

Epidemiološke i mikrobiološke značajke infekcija uzrokovanih kampilobakterima u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji 2021. godine

Viduka, Dino

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:678487>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

DINO VIDUKA

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE ZNAČAJKE INFEKCIJA UZROKOVANIH
KAMPILOBAKTERIMA U AMBULANTNIH BOLESNIKA U SPLITSKO-
DALMATINSKOJ ŽUPANIJI 2021. GODINE**

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.

Split, prosinac 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

DINO VIDUKA

**EPIDEMIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF INFECTIONS
CAUSED BY *CAMPYLOBACTER* SPP. IN OUTPATIENTS IN SPLIT-DALMATIA
COUNTY IN 2021.**

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.

Split, prosinac 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Tema rada: prihvaćena je na 74. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 21. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.

EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE ZNAČAJKE INFEKCIJA UZROKOVANIH KAMPILOBAKTERIMA U AMBULANTNIH BOLESNIKA U SPLITSKO-DALMATINSKOJ ŽUPANIJI 2021. GODINE

Dino Viduka, broj indeksa: 238

Sažetak

Cilj: Cilj ovog istraživanja je bio odrediti učestalost infekcija uzrokovanih bakterijama roda *Campylobacter* u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini, njihovu raspodjelu prema dobi, spolu, mjestu stanovanja i kalendarskim mjesecima te odrediti osjetljivost izolata *Campylobacter* spp. na antibiotike.

Materijal i metode: U istraživanju su korišteni podaci iz računalne baze podataka Odjela za dijagnostiku infekcija probavnoga sustava NZJZ SDŽ Split, a uključivali su sve bolesnike kojima je u razdoblju od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2021. godine izolirana bakterija *Campylobacter* iz uzorka stolice. Podaci su obrađeni korištenjem programskog paketa Microsoft Office 365, a za statističku analizu su korišteni programi Social Science Statistics i VassarStats.

Rezultati: Ukupan broj bakterijskih izolata *Campylobacter* spp. iz uzoraka stolice ambulantnih bolesnika na području Splitsko-dalmatinske županije u 2021. godini je iznosio 395. Najčešći izolat je bio *Campylobacter jejuni* (92,4%). Infekcije su bile značajno češće kod muškaraca nego kod žena. Najveći broj infekcija je zabilježen u dobnim skupinama 0-4 godine i 20-29 godina. Također, broj oboljelih u urbanim područjima je bio značajno veći nego u suburbanim i ruralnim područjima. Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterom je zabilježen u razdoblju od ožujka do listopada s vrhuncem u svibnju. Na području Splitsko-dalmatinske županije u 2021. godini, u odnosu na prethodna istraživanja na istom području, je zabilježen porast broja izolata *Campylobacter jejuni* otpornih na ciprofloksacin i tetraciklin, dok je udio T_{CR}/C_{IPR} korezistentnih izolata ostao stabilan. *Campylobacter jejuni* je u udjelu od 5,3% pokazao otpornost i na amoksicilin-klavulanat. Svi sojevi *Campylobacter jejuni* otporni na amoksicilin-klavulanat su ujedno bili i višestruko rezistentni na druga dva ili više antibiotika. Od 5 izolata *Campylobacter coli* uključenih u istraživanje, svih 5 je pokazalo otpornost na ceftriakson i cefazolin, njih 3 na ciprofloksacin, a 2 soja su bila rezistentna na tetraciklin. Na sve ostale antibiotike *Campylobacter coli* je pokazao zadovoljavajuću osjetljivost. Izolat *Campylobacter lari* je bio rezistentan na ciprofloksacin, ceftriakson i cefazolin, a na ostale antibiotike je bio osjetljiv. Dva izolata *Campylobacter coli* su bili T_{CR}/C_{IPR} korezistentni dok ostali izolati nisu pokazivali dvostruku ili i višestruku otpornost.

Zaključak: Epidemiološke značajke kampilobakterioza u ambulantnih bolesnika u 2021. godini su slične značajkama utvrđenim u SDŽ u prethodnim istraživanjima na ovom području, tj. pokazuju obrazac karakterističan za razvijene zemlje. Utvrđen je porast otpornosti izolata *Campylobacter jejuni* na ciprofloksacin i na tetraciklin. Također, potvrđeno je i postojanje višestruko otpornih izolata *Campylobacter jejuni*, dok je otpornost tih izolata na amoksicilin-klavulanat i eritromicin bila niska. Zabilježena je i povećana otpornost izolata *Campylobacter coli* na ceftriakson i ciprofloksacin, te umjerena otpornost na tetraciklin. S obzirom na ove *in vitro* rezultate testiranja osjetljivosti kampilobaktere na antibiotike, lijek izbora i dalje ostaje eritromicin, a zbog niskih stopa otpornosti, moguća je i terapija i amoksicilin-klavulanatom.

Ključne riječi: *Campylobacter* spp., kampilobakterioza, otpornost na antibiotike

Rad sadrži: 63 stranice, 17 slika, 6 tablica, 61 literaturna referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Nataša Boban, dr. med. - predsjednik povjerenstva
2. doc. prim. dr. sc. Anita Novak, dr. med. - član
3. doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med. – mentor

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Thesis subject: was approved by Council Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, no. 74 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14

Mentor: Assistant Professor Merica Carev

**THE EPIDEMIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF INFECTIONS
CAUSED BY *CAMPYLOBACTER* SPP. IN OUTPATIENTS IN SPLIT-DALMATIA
COUNTY IN 2021.**

Dino Viduka, index number: 238

Summary

Objective: The goal of this research was to determine frequency of infections caused by *Campylobacter* bacteria in outpatients in Split-Dalmatia county in 2021., their distribution according to age, gender, place of residence and months of the year as well as to determine the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates.

Materials and methods: The data used in this research were taken from the computer data base of the Department for gastrointestinal tract infections diagnosing of the TIPH SDC Split, and they included all of the patients who were diagnosed with *Campylobacter* spp. bacteria in their stool samples during the period from the 1st of January 2021. to the 31st of December 2021. The data were analyzed using the Microsoft Office 365 software package, and programs Social Science Statistics and VassarStats for statistical analysis.

Results: The total number of *Campylobacter* spp. isolates from stool samples in the area of Split-Dalmatia County in 2021. was 395. The most common isolate was *Campylobacter jejuni* (92,4%). Infections were significantly more frequent in men than women. The highest number of infections was present in the age groups 0-4 and 20-29 years. Also, the number of patients in urban areas was significantly higher than in suburban and rural areas. The highest number of infections was detected during the period from March through October with a peak in May. In comparison with other previous research that took place in Split-Dalmatia County, there has been detected an increase in the number of resistant *Campylobacter jejuni* isolates to ciprofloxacin and tetracycline, while the percentage of TcR/CipR co-resistant isolates remained stable. 5,3% of *Campylobacter jejuni* isolates also showed resistance to amoxicilin-clavulanate. All of the *Campylobacter jejuni* strains resistant to amoxicilin-clavulanate were also multiple resistant to other two or more antibiotics. Out of the 5 *Campylobacter coli* isolates included in the research, all five were resistant to ceftriaxone and cefazolin, 3 of them were resistant to ciprofloxacin, and 2 strains demonstrated resistance to tetracycline. *Campylobacter coli* showed good susceptibility to tested antibiotics. *Campylobacter lari* isolate was resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and cefazolin, and was susceptible to other tested antibiotics. Two of the *Campylobacter coli* isolates were TcR/CipR co-resistant, while others did not show double or multiple resistance.

Conclusion: The epidemiological characteristics of campylobacteriosis in outpatients in 2021. were similar to the characteristics determined in SDC in previous research in this area, in fact this pattern is similar to patterns of campylobacteriosis in other developed countries. There has been shown an increase in resistance to ciprofloxacin and tetracycline of *Campylobacter jejuni* isolates. Also, there has been confirmed the presence of multiple resistant *Campylobacter jejuni* isolates, while the resistance of these isolates to amoxicilin-clavulanate and erythromycin was low. There was also noted the higher resistance of *Campylobacter coli* isolates to ceftriaxon and ciprofloxacin, as well as moderate resistance to tetracycline. Considering these in vitro antimicrobial susceptibility results of *Campylobacter* isolates, erythromycin still remains the drug of choice, but it is also possible to treat this infection with amoxicilin-clavulanate because of its low resistance rate.

Key words: *Campylobacter* spp., campylobacteriosis, antibiotic resistance

Thesis contains: 63 pages, 17 figures, 6 tables, 61 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Associated Professor Nataša Boban, chair person
2. Assistant Professor Anita Novak, member
3. Assistant Professor Merica Carev, supervisor

Defense date: December 19th, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine,
Šoltanska 2.

SADRŽAJ

1. POPIS OZNAKA I KRATICA.....	1
2. UVOD.....	3
2.1. Rod <i>Campylobacter</i>	4
2.1.1. Fiziologija i struktura	4
2.1.2. Patogeneza kampilobakterioze	5
2.1.3. Klinička slika infekcije.....	6
2.1.4. Epidemiologija	6
2.1.5. Laboratorijska dijagnostika i liječenje	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	12
5. MATERIJALI I METODE	14
5.1. Ispitanici	15
5.2. Opis provedenog dijagnostičkog postupka	15
5.3. Ispitivanje antibiotske osjetljivosti.....	17
5.4. Geografska podjela.....	21
5.5. Statističke metode	21
5.6. Etička načela	21
6. REZULTATI.....	22
6.1. Raspodjela ispitanika s obzirom na vrstu izolata	23
6.2. Socio-demografska obilježja bolesnika	23
6.3. Osjetljivost izolata <i>Campylobacter</i> spp. na antibiotike	28
6.4. Prikaz dvostruko, trostruko i višestruko rezistentnih izolata.....	31
7. RASPRAVA	33
8. ZAKLJUČCI.....	39
9. POPIS CITIRANE LITERATURE	41
10. SAŽETAK	48
11. SUMMARY	51

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr.sc. Merici Carev, dr. med., na savjetima, vodstvu, strpljenju i podršci prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala i Dini Mrčeli, dr.med., na velikoj stručnosti, pomoći i požrtvornosti tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i mojoj obitelji i prijateljima koji su me bodrili i podržavali tijekom cijelog studija, u svakom smislu tih riječi.

1. POPIS OZNAKA I KRATICA

- AIDP – akutna inflamatorna demijelinizacijska polineuropatija,
- AUG – amoksicilin-klavulanat,
- *C. coli* – *Campylobacter coli*,
- *C. jejuni* – *Campylobacter jejuni*,
- CadF – *Campylobacter* adhesion to fibronectin,
- *Campylobacter* spp. (lat. species) – rod *Campylobacter*,
- CZ – cefazolin,
- CFX – cefaleksin,
- CIP – ciprofloksacin,
- E – eritromicin
- EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- GM – gentamicin
- IQR – interkvartilni raspon
- n - brojnost
- NAT – nucleic acid test
- NZJZ – Nastavni Zavod za javno zdravstvo
- P vrijednost - statistički značajna razlika,
- PCR – polymerase chain reaction
- PEB1 - Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
- SDC – Split-dalmatia County
- SDŽ – Splitsko-dalmatinska županija
- T_{C_R}/Cip_R - izolati kampilobaktera otporni na tetraciklin i ciprofloksacin, korezistentni izolati,
- T – tetraciklin
- TIPH – Teaching Institute for Public Health,
- χ^2 - hi kvadrat test.

2. UVOD

2.1. Rod *Campylobacter*

Infekcije uzrokovane kampilobakterom predstavljaju jednu od vodećih bolesti koje se prenose kontaminiranom hranom. Najčešće se očituju kao akutni gastroenteritis. Međutim, razvitak mogućih kroničnih posljedica uzrokovanih akutnom infekcijom jedan je od razloga koji pridonose ozbiljnosti i važnosti ovog problema (1).

