

Epidemiološke i mikrobiološko-molekularne značajke kampilobakterioza u Splitsko-dalmatinskoj županiji

Carev, Merica

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:707592>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MERICA CAREV

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKO - MOLEKULARNE
ZNAČAJKE KAMPILOBAKTERIOZA U
SPLITSKO–DALMATINSKOJ ŽUPANIJI: 2007. – 2012.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2019.

Istraživanje koje je obuhvaćeno ovom disertacijom je provedeno na Odjelu za dijagnostiku infekcija probavnoga sustava Službe za kliničku mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Zavodu za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split i u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica - mentorica istraživanja je bila prof.dr.sc. Marija Tonkić, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom.

Sastavni dio doktorske disertacije su dva izvorna znanstvena rada objavljena u časopisima *Infectious Diseases (Lond)* 2017. godine i *International Journal of Environmental Health Research* 2018. godine, koji su indeksirani u bazi podataka *Current Contents*.

Iz područja disertacije je 2015. godine u časopisu *International Journal of Environmental Health Research*, koji je indeksiran u bazi podataka *Current Contents*, objavljen i treći izvorni znanstveni rad kojemu sam suautor.

Zahvaljujem svim mojim suautorima na njihovom doprinosu.

Takoder zahvaljujem:

mojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Tonkić, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom, na iznimnoj i strpljivoj podršci, velikoj pomoći tijekom istraživanja i vjeri u naš zajednički uspjeh,

medicinsko – laboratorijskim tehničarkama: Ivi Rogulj, Vedrani Kuljiš, Jeleni Vukorepa, Renati Domazet, Matildi Vrtičević i Mary Jagnjić, bacc. med. lab. ing., na predanom laboratorijskom radu te svesrdnoj svakodnevnoj pomoći i podršci u mom znanstvenom istraživanju,

doc. dr. sc. Ani Kovačić, dipl. ing. mol. biol., na izvrsnoj suradnji i angažmanu u provedbi molekularno – mikrobioloških analiza kampilobaktera,

mr. sc. Elmici Borzić, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom na kolegijalnoj i prijateljskoj podršci i na osobito mudrim savjetima,

doc. dr. sc. Aniti Novak, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom, na poticajnoj i kreativnoj suradnji tijekom istraživanja te na prijateljskoj podršci,

doc. dr. sc. Nataši Boban, dr. med., spec. epidemiologije, na znanju i mudrosti koje mi je nesebično prenosila,

mag. inž. Ružici Popović, Pomorskom hidrometeorološkom zavodu Split DHMZ-a RH i Službi za klimatološka istraživanja i primijenjenu klimatologiju DHMZ-a RH na dragocjenoj pomoći i suradnji u prikupljanju meteoroloških podataka,

dr. sc. Katarini Šiško Kraljević, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom i prof. dr. sc. Volgi Punda Polić, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom na pomoći u edukaciji i provedbi PFGE postupka, kolegijalnoj podršci i savjetima,

mojoj matičnoj ustanovi, Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, koji je omogućio moje školovanje na doktorskom studiju i provedbu istraživanja,

Vesni Čapkun, dipl. ing. el., na edukaciji i savjetima o statističkim analizama,

izv. prof. Ani Jerončić, dipl. ing. mol. biol., na pomoći u molekularnim i statističkim analizama,

prof. dr. sc. Ani Marušić, dr. med., prof. emer. Matku Marušiću, dr. med. i prof. dr. sc. Marinku Dobecu, dr. med., spec. med. mikrobiologije s parazitologijom, na iznimno poticajnim savjetima, edukaciji i pomoći u znanstvenim analizama,

prof. dr. sc. Irvingu Nachamkinu, DrPH, MPH, Perelman School of Medicine University of Pennsylvania, na inspiraciji za ovo istraživanje, motivirajućoj podršci i znanstvenom doprinosu u analizi podataka,

mr. sc. Ivani Bočina Mijatović, spec. javnog zdravstva, na stručnoj evaluaciji podataka i prijateljskim savjetima,

dr. sc. Aniti Rakić, dipl. ing. kem. tehnol., na tehničkoj pomoći u pripremi mikrobioloških hranjivih podloga,

prof. dr. sc. Smilji Kalenić, spec. med. mikrobiologije s parazitologijom, na znanstvenim savjetima,

Ivani Hrepić, stručnom suradniku i Miloju Adamiću, dipl. iur., NZZJZ SDŽ, na grafičkoj i lektorskoj pomoći

Zaneti Foscarini, dipl. ing. geod., na pomoći u izradi kartografskog prikaza županije

Ankici Ajduković, dipl. oec. (A&B d.o.o.), Lidiji Marić, dipl. oec. i Miroslavu Mariću, dipl. ing. (Biomax d.o.o.) te doc. dr. sc. Radojki Runje Čalić, mag. pharm.

(Bomi–Lab d.o.o.), koji su svojim stručnim savjetima i donacijama također pomogli moju edukaciju i provedbu ovog istraživanja.

Posebno zahvaljujem:

mom suprugu Nevenu, dipl. ing. el., na neprekidnoj, velikoj i poticajnoj podršci tijekom istraživanja te na informatičkom doprinosu u analizama podataka,

mom sinu Filipu, stud. geod., na strpljenju i optimizmu kojeg je nesebično dijelio, mojim roditeljima Janji i Mati i mojim prijateljicama Dariji, Mariji, Antoaneli i Adi na strpljivom slušanju „o istraživanju“,

prijateljima koji su svojom podrškom i savjetima pomogli da ustrajem na svom putu, objavim članke i završim istraživanje.

Ponekad nije važan samo cilj kojeg želimo dostići već put kojeg ćemo pritom prijeći.....i ono što ćemo na tom putu naučiti.

S ljubavlju,
Nevenu i Filipu

SADRŽAJ:

1. POPIS OZNAKA I KRATICA	7
2. UVOD.....	9
2.1. Taksonomija i klinički značaj kampilobaktera.....	9
2.2. Patogeneza infekcija kampilobakterima.....	11
2.3. Mikrobiološka identifikacija, diferencijacija vrsta i metode tipizacije kampilobaktera	13
2.4. Otpornost kampilobaktera na antibiotike	15
2.5. Epidemiološke značajke kampilobakterioza	17
3. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3.1. Problematika istraživanja	21
3.2. Cilj istraživanja.....	22
3.3. Hipoteza istraživanja	23
4. METODE, ISPITANICI I UZORCI.....	24
4.1. Ispitanici	24
4.2. Demografski, meteorološki i poljoprivredni podatci.....	26
4.3. Izolati <i>Campylobacter jejuni</i> korišteni u ispitivanju osjetljivosti na antibiotike i genotipizaciji	29
4.4. Mikrobiološki i molekularni postupci	29
4.5. Statistički postupci.....	34
4.6. Etička načela.....	36
5. REZULTATI	37
5.1. Epidemiološke značajke kampilobakterioze u Splitsko-dalmatinskoj županiji ..	37
5.1.1. Raspodjela oboljelih prema području.....	38
5.1.2. Raspodjela oboljelih prema spolu	38
5.1.3. Raspodjela oboljelih prema dobi.....	39
5.1.4. Kretanje godišnjih stopa incidencije kampilobakterioze od 2007. do 2012. godine.....	42
5.1.5. Povezanost prosječne mjesečne temperature, relativne vlažnosti i količine oborina u SDŽ s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera u razdoblju od 2007. do 2012. godine.....	43
5.1.6. Povezanost veličine i korištenosti poljoprivrednog zemljišta i incidencije kampilobakterioze	50

5.2. Molekularno - mikrobiološke značajke izolata <i>Campylobacter jejuni</i>	51
5.2.1. Otpornost izolata <i>Campylobacter jejuni</i> na antibiotike i značajke bolesnika	51
5.2.2. Hospitalizirani i ambulantni bolesnici.....	55
5.2.3. Klonalnost izolata <i>Campylobacter jejuni</i>	55
6. RASPRAVA.....	64
7. ZAKLJUČCI	76
8. SAŽETAK	78
9. SUMMARY	80
10. DODATAK	82
11. LITERATURA	85
12. ŽIVOTOPIS	102

1. POPIS OZNAKA I KRATICA

- ATTC – American Type Culture Collection,
- *C. jejuni* – *Campylobacter jejuni*,
- *Campylobacter* spp. (lat. species) – rod *Campylobacter*,
- CI - raspon pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*),
- CIP – Ciprofloksacin,
- Cip_I - izolati kampilobaktera umjereno osjetljivi na ciprofloksacin,
- Cip_R - izolati kampilobaktera otporni na ciprofloksacin,
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute,
- DDD/TID, - definirane dnevne doze/1000 stanovnika/dan (engl. *Defined Daily Doses per Thousand Inhabitants per day*),
- Df – stupnjevi slobode (engl. *Degrees of freedom*),
- DHMZ - Državni hidrometeorološki zavod Republike Hrvatske,
- DNK - deoksiribonukleinska kiselina,
- EQAS – vanjski sustav kontrole kvalitete (engl. *External Quality Assurance System*),
- ERY – Eritromicin,
- EU - Europska Unija,
- GEN – Gentamicin,
- HACCAP - Sustav analize opasnosti i kontrole kritičnih točaka povezanih s hranom (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*),
- I – bakterijski izolat umjereno osjetljiv na antibiotik (engl. *Intermediate Susceptible*),
- IBS - sindrom iritabilnog crijeva (engl. *Irritable Bowel Syndrome*),
- KBC Split - Klinički bolnički centar Split,
- LOS - lipo – oligosaharidi,
- MIK - minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika (µg/mL),
- MLST - tipizacija multilokusnim sekvencioniranjem (engl. *Multilocus Sequence Typing*)
- NZZJZ SDŽ - Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije,

- P vrijednost - statistički značajna razlika,
- Pans - izolati kampilobaktera osjetljivi na sve testirane antibiotike (engl. *Pansusceptible*),
- PCR - lančana reakcije polimeraze (engl. *Polimerase Chain Reaction*),
- PFGE - gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*),
- PGŽ - Primorsko-goranska županija,
- R - bakterijski izolat otporan na antibiotik (engl. *Resistant*),
- r - Pearsonov koeficijent korelacije,
- RH - Republika Hrvatska,
- S – bakterijski izolat osjetljiv na antibiotik (engl. *Susceptible*),
- SAD - Sjedinjene Američke Države,
- SDŽ - Splitsko–dalmatinska županija,
- TC_R - izolati kampilobaktera otporni na tetraciklin,
- Tc_R/Cip_R - izolati kampilobaktera otporni na tetraciklin i ciprofloksacin, korezistentni izolati,
- TET – Tetraciklin,
- UPGMA – metoda za sparivanje klonskih skupina na temelju prosječnih vrijednosti njihovih udaljenosti (engl. *Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*),
- WGS - cjelogenomsko sekvencioniranje (engl. *Whole Genome Sequencing*),
- χ^2 - hi kvadrat test.

2. UVOD

2.1. Taksonomija i klinički značaj kampilobaktera

Bakterije roda *Campylobacter* su sitni, asporogeni, pokretni, gram-negativni, spiralno svinuti štapići (0,2 - 0,9 x 0,5 - 5 µm). Ubrajaju se u skupinu polako rastućih, termofilnih i mikroaerofilnih bakterija (1). Pripadaju razredu *Epsilonproteobacteria*, porodici *Campylobacteriaceae* (2).

Kampilobaktere je opisao T. Escherich još 1886. godine, no prvi rezultati o izolaciji iz ljudskih uzoraka su objavljeni tek 1946. godine, a bakterije su bile svrstane u rod *Vibrio* (2). Tijekom 1972. godine kampilobakteri su prepoznati kao uzročnici bolesti u ljudi (3), a 1973. su izdvojeni u zaseban rod *Campylobacter* (4). Unaprjeđivanje tehnike izolacije i prilagodba sastava hranjivih bakterioloških podloga omogućila je izolaciju ovog patogena u većem broju mikrobioloških laboratorija, a time i njegovu kliničku evaluaciju kao uzročnika bolesti u ljudi (2).

U Hrvatskoj su prvi podatci o izolaciji kampilobaktera iz uzoraka bolesnika te njihovim mikrobiološkim i epidemiološkim značajkama zabilježeni 1982. i 1985. godine na zagrebačkom području (5-7). Slijedila su dodatna istraživanja epidemioloških značajki kampilobakterioze na zagrebačkom području 1989. godine (8), te u razdoblju 2002. - 2006. godine u Primorsko – goranskoj županiji (PGŽ) (9). Novo istraživanje kliničkih i epidemioloških značajki kampilobakterioze u hospitaliziranih bolesnika na području grada Zagreba provela je Balen Topić sa suradnicima 2006. godine (10-11).

Iako je prvu izolaciju kampilobaktera iz veterinarskih uzoraka Hrvatskoj opisao Fras već 1956. godine (12), istraživanja izolata kampilobaktera iz uzoraka hrane, životinja i okoliša provode se tek tijekom posljednjih desetak godina (13-18), a sustavna kontrola i mjere nadzora kampilobaktera u trupovima peradi se još ne provode rutinski (19).

Tijekom godina je učestalost izolacije kampilobaktera iz brojnih ljudskih i životinjskih uzoraka, hrane i vode porasla je u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama te su oni danas diljem svijeta (globalno) najčešći bakterijski uzročnici bolesti koje se prenose hranom (engl. *Foodborne Zoonoses*) (3,20).

Procjenjuje se da u Europskoj uniji (EU) *Campylobacter* spp. godišnje uzrokuje oko 230 000 infekcija i 60 smrtnih ishoda (21), a u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) oko 1,3 milijuna infekcija, 13 000 hospitalizacija i 120 smrtnih ishoda (22), što iziskuje visoke troškove unutar zdravstvenog sustava (između 1,3 i 6,8 milijuna dolara godišnje) (23). Također, moguće su i dugoročne zdravstvene posljedice infekcija kampilobakterima kod oboljelih (20). Zbog svega navedenoga kampilobakterioza je sveprisutan, važan i neriješen javnozdravstveni problem (24).

Unutar roda *Campylobacter* spp. je utvrđeno 28 vrsta (25). Vrsta *C. jejuni* smatra se najčešćim uzročnikom bakterijskog gastroenteritisa u nerazvijenim i većini razvijenih zemalja (2, 26). Iako se infekcija kampilobakterima često očituje samoograničavajućim enteritisom, katkad ovi uzročnici uzrokuju krvavo–sluzave proljeve praćene abdominalnim grčevima, dehidracijom, vrućicom, glavoboljom i općom slabošću. U trudnica *C. jejuni* može uzrokovati spontani pobačaj ili prijevremeni porođaj, perinatalnu sepsu i neonatalni meningitis. U imunokompromitiranih osoba bolest ima teži i dulji tijek, a također je češća i pojava bakteriemije i ekstraintestinalnih reumatoloških i neuroloških komplikacija (1). Dugoročne posljedice infekcija kampilobakterima mogu biti ozbiljne i uključuju postinfektivni sindrom iritabilnog crijeva (engl. *Irritable Bowel Syndrome*, IBS), reaktivni artritis, bakteriemiju i Guillain-Barré sindrom (2, 27-28). Klinički značaj novootkrivenih vrsta još uvijek nije dovoljno poznat, no vrste kao što su *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus* i *C. lari* se sve više povezuju s etiologijom dijagnostički nerazjašnjenih gastroenteritisa, bakteriemije, Chronove bolesti, parodontitisa i drugih komplikacija (20).

U terapiji crijevnog oblika bolesti prvenstveno se provodi nadoknada tekućine i elektrolita, dok je specifična antibiotska terapija potrebna samo u bolesnika s težim kliničkim stanjima, te u trudnica i imunokompromitiranih bolesnika. Tada se rabe azitromicin, eritromicin, ciprofloksacin i tetraciklin (1).

2.2. Patogeneza infekcija kampilobakterima

Osim čovjeka, članovi ovog roda koloniziraju različite domaće i divlje životinje što potvrđuje njihovu sposobnost da se prilagode različitim uvjetima unutar domaćina i okoliša. Patogenost bakterija roda *Campylobacter* je različita što je moguća posljedica različitosti njihova genoma (29). Iako nisu poznati svi detalji patogeneze enteritisa koji uzrokuje *C. jejuni*, tri najvažnija patogenetska čimbenika za razvoj bolesti su: virulencija uzročnika, ingestirana doza uzročnika te imunokompetencija domaćina (30).

Infektivna doza za razvoj infekcije kampilobakterom je niska, svega 800 bakterija. Vrijeme inkubacije je 1 - 7 dana, a bolest se najčešće razvije 2 - 4 dana nakon ingestije uzročnika. Simptomi prosječno traju 4 - 7 dana, ovisno o virulenciji soja i imunološkom odgovoru domaćina (31).

Osnovni čimbenici virulencije kampilobaktera su:

- pokretljivost,
- sposobnost adherencije za stanice domaćina,
- invazija stanica domaćina,
- promjena staničnih signalnih puteva,
- induciranje smrti inficirane stanice,
- izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina,
- iskorištavanje željeza kao mikronutritijenta i katalizatora za stvaranje hidroksilnih radikala,
- stvaranje toksina te
- otpornost na antibiotike (28, 32).

Patogena svojstva sojevima *Campylobacter* spp. daju različiti proteini kodirani tzv. „genima virulencije“:

- CadF protein kodiran *cadF* genom omogućava vezanje kampilobaktera za ekstracelularni matriks ljudskih intestinalnih stanica,
- *flaA* gen kodira flagelarni protein koji omogućava pokretljivost, kolonizaciju i invadiranje stanica probavnoga sustava,
- *ciaB* gen kodira invazivni protein,
- citoletalni distendirajući toksin koji uzrokuje oštećenje stanične DNK i inducira smrt stanice kodiraju tri povezana gena: *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. (33),

- periplazmatska gama-glutamil transpeptidaza koja započinje intestinalnu kolonizaciju kodirana je ggt genom, a
- csrA gen kodira regulatorni CsrA protein koji sudjeluje u adherenciji za epitelne stanice, stvaranju biofilma i adaptaciji kampilobaktera na oksidativni stres (34).

Iako su *in vitro* studije ukazivale da lipo – oligosaharidi (LOS) nekih sojeva *C. jejuni*, zbog molekularne mimikrije s gangliozidima neurona, imaju značajnu ulogu u razvoju Guillain Barre sindroma (35), kliničkim studijama nije dokazana povezanost izolata koji nose gene za LOS sijalilaciju s invazivnošću i ozbiljnijim tijekom bolesti (36).

Virulenciji dijela sojeva *C. jejuni* pridonose i plazmidi, ali njihovu ulogu u patogenezi kampilobakterioze potrebno je rasvijetliti dodatnim istraživanjima (37). Primjerice, češći krvavi proljevi su opisani i u bolesnika inficiranih sojevima s pVir plazmidom (38), ali pretpostavka da taj čimbenik pridonosi invazivnosti sojeva (38) nije potvrđena dodatnim studijama (39).

Međutim, navedeni geni i njima kodirani čimbenici virulencije nisu uniformno prisutni u svim sojevima kampilobaktera već njihova raspodjela pokazuje i geografske varijacije, tj. njihova je zastupljenost povezana i sa zemljopisnim porijeklom izolata. (33, 39), te sa životinjskim domaćinom (34). Stoga definiranje genotipskih i fenotipskih značajki kampilobaktera odgovornih za patogenezu zahtijeva daljnja istraživanja.

Jedan od velikih problema u istraživanju kampilobakterioza je i iznimna genetska varijabilnost sojeva te njihovo učestalo kromosomsko preslagivanje (engl. *chromosomal rearrangements*) (40). Genetska heterogenost, uz pretežito pojedinačno pojavljivanje oboljelih, rijetko povezivanje određene hrane s epidemijskim slučajevima bolesti i prisutnost kampilobaktera u brojnim rezervoarima (u vodi, domaćim i divljim životinjama te kućnim ljubimcima) otežavaju otkrivanje izvora infekcije (40-41), pa je razumijevanje kliničkog značaja pojedinih sojeva i epidemiologije kampilobakterioza znatno otežano na globalnoj razini (24).

U imunološkom odgovoru domaćina za savladavanje infekcije kampilobakterima je ključno međudjelovanje nespecifične (urođene) i specifične (stečene) imunosti.

U nespecifičnom imunološkom odgovoru sudjeluju fagociti i intestinalne epitelne stanice, koje površinske antigene kampilobaktera prepoznaju pomoću „*toll-like*“ receptora 2 i 4. Aktivacija tih receptora potiče lučenje proupalnih citokina (interleukin-6 i

TNF- α) i kemokina (interleukin-8) koji privlače stanice domaćina, pretežno neutrofile, a oni uništavaju bakterije (30, 42).

Važnost specifične (stečene) imunosti u upalnom odgovoru je vidljiva iz primjera osoba s hipogamaglobulinemijom ili sindromom stečene imunodeficijencije (SIDA, engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, AIDS), kod kojih je primjećena veća incidencija infekcija uzrokovanih s *C. jejuni*, kao i teža klinička slika bolesti (30).

2.3. Mikrobiološka identifikacija, diferencijacija vrsta i metode tipizacije kampilobaktera

Izolacija *Campylobacter* spp. iz uzoraka oboljelih je prvi i standardni dijagnostički postupak za potvrdu kampilobakterioze. Međutim, dio laboratorija još uvijek ima poteškoća u provođenju kultivacije (43). Za kultivaciju uzoraka stolice upotrebljavaju se selektivne hranjive podloge (po Karmaliju, Skirrowu, Boltonu) koje se inkubiraju u mikroaerofilnoj atmosferi na 42°C tijekom 48 sati. Nakon inkubacije se iz poraslih karakterističnih mliječno-sivih, nepravilnih kolonija napravi mikroskopski preparat obojen po Gramu, test oksidaze i test katalaze. Kampilobakteri se mikroskopski vide kao sitni, zavnuti štapići, nalik na slovo S ili galebova krila. Pozitivni su na testu oksidaze i testu katalaze. Testom hidrolize hipurata razlikuje se *C. jejuni* (pozitivan) od ostalih vrsta kampilobaktera (negativni). Za kultivaciju primarno sterilnih uzoraka koriste se obogaćene hranjive podloge (krvni agar) (1).

Iako su sve češće u dijagnostičkoj primjeni, metode izravne detekcije antigena kampilobaktera iz uzoraka stolice i izravnog dokaza uzročnika postupkom lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) još uvijek ne pokazuju dovoljno visoku osjetljivost i specifičnost. Također, te metode, za razliku od kultivacije, ne omogućavaju daljnju molekularnu tipizaciju i ispitivanje osjetljivosti na antibiotike ovog patogena (43).

Međutim, danas se molekularne metode tipizacije *Campylobacter* spp. primjenjuju u istraživanjima raširenosti bolesti, praćenju učestalosti određenih sojeva tijekom sezona te povezivanju najčešćih genotipova s izvorima infekcije (24). Trenutno se najučestalije genotipizira *C. jejuni* kao dominantni uzročnik kampilobakterioze čovjeka. Osim za otkrivanje izvora bolesti, koje podrazumijeva istovremenu genotipizaciju *C. jejuni* iz različitih izvora (ljudi, životinja, okoliša), dio istraživanja u području molekularne

epidemiologije usmjeren je na identifikaciju virulentnih sojeva *C. jejuni*, tj. na povezivanje genotipova s težom kliničkom slikom (44). Rezultati tih istraživanja još uvijek su kontroverzni budući da brojni potencijalni virulentni čimbenici utvrđeni u jednom, nisu potvrđeni u drugim istraživanjima (36, 38-39). U svrhu procjene kliničkog značenja virulentnih čimbenika navedena istraživanja uspoređuju značajke sojeva ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika (44). Genotipizacija ljudskih izolata kampilobaktera u Republici Hrvatskoj (RH) je prvi put napravljena za potrebe ovog istraživanja (45).

Iako se trenutno za genotipizaciju kampilobaktera koriste različite molekularne metode uključujući tipizaciju multilokusnim sekvencioniranjem (engl. *Multilocus Sequence Typing*, MLST) i cjelogenomsko sekvencioniranje (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS), kao optimalna metoda genotipizacije se i dalje navodi metoda gel elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (46), koja je opisana 1984. godine (Shwartz i Cantor), te je od tada neprestano u uporabi i usavršava se (17). PFGE metoda, uz korištenje dva restriksijska enzima, ima dokazano veliku mogućnost razlučivanja podtipova i ponovljivost, tj. zadovoljava kriterije pouzdanosti i preciznosti, posebice stoga što, za razliku od drugih, detektira kromosomsko preslagivanje. Dostupnost standardiziranih protokola i odličan omjer troškova i korisnosti su bili presudni da upravo ova metoda bude izabrana metoda genotipizacije Mreže za molekularnu tipizaciju patogena koje se prenose hranom „PulseNet“ u Sjedinjenim Američkim Državama (engl. *Pulse Net USA The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Surveillance*) (47-48). „Pulse Net International“ je internetska baza koja sadrži podatke o izolatima kampilobaktera diljem svijeta, a primjena standardiziranih protokola omogućuje usporedivost rezultata PFGE genotipizacije izolata kampilobaktera različitih laboratorija (17).

Poteškoće u primjeni PFGE metode mogu predstavljati njena vremenska dugotrajnost, visoka razina tehničkog umijeća koju zahtijeva, povremeno otežana interpretacija dobivenih obrazaca pulstipova, nešto niža moć razlikovanja odsječaka DNK približno iste veličine te činjenica da određene sojeve kampilobaktera nije moguće tipizirati ovom metodom (17, 48).

Tijekom posljednjeg desetljeća učestala je primjena MLST-a i WGS-a u istraživanju kampilobakterioza. Dingle i suradnici su opisali MLST metodu 2001. godine (49), a tom metodom se, na temelju sekvenciranja, tipizacija provodi određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa. MLST podatci su značajno pridonijeli

istraživanju mogućih izvora i rezervoara te poznavanju putova prijenosa kampilobakterioze (17, 48). Iako MLST odlično pokazuje srodnost među genotipovima i definira klonalne komplekse (engl. *Clonal Complex*; CC – grupa od dva ili više neovisnih izolata koji dijele jednake alele na pet ili više genskih lokusa) (49), ipak ponekad slabije razlučuje razlike od PFGE-a pa se klonski kompleksi koji su prepoznati MLST-om mogu dodatno razlučiti PFGE-om na subtipove (50).

Sekvencioniranje cijeloga genoma (WGS) u mikrobiologiji se smatra revolucionarnom metodom koja će postupno zamijeniti ostale metode genotipizacije. S druge strane, cjelogenomske analize, iako imaju nešto veću diskriminatornu moć, su vremenski i tehnički prezahtjevne (40). Dodatno ograničenje tih metoda zasad je i nedostatak standardnih protokola i validacije (48).

2.4. Otpornost kampilobaktera na antibiotike

Ispitivanje otpornosti na antibiotike je također sastavni dio praćenja epidemiološkog i kliničkog značaja kampilobaktera. Provodi se metodom dilucije u agaru i dilucije u bujonu (51), a odnedavno i disk difuzijskim postupkom (52). Gradijent strip test (epsilometrijski ili E test), koji je kombinacija dilucijske i disk difuzijske metode, pokazao se osjetljivijim od metode dilucije u agaru (43). Ima dobru podudarnost rezultata s metodom dilucije u bujonu (53), a za razliku od disk difuzijske metode, rezultati E testa su izraženi kvantitativno kao minimalne inhibitorne koncentracije.

Porast otpornosti izolata kampilobaktera na fluorokinolone i tetraciklin je tijekom posljednjeg desetljeća zabilježen širom svijeta (54-56). Zabilježene stope otpornosti su različite - najniže su u skandinavskim zemljama (55) i Australiji (57), a najviše u azijskim zemljama (58-59) i Španjolskoj (55). Raširenost i porast otpornosti na antibiotike pripisuju se pretjeranoj uporabi kinolona i tetraciklina u uzgoju životinja na farmama, produljenoj uporabi antibiotika u humanoj medicini, osobito u imunokompromitiranih bolesnika (60) te produljenoj kolonizaciji i perzistenciji, tj. boljoj vijabilnosti takvih sojeva unutar životinjskog rezervoara (61). Obrasci uporabe antibiotika i njima uzrokovana selekcija otpornosti u jednom dijelu svijeta šire se globalno putem međunarodnog lanca trgovine hranom i međunarodnih putovanja (62). Dokazano je, primjerice, da su infekcije sojevima otpornim na fluorokinolone povezane s putovanjima i da je rizik za infekciju rezistentnim sojevima viši u određenim turističkim područjima

(63). Stoga je vrlo važno poznavati i pratiti otpornost sojeva kampilobaktera na antibiotike u lokalnoj sredini. Poznavanje otpornosti na antibiotike preduvjet je ispravnog odabira terapije u težim slučajevima bolesti.

Otpornost kampilobaktera na antibiotike je uglavnom posljedica spontane mutacije određenog gena te bakterije, a može nastati i zbog horizontalnog prijenosa gena između bakterija tog roda (engl. *Horizontal Gene Transfer*, HGT).

Primijećeno je da *C. jejuni*, za razliku od drugih bakterijskih vrsta, nema velik broj gena koji kodiraju molekule za popravak DNK, a nedostaju mu i geni koji štite DNK od mutagenog djelovanja ultravioletnog (UV) zračenja. Nedostatak tih gena čini ovog uzročnika podložnijim nastanku mutacija (64-66).

U istraživanju koje su proveli Zhao i sur. 2016. godine (67), provedeno je sekvencioniranje čitavog genoma (WGS) 114 izolata kampilobaktera sa ciljem identificiranja gena koji se povezuju s antimikrobnom otpornošću. Identificirano je 18 gena: tet(O), blaOXA-61, catA, lnu(C), aph(2'')-Ib, aph(2'')-Ic, aph(2')-If, aph(2'')-Ig, aph(2'')-Ih, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aac(6')-Ie-aph(2'')-If, aac(6')-Im, aadE, sat4, ant(6'), aad9, aph(3')-Ic, aph(3')-IIIa te mutacije „domaćinskih“ (eng. *housekeeping*) gyrA i 23S rRNA gena. Uočena je snažna povezanost između fenotipske otpornosti kampilobaktera na testirani antibiotik i prisutnosti jednog ili više navedenih mutiranih gena za otpornost. Takva povezanost je za tetraciklin, ciprofloksacin i eritromicin u ovom istraživanju bila 100% (67). Unatoč ovim spoznajama, mehanizmi kojima spomenuti geni ostvaruju antimikrobnu otpornost u kampilobaktera za sada nisu u potpunosti razjašnjeni (67).

