR-CA-19911, which harbored a small plasmid without any match in the RefSeq database.

Detection of Antimicrobial Resistance Genes by WGS revealed several resistance genes, responsible for the observed phenotypes.

The presence of the *tet*(O) gene, which mediates resistance to tetracycline, was detected in all tetracycline-resistant strains (70%, n = 28/40). The most common mutation in the *gyr*A gene (T86I) was identified in all ciprofloxacin resistant isolates (90% (n = 36/40)). The presence of *bla*OXA-61 family genes (OXA-193, OXA452, OXA-460, OXA-461, OXA-489, OXA-594), which confer resistance to beta-lactams, was observed in 75% (n = 30/37) of strains. In addition, we found the *aad*E-Cc gene in three *C.coli*, putatively conferring streptomycin resistance. Streptomycin and ampicillin are not part of EUCAMP3 plate format, so the

phenotype was not confirmed. The AMRFinderPlus database also annotated the mutation 50S_L22_A103V of the L22 ribosomal protein as a putative resistance marker for macrolide resistance in 30% (n =12/37) of the strains; however, all isolates were sensitive towards erythromycin. The resistance mechanism against ertapenem is still unknown. According to Platon prediction, all resistance determinants were chromosomally located.

mCCDA vs. CHROMagar

We performed a dual selection of *Campylobacter* spp. on either mCCDA or CHROMagar *Campylobacter* in order to increase detection sensitivity, and we identified *Campylobacter* spp. in 47 samples with either mCCDA (n=28) and/or CHROMagar (n=39). Hence, out of 47 positive samples, mCCDA showed false negative results or was overgrown by the background microbiota in 30% (n = 12) of the samples; in 7 cases, the medium was not applied. While for *Campylobacter* CHROMagar, false negative results were obtained in 17% (n = 8).

The comparison of the performance of both selective media delivered an odds ratio (OR) of 1.4, with a 95% confidence interval (CI) of 1.1 to 1.7, p = 0.038, showing a better performance of CHROMagar *Campylobacter* versus mCCDA. The typical greyish metallic colonies of thermophilic *Campylobacter* on mCCDA might be overseen due to dominant background microbiota so that CHROMagar *Campylobacter* appeared to be more selective and easier to handle for the routine laboratory, not necessarily focused only on *Campylobacter* spp. detection.

Discussion

Our results showed that campylobacteriosis might be the second leading bacterial cause of acute inflammatory diarrhea in

hospitalized children in the country. An interesting yet unexplained finding was that children with *Campylobacter* spp. were significantly younger than children with shigellosis, while the age distribution of children infected with *Salmonella* compared to *Campylobacter* did not differ significantly. Meanwhile, in school aged children and adolescents, *Shigella sonnei* was dominant. This finding becomes more significant as age differences were previously observed in a recent study from Israel, with younger patients with campylobacteriosis and salmonellosis than with shigellosis. Putting our study results with the existing national statistical data in line, we could suppose that campylobacteriosis is the second most frequent causative agent of bacterial gastroenteric illnesses on a country level, and its burden on public health might be largely underestimated. We tried to estimate the burden of the infection by applying the epidemiological pyramid method and adjusting data in order to provide more realistic estimates of *Campylobacter* incidence. This method is widely applied for priority setting for infectious disease in order to account for uncertainties not captured by the surveillance system. Due to the scarcity of information for public health systems at low- and middle income countries such as Georgia, MFs to correct underestimation, taken from other countries, might increase uncertainties. However, for decision-making processes, this approach is crucial, in particular for those countries. In our study, it was estimated that the "true incidence" of campylobacteriosis among Tbilisi children's population might be over 1800 cases annually. In this study, we focused on *Campylobacter* spp., but the incidence of *Salmonella* and *Shigella* might be underestimated, however, probably to a less extent. Still, in more than half of the samples, the pathogen was unidentified. *Campylobacter* was identified among five pathogens considered to contribute to the

substantial burden of disease spreading through animal feces in domestic environments in LMICs. Despite the fact that all participants of our study were urban residents, contacts with animal feces, e.g., from domestic pets and street dogs at kids' playgrounds, could also have contributed to the infection. Thus, there is an urgent need for further epidemiologic studies on food consumption patterns of Georgian children, including breastfed infants, with a focus on the development of campylobacteriosis, which might help in source attribution of this important pathogen. Moreover, large-scale studies are needed to confirm the differences in these clinical findings, considering the relatively low significance noted in a modest number of children. Higher positive rates for bacteria may be related to the use of multiplex PCR tests for detecting bacterial enteropathogens, particularly Campylobacter spp., as they are more sensitive than culture methods. We hope that the information will push policy makers to support building clinical laboratories' capacity for the identification of relevant pathogens, in particular Campylobacter, and enhance the national epidemiological surveillance system in the country.

EU countries have made significant strides in developing and implementing national monitoring plans on antimicrobial resistance; however, in Georgia, monitoring programs are still lacking. Our study results on antibiotic resistance in Georgian *Campylobacter* spp. isolates from chicken show similarities to the AMR data profiles of *Campylobacter* spp. in EU member states. In particular, both *C. jejuni* and *C. coli* from poultry sources in the EU exhibited high resistance against (fluoro-)quinolones and tetracycline, which is in line with our data. However, notably, the resistance rate to ciprofloxacin and tetracycline was 100% in isolates from industrial poultry samples in Georgia, while in