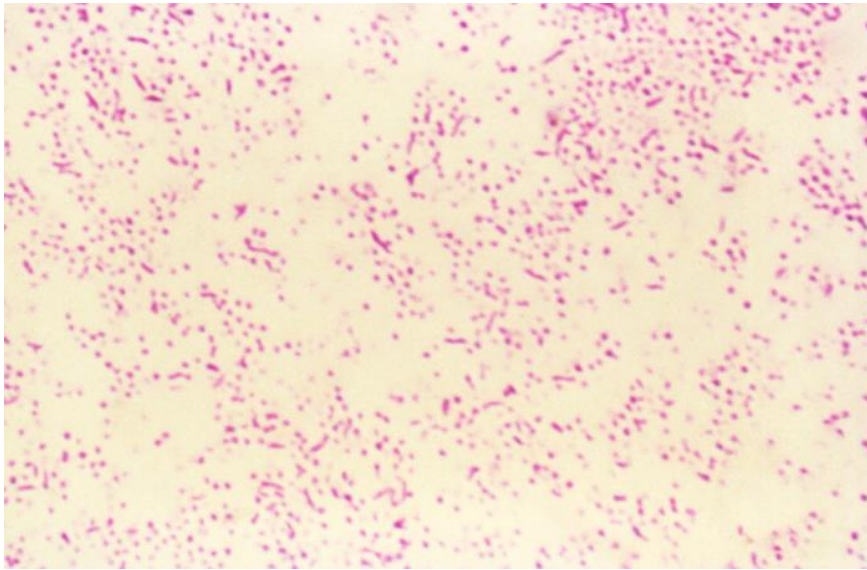
Kampilobaktere je krajem 19. stoljeća uočio Escherich u stolicama bolesne djece s proljevom, a prvi su izolati bili svrstani u rod *Vibrio*. Zahvaljujući razvoju selektivnih podloga, omogućena je izolacija kampilobaktera, a tek 1963. godine ustanovljen je zaseban rod *Campylobacter* (2).

U Hrvatskoj je prvi izolat kampilobaktera iz veterinarskih uzoraka opisan već 1956. godine. Istraživanja kampilobaktera izoliranih iz uzoraka životinja, hrane i okoliša provode se posljednjih dvadesetak godina. Izolati iz uzoraka stolica bolesnika, zajedno s njihovim epidemiološkim i mikrobiološkim značajkama, su opisani prvotno na području Zagreba (1982. i 1985.g.), te nešto kasnije u Primorsko-goranskoj županiji (2002. i 2006.g.) (3). Prva mikrobiološka i epidemiološka istraživanja kampilobakterioze u Splitsko – dalmatinskoj županiji provedena su između 2006. i 2012. godine (3, 23).

Unutar roda *Campylobacter* dokazane su dosad sveukupno 32 vrste (4). Vrste unutar roda *Campylobacter* koje su najčešće odgovorne za razvoj bolesti u ljudi su *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* (5). Uzročnici gastroenteritisa su i *Campylobacter upsaliensis* te *Campylobacter lari*, a *Campylobacter fetus* uzrokuje sustavne infekcije u čovjeka (6).

2.1.1. Fiziologija i struktura

Bakterije roda *Campylobacter* pod mikroskopskim povećanjem izgledaju kao sitni, nesporogeni, zavinuti, štapićasti, gram-negativni mikroorganizmi (0,2 - 0,9 x 0,5 - 5 µm). Pripadaju skupini termofilnih bakterija (2). Kretanje im omogućuje jedna polarno smještena flagela te spiralan stanični oblik. Iz tih razloga jako su pokretljivi u medijima veće viskoznosti (6). Idealni uvjeti za rast kolonija je temperatura između 37°C i 42°C te mikroaerofilna atmosfera što podrazumijeva sniženu koncentraciju kisika i povišenu koncentraciju dušika i ugljikova dioksida (7). Inkubiraju se na selektivnim hranjivim podlogama u razdoblju od 48 sati (5).



Slika 1. *Campylobacter jejuni*, mikroskopski prikaz, bojanje po Gramu (preuzeto s <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=6652>)

2.1.2. Patogeneza kampilobakterioze

Kampilobakteri se ubrajaju među veoma otporne mikroorganizme zbog svog fleksibilnog metabolizma, koji im omogućava preživljenje u nepovoljnim uvjetima (8).

Infektivna doza koja je dostatna za razvoj infekcije je relativno niska te iznosi oko 800 bakterija. Vrijeme inkubacije iznosi najviše tjedan dana (9). Bolest se obično razvije 2 – 4 dana nakon prijenosa infektivne doze, a u prosjeku traje između četiri i sedam dana.

Interakcija *Campylobacter jejuni* s eukariotskom stanicom dovodi do otpuštanja brojnih proupalnih citokina zbog promjena u prijenosu signala napadnute stanice (10). Među ostale čimbenike virulencije spadaju: adhezija, invazija, proizvodnja toksina i izbjegavanje obrambenih mehanizama domaćina. Kod razvoja infekcije veliku ulogu igra i pokretljivost kampilobaktera, to jest, posjedovanje flagele koja mu omogućuje prolazak kroz želudac do crijeva. Adhezija i invazija stanica crijeva također su ovisni o pokretljivosti, ali i o izražaju specifičnih proteina (PEB1, CadF). Jednom kada se internalizira u stanici domaćina, od oksidativnog stresa se brani proizvodnjom katalaze (2). Prilikom istraživanja kampilobaktera otkriveno je kako posjeduju enterotoksine te lipopolisaharide s aktivnošću endotoksina, međutim, značaj tih toksina kod ljudskih infekcija još uvijek nije dobro razjašnjen (11).

Jednom kada dođu u tanko crijevo, započinju proces umnožavanja i invadiranja epitela te dolazi do upale koja se može očitovati pojavom crvenih i bijelih krvnih stanica u stolici. Ponekad mogu prodrijeti u krv te se razviti slika crijevne vrućice (11).

2.1.3. Klinička slika infekcije

Klinička slika enterokolitisa uzrokovanog infekcijom *Campylobacter jejuni* najčešće uključuje abdominalnu bol, proljev, vrućicu te kod nekih pacijenata i krv u stolici (12). Simptomi bolesti onemogućuju veliki broj svakodnevnih aktivnosti, a ovisno o pojedincu mogu biti blaži ili teži te ponekad mogu rezultirati i posljedicama nakon preboljene infekcije (13). Obično prestaju spontano nakon tjedan dana, a kliconoštvo u prosjeku zaostaje 14 dana, u dojenčadi i dulje. U trudnica infekcija može uzrokovati teške komplikacije poput perinatalne sepse, neonatalnog meningitisa, preranog porođaja pa čak i pobačaj. Kod imunokomprimitiranih osoba, bolest poprima dulji i teži tijek te se može razviti i bakterijemija. U tih pacijenata znaju se pojaviti i ekstraintestinalne komplikacije (reumatološke, neurološke, plućne, kožne) (2).

Jedna od ozbiljnih ekstraintestinalnih posljedica je Guillain-Barréov sindrom koji se primarno očituje kao akutna inflamatorna demijelinizacijska polineuropatija (AIDP) (14). Ostale kasne komplikacije uzrokovane zarazom uključuju sindrom iritabilnog kolona, reaktivni artritis, Reiterov sindrom te Miller-Fischerov sindrom. Pojava navedenih neuroloških sindroma može se objasniti antigenskom sličnošću između *Campylobacter jejuni* i mijelina (2).

2.1.4. Epidemiologija

Kampilobakterioze spadaju među najraširenije infektivne bolesti ovoga stoljeća te su podjednako često prisutne u razvijenim zemljama, kao i u zemljama u razvoju (15, 16). One predstavljaju naročito velik problem djeci i nedonoščadi u slabije razvijenim zemljama. Povećana učestalost gladi u ovim područjima uvećava problem infekcije te ovo dvoje u kombinaciji dovodi do teške malnutricije (17). Za razliku od tog, odrasle osobe u siromašnijim zemljama uglavnom imaju blažu kliničku sliku od odraslih osoba i djece u razvijenijim zemljama (18).

Klimatske varijacije također su bitan čimbenik incidencije kampilobakterioza. Većina zemalja doživljava vrhunac broja zaraza u proljeće, dok zemlje za koje su karakteristične blaže zime taj vrhunac dosegnu i ranije (19). Povećani rizik infekcija je stoga u pozitivnoj korelaciji s pojavom toplijih godišnjih doba (20).

U Europskoj uniji, ove infekcije predstavljaju najčešću bolest koja potiče iz prehrambenih izvora. Na godišnjoj razini u EU javi se između 2 i 9,4 milijuna slučajeva što predstavlja ogromno opterećenje za zdravstveni sustav koji potroši oko 2,4 milijarde eura godišnje samo na liječenje ovih bolesti (21). Prve službene prijave ove bolesti u RH nalazimo 2009. godine, te se od tad uz manje oscilacije bilježi kontinuitet godišnjih incidencija. U 2021. godini, u RH je zabilježeno 1159 slučajeva (22).

U Splitsko-dalmatinskoj županiji je, prema šestogodišnjem istraživanju Carev i suradnika (2007. – 2012.), incidencija kampilobakterioza bila veća u urbanim nego u suburbanim i ruralnim područjima. Također, incidencija je bila najveća u djece od 0 do 4 godine. Broj infekcija doseže svoj vrhunac uglavnom u ranim ljetnim mjesecima te je u korelaciji s pojavom viših temperatura i toplijeg vremena, kao i u ostalim zemljama (23). U Dalmaciji je također zabilježena velika rasprostranjenost tetraciklin i ciprofloksacin korezistentnih kampilobaktera (24).

U ljudski organizam kampilobakter najčešće dospijeva konzumacijom nedovoljno obrađenog mesa i kontaminirane vode (25). Nepravilno rukovanje pilećim mesom i njegova konzumacija dokazali su se kao značajan faktor rizika pri prijenosu kampilobaktera (26). Upravo je meso peradi najveći izvor zaraze kampilobakterom, a uz meso sve više se navode i drugi izvori poput okoliša, kontakta s kućnim ljubimcima i domaćim životinjama. Za takve se izvore zaraze smatra da su pretežito lokalizirani, to jest specifični za pojedine regije, za razliku od komercijalnog mesa peradi koje je jednoliko rasprostranjeno i dostupno unutar iste zemlje (3). Nepasterizirano mlijeko također predstavlja mogući izvor zaraze, dok upotreba pasteriziranog mlijeka nema rizika (27). Voda iz fontana i rijeka često može biti kontaminirana, te zbog toga predstavlja izravan izvor kampilobakterioza, naročito u djece. Veliki problem fontana i rijeka jest taj što su ujedno i izvor kampilobaktera rezistentnih na veliki broj antibiotika, što liječenje kampilobakterioza poteklih iz ovih izvora dodatno može otežati (28).

2.1.5. Laboratorijska dijagnostika i liječenje

Kako bi se potvrdila dijagnoza kampilobakterioze, potrebno je izolirati *Campylobacter* spp. iz uzoraka stolice oboljelih (29). Prilikom kultivacije koriste se selektivne hranjive podloge koje se tijekom 48 sati inkubiraju na 42°C u mikroaerofilnoj atmosferi. Optimalan sastav atmosfere je 80% dušik, 10% ugljikov dioksid i 5% kisik. Nakon inkubacije iz sivkastih nepravilnih kolonija napravi se mikroskopski preparat te testovi oksidaze i katalaze koji pozitivnim rezultatom potvrđuju prisutnost *Campylobacter* spp. Testom hidrolize hipurata razlikuje se *C. jejuni* od ostalih kampilobaktera. Uzorci koji su primarno sterilni, obično se nasađuju na obogaćene hranjive podloge poput krvnog agara (2, 30). Nakon dokaza uzročnika, za svaki izolat kampilobaktera se nakon subkultivacije na Columbia krvnom agaru izrađuje antibiogram disk-difuzijskom metodom u skladu s EUCAST smjericama (36).

Sve se više koriste nove dijagnostičke metode za detekciju patogena iz hrane, pa tako i za *Campylobacter* spp. Niska razina kontaminacije hrane kampilobakterom zahtijeva novije dijagnostičke metode koje su visoko osjetljive. Zato se konvencionalne dijagnostičke metode sve više zamjenjuju novijim metodama poput biosenzora, NAT testova te različitih PCR tehnika (31).