Bakterije iz roda *Campylobacter* nisu sklone ugradnji genetskog materija drugih bakterijskih vrsta. Međutim, između sojeva kampilobaktera se ipak viđa horizontalni prijenos gena za otpornost na antibiotike (42). Horizontalni prijenos gena se ostvaruje mehanizmima prirodne transformacije, transdukcije ili konjugacije, a prenose se genetski elementi u obliku kromosoma, transpozona ili plazmida (30). Konjugacija ima temeljnu ulogu u prijenosu plazmidski posredovane neosjetljivosti (60). Primjer konjugacije je prijenos tet(O) gena između bakterija *C. jejuni* zapažen u crijevima kokoši (68).

Velika prevalencija plazmida konjugiranih tet(O) genom se povezuje s rastućom neosjetljivošću kampilobaktera na tetracikline, dok je razvoj otpornosti na makrolide i fluorokinolone kampilobaktera posljedica kromosomalno posredovane prirodne transformacije njihova genoma. (60). Preciznije, osnovni mehanizmi otpornosti kampilobaktera na antibiotike su: modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika (npr. modifikacija DNA-giraze kao uzrok neosjetljivosti na kinolone/fluorokinolone),

nemogućnost antibiotika da dosegne ciljno mjesto djelovanja (npr. postojanje velikog vanjskog membranskog proteina (engl. *Major Outer Membrane Protein*, MOMP), efluks antibiotika (npr. efluks makrolida, fluorokinolona, beta-laktama i tetraciklina putem CmeABC efluksne pumpe) te modifikacija ili inaktivacija antibiotika (npr. postojanje aminoglikozid-modificirajućeg enzima). Visoka otpornost na antibiotike je obično rezultat aktivnosti efluksne pumpe i postojanja još jednog od navedenih mehanizama (30), odnosno njihova sinergističkog učinka.

Povezanost otpornih fenotipova *C. jejuni* s patogenošću i virulencijom sojeva nije sasvim istražena. Rezultati nekih studija upućuju da su infekcije sojevima kampilobaktera otpornim na kinolone povezane s težom kliničkom slikom i višim mortalitetom (69). S obzirom na nedavnu pojavu virulentnog SA klonu *C. jejuni* u SAD-u kojem su pripadali izolati otporni na tetraciklin, pretpostavlja se da i tetraciklinska otpornost pridonosi virulenciji, odnosno stupnju patogenosti sojeva *C. jejuni* (61). Budući su ta pitanja još otvorena, a dosadašnji rezultati kontroverzni (70-71), potrebna su dodatna istraživanja.

2.5. Epidemiološke značajke kampilobakterioza

Kampilobakterioza, koja pripada među antropozoonoze, je u razvijenim zemljama razmjerno česta infekcija probavnoga sustava (72). Međutim, između pojedinih zemalja postoje velike razlike u incidenciji kampilobakterioze koja se bilježi u rasponu od 1,3 do 197,4/100 000 stanovnika godišnje (73-76). One se tumače razlikama u dostupnosti zdravstvene zaštite i metodama laboratorijske dijagnostike, razlikama u sustavima prijavljivanja bolesti, ali i stvarnim razlikama u incidenciji uslijed specifične prostorne raspodjele izvora infekcije (77). Ukupno uzevši, bakterije roda *Campylobacter* su globalno najčešći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa (2).

Iako većina dosad provedenih epidemioloških studija ukazuje na činjenicu da je kampilobakterioza bolest koja se najčešće prenosi hranom te da je upravo meso peradi najvažniji izvor zaraze za ljude (15-16, 72), uočeno je također da je razvoj kampilobakterioze posljedica kompleksnih interakcija između uzročnika bolesti, osobina domaćina, okoliša i putova prijenosa, te da postoje velike lokalne razlike u incidenciji, sezonskoj pojavnosti bolesti i otpornosti izolata između pojedinih regija (77-80). Stoga se danas, uz meso peradi, kao glavni izvor infekcija kampilobakterom, navode sve više i

drugi izvori poput vode za piće, okoliša te kontakta s kućnim ljubimcima i domaćim životinjama (41, 76). Za takve se izvore pretpostavlja da imaju specifičnu prostornu raspodjelu tj. da su lokalizirani u pojedinim područjima, za razliku od komercijalno dostupnog mesa peradi, izvora koji je uglavnom jednoliko rasprostranjen unutar iste zemlje (81).

Izražena ljetna sezonalnost infekcija kampilobakterom, uz regionalne varijacije vrhunca broja infekcija od lipnja (u Ujedinjenom Kraljevstvu) do kolovoza (u skandinavskim zemljama), je uobičajena u umjerenom klimatskom pojasu, što čini kompleksne interakcije između okoliša, uzročnika i domaćina dodatno složenima (7, 77, 79). Stoga su epidemiološke studije koje ispituju prostornu razdiobu oboljelih od kampilobakterioze unutar pojedine regije dragocjen alat za identifikaciju specifičnih područja s povećanim rizikom za obolijevanje, kao i za proučavanje rizičnih čimbenika za razvoj kampilobakterioze koji nisu povezani s konzumacijom kupljenog mesa peradi. Uz to, ovakva istraživanja mogu unaprijediti postojeće sustave prijave i nadzora kampilobakterioza te omogućiti osmišljavanje prikladnih mjera prevencije ove bolesti u lokalnim i međunarodnim okvirima (79). Regionalne i sezonske razlike u incidenciji i ostalim značajkama bolesti mogu se očekivati i unutar RH u odnosu na zemljopisne i klimatske razlike te moguće razlike u poljoprivrednoj proizvodnji i prehrambenim navikama stanovništva.

Iako su poznata ograničenja, većina studija procjenu incidencije temelji na broju laboratorijski potvrđenih izolata, odnosno na mikrobiološkim rezultatima uzoraka stolice hospitaliziranih i ambulantnih bolesnika s proljevom koji su sustavno prikupljeni u promatranom području tijekom pojedine godine (82). Takva metoda ima visoku specifičnost (pozitivni su uistinu bolesni od kampilobakterioze) i preporučuje se u slučaju bolesti s niskom godišnjom incidencijom (83). Ograničenje metode je njena niža osjetljivost, jer za potpunu procjenu incidencije nedostaju bolesnici s gastroenteritisom koji nisu zatražili liječničku pomoć kao i oni kojima nisu napravljene laboratorijske pretrage. To predstavlja ograničenje našeg, ali i ostalih istraživanja iz ovog područja (82). No navedena ograničenja imaju i najrazvijeniji nacionalni registri (84).

S druge strane, kohortne populacijske studije za procjenu incidencije kampilobakterioza iznimno su rijetke i teško provedive. Naime, zbog relativno niske incidencije kampilobakterioza u općoj populaciji, za valjanu procjenu incidencije potrebno je pratiti značajno veliku populaciju u razdoblju od nekoliko godina (83, 85).

Procjena incidencije kampilobakterioze u nekim se slučajevima nastoji korigirati „piramidnim rekonstrukcijskim studijama“ u kojima se broj laboratorijski potvrđenih slučajeva korigira za neprijavljene i nedetektirane slučajeve množenjem s „koeficijentom multiplikacije“ (22, 85). Međutim, za izračun takvog koeficijenta potrebne su vrlo detaljne informacije o korištenju zdravstvenih usluga i laboratorijskom testiranju kojih u Hrvatskoj nema. Kritičari ove metode također ističu i da je njome procijenjena incidencija značajno viša i od incidencije u kohornim studijama (86). Stoga se procjena incidencije kampilobakterioza na temelju broja laboratorijski potvrđenih izolata koristi u većini objavljenih istraživanja.

Podatci i studije o humanoj kampilobakteriozi u RH su nedostatni zbog postojećih ograničenja u provođenju mikrobioloških pretraga i sustavu prijave zaraznih bolesti. Naime, prijavljivanje kampilobakterioza propisano je Zakonom o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti tek 2007. godine (87), a prve službene prijave ove bolesti nalazimo zabilježene 2009. godine (88). Međutim, trenutni sustav nadzora kampilobakterioza u RH procjenjuje incidenciju na temelju registriranja broja liječničkih prijava. Takva procjena nije specifična jer uključuje prijavu bolesti na temelju kliničke slike, a bez nužno potvrđenog uzročnika, kako je uobičajeno u sustavima za nadzor i praćenje kampilobakterioza većine zemalja Europske unije (55) i Sjedinjenim Američkim Državama (89).

U RH do sada nije izvršena procjena incidencije infekcija uzrokovanih *Campylobacter* spp. na temelju broja laboratorijski utvrđenih izolata, koja bi uključivala sveobuhvatnu mrežu laboratorija na određenom području. Naime, rijetke ranije objavljene studije su procjenjivale incidenciju na temelju podataka prikupljenih u kratkom, četveromjesečnom razdoblju (8) i to isključivo od hospitaliziranih bolesnika (8) ili isključivo od ambulantnih bolesnika (9). Također, tehnički zahtjevna kultivacija kampilobaktera se nije provodila sustavno u svim mikrobiološkim laboratorijima u RH, pa stoga opisani postupak procjene incidencije na temelju broja laboratorijski potvrđenih izolata nije bilo moguće napraviti na nacionalnoj razini.

Posljedica nedostatka takvih podataka na nacionalnoj razini je značajno podcjenjivanje ovog javnozdravstvenog problema u RH. Naime, sustavno se provodila samo pretraga na salmonele i šigele, koje se stoga neopravdano smatraju najčešćim bakterijskim uzročnicima gastroenteritisa. Stoga su potrebna epidemiološka i molekularno-mikrobiološka istraživanja čimbenika koji pridonose virulenciji i iznimnoj raširenosti kampilobaktera.

U ovom istraživanju provedeno je sustavno pretraživanje uzoraka stolice na *Campylobacter* spp. svih ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika s gastroenteritisom u Splitsko-dalmatinskoj županiji SDŽ od 2007. do 2012. godine te složeni postupci ispitivanja antibiotske osjetljivosti i genotipizacije izolata *C. jejuni*. Također su prikupljeni i analizirani socio - demografski i okolišni podatci o oboljelima kako bi se na temelju cjelovite slike moglo utvrditi koje su značajke povezane s većom incidencijom, odnosno s težom kliničkom slikom bolesti.

3. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA

3.1. Problematika istraživanja

Bakterije roda *Campylobacter* su najčešći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u nerazvijenim i većini razvijenih zemalja (2, 26). Međutim, genetska heterogenost uzročnika, pretežito pojedinačno pojavljivanje oboljelih, rijetko povezivanje određene hrane s epidemijskim slučajevima bolesti te prisutnost kampilobaktera u brojnim rezervoarima znatno otežavaju otkrivanje izvora infekcije. Stoga je razumijevanje kliničkog značaja sojeva i epidemiologije kampilobakterioza znatno otežano na globalnoj razini.

Postoje velike prostorne razlike u incidenciji kampilobakterioze koje se ne mogu objasniti poznatim rizičnim čimbenicima, ali i kontradiktorne informacije u literaturi o incidenciji na pojedinom području kao i o virulenciji sojeva (36, 38-39, 77-80). Iako je u studijama slučajeva i kontrola utvrđeno da se gotovo polovina rizika može pripisati konzumaciji hrane, posljednjih godina se sve više ističe i hipoteza o okolišnim i drugim rizičnim čimbenicima (41). S obzirom na kompleksne interakcije između uzročnika bolesti, osobina domaćina, okoliša i putova prijenosa, regionalne studije su upravo modeli na kojima se mogu istražiti takve odrednice kampilobakterioze. Rezultati nekoliko ekoloških studija u kojima se incidencija kampilobakterioze modelirala na temelju okolišnih i socio-demografskih značajki pokazale su da je korištenje općina ili postojećih prostornih podjela u popisu stanovništva optimalna skala za proučavanje determinanata kampilobakterioze na regionalnoj razini (90).

Cilj ovog istraživanja bio je sustavno ispitati mikrobiološko-molekularne, socio-demografske i prostorne značajke kampilobakterioze u SDŽ te na temelju tako dobivene cjelovite slike utvrditi koje su značajke povezane s većom incidencijom, odnosno s težom kliničkom slikom bolesti. Na taj se način mogu utvrditi regionalne specifičnosti kampilobakterioze što je važno za ukupno poznavanje epidemiologije ove infektivne bolesti, ali je važno i u kontekstu izostanka vjerodostojnih podataka na nacionalnoj razini.

Uz znanstveni, nije zanemariv ni stručni doprinos istraživanja - povećanje kvalitete zdravstvenih podataka i mikrobiološke dijagnostike, budući da trenutno ne

postoje vjerodostojni podatci o kampilobakteriozi na temelju kojih se mogu donositi javno-zdravstvene mjere u SDŽ niti u RH.

Identifikacijom novih i/ili potvrdom poznatih značajki ove bolesti značajno će se doprinijeti globalnom znanju o kampilobakteriozi te stvoriti pretpostavke za planiranje javno-zdravstvenih preventivnih mjera u SDŽ i u RH.

3.2. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Procijeniti incidenciju kampilobakterioze u SDŽ u razdoblju od 2007. do 2012. godine na temelju broja laboratorijski potvrđenih infekcija vrstama roda *Campylobacter*.
2. Procijeniti incidenciju kampilobakterioze u SDŽ prema dobi, spolu, socio-demografskim (urbano/suburbano/ruralno), i prostorno - okolišnim značajkama prebivališta bolesnika (korištenje poljoprivrednog zemljišta i meteorološki podatci) te utvrditi koje su značajke povezane s višom incidencijom.
3. Ispitati obrasce otpornosti na antibiotike i genotipove *C. jejuni*, izoliranih iz uzoraka stolice ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika u SDŽ.
4. Usporediti učestalost socio-demografskih (dob, spol, urbano/suburbano/ruralno), prostornih, mikrobioloških (otpornost *C. jejuni* na antibiotike) i molekularnih (genotipovi *C. jejuni*) značajki kampilobakterioze između ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika te odrediti koje su značajke povezane s razvojem teže kliničke slike, odnosno s hospitalizacijom bolesnika.

3.3. Hipoteza istraživanja

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Incidencija kampilobakterioze u SDŽ u razdoblju od 2007. do 2012. godine je povezana s demografskim značajkama oboljelih (dob, spol, mjesto prebivališta).
2. Mjesečni broj izolata *Campylobacter* spp. u SDŽ u razdoblju od 2007. do 2012. godine je povezan s prosječnim mjesečnim vrijednostima meteoroloških parametara (prosječna mjesečna temperatura zraka, relativna vlažnost zraka i mjesečna količina oborina) i s poljoprivrednim aktivnostima u pojedinim područjima SDŽ.
3. Molekularno - mikrobiološke značajke sojeva *C. jejuni* (genotip sojeva i njihova otpornost na antibiotike) i značajke bolesnika (dob, spol, prebivalište) inficiranih sojevima *C. jejuni* mogu biti povezane s hospitalizacijom bolesnika.

4. METODE, ISPITANICI I UZORCI

4.1. Ispitanici

Svi ispitanici obuhvaćeni istraživanjem su bili bolesnici iz Splitsko–dalmatinske županije koji su zbog sumnje na bakterijski gastroenteritis u razdoblju od 1.1.2007. do 31.12.2012. godine dali uzorke stolice u laboratorije Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije (NZZJZ SDŽ) i Kliničkog bolničkog centra Split (KBC Split) i kojima su u tim uzorcima dokazane bakterije roda *Campylobacter* spp..

Novooboljelim se smatrao isključivo bolesnik kojem je u kalendarskoj godini uzročnik *Campylobacter* spp. dokazan prvi put (tj. bolesnik s primoizolatom *Campylobacter* spp.), a uzastopni izolati kampilobaktera (engl. *copy strains*) istog bolesnika nisu smatrani novom infekcijom (89, 91).

Od ukupno 2812 bolesnika pozitivnih na *Campylobacter* spp., bilo je 2119 ambulantnih bolesnika i 693 hospitaliziranih. Budući da se mikrobiološki uzorci svih ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika u SDŽ upućuju isključivo u laboratorij NZZJZ SDŽ ili KBC Split, istraživanjem su sustavno obuhvaćeni svi bolesnici s laboratorijski potvrđenom dijagnozom kampilobakterioze u SDŽ.

Ambulantni bolesnici su oni koji su na području SDŽ liječeni u primarnoj zdravstvenoj zaštiti s dijagnozom akutnog gastroenteritisa i čiji je uzorak upućen na bakteriološku pretragu u Službu za mikrobiologiju NZZJZ SDŽ. Hospitalizirani bolesnici su oni koji su s primarnom dijagnozom akutnog gastroenteritisa liječeni u KBC Split i čiji je uzorak upućen na bakteriološku pretragu u Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split. Ti bolesnici u istraživanju su definirani kao oni s težom kliničkom slikom (70, 92).

Sve bolesnike u istraživanju su pregledali obiteljski liječnici i na temelju kliničkih znakova odredili liječenje kod kuće uz pretragu uzorka stolice u NZZJZ SDŽ ili hospitalizaciju uz pretragu uzorka u KBC Split, što je dokumentirano njihovim uputnicama. Eventualne kasnije hospitalizacije ambulantnih bolesnika s primarnom dijagnozom gastroenteritisa su evidentirane i takvi su bolesnici svrstani u hospitalizirane bolesnike.

Uzorci stolice ambulantnih bolesnika su prikupljeni u središtu Službe za mikrobiologiju NZZJZ SDŽ u Splitu i u svim ispostavama NZZJZ SDŽ na području županije: u Omišu, Makarskoj, Vrgorcu, Imotskom, Sinju, Trogiru, Supetru, Jelsi i Visu, a uzorci stolice hospitaliziranih bolesnika su s odjela, klinika i zavoda KBC Split su upućeni na Zavod za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split.

Svi uzorci dijarealne stolice bolesnika s gastroenteritisom s područja Splitsko–dalmatinske županije (SDŽ), upućeni na bakteriološku pretragu u NZZJZ SDŽ ili KBC Split od 2007. do 2012. godine (prosječno 5 500 godišnje), bili su sustavno obuhvaćeni pretragom na *Campylobacter* spp.

Kriterij uključenja ispitanika:

- ✓ izolacija *Campylobacter* spp. iz uzorka stolice bolesnika s akutnim gastroenteritisom (mikrobiološki dokaz),
- ✓ sve dobne skupine,
- ✓ oba spola,
- ✓ mjesto prebivališta u Splitsko–dalmatinskoj županiji.

Kriterij isključenja uzoraka stolice bolesnika:

- ✓ uzastopni (engl. *copy*) sojevi kampilobaktera izolirani iz nekoliko uzoraka stolice istog bolesnika se nisu uzimali u obzir pri izračunu incidencije kampilobakterioze niti u molekularno – mikrobiološkim analizama genotipova i otpornosti *C. jejuni*.

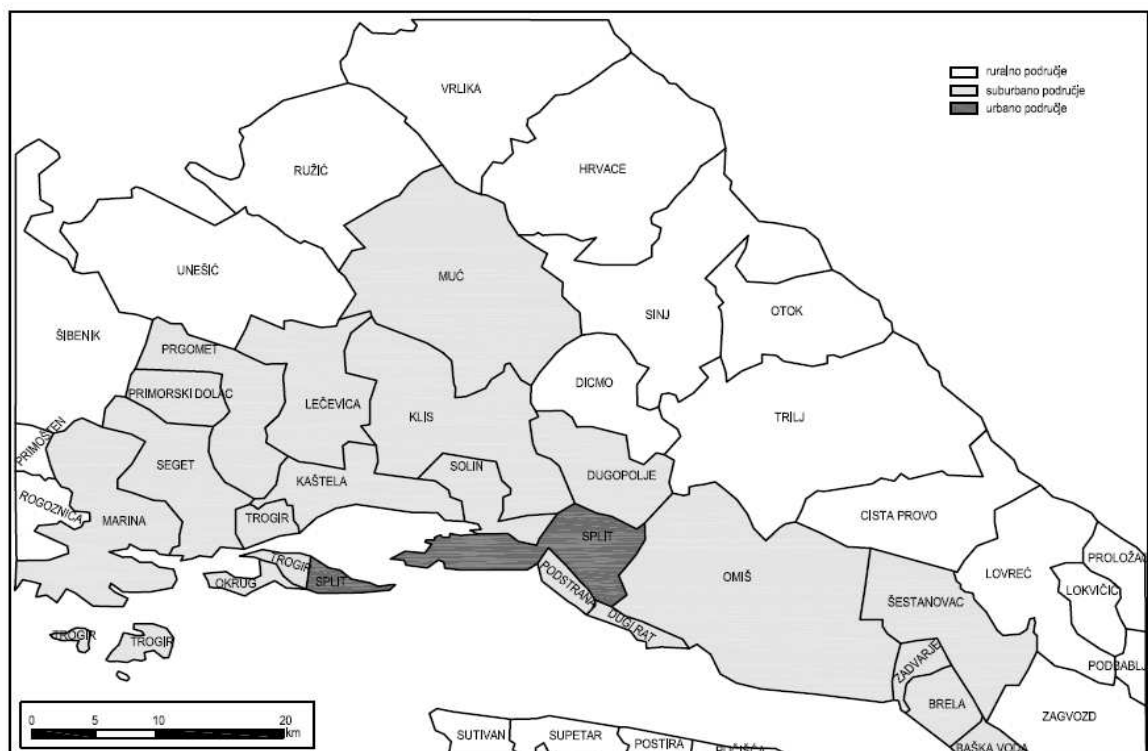
Svi podaci o ispitanicima i njihovim izolatima su pohranjeni u računalnoj bazi podataka Odjela za dijagnostiku infekcija probavnoga sustava Službe za mikrobiologiju NZZJZ SDŽ.

Bilježeni su dob, spol, mjesto prebivališta i način liječenja bolesnika (ambulantno liječenje ili hospitalizacija), datum izolacije i identificirana vrsta *Campylobacter* spp..

4.2. Demografski, meteorološki i poljoprivredni podatci

Podatci o broju, dobnoj i spolnoj strukturi stanovništva u gradovima i općinama SDŽ dobiveni su iz Popisa stanovništva, kućanstava i stanova Republike Hrvatske 2001. i 2011. godine (u daljnjem tekstu: Popis stanovništva RH 2001. i 2011.) (93-94). Ukupni broj stanovnika u SDŽ i ukupni broj stanovnika prema područjima, spolu i dobnim skupinama određen je prema Popisu stanovnika 2011. godine (94) (Tablica 1. u Dodatku), a broj stanovnika u SDŽ pojedinoj kalendarskoj godini prema Procjenama broja stanovnika, koje su objavljene kao dodatci Popisa stanovnika 2001. (2007. – 2010.) (93) i Popisa stanovnika 2011. (2011. – 2012.) (94).

Na temelju izračuna gustoće stanovništva (broj stanovnika/km²) (94-95) i zračne udaljenosti od županijskog centra – Splita koja je mjerena pomoću računalne aplikacije Google karte (96), 55 gradova i općina u županiji su svrstani u **tri geografska područja**: **urbano područje** (> 500 stanovnika/km², < 5 km udaljenosti od centra Splita); **suburbano područje** (150 - 500 stanovnika/km², 5 - 30 km udaljenosti od centra Splita) i **ruralno područje** (< 150 stanovnika/km², > 30 km udaljenosti od centra Splita) (Slika 1).



Slika 1. Geografska karta SDŽ s prikazom urbanog, suburbanog i ruralnog područja (prema „Split – urbana aglomeracija“) (97).

Prema gore navedenim kriterijima:

- u urbano područje spada grad Split;
- u suburbano područje: općina Podstrana; grad Solin s općinama Klis, Dugopolje i Muć; grad Kaštela s općinom Lećevica; grad Trogir s općinama Seget, Prgomet, Primorski Dolac, Marina, Okrug, grad Omiš s općinama Šestanovac, Zadvarje, Dugi Rat; grad Makarska s pripadajućim općinama Baška Voda, Brela, Gradac, Podgora, Tučepi;
- u ruralno područje: grad Imotski s općinama Cista Provo, Lokvičići, Lovreć, Podbablje, Proložac, Runovići, Zagvozd, Zmijavci; grad Sinj s općinama Dicmo, Hrvace, Otok; grad Trilj, grad Vrlika; grad Vrgorac, otok Brač s gradom Supetar i općinama Bol, Milna, Nerežišća, Sutivan, Selca, Pučišća, Postira, otok Šolta, otok Hvar s gradom Hvarom i Starim Gradom i općinama Jelsa, i Sućuraj; otok Vis s gradovima Visom i Komižom i pripadajućim naseljima.

Ukupne prosječne stope incidencije za razdoblje 2007. - 2012. godine (engl. *Mean Overall Incidence Rate*) su se računale na temelju broja laboratorijski potvrđenih izolata *Campylobacter* spp. u razdoblju od 2007. do 2012. godine (Tablica 2 u Dodatku) i podataka o broju stanovnika (Tablica 1 u Dodatku), a izražene su kao stope na 100 000 stanovnika (98) i to za: cijelo područje SDŽ, za tri geografska područja (urbano, suburbano i ruralno), za deset dobnih skupina (0 - 4, 5 - 9, 10 - 19, 20 - 29, 30 - 39, 40 - 49, 50 - 59, 60 - 69, 70 - 79 i ≥ 80 godina) i prema spolu (98).

Godišnje stope incidencije računale su se na temelju broja laboratorijski potvrđenih izolata *Campylobacter* spp. u pojedinoj godini (Tablica 3 u Dodatku) i podataka u broju stanovnika u toj godini, određenim prema godišnjim Procjenama broja stanovnika (93, 94), a izražene su kao stope na 100 000 stanovnika za SDŽ i za tri geografska područja.

Sukladno posljednjem Popisu poljoprivrede Republike Hrvatske provedenom 2004. godine (95), podatci o ukupnoj veličini zemljišta pojedinog područja SDŽ i veličini ukupnog korištenog poljoprivrednog zemljišta koji uključuju površinu obrađenog poljoprivrednog zemljišta i površinu objekata namijenjenih uzgoju peradi i stoke u

pojedinom području županije (urbanom, suburbanom ili ruralnom), korišteni su kao indikator poljoprivredne aktivnosti u pojedinom području SDŽ.

Meteorološki podatci koje je, za razdoblje od 2007. do 2012. godine, ustupio Pomorski hidrometeorološki centar Split Državnog hidrometeorološkog zavoda RH (DHMZ), su prikupljeni sa svih 14 meteoroloških mjernih postaja u SDŽ: Split-Marjan, Split-aerodrom, Hvar, Vis-Hum, Makarska, Sutivan, Bol, Sumartin, Jelsa, Šestanovac, Sinj, Ričice-Brana, Imotski, Vrgorac. Prosječne dnevne vrijednosti temperature zraka (°C), relativne vlažnosti (%) i količine oborina (mm) su mjerene na svakoj postaji u SDŽ. Za potrebe proučavanja klime na meteorološkim postajama **temperatura** se mjerila tri puta na danu u 7 sati ujutro, u 14 poslije podne i u 21 sat navečer. Iz tih podataka, prema formuli, izračunavala se prosječna dnevna temperatura zraka na svakoj postaji:

$$(TsredD) = (T7 + T14 + 2 T21) / 4 \quad (99) \quad (1.1)$$

Na temelju dobivenih podataka o prosječnim dnevnim vrijednostima sa svih 14 postaja su se računale prosječne dnevne vrijednosti temperature u SDŽ ($TsredD$), a potom i prosječne mjesečne vrijednosti temperature u SDŽ ($TsredM$), prema formulama za izračun prosječnih mjesečnih vrijednosti:

$$TsredM = (TsredD1 + TsredD2 + \dots + TsredD28 + \dots + TsredD31) / \text{Broj dana u mjesecu } (TsredD) \quad (99) \quad (1.2)$$

Srednja godišnja temperatura je prosječna vrijednost svih dvanaest srednjih mjesečnih temperatura, i računa se prema izrazu:

$$TsredG = (TsredM1 + TsredM2 + \dots + TsredM11 + TsredM12) / 12 \quad (99) \quad (1.3.)$$

Na meteorološkim postajama **količina oborina** se mjeri jednom dnevno, ujutro u 7 sati. Prosječne mjesečne količine oborine u SDŽ dobiju se kao aritmetička sredina prosječnih dnevnih vrijednosti količine oborina izmjerenih na 14 postaja, prema gore navedenoj formuli (1.2.).

Srednje mjesečne količine oborina za razdoblje 2007. – 2012. u SDŽ dobiju se također izračunom aritmetičke sredine prosječnih mjesečnih količina oborina u SDŽ. To znači da primjerice zbrojimo sve prosječne mjesečne količine za siječanj i taj zbroj podijelimo s brojem godina za koje imamo podatke. Tako napravimo za svih 12 mjeseci i dobijemo srednje mjesečne višegodišnje količine oborina (99).

Na meteorološkom postajama se **relativna vlažnost zraka** mjerila tri puta dnevno, a prosječne dnevne, mjesečne, godišnje i višegodišnje vrijednosti relativne vlage u zraku su se dobile izračunom aritmetičke sredine, kao što je već opisano na primjeru izračuna prosječnih vrijednosti temperature (formule 1.1., 1.2., 1.3.) (99).

U statističkoj analizi su se koristile prosječne mjesečne vrijednosti meteoroloških parametara za svaku od šest godina u razdoblju 2007. do 2012. godine te ukupne prosječne vrijednosti meteoroloških parametara za šestogodišnje razdoblje 2007. – 2012. u SDŽ.

4.3. Izolati *Campylobacter jejuni* korišteni u ispitivanju osjetljivosti na antibiotike i genotipizaciji

Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike i genotipizacija izolata vrste *C. jejuni* provedeno je od 1.5. 2012. do 31.5. 2013. testiranjem 77 uzastopnih izolata *C. jejuni* hospitaliziranih bolesnika i 77 izolata ambulantnih bolesnika koji su izolirani istoga datuma kada i izolati hospitaliziranih bolesnika. Uzorak takve veličine obuhvaća 100% izolata hospitaliziranih bolesnika te 21% izolata ambulantnih bolesnika, što uz pretpostavku o 95% razini pouzdanosti osigurava toleranciju pogreške do 10% u ciljanoj populaciji. Do provođenja ispitivanja sojevi su bili pohranjeni u tekućoj podlozi Müller-Hinton bujon (Biolife, Italija) s dodatkom 20% glicerola (Merck, Njemačka) pri -80°C.