backyard chicken and in human isolates *Campylobacter* strains displayed slightly lower resistance against both antimicrobials. Comparing multi-resistance in *C. jejuni* or *C. coli* in industrial versus backyard chicken, no significant difference could be found. Interestingly, all isolates were sensitive towards gentamicin, chloramphenicol and erythromycin. Use of (fluoro-)quinolones was shown to be the major risk factor for ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp. on broiler farms. However, it was shown that the *gyr*A mutation, conferring resistance against (fluoro-)quinolones, can also contribute to a fitness increase in *C. jejuni* in poultry depending on the strain background. The clonal spreading of (fluoro-)quinolone-resistant clones was suggested to occur in Europe, although the contribution of whether the resistance was selected through (fluoro-)quinolone use in individual countries and/or transmission between countries is still unclear. Moreover, the differences in resistance rates between the bacterial species from the same source and, therefore, the same antimicrobial exposure indicated that antimicrobial use alone cannot explain differences in resistance profiles of *C. jejuni* and *C. coli*. *C. coli* from the same matrix exhibited higher resistance than *C. jejuni* towards multiple antimicrobials tested. The reason for this phenomenon is still unclear. (Fluoro-)quinolones are among WHOs "Highest Priority Critically Important Antimicrobials" (HPCIA). Increases in resistance to (fluoro-)quinolones in *Campylobacter* spp. are of concern, as resistance in *Campylobacter* from animals has been shown to be associated with resistance of *Campylobacter* from human infections. When Georgian isolates were compared according to their origin, the chicken *C. coli* or *C. jejuni* isolates were each significantly more resistant towards two and three classes of antimicrobials than the human strains. This might hint to additional infection routes other than cross-contamination from

preparing fresh chicken meat and/or direct contact to animals on chicken farms in Georgian children suffering from campylobacteriosis. In addition to the preparation of poultry meat and contact with poultry animals, contact with sand in a sandbox with putative contact to animal feces such as that from dogs and wild animals was also identified in a German study as risk factor positively associated with a *Campylobacter* infection for children under 5 years of age. Furthermore, our study showed a high prevalence of *C.coli* in comparison to *C.jejuni* from poultry samples, which was untypical in a number of countries even in the Caucasus region. However, there are other studies that identified a higher prevalence of *C. coli* than *C. jejuni* in swab samples from farms and neck skins at slaughter in Italy or some alterations of species distribution depending on the stage of broiler production. A long-term study over seven years showed a gradual decrease in the prevalence of *C. jejuni* and a concomittant increase in *C. coli* in cecal samples from chicken in China, while in Malaysia both species were frequently isolated from different broiler parts. One explanation for different species distribution might be age and race of the chicken, which is not likely in our study, since we obtained a similar species distribution from backyard chicken of different age and industrial chicken with standardized rearing period of 38–42 days. Our results may additionally hint at the fact that initially, we might have isolated mixed cultures of both *C. jejuni* and *C. coli* in some cases, since PCR results of inoculums identified the presence of both species, which in turn could not be recultivated together.

Preventive and control activities in Georgia are still limited concerning the monitoring and antimicrobial susceptibility profiling of thermotolerant *Campylobacter* spp. Our first national study showed similar AMR patterns of thermotolerant

Campylobacter spp. strains isolated in Georgia to those reported by the European Union. In particular, resistances against (fluoro-)quinolones and tetracycline were high and should be considered in local therapeutic protocols for severe human cases. Antimicrobial resistance and the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in animals, food and humans need further approaches in order to gain a representative picture of concurrent strains in the Caucasian region.

Recommendation

Large-scale incidence studies are needed on the country level at different age groups applying multiplex PCR tests for detecting bacterial enteropathogens, particularly *Campylobacter* spp., as they are more sensitive than culture methods;

There is an urgent need for further epidemiologic studies on food consumption patterns of Georgian children, including breastfed infants, with a focus on the development of campylobacteriosis, which might help in source attribution of this important pathogen;

WGS of isolates, especially those with multi-drug resistance high-level resistance to erythromycin or ciprofloxacin, or resistance to gentamicin or ertapenem, is strongly recommended in order to decipher the antimicrobial resistance determinants involved, their genetic location, and the potential for horizontal transmission.

List of Publications

- ✓ **Metreveli, M.;** Bulia, S.; Tevzadze, L.; Tsanava, S.; Zarske, M.; Goenaga, J.C.; Preuß, S.; Lomidze, G.; Koulouris, S.; Imnadze, P.; Stingl, K. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Profiles of Thermotolerant *Campylobacter* spp. Isolated from Human and Poultry Samples in Georgia (Caucasus). *Antibiotics* **2022**, 11, 1419. https://doi.org/10.3390/antibiotics11101419
- ✓ **Metreveli, M.**; Bulia, S.; Shalamberidze, I.; Tevzadze, L.; Tsanava, S.; Goenaga, J.C.; Stingl, K.; Imnadze, P. Campylobacteriosis, Shigellosis and Salmonellosis in Hospitalized Children with Acute Inflammatory Diarrhea in Georgia. *Pathogens* **2022**, 11, 232. https://www.mdpi.com/2076-0817/11/2/232
- ✓ **Metreveli, M.**; Bulia, S.; Shalamberidze, I.; Tevzadze, L.; Lashqarashvili, M.; Tsanava, S.; Imnadze, P. Study of campylobacteriosis in hospitalized children with acute inflammatory diarrhea and *Campylobacter* spp. colonization status of poultry flocks in Georgia. *Translational and Clinical Medicine – Georgian Medical Journal* Vol 7, No 3 (2022). http://www.tcm.tsu.ge/index.php/TCM-GMJ
- ✓ **M.Metreveli**; S.Bulia; I.Shalamberidze MD, PHD; L.Tevzadze, PHD; P.Imnadze, MD, PHD; Campylobacteriosis – The Most Causative Agent of Gastroenteritis; Experimental and Clinical Medicine ISSN 1512-0392, 2020 December (GEO).

Scientific Events

FEMS Conference on Microbiology 2022. Serbia, Belgrade

https://www.femsbelgrade2022.org/abstract-book