Slika 2. *Campylobacter* spp., makroskopski prikaz kolonija na hranjivoj podlozi Karmali agar (fotografirano u zgradi NZJZ SDŽ u Splitu, 24. studenoga 2021.)

Zaraza kampilobakterom se može prevenirati održavanjem osobne higijene, čestim pranjem ruku, dovoljnom termičkom obradom mesa te opreznim unosom mliječnih proizvoda (32). Ukoliko se razviju simptomi zaraze, ona se prvo liječi simptomatski. Simptomatsko liječenje (rehidracija, unos elektrolita, dijeta) igra važnu ulogu u liječenju proljeva i sprječavanju komplikacija (33).

Ukoliko je riječ o težem slučaju kampilobakterioze, u terapiju je potrebno uključiti i antimikrobne lijekove. Lijek izbora za liječenje ove infekcije je eritromicin, antibiotik iz skupine makrolida. Međutim, otpornost *C. jejuni* na eritromicin je u porastu zadnjih godina (34). Visoka stopa otpornosti *C. jejuni* na ostale antibiotike poput fluorokinolona, beta-laktama i tetraciklina ukazuje na potrebu za racionalnijim korištenjem antibiotika kod enteritisa uzrokovanog kampilobakterima (35).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Procijeniti učestalost infekcija uzrokovanih vrstama roda *Campylobacter* u Splitsko-dalmatinskoj županiji na temelju broja laboratorijski potvrđenih infekcija u ambulantnih bolesnika u 2021. godini.
2. Procijeniti raspodjelu vrsta roda *Campylobacter* u ambulantnih bolesnika u 2021. godini.
3. Procijeniti raspodjelu kampilobakterioza u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji prema spolu, dobi te mjestu stanovanja (urbano/suburbano/ruralno) bolesnika.
4. Odrediti osjetljivost svake pojedine vrste izolata na ispitivane antibiotike, kao i broj dvostruko i višestruko rezistentnih izolata izoliranih iz uzoraka stolice ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika u SDŽ.

4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Učestalost infekcija uzrokovanih kampilobakterima u SDŽ 2021. godine je povezana s demografskim obilježjima i mjestom stanovanja bolesnika.
2. Mjesečni broj izolata *Campylobacter* spp. povezan je s klimatskim uvjetima karakterističnim za određeno doba godine.
3. Učestalost kampilobaktera otpornih na pojedine antibiotike (naročito tetraciklin i ciprofloksacin) je u porastu u usporedbi s rezultatima iz prethodnih istraživanja na području SDŽ.

5. MATERIJALI I METODE

5.1. Ispitanici

Istraživanjem su bili obuhvaćeni svi bolesnici kojima je u razdoblju od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2021. godine, u NZJZ SDŽ Split izolirana bakterija *Campylobacter* iz uzorka stolice.

Kriteriji uključenja:

- ✓ bolesnici u čijem je uzorku stolice dokazan *Campylobacter* tijekom 2021. godine
- ✓ bolesnici koji su upućeni iz ordinacija primarne zdravstvene zaštite (ambulantni bolesnici),
- ✓ mjesto stanovanja bolesnika u SDŽ
- ✓ pripadnici oba spola,
- ✓ pripadnici svih dobnih skupina.

Kriteriji isključenja u ovom istraživanju:

- ✓ mjesto stanovanja izvan SDŽ,
- ✓ ponavljani izolati kampilobaktera (tzv. *copy strains*) izolirani kod istog bolesnika

5.2. Opis provedenog dijagnostičkog postupka

Prije samog dijagnostičkog postupka, pacijente je potrebno uputiti na pravilno uzorkovanje stolice. Defekaciju je potrebno izvršiti u čistoj i suhoj noćnoj posudici, a potom dio uzorka prenijeti u plastičnu posudicu žličicom koja je spojena na čep čašice za uzorkovanje. Uzorak stolice dane na testiranje treba biti svjež, ne smije biti kontaminiran urinom, vodom, toaletnim papirom ili drugim sredstvima. Potrebno je uzeti 3 žličice materijala kako bi posudica bila dopola ispunjena. Prije i poslije rukovanja savjetuje se oprati ruke.

Od dostavljenog uzorka napravi se Gram preparat, a potom se uzorak stolice nasijava na Karmali agar metodom iscrpljivanja. Inkubacija traje 48 sati, a provodi se pri 42 °C u mikroaerofilnim uvjetima koji se postižu stavljanjem vrećice „GENboxmicroaer“ (Oxoid) u lonac za inkubaciju.

Po završetku inkubacije radi se probir suspektnih kolonija te Gram preparat i biokemijski testovi. Test oksidaze provodi se na način da se na filter papir kapne komercijalno pripremljen oksidaza reagens te se zatim vrhom eze umiješa suspektna kultura. Brzom pojavom ljubičaste reakcije dokazuje se prisustvo roda *Campylobacter*. Ovi mikroorganizmi sadržavaju enzim citokrom-oksidadu što rezultira obojenjem. S druge strane, test hipurične kiseline radi se tako da se u otopinu hipurične kiseline inokulira čista kultura kampilobaktera te se inkubira 2 sata pri 37 °C. Dodaje se ninhidrin, a pojava intenzivne ljubičaste boje tijekom 5 minuta signalizira pozitivan test. Sposobnost hidrolize hipurata svojstvena je isključivo za *C. jejuni* te se time isključuje prisutnost svih ostalih vrsta roda *Campylobacter*.



Slika 3. Pozitivan test oksidaze (fotografirano u zgradi NZJZ SDŽ u Splitu, 22. studenoga 2021.)



Slika 4. Pozitivan test hidrolize hipurične kiseline (fotografirano u zgradi NZJZ SDŽ u Splitu, 24. studenoga 2021.)

Za potpuniju identifikaciju ostalih vrsta roda *Campylobacter* izvode se drugi biokemijski testovi poput „apiCampy“ testa (bioMerieux, Francuska). Test se sastoji od plastičnog podloška na koji je pričvršćen niz od 10 mikroepreveta s različitim reagensima unutar svake od njih. Kultura kampilobaktera suspendira se u destiliranoj vodi te se ukapa u mikroeprevete. Potom se očitavaju rezultati koji se interpretiraju slijedeći upute proizvođača. Konačna identifikacija soja vrši se pomoću „Api Lab“ (bioMerieux, Francuska) računalnog programa.



Slika 5. Prikaz „apiCampy“ niza nakon dodatka suspendirane kulture *Campylobacter* (fotografirano u zgradi NZJZ SDŽ u Splitu, 25. Studenoga 2021.)

5.3. Ispitivanje antibiotske osjetljivosti

Nakon dokaza vrste uzročnika, za svaki izolat je potrebno napraviti test osjetljivosti na antibiotike disk difuzijskom metodom po Kirby – Baueru. Ova metoda ujedno je najčešći način određivanja antibiotske osjetljivosti bakterija.

Ezom se iz ispitivanog soja nasadenog na Karmali agar 'pikiraju' čiste kolonije te se potom subkultiviraju na Columbia krvnom agaru s kojeg se priprema standardizirana suspenzija pomoću sterilne fiziološke otopine. Gustoća standardizirane suspenzije treba iznositi 0,5 McFarlanda. Sterilni bris se potom namoči pripremljenom suspenzijom, ocijedi se višak tekućine, te se suspenzija prenese

na površinu krvnog Mueller-Hinton agra. Krvni Mueller-Hinton agar je standardizirana podloga za izradu antibiograma te se na nju poslije dodatka suspenzije stavljaju komercijalni papirnati diskovi prethodno natopljeni određenom količinom antibiotika. Oni se na podlogu mogu nanijeti pincetom ili pomoću dispenzora te razmak među njima treba biti minimalno 20 milimetara. Podloga skupa s natopljenim diskovima se potom inkubira u termostatu 18-24 sata, pri 35-37°C.

Tijekom inkubacije, odvija se difuzija antibiotika s diska u podlogu. Ovisno o djelotvornosti antibiotika dolazi do inhibicije porasta kultura bakterija na području oko diska. Bakterije će rasti tek na onoj udaljenosti od diska gdje je koncentracija antibiotika premala te samim time nedjelotvorna. Područje na površini podloge na kojoj ne dolazi do rasta bakterija zbog blizine diska natopljenog antibiotikom naziva se zonom inhibicije. Zona inhibicije poprima kružni oblik zbog diska te joj se može izmjeriti promjer (u milimetrima). Taj promjer označava se kao promjer inhibicije te svjedoči o učinkovitosti antibiotika na izoliranu bakteriju (37).



Slika 6. i slika 7. Prikaz disk difuzijske metode po Kirby-Baueru; rezultat osjetljivosti na antibiotike nakon provedene inkubacije (fotografirano u zgradi NZJZ SDŽ u Splitu, 25. Studenoga 2021.)

Prema veličini promjera zone inhibicije, testirani se soj svrstava u jednu od tri kategorije prema europskim standardima:

1. Rezistentan ili otporan (oznaka R) – antibiotik uopće ne djeluje na soj, čak ni kad je primijenjen u maksimalnim dopuštenim koncentracijama.
2. Intermedijarno osjetljiv ili umjereno osjetljiv (oznaka I) – antibiotik ima terapijski učinak na soj, ali to se postiže samo maksimalnim dopuštenim doziranjem.
3. Osjetljiv (oznaka S) – antibiotik postiže terapijski učinak na soj u srednjim ili prosječnim dozama (37, 38).

Soj se razvrstava u neku od 3 navedene kategorije prema propisanim europskim smjernicama od strane EUCAST-a. U smjernicama je navedena korelacija između osjetljivosti soja na pojedini antibiotik (pojedine kategorije) i veličine promjera zone inhibicije izražene u milimetrima (39).

U ovom istraživanju rađeno je i dodatno testiranje antibiotske osjetljivosti prema američkoj studiji Schiaffino i suradnika iz 2019. godine (55). Dolje prikazana Tablica 1. predočava uvjete za svrstavanje ispitivanog soja u neku od 3 kategorije osjetljivosti na antibiotike. Ispitani antibiotici su augmentin (AUG), eritromicin (E), gentamicin (GM), tetraciklin (T), ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO) i cefazolin (CZ).

Tablica 1. Interpretacija testa osjetljivosti *Campylobacterspp.* na antibiotike

	Promjer zone (mm)			Komentar
	S ≥	I	R ≤	
Amoksicilin + klavulanska kiselina (AUG)	18	14-17	13	
Eritromicin, <i>C. jejuni</i> (E)	20		20	
Eritromicin, <i>C. coli</i> (E)	24		24	
Gentamicin (GM)	15	13-14	12	
Tetraciklin (T)	30		30	
Ciprofloksacin (CIP)	50		26	
Ceftriakson (CRO)	23	20-22	19	
Cefazolin (CZ)	Postoji zona inhibicije porasta		Nema zone inhibicije porasta	Dijagnostički disk – ne koristi se za kliničku interpretaciju

5.4. Geografska podjela

U ovom istraživanju provedena je podjela Splitsko-dalmatinske županije na 3 geografska područja. Korištena metoda je već opisana u prethodnom istraživanju doc. dr. sc. Merice Carev, dr. med. na istom području (3). Na temelju izračuna gustoće stanovništva i zračne udaljenosti od županijskog centra, gradovi i općine u županiji su smješteni u neku od 3 definirane zone:

1. Urbano područje (> 500 stanovnika/km², < 5 km udaljenosti od centra Splita) - grad Split.
2. Suburbano područje (150-500 stanovnika/km², 5-30 km udaljenosti od centra Splita) - Solin, Dugopolje, Kaštela, Trogir, Podstrana, Omiš, Makarska.
3. Ruralno područje (< 150 stanovnika/km², > 30 km udaljenosti od centra Splita) - Sinj, Vrljika, Imotski, Vrgorac, otoci Brač, Hvar, Vis.

5.5 Statističke metode

U analizi podataka korištene su metode opisne i inferencijalne analitike. Social Science Statistics (60) i VassarStats (61) su internetske stranice korištene za statističku analizu.

Statistički značajne razlike u učestalosti kampilobakterioza prema spolu i geografskim područjima, te razlike u stopama otpornosti izolata kampilobaktera na antibiotike uz interval pouzdanosti od 95% su se računale korištenjem Pearsonovog hi-kvadrat testa. Sve statistički značajne razlike su prikazane na razini značajnosti $p < 0,05$.