4.4. Mikrobiološki i molekularni postupci

Dijagnostički postupci, detaljnije opisani u nastavku teksta, provedeni su u istraživanju slijedećim redoslijedom:

1. Izolacija *Campylobacter* spp. iz uzorka proljevaste stolice standardnim mikrobiološkim postupkom,

2. Identifikacija vrsta *Campylobacter* spp. biokemijskim testovima,
3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika i osjetljivosti izoliranih sojeva *C. jejuni* metodom gradijent strip testa (E testom),
4. Određivanje makrorestriksijskih profila *C. jejuni* – genotipizacija metodom gel elektroforeze u pulsirajućem polju.

Ad 1) Izolacija *Campylobacter* spp. standardnim mikrobiološkim postupkom

Izolacija *Campylobacter* spp. iz uzorka proljevaste stolice provedena je kultivacijom na selektivnom hranilištu Karmali agar (Biolife, Italija) u mikroaerofilnoj atmosferi (6% O₂, 13% CO₂) koja je stvorena uporabom tvornički pripremljenih vrećica Genbox microaerof (bioMerieux, Francuska) i uz inkubaciju pri 42°C tijekom 48 sati.

Pozitivnim nalazom *Campylobacter* spp. je smatran porast sivo–smeđih, vlažnih, okruglih i nepravilnih, konfluirajućih kolonija bakterija koje su bile pozitivne u testu citokrom oksidaze i testu katalaze, a u mikroskopskom preparatu su bile gram-negativne i spiralno zavijene.

Ad 2) Identifikacija vrsta biokemijskim testovima

Za svaki izolat *Campylobacter* spp. urađen je test hidrolize hipurične kiseline u epruveti. Suspenzija ispitivanih izolata kampilobaktera i hipurične kiseline je inkubirana pri 37°C tijekom 2 sata, a potom su u suspenziju dodane 4 kapi ninhidrina (bioMerieux, Francuska). Razgradnja hipurične kiseline očitovala se promjenom boje suspenzije u ljubičastu i smatrala se pozitivnim nalazom (100). Budući da isključivo izolati *C. jejuni* imaju sposobnost razgradnje hipurične kiseline (100), sojevi kampilobaktera koji su bili pozitivni u tom testu identificirani su kao *C. jejuni*.

Za daljnju identifikaciju sojeva *Campylobacter* spp. koji su bili negativni u testu hidrolize hipurata, korišten je test hidrolize indoksil acetata i komercijalni niz biokemijskih testova Api Campy (bioMerieux, Francuska) čiji su rezultati uneseni u prateći računalni program koji je na temelju biokemijskih nalaza odredio vrstu.

Ad 3) Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika i osjetljivosti izoliranih sojeva *C. jejuni* metodom E testa

Ispitivanje antibiotske osjetljivosti kampilobaktera provedeno je u SDŽ i RH po prvi put za potrebe ove studije, metodološki u skladu s preporukama EQAS (engl. *External Quality Assurance System*) programa Referentnog laboratorija za ispitivanje antimikrobne osjetljivost EU za 2011. godinu (101).

Za metodu testiranja osjetljivosti na antibiotike odabran je gradijent – strip test (E-test®, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska), koji je kombinacija difuzijske i dilucijske metode, a rezultati su izraženi kvantitativno kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; µg/mL). Uspoređivan sa standardiziranim metodama dilucije u agaru i bujonu, test je pokazao dobru podudarnost rezultata, a izvedba je jednostavnija, jeftinija i brža od navedenih dilucijskih metoda (53). Za testiranje su odabrani antibiotici eritromicin, ciprofloksacin, tetraciklin i gentamicin. Kriterij odabira bili su učinkovitost u terapiji kampilobakterioze u ljudi (1, 43) i važnost u praćenju otpornosti prema međunarodno propisanim standardima (51-52), koje se provodi zbog epidemioloških razloga (evaluacije stopa otpornosti) i/ili otkrivanja novih mehanizama rezistencije.

3a) Izrada E testa

Trakica s antibiotikom adsorbiranim u gradijentu koncentracije je nanosena na Müller-Hinton agar s dodatkom 5% ovčje krvi (Liofilchem, Italija) na koji je potom nasijana suspenzija ispitivanog soja kampilobaktera. Za izradu suspenzije gustoće 1 McFarland je korišten BBL™ Brain heart infusion bujon (Becton, Dickinson and Company, SAD). Agar je inkubiran u mikroaerofilnim uvjetima 24 h. Tijekom inkubacije antibiotik difundira iz trake, pa se stvara gradijent koncentracije lijeka u podlozi.

3b) Očitavanje E testa

Prema očitanoj koncentraciji pojedinog testiranog antibiotika na mjestu gdje nastala elipsoidna zona inhibicije rasta siječe testnu trakicu, očita se minimalna inhibitorna koncentracija lijeka (MIK), a potom se osjetljivost interpretira kvalitativno (R-otporno; S-osjetljivo i I-umjereno osjetljivo) prema CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, SAD) kriterijima navedenim u Tablici 1 (51). Kao kontrolni soj

tijekom ispitivanja osjetljivosti sojeva *C. jejuni* na antibiotike korišten je soj American Type Culture Collection *C. jejuni* (ATTC) 33560.

Tablica 1. Referentne vrijednosti za interpretaciju antibiotske osjetljivosti *C. jejuni* prema CLSI-u (51)

Antibiotik, kratica	MIK ($\mu\text{g/mL}$)		
	S	I	R
Ciprofloksacin, CIP	≤ 1	2	≥ 4
Eritromicin, ERY	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicin, GEN	≤ 2	4	≥ 8
Tetraciklin, TET	≤ 4	8	≥ 16

Ad 4) Određivanje makrorestriksijskih profila *C. jejuni* – genotipizacija metodom gel elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE)

Izolirani sojevi *C. jejuni* analizirani su PFGE postupkom u svrhu utvrđivanja genotipova prema standardiziranom PFGE protokolu za *Campylobacter* spp. (102). PFGE je metoda genotipizacije kojom se čitav genom bakterije cijepa djelovanjem restriksijskih enzima. Time se dobiju vrlo veliki fragmenti DNK molekule – makrorestriksijski odsječci koji se razdvajaju elektroforezom pri posebnim uvjetima, tj. neprestanim mijenjanjem električnog polja.

4a) Izolacija DNK

Sojevi kampilobaktera subkultivirani su na Columbia krvnom agaru (Biolife, Milano, Italija) tijekom 24 sata na 42°C u mikroaerofilnim uvjetima. Od poraslih kolonija pripravljena je suspenzija u PBS puferu u koncentraciji 1×10^9 , mjereno prema standardu McFarland 5 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Po 400 μL pripravljene suspenzije svakog uzorka pomiješano je s 20 μL proteinaze K (20 mg/mL stock; Roche, Basel, Switzerland) i s 400 μL 1,7% LMP (od engl. *Low Melting Point*) agaroze (Bio-Rad,

Hercules, California) pripremljene u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Dobivena suspenzija je razlivena u jednokratne kalupe za oblikovanje agaroznih blokova.

Blokovi su prebačeni u epruvete s 5 mL CL pufera za lizu bakterijskih stanica (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 1% sarcosine, 0,1 mg proteinaze K/mL), čime je DNK izdvojena od proteina i drugih staničnih sastojaka (15).

4b) Restrikcija

Blokovi s DNK su potom izloženi restrikciji enzimom *SmaI* (New England Biolabs, Hitchin, Engleska). Za dio sojeva koji su nakon elektroforeze pokazali genotipsku sličnost $\geq 90\%$ urađena je dodatna restrikcija s *KpnI* enzimom (New England Biolabs, Hitchin, Engleska). Blokovi kontrolnog soja *Salmonella* Braenderup ATTC H9812 pripremljeni su na jednak način kao i blokovi sojeva *C. jejuni*, a za njihovu restrikciju je korišten enzim *XbaI* (New England Biolabs, Hitchin, Engleska).

4c) Elektroforeza

Nakon restrikcije blokovi su uklopljeni u 1,4% agarozni gel za PFGE (Certified PFGE agarose, Bio-Rad, Njemačka) pripremljen u 0,5 x TBE puferu (Bio-Rad, Njemačka).

Makrorestriksijski odsječci su razdvojeni elektroforezom na gelu u CHEF DRII/III sustavu (Bio-Rad, Njemačka) pod kutom od 120°, naponom od 5,5 V pri 14°C kroz 19 sati. Pulsno vrijeme bilo je od 6,75 s do 38,3 s za restrikciju sa *SmaI* i od 5,2 s do 42,3 s za restrikciju sa *KpnI*.

4d) Analiza makrorestriksijskih profila (engl. *Macrorestriction Profile*, MRP)

Agarozni gelovi su obojani u 400 mL otopine etidij-bromida (50 µg/mL), a potom su, pomoću sustava za dokumentiranje gelova (Gel DOC 1000 system, Bio-Rad, Hercules, SAD), osvijetljeni UV svjetlom, digitalno fotografirani i pohranjeni u obliku elektroničkog TIFF dokumenta.

U analizi su u obzir uzeti samo fragmenti čija je veličina bila u rasponu od 33,3-1135 kb kod restrikcije sa *SmaI*, odnosno u rasponu od 33,3-668,9 kb kod restrikcije s *KpnI*.

Dobiveni makrorestriksijski profili sojeva su analizirani pomoću računalnog programa „Molecular Analyst Fingerprinting II Software“ (Bio-Rad, Hercules, SAD), na temelju usporedbe sa kontrolnim sojem *S. enterica* Branderup H9812.

Sojevi su svrstani u skupine prema metodi za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti (engl. *Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*, UPGMA), te je izrađen dendogram. Preklapanje i UPGMA analiza dendograma su obavljani korištenjem Dice-ovog koeficijenta korelacije (102).

Svi sojevi čiji su makrorestriksijski profili pokazivali sličnost od $\geq 90\%$ nakon restrikcije sa *SmaI* enzimom smatrali su se podudarnim te su svrstani u iste S skupine. Sojevi koji pripadaju istoj S skupini potom su pocijepani restrikcijskim enzimom *KpnI*, a oni izolati koji su pokazali podudarnost $\geq 90\%$ i nakon restrikcije s *KpnI* su smatrani genotipski identičnima i svrstani su u iste klonske grupe označene tiskanim slovima abecede (45).

Za određivanje genetske raznolikosti populacija bakterije *Campylobacter jejuni* korišten je Simpsonov indeks raznolikosti koji izražava vjerojatnost da dvije nasumično odabrane jedinice pripadaju različitim vrstama. Za izračun Simpsonovog indeksa (D) primijenjena je modificirana jednadžba po Hunteru koju su u svojim istraživanjima koristili Denis i suradnici (103-104).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

Gdje je:

N= ukupan broj testiranih sojeva *C. jejuni*

S= broj različitih genotipova *C. jejuni*

nj= broj sojeva koji pripadaju točno određenom genotipu *C. jejuni*

4.5. Statistički postupci

U analizi podataka korištene su metode opisne i inferencijalne statistike.

U opisnoj statistici kvantitativnih podataka korištene su: aritmetička sredina i standardna devijacija, medijan i interkvartilni raspon, ovisno o razdiobi podataka. Za opis kvalitativnih podataka korištene su apsolutna i relativna frekvencija.

Prosječne mjesečne vrijednosti temperature zraka, relativne vlažnosti zraka i količine oborina izračunate su za svaki mjesec pojedine kalendarske godine u razdoblju od 1.1.2007. do 31.12.2012. (N=72), te su prema tim podacima su rađene usporedbe vrijednosti meteoroloških parametara između godina.

Kruskal-Wallisov test je korišten da bi se ispitalo jesu li meteorološki parametri: temperatura zraka, vlažnost zraka, količina oborina značajno odstupali svojim prosječnim mjesečnim vrijednostima između različitih godina, što je zapravo činilo 15 različitih usporedaba, budući se radilo o usporedbi 6 kalendarskih godina. Nadalje, budući da je Kolmogorov-Smirnovim testom dokazano da prosječne mjesečne vrijednosti meteoroloških varijabli (temperatura zraka, relativna vlažnost zraka i količina oborina), te mjesečni broj izolata kampilobaktera, ne odstupaju značajno od normalne distribucije, moglo se računati i povezanosti, tj. Pearsonov koeficijent korelacije. Povezanosti između prosječnih mjesečnih vrijednosti meteoroloških parametara i broja izolata su izražene Pearson-ovim korelacijskim koeficijentom (r).

Za testiranje povezanosti incidencija kampilobakterioze i indikatora poljoprivredne aktivnosti je također je korištena Pearsonova korelacijska analiza, a rezultati su izraženi korelacijskim koeficijentom (r).

Statistički značajne razlike između ukupnih prosječnih stopa incidencije za razdoblje 2007. - 2012. godine prema dobi, spolu i području te razlike između godišnjih stopa incidencije su testirane hi-kvadrat (χ^2) testom.

U dijelu istraživanja u kojem su analizirane molekularno-mikrobiološke značajke izolata *C. jejuni*, korišteni su hi-kvadrat test i Fisherov egzaktni test kako bi se procijenile povezanosti između kvalitativnih varijabli.

Razlike u učestalosti vrsta izoliranih u ambulantnom i bolničkom uzorku izolata *C. jejuni* korištenim za određivanje molekularno-mikrobioloških značajki testirane su hi-kvadrat testom uz korekciju za nejednaku veličinu uzorka. Mann-Whitney test je korišten za procjenu razlika u dobi između tih grupa bolesnika. Uzimajući u obzir broj izolata u određenim klonskim grupama, vjerojatnost da bi se u istoj klonskoj grupi mogli slučajno naći isključivo korezistentni izolati je procijenjena prema postotku rezistencije u ukupnom uzorku izolata *C. jejuni* u kojem se ispitala otpornost na antibiotike (N = 153).

U identifikaciji genotipova korišten je komercijalni programski paket „Molecular Analyst Fingerprinting II Software“ (Bio-Rad, Hercules, USA), a pouzdanost konačnog dendograma procijenjena je permutacijskim testom u programu R 3.2.2. (R Development Core Team 2015, <http://www.r-project.org>) (105). Uz binomni test za pojedinačne

genotipove, raznolikost genotipova *C. jejuni* između bolničkog i ambulantnog uzorka procijenjena je i Simpsonovim indeksom raznolikosti uobičajenim kod ovakvih analiza.

Sve procijenjene vrijednosti izražene su uz 95% - tni raspon pouzdanosti. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti $P < 0,05$. Analize su izrađene uz pomoć statističkih programa Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, USA), MedCalc Version 17.5.3. (MedCalc Software, Ostend, Belgija) (106) i VassarStats (Lowry R. The VassarStats website for statistical computation, Poughkeepsie, New York, SAD) (107).

4.6. Etička načela

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

Istraživanje je odobreno odlukama Etičkog povjerenstva NZZJZ SDŽ (klasa: 500-01/13-01/10, ur.br.: 2181-103-01-13-3 od 9.9.2013.) i Etičkog povjerenstva KBC Split (klasa: 500-03/13-01/02; ur.br.: 2181-147-01/06/J.B.-14-2 od 24.2.2014.).

Istraživanje je većim dijelom plaćeno sredstvima NZZJZ SDŽ temeljem Ugovora o upućivanju na doktorski studij (klasa 643-03/05-01/01, ur.br. 2181-103-01-05-4), a dio laboratorijskih troškova i troškova za edukaciju je podmiren donacijama te osobnim sredstvima.

5. REZULTATI

5.1. Epidemiološke značajke kampilobakterioze u Splitsko-dalmatinskoj županiji

U razdoblju od 2007. do 2012. godine u SDŽ je bilo 2812 bolesnika s laboratorijski potvrđenom infekcijom kampilobakterom. Sto pedeset četiri bolesnika koji nisu imali mjesto prebivališta u SDŽ ili nisu imali potpune demografske podatke su isključeni iz istraživanja jer nisu zadovoljavali kriterije uključenja.

Stoga je konačni broj bolesnika s laboratorijski potvrđenom infekcijom kampilobakterom u SDŽ od 2007. do 2012. godine bio 2658, a ukupna prosječna stopa incidencije kampilobakterioze u SDŽ tom razdoblju je bila 96/100 000 stanovnika (Tablica 2).

Tablica 2. Ukupne prosječne incidencije kampilobakterioze u Splitsko–dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. prema područjima

Područje	Broj izolata	Ukupna prosječna incidencija 2007.-2012./ 100 000	Urbano/Suburbano		Suburbano/Ruralno		Urbano/Ruralno	
			Razlika incidencija (95% CI)	P vrijednost	Razlika incidencija (95% CI)	P vrijednost	Razlika incidencija (95% CI)	P vrijednost
Urbano	1403	131	45,5 (36,5-54,5)	< 0,001	24,7 (16,4-32,9)	< 0,001	70,2 (61,2-79,2)	< 0,001
Suburbano	835	86						
Ruralno	420	61						
Ukupno SDŽ	2658	96						

*CI = *Confidence Interval* (raspon pouzdanosti).

Ambulantnih bolesnika je bilo 2108 (79%), a hospitaliziranih 550 (21%). Većinu infekcija kampilobakterom uzrokovali su *C. jejuni* (82,4%) i *C. coli* (1,8%), ostali dokazani uzročnici bili su *C. upsaliensis*, *C. lari* i *C. fetus* (< 0,1%), dok je 15,5% izolata je identificirano kao *Campylobacter* spp. (15,5%).

5.1.1. Raspodjela oboljelih prema području

Broj oboljelih od kampilobakterioze statistički se značajno razlikovao između urbanog, suburbanog i ruralnog područja županije ($\chi^2= 234$; $df = 2$; $P < 0,001$). Razlike stopa incidencija između svih promatranih područja su bile statistički značajne (Tablica 2). Ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u urbanom području (131/100 000 stanovnika) je bila statistički značajno veća nego u suburbanom (86/100 000 stanovnika) i ruralnom području (61/100 000 stanovnika) ($P < 0,001$) (Tablica 2), a ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u suburbanom području bila je statistički značajno veća nego u ruralnom području ($P < 0,001$) (Tablica 2).

5.1.2. Raspodjela oboljelih prema spolu

Prosječna stopa incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. – 2012. godine u muškaraca (111/100 000 stanovnika) u SDŽ je bila statistički značajno veća od prosječne stope incidencija kampilobakterioze u žena (81/100 000 stanovnika) ($P < 0,001$) (Tablica 3).

Tablica 3. Prosječne incidencije kampilobakterioze u Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. prema spolu i području

Područje	Broj izolata		Prosječna incidencija 2007.-2012. / 100 000		Usporedba M/Ž	
	M	Ž	M	Ž	Razlika incidencija (95% CI)	P vrijednost
Urbano	785	618	155	110	45,0 (31,0 - 58,7)	< 0,001
Suburbano	475	360	99	73	26,7 (14,6 - 37,9)	< 0,001
Ruralno	240	180	70	52	18,3 (6,4 - 29,8)	< 0,001
Ukupno SDŽ	1.500	1.158	111	81	30,0 (22,2 - 36,9)	< 0,001

*M – muškarci, Ž – žene.

†CI = *Confidence Interval* (raspon pouzdanosti).

Također, postojala je statistički značajna razlika u razdiobi muškaraca oboljelih od kampilobakterioze između urbanog, suburbanog i ruralnog područja županije ($\chi^2 = 143,1$; $df = 2$; $P < 0,001$). Statistički se značajno razlikovao i broj žena oboljelih od kampilobakterioze u urbanom, suburbanom i ruralnom području SDŽ ($\chi^2 = 96$; $df = 2$; $P < 0,001$).

U svim područjima Splitsko-dalmatinske županije: urbanom, suburbanom i ruralnom, prosječne stope incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. – 2012. godine u muškaraca su bile statistički značajno veće nego u žena ($P < 0,001$) (Tablica 3). U oba spola prosječne stope incidencije kampilobakterioze su u urbanom području bile statistički značajno veće nego u suburbanom i ruralnom području ($P < 0,001$), a u suburbanom području su bile statistički značajno veće nego u ruralnom području ($P < 0,001$) (Tablica 3).

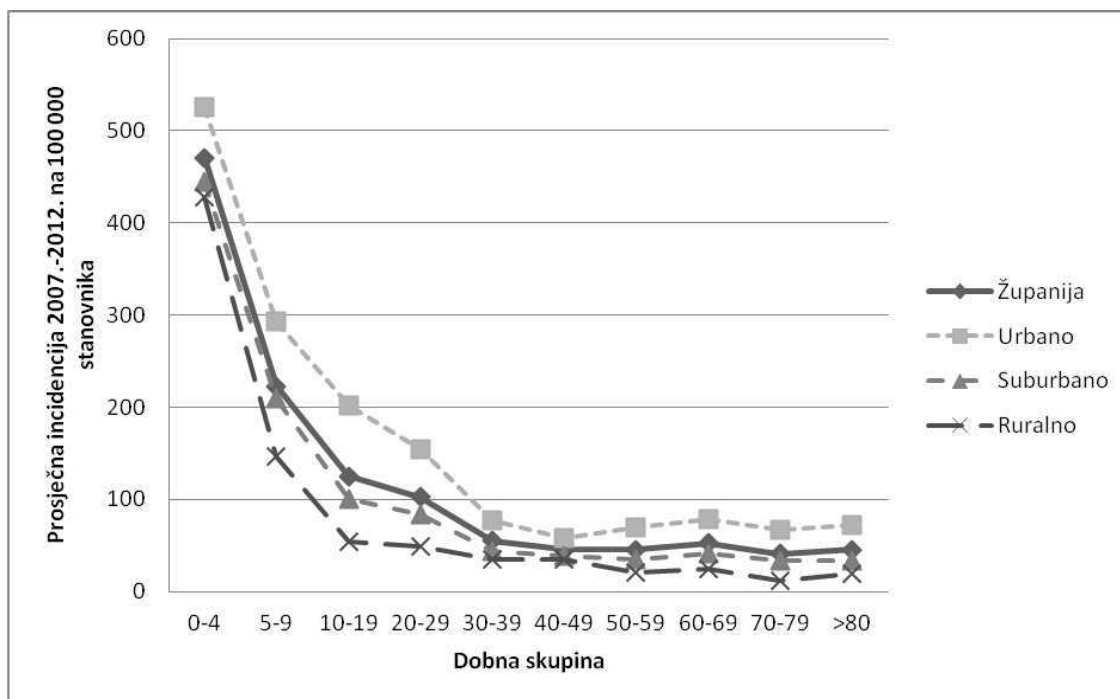
5.1.3. Raspodjela oboljelih prema dobi

Najveća stopa incidencije kampilobakterioze prema dobi u SDŽ u razdoblju 2007. - 2012. godine zabilježena je u dobnoj skupini od 0 do 4 godine (470/100 000). Stope incidencije oboljelih od kampilobakterioze u SDŽ u dobnim skupinama 40 - 49, 50 - 59, 60 - 69, 70 - 79 i ≥ 80 godina se međusobno nisu statistički značajno razlikovale ($P > 0,062$), pa smo u daljnjoj analizi sve oboljele starije od 40 godina svrstali u jednu jedinstvenu dobnu skupinu (≥ 40 god.) s prosječnom incidencijom 46/100 000 stanovnika (Tablica 4). Stope incidencije kampilobakterioze u dobnim skupinama 0 - 4, 4 - 9, 10 - 19, i 20 - 29 godina u svim područjima SDŽ, u usporedbi sa svim starijim dobnim skupinama, bile su statistički značajno veće ($P < 0,001$) (Tablica 4, Slika 2).

Tablica 4. Prosječne incidencije kampilobakterioze u Splitsko–dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. prema dobi i području

Dobna skupina (godine)	Broj izolata			Prosječna incidencija 2007.-2012. / 100 000			Razlika incidencija između područja (95% CI); P vrijednost					
	Urbano	Sub-urbano	Ruralno	Urbano	Sub-urbano	Ruralno	Urbano/ Suburbano		Suburbano/ Ruralno		Urbano/ Ruralno	
0 - 4	275	245	158	526	445	428	81,1 (-1,2-163,3)	0,060	16,6 (-69,2-102,5)	0,700	97,7 (7,8-187,7)	0,040
5 - 9	148	113	55	293	209	147	83,5 (23,1-144,0)	0,007	62,0 (7,5-116,4)	0,040	145,5 (84,8-206,2)	< 0,001
10 - 19	244	119	48	202	100	54	102,0 (71,1-132,9)	< 0,001	45,5 (21,9-69,0)	< 0,001	147,5 (118,0-177,0)	< 0,001
20 - 29	212	109	43	155	84	49	70,6 (44,5-96,6)	< 0,001	35,5 (14,1-57,0)	0,003	106,1 (80,8-131,4)	< 0,001
30 - 39	114	59	29	78	44	35	34,2 (16,1-52,2)	< 0,001	8,9 (-7,9-25,7)	0,570	43,1 (24,0-62,1)	< 0,001
≥ 40	383	178	83	68	37	24	19,5 (3,4-35,6)	< 0,001	13,3 (6,6-21,7)	< 0,001	22,3 (5,0-39,6)	< 0,001
Ukupno (sve dobi)	1,403	835	420	131	86	61	45,5 (36,5-54,5)	< 0,001	24,7 (16,4-32,9)	< 0,001	70,2 (61,2-79,2)	< 0,001

*CI = *Confidence Interval* (raspon pouzdanosti).



Slika 2. Prosječne incidencije laboratorijski potvrđenih kampilobakteriozu Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. prema dobnim skupinama i područjima.

[Incidencije urbano vs. suburbano značajno veće ($P < 0,007$) osim u dobnj skupini 0 – 4. Incidencije u suburbano vs. ruralno značajno veće ($P < 0,040$) osim u dobnim skupinama 0 – 4 i 30 – 39. Incidencije urbano vs. ruralno značajno veće ($P < 0,040$) u svim dobnim skupinama].

U svim dobnim skupinama prosječne stope incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. - 2012. godine u urbanim područjima županije su bile statistički značajno veće nego u ruralnim područjima ($P < 0,040$). Također su bile i statistički značajno veće nego stope incidencije u suburbanim područjima ($P < 0,007$), osim u dobnj skupini 0 - 4 godine (Tablica 4, Slika 2). U toj najmlađoj dobnj skupini nije bilo statistički značajne razlike između prosječnih stopa incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. - 2012. godine u urbanim (526/100 000) i suburbanim područjima (445/100 000) ($P = 0,060$), niti između stopa incidencije u suburbanim i ruralnim područjima (428/100 000) SDŽ ($P = 0,700$) (Tablica 4). Također, u dobnj skupini 30 - 39 godina nije bilo statistički značajne razlike između prosječnih stopa incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. - 2012. godine u suburbanim i ruralnim područjima SDŽ ($P = 0,570$) (Tablica 4), dok je u svim ostalim dobnim skupinama incidencija kampilobakterioze u suburbanom području viša nego u ruralnom ($P < 0,040$) (Tablica 4).

5.1.4. Kretanje godišnjih stopa incidencije kampilobakterioze 2007.-2012.

Godišnje stope incidencija kampilobakterioze u SDŽ te njenom urbanom, suburbanom i ruralnom području od 2007. do 2012. godine su prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Godišnje stope incidencije kampilobakterioze na 100 000 stanovnika prema područjima Splitsko-dalmatinske županije

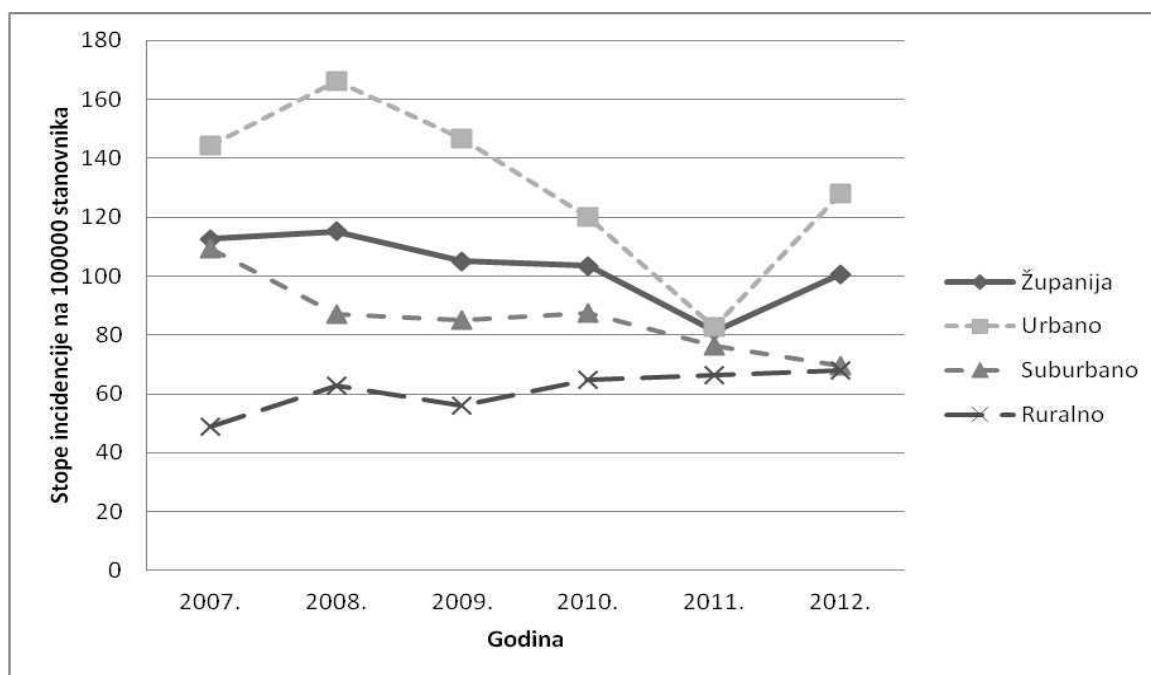
Godina	Godišnje stope incidencije kampilobakterioze / 100 000 stanovnika prema područjima SDŽ			
	SDŽ ukupno	Urbano	Suburbano	Ruralno
2007.	108	144	109	49
2008.	112	166	87	63
2009.	102	147	85	56
2010.	95	120	88	65
2011.	76	83	76	66
2012.	92	128	70	68

*Splitsko-dalmatinska županija.

