Antimikrobna osjetljivost sojeva kampilobaktera na kinolone i makrolide u hospitaliziranih bolesnika s kampilobakteriozom

Šupraha, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:739196

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Paula Šupraha

Antimikrobna osjetljivost sojeva kampilobaktera na kinolone i makrolide u hospitaliziranih bolesnika s kampilobakteriozom

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Klinici za infektivne bolesti „ Dr. Fran Mihaljević“ pod vodstvom doc. dr. sc. Mirjane Balen Topić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Mirjana Balen Topić

SADRŽAJ

Str.

1. SAŽETAK.....1

2. SUMMARY.....2

3. UVOD.....3

3.1. OSOBINE UZROČNIKA.....6

3.1.1. Klasifikacija.....6

3.1.2. Struktura i fiziologija.....6

3.1.3. Virulencija i patogeneza.....7

3.1.4. Imunosni odgovor domaćina.....8

3.2. KLINIČKA SLIKA KAMPILOBAKTERIOZE.....9

3.3. LIJEČENJE KAMPILOBAKTERIOZE.....9

3.4. ANTIMIKROBNA NEOSJETLJIVOST KAMPILOBAKTERA.....10

3.4.1. Mehanizmi antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na kinolone...12

3.4.2. Mehanizmi antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na makrolide.14

4. HIPOTEZE.....16

5. CILJEVI RADA.....16

6. MATERIJALI I METODE.....17

Str.

6.1. ISPITANICI.....17

6.2. METODE.....18

6.2.1. Prikupljanje podataka.....18

6.2.2. Mikrobiološka analiza.....18

6.2.3. Statistička analiza.....19

7. REZULTATI.....20

7.1. Demografska i epidemiološka obilježja.....20

7.2. Kretanje antimikrobne osjetljivosti izoliranih sojeva kampilobaktera na kinolone.....23

7.3. Kretanje antimikrobne osjetljivosti izoliranih sojeva kampilobaktera na makrolide.....27

8. RASPRAVA.....28

9. ZAKLJUČAK.....33

10. LITERATURA.....34

11. ZAHVALA.....43

12. ŽIVOTOPIS.....44

1. SAŽETAK

Kampilobakterioza spada među najčešće bakterijske gastroenteritise u ljudi koju se, kada za to postoji indikacija, preporuča antimikrobno liječiti lijekovima iz skupine makrolida ili kinolona. U posljedenje vrijeme bilježi se porast antimikrobne neosjetljivosti sojeva kampilobaktera na spomenute lijekove, što se povezuje s njihovom primjenom u veterinarskoj medicini, dok je uloga njihove primjene u humanoj medicini u razvoju neosjetljivosti manje jasna. Cilj ovog istraživanja je bio prikazati kretanje antimikrobne osjetljivosti sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na kinolone i makrolide u razdoblju od 1994.-2014. godine u promatranoj populaciji te ispitati kretanje neosjetljivosti s obzirom na dob bolesnika i prema sezoni razboljevanja. Ovim retrospektivnim istraživanjem su obuhvaćene 2781 osobe s dokazanom kampilobakteriozom hospitalizirane u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju od 1994-2014. godine kojima je iz uzorka stolice izolirana vrsta *C. jejuni* ili *C. coli* te je učinjen antibiogram. Podaci o bolesnicima su prikupljeni iz Odsjeka za medicinsku dokumentaciju Klinike, dok su podaci o vrsti kampilobaktera i antimikrobnoj osjetljivosti sojeva prikupljeni iz dokumentacije Zavoda za kliničku mikrobiologiju Klinike. Rezultati su pokazali da je u promatranom razdoblju antimikrobna neosjetljivost na kinolone sojeva kampilobaktera značajno porasla ($p<0,001$), a kretala se u rasponu od 0% godine 1995. do 53,4% godine 2009. Neosjetljivost sojeva kampilobaktera se prema kalendarskom mjesecu hospitalizacije kretala u rasponu od 16,3% u travnju i svibnju do 29,1% u studenom te je bila značajno viša u razdoblju od studenog do siječnja u odnosu na ostatak godine ($p<0,001$). Prema promatranim dobnim skupinama se neosjetljivost na kinolone kretala u rasponu od 9,2% u djece stare 3-5 godina do 24,1% u osoba ≥60 godina te je bila signifikantno viša u odraslih nego u djece <18 godina ($p=0,016$). Antimikrobna neosjetljivost sojeva kampilobaktera na makrolide je bila 6/2769; 0,2%. Značajno veća antimikrobna neosjetljivost promatranih sojeva na kinolone u odraslih osoba te tijekom hladnih mjeseci u godini kada je općenito veća i upotreba antibiotika u ljudi, upućuje na utjecaj primjene kinolona u humanoj medicini na razvoj neosjetljivosti sojeva kampilobaktera.

Ključne riječi: *Campylobacter*, antimikrobna osjetljivost, kinoloni, makrolidi

1. SUMMARY

Campylobacteriosis is one of the most common bacterial gastroenteritis in humans. In certain indications, antimicrobial therapy using macrolides or quinolones may be of clinical benefit. In the last few decades, the emergence of antimicrobial resistance to macrolides and/or quinolones has been observed in *Campylobacter* strains, that is mainly consequence of their broad usage in veterinary medicine. The influence of their usage in human medicine on the development of *Campylobacter* resistance is less clear. The aim of this research was to investigate trends in the antimicrobial resistance on quinolones and macrolides in *C. jejuni* and *C. coli* strains during the 1994-2014 period, as well as the influence of the patient's age and seasonality. This retrospective study included 2781 patients with confirmed campylobacteriosis that were hospitalized at the University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević" during the 1994-2014 period. In all patients with campylobacteriosis the antimicrobial susceptibility tests were done. The patient's data were extracted from medical records while the data about the antimicrobial susceptibility were collected from the Department of Clinical Microbiology of the Hospital. Antimicrobial resistance on quinolones in *Campylobacter* strains increased significantly in the observed period ($p<0.001$), ranging from 0% in the year 1994 to 53.4% in the year 2009. The seasonal resistance of *Campylobacter* strains, ranged from 16.3% in April and May to 29.1% in November and was significantly higher from November until January compared to the rest of the year ($p<0.001$). In addition, the resistance on quinolones ranged from 9.2% in children 3-5 years of age to 24.1% in persons ≥60 years of age and it was significantly higher in adults than in children <18 years age ($p=0.016$). Antimicrobial resistance on macrolides in *Campylobacter* strains was 6/2769; 0.2%. Significantly higher antimicrobial resistance on quinolones in the observed strains in adults as well as during the cold months of the year when the usage of antibiotics in humans is generally higher, indicates the influence of antimicrobial usage in human medicine on the antimicrobial resistance development.

Key words: *Campylobacter*, antimicrobial susceptibility, quinolones, macrolides

2. UVOD

Kampilobakterioza, zoonoza uzrokovana bakterijama iz roda *Campylobacter*, je jedna od najčešćih bakterijskih gastroenteritisa u ljudi (Kaakoush i sur. 2015). Bolest je obično samoograničavajuća, ali se mogu razviti i teži oblici bolesti s ozbiljnim komplikacijama, kao što je Guillan-Barréov sindrom (McCrackin i sur. 2015).

Najčešći uzročnici kampilobakterioze u ljudi su vrste *C. jejuni* (95-98%) i *C. coli* (2-5%), koji su česti komenzali u probavnom sustavu domaćih i divljih životinja (Allos i sur. 2001). Kolonizacija probavnog sustava kampilobakterom je u životinja obično asimptomatska te one predstavljaju rezervoar zaraze (Sahin i sur. 2008). Glavni način zaraze kampilobakterom je konzumiranje sirove i nedovoljno termički obrađene hrane, najčešće mesa peradi. Izvor zaraze također može biti nepasterizirano mlijeko, kontaminirana voda za piće te kontakt sa životinjama. Čimbenik rizika za oboljenje predstavlja i međunarodno putovanje (Kaakoush i sur. 2015). Prijenos zaraze s čovjeka na čovjeka je rijedak (Huang i sur. 2005). Kontaminacija hrane kampilobakterom se može dogoditi u bilo kojem dijelu procesa proizvodnje hrane, što često otežava kontrolu širenja bolesti (Crim i sur. 2014).

Globalno gledajući, incidencija i prevalencija kampilobakterioze su u posljednjih 10 godina porasle i u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju. Značajno velik porast je vidljiv u Južnoj Americi, Europi te Australiji, dok se u djelovima Afrike, Azije te Bliskog Istoka bolest, naročito među djecom, smatra endemskom (Kaakoush i sur. 2015). Na području Europe podaci iz Njemačke pokazuju da je u razdoblju 2005.-2011. incidencija kampilobakterioze porasla sa 53,4/100 000 na 81,4/100 000 (Hauri i sur. 2013). Za razliku od Njemačke, u Danskoj i Švedskoj je zabilježen pad incidencije kampilobakterioze u razdoblju 2001.- 2007. (Jore i sur. 2010). Prema podacima naših autora, epidemiološka obilježja kampilobakterioze u Hrvatskoj odgovaraju epidemiološkim kretanjima u razvijenim europskim zemljama što znači da se bolest najčešće pojavljuje kod male djece i mlađih odraslih, pretežno u toplijem dijelu godine (Balen Topić i sur. 2007).

Kampilobakterioza se u većini slučajeva liječi simptomatski. Ipak, osobe s težom kliničkom slikom bolesti, visokim rizikom za razvoj komplikacija te imunokompromitirane je opravdano liječiti antibioticima. Lijekovi izbora su eritromicin (makrolid) te ciprofloksacin (fluorokinolon), dok su alternativa u liječenju

tetraciklini (Luangtongkum i sur. 2009; Wieczorek i Osek 2013). Porast antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na spomenute lijekove, naročito ciprofloksacin i tetracikline, ograničio je terapijske mogućnosti u liječenju kampilobakterioze, što predstavlja značajan javnozdravstveni problem u mnogim zemljama svijeta (Crim i sur. 2014).

Porast antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na makrolide i kinolone je zamjećen krajem 1980-ih godina, što se prvenstveno dovelo u vezu s rastućom primjenom ovih lijekova u veterinarskoj medicini te primjenom u uzgoju životinja u mesnoj industriji (Engberg i sur. 2001). Porast antimikrobne neosjetljivosti sojeva kampilobaktera izoliranih u životinja radi učestale primjene antibiotika se odražava na porast antimikrobne neosjetljivosti sojeva kampilobaktera izoliranih u čovjeka (Endtz i sur. 1991). Razvoj antimikrobne neosjetljivosti humanih izolata sojeva kampilobaktera tijekom liječenja ljudi s fluorokinolonima se procjenjuje na 10%. Izgleda da učestala primjena antibiotika u humanoj medicini također pridonosi razvoju antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera, ali u znatno manjoj mjeri nego primjena u veterinarskoj medicini (Wistrom i Norrby 1995).