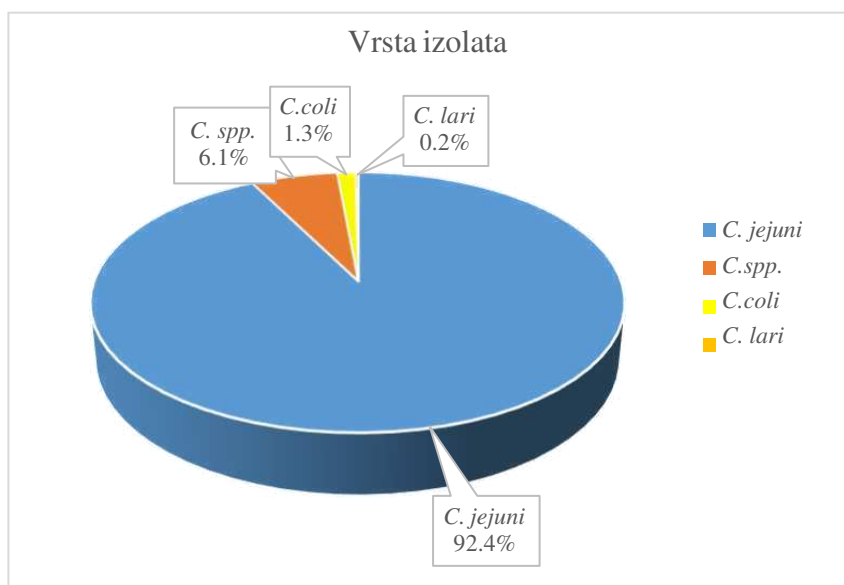
5.6. Etička načela

Tijekom provedbe istraživanja pridržavali smo se načela koja imaju izvorište u Helsinškoj deklaraciji.

6. REZULTATI

6.1. Raspodjela ispitanika s obzirom na vrstu izolata

U Splitsko-dalmatinskoj županiji je iz dijarealnih uzoraka stolice ambulantnih bolesnika tijekom 2021. godine izolirano 395 sojeva kampilobaktera. Od ukupnog broja izolata, izolirana su 365 (92,4%) izolata *Campylobacter jejuni*, 24 (6,1%) izolata *Campylobacter* spp., 5 (1,3%) izolata *Campylobacter coli*, i 1 (0,2%) izolat *Campylobacter lari*. Slika 8. prikazuje raspodjelu i učestalost pojedinih vrsta kampilobaktera u ambulantnih bolesnika u SDŽ u 2021. godini.

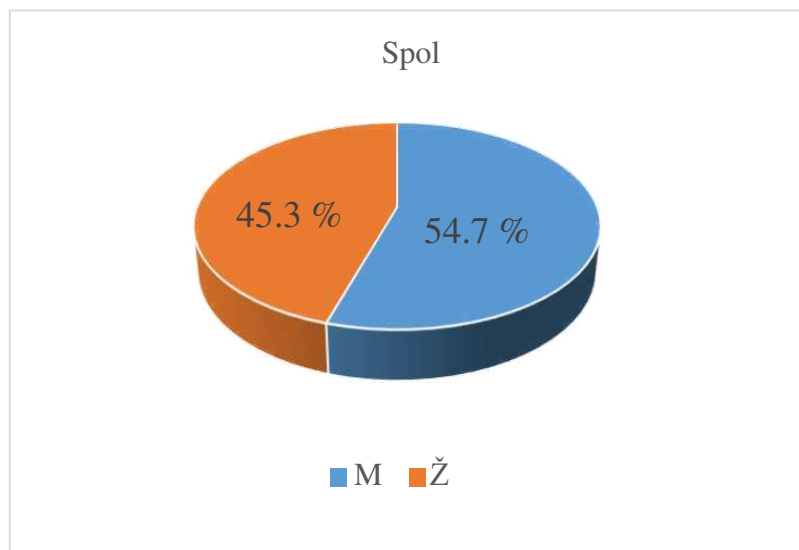


Slika 8. Učestalost vrsta *Campylobacter* spp. u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini

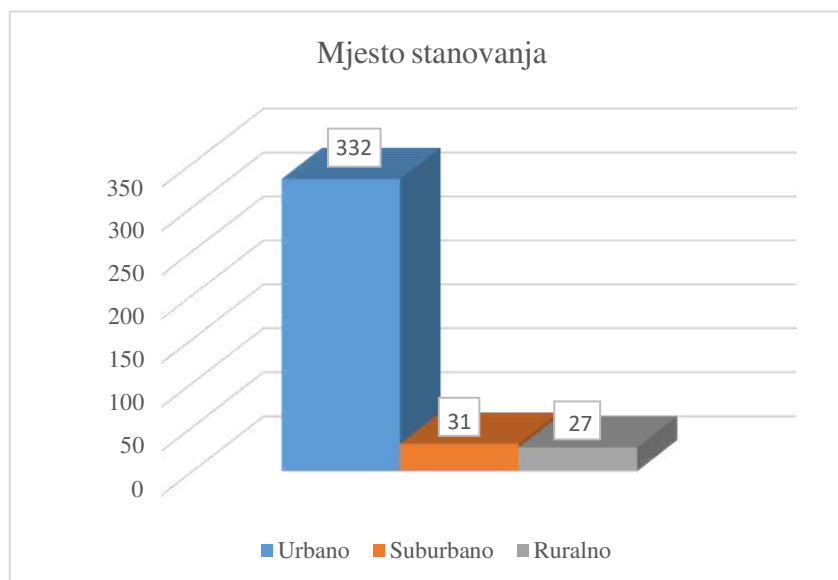
6.2. Socio-demografska obilježja bolesnika

Medijan dobi (Md) oboljelih iznosio je 23 uz interkvartilni raspon (IQR) 5-43. Analizom demografskih obilježja je utvrđeno kako su bakterije roda *Campylobacter* izolirane u 179 (45,3%) žena i 216 (54,7%) muškaraca (Slika 9.), odnosno kampilobakterioze u SDŽ su bile statistički značajno češće u muškaraca ($\chi^2 = 6,89$; $p < 0,01$).

Na slici 10. je grafički prikazana raspodjela ambulantnih bolesnika s kampilobakteriozom u SDŽ tijekom 2021. godine prema mjestu stanovanja. Najveći broj oboljelih, 332 (85,1%) je živio u urbanom području (Split), njih 31 (8%) u suburbanom (Solin, Kaštela, Makarska, Omiš, Trogir, Dugi Rat), a 27 (6,9%) u ruralnom području (Sinj, Imotski, Vrgorac, otoci). Za petoro bolesnika je nedostajao podatak o mjestu stanovanja.



Slika 9. Raspodjela ambulantnih bolesnika s kampilobakteriozom u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini prema spolu



Slika 10. Raspodjela ambulantnih bolesnika s kampilobakteriozom u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini prema mjestu stanovanja

Tablica 2. prikazuje usporedbu broja oboljelih prema geografski definiranim područjima, to jest mjestu stanovanja. Utvrđena je statistički značajna razlika između uspoređenih područja (urbanog i suburbanog, urbanog i ruralnog, ali i suburbanog i ruralnog).

Tablica 2. Prikaz usporedbe broja oboljelih prema geografski definiranim područjima.

		P vrijednost
Urbano	Suburbano	
332	31	<0,01
Urbano	Ruralno	
332	27	<0,01
Suburbano	Ruralno	
31	27	<0,05

*Hi-kvadrat test, $P < 0.05$ (statistički značajno)

*<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>

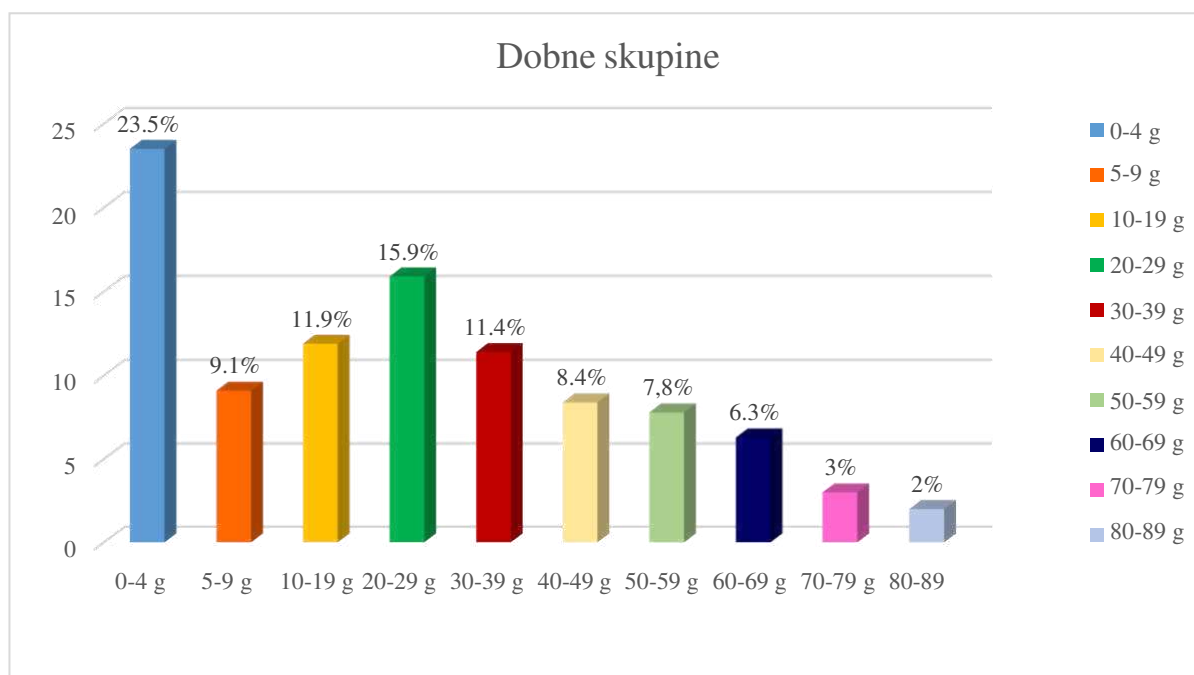
Tablica 3. prikazuje broj oboljelih od kampilobakterioze prema spolu i mjestu stanovanja. Nije utvrđena statistički značajna razlika prema mjestu stanovanja između muškaraca i žena ($P > 0.05$).

Tablica 3. Prikaz broja oboljelih prema spolu i mjestu stanovanja

Područje	Broj izolata		P vrijednost
	M	Ž	
Urbano	186	146	0.508*
Suburbano	14	17	
Ruralno	15	12	
Ukupno SDŽ	215	175	

*Hi-kvadrat test, $P < 0.05$ (statistički značajno)

Na slici 11. se nalazi grafički prikaz raspodjele ispitanika prema dobnim skupinama. U raspodjeli prema dobnim skupinama je vidljivo da je učestalost infekcija bila najveća u dobnim skupinama od 0 do 4 godine (23,5%), 20 do 29 godina (15,9%), 10 do 19 godina (11,9%) i 30 do 39 godina (11,4%). Najmanje oboljelih zabilježeno je u dobnim skupinama 80 do 89 godina (2%) i 70 do 79 godina (3%) (Slika 11., Tablica 4.).