Statistički značajan pad incidencije kampilobakterioze u SDŽ je zabilježen između 2007. i 2012. godine. Naime, najveća stopa incidencije kampilobakterioze zabilježena je 2008. godine (112/100 000 stanovnika), a statistički značajno manje stope incidencije 2010. godine (razlika incidencija = 17,4; 95% CI = 8 – 26; P = 0,012), 2011. godine (razlika incidencija = 35,6; 95% CI = 28 – 44; P < 0,001) i 2012. godine (razlika incidencija = 19,8; 95% CI = 11 – 29; P = 0,003) (Tablica 5). U 2011. godini je stopa incidencije kampilobakterioze u SDŽ bila najmanja (76/100 000). Iako je stopa incidencije 2012. godine također bila statistički značajno manja nego 2008. godine, te se godine dogodio statistički značajan porast incidencije kampilobakterioze u SDŽ u odnosu na prethodnu 2011. godinu (razlika incidencija = 15,8; 95% CI = 7 - 25; P = 0,011).

U razdoblju između 2007. i 2012. godine u urbanom (razlika incidencija = 38,2; 95% CI = 22 - 55, P = 0,003) i suburbanom području (razlika incidencija = 39,5; 95% CI

= 27 - 52, $P < 0,001$) SDŽ također je zabilježen pad godišnjih stopa incidencije, tj. na početku razdoblja, 2007. i 2008. godine, su godišnje stope incidencije kampilobakterioze bile statistički značajno veće od godišnjih stopa incidencije 2011. i 2012. godine (Tablica 5, Slika 3). U ruralnom području SDŽ nije bilo statistički značajnih razlika između godišnjih stopa incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2007. – 2012. godine (razlika incidencija = 19,2; 95% CI = 4 - 34, $P = 0,070$) (Slika 3).



Slika 3. Godišnje incidencije kampilobakterioze od 2007. do 2012. u Splitsko-dalmatinskoj županiji prema područjima.

[Incidencije urbano vs. suburbano i ruralno značajno veće u svim godinama razdoblja ($P < 0,001$) osim u 2011. Incidencije suburbano vs. ruralno značajno veće u svim godinama razdoblja ($P < 0,040$) osim u 2011. i 2012.]

5.1.5. Povezanost prosječne mjesečne temperature, relativne vlažnosti i količine oborina u SDŽ s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera u razdoblju od 2007. do 2012. godine

U Tablici 6 su prikazane prosječne mjesečne vrijednosti osnovnih meteoroloških parametara: temperature zraka, relativne vlažnosti zraka i količine oborina te ukupan mjesečni broj izolata kampilobaktera u Splitsko-dalmatinskoj županiji od 2007. do 2012. godine.

Tablica 6. Prosječne mjesečne vrijednosti temperature zraka, relativne vlažnosti zraka količine oborina i mjesečni broj izolata *Campylobacter* spp. u Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. godine

	Mjeseci											
Godina 2007.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	8,9	9,9	11,4	15,9	19,6	24,0	26,7	25,3	18,6	15,1	9,7	6,7
(M, Sd)	(3,0)	(2,2)	(2,6)	(2,4)	(3,1)	(3,2)	(3,2)	(2,8)	(3,1)	(3,8)	(3,9)	(3,5)
Vlažnost (%)	75,5	72,9	71,4	63,5	65,0	63,1	50,9	58,9	62,6	67,7	66,9	67,9
(M, Sd)	(11,6)	(15,1)	(14,5)	(10,1)	(12,3)	(10,9)	(9,9)	(11,9)	(12,5)	(14,1)	(14,1)	(15,4)
Oborine (mm)	6,8	11,1	14,1	3,9	11,4	2,5	11,1	8,3	6,6	8,9	11,5	9,3
(M, Sd)	(2,9)	(5,3)	(4,3)	(3,0)	(5,3)	(1,2)	(15,9)	(7,8)	(2,0)	(3,4)	(3,9)	(3,4)
Broj izolata (n)	31	29	46	32	54	70	48	52	39	42	47	22
	Mjeseci											
Godina 2008.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	8,3	8,2	10,7	14,0	19,4	22,9	25,6	25,9	19,7	16,8	12,2	9,1
(M, Sd)	(3,2)	(3,5)	(2,8)	(2,3)	(3,0)	(3,9)	(3,0)	(2,4)	(5,2)	(2,4)	(4,7)	(3,8)
Vlažnost (%)	74,3	67,7	72,3	70,9	62,3	68,8	56,5	54,1	59,3	71,6	72,5	69,4
(M, Sd)	(16,2)	(15,7)	(11,5)	(13,4)	(12,6)	(11,7)	(9,2)	(8,7)	(11,2)	(8,7)	(13,8)	(15,5)
Oborine (mm)	8,9	4,5	10,2	10,3	4,1	12,7	4,8	1,1	10,5	5,8	17,9	15,2
(M, Sd)	(5,8)	(2,6)	(4,4)	(3,4)	(1,8)	(5,0)	(3,4)	(1,4)	(8,1)	(4,7)	(5,9)	(7,8)
Broj izolata (n)	20	23	19	49	60	77	53	49	39	46	35	54
	Mjeseci											
Godina 2009.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	7,9	6,5	9,9	14,9	20,4	21,4	25,5	26,3	21,9	15,2	11,8	8,9
(M, Sd)	(3,5)	(4,0)	(2,8)	(2,0)	(3,6)	(2,9)	(2,5)	(2,0)	(2,2)	(4,2)	(2,7)	(4,8)
Vlažnost (%)	74,1	64,8	65,2	71,9	59,6	67,1	59,4	58,0	64,3	65,0	79,4	73,8
(M, Sd)	(13,9)	(17,0)	(16,5)	(12,3)	(10,3)	(13,5)	(12,5)	(9,3)	(12,9)	(14,7)	(8,9)	(13,0)
Oborine (mm)	14,5	8,3	7,9	5,9	8,1	13,6	4,4	4,2	8,9	17,6	12,7	11,3
(M, Sd)	(4,1)	(2,7)	(3,6)	(1,5)	(4,7)	(5,7)	(3,1)	(2,4)	(5,6)	(8,9)	(4,3)	(5,8)
Broj izolata (n)	28	38	36	30	23	62	67	41	33	62	31	27
	Mjeseci											
Godina 2010.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	6,2	7,8	9,8	14,2	17,7	22,2	25,9	25,2	20,0	15,0	13,1	7,4
(M, Sd)	(3,5)	(3,3)	(3,7)	(2,9)	(2,6)	(3,5)	(2,8)	(2,7)	(2,4)	(3,3)	(3,6)	(5,5)
Vlažnost (%)	71,7	75,1	68,7	66,6	66,3	61,6	55,7	56,5	64,3	69,2	80,6	70,7
(M, Sd)	(15,5)	(13,3)	(15,0)	(12,8)	(11,0)	(10,1)	(9,2)	(8,8)	(12,1)	(13,3)	(8,1)	(16,9)
Oborine (mm)	14,9	12,9	12,0	8,9	8,5	7,4	12,1	6,5	14,1	8,5	14,6	10,5
(M, Sd)	(6,5)	(4,4)	(7,6)	(3,9)	(5,0)	(3,7)	(11,5)	(4,6)	(5,9)	(3,4)	(6,0)	(4,1)
Broj izolata (n)	29	31	40	44	48	40	47	41	28	44	38	40

	Mjeseci											
Godina 2011.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	7,3	8,0	10,3	15,5	18,8	23,7	24,6	26,1	24,1	16,1	11,9	9,5
(M, Sd)	(3,5)	(3,1)	(3,4)	(2,5)	(3,4)	(2,2)	(3,6)	(2,4)	(2,6)	(3,8)	(3,4)	(4,0)
Vlažnost (%)	72,8	66,4	65,6	58,5	62,4	58,8	60,0	58,0	61,4	65,3	71,9	71,1
(M, Sd)	(14,0)	(15,7)	(15,0)	(14,0)	(13,0)	(11,8)	(12,4)	(9,8)	(10,3)	(17,2)	(13,0)	(15,65)
Oborine (mm)	4,6	7,9	8,9	3,2	9,8	11,2	10,9	1,4	10,6	12,1	21,0	7,2
(M, Sd)	(1,8)	(4,7)	(4,6)	(2,1)	(4,7)	(10,9)	(3,8)	(2,1)	(4,9)	(4,9)	(8,4)	(3,2)
Broj izolata (n)	10	11	18	31	44	48	33	33	29	48	31	18
	Mjeseci											
Godina 2012.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	6,4	4,0	12,4	13,3	17,9	24,5	27,9	27,0	21,8	17,0	14,5	7,6
(M, Sd)	(3,3)	(5,0)	(2,7)	(3,5)	(3,0)	(3,3)	(2,4)	(2,4)	(3,0)	(3,5)	(2,9)	(3,6)
Vlažnost (%)	62,7	64,5	57,3	71,2	64,0	60,4	54,1	50,9	65,3	75,3	74,5	65,5
(M, Sd)	(16,2)	(14,6)	(15,0)	(13,8)	(11,7)	(10,9)	(11,8)	(10,3)	(11,9)	(10,8)	(11,4)	(15,9)
Oborine(mm)	5,7	6,5	2,5	8,8	5,4	11,0	3,9	0,4	13,5	13,0	8,4	13,8
(M, Sd)	(2,6)	(3,3)	(2,2)	(3,9)	(1,5)	(8,5)	(2,9)	(0,6)	(3,7)	(5,0)	(5,6)	(3,7)
Broj izolata (n)	22	8	23	29	59	57	50	41	40	39	46	26

Korištenjem Kruskal-Wallisovog testa za nezavisne uzorke dokazano je da između pojedinih godina u razdoblju od 2007. do 2012. godine nisu postojala značajna odstupanja u prosječnim mjesečnim vrijednostima temperature zraka ($P = 0,998$), relativne vlažnosti zraka ($P = 0,793$) i količine oborina ($P = 0,524$), odnosno da se te godine nisu međusobno statistički značajno razlikovale prema tim varijablama.

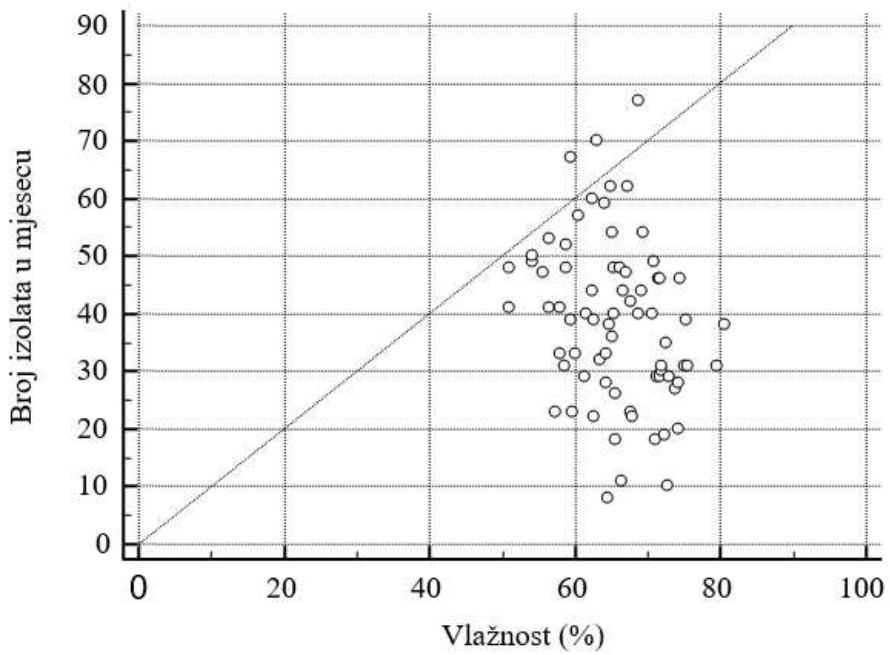
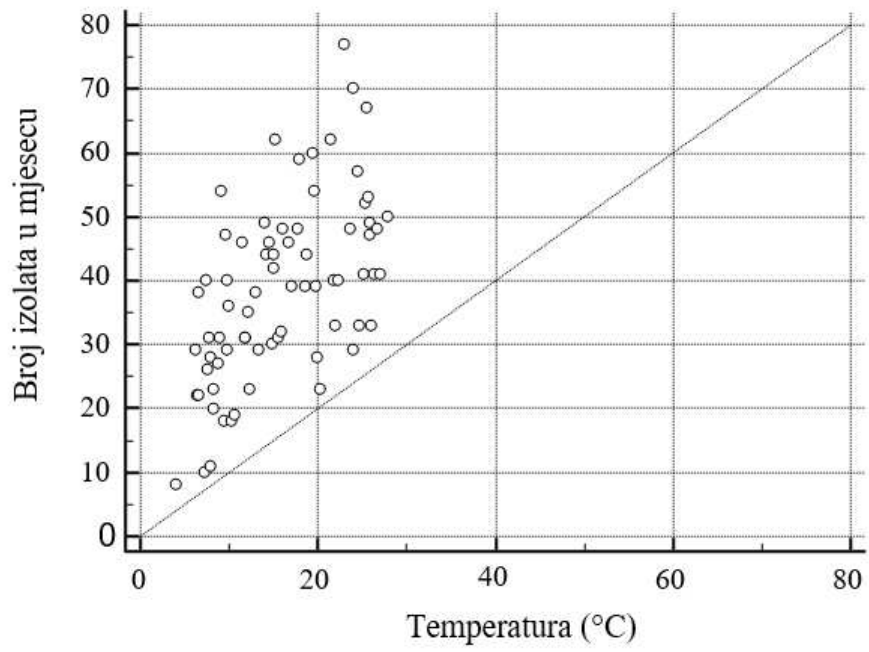
U Tablici 7. su prikazane vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) za povezanost prosječnih mjesečnih vrijednosti temperature zraka, relativne vlažnosti zraka, količine oborina s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera u razdoblju od 2007. do 2012. godine, odnosno za 72 mjeseca.

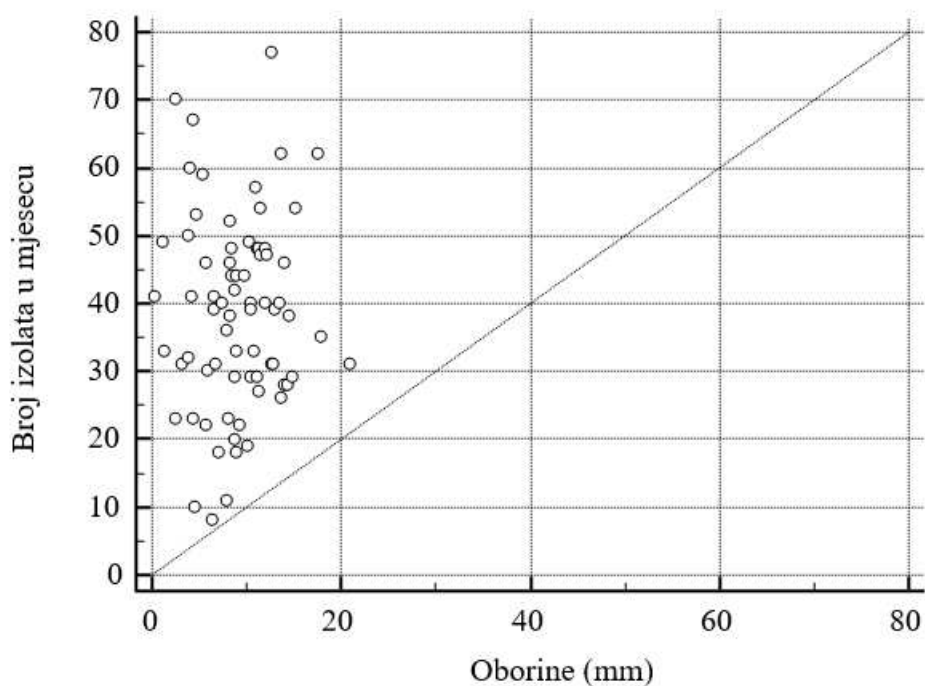
Tablica 7. Vrijednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije (r, 95% CI) za povezanost prosječne mjesečne temperature zraka, relativne vlažnosti zraka, oborina i mjesečnog broja izolata kampilobaktera u Splitsko–dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. (N = 72).

	TEMPERATURA	VLAŽNOST	OBORINE	BROJ IZOLATA
	r (95% CI), P vrijednost			
TEMPERATURA r, (95% CI), P	1	-0,70 (-0,80 do -0,56) P < 0,001	-0,28 (-0,47 do -0,04) P = 0,022	0,58 (0,40 do 0,72) P < 0,001
VLAŽNOST r, (95% CI), P		1	0,49 (0,29 do 0,64) P < 0,001	-0,27 (-0,48 do -0,05) P = 0,017
OBORINE r, (95% CI), P			1	0,04 (-0,19 do 0,27) P = 0,721
MJESEČNI BROJ IZOLATA				1

Prema vrijednostima koeficijenta korelacije (Tablica 7), prosječna mjesečna temperatura zraka bila je umjereno pozitivno povezana s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera. Relativna vlažnost zraka je bila slabo negativno povezana s mjesečnim brojem izolata, dok treća meteorološka varijabla – prosječna mjesečna količina oborina, nije bila statistički značajno povezana s brojem izolata kampilobaktera (Tablica 7).

Na takvu povezanost ukazuje i prikaz odnosa tih varijabli točkastim grafikonom (Slika 4), te Slika 5 a-d.



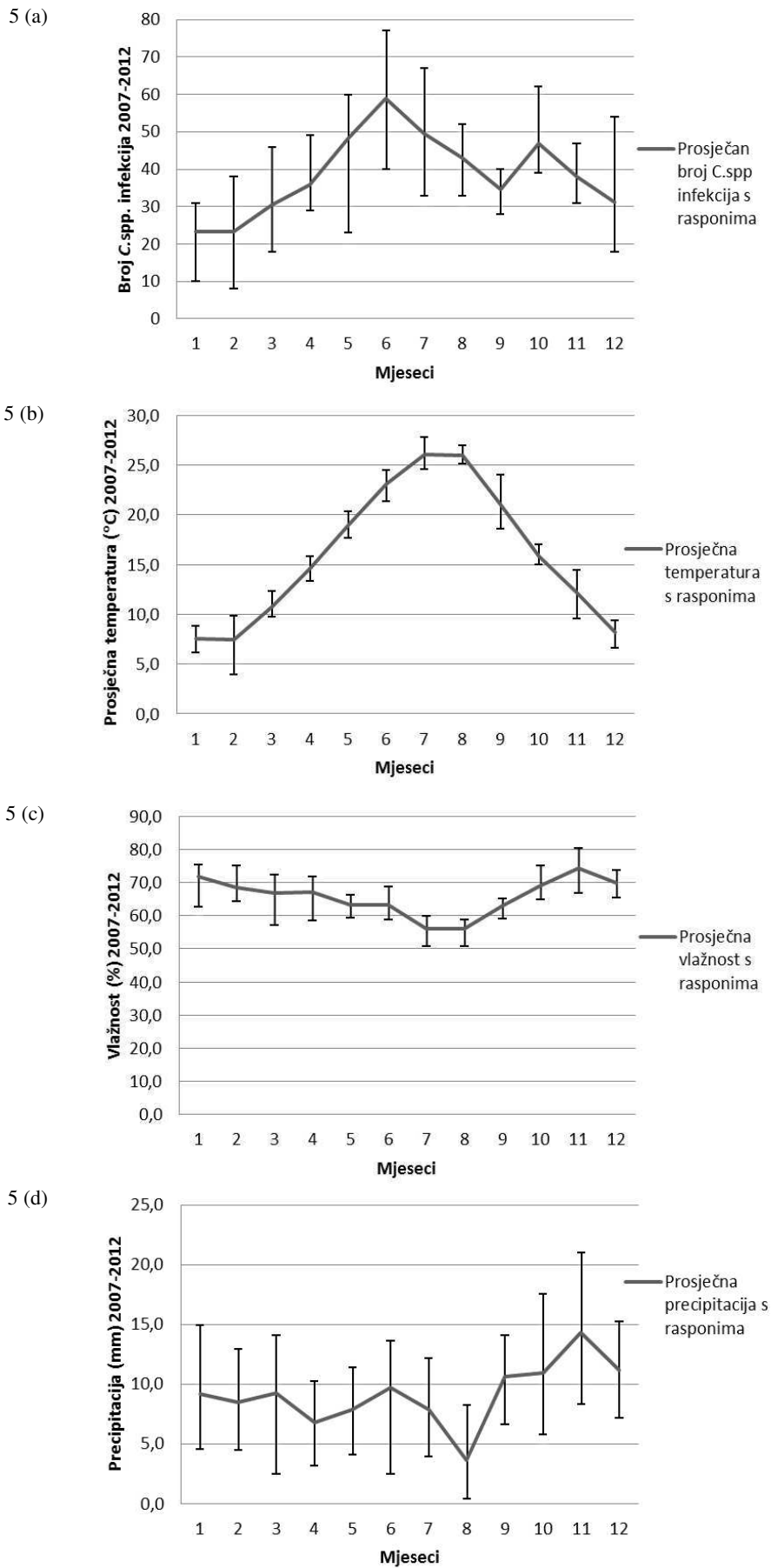


Slika 4. Prikaz povezanosti mjesečnog broja izolata *Campylobacter* spp. i temperature, vlažnosti i oborina točkastim dijagramom (N = 72).

Većina infekcija kampilobakterima (1915 ili 72%) u SDŽ od 2007. do 2012. godine je zabilježena između travnja i listopada, odnosno u toplijem razdoblju godine (Tablica 6, slika 4 a), što odgovara ljetnom sezonskom kretanju ove bolesti u SDŽ (108). Najviše infekcija tijekom šestogodišnjeg razdoblja istraživanja je bilo u lipnju (354 ili 18,5%) i svibnju (288 ili 15%) (Tablica 6, Slika 4 a).

Porast broja infekcija kampilobakterima u SDŽ se događao usporedo s porastom prosječnih mjesečnih temperatura zraka od veljače do lipnja, kada doseže vrhunac. Međutim, najviše vrijednosti prosječnih mjesečnih temperatura zraka u SDŽ od 2007. do 2012. godine su zabilježene kasnije, u srpnju i kolovozu (Slika 5 a-d). Takvi rezultati, kao i prethodno navedene vrijednosti koeficijenta korelacije (Tablica 7), sugeriraju da je porast broja infekcija kampilobakterima umjereno, ali ne i u potpunosti povezan s porastom temperature zraka, odnosno je ta korelacija nelinearna.

Uz to, što je bila manja vlažnost u određenom mjesecu, to je bio zabilježen i veći broj izolata u tom mjesecu, dok količina oborina nije bila povezana s ostalim varijablama (Slike 4, 5 a-d).



Slika 5 a–d. Prosječni mjesečni broj i rasponi između najnižeg i najvišeg broja laboratorijski potvrđenih infekcija kampilobakterom (a), prosječne mjesečne vrijednosti i rasponi između najniže i najviše prosječne mjesečne vrijednosti temperature zraka (b), relativne vlažnosti zraka (c) i količine oborina (d) u SDŽ u razdoblju 2007. – 2012. godine.

5.1.6. Povezanost veličine i korištenosti poljoprivrednog zemljišta i incidencije kampilobakterioze

Za potrebe prikaza i statističke analize ovog dijela podataka, urbano, suburbano i ruralno područje podijelili smo na 11 manjih teritorijalnih cjelina koje čine gradovi Splitsko-dalmatinske županije s gravitirajućim općinama i naseljima. U Tablici 8 su prikazane ukupna površina poljoprivrednog zemljišta, površina korištenog poljoprivrednog zemljišta i stope incidencija u tim teritorijalnim cjelinama unutar županije.

Tablica 8. Veličina, iskorištenost poljoprivrednog zemljišta i godišnje incidencije kampilobakterioze u Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. godine prema područjima

Područje/ Teritorijalna jedinica	Ukupna površina zemljišta (ha)	Ukupno korišteno poljoprivredno zemljište (ha)	Stope incidencije kampilobakterioze na 100 000 stanovnika					
			2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.
Urbano područje								
Split	1581,0	601,1	144	166	147	120	83	128
Suburbano područje								
Solin	1382,2	981,4	86	118	137	186	108	86
Kaštela	1030,3	564,3	56	109	121	83	66	56
Trogir	2472,5	1826,8	98	110	70	88	106	98
Podstrana	152,6	73,4	121	177	164	150	55	121
Omiš	1555,9	564,4	58	93	78	62	58	58
Makarska	1327,4	571,7	31	0	11	19	42	31
Ruralno područje								
Imotski	5646,0	2548,3	50	54	54	63	40	50
Sinj	7530,1	5260,6	85	82	70	72	94	85
Vrgorac	1266,7	583,4	30	27	13	13	61	30
Otoci	14833,6	6479,0	66	33	30	50	50	66

Pearsonov koeficijent korelacije za povezanost površina zemljišta određene teritorijalne jedinice i površina iskorištenog poljoprivrednog zemljišta te teritorijalne jedinice je iznosio $r = 0,60$ ($P < 0,001$), tj. što je ukupna površina zemljišta nekog područja bila veća, bilo je i više obrađenog poljoprivrednog zemljišta u tom području. Najviše obrađenog poljoprivrednog zemljišta je bilo u ruralnom području SDŽ (Tablica 8).

Nije bilo povezanosti stope incidencije kampilobakterioze i ukupne površine zemljišta određene teritorijalne jedinice/područja SDŽ ($r = -0,018$, $P = 0,887$), niti povezanosti incidencije kampilobakterioze i površine korištenog poljoprivrednog zemljišta određene teritorijalne jedinice/područja ($r = -0,126$, $P = 0,313$), odnosno incidencija kampilobakterioze u SDŽ u razdoblju od 2007. do 2012. godine nije bila povezana s poljoprivrednim aktivnostima.

5.2. Molekularno - mikrobiološke značajke izolata *Campylobacter jejuni*

5.2.1. Otpornost izolata *Campylobacter jejuni* na antibiotike i značajke bolesnika

U razdoblju od 1.5. 2012. do 31.5. 2013. godine izoliran je 441 *C. jejuni*: 77 izolata (17%) je bilo izolirano u hospitaliziranih bolesnika, a 364 (83%) u ambulantnih bolesnika. Otpornost prema antibioticima i genotipske značajke su analizirane na uzorku od 153 izolata *C. jejuni*: 76 izolata hospitaliziranih bolesnika (subkultivacija jednog soja hospitaliziranog bolesnika nije uspjela) i 77 izolata ambulantnih bolesnika, koji su izolirani istoga dana kada i izolati hospitaliziranih bolesnika.

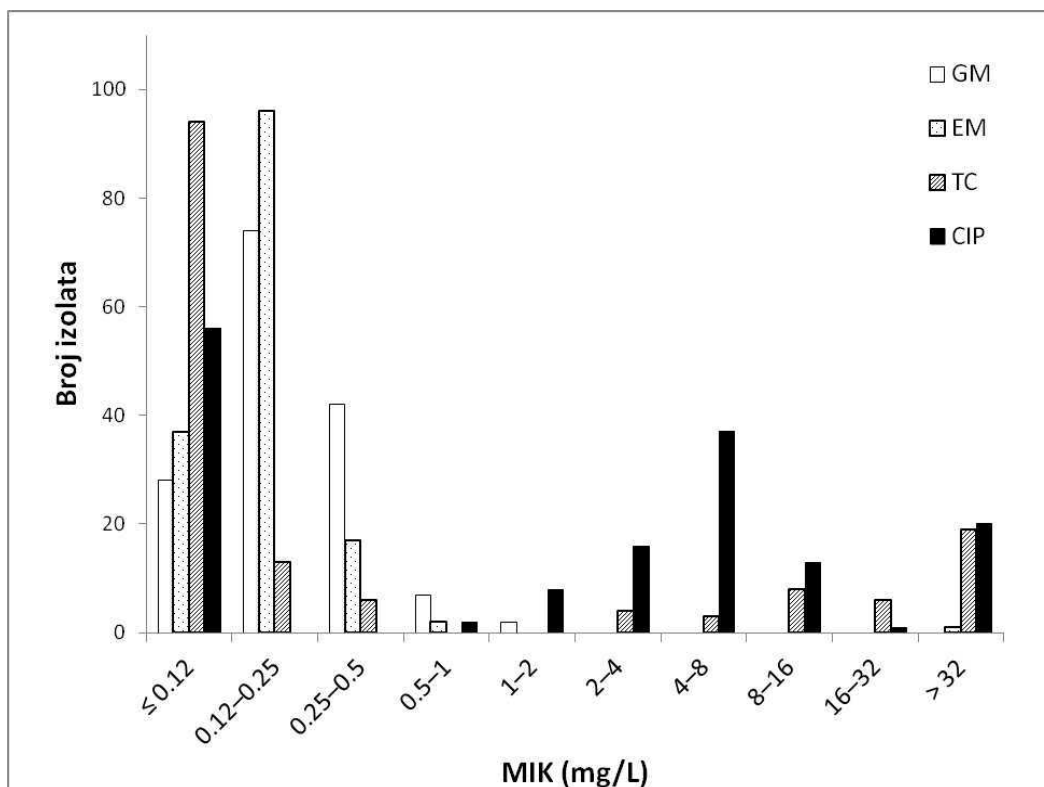
Raspodjela bolesnika inficiranih s *C. jejuni* prema dobi je bila bimodalna s maksimumima u dobnim skupinama 0 - 10 godina i 51 - 60 godina (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela prema dobi i spolu bolesnika inficiranih sa *C. jejuni* čiji su se izolati korišteni za određivanje molekularno - mikrobioloških značajki (n=153).

Dob (godine)	N	Udio bolesnika (%)
0 – 10	46	30
11 – 20	28	18
21 – 30	22	14
31 – 40	10	7
41 – 50	10	7
51 – 60	15	10
61 – 70	10	7
71 – 80	8	5
> 80	1	1
Podatci koji nedostaju	3	2
Spol		
Muškarci	91	59
Žene	62	41

Muškarci su bili češće inficirani kampilobakterom nego žene (91 ili 59%; $P = 0,024$). Većina infekcija (101 ili 66%) zabilježena je tijekom sezonskog vrhunca bolesti, između svibnja i rujna.