Početak primjene enfloksacina u uzgoju životinja na području Azije i Europe početkom 1990.-ih godina je u pozitivnom odnosu sa značajnim porastom antimikrobne neosjetljivosti na fluorokinolone sojeva izoliranih u čovjeka (Endtz i sur. 1991), što je opaženo i u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) te Ujedinjenom Kraljevstvu nakon početka korištenja fluorokinolona u veterinarske svrhe (Sam i sur. 1999; Nachamkin i sur. 2002). U razdoblju 1992.-1998. u SAD-u je antimikrobna neosjetljivost humanih izolata sojeva kampilobaktera na kinolone značajno porasla s 1,3% na 10,2% (Smith i sur. 1999). U zemljama u kojima je primjena fluorokinolona u uzgoju životinja niska ili zabranjena (npr. Australija, Švedska, Finska), antimikrobna neosjetljivost humnih izolata sojeva kampilobaktera je mala ili umjerena (Hart i sur. 2004; Schonberg-Norio i sur. 2006; Sjogren i sur. 1997). U Danskoj, u kojoj je godine 2003. zabranjena primjena fluorokinolona u uzgoju životinja, zapažena je značajno veća antimikrobna neosjetljivost sojeva *C. jejuni* izoliranih iz uvezenog mesa peradi na fluorokinolone, tetracikline te nalidiksičnu kiselinu u odnosu na meso danske peradi (Skjøt-Rasmussen i sur. 2009). U istraživanju hrvatskih autora je antimikrobna neosjetljivost na kinolone humanih izolata sojeva kampilobaktera porasla u razdoblju 1997.-2000. s 0% na 16% (Balen Topić 2007). Ukupna antimikrobna neosjetljivost na

fluorokinolone sojeva *C. jejuni* i *C. coli* izoliranih u peradi s farmi na području Hrvatske iznosila je 35,7% (Horvatek i Prukner-Radovčić 2010).

Antimikrobna neosjetljivost na makrolide humanih izolata sojeva *C. jejuni* i *C. coli* varira ovisno o geografskom području (Gibreel i Taylor 2006). U svijetu je većinom stabilno niska, iako u nekim zemljama pokazuje trend rasta, dok je u pojedinim zemljama (zemlje jugoistočne Azije) i visoka. Porast antimikrobne neosjetljivosti je vidljiv naročito među sojevima izoliranim kod životinja (Wieczorek i Osek 2013). Zabrinjavajući je podatak da je ukupna antimikrobna neosjetljivost sojeva *C. jejuni* i *C. coli* izoliranih kod peradi s farmi na području Hrvatske na azitromicin iznosila 87.1%, dok je na eritromicin bila 64,3% (Horvatek i Prukner-Radovčić 2010).

U pojedinim dosadašnjim istraživanjima je i na humanim i na životinjskim izolatima primijećena veća antimikrobna neosjetljivost sojeva *C. coli* od neosjetljivosti sojeva *C. jejuni* (EFSA/ECDC 2011-2016). U istraživanju Lehtopolku i sur. 2010. primijećena je značajno veća antimikrobna neosjetljivost humanih izolata sojeva *C. coli* od neosjetljivosti humanih izolata sojeva *C. jejuni* na barem 5 različitih skupina antibiotika (Lehtopolku 2010).

U ovom istraživanju ispitano je kretanje antimikrobne osjetljivosti na kinolone i makrolide humanih izolata sojeva *C. jejuni* i *C. coli* u razdoblju 1994.-2014., s ciljem dobivanja novijih podataka o antimikrobnoj neosjetljivosti humanih izolata sojeva kampilobaktera u naših bolesnika. S ciljem ispitivanja utjecanja korištenja antibiotika u humanoj medicini na razvoj antimikrobne neosjetljivosti na kinolone sojeva kampilobaktera izoliranih u ljudi, u ovom istraživanju je ispitano kretanje neosjetljivosti s obzirom na dob bolesnika i s obzirom na sezonu razboljevanja, imajući u vidu činjenicu da se kinolonski antibiotici ne koriste u dječjoj dobi te da je potrošnja antibiotika veća tijekom hladnijih mjeseci u godini (Sun i sur. 2012; Suda i sur. 2014; Exasol 2015).

2.1. OSOBINE UZROČNIKA

2.1.1. Klasifikacija

U rod *Campylobacter* spadaju 22 za sada otkrivene vrste kampilobaktera te 8 podvrsta (Vučković i Plečko 2013). Rod pripada porodici *Campylobacteriaceae*, zajedno s rodovima *Arcobacter* te *Sulfurospirillum.* Sva tri roda pripadaju razredu *Proteobacteria* (Lastovica i sur. 2014).

Vrste kampilobaktera koje su najčešći uzročnici bolesti u čovjeka su *C. jejuni, C. coli, C. lari, C. fetus, C. upsaliensis, C. sputorum* i *C. hyointestinalis.* Vrsta *C. jejuni* je najčešći uzročnik intestinalnih infekcija, dok je vrsta *C. fetus* najčešći uzročnik ekstraintestinalnih infekcija. Vrste *C. nitrofigilis* te *C. concisus* se ne povezuju s razvojem bolesti u čovjeka. Nomenklatura za „nitrat-negativne“ kampilobaktere, koji se povezuju s intestinalnom bolesti, za sada još nije određena (Allos i sur. 2014).

2.1.2. Struktura i fiziologija

Bakterije iz roda *Campylobacter* su gram-negativni, nesporogeni, zavinuti štapići veličine 0,2-0,9 x 0,5-5µm. Pokretne su, što im omogućuje jedna polarno smještena flagela. Pri duljem izlaganju atmosferskom kisiku mogu poprimiti kokoidan oblik. Najbolje rastu u mikroaerofilnim uvjetima (5-7% O_2) uz nešto višu koncentraciju ugljikovog dioksida (5-10% CO_2). Svim vrstama kampilobaktera je optimalna temperatura za rast od 38-42°C (Vučković i Plečko 2013). Kampilobakteri su relativno termorezistentne bakterije, ali ih uništava temperatura pasterizacije, dok niske temperature dobro podnose. Energiju dobivaju razgradnjom aminokiselina, dok fermentativnog i oksidativnog metabolizma nemaju. Svi sojevi luče oksidazu (Kalenić 2005).

Glavni antigen roda *Campylobacter* je termostabilni lipopolisaharidni O-antigen (Vučković i Plečko 2013). Nalazi se na vanjskoj memebrani bakterije, visoko je varijabilan te je prema njemu, tipizacijom izolata, determinirano oko 70 serotipova *C. coli* i *C. jejuni* (Kalenić 2005).

U ostale antigene spadaju površinski PEB1 antigen, flagelarni H-antigen te površinski protein mikrokapsule (eng. surface (S)-layer protein) (Kalenić 2005; Allos i

sur. 2014). Površinski PEB-1 antigen, uglavnom zastupljen među serotipovima *C. jejuni*, se smatra najvažnijim adhezinom i bitnim čimbenikom virulencije (Allos i sur. 2014), dok se flagelarni H-antigen, zbog svoje varijabilnosti, koristi u tipizaciji izolata. Poznato je preko 100 H-serotipova *C. coli*, *C. jejuni* i *C. lari* (Kalenić 2005). Površinski protein mikrokapsule, vezan na lipopolisaharidni O-antigen, je čimbenik virulencije svojstven soju *C. fetus* (Allos i sur. 2014).

2.1.3. Virulencija i patogeneza

Patogenetski učinak kampilobaktera na organizam ovisi o nizu čimbenika, od kojih su tri najvažnija: virulencija uzročnika, ingestirana doza uzročnika te imunokompetencija domaćina (Allos i sur. 2014).

Osnovni čimbenici virulencije kampilobaktera su pokretljivost, adhezija, invazija, proizvodnja toksina te sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina (Vučković i Plečko 2013). Kretanjem pomoću flagele koloniziraju sluznicu crijeva te secerniraju različite proteine koji pridonose invazivnosti. Strukturni proteini flagele, flagelini, ostaju neprepoznati od strane *Toll-like 5* receptora upalnih stanica domaćina pa ne dovode do otpuštanja proupalnih citokina interleukin-8, čime odgađaju razvoj upalnog odgovora. Adheziju bakterije na sluznicu olakšavaju molekule adhezini kao što su površinski antigen PEB1, površinski lipoprotein JipA, CadF (adhezija na fibronektin) i drugi (Vučković i Plečko 2013; Allos i sur. 2014). Lipopolisaharidni O-antigen kao čimbenik virulencije spada u endotoksine (Kalenić 2005). Sijalizirani oblik ovog antigena kod pojedinih sojeva *C. jejuni* se povezuje s razvojem Guillan-Barréovog sindroma te s težom kliničkom slikom gastroenteritisa (Allos i sur. 2014). Od ostalih toksina značajni su enterotoksin, srodan enterotoksinu *V. cholerae*, potom citotoksin s citopatskim učinkom te citoletalni distendirajući toksin (eng. cytolethal-distending toxin, CDT) čija uloga u patogenezi nije u potpunosti razjašnjena (Kalenić 2005; Allos i sur. 2014). U izbjegavanju imunološkog sustava domaćina je značajan varijabilni površinski S-antigen, svojstven *C. fetus*, koji ometa adheziju Cd3-komponente komplementa na bakteriju sprječavajući fagocitozu iste, što objašnjava sklonost ovog soja kampilobaktera ekstraintestinalnom širenju i izazivanju bakterijemije. Visokomolekularni *pVir* plazmid, izoliran u pojedinih sojeva kampilobaktera, se povezuje s većom učestalosti razvoja krvavih stolica.

Infektivna doza za kampilobakter je 10^5 bakterija, dok je vrijeme inkubacije 1-7 dana. Bolest se najčešće razvije unutar 2-4 dana od ekspozicije. Ekskrecija kampilobaktera u fecesu nakon preboljele infekcije traje u prosjeku 2-3 tjedna.

Sojevi kampilobaktera se umnažaju u tankom i debelom crijevu čovjeka gdje izazivaju nespecifičan kolitis obilježen degeneracijom i atrofijom sluznice te razvojem kriptalnih apscesa. Na mikroskopskom preparatu sluznice crijeva zahvaćene kampilobakteriozom se vidi upalni infiltrat neutrofila, mononukleara i eozinofila u lamini propriji dok se u stolici redovito nalaze neutrofili i eritrociti.