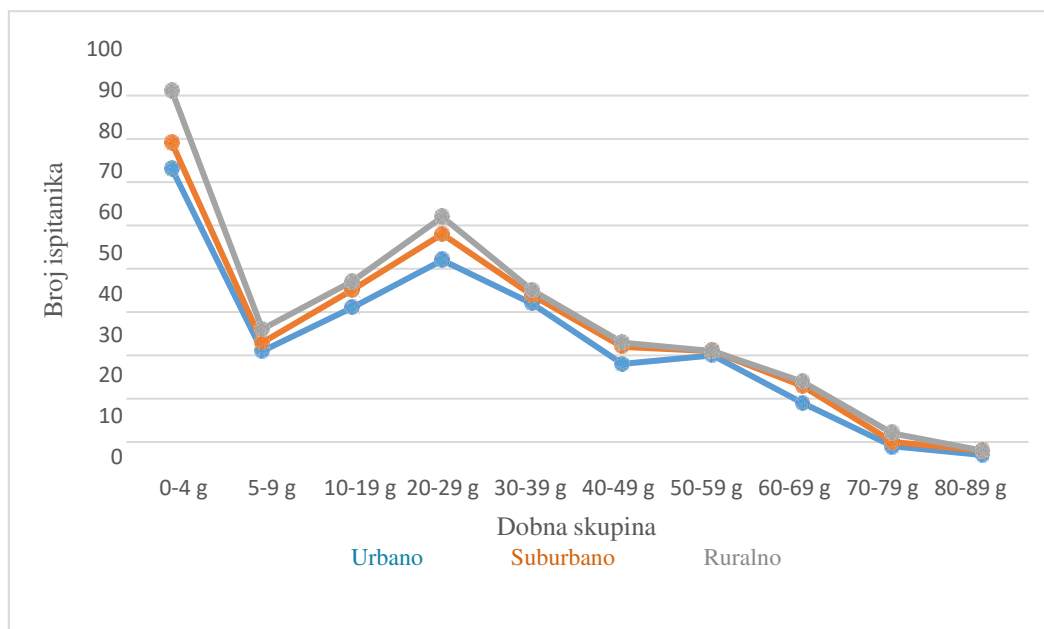


Slika 11. Raspodjela ispitanika po dobnim skupinama

Tablica 4. Prikaz raspodjele ambulantnih bolesnika prema dobnim skupinama i mjestu stanovanja.

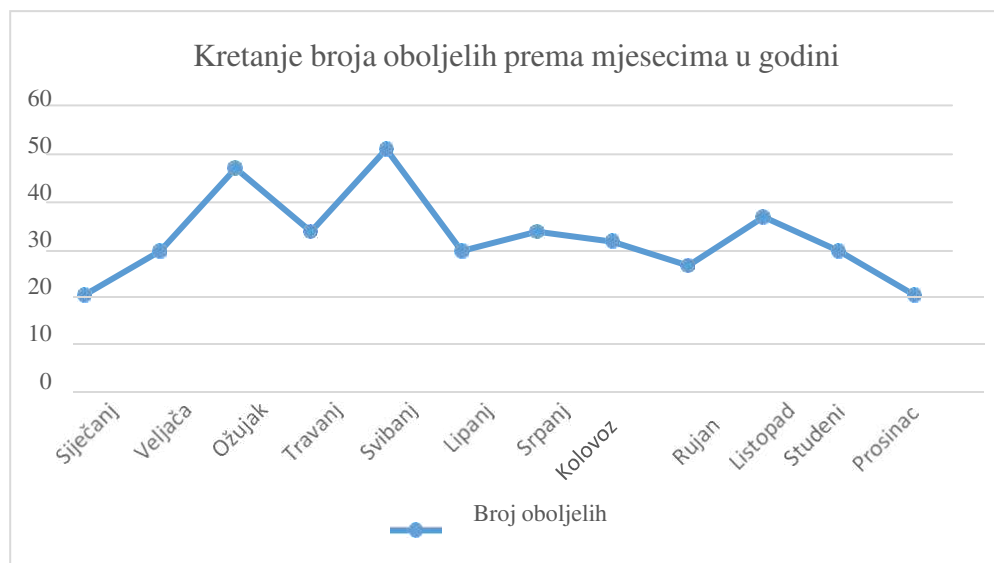
Dobna skupina	Mjesto boravka			Ukupno
	Urbano	Suburbano	Ruralno	
0-4 godine	73	6	12	91
5-9 godina	31	2	3	36
10-19 godina	41	4	2	47
20-29 godina	52	6	4	62
30-39 godina	42	2	1	45
40-49 godina	28	4	1	33
50-59 godina	30	1	0	31
60-69 godina	19	4	1	24
70-79 godina	9	1	2	12
80-89 godina	7	1	0	8
Ukupno	332	31	26	389

Slika 12. i tablica 4. prikazuju raspodjelu ambulantnih bolesnika prema dobnim skupinama i mjestu stanovanja. Vidljivo je kako je na svim područjima stanovanja zabilježen približno jednak broj oboljelih od kampilobakterioza u određenoj dobnj skupini.



Slika 12. Raspodjela kampilobakterioza u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini prema dobnim skupinama i mjestu stanovanja

Slika 13. prikazuje raspodjelu broja oboljelih prema mjesecima tijekom 2021. godine. Najveća pojavnost infekcije zabilježena je u razdoblju od ožujka do listopada, s vrhuncem u svibnju, a najmanje infekcija je bilo tijekom siječnja, rujna i prosinca 2021. godine.



Slika 13. Raspodjela broja oboljelih od kampilobakterioza u Splitsko – dalmatinskoj županiji prema mjesecima tijekom 2021. godine

6.3. Osjetljivost izolata *Campylobacter* spp. na antibiotike

Ukupno 366 (92,7%) izolata kampilobaktera je testirano na antibiotike: amoksisicilin–klavulanat (AUG), cefazolin (CZ), eritromicin (E), azitromicin (AZM), gentamicin (GM), tetraciklin (T) i na dijagnostički disk cefazolin (CZ). Osjetljivost na antibiotike nije bilo moguće testirati za 29 (7,3%) izolata jer nije poraslo dovoljno mikrobiološke kulture ili nije uspjela subkultivacija tih izolata. U tablici 5. prikazana je otpornost pojedinih vrsta izolata kampilobaktera na antibiotike.

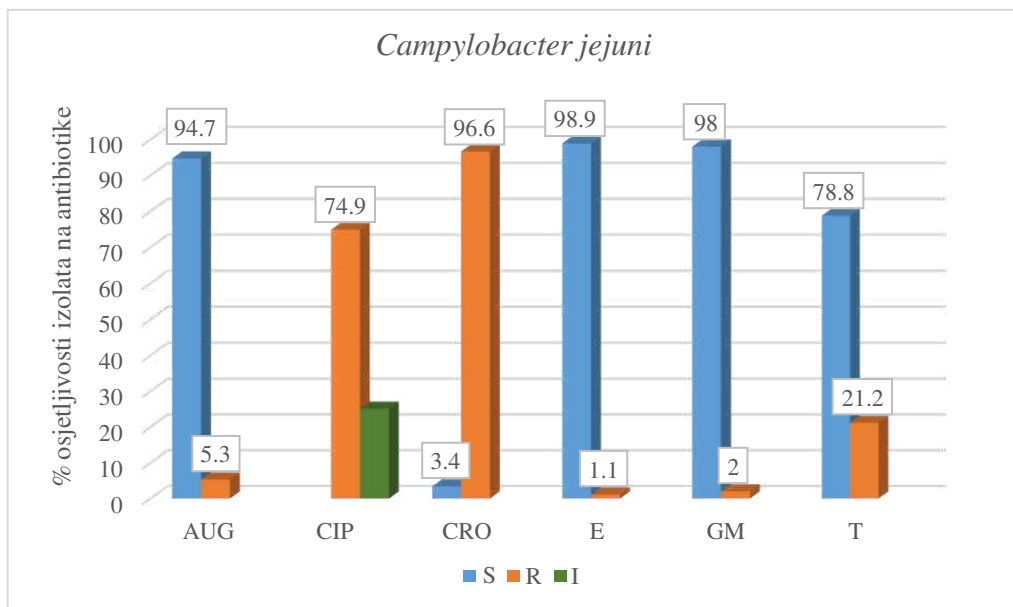
Tablica 5. Prikaz rezistencije izolata na antibiotike

Broj i udio izolata <i>Campylobacter</i> spp. otpornih prema antibioticima (n=366)								
Testirani izolati	AUG	AZM	CIP	CRO	CZ	E	GM	T
<i>C.jejuni</i> (358)	19 (5,3%)	4 (1,1%)	268 (74,8%)	346 (96,6%)	329 (91,9%)	4 (1,1%)	7 (2%)	76 (21,2%)
<i>C.spp.</i> (2)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. coli</i> (5)	0 (0%)	0 (0%)	3 (60%)	5 (100%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (40%)
<i>C.lari</i> (1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Grafički ćemo prikazati samo osjetljivost izolata na amoksisilin-klavulanat (AUG), ceftriakson (CRO), ciprofloksacin (CIP), eritromicin (E), tetraciklin (T) i gentamicin (GM), kako je i preporučeno EUCAST smjernicama (39) i radom Schiaffino i suradnika (55).

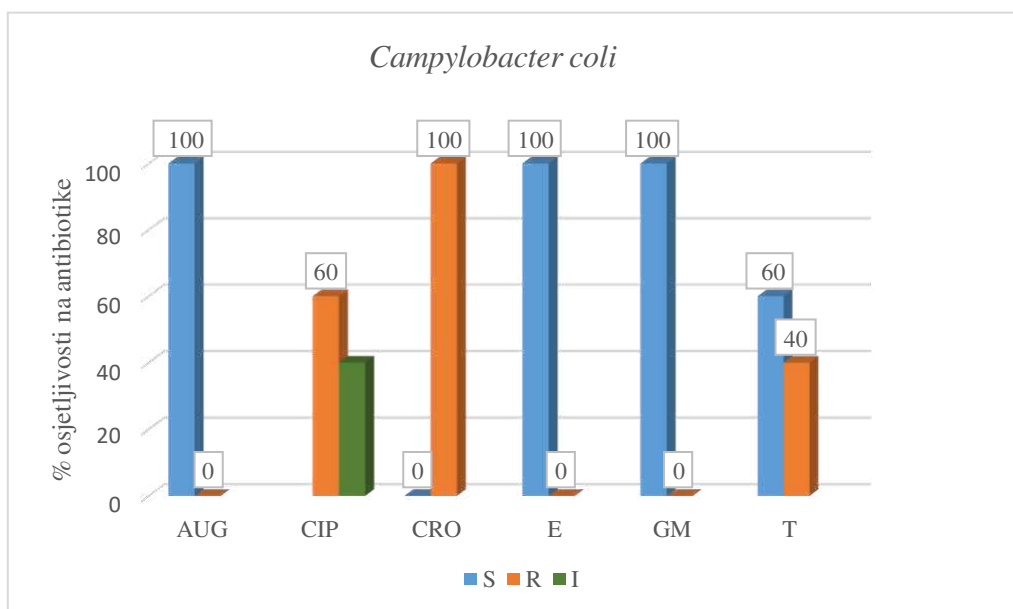
Testiranje na cefazolin (CZ) je rađeno u dijagnostičke svrhe (dokaz intrinzičke rezistencije izolata), a osjetljivost na azitromicin (AZM) je očitavana prema rezultatu za eritromicin (E) (39).

Slika 14. prikazuje osjetljivost izolata *Campylobacter jejuni* na antibiotike. Dokazana je visoka otpornost izolata *Campylobacter jejuni* na ceftriakson (CRO) i ciprofloksacin (CIP), a umjereno visoka otpornost tih izolata na tetraciklin (T). Osjetljivost izolata *Campylobacter jejuni* na eritromicin (E), azitromicin (AZ), gentamicin (GM) i amoksisilin-klavulanat (AUG) je bila dobra (Tablica 5., Slika 14.).



Slika 14. Osjetljivost izolata *Campylobacter jejuni* na antibiotike (n=358)

Slika 15. prikazuje osjetljivost izolata *Campylobacter coli* na antibiotike. Na grafikonu se može primjetiti visoka otpornost izolata na ciprofloksacin (CIP) i ceftriakson (CRO) te umjereno visoka otpornost na tetraciklin (T). Osjetljivost izolata na amoksisicilin-klavulanat (AUG), eritromicin (E), azitromicin (AZ) i gentamicin (G) je bila visoka (Tablica 5., Slika 15.).



Slika 15. Osjetljivost izolata *Campylobacter coli* na antibiotike (n=5)

Tablica 5 prikazuje osjetljivost izolata *Campylobacter lari* na antibiotike. Vidljiva je visoka otpornost izolata na ciprofloksacin (CIP) i ceftriakson (CRO), ali i zadovoljavajuća osjetljivost na amoksisilin–klavulanat (AUG), eritromicin (E), azitromicin (AZ), gentamicin (GM) i tetraciklin (T).