Od ukupno 153 testirana izolata *C. jejuni*, 96 izolata (63%; 95% CI 55–70%) je bilo otporno na barem jedan testirani antibiotik (Slika 6). Svi testirani izolati *C. jejuni* (153 ili 100%) su bili osjetljivi na gentamicin, a samo jedan izolat je bio otporan na eritromicin (0,7%). Taj soj *C. jejuni* je ujedno bio i jedini soj koji je pokazivao višestruku otpornost na eritromicin, ciprofloksacin i tetraciklin. Na ciprofloksacin nije bilo osjetljivo (Cip_R) 92 ili 60% testiranih izolata *C. jejuni* (95% CI 52–68%; 83 otporna i 9 umjereno osjetljivih izolata), a na tetraciklin nije bilo osjetljivo (TC_R) 36 ili 24 % izolata (95% CI 17–31%; 29 otpornih i 7 umjereno osjetljivih izolata).

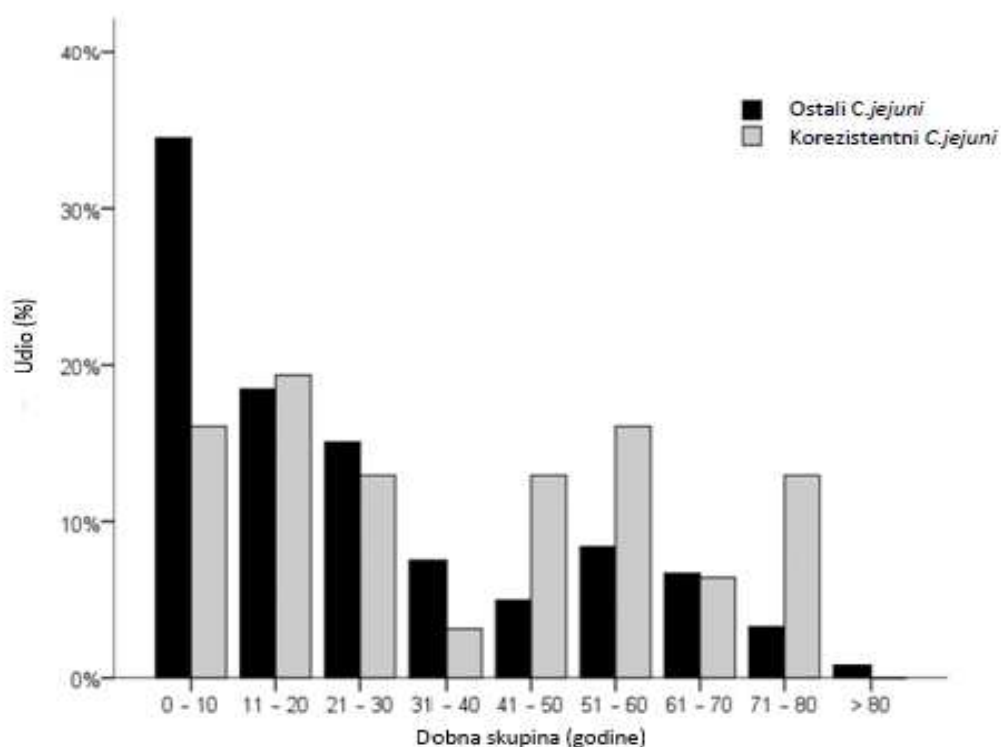


Slika 6. Raspodjela minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) izolata *C. jejuni* testiranih na gentamicin (GM), eritromicin (EM), tetraciklin (TC), i ciprofloksacin (CIP).

Od 36 izolata otpornih na tetraciklin, 32 (89%) su bila istodobno otporna (korezistentna) i na ciprofloksacin (T_{cR}/Cip_R izolati). Statistički značajna povezanost otpornosti na tetraciklin i ciprofloksacin dokazana je u ukupnom uzorku ($P = 3,2 \times 10^{-5}$). Također, kada su zasebno testirani uzorci izolata ambulantnih i hospitaliziranih bolesnika, u svakoj je od navedenih podskupina i dokazana značajna povezanost otpornosti na tetraciklin i ciprofloksacin ($P < 0,015$), tj. T_{cR}/Cip_R korezistencija.

U usporedbi s rezultatima pokusnog dijela testiranja otpornosti izolata *C. jejuni* iz 2010. godine, kada je nađeno 26% izolata *C. jejuni* otpornih na ciprofloksacin, 8% izolata otpornih na tetraciklin i 4% T_{cR}/Cip_R izolata od ukupno 50 testiranih izolata (109), tijekom testiranja 2012/2013. godine je nađena značajno veća otpornost izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin ($P = 0,010$), tetraciklin ($P = 0,016$) i značajno veći udio korezistentnih izolata ($P = 0,005$) (45).

Otpornost izolata nije bila povezana sa spolom niti s hospitalizacijom bolesnika ($P > 0,269$). Međutim, bolesnici inficirani s Tc_R/Cip_R izolatima su imali specifičnu raspodjelu prema dobi. Naime, medijan dobi bolesnika inficiranih s korezistentnim izolatima (39 godina; 95% CI 13–52) je bio značajno viši od medijana dobi bolesnika inficiranih s monorezistentnim i osjetljivim izolatima (19 godina; 95% CI 17–23; $P = 0,027$; Slika 7) Također, većina infekcija s monorezistentnim i osjetljivim izolatima je zabilježena u djece i adolescenata (60 ili 50%), dok su udjeli bolesnika inficiranih korezistentnim izolatima bili usporedivi u većini dobnih skupina (Slika 7). Preciznije, osim u bolesnika starijih od 80 godina, udjeli bolesnika inficiranih korezistentnim izolatima u svim dobnim skupinama nisu odstupali značajno od prosjeka (binomni test, $P > 0,070$), što sugerira da su se infekcije korezistentnim izolatima događale neovisno o dobi bolesnika.



Slika 7. Raspodjela prema dobi bolesnika inficiranih korezistentnim izolatima (sivi stupci, $n = 32$) i ostalim izolatima (crni stupci, $n = 121$).

Slična je bila i raspodjela prema dobi bolesnika inficiranih Tc_R izolatima. Medijan dobi inficiranih Tc_R izolatima (30 godina) je bio značajno viši od medijan dobi bolesnika inficiranih izolatima osjetljivim na tetraciklin (19 godina) (P = 0,033).

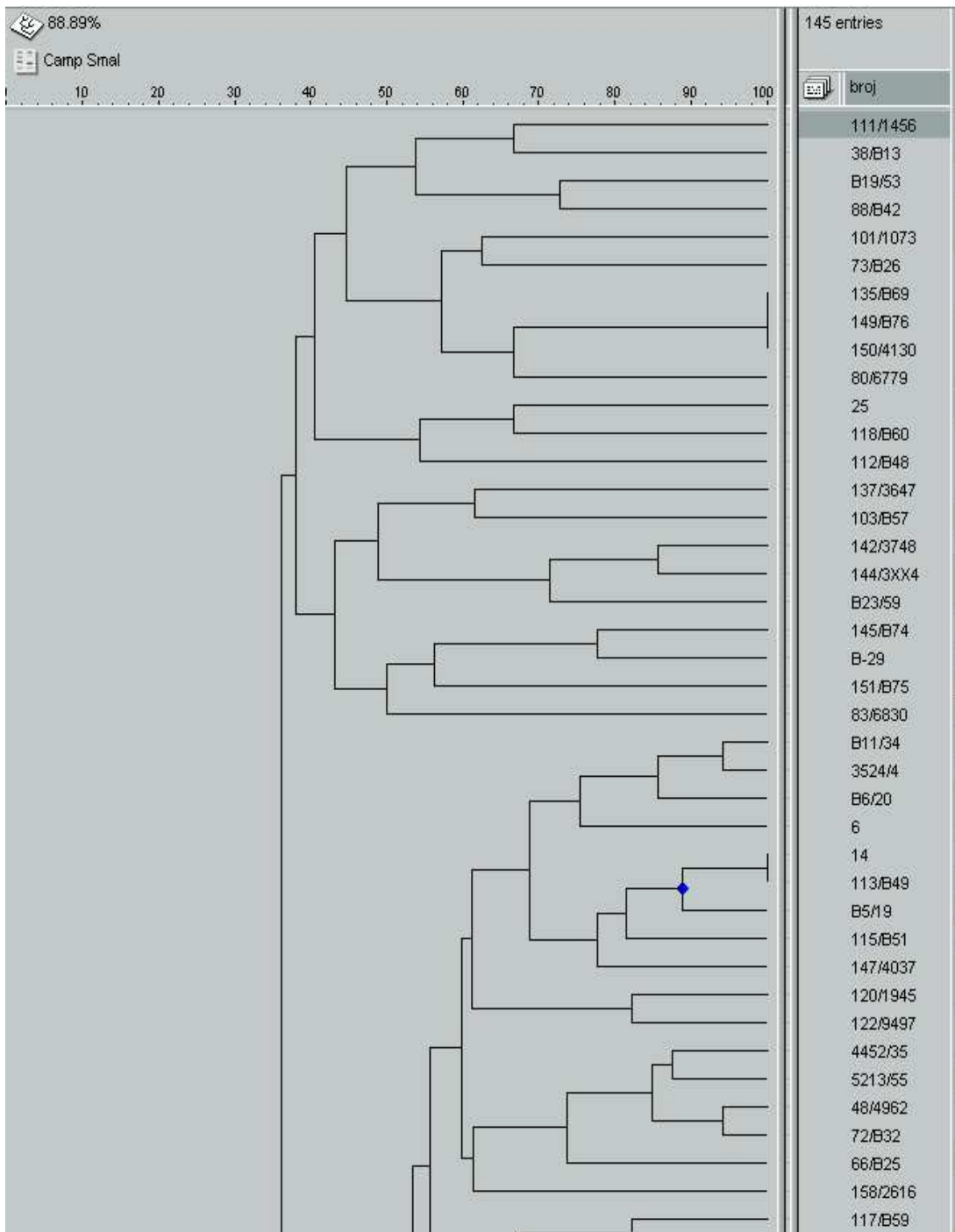
5.2.2. Hospitalizirani i ambulantni bolesnici

U raspodjeli prema dobi i spolu nije bilo statistički značajnih razlika između hospitaliziranih i ambulanih bolesnika (P < 0,171).

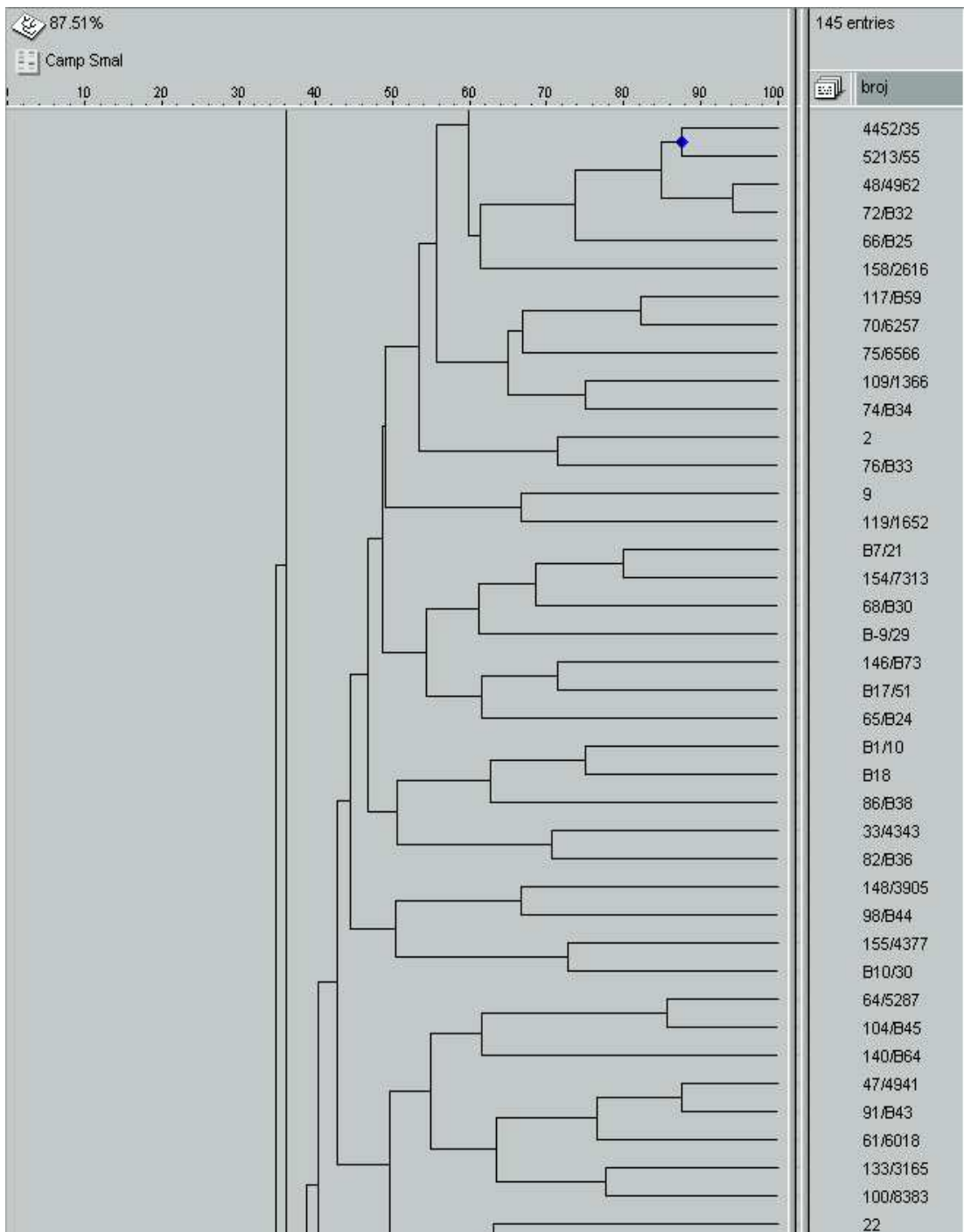
Također, nije bilo razlika u otpornosti i korezistenciji *C. jejuni* izoliranih u hospitaliziranih i ambulanih bolesnika. Jedina razlika između izolata hospitaliziranih i ambulanih bolesnika bio je nešto viši udio izolata umjereno osjetljivih na ciprofloksacin (Cip_I) među hospitaliziranim bolesnicima (8 od 9 ili 89%; P = 0,019).

5.2.3. Klonalnost izolata *Campylobacter jejuni*

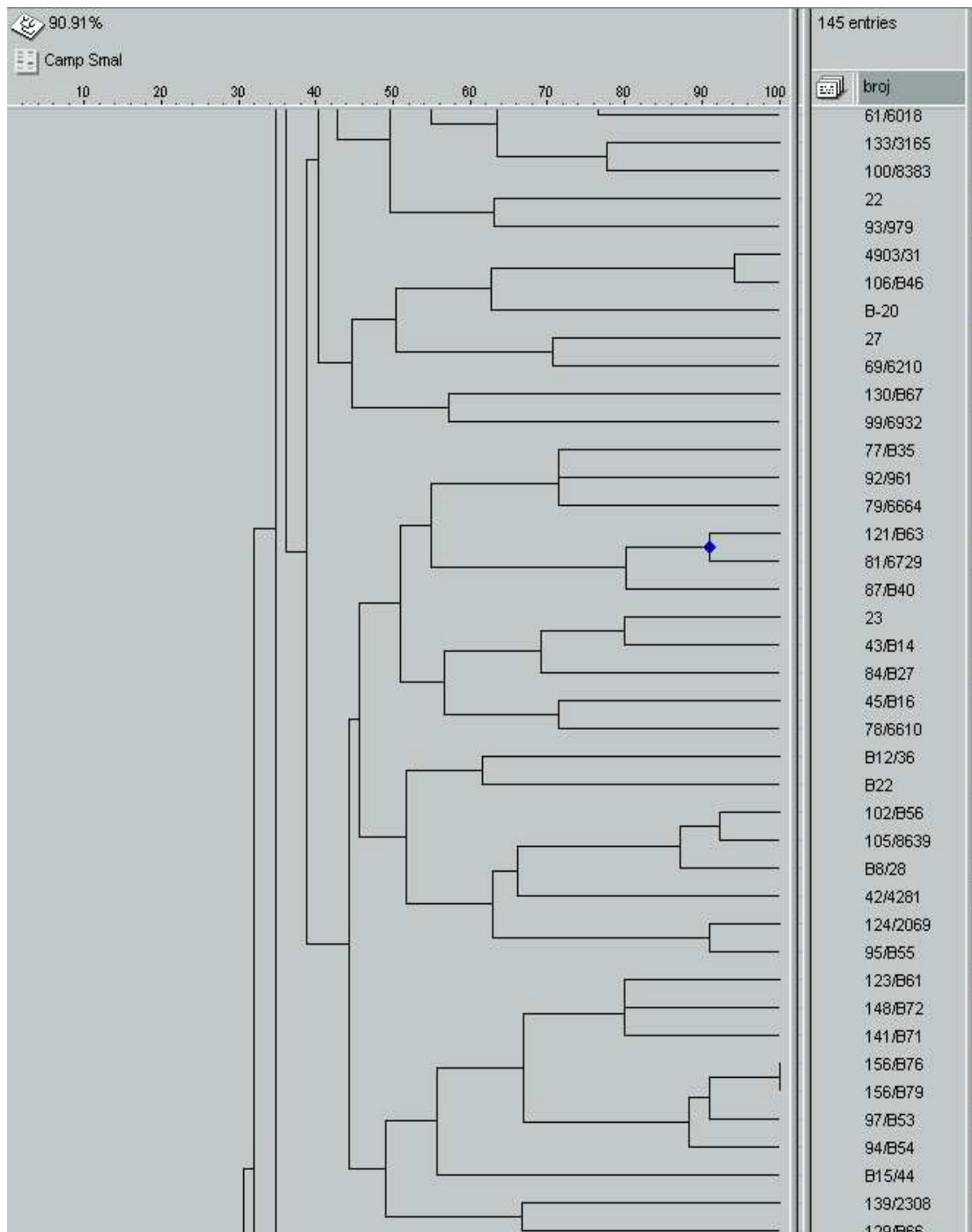
Stotinu četrdeset i pet izolata *C. jejuni* je uspješno genotipizirano, dok za 8 izolata nije uspjela subkultivacija ili nije uspjelo cijepanje restriksijskim enzimima. Na temelju obrasca cijepanja s prvim *Sma*I enzimom, 60 izolata je svrstano u 25 *Sma*I S skupina, a 85 izolata je imalo zaseban, jedinstven *Sma*I genotip (Slika 8).



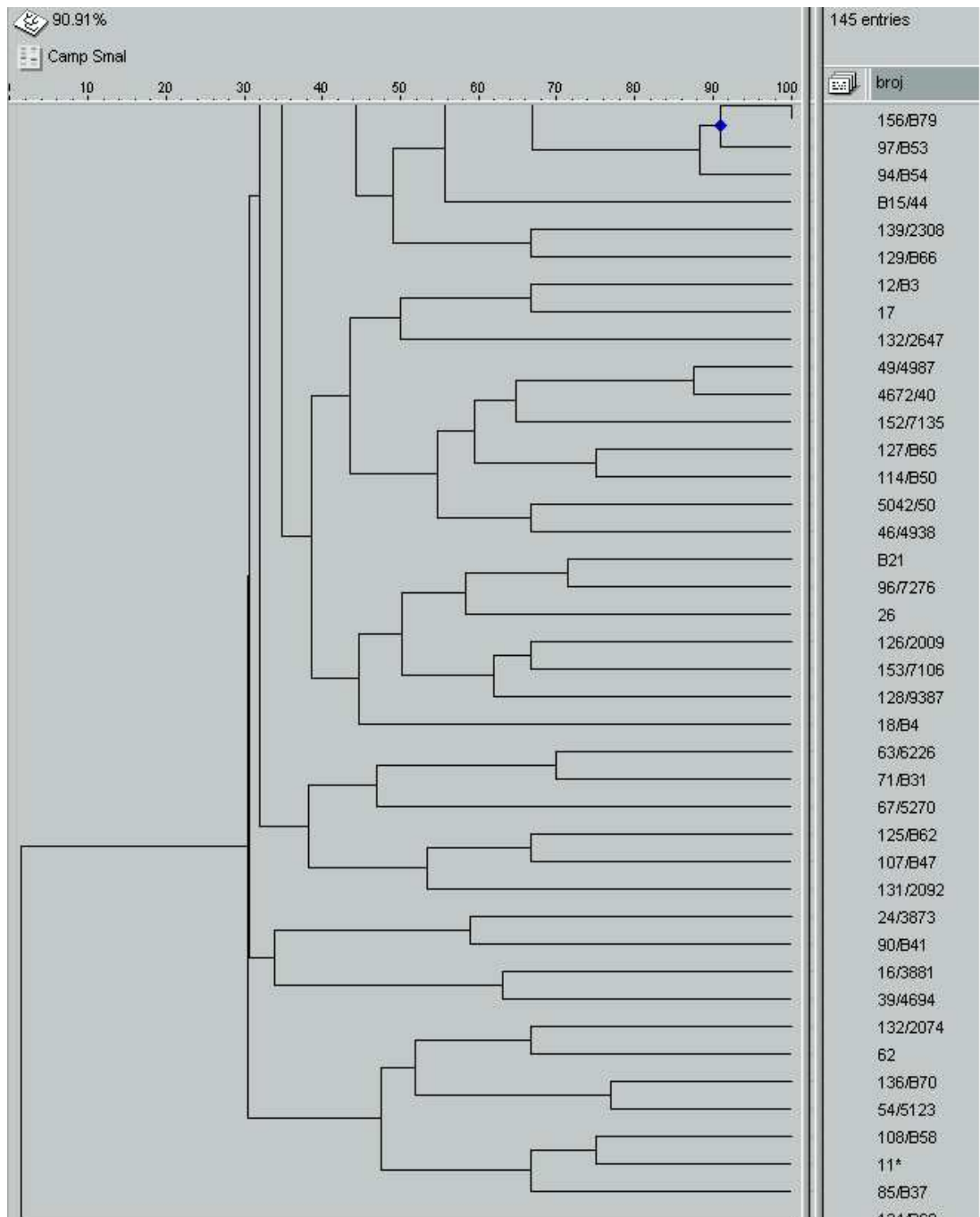
Slika 8., 1. dio *SmaI* dendrogram *C. jejuni* izolata (n = 145).



Slika 8., 2. dio SmaI dendrogram *C. jejuni* izolata (n = 145).

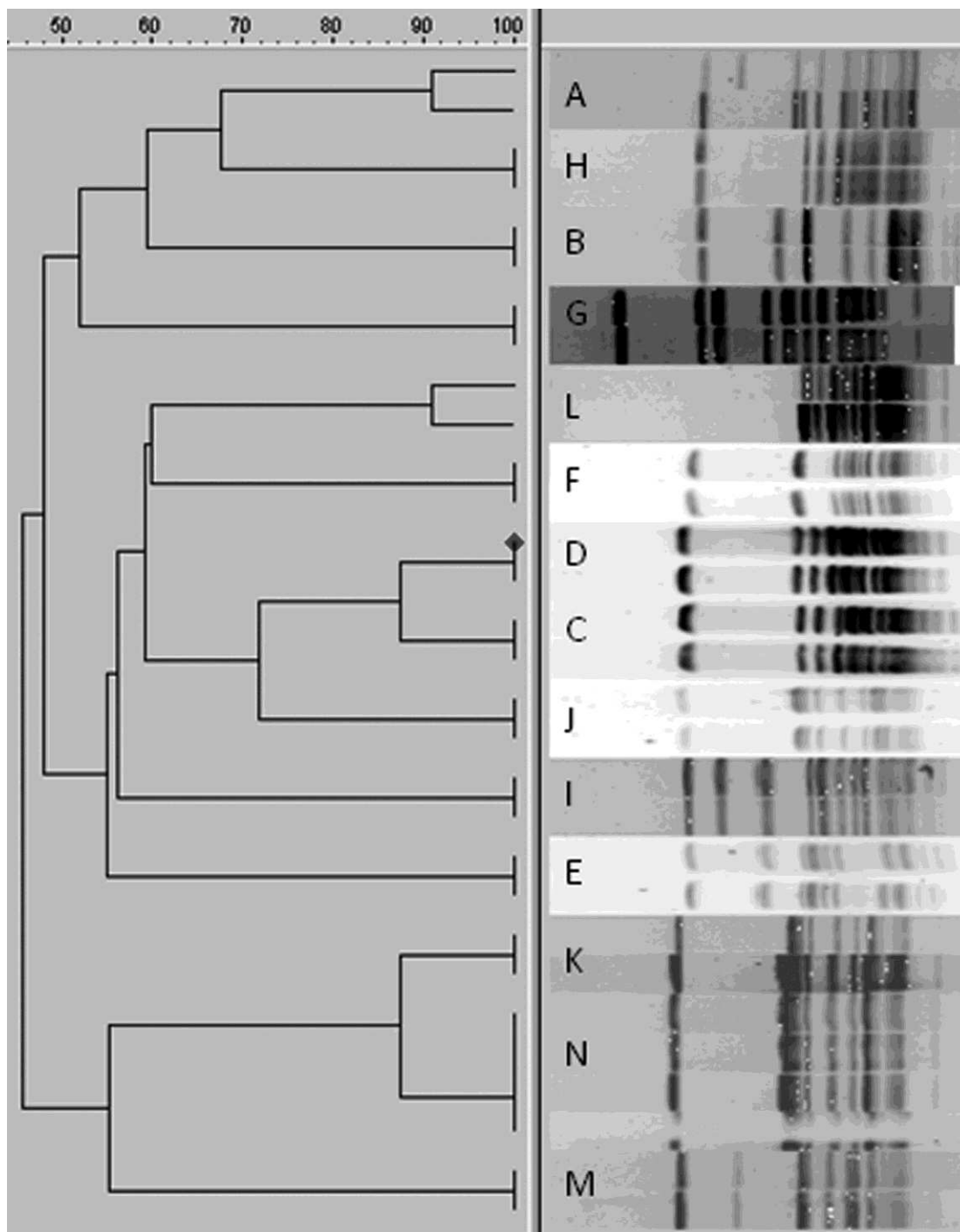


Slika 8., 3. dio *SmaI* dendrogram *C. jejuni* izolata (n = 145).



Slika 8., 4. dio *Sma*I dendrogram *C. jejuni* izolata (n = 145).

Nakon dodatnog cijepanja izolata svrstanih u *Sma*I S skupine s drugim enzimom, *Kpn*I, identificirano je 14 klonskih *Sma*I/*Kpn*I grupa s 30 izolata (Slika 9) te 30 jedinstvenih genotipova.



Slika 9. Dendrogram *SmaI/KpnI* klonskih grupa s prikazom PFGE makrorestriksijskih profila.

Ukupno je identificirano 115 (79%) jedinstvenih genotipova (Slika 8) i 14 klonskih grupa, koje su sadržavale 30 izolata identičnih *SmaI/KpnI* genotipova (Slika 9).

Klonski povezani izolati su bili podjednako zastupljeni među ambulantnim i hospitaliziranim bolesnicima (Tablica 10). Jedanaest klonskih grupa (79%) je pokazivalo epidemiološku povezanost, tj. unutar klonskih grupa je postojala prostorna i vremenska podudarnost izolata identičnih genotipova (izolirani su unutar 7 - 30 dana i na udaljenosti do 30 km; Tablica 10). Također su identificirane i dvije stabilne klonske grupe (A i I): izolati unutar tih grupa su imali identične genotipove iako su izolirani na međusobno udaljenim područjima SDŽ i unutar dužeg vremenskog razdoblja (≥ 60 km, ≥ 170 dana).

Otpornost na antibiotike je bila dokazana u izolatima 10 klonskih grupa i 71 izolatu s jedinstvenim genotipom. Značajna povezanost rezistentnih fenotipova i PFGE genotipova zamijećena je među Tc_R/Cip_R izolatima. Naime, sve klonske grupe u kojima je zabilježena Tc_R/Cip_R korezistencija imale su takav fenotip u svim pridruženim izolatima (Tablica 10). Takva pojava nije bila slučajna (vjerojatnost da bi se u istoj klonskoj grupi mogli naći isključivo korezistentni izolati slučajno bila je vrlo mala; $P < 0,044$ za grupe s dva, ili $P = 0,001$ za grupu s četiri izolata). Također, takva fenotipsko – genotipska povezanost nije zabilježena u klonskim grupama s dva Cip_R monorezistentna izolata ($P = 0,360$) niti u klonskim grupama s dva potpuno osjetljiva (Pan_S) izolata ($P = 0,0137$).

Tablica 10. Značajke *SmaI/KpnI* klonalno povezanih *C. jejuni* izolata (unutar grupe su svrstani prema najranijem datumu izolacije)

PFGE– <i>SmaI</i> skupina	<i>SmaI/KpnI</i> klonalna grupa	Broj izolata	Izolat	Datum izolacije	Udaljenost između mjesta izolacije (km)	Obrazac otpornosti	Status bolesnika
S4	D	2	4/3524	8. svibnja 2012.	0	Pansusc*	A
			19/B-5	28. svibnja 2012.		Pansusc	H
	C	2	14/3758	16. svibnja 2012.	18	Pansusc	A
			34/B-11	8. lipnja 2012.		Pansusc	H
	E	2	113/B-49	22. studenog 2012.	0	Pansusc	H
			115/B-51	27. studenog 2012.		Pansusc	H
S1	A	2	31/4903	29. svibnja 2012.	86	Pansusc	A
			106/B-46	19 studenog 2012.		Cip R	H
S9	G	2	35/4452	5. lipnja 2012.	18	Cip R	A
			48/4962	19. lipnja 2012.		Pansusc	A
S12	I	2	129/B-66	20. srpnja 2012.	144	Cip + Tc R	H
			127/B-65	16. travnja 2013.		Cip + Tc R	H
S5	F	2	70/6275	11. kolovoza	25	Cip R	A
			75/6566	23. kolovoza		Cip R	A
S11	H	2	61/6018	30. srpnja 2012.	0	Pansusc	A
			72/B-32	16. kolovoza		Pansusc	H
S3	B	2	68/B-30	10. kolovoza	18	Cip R	H
			154/7313	14. rujna 2013.		Cip R	A
S17	J	2	123/B-61	13. ožujka 2013.	0	Cip + Tc R	H
			126/2009	20 ožujka 2013.		Cip + Tc R	A
S24	N	4	135/B-69	6. svibnja 2013.	5	Cip + Tc R	H
			149/B-77	18. svibnja 2013.		Cip + Tc R	H
			150/4130	21. svibnja 2013.		Cip + Tc R	A
			155/4377	24. svibnja 2013.		Cip + Tc R	A
S23	M	2	142/3748	10. svibnja 2013.	29	Cip R	A
			144/3994	16. svibnja 2013.		Cip R	A
S18	K	2	157/B-76	17. svibnja 2013.	5	Cip + Tc R	H
			156/B-79	28. svibnja 2013.		Cip + Tc R	H
S19	L	2	23/4012	24. svibnja 2012.	25	Cip R	A
			28/B-8	1. lipnja 2012.		Cip R	H

*Pansusc – potpuno osjetljivi izolat.