Kolonizacija crijeva kampilobakterom ovisi i o prolasku bakterija kroz želudac čija želučana kiselina predstavlja nepovoljan medij za preživljavanje kampilobaktera. Stoga su osobe na terapiji inhibitorima protonske pumpe podložnije razvoju infekcije kampilobakterom. Ubrzan prolazak hrane kroz želudac posredovan npr. mlijekom, vodom ili masnim namirnicama, smanjuje trajanje kontakta sa želučanom kiselinom te posljedično pogoduje razvoju gastroenteritisa s relativno niskim infektivnim dozama kampilobaktera (Allos i sur. 2014).

2.1.4. Imunosni odgovor domaćina

Temelj imunog odgovora domaćina čine stanice nespecifične (urođene) imunosti, kao što su fagociti i intestinalne epitelne stanice, koje preko *toll-like* receptora 2 i 4 prepoznaju površinske antigene *C. jejuni*. Aktivacija *toll-like* receptora je poticaj za lučenje proupalnih citokina (interelukin-6 i TNF-α) i kemokina (interleukin-8) koji privlače stanice domaćina, pretežno neutrofile, koji uništavaju bakterije. *C. jejuni* je također osjetljiv na djelovanje α i β defenzina kojeg luče fagociti i intestinalne epitelne stanice. Antigen prezentirajuće stanice, kao i epitelne stanice posjeduju na svojoj površini NOD1 protein (eng. nucleotide-binding oligomerization domain protein 1), receptor koji prepoznaje peptidoglikane na površini invazivnih sojeva što je još jedan važan mehanizam u nastanku upalnog odgovora. Za savladavanje infekcije je u konačnici ključno međudjelovanje nespecifične (urođene) i specifične (stečene) imunosti. Važnost specifične (stečene) imunosti u upalnom odgovoru je vidljiva iz primjera osoba s hipogamaglobulinemijom ili sindromom stečene imunodeficijencije (AIDS), kod kojih je primjećena veća incidencija infekcija uzrokovanih s *C. jejuni* kao i teža klinička slika bolesti (Allos i sur. 2014).

2.2. KLINIČKA SLIKA KAMPILOBAKTERIOZE

Bakterije iz roda *Campylobacter* najčešće uzrokuju gastroenteritis, a najčešći uzročnik je u humanoj populaciji *C. jejuni* (Wieczorek i Osek 2013). Infekcija sojevima *C. jejuni* najčešće prolazi kao asimptomatska bolest ili kao samoograničavajući gastroeneteritis obilježen proljevom. Proljev može biti blag ili obilan, ponekad s primjesima krvi i sluzi te praćen abdominalnim kolikama, mučninom, vrućicom, glavoboljom i općom slabošću (Vučković i Plečko 2013). U početku bolesti se može javiti prolazna bakterijemija (Kalenić 2005). Simptomi se najčešće spontano povlače za 7 dana dok su komplikacije bolesti iznimno rijetke (Kalenić 2005). Kasne komplikacije bolesti su reaktivni artritis i Guillan-Barréov sindrom (Kalenić 2005; Vučković i Plečko 2013).

Infekcija s *C. jejuni* u trudnica može dovesti do preranog porođaja, spontanog pobačaja, neonatalnog meningitisa te perinatalne sepse (Vučković i Plečko 2013).

Sojevi *C. fetus* najčešće se povezuju sa sistemskim oblikom bolesti kojem mogu i ne moraju prethoditi intestinalni simptomi (Allos i sur. 2014). Kliničkom slikom obično dominiraju simptomi bakterijemije uz moguća sekundarna sijela infekcije (npr. endokarditis, tromboflebitis, meningitis i dr.).

Teži oblici kampilobakterioze se pojavljuju kod imunokompromitiranih te kod osoba s težom sistemskom bolešću (Kalenić 2005).

2.3. LIJEČENJE KAMPILOBAKTERIOZE

Osnova lječenja gastroenteritisa uzrokovanog kampilobakterom je nadoknada tekućine i elektrolita.

Liječenje antibioticima opravdano je u manje od polovice slučajeva kampilobakterioze. Primjena antibiotika preporuča se u slučaju visoke vrućice, krvavih stolica te kada osoba ima više od 8 stolica na dan. Antimikrobno liječenje je također opravdano kada se simptomi bolesti ne smiruju ili se pogoršavaju od trenutka postavljanja dijagnoze te kada simptomi perzistiraju dulje od jednog tjedna (Allos i sur. 2014).

U in *vitro* uvjetima, *C. jejuni* je osjetljiv na eritromicin, tetracikline, aminoglikozide, kloramfenikol, kinolone, nitrofurantoin te klindamicin. Zbog visoke učinkovitosti, lakoće primjene te niske toksičnosti, lijek izbora u liječenju

kampilobakterioze je makrolid eritromicin (Allos i sur. 2014). Osim što skraćuje trajanje bolesti, u većine osoba eliminira kliconoštvo unutar 72 sata od početka primjene. Također je lijek izbora u liječenju bakterijemije i sepse uzrokovane kampilobakterom. Ne preporuča se u liječenju infekcije uzrokovane vrstom *C. fetus*. Važna, iako ne tako česta nuspojava ovog lijeka, je iznenadna srčana smrt. Budući da se eritromicin metabolizira preko CYP3A4, rizik za iznenadnu srčanu smrt je pet puta veći kod osoba koje su istodobno na terapiji lijekovima koji inhibiraju CYP3A4 (npr. blokatori kalcijskih kanala). Rizične skupine (u terapiji jedan ili više inhibitora CYP3A4) se preporuča liječiti azitomicinom. Makrolidi širokog spektra, kao što su azitomicin i klaritromicin, imaju jednaku terapijsku učinkovitost kao eritromicin (Allos i sur. 2014). Unatoč preporuci, u Hrvatskoj se u praksi puno češće primjenjuje azitromicin, dok se eritromicin koristi iznimno.

Drugi lijek izbora je fluorokinolon ciprofloksacin kojeg zbog rastuće neosjetljivosti treba korisiti s oprezom (Allos i sur. 2014). Primjena fluorokinolona je u dječjoj dobi kontraindicirana zbog mogućih ireverzibilnih oštećenja zglobnih hrskavica (Talsma i sur. 1999). U liječenju kampilobakterioze, kod starijih od 9 godina se mogu primjenjivati i tetraciklini. Većina sojeva *C. coli* i *C. jejuni* nije osjetljiva na cefalosporine i penicilin, zbog čega primjena ovih antibiotika u liječenju kampilobakterioze nije opravdana. U liječenju su učinkoviti amoksicilin te tikarcilin sa klavulanskom kiselinom. Osjetljivost na sulfonamide i metronidazol je varijabilna. U osoba s teškom kliničkom slikom i lošeg općeg stanja, preporuča se liječenje gentamicinom, imipenenom ili kloramfenikolom (Allos i sur. 2014).

2.4. ANTIMIKROBNA NEOSJETLJIVOST KAMPILOBAKTERA

Neosjetljivost kampilobaktera na antibiotike je posljedica ili spontane mutacije određenog gena bakterije ili je rezultat horizontalnog prijenosa gena između bakterija (eng. horisontal gene transfere, HGT).

Spontane mutacije su u podlozi većine mehanizama neosjetljivosti kampilobaktera na antibiotike. Primjećeno je da *C. jejuni*, za razliku od drugih bakterija, nema velik broj gena koji kodiraju molekule koje popravljaju DNA, kao što su npr. *mutH* i *mutL* (eng. methyl-directed mismatch repair), *phr* (eng. repair of pyrimidine dimers) te *vsr* (eng. very short patch repair). Također mu nedostaju geni koji štite DNA od mutagenog djelovanja UV-zračenje, *umuCD*. Nedostatak ovih gena

ga čini podložnijim za nastanak mutacija (Parkhill i sur. 2000; Fouts i sur. 2005; Zhang i sur. 2006). U istraživanju koje su proveli Zhao i sur. 2016, provedeno je sekvenciranje čitavog genoma (eng. whole-genome sequencing) 114 izolata kampilobaktera s ciljem identificiranja gena koji se povezuju s antimikrobnom neosjetljivošću. Identificirano je 18 gena: *tet(O)*, bla_{OXA-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 fenotipskog ispoljavanja neosjetljivosti na testirani lijek te prisutnosti jednog ili više mutiranih gena za neosjetljivost. Ta je povezanost za tetracikline, ciprofloksacin/nalidiksična kiselina te eritromicin u ovom istraživanju bila 100%. Unatoč ovim spoznajama, mehanizmi kojima spomenuti geni ostvaruju antimikrobnu neosjetljivost u kampilobaktera za sada nisu u potpunosti razjašnjeni (Zhao i sur. 2016).

Bakterije iz roda *Campylobacter* nisu sklone ugradnji tuđeg genetskog materija u vlastiti. Međutim, kod njih se ipak viđa horizontalni prijenos gena za neosjetljivost između sojeva kampilobaktera, pa čak i između drugih gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterija i kampilobaktera. Horizontalni prijenos gena se ostvaruje mehanizmima prirodne transformacije, transdukcije ili konjugacije, a prenose se genetski elementi u obliku kromosoma, transpozona ili plazmida (Allos i sur. 2014). Konjugacija ima temeljnu ulogu u prijenosu plazmid-posredovane neosjetljivosti (Wieczorek i Osek 2013). Primjer konjugacije je prijenos *tet(O)* gena između bakterija *C. jejuni* zapažen u crijevima kokoši (Avrain i sur. 2004). Velika prevalencija plazmida konjugiranih *tet(O)* genom se povezuje s rastućom neosjetljivošću kampilobaktera na tetracikline. Prirodna transformacija je osnovni mehanizam prijenosa kromosomalno posredovane neosjetljivosti, a povezuje se s razvojem neosjetljivosti kampilobaktera na makrolide i fluorokinolone (Wieczorek i Osek 2013).

Temeljni mehanizmi kojima se ostvaruje antimikrobna neosjetljivosti sojeva kampilobaktera 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; eng. 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 neosjetljivost na antibiotike je obično rezultat aktivnosti efluksne pumpe i postojanja još jednog od navedenih mehanizama (Allos i sur. 2014).

2.4.1. Mehanizmi antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na kinolone

U liječenju kampilobakterioze važnu ulogu imaju fluorokinoloni (Allos i sur. 2014). Fluorokinoloni djeluju na dva velika bakterijska enzima, topoizomerezu II (DNA-girazu) i topoizmoerazu IV, enzime koji uzajamno sudjeluju u replikaciji, rekombinaciji, transkripciji i reparaciji bakterijske DNA (Jacoby 2005). Fluorokinoloni mijenjaju funkciju spomenutih enzima na način da povećavaju koncentraciju „DNA-enzim cleavage kompleksa“ čime oni postaju toksični za stanicu i u konačnici dovode do fragmentacije bakterijske DNA (Hiasa i Shea 2000).