U tablici 5 je i prikaz osjetljivosti izolata *Campylobacter spp.* na antibiotike. Zamijećena je značajna otpornost izolata na ceftriakson (CRO) te umjereno visoka otpornost na ciprofloksacin (CIP). Osjetljivost izolata na amoksisilin–klavulanat (AUG), eritromicin (E), azitromicin (AZ), gentamicin (GM) i tetraciklin (T) bila je dobra.

6.4. Prikaz dvostruko, trostruko i višestruko rezistentnih izolata

Ukupni broj dvostruko rezistentnih izolata na ciprofloksacin (CIP) i tetraciklin (T) iznosio je 71 (19,4%), a broj trostruko rezistentnih na ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (T) i eritromicin (E) 3 (0,8%) od ukupnog broja testiranih izolata (N=366).

Campylobacter jejuni bio je dvostruko rezistentan na ciprofloksacin (CIP) i tetraciklin (T) u 69 (19,3%), a trostruko rezistentan na ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (T) i eritromicin (E) u 3 (0,8%) ispitanika, dok je za *Campylobacter coli* broj dvostruko rezistentnih na ciprofloksacin (CIP) i tetraciklin (T) bio 2 (40%), a broj trostruko rezistentnih na ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (T) i eritromicin (E) 0. Kod *Campylobacter spp.* i *Campylobacter lari* nisu zabilježeni dvostruko (na ciprofloksacin (CIP) i tetraciklin (T)) ili trostruko rezistentni (na ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (T) i eritromicin (E)) izolati niti u jednog ispitanika.

Također je promatran broj višestruko rezistentnih izolata na amoksisilin–klavulanat (AUG) te broj višestruko rezistentnih na gentamicin (GM). Navedeno je podrazumijevalo rezistenciju na amoksisilin–klavulanat (AUG) ili gentamicin (GM) uz rezistenciju na još dva ili više antibiotika. Broj višestruko rezistentnih izolata koji uključuju rezistenciju na amoksisilin–klavulanat (AUG) bio je 19 (5,2%), a broj višestruko rezistentnih izolata koji uključuju rezistenciju na gentamicin (GM) 7 (1,9%) od ukupnog broja testiranih izolata (N=366). Broj izolata rezistentnih na amoksisilin–klavulanat (AUG), ciprofloksacin (CIP) i ceftriakson (CRO) iznosio je 15 (7,65%); broj izolata rezistentnih na amoksisilin–klavulanat (AUG), ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO) i tetraciklin (T) iznosio je 3 (0,81%); broj izolata rezistentnih na amoksisilin–klavulanat (AUG),

azitromicin (AZM), ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO) i eritromicin (E) 1 (0,27%). Broj izolata rezistentnih na gentamicin (GM), i ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO), iznosio je 4 (1,09%); broj izolata rezistentnih na gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO) i tetraciklin (T) 1 (0,27%); broj izolata rezistentnih na gentamicin (GM), azitromicin (AZM), ciprofloksacin (CIP), ceftriakson (CRO), eritromicin (E) i tetraciklin (T) 1 (0,27%); broj izolata rezistentnih na gentamicin (GM), azitromicin (AZM) i eritromicin (E) iznosio je 1 (0,27%).

Gledajući razdiobu prema vrsti izolata može se primjetiti da su višestruko rezistentni izolati zabilježeni su samo među izolatima *Campylobacter jejuni* koji je u 19 (5,3%) ispitanika bio višestruko rezistentan s rezistencijom na augmentin (AUG), u 9 (2,5%) ispitanika višestruko rezistentan sa rezistencijom na gentamicin (GM).

Prikaz dvostruko, trostruko i višestruko rezistentnih izolata nalazi se u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz dvostruko, trostruko i višestruko rezistentnih izolata

Testirani izolati	Dvostruko rezistentni (CIP i T)	Trostruko rezistentni (CIP, T i E)	Višestruko rezistentni sa rezistencijom na AUG	Višestruko rezistentni sa rezistencijom na GM
<i>C. jejuni</i> (358)	69 (19,3%)	3 (0,8%)	19 (5,3%)	7 (2%)
<i>C. spp.</i> (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. coli</i> (5)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. lari</i> (1)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ukupno (366)	71 (19,4%)	3 (0,8%)	19 (5,2%)	7 (1,9%)

7. RASPRAVA

Ukupan broj izoliranih sojeva roda *Campylobacter* iz uzoraka stolice ambulantnih bolesnika na području Splitsko-dalmatinske županije u 2021. godini iznosio je 395. U usporedbi s prijašnjim istraživanjem na tom području (3) nije došlo do značajnijih promjena u broju laboratorijski potvrđenih kampilobakterioza u ambulantnih bolesnika na godišnjoj razini. Najčešći uzročnik ovih bolesti je *Campylobacter jejuni*, uz neznatan broj izolata *Campylobacter lari* i *Campylobacter coli* te ostalih izolata roda *Campylobacter*. Infekcije su bile značajno češće kod muškaraca nego kod žena. Najčešće su oboljevale osobe koje žive u urbanim područjima te osobe u dobnim skupinama 0-4 godine i 20-29 godina. Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterom zabilježen je u razdoblju od ožujka do listopada s vrhuncem u svibnju, to jest u proljetnim mjesecima.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je među kampilobakterima najčešći uzročnik enteritisa u Splitsko-dalmatinskoj županiji *Campylobacter jejuni*, a potom *Campylobacter coli* što je u skladu s podacima o učestalosti kampilobakterioza ostalih europskih zemalja (41). Nije neuobičajena i veća pojavnost kampilobakterioza kod pripadnika muškog spola. Slični rezultati bili su vidljivi i u prethodnim istraživanjima na drugim područjima (42).

Činjenica da stanovništvo u urbanom području značajno češće oboljeva nego stanovništvo u suburbanim i ruralnim područjima stanovništva sugerira mogućnost da je urbano stanovništvo puno izloženije zarazama bakterijama roda *Campylobacter*. Slični rezultati koji pokazuju pretežitu urbanu raspodjelu ove bolesti uočeni su i na drugim područjima poput Danske (43) ili Njemačke (44), ali i u prethodnim istraživanjima na području Splitsko-dalmatinske županije (23). Veća izloženost kampilobakteriozama stanovništva urbanih područja često se povezuju s pretjeranom konzumacijom nezdrave, brze hrane, koja može biti nedovoljno termički obrađena (naročito meso peradi) te samim time i potencijalni izvor zaraze (45). U posljednje vrijeme sve se više odgovornosti za ovakve ishode pripisuje i brojnim dostavljačkim uslugama, koje su za vrijeme pandemije postale češće korištene (46). Sam proces dostave nerijetko uključuje nehigijenske uvjete prijenosa hrane i veliki broj posrednika što dodatno povećava rizik. Još jedan od potencijalnih čimbenika koji doprinose takvom rezultatu jest i držanje kućnih ljubimaca. Ljudi u urbanim područjima se sve više odlučuju na kućanski suživot s ljubimcima. Životinjski kontakt je također potencijalni put transmisije kampilobaktera, a samim time i kontakt s kućnim ljubimcima (47).

U usporedbi s prethodnim istraživanjem Carev i suradnika (23), ponovno je zabilježena statistički značajna razlika u broju infekcija između suburbanih i ruralnih područja ($p < 0,05$). Ova pojava može se pokušati objasniti činjenicom kako je za vrijeme istraživanja pandemija koronavirusa i dalje bila aktualna te su ljudi bili primorani boraviti kući, a samim time i rjeđe konzumirati hranu pripremljenu u lancima brze prehrane koji su uglavnom locirani u urbanim područjima. Također, tijekom pandemije su se ljudi striktnije pridržavali mjera osobne higijene, higijene ruku i površina što općenito pridonosi smanjenju broja infekcija koje se prenose hranom (59). Dodatno, ljudi u ruralnim područjima žive u izoliranim domaćinstvima, na većoj geografskoj udaljenosti što doprinosi socijalnoj distanci, a time i manjoj izloženosti prijenosu zaraznih bolesti. Međutim, potrebna su dodatna epidemiološka istraživanja za dobivanje relevantnijih objašnjenja o epidemiologiji kampilobakterioze.

Infekcije bakterijama roda *Campylobacter* u ambulantnih bolesnika u SDŽ su bile najčešće u dobnoj skupini 0-4 godine. Udio godišnjih zaraza u ovoj dobnoj skupini u 2021. godini je iznosio 23,5% , a može se objasniti nerazvijenom imunošću bolesnika te dobi (48). Tu pretpostavku dodatno potkrepljuju gotovo izjednačeni udjeli oboljelih, koji su zabilježeni isključivo u dobnoj skupini 0-4 godine u urbanim, suburbanim i ruralnim područjima Splitsko-dalmatinske županije (Tablica 4, Slika 12). Nedovoljno razvijena imunost kod pripadnika ove dobne skupine čini ih vulnerabilnijima i prema ostalim izvorima infekcije kampilobakterom. Ovi rizični čimbenici uključuju: igranje u pješčanicima, kontakt s domaćim životinjama i kućnim ljubimcima koji imaju proljev, pijenje vode iz rijeka, jezera i bunara (3). Druga po učestalosti infekcija je dobna skupina 20-29 godina s udjelom od 15,9%. oboljelih u 2021. godini. Danska studija (43) sugerira da se takva otkrića mogu pripisati nedovoljnom znanju rukovanja hranom što uključuje i nedovoljnu termičku obradu hrane. U ovoj dobnoj skupini često započinje život izvan obiteljskog doma što je nerijetko povezano s nesigurnim rukovanjem hranom, kao i prehranom iz lanaca brze hrane. Također, u ovoj dobi nerijetko započinje i roditeljstvo koje je povezano s transmisijom uzročnika zaraze s djeteta na roditelje (44). U istraživanju je zabilježen pad broja zaraženih od mlađih prema starijim dobnim skupinama što vjerojatno odražava stjecanje imunosti nakon preboljene infekcije ranije u životu (48,49).

Povećan broj izolata roda *Campylobacter* u razdoblju od ožujka do listopada, s vrhuncima u ožujku i svibnju vjerojatno je povezan s toplijim vremenskim prilikama na području Splitsko-dalmatinske županije. Ovakvi rezultati podudaraju se s prijašnjim istraživanjima na ovom području (3, 40) što sugerira sezonsku prirodu bolesti. Ovo se može objasniti pojavom ljepšeg vremena karakterističnog za proljetno i predljetno razdoblje koje potiče ljudski boravak i socijalne aktivnosti na otvorenom. Plivanje, obiteljska i prijateljska okupljanja, priprema roštilja i ostale aktivnosti u prirodi mogu povisiti izloženost kampilobakterima iz okolišnih izvora i kontaminiranih voda (50). U ovo doba godine, obično je povećana i učestalost različitih svečanosti i obiteljskih okupljanja tijekom kojih se konzumira masovno pripremljena hrana, primjerice prvih pričesti, krizmi i vjenčanja, što sve može pridonijeti riziku zaraze (51). Postoje i drugi okolišni čimbenici koji utječu na ovaj rezultat, a nevezani su uz ljudsko ponašanje. Transmisija kampilobaktera u tom razdoblju omogućena je i putem mušica (43), no isto tako najveća količina uzoraka mesa peradi pozitivnih na kampilobakter zabilježena je upravo u tom proljetnom razdoblju (52).