†A - ambulantni, H - hospitalizirani bolesnici.

T_{CR}/Cip_R fenotip imali su izolati svrstani u četiri klonske grupe (I, J, N i K) (Tablica 10) te 22 izolata jedinstvenih genotipova. Izolirani su tijekom čitave godine s najvišom učestalošću u svibnju, lipnju, rujnu i ožujku. Prvi korezistentni izolat dokazan je u svibnju 2012. godine, a nagli porast broja klonski povezanih T_{CR}/Cip_R korezistentnih izolata zabilježen je u ožujku 2013. godine. U kratkom razdoblju između ožujka i svibnja 2013. izolirano je 90% (9/10, P = 0,001) klonski povezanih T_{CR}/Cip_R korezistentnih izolata. U istom razdoblju nije zabilježen značajan porast broja T_{CR}/Cip_R korezistentnih izolata jedinstvenih genotipova (P = 0,405) što ukazuje na to da je porast T_{CR}/Cip_R korezistencije u tom razdoblju bio vezan isključivo za klonski povezane izolate. Budući da se klonski povezani T_{CR}/Cip_R korezistentni izolati pojavljuju gotovo isključivo nakon ožujka 2013. godine, ispitali smo povezanost između klonskog tipa izolata i otpornosti na antibiotike u uzorku izolata koji su izolirani između ožujka i svibnja 2013. godine (n=32). Utvrđena je značajna povezanost klonski povezanih izolata i korezistencije (P = 0,001) te klonski povezanih izolata i tetraciklinske otpornosti (P = 0,001).

6. RASPRAVA

Ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u SDŽ od 2007. do 2012. godine, procijenjena na temelju broja laboratorijski potvrđenih infekcija, bila je 96/100 000 stanovnika. Stope incidencije su bile najviše u dobnoj skupini 0 - 4 godine i među muškarcima. Također, stope incidencije su u urbanim područjima SDŽ bile više nego u ruralnim područjima u svim dobnim skupinama. Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterima je zabilježen između svibnja i rujna, s vrhuncem u lipnju, a bio je povezan s višim prosječnim mjesečnim temperaturama i nižom relativnom vlažnosti zraka (Slika 4). Poljoprivredne aktivnosti u SDŽ nisu bile povezane sa stopama incidencije kampilobakterioze. Najčešće izolirana vrsta je bio *C. jejuni*. Izolati *C. jejuni* bili su genetski heterogeni s djelomično organiziranom klonskom strukturom. Utvrđena je umjereno visoka rezistencija sojeva *C. jejuni* na ciprofloksacin i Tc_R/Cip_R korezistencija. Tc_R/Cip_R korezistentni sojevi su bili klonski povezani, pojavili su se u kratkom vremenskom razdoblju i bili su ravnomjerno raspodijeljeni među bolesnicima svih dobnih skupina, a nisu bili povezani s hospitalizacijom bolesnika.

Ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u SDŽ od 2007. do 2012. godine, procijenjena na temelju broja laboratorijski potvrđenih infekcija, se može smatrati umjereno visokom. Naime, ukupna prosječna incidencija u SDŽ (96/100 000 stanovnika) je bila veća od prosječnih stopa incidencije u EU u istom razdoblju (65,9/100 000), te usporediva sa stopama incidencije kampilobakterioze u Švedskoj (87,2/100 000) i Slovačkoj (105,5/100 000), koje su također ocijenjene umjereno visokima (110). Nadalje, slično izvještajima u Republici Češkoj i Finskoj, u SDŽ je između 2007. i 2012. godine, zabilježen statistički značajan pad stopa incidencije kampilobakterioze (110).

Međutim, tijekom razdoblja istraživanja od 2007. do 2012. godine, svega 312 infekcija kampilobakterom je prijavljeno putem liječničkih prijava Službi za epidemiologiju HZZJZ (Izvještaj Službe za epidemiologiju HZZJZ, Tablica 4 u Dodatku), što bi odgovaralo gotovo devet puta manjoj incidenciji (12/100 000). Ovakvo odstupanje rezultata sugerira da postojeći sustav nadzora zaraznih bolesti, utemeljen na broju liječničkih prijava (tzv. "pasivni sustav nadzora"), značajno podežnjuje incidenciju kampilobakterioze u RH.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je među kampilobakterima najčešći uzročnik infekcija u bolesnika u SDŽ vrsta *C. jejuni*, a potom *C. coli*, što je u skladu s podacima iz ostalih zemalja EU (111). Nadalje, statistički značajno veće stope incidencije kampilobakterioze u muškaraca nego u žena, nađene u SDŽ, također su uobičajene i drugdje (112-113).

Stope incidencije u dobnoj skupini 0-4 godine zabilježene u SDŽ su bile visoke i usporedive sa stopama incidencije u Primorsko - goranskoj županiji (PGŽ) (484,4/100 000) (9), Izraelu (356,1/100 000) (91) i Novom Zelandu (461/100 000) (114). Međutim, bile su veće nego u Danskoj (96,8/100 000) (98) i Njemačkoj (123/100 000) (113). Tako visoke stope incidencije u ovoj dobnoj skupini pripisuju se nerazvijenoj imunosti bolesnika te dobi (115). Tu pretpostavku dodatno potvrđuju gotovo ujednačeno visoke stope incidencije, koje su zabilježene isključivo u dobnoj skupini 0 - 4 godine u urbanim, suburbanim i ruralnim područjima SDŽ (Slika 2, Tablica 4). Nadalje, postupan pad stopa incidencije od mlađih prema starijim dobnim skupinama, koji je ovim istraživanjem također utvrđen u SDŽ, vjerojatno odražava stjecanje zaštitne imunosti nakon ponavljano izlaganja infekciji kampilobakterima u djetinjstvu (115-116).

Najviše stope incidencije u najmlađoj životnoj dobi, koje su dugogodišnjim praćenjem uniformno zabilježili sustavi za nadzor kampilobakterioza niza zemalja (91, 98, 113-114), također se pripisuju i višoj učestalosti zahtjeva za liječničkim pregledima i laboratorijskim pretragama u toj ranjivoj dobnoj skupini (8, 117). Uz to, neovisno o opisanim razlikama u imunološkom odgovoru, u najmlađoj dobnoj skupini postoje i razlike u izloženosti epidemiološkim rizičnim čimbenicima (114). Naime, manje od 40% infekcija kampilobakterima je među mlađom djecom povezano s hranom (80). Smatra se, također, da, za razliku od odraslih kod kojih se 66% kampilobakterioza prenosi putem kontaminiranog pilećeg i drugog mesa (41), razvoju infekcija kampilobakterima u najmlađoj dobnoj skupini značajno doprinosi izlaganje rizičnim čimbenicima u okolišu, a navode se: kontakt s kućnim ljubimcima koji imaju proljev (118), kontakt s domaćim životinjama na farmama (119), igranje u pješčanicima (41), pijenje bunarske vode te vode iz jezera i rijeka (120).

Visoke stope incidencije u dobnim skupinama 10 - 19 godina i 20 - 29 u SDŽ (Tablica 4) slične su stopama incidencije u tim dobnim skupinama u Danskoj (125/100 000) (98) i Njemačkoj (107/ 100 000) (113). Danska studija (98) sugerira da se takvi nalazi mogu pripisati češćoj konzumaciji hrane izvan kuće i selidbi iz obiteljskog kućanstva u toj dobi, što je nerijetko povezano s nesigurnim rukovanjem hranom i lošijom

kuhinjskom higijenom. Uz to, roditeljstvo, koje često započinje u dobnoj skupini 20 - 29 godina, je povezano s mogućim interhumanim prijenosom kampilobaktera s male djece o kojoj njihovi roditelji skrbe (113).

Rezultati ovog istraživanja nedvojbeno su pokazali da postoje razlike u stopama incidencije prema područjima SDŽ: ukupne prosječne stope incidencije kampilobakterioze od 2007. do 2012. godine te stope incidencije prema dobi i spolu su bile najviše u urbanim područjima, umjereno visoke u suburbanim područjima, a najniže u ruralnim područjima (Tablica 2, Slika 2 i 3). Takvi rezultati sugeriraju mogućnost da je urbano stanovništvo u SDŽ bilo izloženije infekcijama kampilobakterima od suburbanog i ruralnog stanovništva. Veće stope incidencije u urbanim nego u ruralnim područjima uočene su i u Danskoj (98) te u Njemačkoj (113), s izuzetkom stopa incidencije u dobnoj skupini 0 - 4 godine, koje su bile veće u ruralnim područjima tih zemalja. Veće stope incidencije kampilobakterioze nađene su i u urbanim i suburbanim područjima Nizozemske, a povezuju se s konzumacijom gotove hrane (engl. "*ready to eat*" food) (78). Prevladavanje kampilobakterioze u urbanim područjima također se povezuje s prehranom izvan kuće te s konzumacijom namirnica široko rasprostranjenih na tržištu, poput peradi (121). Molekularno - prostornim epidemiološkim studijama kampilobakterioze provedenim na Novom Zelandu (122), Nizozemskoj (41) i u Kanadi (123) je dokazano da su bolesnici u urbanim područjima tih zemalja češće inficirani genotipovima kampilobaktera koji su povezani s peradi nego bolesnici u ruralnim područjima, što sugerira da je komercijalno dostupna perad glavni rezervoar kampilobakterioze za ljude u urbanim sredinama (41). Istraživanjem Kovačić i suradnica provedenim u SDŽ 2011. godine (15) dokazani su identični PFGE makrorestriksijski profili izolata *C. jejuni* iz uzoraka peradi i izolata *C. jejuni* iz uzoraka stolice dijarealnih bolesnika što sugerira da je perad značajan izvor kampilobakterioze ljudi i u našoj županiji. Međutim, kako bismo dobili precizniji uvid u rezervoare infekcije kampilobakterima u urbanim sredinama, potrebno je dodatnim molekularno – epidemiološkim prostornim studijama ispitati prostornu raspodjelu tih i drugih izolata iz hrane, životinja i okoliša u našoj županiji.

Nalaz većih stopa incidencije kampilobakterioze u urbanim područjima SDŽ je posebno zanimljiv u usporedbi s rezultatom istraživanja provedenog u gradu Zagrebu i njegovoj okolici 1985. godine, kada su veće incidencije kampilobakterioze bile nađene u ruralnim područjima (8). Takav rezultat također je nađen u Kanadi (124), SAD -u (125) i Švedskoj (126). Veće stope incidencija u ruralnim područjima tih zemalja povezivale su se s velikom poljoprivrednom aktivnosti i velikom gustoćom papkara na tim područjima.

Međutim, ruralna područja RH su nakon 1990. godine bila zahvaćena dugotrajnim razornim ratnim zbivanjima i urušavanjem lokalnog gospodarstva što je za posljedicu imalo depopulaciju i deagrarizaciju tih područja (127). Naime, udio poljoprivrednog stanovništva u ukupnom stanovništvu RH je u razdoblju od 1991. do 2001. godine smanjen s 8,56% na 5,54%, a između 1990. i 2007. godine je značajno smanjen i broj stočnih grla (128). Prema ukupnoj površini iskorištenog poljoprivrednog zemljišta, broju stočnih grla i prihodima, udio hrvatske poljoprivrede u ukupnoj poljoprivrednoj proizvodnji EU je sada svega 1% (127). Takve specifične okolnosti u RH mogle su u značajnoj mjeri umanjiti izloženost stanovnika ruralnih područja RH rizičnim čimbenicima za infekcije kampilobakterima, koje inače nalazimo u ruralnim područjima drugih zemalja s razvijenijom poljoprivredom. Ta pretpostavka je u skladu s izostankom povezanosti između incidencije kampilobakterioze u urbanim, suburbanim i ruralnim područjima SDŽ i poljoprivredne aktivnosti u tim područjima, što je utvrđeno ovim istraživanjem.

Iako su prethodna epidemiološka istraživanja kampilobakterioze u RH imala metodološka ograničenja, koja su pojašnjena u Uvodu disertacije, usporedba rezultata istraživanja provedenih na zagrebačkom području 1985. godine (8), u PGŽ od 2003. do 2007. godine (9) i u SDŽ od 2007. do 2012. godine (129) omogućila je uvid u epidemiološke značajke ove bolesti u RH tijekom tri desetljeća.

U odnosu na stopu incidencije kampilobakterioze koja je na području grada Zagreba 80-ih godina prošlog stoljeća bila 56/100 000 stanovnika (8), stope incidencije kampilobakterioze zabilježene u RH nakon 2003. godine su bile značajno veće (81/100 000) (9), te su nakon kontinuiranog porasta vrhunac dosegle 2008. godine (112/100 000 stanovnika) (9, 129). Potom je ovim istraživanjem zabilježen statistički značajan pad stopa incidencije od 2009. do 2011. godine, a zatim ponovni porast 2012. godine (Slika 3). Pad stopa incidencije kampilobakterioze između 2009. i 2011. godine mogao bi predstavljati pozitivan odraz primjene novih zakonskih normi uvedenih 2009. godine (130), kojima se unaprijedila kontrola proizvodnje, prometa i prodaje hrane. S druge strane, ponovni porast incidencije kampilobakterioze 2012. godine se podudara s porastom incidencije kampilobakterioze zabilježenim te godine i u drugim zemljama EU (111). U usporedbi s rezultatima istraživanja provedenog 1985. godine (8), novija istraživanja epidemioloških značajki kampilobakterioze provedena u PGŽ (9) i SDŽ (129), ukazuju na pad stopa incidencije u djece, prevladavanje bolesti u urbanim, a ne više u ruralnim područjima RH te porast udjela vrste *C. jejuni* u ukupnom broju

kampilobaktera izoliranih u bolesnika. Takve značajke kampilobakterioze u RH se sada podudaraju sa značajkama ove bolesti u razvijenim zemljama (77), što nije bio slučaj 80.-ih godina prošlog stoljeća (8).

Kampilobakterioza je od 2005.-te najčešća zoonoza u ljudi u EU i globalno (79, 111), što je odraz raširenosti ovog patogena u brojnim životinjskim domaćinima te u okolišu, gdje i klimatski čimbenici mogu imati značajan utjecaj na dinamiku ove bolesti (79). Iako je povezanost između temperature okoliša i učestalosti infekcija kampilobakterima poznata, utjecaj regionalnih klimatskih varijacija nije dovoljno istražen (98). Prema Köpenovoj klimatskoj klasifikaciji za standardno razdoblje 1961. – 1990. godine, SDŽ ima umjereno toplu klimu tipa C, mediteranskog podtipa Csa te najnižu godišnju količinu oborina u RH (131). Broj infekcija kampilobakterima u SDŽ je bio najveći od svibnja do rujna, s vrhuncem u lipnju (Slika 5 a - d, Tablica 6) i bio je povezan s višim prosječnim mjesečnim temperaturama zraka, što je u skladu s podacima iz drugih zemalja s umjerenom klimom (79, 132-133). Također, jednaka sezonska raspodjela kampilobakterioza je zabilježena i na zagrebačkom području među bolesnicima hospitaliziranim zbog kampilobakterioze u razdoblju 1994. – 2014. godine (10, 42). Većina bolesnika hospitalizirana je od svibnja do rujna, s najvećim brojem hospitaliziranih u lipnju (134).

Iako se porast broja infekcija kampilobakterima u SDŽ događao usporedo s porastom prosječnih mjesečnih temperatura zraka od veljače do lipnja, kada doseže vrhunac, najviše vrijednosti prosječnih mjesečnih temperatura zraka su zabilježene kasnije, u srpnju i kolovozu (Slika 5 a - d). Takvi rezultati sugeriraju da je porast broja infekcija kampilobakterima umjereno, ali ne i u potpunosti povezan s porastom temperature zraka. Umjerenu povezanost ovih varijabli sugerira i istraživanje Yuna i suradnika (135), te studija kampilobakterioze u Engleskoj (81).

Nadalje, navodi se da i drugi okolišni čimbenici (132) te ponašanje ljudi (133) pridonose vrhuncu broja infekcija kampilobakterima u lipnju. Naime, stope infekcija kampilobakterima u jatima peradi i broj uzoraka mesa pozitivnih na *Campylobacter* spp. su najviši tijekom toplih mjeseci (98). Vrhuncu broja infekcija u lipnju pridonosi i dodatno izlaganje sojevima kampilobaktera koji nisu povezani s peradi (npr. sojevima iz papkara i divljih ptica) (132) te češći prijenos kampilobaktera putem mušica u tom razdoblju (136). Također, više temperature i lijepo vrijeme početkom ljeta potiču ljude na aktivnosti izvan kuće poput plivanja, igri na tlu, pripreme roštilja, što može povisiti izloženost kampilobakterima iz izvora u okolišu i vodama (133).

Prosječna mjesečna količina oborina u SDŽ nije bila povezana s mjesečnim brojem infekcija kampilobakterima, što je podudarno s rezultatima studije provedene u PGŽ (9), koja također ima mediteranski tip klime. Prosječna mjesečna relativna vlažnost u SDŽ je bila slabo negativno povezana s mjesečnim brojem infekcija kampilobakterima (Tablica 7, Slika 4, i 5 a - d). Nekoliko studija je pokazalo da odnos relativne vlažnosti i broja infekcija kampilobakterima varira ovisno o klimatskoj regiji (133, 137-138), sugerirajući tako moguće različite učinke lokalnih klimatskih varijabli na prijenos kampilobaktera.

Iako je u ovom istraživanju utvrđena sezonalnost kampilobakterioze i povezanost broja izolata kampilobaktera i temperature, odnosno relativne vlažnosti u SDŽ, odnos tih meteoroloških varijabli i zbijanja u okolišu je daleko složeniji, jer vjerojatno uključuje i izloženost ljudi različitim izvorima infekcija kampilobakterima i različitim dominantnim sojevima kampilobaktera tijekom godine (112). Stoga su potrebna dodatna istraživanja kako bi se pojasnio utjecaj okolišnih čimbenika.

Rezultati ovog istraživanja, prikupljeni sustavnim šestogodišnjim praćenjem broja laboratorijski potvrđenih infekcija kampilobakterima u SDŽ, koji je obuhvatio sve ambulantne i hospitalizirane bolesnike, omogućili su detaljan uvid u epidemiološke značajke kampilobakterioze u najvećoj županiji u RH. Ujedno je time, po prvi put u RH, uspostavljen tzv. „aktivni sustav nadzora“ (engl. *active surveillance system*) kampilobakterioze. Rezultati su pokazali da se demografske značajke oboljelih i sezonsko kretanje kampilobakterioze SDŽ ne razlikuju od tih značajki u drugim razvijenim zemljama. Međutim, osobitost kampilobakterioze u SDŽ je naglašena razlika ukupnih prosječnih stopa incidencija te stopa incidencije prema dobi i spolu u svim dobnim skupinama između urbanih i ruralnih područja županije.

Stope incidencije kampilobakterioze u SDŽ utvrđene praćenjem broja laboratorijski potvrđenih infekcija, koje su slične stopama incidencije u nekim drugim zemljama EU, odražavaju i sveobuhvatnost uspostavljenog sustava nadzora ove bolesti te široku dostupnost i kvalitetu mikrobiološke dijagnostike, odnosno ovog istraživanja. Naime, budući da se većina infekcija kampilobakterima javlja sporadično i da je bolest samoograničavajućeg tijeka te da, ovisno o dobi i prebivalištu bolesnika, mogu postojati razlike u broju liječničkih pregleda i zahtjeva za mikrobiološkim pretragama, broj laboratorijski potvrđenih infekcija kampilobakterima vjerojatno predstavlja samo dio stvarnog broja infekcija (117), što onemogućava procjenu stvarne incidencije bolesti. Nadalje, pad ukupnog broja stanovnika i starenje stanovništva (varijabilnost populacije)

ruralnih područja te smanjenje poljoprivredne proizvodnje u tim područjima tijekom posljednjih 25 godina donekle može umanjiti i mogućnost poopćavanja tog dijela naših rezultata na druga ruralna područja. Međutim, iako uzorak dobiven praćenjem broja laboratorijski potvrđenih infekcija ne mora obuhvatiti sve oboljele, omogućava dosljedno, sustavno i kvalitetno prikupljanje podataka (139). Također, dosljednost rezultata, tj. statistički značajna razlika između stopa incidencije u urbanim, suburbanim i ruralnim područjima utvrđena u svim dobnim skupinama tijekom šestogodišnjeg razdoblja potvrđuje urbano – ruralni gradijent incidencije kampilobakterioze u SDŽ, odnosno prevladavanje ove bolesti u njenim urbanim područjima. Dodatna istraživanja značajki kampilobakterioze u RH bila bi moguća kada bi se i u drugim županijama ujednačila dostupnost mikrobioloških pretraga i uspostavio aktivni sustav nadzora broja oboljelih.

Najčešće izolirana vrsta kampilobaktera u bolesnika s gastroenteritisom u SDŽ bio je *C. jejuni*. Izolati *C. jejuni* u bolesnika u SDŽ su prema fenotipskim i genotipskim značajkama bili usporedivi s izolatima u drugim zemljama EU. Naime, bili su genetski heterogeni s djelomično organiziranom klonskom strukturom, što se navodi i u molekularnim istraživanjima kampilobaktera izoliranih u bolesnika u Engleskoj i Nizozemskoj (24, 41).

Otpornost izolata na ciprofloksacin i tetraciklin u SDŽ je bila, u usporedbi sa stopama i otpornosti u EU (55), umjereno visoka, a na gentamicin i eritromicin vrlo niska, što se podudara s rezultatima iz Austrije (63% *C. jejuni* otpornih na ciprofloksacin i 21,5% otpornih na tetraciklin) i Slovenije (64,1% otpornih na ciprofloksacin i 27,7% otpornih na tetraciklin) (55) i nedavno objavljenim rezultatima sa zagrebačkog područja (53,4% otpornih na ciprofloksacin) (134), dok su u Španjolskoj stope otpornosti *C. jejuni* na ciprofloksacin i tetraciklin bile veće (91,5% i 80%) (55).

U SDŽ je, u razdoblju 2012. - 2013. godine, udio izolata *C. jejuni* otpornih na ciprofloksacin, tetraciklin i T_{cR}/C_{ipR} korezistentnih izolata bio značajno veći nego tijekom 2010. godine, kada je proveden pokusni dio istraživanja na uzorku od 50 bolesničkih izolata *C. jejuni* (109). S obzirom na rezultate tog istraživanja, otpornost izolata na ciprofloksacin je porasla s 26% na 60%, otpornost na tetraciklin s 4% na 24%, a udio T_{cR}/C_{ipR} korezistentnih izolata s 4% na 21% (45). Porast udjela T_{cR}/C_{ipR} korezistentnih izolata *C. jejuni* je bio popraćen i naglim pojavljivanjem klonski povezanih T_{cR}/C_{ipR} korezistentnih izolata koji su uzrokovali infekcije ravnomjerno raspodijeljene među bolesnicima svih dobnih skupina, za razliku od uobičajene dobne raspodjele s vrhuncem učestalosti infekcija kampilobakterima u najmlađim dobnim skupinama (Slika 7).

Takva osobita dobna raspodjela bolesnika inficiranih korezistentnim izolatima je posebno zanimljiva jer upućuje na moguću pojavu novih sojeva kampilobaktera među oboljelima. Naime, ravnomjerna dobna raspodjela oboljelih od kampilobakterioze se povezuje s nedostatkom imunosti prema dotad nepoznatim sojevima kampilobaktera, tj. smatra se da nedostatak imunosti na takve sojeve rezultira brzim širenjem infekcije unutar populacije neovisno o dobi (41, 115, 140). Također navode da sojevi kampilobaktera čiji se genotipovi rijetko pojavljuju u populaciji izazivaju infekcije neovisno o dobi, dok su sojevi s najčešćim, uobičajenim genotipovima najzastupljeniji u najmlađoj dobnoj skupini, a rijetki u starijoj dobi (115, 140). Pretpostavlja se da ponavljano izlaganje izolatima *C. jejuni* uobičajenih genotipova dovodi do razvoja imunosti na takve sojeve, a time i do smanjenja učestalosti infekcija u starijim dobnim skupinama (140). S druge strane, izolati koji imaju rijetke ili nove genotipove vjerojatno imaju neuobičajene antigene koji potiču infekciju u svim dobnim skupinama (140).

PFGE analiza Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata *C. jejuni* u SDŽ je pokazala da su ti izolati genetski heterogeni s djelomično izraženom klonskom strukturom (Slika 8 i 9). Pojava klonski povezanih izolata općenito se može pripisati klonskoj ekspanziji izolata određenog genotipa, adaptaciji izolata na uvjete u rezervoaru i/ili okolišu, njegovoj prisutnosti na određenom zemljopisnom području ili nerazvijenom imunološkom odgovoru domaćina (141). Nalazu klonske ekspanzije u našem istraživanju odgovarala bi pojava šest (od ukupno 8) Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata u genetski visoko podudarnim klonskim grupama (> 90%) N i K unutar svega tri tjedna (Slika 9, Tablica 10), što bi moglo ukazivati na bolju sposobnosti preživljavanja klonski povezanih korezistentnih sojeva u okolišu koji sadrži antibiotike. Naime, u takvim uvjetima, antimikrobna rezistencija izolata predstavlja jaku selektivnu prednost, pa udio klonskih povezanih izolata u ukupnoj populaciji kampilobaktera raste, a njihova perzistencija je posljedica bolje sposobnosti preživljavanja u takvom okolišu (142). Osim u klonskim grupama, Tc_R/Cip_R korezistentni sojevi, izolirani u bolesnika u SDŽ, su bili i difuzno raspoređeni među i sojevima s jedinstvenim genotipom, što sugerira da Tc_R/Cip_R korezistencija nije bila povezana samo sa širenjem pojedinih klonskih grupa, već je moguće nastala i kao posljedica horizontalnog genskog transfera između različitih sojeva kampilobaktera unutar rezervoara nakon selektivnog antibiotskog pritiska (143).

Opaženi porast broja Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata u SDŽ između 2010. i 2012. – 2013. godine nije bio popraćen većom potrošnjom antibiotika u bolesnika. Naime, prema podacima Odbora za praćenje rezistencije na antibiotike Akademije medicinskih

znanosti Hrvatske, potrošnja fluorokinolona i tetraciklina u RH među ambulantnim bolesnicima, koja predstavlja 92% ukupne potrošnje antibiotika u RH, je bila smanjena (144). Preciznije, između 2002. i 2012. godine je potrošnja kinolona smanjena s 1,52 na 1,49 definiranih dnevnih doza/1000 stanovnika/dan (engl. *Defined Daily Doses per Thousand Inhabitants per Day*, DDD/TID), a tetraciklina s 1,82 na 1,19 DDD/TID (144). Takvi podatci ne govore u prilog pretpostavci da je potrošnja antibiotika u ljudi presudan čimbenik za porast otpornosti na antibiotike izolata *C. jejuni* u bolesnika (145).

S druge strane, pretpostavlja se da životinje kojima se služimo u ishrani djeluju kao globalna mreža za širenje infekcija kampilobakterima među ljudima te da mogu utjecati i na prijenos sojeva otpornih na antibiotike (146). Naime, usporedno provedena genetička istraživanja kampilobaktera izoliranih iz peradi i drugih vrsta životinja u različitim zemljama na tri kontinenta (Europa, Sjeverna Amerika i Afrika) su dokazala da postoje podudarnosti među izolatima iz istog životinjskog domaćina, neovisno o zemljopisnoj lokaciji na kojoj životinje obitavaju, čime je dokazana interkontinentalna ekspanzija linija kampilobaktera unutar peradi (146). Stoga se nameće i pitanje o mogućem zoonotskom prijenosu rezistencije (147).

Naime, u mnogim se zemljama tijekom posljednjih godina nastavlja neprekidni porast otpornosti na fluorokinolone bolesničkih izolata kampilobaktera (62, 134, 148). Usporedo su porast otpornosti i dosezanje stopa otpornosti podjednako visokih kao među bolesničkim izolatima zabilježeni i među životinjskim izolatima kampilobaktera, osobito iz peradi, koja je glavni izvor bolesti u ljudi (147). Porast otpornosti ljudskih i životinjskih izolata kampilobaktera povezuje se s količinom potrošenih antibiotika u uzgoju životinja. Tako su najniže stope otpornosti na kinolone i makrolide, primjerice, zabilježene u skandinavskim zemljama koje su uvele restriktivan pristup u potrošnji antibiotika u uzgoju životinja (149). Uz to, izolati *Campylobacter* spp. otporni na kinolone perzistiraju u životinjskoj populaciji i nekoliko godina nakon smanjenja uporabe antibiotika, tj. tako tretirane životinje nisu samo prolazni domaćini otpornim izolatima, već i mjesta cirkulacije i diseminacije otpornosti unutar životinjske populacije (150). Stoga sustavi za uzgoj životinja koji koriste veće količine antibiotika predstavljaju rizik za širenje otpornih izolata u zajednici (147). Međutim, vrlo je teško kvantificirati u kojem opsegu uporaba antibiotika u uzgoju životinja doprinosi umanjivanju učinkovitosti tih lijekova u terapiji ljudi oboljelih od kampilobakterioze (147). Naime, izravna uzročna povezanost između uporabe antibiotika u uzgoju životinja i pojave sojeva kampilobaktera otpornih na antibiotike još nije potvrđena (151). Primjerice, do sada nije potvrđeno

klonsko grupiranje izolata otpornih na kinolone neposredno nakon uporabe kinolona u određenom životinjskom rezervoaru (147). Međutim, u Europi je nedavno dokazana korelacija visoke otpornosti na kinolone bolesničkih izolata kampilobaktera i otpornosti na kinolone izolata iz životinja koje se koriste u prehrani (engl. *food-producing animals*), te istodobno i korelacija kinolonske otpornosti tih životinjskih izolata s potrošnjom kinolona u uzgoju istih životinja (148).