Temeljni mehanizam antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na kinolone je aminoacidna supstitucija u QRDR regiji (eng. quinolone resistance-determining region) (Allos i sur. 2014). Najčešća mutacija koja se povezuje s neosjetljivošću na fluorokinolone je mutacija C257T u *gyrA* domeni koja dovodi do Thr-86-Ile supstitucije u DNA-girazi. Ova mutacija se viđa u visokoneosjetljivih spojeva kampilobaktera na fluorokinolone. Ostale opisane supstitucije u QRDR regiji *gyrA* domene su: Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val i Asp90Tyr. S razvojem neosjetljivosti na fluorokinolone se povezuju i sljedeće mutacije: T86 K, A70T i D90N. Potonje su rjeđe viđene te ne igraju značajnu ulogu u razvoju neosjetljivosti na fluorokinolone (Payot i sur. 2006). Ukoliko je prisutna, mutacija u *gyrB* domeni se ne povezuje s neosjetljivošću na fluorokinolone (Allos i sur. 2014). Frekvencija mutacije u *gyrA* domeni je velika i iznosi od 10^{-6} do 10^{-8} /stanica/generacija, što je 10 000 puta više od frekvencije mutacije 23S rRNA kod neosjetljivosti na makrolide. Iz toga proizlazi da kampilobakter razvija brže neosjetljivost na fluorokinolone u donosu na makrolide (Yan i sur. 2006).

Drugi važan mehanizam neosjetljivosti kampilobaktera na kinolone je postojanje efluksne pumpe. Pretpostavlja se da kampilobakter posjeduje barem osam različitih efluksnih pumpi, ali mehanizmi djelovanja većine za sada nisu poznati (Wieczorek i Osek 2013). Najvažnija je CmeABC efluksna pumpa koja je homologna efluksnim pumpama (eng.multi-drug efflux pump) skupine RND (eng. resistance

nodulation cell division) nađenim u drugih gram-negativnih bakterija (Corcoran i sur. 2005). CmeABC efluksna pumpa se sastoji od tri dijela: periplazmatskog fuzijskog proteina CmeA, unutrašnjeg membranskog transportera CmeB i vanjskog membranskog proteina CmeC. Ova tri proteina tvore membranski kanal kroz koji bakterija kampilobaktera izbacuje za nju toksične tvari (npr. antibiotike) (Lin i sur. 2002). Ekspresija gena CmeA, CmeB i CmeC, koji kodiraju sastavne proteine CmeABC efluksne pumpe, je modulirana CmeR proteinom koji vezujuć se za promotorsku regiju smanjuje transkripciju ovih gena i posljedično smanjuje aktivnost same pumpe. Gen koji kodira CmeR transkripcijski represor nalazi se uzlazno i neposredno uz domenu CmeABC (Lin i sur. 2005). Prisutnost antibiotika, kao što su npr. eritromicin, ciprofoksacin, tetraciklini i dr., nije poticaj za veću ekspresiju i aktivnost efluksne pumpe, već njenu aktivnost povećava prisutnost žučnih soli u probavnom traktu domaćina (Lin i Cagliero 2005). Žučne soli se vezuju na C-terminalni kraj CmeR proteina i time mijenjaju njegovu konfiguraciju što za posljedicu ima smanjenje afiniteta vezivanja na promotorsku regiju i povećanje ekspresije CmeABC operona (Lin i Cagliero 2005). Osim različitih vrsta antibiotika (npr. fluorokinolona, ciprofloksacina i dr.), ova efluksna pumpa ima sposobnost izbacivanja i deterdženata i boja iz stanice bakterije (Lin i sur. 2002; Lin i sur. 2003; Pumbwe i Piddock 2002).

U sinergiji s mutacijom u *gyrA* domeni, CmeABC efluksna pumpa pridonosi postojanju visoke neosjetljivosti na fluorokinolone (Luo i sur. 2003). Važnost CmeABC pumpe u neosjetljivosti na fluorokinolone je vidljiva kada se blokira njena aktivnost (Akiba i sur. 2006). Posljedično dolazi do značajnog porasta osjetljivosti bakterije na fluorokinolone. Također je zapaženo da, i u koliko postoji mutacija u *gyrA* domeni, se MIC (eng. minimal inhibitory concentracion, MIC) može sniziti na razine svojstvene osjetljivim sojevima (Luo i sur. 2003).

Sojevi *C. jejuni* posjeduju i CmeDEF efluksnu pumpu, također iz razreda RND efluksnih pumpi (Pumbwe i sur. 2005). Sastoji se od tri dijela, CmeD, CmeE te CmeF, koji predstavljaju vanjski membranski kanalikularni protein, periplazmatski fuzijski protein te unutrašnji membranski transporter. Rezultati istražianja *Akiba et al. 2006* su pokazali da CmeDEF efluksna pumpa ima utjecaj na antimikrobnu osjetljivost kampilobaktera, ali točan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjena zbog maskiranja njenje funkcije aktivnošću CmeABC efluksne pumpe. Isto istraživanje je

pokazalo da zajednička aktivnost CmeABC i CmeDEF efluksne pumpe ima esencijalnu ulogu u očuvanju vijabilnosti bakterijske jedinke (Akiba i sur. 2006).

2.4.2. Mehanizmi antimikrobne neosjetljivosti kampilobaktera na makrolide

Temeljni mehanizam djelovanja makrolida jest reverzibilno vezanje na P segment 50S podjedinice ribosoma, remećenje procesa translokacije te posljedično inhibicija sinteze proteina (Poehlsgaard i Douthwaite 2005). Blokirajući prolazak novosintetiziranog polipeptidnog lanca kroz tunel velike 50S podjedinice ribosoma (Nissen i sur. 2000) dovode do preranog odvajanja lanca od ribosoma (eng. drop-off) (Menninger i sur. 1982) i posljedično zaustavljanja elongacije (Tenson i sur. 2003).

Dva osnovna mehanizma antimikrobne neosjetljivosti na makrolide su modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika na bakterijskom ribosomu te aktivnost efluksnih pumpi (Allos i sur. 2014).

Visoka antimikrobna neosjetljivost sojeva *C. coli* i *C. jejuni* na makrolide se najviše povezuje s mutacijom u domeni V na 23S rRNA genu (pozicije 2074 ili 2075) (Jeon i sur. 2008). Mutacija u ovoj domeni dovodi do promjene konfiguracije ciljnog mjesta djelovanja makrolida i posljedično do nemogućnosti vezanja lijeka na ciljno mjesto djelovanja (Allos i sur. 2014). Najčešće se radi o tranzitornoj mutaciji A2075G (Niwa i sur. 2001; Vacher i sur. 2003). Rjeđe zastupljene tranzitorne mutacije nađene u sojeva *C. jejuni* i *C. coli* su A2074C, A2074G te A2075G, a povezuju se s visokom neosjetljivošću na makrolide (Wieczorek i Osek 2013). Sojevi kampilobaktera sadrže na kromosomu tri kopije 23S rRNA gena koje su u većine sojeva neosjetljivih na makrolide sve mutirane. Iako su za ispoljavanje neosjetljivosti dovoljne već dvije mutirane kopije (Gibrel i sur. 2005), povezanost između razine neosjetljivosti sojeva kampilobaktera na makrolide i broja mutiranih kopija 23S rRna gena nije zamjećena, kao ni povezanost između razine neosjetljivosti i položaja mutacije (Jensen i Aerestrup 2001; Payot i sur. 2004; Gibreel i sur. 2005). Frekvencija mutacije 23S rRNA je niska i iznosi ~10^{-10}/stanica/generaciji (Jan i sur. 2006; Lin i sur. 2007). Iz toga proizlazi da kampilobakteri sporo razvijaju neosjetljivost na makrolide u odnosu na kinolone.

Drugi važan mehanizam neosjetljivosti kampilobaktera na makrolide je aktivnost efluksnih pumpi. Efluksna pumpa CmeABC, osim što pridnosi razvoju neosjetljivosti na niz antibiotika, uključujući i kinolone, je najvažnija efluksna pumpa u razvoju neosjetljivosti i na makrolide (Lin i sur. 2002). Uloga CmeDEF efluksne

pumpe u antimikrobnoj neosjetljivosti na makrolide za sada nije u potpunosti razjašnjena. Rezultati istraživanju *Akiba et al. 2006* nisu pokazali značajniji utjecaj ove pumpe na antimikrobnu osjetljivost na eritromicin (Akiba i sur. 2006).

Kao mehanizam antimikrobne neosjetljivosti na makrolide se također spominje mutacija gena za L4 (mutacija G74D) i L22 (insercija na poziciji 86 ili 98) ribosomalne proteine (Allos i sur. 2014). Ovaj mehanizam u sinergiji s aktivnošću efluksnih pumpi pridonosi visokoj neosjetljivosti na makrolide. Dokazano je da odsustvo jednog od navedenih mehanizama zamjetno smanjuje neosjetljivost na makrolide (Cagliero i sur. 2006).

Sojevi kampilobaktera mogu biti visokoneosjetljivi (eng.HLR-High level resistant strains) i niskoneosjetljivi (eng.LRS-low resistant strains) na makrolide (Mamelli i sur. 2005). U visokoneosjetljivih sojeva MIC je iznad 128 mg/L te uvijek postoji mutacija u 23S rRNA genu. U niskoneosjetljivih sojeva MIC je u rasponu između 8 i 16 mg/L, a mutacija u 23S rRNA genu nije prisutna (Payot i sur. 2004).