Na području Splitsko-dalmatinske županije zabilježen je porast izolata *Campylobacter jejuni* otpornih na ciprofloksacin. Ovo je vidljivo iz usporedbe s prethodnim istraživanjima na istom području iz 2010. godine kada je 26% od ukupno 50 bolesničkih izolata pokazalo rezistenciju na ciprofloksacin (40) te iz istraživanja 2012. – 2013. godine kada je 63% ukupnih izolata pokazalo otpornost na navedeni antibiotik (3). U ovom istraživanju udio rezistentnih izolata *Campylobacter jejuni* na ciprofloksacin iznosio je 76,3%, što predstavlja statistički značajan porast otpornosti ($\chi^2=21,17$; $p < 0,01$). Prikazano povećanje otpornosti uklapa se u sliku otpornosti kampilobaktera na europskom nivou, gdje je također došlo do smanjene osjetljivosti na ciprofloksacin u 9 zemalja EU. Udio rezistentnih izolata *Campylobacter jejuni* na ciprofloksacin na području EU u razdoblju 2019. – 2020. godine iznosio je 61,2% (53) što područje SDŽ svrstava u kategoriju visoke rezistencije. Zamjetno je i povećanje otpornosti kampilobaktera na tetraciklin ($\chi^2=5,5$; $p < 0,05$). Udio T_{CR}/Cip_R korezistentnih izolata porastao je s 4% 2010. godine (3) na 21% u 2012./2013. godini, (40) dok je u ovom istraživanju zabilježeno 19,3% korezistentnih izolata kampilobaktera te nije bilo statistički značajne razlike tih stopa u odnosu na 2012./2013. godinu ($\chi^2=0,18$; $p > 0,05$). Također, 0,8% izolata *Campylobacter jejuni* u ovoj studiji bili su trostruko rezistentni na tetraciklin, ciprofloksacin i eritromicin. Njih 2% pokazalo je i višestruku rezistenciju koja je uključivala i rezistenciju na gentamicin te 5,3% izolata višestruku otpornost na amoksisicilin-klavulanat.

Uzrok porasta udjela izolata rezistentnih na ciprofloksacin i tetraciklin izolata u odnosu na istraživanje iz 2012. godine ne može se pripisati povećanoj potrošnji antibiotika u bolesnika. Naime, potrošnja antibiotika kod ambulantnih bolesnika u RH u 2020. godini bila je najniža od početka praćenja potrošnje antibiotika 2001. godine (54). Takva spoznaja ne ide u korist pretpostavci da je povećana konzumacija antibiotika u ljudi povezana s povećanom otpornošću izolata *Campylobacter jejuni* na antibiotike.

Suprotno tome, smatra se kako životinjsko meso koje se koristi u ljudskoj ishrani ujedno predstavlja izvor zaraze kampilobakterima, a samim time omogućava transmisiju rezistentnih sojeva (55). U životinjskom uzgoju nerijetko se poseže i za uporabom antibiotika kao promotora rasta te se povećanje udjela otpornih izolata u ljudi povezuje s količinom utrošenih antibiotika pri takvim postupcima (56). Najniže stope otpornosti na antibiotike zabilježene su u zemljama gdje je uveden restriktivni pristup njihove potrošnje pri životinjskom uzgoju (57). Upravo iz ovih razloga nameće se pitanje o mogućnosti zoonotske transmisije rezistentnih sojeva, no za potvrdu tih pretpostavki su potrebna daljnja istraživanja u okviru koncepta „Jedno zdravlje“ (*engl. One Health*).

Po uzoru na američku studiju Schiaffino i suradnika (58), u ovom istraživanju je prvi put na ovom području testirana osjetljivost izolata kampilobaktera na amoksisilin–klavulanat. Svi sojevi su testirani na navedeni antibiotik, međutim samo je *Campylobacter jejuni* u udjelu 5,3% od sveukupnih izolata pokazao otpornost. Ovo predstavlja određenu, ali ne i veliku razliku u odnosu na studiju Schiaffino i suradnika prema kojoj amoksisilin–klavulanat predstavlja najučinkovitiji antibiotik za oralnu terapiju zbog niske stope rezistencije od svega 0,7%. U američkoj studiji učinkovitost amoksisilin–klavulanata ispitana je samo na sojevima *Campylobacter jejuni* za razliku od ovog istraživanja. U ovoj je studiji zanimljivo primijetiti kako su svi sojevi rezistentni na amoksisilin–klavulanat ujedno bili i višestruko rezistentni na druga 2 ili više antibiotika, ali relativno niske stope otpornosti kampilobaktera *in vitro* na ovaj antibiotik čine ga mogućim terapijskim izborom u liječenju dijela kampilobakterioza.

U ovoj studiji je po prvi puta na ovom području urađeno i testiranje osjetljivosti na antibiotike izolata *Campylobacter lari* i *Campylobacter coli*. Od 5 izolata *Campylobacter coli* uključenih u istraživanje, njih 5 je pokazalo otpornost na ceftriakson i cefazolin, njih 3 na ciprofloksacin, a 2 soja su bila rezistentna na tetraciklin. Na sve ostale antibiotike *Campylobacter coli* je pokazao

zadovoljavajuću osjetljivost. Izolat *Camyplobacter lari* je bio rezistentan na ciprofloksacin, ceftriakson i cefazolin, a na ostale antibiotike je bio osjetljiv. Osim dva izolata *Campylobacter coli* koji su bili Tc_R/Cip_R korezistentni, ostali izolati nisu pokazivali dvostruku, trostruku niti višestruku otpornost.

Međutim, testiranje antimikrobne osjetljivosti na malom broju izolata tih *non-jejuni* vrsta kampilobaktera predstavlja i ograničenje ove studije, tj. dobiveni rezultati ne mogu predstavljati osnovu za zaključke o njihovoj antimikrobnoj otpornosti, već zahtijevaju daljnja istraživanja.

Na temelju *in vitro* rezultata testiranja otpornosti kampilobaktera na antibiotike u SDŽ u 2021. godini može se zaključiti da eritromicin ostaje lijek izbora kod težih slučajeva kampilobakterioza koji zahtijevaju antibiotsko liječenje, a amoksisilin-klavulanat je, zbog niskih stopa otpornosti *in vitro*, također mogući lijek izbora u bolesnika koji zbog otpornosti na eritromicin ili drugih, kliničkih indikacija ne mogu primati eritromicin.

Učestalost ove bolesti i praćenje otpornosti izolata predstavljaju javnozdravstveni i znanstveni izazov koji zahtijeva daljnji kontinuirani nadzor i istraživanja.

8. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Tijekom 2021. godine nije bilo značajnijeg porasta broja laboratorijskih potvrđenih kampilobakterioza u odnosu na broj izolata kampilobaktera u ambulantnih bolesnika u SDŽ tijekom razdoblja 2007. – 2012. godine.
2. Najčešći uzročnik enteritisa među kampilobakterima u Splitsko-dalmatinskoj županiji 2021. godine je bio *Campylobacter jejuni*.
3. Infekcije kampilobakterom u Splitsko-dalmatinskoj županiji 2021. godine su bile češće kod muškaraca te u bolesnika dobnih skupina 0-4 i 20-29 godina.
4. Najveći broj infekcija kampilobakterom na području Splitsko-dalmatinske županije 2021. godine bio je evidentiran u razdoblju od ožujka do listopada s vrhuncima u ožujku i svibnju.
5. Najveći broj kampilobakterioza u Splitsko-dalmatinskoj županiji 2021. godine zabilježen je u urbanim područjima.
6. Primjetno je smanjenje razlike u broju infekcija između suburbanih i ruralnih područja u Splitsko-dalmatinskoj županiji 2021. godine u usporedbi s 2012./2013. godinom.
7. Utvrđen je porast otpornosti *Campylobacter jejuni* na ciprofloksacin i porast otpornosti na tetraciklin. Također, potvrđeno je i postojanje višestrukootpornih izolata.
8. Zbog niskih stopa otpornosti eritromicin ostaje lijek izbora kod onih slučajeva kampilobakterioza koji zahtijevaju antibiotsko liječenje, a amoksisilin-klavulanat je, također, zbog dokanih niskih stopa otpornosti *in vitro* u ovom istraživanju mogući lijek izbora u bolesnika koji zbog otpornosti na eritromicin ili drugih, kliničkih, indikacija ne mogu primati eritromicin.

9. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. O'Brien SJ. The consequences of *Campylobacter* infection. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017 01;33(1):14-20.
2. Kalenić S. Kampilobakter. U: Kalenić S, Mlinarić-Missioni E. Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb: A. B. D.;2005. Str. 226-7.
3. Carev M. Epidemiološke i mikrobiološko – molekularne značajke kampilobakterioza u Splitsko–dalmatinskoj županiji: 2007. – 2012. [disertacija]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2019.
4. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jul 3;32(4):e00072-18.
5. Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Aug;58(2):243-55.
6. Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:389-410.
7. Jones DM, Sutcliffe EM, Rios R, Fox AJ, Curry A. *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment. *J Med Microbiol*. 1993 Feb;38(2):145-50.
8. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Nov 26;10(12):6292-304.
9. Blaser MJ, Engberg J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. U: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, ur. *Campylobacter*. 3. Izd. Washington: ASM Press; 2008. Str. 99-121.
10. Poly F, Guerry P. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008 Jan;24(1):27-31.
11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Meitzner TA, ur. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology*. 25. Izd. New York: McGraw Hill Companies; 2010.
12. Rokosz-Chudziak N, Rastawicki W. [Frequency of antibodies to the recombinant protein P39 of *C. jejuni* in patients with gastrointestinal disorders and reactive arthritis in Poland]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2014;66(3-4):195-207.
13. Tegtmeyer N, Sharafutdinov I, Harrer A, SoltanEsmaili D, Linz B, Backert S. *Campylobacter* Virulence Factors and Molecular Host-Pathogen Interactions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2021;431:169-202.

14. Ho TW, Mishu B, Li CY, Gao CY, Cornblath DR, Griffin JW, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*. 1995 Jun;118 (Pt 3):597-605.
15. Shane SM. *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Rev Sci Tech*. 2000 Aug;19(2):376-95.
16. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):687-720.
17. Platts-Mills JA, Kosek M. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*. 2014 Oct;27(5):444-50.
18. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 2002 Mar;8(3):237-44.
19. Kovats RS, Edwards SJ, Charron D, Cowden J, D'Souza RM, Ebi KL, et al. Climate variability and campylobacter infection: an international study. *Int J Biometeorol*. 2005 Mar;49(4):207-14.
20. Jonsson ME, Chriél M, Norström M, Hofshagen M. Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. student4444ion in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med*. 2012 Nov 1;107(1-2):95-104.
21. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Food-borne *Campylobacter* bacteria [Internet]. Bruxelles, Belgija : ECDC; 2015 [pristupljeno 12.11.2022.]. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/food-borne-campylobacter-bacteria>
22. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. Godinu (web izdanje) [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021. [pristupljeno 12.11.2022.] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2021-tablicni-podaci-2/>
23. Carev M, Tonkić M, Boban N. A six-year epidemiological surveillance study in Split-Dalmatia County, Croatia: urban versus rural differences in human campylobacteriosis incidence. *Int J Environ Health Res*. 2018 Aug;28(4):407-18.
24. Carev M, Kovačić A, Novak A, Tonkić M, Jerončić A. *Campylobacter jejuni* strains coresistant to tetracycline and ciprofloxacin in patients with gastroenteritis in Croatia. *Infect Dis (Lond)*. 2017 Apr;49(4):268-76.
25. Peterson MC. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *West J Med*. 1994 Aug;161(2):148-52.

26. Lindqvist R, Lindblad M. Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. And cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jan 15;121(1):41-52.
27. Peterson MC. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *J Environ Health.* 2003 May;65(9):20-1, 24, 26.
28. Szczepanska B, Andrzejewska M, Spica D, Klawe JJ. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiol.* 2017 04 4;17(1):80.
29. Fitzgerald C, Whicard J, Nachamkin I. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* Species. U: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, ur. *Campylobacter.* 3. Izd. Washington: ASM Press; 2008. Str. 227-43.
30. Davis L, DiRita V. Growth and laboratory maintenance of *Campylobacter jejuni*. *CurrProtocMicrobiol.* 2008 Aug;Chapter 8:Unit 8A.1.1-8A.1.7.
31. Umesha S, Manukumar HM. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 Jan 2;58(1):84-104.
32. Stutman HR. *Salmonella, Shigella, and Campylobacter: common bacterial causes of infectious diarrhea.* *Pediatr Ann.* 1994 Oct;23(10):538-43.
33. Lübbert C. Antimicrobial therapy of acute 45student45: a clinical review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(2):193-206.
34. Xia Q, Muraoka WT, Shen Z, Sahin O, Wang H, Wu Z, et al. Adaptive mechanisms of *Campylobacter jejuni* to erythromycin treatment. *BMC Microbiol.* 2013 Jun 14;13:133.
35. Trajkovska-Dokic E, Mihajlov K, Mirchevska G, Kostovski M, Blazevska A, Stojkovska S. Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* isolates in the Capital of North Macedonia. *Pril (MakedonAkadNaukUmet Odd Med Nauki).* 2019 Oct 1;40(2):73-80.
36. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Development and validation of EUCAST Disk Diffusion breakpoints. [Internet] [pristupljeno 15.11.2022.] Dostupno na: <http://www.eucast.org>.
37. Tonkić M. I suradnici *Medicinska Mikrobiologija: Praktikum za vježbe za studente medicine.* Split; Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2022.

38. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020 [Internet] Surveillance report 29.3.2022. [pristupljeno 18.11.2022.]. Dostupno na: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/efs2_7209_Rev2.pdf
39. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (Verzija 12.0, valjana od 1.1.2022.) [Internet] [pristupljeno 18.11.2022.]. Dostupno na: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf
40. Jozipović D. Učestalost i osjetljivost na antibiotike uzročnika proljeva u ljudi iz roda *Campylobacter* izoliranih u KBC Split [diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2012.
41. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021Dec 13;19(12):6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
42. McCarthy ND, Gillespie IA, Lawson AJ, Richardson J, Neal KR, Hawtin PR, I sur. Molecular epidemiology of human *Campylobacter jejuni* shows association between seasonal and international patterns of disease. *Epidemiol Infect.* 2012;140(12):2247–55.
43. Kuhn KG, Nielsen EM, Mølbak K, Ethelberg S. Epidemiology of campylobacteriosis in Denmark 2000–2015. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(1):59-66.
44. Schielke A, Rosner BM, Stark K. Epidemiology of campylobacteriosis in Germany – insights from 10 years of surveillance. *BMC Infect Dis.* 2014 Jan 15;14:30. Doi: 10.1186/1471-2334-14-30. PubMed PMID: 24422983; PubMed Central PMCID: PMC3898467.
45. Strachan NJC, Rotariu O, MacRae M, Sheppard, SK, Smith-Palmer A, Cowden J, I sur. Operationalising factors that explain the emergence of infectious diseases: a case study of the human campylobacteriosis epidemic. *PloS One.* 2013 Nov 21;8(11):e79331. Doi: 10.1371/journal.pone.0079331. PubMed PMID: 24278127; PubMed Central PMCID: PMC3836786.

46. Ray LC, Collins JP, Griffin PM, Shah HJ, Boyle MM, Cieslak PR, et al. Decreased Incidence of Infections Caused by Pathogens Transmitted Commonly Through Food During the COVID-19 Pandemic – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2017-2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021 Sep 24;70(38):1332-6.).
47. Pintar KD, Christidis T, Thomas MK, Anderson M, Nesbitt A, Keithlin J, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the *Campylobacter* spp. Prevalence and Concentration in Household Pets and Petting Zoo Animals for Use in Exposure Assessments. *PloS One.* 2015;10(12):e0144976.
48. Miller G, Dunn GM, Reid TM, Ogden ID, Strachan NJ. Does age acquired immunity confer selective protection to common serotypes of *Campylobacter jejuni*? *BMC Infect Dis.* *BMC Infect Dis.* 2005 Aug 23;5:66. Doi: 10.1186/1471-2334-5-66. PubMed PMID: 16117832; PubMed Central PMCID: PMC1208888.
49. Havelaar AH, van Pelt W, Ang CW, Wagenaar JA, van Putten JP, Gross U, I sur. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(1):1-22.
50. Patrick ME, Christiansen LE, Wainø M, Ethelberg S, Madsen H, Wegener HC. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. In humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7474-80.
51. Lahti E, Löfdahl M, Ågren J, Hansson I, Olsson Engvall E. Confirmation of a Campylobacteriosis Outbreak Associated with Chicken Liver Pâté Using PFGE and WGS. *Zoonoses Public Health.* 2017 Feb;64(1):14-20.
52. Patrick ME, Christiansen LE, Wainø M, Ethelberg S, Madsen H, Wegener HC. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. In humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7474-80.
53. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020 *EFSA Journal.* 2022;20(3):7209 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
54. Tambić Andrašević A, Žmak Lj, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelec D, Bukovski S i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020. g. *Akademija medicinskih znanosti Hrvatske.* 2020; 106-43

55. Sheppard SK, Colles F, Richardson J, Cody AJ, Elson R, Lawson A, I sur. Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:5269–77.
56. Eltayb A, Barakat S, Marrone G, Shaddad S, Stålsby Lundborg C. Antibiotic use and resistance in animal farming: a quantitative and qualitative study on knowledge and practices among farmers in Khartoum, Sudan. *Zoonoses Public Health.* 2012 Aug;59(5):330-8.
57. Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2014;170(1-2):1-9.
58. Schiaffino F, Colston JM, Paredes-Olortegui M, François R, Pisanic N, Burga R, et al. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Species in a Pediatric Cohort Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Feb;63(2):e01911-18.
59. Ray LC, Collins JP, Griffin PM, Shah HJ, Boyle MM, Cieslak PR, et al. Decreased Incidence of Infections Caused by Pathogens Transmitted Commonly Through Food During the COVID-19 Pandemic – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2017-2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021 Sep 24;70(38):1332-6.
60. Stangroom J Social Science Statistics [Internet] [pristupljeno 15.11.2022.]. Dostupno na: <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>
61. Lowry R Vassarstats: website for statistical computation [Internet]. Poughkeepsie (NY): Lowry R. 2017 [pristupljeno 8.12.2022.]. Dostupno na: <http://www.vassarstats.net/>.

10. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog istraživanja je bio odrediti učestalost infekcija uzrokovanih bakterijama roda *Campylobacter* u ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji u 2021. godini, njihovu raspodjelu prema dobi, spolu, mjestu stanovanja i kalendarskim mjesecima te odrediti osjetljivost izolata *Campylobacter* spp. na antibiotike.

Materijal i metode: U istraživanju su korišteni podaci iz računalne baze podataka Odjela za dijagnostiku infekcija probavnoga sustava NZJZ SDŽ Split, a uključivali su sve bolesnike kojima je u razdoblju od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2021. godine izolirana bakterija *Campylobacter* iz uzorka stolice. Podaci su obrađeni korištenjem programskog paketa Microsoft Office 365, a za statističku analizu su korišteni programi Social Science Statistics i VassarStats.

Rezultati: Ukupan broj bakterijskih izolata *Campylobacter* spp. iz uzoraka stolice ambulantnih bolesnika na području Splitsko-dalmatinske županije u 2021. godini je iznosio 395. Najčešći izolat je bio *Campylobacter jejuni* (92,4%). Infekcije su bile značajno češće kod muškaraca nego kod žena. Najveći broj infekcija je zabilježen u dobnim skupinama 0-4 godine i 20-29 godina. Također, broj oboljelih u urbanim područjima bio je značajno veći nego u suburbanim i ruralnim područjima. Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterom je zabilježen u razdoblju od ožujka do listopada s vrhuncem u svibnju. Na području Splitsko-dalmatinske županije u 2021. godini, u odnosu na prethodna istraživanja na istom području, je zabilježen porast broja izolata *Campylobacter jejuni* otpornih na ciprofloksacin i tetraciklin, dok je udio TcR/CipR korezistentnih izolata ostao stabilan. *Campylobacter jejuni* je u udjelu od 5,3% pokazao otpornost i na amoksisicilin-klavulanat. Svi sojevi *Campylobacter jejuni* otporni na amoksisicilin-klavulanat su ujedno bili i višestruko rezistentni na druga dva ili više antibiotika. Od 5 izolata *Campylobacter coli* uključenih u istraživanje, svih 5 je pokazalo otpornost na ceftriakson i cefazolin, njih 3 na ciprofloksacin, a 2 soja su bila rezistentna na tetraciklin. Na sve ostale antibiotike *Campylobacter coli* je pokazao zadovoljavajuću osjetljivost. Izolat *Campylobacter lari* je bio rezistentan na ciprofloksacin, ceftriakson i cefazolin, a na ostale antibiotike je bio osjetljiv. Dva izolata *Campylobacter coli* su bili TcR/CipR korezistentni dok ostali izolati nisu pokazivali dvostruku ili i višestruku otpornost.

Zaključak: Epidemiološke značajke kampilobakterioza u ambulantnih bolesnika u 2021. godini su slične značajkama utvrđenim u SDŽ u prethodnim istraživanjima na ovom području, tj. pokazuju obrazac karakterističan za razvijene zemlje. Utvrđen je porast otpornosti izolata

Campylobacter jejuni na ciprofloksacin i na tetraciklin. Također, potvrđeno je i postojanje višestruko otpornih izolata *Campylobacter jejuni*, dok je otpornost tih izolata na amoksisiclin-klavulanat i eritromicin bila niska. Zabilježena je i povećana otpornost izolata *Campylobacter coli* na ceftriakson i ciprofloksacin, te umjerena otpornost na tetraciklin. S obzirom na ove *in vitro* rezultate testiranja osjetljivosti kampilobaktera na antibiotike, lijek izbora i dalje ostaje eritromicin, a zbog niskih stopa otpornosti, moguća je i terapija i amoksisiclin-klavulanatom.

11. SUMMARY

Objective: The goal of this research was to determine frequency of infections caused by *Campylobacter* bacteria in outpatients in Split-Dalmatia county in 2021., their distribution according to age, gender, place of residence and months of the year as well as to determine the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates.

Materials and methods: The data used in this research were taken from the computer data base of the Department for gastrointestinal tract infections diagnosing of the TIPH SDC Split, and they included all of the patients who were diagnosed with *Campylobacter* bacteria in their stool samples during the period from 1st of January 2021. to 31st of December 2021. The data were processed using the Microsoft Office 365 software package, and programs Social Science Statistics and VassarStats for statistical analysis.

Results: The total number of *Campylobacter* spp. isolates from stool samples in the area of Split-Dalmatia County in 2021. was 395. The most common isolate was *Campylobacter jejuni* (92,4%). Infections were significantly more frequent in men than woman. The highest number of infections was present in the age groups 0-4 and 20-29 years. Also, the number of patients in urban areas was significantly higher than in suburban and rural areas. The highest number of infections was detected during the period from March through October with a peak in May. In comparison with other previous research that took place in Split-Dalmatia County, there has been detected an increase in the number of resistent *Campylobacter jejuni* isolates to ciprofloxacin and tetracycline, while the percentage of TcR/CipR co-resistant isolates remained stable. 5,3% of *Campylobacter jejuni* isolates also showed resistance to amoxicilin-clavulanate. All of the *Campylobacter jejuni* strains resistant to amoxicilin-clavulanate were also multiple resistant to other two or more antibiotics. Out of the 5 *Campylobacter coli* isolates included in the research, all of them showed resistance to ceftriaxone and cefazolin, 3 of them were resistant to ciprofloxacin, and 2 strains demonstrated resistance to tetracycline. *Campylobacter coli* showed good susceptibility to tested antibiotics. *Campylobacter lari* isolate was resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and cefazolin, and was susceptible to other tested antibiotics. Two of the *Campylobacter coli* isolates were TcR/CipR co-resistant, while others did not show double or multiple resistance.

Conclusion: The epidemiological characteristics of campilobacteriosis in outpatients in 2021. were similar to the characteristics determined in SDC in previous research in this area, in fact this pattern is similar to patterns of campylobacteriosis in other developed countries. There has been shown an

increase in resistance to ciprofloxacin and tetracycline of *Campylobacter jejuni* isolates. Also, there has been confirmed the presence of multiple resistant *Campylobacter jejuni* isolates, while the resistance of these isolates to amoxicillin-clavulanate and erythromycin was low. There was also noted the higher resistance of *Campylobacter coli* isolates to ceftriaxon and ciprofloxacin, as well as intermediate resistance to tetracycline. Considering these in vitro antimicrobial susceptibility results of *Campylobacter* isolates, erythromycin still remains the drug of choice, but it is also possible to treat this infection with amoxicillin-clavulanate because of its low resistance rate.