Iako je u RH urađeno istraživanje otpornosti izolata kampilobaktera iz peradi (13) kojim je dokazana visoka otpornost tih izolata na antibiotike, nisu rađena ispitivanja na većem uzorku niti su dostupni podatci o potrošnji antibiotika u uzgoju i liječenju životinja i stoke u RH. Stoga je za pouzdanije zaključke potreban trajni nadzor potrošnje antibiotika i u veterinarskoj medicini te molekularne analize povezanosti otpornih izolata s njihovim izvorima u rezervoarima i okolišu.

Također, i rezultati istraživanja otpornosti *C. jejuni* u SDŽ, kao što su porast stopa otpornosti bolesničkih izolata kampilobaktera u SDŽ nakon 2010. godine (109), njihova podudarnost sa stopama otpornosti *C. jejuni* na antibiotike u susjednim zemljama te izostanak povezanosti s potrošnjom antibiotika u humanoj medicini (129), sugeriraju potrebu za daljnjim usporednim istraživanjima mehanizama prijenosa otpornosti kampilobaktera na antibiotike u veterinarskoj i humanoj medicini.

Značajna povezanost između otpornosti na tetraciklin i ciprofloksacin je nađena u izolatima *C. jejuni* iz peradi u Belgiji (152), u izolatima iz pilića iz domaćeg uzgoja i iz uvoza u Danskoj i Kanadi (153-154) te u izolatima bolesnika u Švicarskoj (155). U svim navedenim istraživanjima je prevalencija korezistentnih izolata bila visoka: 29 – 64% u peradi i 10 – 25% u bolesnika. Habib i suradnici (152) su opisali povezanost između T_{cR}/C_{ipR} korezistencije i MLST klonskih grupa sojeva *C. jejuni*. U istraživanju antibiotske otpornosti i genotipova *C. jejuni* u SDŽ je također zapaženo postojanje statistički značajne povezanosti između otpornosti na tetraciklin i ciprofloksacin u ukupnom uzorku te fenotipsko–genotipska povezanost između T_{cR}/C_{ipR} izolata i PFGE klonskih grupa (genotipova) (129). Takve pojave mogu odražavati mutacije na plazmidima (*tet(O)*gen) ili kromosomima (*gyrA* gen) ili funkcionalne promjene (smanjena permeabilnost membrane ili smanjena aktivnost CME efluks pumpe) sojeva *C. jejuni* (60). Iako se T_{cR}/C_{ipR} korezistentni izolati *C. jejuni* opisani u navedenim istraživanjima (152-155) ne mogu izravno usporediti i povezati sa T_{cR}/C_{ipR} korezistentnim izolatima otkrivenim u SDŽ jer nisu genotipizirani ili su korištene različite metode genotipizacije, njihova pojava u većem broju zemalja zahtijeva daljnji pažljivi

nadzor i detaljno istraživanje značajki, posebice stoga što relativno visoka učestalost ovih izolata značajno sužava terapijski izbor antibiotika u ozbiljnijim slučajevima bolesti (54-55).

Dosljednost nalaza o T_{CR}/Cip_R korezistentnim izolatima na koju ukazuje naše istraživanje: zabilježeni porast korezistencije između 2010. i 2012. - 2013. godine, osobita (ujednačena) dobna raspodjela bolesnika inficiranih T_{CR}/Cip_R korezistentnim izolatima, pojava tih izolata u kratkom vremenskom razdoblju od ožujka do svibnja 2013. godine te povezanost korezistentnih izolata s klonskim grupama ukazuje na moguću pojavu novih (emergentnih) sojeva *C. jejuni* na području SDŽ, kojima stanovništvo ranije nije bilo izloženo (129). Njihova pojava zahtijeva daljnje molekularno – epidemiološko praćenje.

U ovaj dio istraživanja je bilo uključeno 100% izolata hospitaliziranih bolesnika i 22% izolata svih ambulantnih bolesnika u razdoblju od 1.5.2012. do 31.5.2013., što uz procijenjenu razinu pogreške do 10%, ukupnu veličinu uzorka čini primjerenom. Opažene značajke izolata *C. jejuni* usporedive su sa značajkama izolata u drugim zemljama članicama EU što potvrđuje reprezentativnost, odnosno vanjsku valjanost uzorka. Također, nalazi o umjereno visokim stopama otpornosti, fenotipsko – genotipskoj i vremensko – prostornoj podudarnosti T_{CR}/Cip_R korezistentnih izolata, koje smo potvrdili statističkim, molekularno – mikrobiološkim i epidemiološkim analizama dosljedno upućuju na pojavu novonastalih sojeva. Potvrđivanje tih nalaza različitim analitičkim pristupima odražava i dobru unutrašnju valjanost (validnost) istraživanja.

Međutim, iako smo potvrdili da su T_{CR}/Cip_R korezistentni izolati svrstani u klonske grupe uz genotipsku podudarnost, pokazivali i vremensko - prostornu podudarnost, za njihovu detaljniju evaluaciju bila bi potrebna i genotipizacija komplementarnim metodama genotipizacije poput MLST –a i WGS –a. Naime, iako je PFGE dobro validirana i potpuno standardizirana metoda za nadzor kampilobaktera (47-48), primjena komplementarnih metoda genotipizacije mogla bi omogućiti detaljniji uvid u genetsku strukturu i molekularnu epidemiologiju ovih sojeva.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su stope incidencija kampilobakterioze najviše u urbanim područjima SDŽ, odnosno da stanovništvo u suburbanim i ruralnim područjima SDŽ rjeđe obolijeva od ove bolesti što je u skladu s pretpostavkama iznesenim u studiji Mughini – Grassa i suradnika, da su izvori kampilobakterioze povezani s mjestom prebivališta bolesnika (41). Međutim, za otkrivanje rizičnih čimbenika koji pridonose takvoj raspodjeli bolesti potrebna su dodatna istraživanja u

kojima bi se povezivali epidemiološki podatci o oboljelima s molekularnim istraživanjem bolesničkih izolata i izolata iz različitih izvora u hrani i okolišu.

Sustavnim epidemiološko – mikrobiološkim istraživanjem kampilobakterioze u SDŽ u šestogodišnjem razdoblju dobili smo uvid u epidemiološke značajke ove bolesti, mikrobnu ekologiju, raspodjelu vrsta, obrasce otpornosti i genotipove kampilobaktera. Uspostavljen je tzv. „aktivni sustav nadzora“ kampilobakterioze, omogućen detaljan uvid u značajke ove bolesti u RH i njihova usporedba s podacima iz drugih razvijenih zemalja, što nije bilo moguće na temelju dosadašnjeg načina praćenja. Utvrđena je umjereno visoka ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u SDŽ s najvišim stopama u dobi od 0-4 godine i među muškarcima te sa značajno višim stopama u urbanim nego u suburbanim i ruralnim područjima. Najčešće izolirana vrsta je bio *C. jejuni* kod kojega je utvrđena umjereno visoka rezistencija na ciprofloksacin i Tc_R/Cip_R korezistencija. Korezistentni sojevi su bili klonski povezani, pojavili su se u kratkom vremenskom razdoblju i bili su ravnomjerno raspodijeljeni među bolesnicima svih dobnih skupina što sugerira da je riječ o novonastalim sojevima na ovom području. Rezistentni fenotipovi *C. jejuni* nisu bili povezani s hospitalizacijom bolesnika, ali njihova visoka učestalost među izolatima može značajno ograničiti terapijski izbor antibiotika.

Ovi rezultati predstavljaju osnovu za planiranje preventivnih mjera i kontrolu ove bolesti te za optimalan izbor empirijske antimikrobne terapije. Također sugeriraju i da je potrebno nastaviti s istraživanjima mehanizama nastanka i prijenosa otpornosti kampilobaktera, te s molekularno–epidemiološkim praćenjem ove bolesti. Pritom se ukazuje potreba i za nacionalnim monitoringom otpornosti kampilobaktera na antibiotike i epidemiologije kampilobakterioze pri čemu je neophodan holistički pristup, tj. suradnja humane i veterinarske medicine uz daljnju evaluaciju poljoprivrednih aktivnost i čimbenika okoliša, odnosno pristup „Jednog zdravlja za sve“ (engl. *One Health*).

7. ZAKLJUČCI

1. Ukupna prosječna incidencija kampilobakterioze u SDŽ od 2007. do 2012. godine, procijenjena na temelju broja laboratorijski potvrđenih infekcija, bila je 96/100 000 stanovnika.

2. Stope incidencije su bile najveće u dobnoj skupini 0 - 4 godine i među muškarcima. U svim dobnim skupinama stope incidencije kampilobakterioze u urbanim područjima županije su bile statistički značajno veće nego u ruralnim područjima. Također su bile i statistički značajno veće nego stope incidencije u suburbanim područjima, osim u dobnoj skupini 0 - 4 godine.

3. Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterima u SDŽ u razdoblju od 2007. do 2012. godine je zabilježen u lipnju. Bio je umjereno povezan s višim prosječnim mjesečnim temperaturama i nižom relativnom vlažnosti zraka, dok prosječna mjesečna količina oborina nije bila povezana s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera. Poljoprivredne aktivnosti u SDŽ nisu bile povezane sa stopama incidencije kampilobakterioze.

4. Demografske značajke oboljelih i sezonalnost kampilobakterioze u SDŽ se ne razlikuju od značajki ove bolesti u drugim razvijenim zemljama. Međutim, osobitost kampilobakterioze u SDŽ je naglašena razlika ukupnih prosječnih stopa incidencija, uključujući i incidencije prema dobi i spolu između urbanih i ruralnih područja županije.

5. Najčešće izolirana vrsta u SDŽ je bio *C. jejuni*. Izolati *C. jejuni* bili su genetski heterogeni s djelomično organiziranom klonskom strukturom. Utvrđena je umjereno visoka rezistencija izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin i T_{cR}/Cip_R korezistencija, te porast rezistencije na ciprofloksacin i T_{cR}/Cip_R korezistencije između 2010. i 2012/13. godine. Otpornost *C. jejuni* na gentamicin i eritromicin je bila vrlo niska.

6. Porast udjela T_{cR}/Cip_R korezistentnih izolata *C. jejuni* je bio popraćen i naglim pojavljivanjem klonski povezanih T_{cR}/Cip_R korezistentnih izolata. Korezistentni klonski povezani T_{cR}/Cip_R izolati su se pojavili u kratkom tromjesečnom razdoblju, na maloj prostornoj udaljenosti i imali su specifičnu, ravnomjernu dobnu raspodjelu među bolesnicima svih dobnih skupina, što sugerira da je riječ o novim (emergentnim) sojevima na ovom području. Njihova pojava zahtijeva daljnje molekularno – epidemiološko praćenje.

7. Otpornost izolata nije bila povezana sa spolom niti s hospitalizacijom bolesnika. Međutim, visoka otpornost izolata na ciprofloksacin te pojava umjereno visokog udjela Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata može značajno ograničiti empirijski izbor antibiotika u terapiji kampilobakterioze.

8. SAŽETAK

Porast incidencije kampilobakterioze i porast otpornosti izolata kampilobaktera na antibiotike tijekom posljednjeg desetljeća smatraju se značajnim javnozdravstvenim problemom u razvijenim zemljama. Međutim, u SDŽ i u RH su postojeći podatci o kampilobakteriozi nedostatni zbog poteškoća u mikrobiološkoj dijagnostici i prijavljivanju ove bolesti. Također, istraživanja otpornosti bolesničkih izolata kampilobaktera na antibiotike i njihova genotipizacija u RH prethodno nisu rađeni.

Cilj ovog istraživanja je bio sustavnim praćenjem podataka o svim laboratorijski potvrđenim infekcijama kampilobakterima među ambulantnim i hospitaliziranim bolesnicima u SDŽ od 2007. do 2012. godine (tzv. „aktivnim sustavom nadzora“), procijeniti incidenciju kampilobakterioze u SDŽ i ispitati povezanost incidencije s demografskim, prostornim, klimatskim, poljoprivrednim i mikrobiološkim čimbenicima. Ispitani su i otpornost na antibiotike gradijent strip testom te genetska struktura najčešće vrste kampilobaktera *C. jejuni* metodom gel elektroforeze u električnom polju (PFGE).

U SDŽ je zabilježeno ukupno 2 658 laboratorijski potvrđenih infekcija kampilobakterima u šestogodišnjem razdoblju istraživanja. Ukupna prosječna stopa incidencije tog razdoblja je bila 96/100 000 stanovnika; najniža je bila u ruralnim područjima županije (61/100 000), a najviša u urbanim područjima (131/100 000). Stope incidencije su bile najviše u dobnoj skupini 0-4 godine i među muškarcima. Ukupne prosječne stope incidencije te stope incidencije prema dobi i spolu su bile značajno veće u urbanim nego u suburbanim ($P < 0,001$) i ruralnim ($P < 0,001$) područjima županije.

Najveći mjesečni broj infekcija kampilobakterima je zabilježen u lipnju. Bio je umjereno povezan s višim prosječnim mjesečnim temperaturama ($r=0,58$) i nižom relativnom vlažnosti zraka ($r=-0,27$), dok prosječna mjesečna količina oborina nije bila povezana s mjesečnim brojem izolata kampilobaktera. Poljoprivredne aktivnosti u SDŽ nisu bile povezane sa stopama incidencije kampilobakterioze.

Ispitivanje osjetljivosti i genotipizacija *C. jejuni* provedeni su od 1.5.2012. do 31.5.2013. testiranjem 77 uzastopnih izolata *C. jejuni* hospitaliziranih bolesnika i 77 izolata ambulantnih bolesnika, koji su izolirani istoga datuma kada i izolati hospitaliziranih bolesnika.

Na ciprofloksacin je bilo otporno (Cip_R) 60% testiranih izolata *C. jejuni*. a na tetraciklin 24%, od kojih je 89% bilo i korezistentno na ciprofloksacin (Tc_R/Cip_R). Otpornost *C. jejuni* na gentamicin i eritromicin je bila vrlo niska (< 0,7%). Izolati su bili genetski heterogeni s djelomično organiziranom klonskom strukturom.

Između 2010. i 2012/13. godine zabilježen je značajan porast rezistencije na ciprofloksacin i Tc_R/Cip_R korezistencije. Porast udjela Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata *C. jejuni* je bio povezan s naglim pojavljivanjem klonskih grupa Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata u kratkom tromjesečnom razdoblju, na maloj prostornoj udaljenosti i uz specifičnu, ravnomjernu dobnu raspodjelu među bolesnicima svih dobnih skupina, što sugerira da je riječ o novonastalim (emergentnim) sojevima na ovom području.

Otpornost izolata nije bila povezana sa spolom niti s hospitalizacijom bolesnika. Međutim, visoka otpornost izolata na ciprofloksacin i pojava Tc_R/Cip_R korezistentnih izolata može značajno ograničiti terapijski izbor antibiotika. Stoga je potrebno daljnje praćenje i istraživanje mehanizama nastanka i prijenosa otpornosti. Pri tom je neophodna suradnja humane i veterinarske medicine.

Iako se incidencija kampilobakterioze u SDŽ može smatrati umjereno visokom, demografske značajke oboljelih i sezonalnost kampilobakterioze u SDŽ se ne razlikuju od značajki ove bolesti u drugim razvijenim zemljama. Međutim, osobitost kampilobakterioze u SDŽ je naglašena razlika ukupnih prosječnih stopa incidencija te stopa incidencije prema dobi i spolu u između urbanih i ruralnih područja županije

Rezultati istraživanja ukazuju na nove i specifične epidemiološke značajke kampilobakterioze, obrasce otpornosti i genotipove *C. jejuni* u SDŽ i RH, što je osnova za planiranje preventivnih mjera, kontrolu ove bolesti i optimalan izbor empirijske antimikrobne terapije.

9. SUMMARY

The incidence of campylobacteriosis and number of antibiotic-resistant *Campylobacter* strains has been increasing worldwide in the last decade, contributing to the increasing public health burden of *Campylobacter* infections. Campylobacteriosis incidence and disease pattern(s) in Split-Dalmatia County (SDC), and throughout Croatia, are largely unknown due to deficiencies in illness reporting and laboratory diagnosis. Notification of laboratory-confirmed cases, which is commonly used in surveillance systems in the EU and the US is absent in Croatia. To date, no surveillance data on antibiotic resistance or molecular characterization of human *C. jejuni* isolates have been reported for Croatia.

Data from population-based laboratory surveillance were used to examine the epidemiological pattern of campylobacteriosis in a sentinel site, SDC, from 2007 to 2012, and to evaluate the association between disease incidence and demographic, geographical, climatic, agricultural, and microbiological factors. Antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping of isolates were performed.

A total of 2 658 laboratory-confirmed *Campylobacter* infections were recorded. Overall mean incidence was 96/100 000, ranging from 61/100 000 in rural to 131/100 000 in urban areas; rates were highest in the age group 0-4 years. Overall mean and age- and sex-specific incidences were significantly higher in urban versus suburban ($P < 0.001$) and rural areas ($P < 0.001$). The number of infections peaked in early summer and was correlated with higher average monthly temperature ($r = 0.58$) and lower humidity ($r = -0.27$), but not with precipitation. Incidence was not associated with agricultural activities.

From May 2012 to May 2013, 153 consecutive *C. jejuni* isolates were collected from stool samples of all patients hospitalized with gastroenteritis ($n = 76$) and matched positive outpatients (by the date of laboratory submission) ($n = 77$). The gradient strip method (E-test; bioMerieux) was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for antibiotics. All isolates were analyzed according to the standardized *Campylobacter* PFGE protocol of the Centers for Disease Control and Prevention.

Approximately 60% of *C. jejuni* isolates were resistant to ciprofloxacin, whereas 24% of isolates were resistant to tetracycline; of the latter, 89% were also coresistant to ciprofloxacin. Resistance to erythromycin and gentamicin was infrequent ($< 0.7\%$).

Antibiotic-resistant strains were generally not associated with the need for hospitalization; however, effective treatment options for *Campylobacter* infections may be limited.

C. jejuni isolates were genetically highly diverse and exhibited a weak clonal structure. However, the prevalence of coresistant strains increased sharply after 2010, and these coresistant strains were more prevalent in infections caused by clonal PFGE types, with distinct patterns of temporal occurrence and age distribution in infected patients, suggestive of newly identified strains. Further in-depth studies are essential to evaluate whether this phenomenon is linked to *C. jejuni* epidemiology in food animals and agricultural ecosystems.

Epidemiological features of campylobacteriosis in SDC from 2007 to date parallel those in developed countries with respect to demography and seasonality. However, a distinct campylobacteriosis pattern with consistently higher urban versus rural incidence was observed. An increase and a high prevalence of Cip_R and Tc_R/Cip_R coresistant *C. jejuni* were detected. These data signal recent and new campylobacteriosis patterns, which may help formulate further preventive measures.

10. DODATAK

Dodatak, tablica 1. Stanovništvo Splitsko–dalmatinske županije prema dobi, spolu i područjima (94)

Područje	SDŽ ukupno			Urbano			Suburbano			Ruralno			
	Spol	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko
Ukupno (sve dobi)		454 798	221 295	233 503	178 102	84 477	93 625	162 187	79 865	82 322	114 509	56 953	57 556
D o b	0-4	24 038	12 282	11 756	8 713	4 483	4 230	9 177	4 673	4504	6 148	3 126	3 022
	5-9	23 661	12 106	11 555	8 428	4 287	4 141	9 005	4 618	4 387	6 228	3 201	3 027
	10-19	54 748	27 804	26 944	20 151	10 206	9 945	19 873	10 092	9 781	14 724	7 506	7 218
	20-29	59 180	30 063	29 117	22 841	11 452	11 389	21 592	10 947	10 645	14 747	7 664	7 083
	30-39	60 934	30 871	30 063	24 437	12 039	12 398	22 566	11 467	11 099	13 931	7 365	6 566
	40-49	62 114	31 034	31 080	24 832	12 048	12 784	22 238	11 137	11 101	15 044	7 849	7 195
	50-59	65 286	32 289	32 997	26 408	12 420	13 988	23 117	11 508	11 609	15 761	8 361	7 400
	60-69	47 851	22 074	25 777	19 573	8 555	11 018	16 311	7 787	8 524	11 967	5 732	6 235
	70-79	39 130	16 844	22 286	15 314	6 438	8 876	12 945	5 832	7 113	10 871	4 574	6 297
>80	17 856	5 928	11 928	7 405	2 549	4 856	5 363	1 804	3 559	5 088	1 575	3 513	

*SDŽ =Splitsko-dalmatinska županija.

†Izvor: Popis stanovnika, kućanstava i stanova RH 2011.

‡Tablica 1 u Dodatku je dodatak Tablicama 2,3,4 i 5 teksta disertacije.

Dodatak, tablica 2. Broj izolata *Campylobacter* spp. u Splitsko–dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. godine prema dobi, spolu i područjima

Područje	SDŽ ukupno			Urbano			Suburbano			Ruralno			
Spol	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	
Ukupno (sve dobi)	2 658	1 500	1 158	1 403	785	618	835	475	360	420	240	180	
Dob	0-4	678	395	283	275	164	111	245	134	111	158	97	61
	5-9	316	194	122	148	88	60	113	67	46	55	39	16
	10-19	411	236	175	244	139	105	119	68	51	48	29	19
	20-29	364	200	164	212	117	95	109	62	47	43	21	22
	30-39	202	119	83	114	72	42	59	32	27	29	15	14
	40-49	169	91	78	86	45	41	51	30	21	32	16	16
	50-59	179	97	82	111	55	56	49	33	16	19	9	10
	60-69	151	78	73	92	49	43	41	20	21	18	9	9
	70-79	96	40	56	62	22	40	26	16	10	8	2	6
	>80	49	25	24	32	18	14	11	5	6	6	1	5
NP*	43	26	17	27	16	11	12	8	4	4	2	2	

*SDŽ =Splitsko-dalmatinska županija.

†M = muškarci, Ž= žene.

‡NP=nepoznata dob bolesnika.

Dodatak, tablica 3. Broj izolata *Campylobacter* spp. u Splitsko–dalmatinskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2012. godine prema kalendarskim godinama i područjima

Područje	SDŽ ukupno			Urbano			Suburbano			Ruralno		
Godina	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko	Ukupno	Muško	Žensko
2007.	490	263	227	257	140	117	177	93	84	56	30	26
2008.	509	298	211	296	174	122	141	72	69	72	52	20
2009.	463	257	206	261	151	110	138	73	65	64	33	31
2010.	430	259	171	214	116	98	142	99	43	74	44	30
2011.	347	190	157	147	83	64	124	74	50	76	33	43
2012.	419	233	186	228	121	107	113	64	49	78	48	30
Ukupno	2.658	1.500	1.158	1.403	785	618	835	475	360	420	240	180

*SDŽ =Splitsko-dalmatinska županija.

Dodatak, tablica 4. Usporedba broja prijavljenih infekcija kampilobakterima Službi za epidemiologiju HZJZ i broja laboratorijski potvrđenih izolata *Campylobacter* spp. u razdoblju od 2007. do 2012. godine

Područje	Broj prijavljenih infekcija uzrokovanih s <i>Campylobacter</i> spp.						
	2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.	Ukupno
SDŽ	0	0	97	96	66	53	312
	Broj laboratorijski potvrđenih izolata <i>Campylobacter</i> spp.						
	2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.	Ukupno
SDŽ	490	509	463	430	347	419	2 658
RH	np	np	np	np	np	np	np

*np = nije poznato (podatci nisu dostupni).

†Izvor: Hrvatski zdravstveno – statistički ljetopis 2012 (156).

11. LITERATURA

1. Vučković D, Plečko V. Kampilobakter. Helikobakter. U: Kalenić S: Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. Str. 207-13.
2. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. U: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, ur. *Campylobacter*. 3. izd. Washington: ASM Press; 2008. Str. 3-25.
3. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect. 2004;10:868-8.
4. Véron M, Chatelain R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. Int J Syst Bacteriol. 1973;23:122-34.
5. Kalenić, S. Epidemiološko značenje infekcija s *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 1982.
6. Kalenić S, Gmajnički B, Komeštki-Smrkić Z, Perković D, Breitenfeld V, Vodopija I. Kampilobakterioza – nova bolest na području grada Zagreba. Lij Vjes. 1982;104 (9):337-40.
7. Kalenić S, Gmajnički B, Milaković-Novak Lj, Baklaić Ž, Vodopija I, Skirrow MB, Sezonska raspodjela *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* (1. 9. 1982. – 31. 8. 1983.). Lij Vjes. 1985;107:431-2.
8. Popović-Uroić T. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* diarrhea in rural and urban populations in Yugoslavia. Epidemiol Infect. 1989;102(1):59–67.
9. Vučković D, Gregorović-Kesovija P, Brumini G, Tićac B, Abram M. Epidemiologic characteristics of human campylobacteriosis in the County Primorsko-goranska (Croatia), 2003-2007. Coll Antropol. 2011;35(3):847–53.
10. Balen Topić M, Beus A, Desnica B, Vicković N, Šimić V, Šimić D. Epidemiološke osobitosti kampilobakterioza u hospitaliziranih bolesnika. Infekt Glas. 2007;27(1):15-22.
11. Balen Topić M, Beus A, Desnica B, Vicković N, Šimić V, Šimić D. Kliničke osobitosti kampilobakterioza u hospitaliziranih bolesnika. Infekt Glas. 2007. 2007;27(2):71-9.

12. Fras A, Karlović M, Grmovšek P. *Vibrio fetus* kod goveda u Jugoslaviji. Vet. Arhiv. 1956;26:174.
13. Šimpraga B, Lohman-Janković I, Krstulović F, Sokolović M, Labrović A. Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti bakterija *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* izdvojenih iz tovnih pilića U: Balenović, M, ur. Zbornik IX. Simpozij peradarski dani; 2011 11.-14. svibnja; Šibenik, Hrvatska. Zagreb: Centar za peradarstvo; 2011. Str. 108-13.
14. Njari B, Mioković B, Kozačinski L, Kovačić A, Dobranić V, Zdolec N, Filipović I, Carev M. Značaj nalaza bakterija roda *Campylobacter* u hrani. U: Veterinarski dani: zbornik radova; 2011 26.-29. listopada; Šibenik, Hrvatska.
15. Kovačić A, Carev M, Tripković I, Srećec S, Šiško-Kraljević K. Comparison of *Campylobacter jejuni* pulsotypes isolated from humans and poultry in Split and Dalmatia County, Croatia. Int J Environ Health Res. 2015;25:10–20.
16. Mikulić M, Humski A, Njari B, Stojević D, Jurinović L, Špičić S, i sur. Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – klasične i molekularne metode (I. dio). Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis. 2017;48 297-303.
17. Mikulić M, Humski, A, Njari B, Stojević D, Jurinović L, Špičić S, i sur. Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – metode genotipizacije (II. dio). Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis. 2017;48(5):357-63.
18. Jurinović L, Humski A, Šimpraga B, Kompes G, Mikulić M, Krstulović F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. found in gulls, Laridae, wintering in Zagreb, Croatia. U: 19th International workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms CHRO 2017 Abstract book; 2017 10.-14. rujna; Nantes, Francuska. Str. 315.
19. Humski, A, Mikulić, M. *Campylobacter* spp. - značaj i provedba aktivnosti nadzora. U: XI. konferencija o sigurnosti i kvaliteti hrane; 2017 29.-31. svibnja; Opatija, Hrvatska.
20. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011;8(12):669-85.
21. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Campylobacteriosis. Annual epidemiological report for 2015 [Internet]. Stockholm (S): ECDC; 2018. [pristupljeno 15.5.2019.]. Dostupno na:

https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015_campylobacteriosis.pdf.

22. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, i sur. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:7-15.
23. Hoffmann S, Batz MB, Morris JG Jr. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot.* 2012;75(7):1292-302.
24. Cody AJ, McCarthy NM, Wimalaratna HL, Colles FM, Clark L, Bowler IC, i sur. A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical *Campylobacter* isolates in Oxfordshire, United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3193-201.
25. Wilkinson DA, O'Donnell AJ, Akhter RN, Fayaz A, Mack, HJ, Rogers LE, i sur. Updating the genomic taxonomy and epidemiology of *Campylobacter hyointestinalis*. *Sci Rep.* 2018 Feb 5;8(1):2393. doi: 10.1038/s41598-018-20889-x. PubMed PMID: 29403020; PubMed Central PMCID: PMC5799301.
26. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(3):237-44.
27. Kirkpatrick BD, Tribble DR. Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27(1):1-7.
28. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):863.
29. Zhou Y, Bu L, Guo M, Zhou C, Wang Y, Chen L, i sur. Comprehensive Genomic Characterization of *Campylobacter* genus reveals some underlying mechanisms for its genomic diversification. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e70241. doi: 10.1371/journal.pone.0070241. PubMed PMID: 23940551; PubMed Central PMCID: PMC3734277.
30. Allos BM, Iovine NM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and Related Species. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, ur. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. Str. 2485-93.

31. 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.
32. Epps SVR, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6292-304.
33. Ghorbanalizadgan M, Bakhshi B, Kazemnejad Lili A, Najjar-Peerayeh S, Nikmanesh B. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. *Iran Biomed J*. 2014;18(3):158-64.
34. González-Hein G, Huaracán B, García P, Figueroa G. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. *Braz Jour Microbiol*. 2013;44(4):1223-29.
35. Perera VN, Nachamkin I, Ung H, Patterson JH, McConville MJ, Coloe PJ, i sur. Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni*: role of the lipooligosaccharide core oligosaccharide in inducing antiganglioside antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50(1):27-36.
36. Ellström P, Feodoroff B, Hänninen ML, Rautelin H. Characterization of clinical *Campylobacter jejuni* isolates with special emphasis on lipooligosaccharide locus class, putative virulence factors and host response. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(3):134-9.
37. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, i sur. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*. 2000;68(8):4384-90.
38. Tracz DM, Keelan M, Ahmed-Bentley J, Gibreel A, Kowalewska-Grochowska K, Taylor DE. pVir and Bloody Diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):839-43.
39. Louwen RPL, van Belkum A, Wagenaar JA, Doorduyn Y, Achterberg R, Endtz HP. Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Journ Clin Microbiol*. 2006;44(5):1867-68.
40. Pendleton S, Hanning I, Biswas D, Ricke SC. Evaluation of whole-genome sequencing as a genotyping tool for *Campylobacter jejuni* in comparison with pulsed-field gel electrophoresis and flaA typing. *Poult Sci*. 2013;92(2):573-80.
41. Mughini Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, de Boer AG, Havelaar AH, Friesema IH, i sur. Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental

- origin: a combined case-control and source attribution analysis. PLoS One. 2012 Aug 3;7(8):e42599. doi: 10.1371/journal.pone.0042599. PubMed PMID: 22880049; PubMed Central PMCID: PMC3411806.
42. Šupraha P. Antimikrobna osjetljivost sojeva kampilobaktera na kinolone i makrolide u hospitaliziranih bolesnika s kampilobakteriozom. [Internet]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2014 [pristupljeno 7.4.2019.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:739196>.
 43. 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.
 44. Zautner AE, Ohk C, Tareen AM, Lugert R, Gross U. Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. BMC Microbiol. 2012 Aug 8;12:171. doi: 10.1186/1471-2180-12-171. PubMed PMID: 22873291; PubMed Central PMCID: PMC3487957.
 45. 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;49(4):268–76.
 46. Thakur S, Zhao S, McDermott PF, Harbottle H, Abbott J, English L, i sur. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(7):835-44.
 47. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl JM, Laurent F, i sur.; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill. 2013;18(4):pii=20380. doi: 10.2807/ese.18.04.20380-en
 48. Magana M, Chatzipanagiotou S, Burriel AR, Ioannidis A. Inquiring into the gaps of *Campylobacter* surveillance methods. Vet Sci. 2017 Jul 19;4(3):36. doi: 10.3390/vetsci4030036. PubMed PMID: 29056694; PubMed Central PMCID: PMC5644652.
 49. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, i sur. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2001;39(1):14-23.