3. HIPOTEZE

- antimikrobna neosjetljivost na makrolide i kinolone sojeva *C. jejuni* i *C. coli* je u porastu
- antimikrobna neosetljivost na kinolone sojeva *C. jejuni* i *C. coli* ovisi o sezoni razboljevanja
- antimikrobna neosjetljivost na kinolone sojeva *C. jejuni* i *C. coli* manja je u djece <18 godina nego u odraslih

4. CILJEVI RADA

4.1. Opći cilj:

- ispitati kretanje antimikrobne neosjetljivosti na kinolone i makrolide promatranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli*

4.2. Specifični ciljevi:

- usporediti kretanje antimikrobne neosjetljivosti na kinolone i makrolide među vrstama *C. jejuni* i *C. coli*
- analizirati kretanje antimikrobne neosjetljivosti na kinolone promatranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli* s obzirom na dob te na sezonu razboljevanja bolesnika s kampilobakteriozom

5. MATERIJALI I METODE

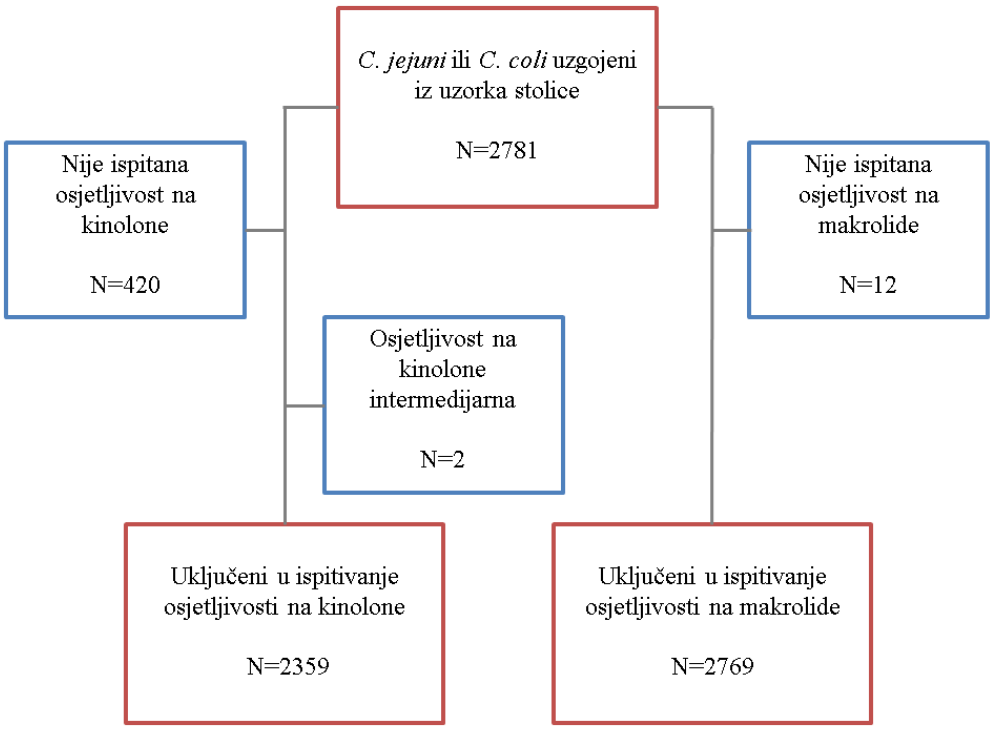
5.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključena 2781 osoba oba spola i svih dobnih skupina, liječena zbog kampilobakterioze u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju od 01. siječnja 1994. do 31. prosinca 2014. godine, kojoj je iz uzorka stolice uzgojena vrsta *C. jejuni* ili *C. coli* te je ispitana antimikrobna osjetljivost izoliranog soja.

Iz analize antimikrobne osjetljivosti promatranih sojeva na kinolone je isključeno 420 sojeva kojima osjetljivost na kinolone nije ispitana te dva soja u kojih je antimikrobna osjetljivost bila izražena kao intermedijarna.

Iz analize antimikrobne osjetljivosti promatranih sojeva na makrolide je isključeno 12 sojeva kojima osjetljivost na makrolide nije ispitana.

Stablo uključivanja ispitanika u analizu antimikrobne osjetljivosti na kinolone i makrolide je prikazano na Slici 1.



Slika 1. Stablo uključivanja ispitanika u analizu antimikrobne osjetljivosti na kinolone i makrolide

5.2. METODE

5.2.1. Prikupljanje podataka

Podaci su prikupljeni iz Odsjeka za medicinsku dokumentaciju te iz dokumentacije Zavoda za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

a.) Podaci prikupljeni iz Odsjeka za medicinsku dokumentaciju:

- Matični broj bolesnika
- Spol
- Dob u godinama
- Kalendarski mjesec prijema
- Godina prijema

b.) Podaci prikupljeni iz dokumentacije Zavoda za kliničku mikrobiologiju:

- Vrsta izoliranog kampilobaktera
- Antimikrobna osjetljivost na makrolide (eritromicin/azitromicin)
- Antimikrobna osjetljivost na kinolone (ciprofloksacin)

5.2.2. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza uzoraka stolica bolesnika je rađena u Zavodu za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Mirogojska 8, Zagreb. Obuhvatila je uzgoj i identifikaciju uzročnika te ispitivanje antimikrobne osjetljivosti. Za analizu su korištene standardne mikrobiološke metode.

Uzeti uzorci stolica su kultivirani na selektivnoj krutoj podlozi (Skirow podloga, modifikacija „Zagreb“). Navedena podloga se priprema u mikrobiološkom laboratoriju, a sastoji se od: suplementa za kampilobakter vlastite proizvodnje (cefobid 33 mg/l, rifogal 10 mg/l i amphotericin 2 mg/l), agara 12 g/l, Hirn-Herz buillona 37 g/l, i konjske, ovčje ili ljudske krvi 10 ml/l destilirane vode. Suplement i agar se steriliziraju u autoklavu na 121°C te im se nakon djelomičnog hlađenja dodaju bujon i

krv. Podloga se inokulira te se inkubira 48 h na 42°C u mikroaerofilnim uvjetima (Gmajnički B 1984; Vučković i Plečko 2013).

Za identifikaciju sojeva je korišteno: izgled kolonija (sitne, glatke, sjajne, konveksne kolonije koje izgledaju poput kapljica vode), mikroskopski preparat obojan po Ziehl-Neelsen-u (zavijeni bacili koji oblikom podsjećaju na galebova krila) te test hidrolize hipurata (pozitivan test označava *Campylobacter jejuni*, a negativan test označava *Campylobacter coli*) (Vučković i Plečko 2013) .

Antimikrobna osjetljivost je ispitivana na sljedeći način: bakterijska suspenzija, pripremljena razmućivanjem nekoliko kolonija kampilobaktera u 5 ml triptoznog bujona, je inokulirana sterilnim vatenim štapićem na površinu Mueller-Hinton Fastidius agara (Mueller-Hinton agar s dodatkom krvi). Unutar 15 minuta od inokulacije na površinu Mueller-Hinton agara aplicirani su diskovi antibiotika (eritromicin, azitromicin, nalidiksična kiselina, ciprofloksacin, tetraciklin). Nakon inkubacije (24 h, 42°C, mikroaerofilni uvjeti) oko antibiotskih diskova su očitane zone inhibicije bakterijskog rasta. S obzirom na veličinu zone inhibicije, osjetljivost na ispitivani antibiotik se izražava kao: osjetljiv, umjereno osjetljiv i neosjetljiv. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je rađeno prema engleskom laboratorijskom standardu do godine 2011. (eng. British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC; www.bsac.org.uk), a od godine 2011. je rađeno prema europskom laboratorijskom standardu (eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; www.eucast.org).

5.2.3. Statistička analiza

U statističkoj analizi korištene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Kategoričke varijable su prikazane kao apsolutne vrijednosti broja te kao postotak. Razlike između kategoričkih varijabli su analizirane χ^2-testom i Fisherovim-egzaktnim testom. Za razinu statističke značajnosti uzeta je p vrijednost <0,05. U statističkoj analizi je korišten statistički softver IBM SPSS Statistics v. 20.

6. REZULTATI

6.1. Demografska i epidemiološka obilježja

U razdoblju od 1994.-2014. u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ je hospitaliziran 2781 bolesnik s dijagnozom kampilobakterioze; analiza antimikrobne osjetljivosti na kinolone je rađena na 2359 bolesnika, a analiza osjetljivosti na makrolide na njih 2769.

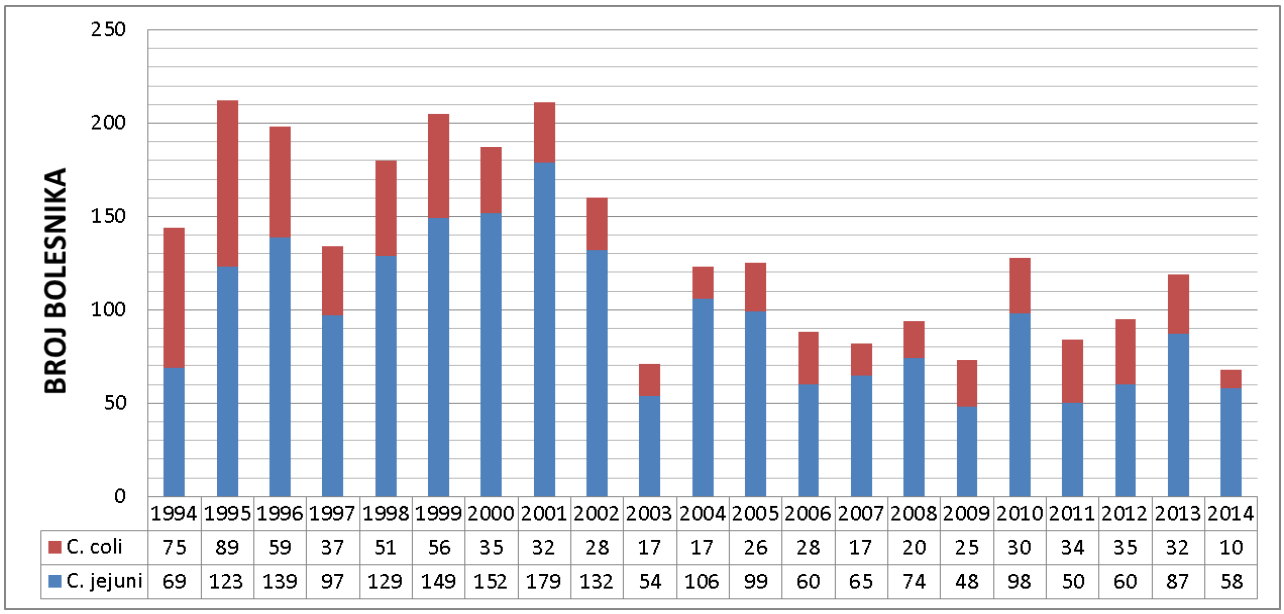
U promatranoj populaciji *C. jejuni* je uzgojen u 2028/2781; 72,9% bolesnika, dok je *C. coli* uzgojen u njih 753/2781; 27,1%.

Udio bolesti uzrokovanih vrstom *C. jejuni* značajno je rastao u promatranom razdoblju ($p<0,001$; χ^2-test), a kretao se u rasponu od 47,9% godine 1994. do 84,8% godine 2001. (Slika 2)

Najveći broj bolesnika s kampilobakteriozom pripadao je dobnoj skupini od 0.-2. godine života (811/2781; 29,2%). Slijedi ih skupina bolesnika ≥60 godina života (494/2781; 17,8%) (Slika 3). Omjer bolesti uzrokovanih sojevima *C. jejuni* i *C. coli* se nije značajno mijenjao promatrano po dobnim skupinama ($p=0,490$; $\chi^2=5,43$; d.f.=6). Najviši omjer *C. jejuni/C. coli* je zabilježen u dobnoj skupini od 3.-5. godine života (*C. jejuni* 78,17% vs. *C. coli* 21,83%), a najniži u dobnoj skupini od 18.-29. godine života (*C. jejuni* 70,05% vs. *C. coli* 29,95%).