50. Kärenlampi R, Rautelin H, Hänninen ML. Evaluation of genetic markers and molecular typing methods for prediction of sources of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infections. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(5):1683-5.
51. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disc Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline – Second Edition, CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
52. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Internet] 5. izd. Basel: The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2015 [pristupljeno 20.9.2018.]. Dostupno na: <http://www.eucast.org>.
53. Valdivieso-García A, Imgrund R, Deckert A, Varughese BM, Harris K, Bunimov N, i sur. Cost analysis and antimicrobial susceptibility testing comparing the E test and the agar dilution method in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 65(2):168-74.
54. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future microbiol.* 2009;4(2):189-200.
55. 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 2015. *EFSA J.* 2017;15(2):4694.
56. 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 Microbiology.* 2017 Apr 4;17(1):80. doi: 10.1186/s12866-017-0991-9. PubMed PMID: 28376713; PubMed Central PMCID: PMC5379741.
57. Unicomb LE, Ferguson J, Stafford RJ, Ashbolt R, Kirk MD, Becker NG, i sur. Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1368-74.
58. Mukherjee P, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Rajendran K, Mukhopadhyay AK. *Campylobacter jejuni* in hospitalized patients with diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(7):1155-56.

59. Pan H, Ge Y, Xu H, Zhang J, Kuang D, Yang X, i sur. Molecular characterization, antimicrobial resistance and Caco-2 cell invasion potential of *Campylobacter jejuni/coli* from young children with diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(3):330-4.
60. Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res Int*. 2013;2013:340605. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res Int*. 2013;2013:340605. doi: 10.1155/2013/340605. Epub 2013 Jun 24. PubMed PMID: 23865047; PubMed Central PMCID: PMC3707206.
61. Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S, Zhao S, Sippy RJ, Kwan P, i sur. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):680-7.
62. World Health Organization. The global view of Campylobacteriosis. Report of expert consultation. [Internet]. Geneva (CH): World Health Organization; 2013. [pristupljeno 10. 6. 2018]. Dostupno na: www.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601eng.pdf.
63. Tribble DR. Resistant pathogens as causes of traveler's diarrhea globally and impact(s) on treatment failure and recommendations. *J Travel Med*. 2017;24(Suppl 1):S6-S12.
64. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, i sur. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 2000;403(6770): 665–8.
65. Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, i sur. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol*. 2005 Jan;3(1):e15. doi: 10.1371/journal.pbio.0030015. Epub 2005 Jan 4. PubMed PMID: 15660156; PubMed Central PMCID: PMC539331.
66. Zhang Q, Sahin O, McDermott PF, Payot S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes Infect*. 2006;8(7): 1972–8.
67. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, i sur. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(2):459-66.

68. Avrain L, Vernozy-Rozand C, Kempf I. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1): 134–40.
69. Helms M, Simonsen J, Olsen KE, Mølbak K. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J Infect Dis.* 2005;191(7):1050-5.
70. Wassenaar TM, Kist M, de Jong A. Re-analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* infections. *Int J Antimicrobial Agents.* 2007;30:195–201.
71. Feodoroff B, Lauhio A, Ellström P, Rautelin H. A Nationwide Study of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteremia in Finland over a 10-year period, 1998-2007, with special reference to clinical characteristics and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.* 2011;53(8):99-106.
72. Prukner-Radovčić E, Kurečić Filipović S, Hengl B, Špičić S, Knežević, Pem Novosel I, i sur. Godišnje izvješće o zoonozama u Hrvatskoj za 2015./16. godinu. [Internet]. Hrvatska agencija za hranu [pristupljeno 7. 4. 2019.]. Dostupno na: [http:// https://www.bib.irb.hr/pregled/znanstvenici/130695?chunk=25&report=1](http://https://www.bib.irb.hr/pregled/znanstvenici/130695?chunk=25&report=1).
73. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual Epidemiological Report 2016 – Campylobacteriosis. [Internet]. Stockholm (S): ECDC; 2016. [pristupljeno 7. 6. 2018.]. Dostupno na: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/campylobacteriosis/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx>.
74. Marder EP, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Hurd S, Jervis R, i sur. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2017. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67:324–8.
75. Muellner P, Pleydell E, Pirie R, Baker MG, Campbell D, Carter PE, i sur. Molecular-based surveillance of campylobacteriosis in New Zealand – from source attribution to genomic epidemiology. *Euro Surveill.* 2013 Jan 17;18(3):pii=20365.
76. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):687-720.
77. Olson CKE, Ethelberg S, van Pelt W, Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. U: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, ur. *Campylobacter*. 3. izd. Washington (DC): ASM Press; 2008. Str. 163-89.

78. van Hees BC, Veldman-Ariesen MJ, de Jongh BM, Tersmette M, van Pelt W. Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in The Netherlands: an overview of 2000-2004. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(3):305-10.
79. Lal A, Hales S, French N, Baker MG. Seasonality in human zoonotic enteric diseases: a systematic review. *PLoS One*. 2012 Apr 2;7(4):e31883. doi: 10.1371/journal.pone.0031883. PubMed PMID: 22485127; PubMed Central PMCID: PMC3317665.
80. Fitzenberger J, Uphoff H, Gawrich S, Hauri AM. Urban-rural differences of age- and species-specific campylobacteriosis incidence, Hesse, Germany, July 2005 - June 2006. *Euro Surveill*. 2010 Oct 21;15(42):pii=19693.
81. Rushton SP, Sanderson RA, Diggle PJ, Shirley MDF, Blain AP, Lake I, et al. Climate, human behaviour or environment: individual-based modelling of *Campylobacter* seasonality and strategies to reduce disease burden. *J Transl Med*. 2019 Jan 21;17(1):34. doi: 10.1186/s12967-019-1781-y. PubMed PMID: 30665426; PubMed Central PMCID: PMC6341592.
82. Janiec J, Evans MR, Thomas DR, Davies GH, Lewis H. Laboratory-based surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* infection and the importance of denominator data. *Epidemiol Infect*. 2012;140(11):2045-52.
83. Boyle P, Parkin DM. Statistical methods for registries. U: Jensen OM, Parkin DM, MacLennan R, Muir CS and Skeet RG, ur. *Cancer Registration: Principles and Methods*, IARC Scientific Publication No. 95. Lyon: World Health Organization and International Agency for research on cancer; 1991. Str. 126-58.
84. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through Food – Foodborne Disease Active Surveillance network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(42):749-55.
85. Hall G, Yohannes K, Raupack J, Becker N, Kirk M. Estimating community *Salmonella*, *Campylobacter*, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(10): 1601–9.
86. Haagsma JA, Geenen PL, Ethelberg S, Fetsch A, Hansdotter F, Jansen, et al. Community incidence of pathogen-specific gastroenteritis: reconstructing the surveillance pyramid for seven pathogens in seven European Union member states. *Epidemiol Infect*. 2013;141(8):1625-39.

87. Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti. Narodne novine [Internet]. 2007;79:No 2486. [pristupljeno 12. 8. 2017.]. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_07_79_2486.html.
88. Baklajić Ž, Dečković-Vukres V, Kuzman M. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu (web izdanje) [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2011 [pristupljeno 12. 6. 2018.]. Dostupno na: https://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Ljetopis_2010.pdf.
89. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). FoodNet surveillance report for 2012 (final data). [Internet]. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, CDC, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Foodborne Waterborne, and Environmental Diseases; 2014 [pristupljeno 17. 8. 2018.]. Dostupno na: https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012_annual_report_508c.pdf.
90. Ailes E, Scallan E, Berkelman RL, Kleinbaum DG, Tauxe RV, Moe CL. Do differences in risk factors, medical care seeking, or medical practices explain the geographic variation in campylobacteriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites? Clin Infect Dis. 2012;54 (Suppl 5):S464-71.
91. Weinberger M, Lerner L, Valinsky L, Moran-Gilad J, Nissan I, Agmon V, i sur. Increased incidence of *Campylobacter* spp. infection and high rates among children, Israel. Emerg Infect Dis. 2013;19(11):1828–31.
92. Pitson GA, Grimwood K, Coulson BS, Oberklaid F, Hewstone AS, Jack I, i sur. Comparison between children treated at home and those requiring hospital admission for rotavirus and other enteric pathogens associated with acute diarrhea in Melbourne, Australia. J Clin Microbiol. 1986;24(3):395-9.
93. Državni zavod za statistiku. Popis stanovništva, kućanstava i stanova 2001. [Internet]. Zagreb (HR): Državni zavod za statistiku; 2002 [pristupljeno 17. 6. 2017]. Dostupno na: <https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/Census2001/census.htm>.
94. Državni zavod za statistiku. Popis stanovništva, kućanstava i stanova 2011. [Internet]. Zagreb (HR): Državni zavod za statistiku; 2013 [pristupljeno 17. 6. 2017]. Dostupno na: <https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/censuslogo.htm>.
95. Državni zavod za statistiku. Popis poljoprivrede 2003. [Internet]. Zagreb (HR): Državni zavod za statistiku; 2004 [pristupljeno 17. 6. 2017]. Dostupno na: https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/Agriculture2003/census_agr.htm.

96. Google LLC [Internet]; 2017 [pristupljeno 17. 6. 2017]. Dostupno na: <https://www.google.hr/maps/@45.840196,15.9643316,11z?hl=hr>.
97. Sveučilište u Splitu. Strategija razvoja urbane aglomeracije Split. [Internet]. Split (HR): Sveučilište u Splitu; 2016 [pristupljeno 17. 6. 2018]. Dostupno na: <http://www.split.hr/lgs.axd?t=16&id=16373>.
98. Kuhn KG, Nielsen EM, Mølbak K, Ethelberg S. Epidemiology of campylobacteriosis in Denmark 2000–2015. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(1):59-66.
99. Anonymus. Globe program – meteorologija. Kontrola i osnovna statistička obrada podataka. [Internet]. 2017 [pristupljeno 20. 9. 2018.]. Dostupno na: <http://globe.pomsk.hr/prirucnik/Statisticka%20kontrola%20i%20obrada%20pod.doc>.
100. 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.
101. Hendriksen RS, Karlsmose S, Jensen AB, Aarestrup FM. The External Quality Assurance System of the WHO Global Foodborne Infections Network year 2011. [Internet]. Lyngby (DK): National Food Institute, Technical University of Denmark; 2012 [pristupljeno 17. 6. 2017.]. Dostupno na: <https://www.food.dtu.dk>.
102. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1889-94.
103. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, i sur. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*. 2005;43: 1045-50.
104. Denis M, Chidaine B, Laisney MJ, Kempf I, Rivoal K, Mégraud F, i sur. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57: 23-9.
105. R Development Core Team. R program Version 3.2.2. [software]. 2015 Aug 14 [pristupljeno 19. 5 2017.]. Dostupno na: <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.2.2/>.

106. MedCalc Software: MedCalc Version 17.5.3 [software]. 2017 May 7 [pristupljeno 19. 5 2017.]. Dostupno na: <https://www.medcalc.org/download.php/>.
107. Lowry R Vassarstats: website for statistical computation [Internet]. Poughkeepsie (NY): Lowry R. 2017 [pristupljeno 7. 4.2017]. Dostupno na: <http://www.vassarstats.net/>.
108. Kolčić I. Epidemiološke mjere i mjerenje pojava u populaciji. U: Kolčić I, Vorko-Jović A, ur. Epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. Str. 14 – 26.
109. Jozipović D. Učestalost i osjetljivost na antibiotike uzročnika proljeva u ljudi iz roda *Campylobacter* izoliranih u KBC-u Split [Internet]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2012 [pristupljeno 15.1.2019.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:968678>.
110. Eurosurveillance Editorial Team. The 2013 joint ECDC/EFSA report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks published. Euro Surveill. 2015 Jan 29;20(4):pii=21021. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991.
111. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2012. EFSA Journal. 2014 Feb 19;12(2):3547. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3547.
112. 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.
113. 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.
114. Nelson W, Harris B. Campylobacteriosis rates show age-related static bimodal and seasonality trends. N Z Med J. 2011;124(1337):33–9.
115. 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.

116. 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.
117. Scallan E, Mahon BE, Hoekstra RM, Griffin PM. Estimates of illnesses, hospitalizations and deaths caused by major bacterial enteric pathogens in young children in the United States. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(3):217–21.
118. Fullerton KE, Ingram LA, Jones TF, Anderson BJ, McCarthy PV, Hurd S, i sur. Sporadic *Campylobacter* infection in infants: a population-based surveillance case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(1):19–24.
119. Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, Van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in the Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect*. 2010;138(10):1391–404.
120. Carrique-Mas J, Andersson Y, Hjertqvist M, Svensson A, Torner A, Giesecke J. Risk factors for domestic sporadic campylobacteriosis among young children in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 2005;37(2):101–10.
121. 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.
122. Muellner P, Marshall JC, Spencer SE, Noble AD, Shadbolt T, Collins-Emerson JM, i sur. Utilizing a combination of molecular and spatial tools to assess the effect of a public health intervention. *Prev Vet Med*. 2011;102(3):242–53.
123. Deckert AE, Taboada E, Mutschall S, Poljak Z, Reid-Smith RJ, Tamblyn S, i sur. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* human and chicken isolates from two health units. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(2):150–55.
124. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS One*. 2013 Dec 26;8(12):e83731. doi: 10.1371/journal.pone.0083731. PubMed PMID: 24386265; PubMed Central PMCID: PMC3873381.

125. Cha W, Henderson T, Collins J, Manning SD. Factors associated with increasing campylobacteriosis incidence in Michigan, 2004–2013. *Epidemiol Infect.* 2016;144(15):3316–25.
126. Nygård K, Andersson Y, Røttingen JA, Svensson A, Lindbäck J, Kistemann T, i sur. Association between environmental risk factors and *Campylobacter* infections in Sweden. *Epidemiol Infect.* 2004;132(2):317–25.
127. Franić R, Jurišić Ž, Gelo R. Food production and rural development – Croatian perspective within the European context. *Agroeconomia Croatica.* 2014;4(1):16–24.
128. Republic of Croatia Ministry of Environmental Protection, Physical Planning and Construction. Fifth National Communication of the Republic of Croatia under the United Nation Framework Convention on the Climate Change. [Internet]. Zagreb (Croatia): Republic of Croatia Ministry of Environmental Protection, Physical Planning and Construction; 2010 [pristupljeno 25. 8. 2018.]. Dostupno na: http://unfccc.int/resource/docs/natc/hrv_nc5.pdf.
129. 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;28(4):407-18.
130. Zakon o hrani. Narodne novine. [Internet]. 2007 [citirano 12. 8. 2017.];46:No 1554. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_05_46_1554.html.
131. Jylhä K, Tuomenvirta H, Ruosteenoja KH, Niemi-Hugaerts H, Keisu K, Karhu JA. Observed and projected future shifts of climatic zones in Europe and their use to visualize climate change information. *Weather Clim Soc.* 2010;2:148–67.
132. Strachan NJC, Rotariu O, Smith-Palmer A, Cowden J, Sheppard SK, O'Brien SJ, i sur. Identifying the seasonal origins of human campylobacteriosis. *Epidemiol Infect.* 2013;141(6):1267–75.
133. 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.
134. Šupraha P, Balen Topić M. Increase of resistance to fluoroquinolone and retained susceptibility to macrolides of *Campylobacter* isolates in Croatia. *Infect Dis (Lond).* 2017;49(10):781-4.
135. Yun J, Greiner M, Höller C, Messelenhäusser U, Rampp A, Klein G. Association between the ambient temperature and the occurrence of human *Salmonella* and

- Campylobacter* infections. Sci Rep. 2016 Jun 21;6:28442. doi: 10.1038/srep28442. PubMed PMID: 27324200; PubMed Central PMCID: PMC4914963.
136. Nichols GL. Fly transmission of *Campylobacter*. Emerg Infect Dis. 2005;11(3):361-4.
 137. Bi P, Cameron AS, Zhang Y, Parton KA. Weather and notified *Campylobacter* infections in temperate and sub-tropical regions of Australia: an ecological study. J Infect. 2008;57(4):317–23.
 138. White AN, Kinlin LM, Johnson C, Spain CV, Ng V, Fisman DN. Environmental determinants of campylobacteriosis risk in Philadelphia from 1994 to 2007. Ecohealth. 2009;6(2):200–8.
 139. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lesson 5: Public Health Surveillance. U: Principles of epidemiology in public health practice: an introduction to applied epidemiology and biostatistics, 3. izd. [Internet]. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, CDC;2012 [pristupljeno 7. 9. 2017.]. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/ophss/csels/dsepd/ss1978/lesson5/section4.html>
 140. Mughini-Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, DE Boer A, Havelaar AH, Friesema IH, i sur. Campylobacteriosis in returning travellers and potential secondary transmission of exotic strains. Epidemiol Infect. 2014;142:1277–88.
 141. Gupta S, Maiden MC. Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. Trends Microbiol. 2001;9:181–5.
 142. Wimalarathna HM, Richardson JF, Lawson AJ, Elson R, Meldrum R, Little CL, i sur. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. BMC Microbiol. 2013 Jul 15;13:160. doi: 10.1186/1471-2180-13-160. PubMed PMID: 23855904; PubMed Central PMCID: PMC3717071.
 143. Kinana AD, Cardinale E, Tall F, Bahsoun I, Sire JM, Garin B, i sur. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. Appl Environ Microbiol. 2006;72:3309–13.
 144. Payerl Pal M, Tambić Andrašević A. Antibiotic consumption in Croatia. U: Tambić Andrašević A, Tambić T, ur. Antibiotic resistance in Croatia, 2012. Zagreb: The Croatian Academy of Medical Sciences; 2013. Str.79–101.
 145. Niederer L, Kuhnert P, Egger R, Büttner S, Hächler H, Korczak BM. Genotypes and antibiotic resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates

- from domestic and travel-associated human cases. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:288–91.
146. Sheppard SK, Colles F, Richardson J, Cody AJ, Elson R, Lawson A, et al. Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:5269–77.
 147. Sproston EL, Wimalarathna HML, Sheppard SK. Trends in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Microb Genom.* 2018 Aug;4(8):e000198. doi: 10.1099/mgen.0.000198. E pub 2018 Jul 19. PubMed PMID: 30024366; PubMed Central PMCID: PMC6159550.
 148. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, and European Medicines Agency. ECDC/EFSA/EMA second joint report on to integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA J.* 2017 Dec 12;15:5077. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
 149. 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.
 150. Rossi M, Olkkola S, Roasto M, Kivistö R, Hänninen M. Poglavlje 4: Antimicrobial resistance and *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. U: Chen C, Yan X, Jackson CR, ur. *Antimicrobial Resistance and Food Safety: Methods and Techniques.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press; 2015. Str. 55–75.
 151. McCrackin MA, Helke KL, Galloway AM, Poole AZ, Salgado CD, Marriott BP. Effect of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne campylobacteriosis in humans: a systematic literature review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(13):2115-32.
 152. Habib I, Miller WG, Uyttendaele M, Houf K, De Zutter L. Clonal population structure and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in chicken meat from Belgium. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:4264–72.
 153. DANMAP 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Frøkjær Jensen V, Hammerum MA, Skjøl-Rasmussen L, Agersø Y, ur. [Internet] Søborg (DK): Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research

Programme; 2010 [pristupljeno 25. 8. 2018.]. Dostupno na: <http://www.danmap.org>.

154. Agunos A, Leger D, Avery BP, Parmley EJ, Deckert A, Carson CA, i sur. Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, western Canada. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1121–4.
155. Kittl S, Kuhnert P, Hachler H, Korczak BM. Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *J Appl Microbiol.* 2011;110:513–20.
156. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012. godinu. Poljičanin T, Benjak T, ur. [Internet] Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013 [pristupljeno 20.3.2019.]. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/12/Ljetopis_2012__.pdf

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNNE INFORMACIJE:

Ime i prezime: Merica Carev

Adresa: Fra Bone Razmilovića 8, 21000 Split (Hrvatska)

Mobitel: +385 98 784303

Email: mcarev3@gmail.com

Spol: Žensko

Datum rođenja: 22.05.1970.

Državljanstvo: hrvatsko

Udana, majka jednog djeteta

ZVANJE:

doktor medicine, specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom i stručni suradnik Katedre za medicinsku mikrobiologiju Medicinskog Fakulteta Split

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:

1976. – 1984.

Osnovna škola, Split 3, Split (Hrvatska)

Glazbena škola „Josip Hatze“, Split, klavir

1984. – 1988. Kemijski tehničar

Srednja kemijska škola, Split (Hrvatska)

1988. – 1994. Doktor medicine

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

1998. – 2003. Specijalist medicinske mikrobiologije

Ministarstvo zdravstva, Zagreb (Hrvatska)

2002. – 2003. Stručni poslijediplomski studij Medicinska mikrobiologija s parazitologijom

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

2005. – 2007. Poslijediplomski doktorski studij

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split (Hrvatska)

2013. Prihvaćena tema doktorske disertacije: Epidemiološke i mikrobiološko-molekularne značajke kampilobakterioza u Splitsko-dalmatinskoj županiji: 2007. - 2012.

03/2015 – 03/2021. Liječnička licenca: specijalist med. mikrobiologije s parazitologijom (br. 6120), Hrvatska liječnička komora (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

01.01.1995–31.12.1996. Liječnik pripravnik

Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split (Hrvatska)

26 .03. 1997. Položen državni ispit za doktora medicine

Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split (Hrvatska)

01.01.1997. – 30.03.1998. Suradnik na istraživanju "Uzroci smrtnosti novorođenčadi u Splitsko-dalmatinskoj županiji"

Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split (Hrvatska)

01.04.1998. – 18. 07. 2003. Specijalizant medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split, Split (Hrvatska)

19.07.2003. – 30.04.2005. Specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom
Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije Split, Split (Hrvatska)

01.05.2005 – danas: Voditeljica Odjela za dijagnostiku infekcija probavnoga
sustava

Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije Split, Split
(Hrvatska)

01.05.2014. – danas: Stručni suradnik Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju
Medicinski fakultet i Sveučilišni odjel Zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu,
Split
(Hrvatska)

OSOBNJE VJEŠTINE

Strani jezici: engleski i njemački (aktivno znanje)

MEĐUNARODNE EDUKACIJE I SURADNJA

2016. - danas

Recenzent CC časopisa: Foodborne Pathogens and Diseases

2002. - 2011.

2017. - danas

Recenzent CC časopisa: Croatian Medical Journal

Certifikati:

Statens Serum Institute, Denmark: Certificate of Training Salmonella Serotyping
Course, 2015.

DTU Food, WHO, CDC, Institut Pasteur: Certificate of Participation WHO Global
Salm Surv External Quality Assurance System 2008 - 2011.

Seminari:

2nd ICOHAR International Conference on One Health Antimicrobial Resistance, Utrecht, Netherlands, 2019.

Statens Serum Institute, Hilerod, Denmark: Training Salmonella Serotyping Course, 2015.

10th ESCMID Postgraduate Education Course: "Lower Respiratory Tract Infections: Problems in Diagnosis and Treatment", Dubrovnik, Croatia, 2000.

9th ESCMID Postgraduate Education Course: "Training Course in Hospital Epidemiology", Geneva, Switzerland, 2000.

Projekti:

2006. - 2011. WHO Global Salmonella Surveillance System EQAS - Program Participant

2007. – 2018. Epidemiološke i molekularno – mikrobiološke značajke kampilobakterioza u Splitsko–dalmatinskoj županiji

CC RADOVI:

1. 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;28(4):407-18.
2. 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;49(4):268-76.
3. Kovačić A, Carev M, Tripković I, Srećec S, Šiško-Kraljević K. Comparison of *Campylobacter jejuni* pulsotypes isolated from humans and poultry in Split and Dalmatia County, Croatia. *Int J Environ Health Res.* 2015; 25(1):10-20.

4. Barišić Z, Borzić E, Kraljević KS, Carev M, Zoranić V, Kaliterna V: Rise in ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* from urinary tract infections from 1999 - 2004, International Journal of Antimicrobial Agents. 2005;25(6):550 - 1.
5. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Carev M. Urinary tract infections in South Croatia: etiology and antimicrobial resistance, International Journal of Antimicrobial Agents. 2003;22 (Suppl 29):S61-S64.
6. Barišić Z, Vrsalović-Carević N, Milostić K, Alfrević D, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Kaliterna V, Carev M. Tuberculous orchiepididymitis diagnosed by nucleic acid amplification test: a case report. Int Urol Nephrol. 2003;35(2):203-5.
7. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Carev M, Kaliterna V. Optimal choice of antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in outpatients. Int J antimicrobial Agents 2002;19(Suppl.1):44-5.

CC SAŽECI:

1. Carev M, Novak A, Jerončić A & Tonkić M. Combined ciprofloxacin and tetracycline resistance among *C. jejuni* human faecal isolates in the largest Croatian county: a cross-sectional study. Abstract book of the 24th ECCMID. 10 - 13 May 2014; Barcelona, Spain. Barcelona: ESCMID; 2014.
2. Carev M, Tandara D, Rizvan P, Barišić Z, Šiško Kraljević K., Borzić E. An outbreak of gastroenteritis due to *Aeromonas hydrophila*. Abstract book of the 15th ECCMID; 2 - 5 April 2005; Copenhagen, Denmark. Copenhagen: ESCMID; 2005.
3. Babić-Erceg A, Pavić S, Erceg M, Barišić Z, Borzić E, Smoljanović M, Zoranić V, Kaliterna V, Carev M. Evaluation of the new „Chromogenic

Salmonella Agar” for the selective isolation of *Salmonella* spp. from stools. Clin Microbiol Infect 2002;8(Suppl. 1): 226.

4. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Carev M, Kaliterna V, Smoljanović M. In vitro susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* isolates in community acquired urinary tract infections. Clin Microbiol Infect 2000;6(Suppl.1): 97-8.
5. Barišić Z, Sardelić S, Zoranić V, Batarilo I, Carev M, Punda-Polić V. Species identification and antibiotic susceptibility of clinical isolates of enterococci isolated from hospitalized patients and outpatients in Split and Dalmatia County, Croatia. Abstracts of the ECCMID; Clinical Microbiology and Infection 1999;(Suppl.5): 325.

SCI:

1. Babić-Erceg A, Erceg M, Barišić Z, Borzić E, Zoranić V, Kaliterna V, Carev M, Marasović D. Dermatophyte infections in Split and Dalmatia County. Acta Dermatovenerologica Croatica 2000; 8(2): 119.

SCOPUS:

1. Njari B, Mioković B, Kozačinski L, Kovačić A, Dobranić V, Zdolec N, Filipović I, Carev M. Značaj nalaza bakterija roda *Campylobacter* u hrani. U: Veterinarski dani: zbornik radova; 2011 26.-29. listopada; Šibenik, Hrvatska.
2. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Carev M, Kaliterna V. Učestalost otpornosti na makrolide kliničkih izolata *Streptococcus pyogenes*. Infektol glasnik 2001; 21(1): 13-15.

OSTALI RADOVI:

1. Carev M. Reovirusi, rotavirusi i kalicivirusi. U: Tonkić M, Abram M, Dobec M, ur. Medicinska mikrobiologija. Split: Placebo; 2015. Str. 543-552
2. Carev M, Matijaš Ključević J, Boban N, Punda Polić V. A long-term *S. Typhi* carriage, a case report: Coordination of microbiological and epidemiological procedures contribute to the biosafety in the community and in the laboratory. U: Proceedings of the 1st Croatian Congress on Biosafety and Biosecurity with international participation; December 7 - 9 2017, Zagreb, Croatia.
3. Ines Škoko I, Kozačinski L, Lojkić I, Carev M, Listeš E. Comparative phylogenetic analysis of norovirus from shellfish and patients with gastroenteritis in Croatia. In: Brkljača Bottegaro N, Zdolec N, Vrbanac Z, editors. Book of Abstracts of the 7th International Congress „Veterinary Science and Profession”; October 5 – 7 2017; Zagreb, Croatia. Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb; 2017.
4. Smoljanović A, Carev M, Tandara D, Petrić I, Makarić K, Smoljanović M. Crijevne zaraze ponovno prijete. HČJZ; Vol 8, Broj 30, 7. travnja 2012.
5. Carev M. Značajke salmoneloza u Splitsko–Dalmatinskoj županiji 2005. – 2008. Javno zdravstvo, 2009.
6. Carev M, Šiško Kraljević K, Borzić E, Barišić Z. Značajke salmoneloza u Splitsko–Dalmatinskoj županiji 2005. - 2007. Knjiga sažetaka: V. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem; 2008; Zagreb, Hrvatska. Zagreb: Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju, 2008. Str. 155-56.
7. Carev M. Bakteriološka i virološka dijagnostika infekcija probavnoga sustava. U: Barišić Z, ur. Priručnik za suradnju mikrobiološkoga laboratorija i primarne zdravstvene zaštite. Split: Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije; 2004.

„Rezultat putovanja može biti i da se ponekad izgubimo, a tada odabiremo smjer nasumce – ono što tada pronalazimo više je od običnoga puta, to je ono što jesmo.“

Anonymus