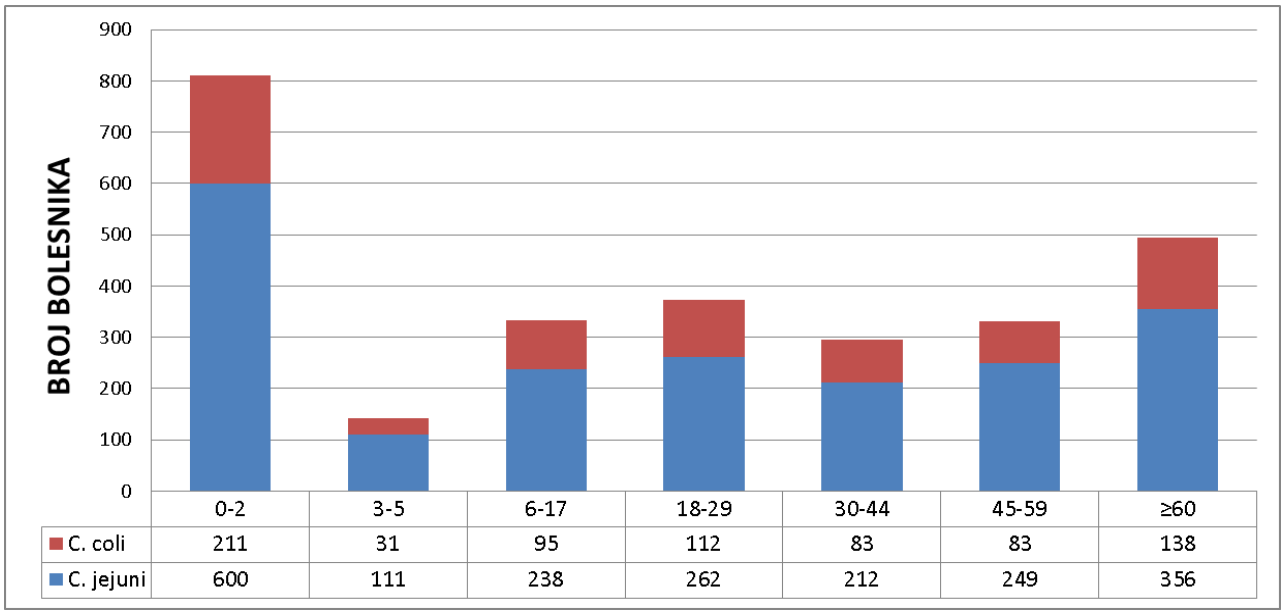
U promatranoj populaciji, muškaraca je bilo 1600/2781; 57,5%, dok je žena bilo 1181/2781; 42,5%.

Sezonska raspodjela hospitalizacija promatranih bolesnika s kampilobakteriozom je prikazana na Slici 4. Najveći broj hospitalizacija je zabilježen u mjesecu lipnju (379/2781; 13,6%), dok je najmanje hospitalizacija bilo u veljači (102/2781; 3,7%). Omjer bolesti uzrokovanih vrstama *C. jejuni* i *C. coli* se nije značajno mijenjao promatrano po kalendarskom mjesecu razboljevanja ($p=0,426$; χ^2-test).



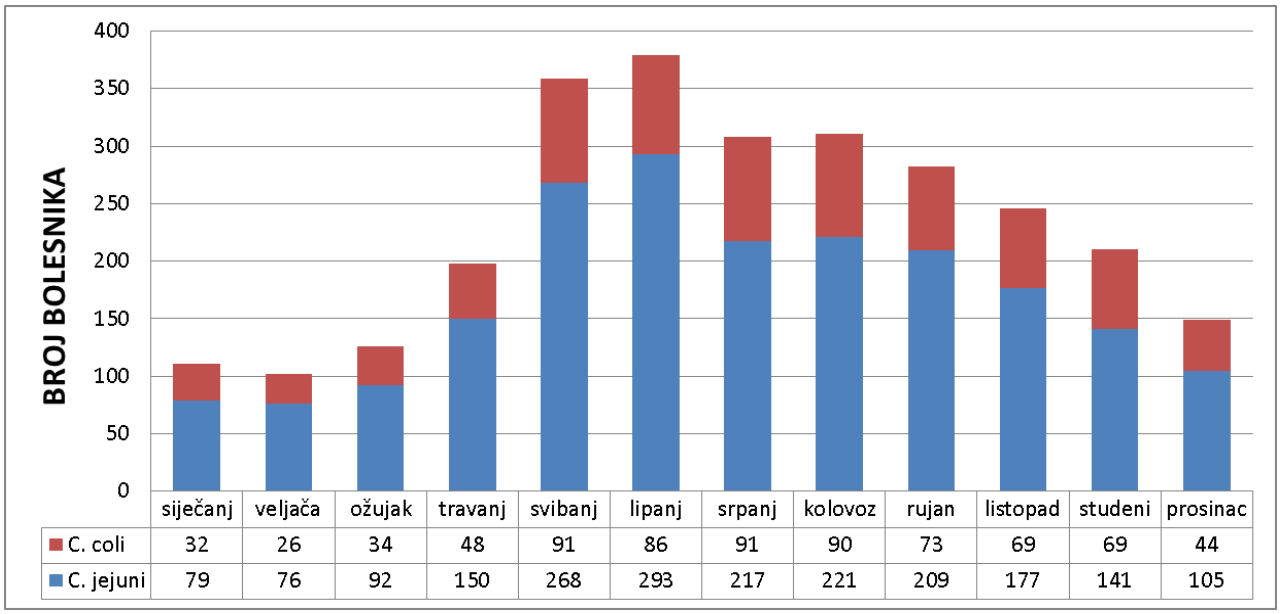
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
C. coli	75	89	59	37	51	56	35	32	28	17	17	26	28	17	20	25	30	34	35	32	10
C. jejuni	69	123	139	97	129	149	152	179	132	54	106	99	60	65	74	48	98	50	60	87	58

Slika 2. Raspodjela bolesnika s kampilobakteriozom po godinama i prema vrsti uzgojenog kampilobaktera, hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014.



	0-2	3-5	6-17	18-29	30-44	45-59	≥60
C. coli	211	31	95	112	83	83	138
C. jejuni	600	111	238	262	212	249	356

Slika 3. Broj bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014. prema dobnim skupinama i prema vrsti uzgojenog kampilobaktera



	siječanj	veljača	ožujak	travanj	svibanj	lipanj	srpanj	kolovoz	rujan	listopad	studeni	prosinac
C. coli	32	26	34	48	91	86	91	90	73	69	69	44
C. jejuni	79	76	92	150	268	293	217	221	209	177	141	105

Slika 4. Broj bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014. prema kalendarskom mjesecu razboljevanja i prema vrsti uzgojenog kampilobaktera.

6.2. Kretanje antimikrobne osjetljivosti izoliranih sojeva kampilobaktera na kinolone

Od ukupno 2359 osoba kod kojih je ispitana antimikrobna osjetljivost izoliranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na kinolone, osjetljivih sojeva je bilo 1908 (80,9%), a neosjetljivih je bilo 451 (19,1%).

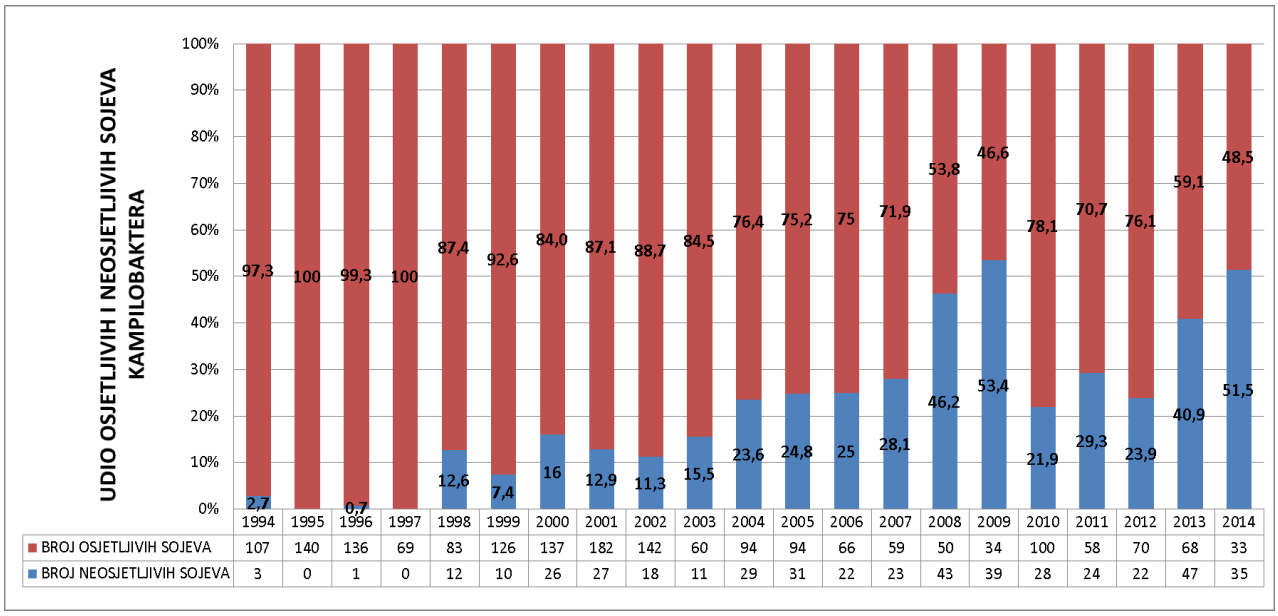
Neosjetljivost na kinolone promatranih sojeva *C. jejuni* je utvrđena u 345 (19,99%) izolata, dok je u sojeva *C. coli* utvrđena u 106 (16,75%) izolata. Razlika u neosjetljivosti na kinolone između sojeva *C. jejuni* i *C. coli* se nije pokazala statistički značajnom ($p=0,076$; χ^2-test).

U promatranom razdoblju utvrđen je značajan porast antimikrobne neosjetljivosti promatranih sojeva kampilobaktera na kinolone ($p<0,001$, $\chi^2=325,34$; d.f.=20). U promatranom razdoblju neosjetljivost na kinolone kretala se u rasponu od 0% godine 1995. i 1997. do 53,4% godine 2009. (Slika 5)

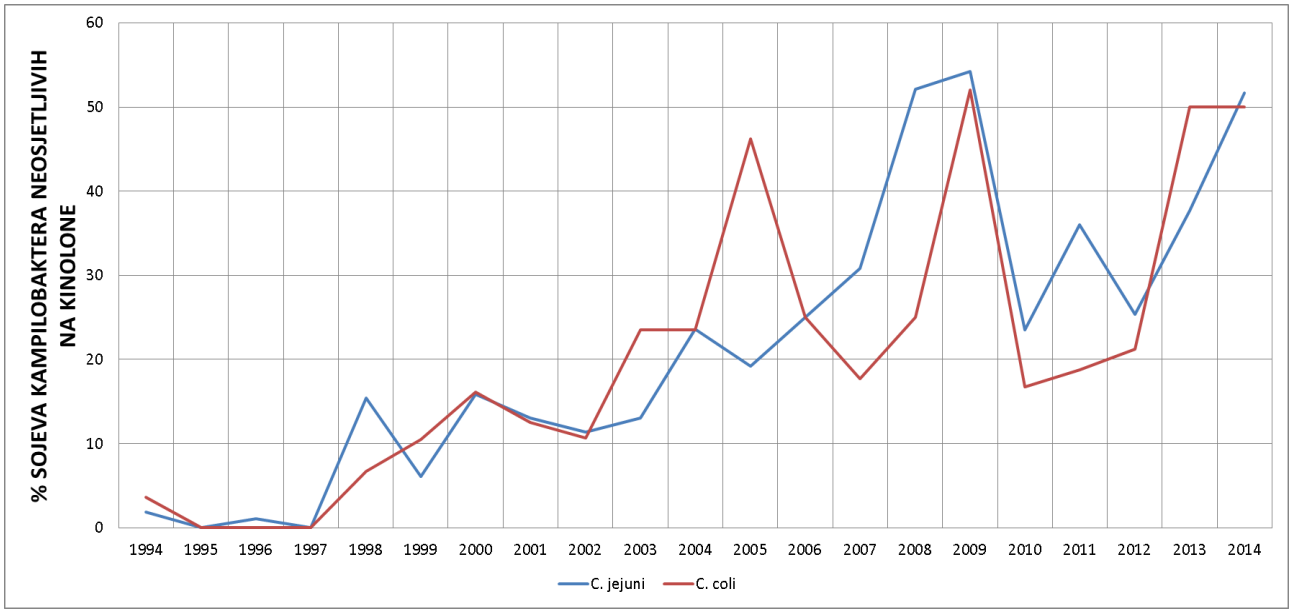
U promatranom razdoblju utvrđen je značajan porast antimikrobne neosjetljivosti na kinolone promatranih sojeva *C. jejuni* ($p<0,001$; χ^2-test). U promatranom razdoblju neosjetljivost na kinolone se u sojeva *C. jejuni* kretala u rasponu od 0% godine 1995. i 1997. do 54,2% godine 2009. (Slika 6)

U promatranom razdoblju utvrđen je značajan porast antimikrobne neosjetljivosti na kinolone promatranih sojeva *C. coli* ($p<0,001$; χ^2-test). U promatranom razdoblju neosjetljivost na kinolone u sojeva *C. coli* kretala se u rasponu od 0% godine 1995., 1996. i 1997. do 52% godine 2009. (Slika 6)

Razlika u kretanju neosjetljivosti na kinolone između promatranih vrsta *C. jejuni* i *C. coli* se nije pokazala statistički značajnom ($p=0,458$; d.f=20).



Slika 5. Kretanje udjela osjetljivih i neosjetljivih sojeva kampilobaktera na kinolone u bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014.

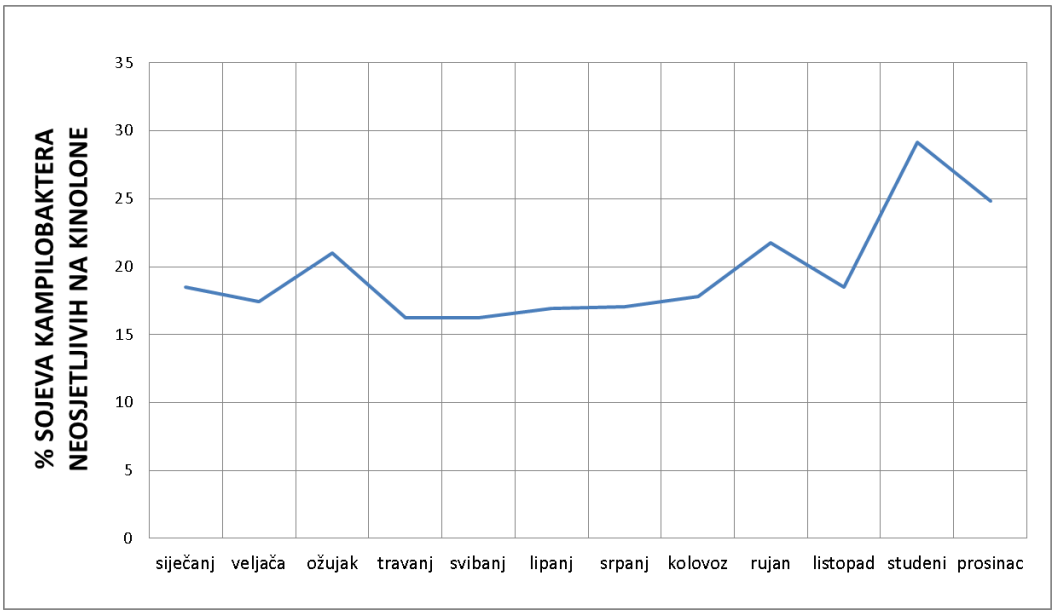


Slika 6. Kretanje udjela sojeva *C. jejuni* i *C. coli* neosjetljivih na kinolone u bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014.

Promatrano po kalendarskom mjesecu hospitalizacije najviša ukupna neosjetljivost sojeva kampilobaktera na kinolone je utvrđena u mjesecu studenom (29,1%), dok je najniža bila u mjesecima travnju i svibnju (16,3% u oba mjeseca). Značajno najviša neosjetljivost na kinolone je utvrđena u razdoblju od studenog do siječnja u odnosu na ostale mjesece u godini (p=0,001; χ^2=11,71; d.f.=1). (Slika 7)

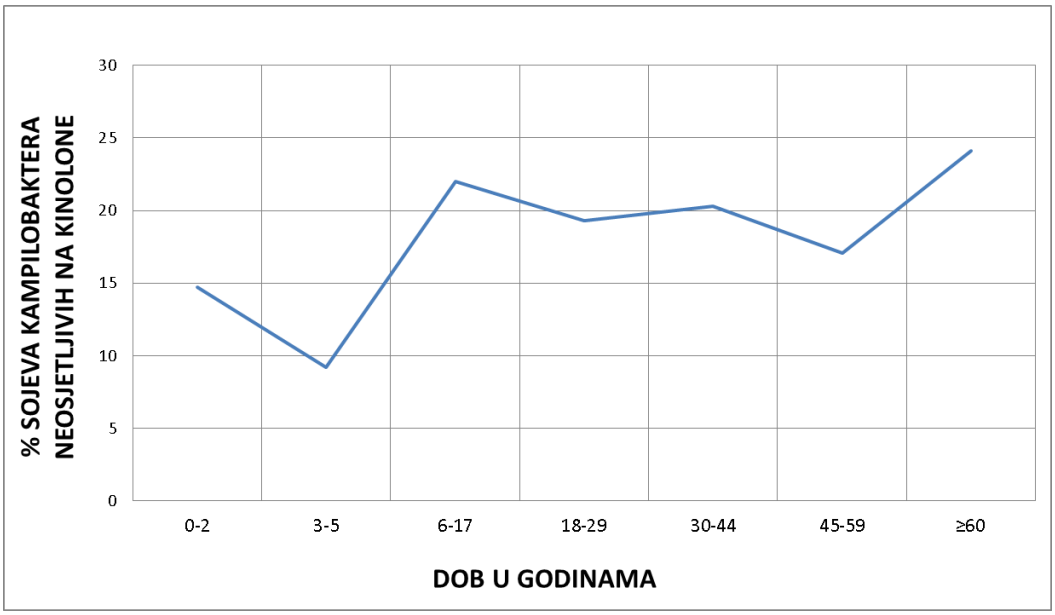
Najveći udio neosjetljivih sojeva *C. jejuni* je zabilježen u studenom (34,2%), dok je najniži bio u srpnju (14,4%). Značajno najviši udio neosjetljivih sojeva *C. jejuni* je zabilježen u razdoblju od studenog do ožujka u odnosu na ostale mjesece u godini (p<0,0001; χ^2=17,765; d.f.=1).

Najveći udio neosjetljivih sojeva *C. coli* je zabilježen u rujnu (25%), dok je najniži bio u veljači (0%). Značajno najviši udio neosjetljivih sojeva *C. coli* je zabilježen u razdoblju od srpnja do rujna, u odnosu na ostatak godine (p<0,0001; χ^2=11,484; d.f.=1).



Slika 7. Kretanje udjela sojeva kampilobaktera neosjetljivih na kinolone u bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014., prema kalendarskom mjesecu hospitalizacije.

Promatrano po dobnim skupinama, najviša neosjetljivost kampilobaktera na kinolone je zapažena u dobnoj skupini ≥60 godine života (24,1%), dok je najniža neosjetljivost zapažena u dobnoj skupini od 3-5 godina života (9,2%). (Slika 8) U djece <18 godina je neosjetljivost sojeva kampilobaktera bila statistički značajno niža nego u odraslih ($p<0,016$; $\chi^2=5,762$; d.f.=1).



Slika 8. Kretanje udjela sojeva kampilobaktera neosjetljivih na kinolone u bolesnika s kampilobakteriozom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju 1994.-2014. prema dobnim skupinama.

6.3. Kretanje antimikrobne osjetljivosti izoliranih sojeva kampilobaktera na makrolide

Od 2769 ispitanih sojeva kampilobaktera, neosjetljivost na makrolide je nađena u njih 6; 0,2% (po jedan izolat godine 1994., 1997. i 2013. te tri izolata godine 2010.). Od navedenih 6 izolata neosjetljivih na makrolide, 5 ih je pripadalo vrsti *C. coli*. Zbog vrlo malog broja sojeva neosjetljivih na makrolide, daljnje statističke analize neosjetljivosti na makrolide nisu rađene.

7. RASPRAVA

Antimikrobna neosjetljivost kampilobaktera na kinolone u hospitaliziranih bolesnika s kampilobakteriozom značajno je porasla u razdoblju 1994.-2014. s 2,7% na 51,5%, čime je potvrđena prva hipoteza ovog istraživanja. Rezultati istraživanja pokazuju i podjednak porast neosjetljivosti na kinolone promatranih vrsta *C. jejuni* i *C. coli* u promatranom vremenu, što je rezultat koji se nalazi i u istraživanju rađenom u Bosni i Hercegovini (Uzunović-Kamberović i sur. 2009). Trend rasta neosjetljivosti na kinolone bilježi se u mnogim zemljama svijeta što se prvenstveno pripisuje širokoj primjeni antibiotika u poljoprivredi (EFSA/ECDC 2011.-2016.; CDC 2014). Prema zbirnim podacima iz europskih zemalja, neosjetljivost sojeva *C. jejuni* na ciprofloksacin je na području Europe porasla u razdoblju 2009.-2014 s 53,3% na 60,2%. Neosjetljivost sojeva *C. coli* na ciprofloksacin je u istom razdoblju porasla s 59,7% na 68,9% (EFSA/ECDC 2011.-2016.). Visoka neosjetljivost na kinolone humanih izolata sojeva kampilobaktera je zabilježena godine 2014. u Španjolskoj i Litvi gdje je prelazila 85% te u Portugalu gdje je prelazila 95% (EFSA/ECDC 2016). Trend rasta neosjetljivosti je zabilježen i u drugim zemljama svijeta. Tako je u Pensilvaniji, u razdoblju 1996.-2001., neosjetljivost porasla s 8% na 40% (Nachamkin i sur. 2002), dok je u istraživanju rađenom u Peruu (Lima), porast neosjetljivosti u razdoblju 2001.-2010. bio značajan, s 42,1% na 91,1% (Pollett i sur. 2012). Značajan porast neosjetljivosti na kinolone u razdoblju 1995.-2000. s 12,9% na 48,2% je zabilježen i u istraživanju rađenom na dječjoj populaciji u Egiptu. U istom istraživanju utvrđen je značajan porast neosjetljivosti zasebno i za vrstu *C. jejuni* i za *C. coli* (Putnam i sur. 2003). Porast neosjetljivosti na kinolone sojeva *C. jejuni* je bio značajan i u Kini u razdoblju 1994.-2010. (Zhou i sur. 2016). Niska antimikrobna neosjetljivost na ciprofloksacin humanih izolata sojeva kampilobaktera zbilježena je u Australiji te na Novom Zelandu. U Australiji je neosjetljivost godine 2001. i 2002. iznosila svega 2%, dok se na Novom Zelandu značajno smanjila u razdoblju 2000.-2010. Ovako niska neosjetljivost na kinolone pripisuje se strogo ograničenoj primjeni kinolona u uzgoju životinja za mesnu industriju (Unicomb i sur. 2006; Harrington i sur. 2014).

Poznata je činjenica da je upotreba antibiotika, posebice kinolona, povećana tijekom hladnijih mjeseci u godini (Sun i sur. 2012; Suda i sur. 2014; Exasol 2015). Veća primjena kinolona u zimskim mjesecima se povezuje s većom incidencijom respiratornih infekcija u tom dijelu godine (Goossens i sur. 2005; Polgreen i sur.

2011). U dva istraživanja provedena u Nizozemskoj godine 1999. i 2007. je zapažena veća neosjetljivost humanih izolata sojeva kampilobaktera na fluorokinolone u zimskim mjesecima u odnosu na ljetne (Talsma i sur. 1999; Ven Hees i sur. 2007), što je rezultat sličan onom dobivenom u našem istraživanju. Suprotno tome, u istraživanju rađenom u Ujedinjenom Kraljevstvu, nisu uočene značajne sezonske promjene antimikrobne neosjetljivosti humanih izolata sojeva kampilobaktera na kinolone (Gaunt i Piddock 1996). Značajna povezanost između učestalosti propisivanja kinolona i sezonskih varijacija u antimikrobnoj osjetljivosti na iste je uočena kod vrsta *E. coli* i meticilin-rezistentnog *S. aureus* (MRSA), ali se ne može sa sigurnošću reći radi li se o uzročno-posljedičnoj povezanosti zbog mogućeg utjecaja drugih čimbenika na osjetljivosti (Sun i sur. 2012). Sezonske varijacije neosjetljivosti na β-laktamske antibiotike primjećene su i kod vrste *S. pneumoniae* (Baquero i sur. 1999).

Ovim istraživanjem je potvrđena hipoteza prema kojoj je neosjetljivost na kinolone niža u sojeva kampilobaktera izoliranih u djece nego u odraslih. Budući da se upotreba kinolona ne preporuča u djece mlađe od 18 godina, ne začuđuje rezultat da je neosjetljivost najniža u sojeva kampilobaktera izoliranih u djece dobi od 0-2 godine (14,7%) te od 3-5 godina (9,2%) kao niti rezultat da je neosjetljivost sojeva kampilobaktera značajno veća u odraslih u odnosu na djecu mlađu od 18 godina. Iako su mnoga do sada provedena istraživanja potvrdila nepovoljan utjecaj primjene kinolona u uzgoju životinja na razvoj neosjetljivosti na kinolone (Endtz i sur. 1991; Engberg i sur. 2001), razlika u neosjetljivosti humanih izolata sojeva kampilobaktera na kinolone među dobnim skupinama ukazuje na značajnost primjene kinolona i u humanoj medicini na razvoj promatrane antimikrobne neosjetljivosti (Goossens i sur. 2005). U istraživanju provedenom u Bosni i Hercegovini je također zabilježena značajno niža neosjetljivost na kinolone humanih izolata sojeva kampilobaktera u dobnoj skupini od 0.-6. godine života u odnosu na odraslu dob (Uzunović-Kamberović i sur. 2009). Neosjetljivost po dobnim skupinama je promatrana i u istraživanju provedenom u Nizozemskoj u kojem je antimikrobna neosjetljivost na kinolone humanih izolata sojeva kampilobaktera bila najviša u dobnoj skupini od 45-59 godina (Van Hees i sur. 2007), što se ne poklapa s rezultatim našeg istraživanja. Razlike u osjetljivosti na različite antibiotike između dobnih skupina su zapažene i kod drugih vrsta bakterija (Diekema i sur. 2002; Jones i sur. 2003; Hasan i sur. 2008; Moyo i sur. 2011). Zanimljiv je rezultat istraživanja provedenog u Tanzaniji prema kojem kod djece s proljevom mlađe od 5 godina niti jedan bakterijski izolat nije bio neosjetljiv na

ciprofloksacin (Moyo i sur. 2011). Manja antimikrobna neosjetljivost na fluorokinolone kod djece mlađe od 5 godina u odnosu na odrasle je zapažena i kod vrste *S. pneumoniae* (Jones i sur. 2003). Značajno manja neosjetljivost na fluorokinolone kod djece mlađe od 15 godina je zapažena i kod vrsta *S. typhi* i *S. parathypi* (Hasan i sur. 2008). Općenito, pozitivna povezanost primjene antibiotika u humanoj medicini i razvoja neosjetljivosti je dobro podkrijepljena (Goossens i sur. 2005), no zanimljivo je da rezultati našeg istraživanja i istraživanja bosanskohercegovačkih autora (Uzunović-Kamberović i sur. 2009) takav odnos potvrđuju i kod kampilobaktera, koji se većinom prenose zoonotski.

Ovim istraživanjem nije potvrđena hipoteza o porastu antimikrobne neosjetljivosti humanih izolata sojeva kampilobaktera na makrolide u promatranoj populaciji. Neosjetljivost se pokazala vrlo niskom, s uzgojenih svega 6 neosjetljivih sojeva (0,2%) u vremenskom razdoblju 1994.-2014., čime se neosjetljivost na makrolide naših promatranih sojeva kampilobaktera svrstava među najniže u Europi (EFSA/ECDC 2011-2016). U našem istraživanju većina sojeva neosjetljivih na makrolide je bila vrste *C. coli* (5/6), što bi moglo ići u prilog dosadašnjim saznanjima o većoj antimikrobnoj neosjetjivosti sojeva *C. coli* na makrolide u odnosu na neosjetljivost sojeva *C. jejuni* (Schönberg-Norio i sur. 2006; Lehtopolku i sur. 2010, EFSA/ECDC 2011-2016), no kako se radi o malom broju na makrolide neosjetljivih izolata, u našem istraživanju ne možemo govoriti o statističkoj značajnosti razlika među promatranim vrstama kampilobaktera. Prema zbirnim podacima iz europskih zemalja, antimikrobna neosjetljivost sojeva *C. jejuni* na području Europe je zadnjih godina niska te se nije značajnije mijenjala (2009: 1,6%, 2014: 1,5%) (EFSA/ECDC 2011-2016). Izrazitiji porast je zapažen na Malti gdje je neosjetljivost humanih izolata sojeva *C. jejuni* u razdoblju 2009.-2014. porasla s 0% na 27,5% (EFSA/ECDC 2011-2016). U istom je razdoblju neosjetljivost na makrolide humanih izolata sojeva *C. coli* u europskim zemaljama porasla sa 8,5 % na 14,6% (EFSA/ECDC 2011-2016). Visoka neosjetljivost humanih izolata sojeva *C. coli* je zabilježena godine 2014. u Portugalu (57,6%) i Španjolskoj (44,8%) (EFSA/ECDC 2016). Neosjetljivost na makrolide humanih izolata sojeva kampilobaktera je niska i u skandinavskim zemljama (Schönberg-Norio i sur. 2006; Skjøt-Rasmussen i sur. 2009; EFSA/ECDC 2015-2016). U Norveškoj je godine 2014. iznosila 3.4%, dok je u Danskoj u razdoblju 1997.-2007. bila ispod 10% (Skjøt-Rasmussen i sur. 2009; EFSA/ECDC 2016). U istraživanju koje je obuhvatilo razdoblje 1994.-2010. rađenom u Kini, humanih izolata sojeva *C. jejuni*

neosjetljivih na makrolide je bilo svega 4,4%. Neosjetljivost na makrolide (eritromicin) humanih izolata *C. jejuni* u SAD-u je posljednjih godina također stabilno niska (2004: 0,9%, 2014: 2,2%), dok je neosjetljivost sojeva *C. coli* u razdoblju 2004.-2014. porasla s 3,8% na 17,6% (CDC 2015). Značajan porast antimikrobne neosjetljivosti na makrolide (eritromicin) humanih izolata sojeva *C. jejuni* je zabilježen u Peru-u u razdoblju 2001.-2010., kada je neosjetljivost porasla s 2,2% na 14,9% (Pollett i sur. 2012). Niska neosjetljivost na makrolide humanih izolata sojeva kampilobaktera je zabilježena i u Bangladešu, gdje je godine 2009. iznosila 3% (Ahmed i sur. 2011). Razlike u neosjetljivosti među zamljama svijeta vjerojatno su značajnije uvjetovane primjenom makrolida u veterinarskoj, nego u humanoj medicini (Engberg i sur. 2001). Prema podacima za 2010. godinu, u uzgoju životinja za mesnu industriju u svijetu je potrošeno oko 63200 tona antibiotika, što je količina koja premašuje potrošnju u humanoj medicini (Van Boeckel i sur. 2015). U uzgoju životinja koristi se 27 vrsta antibiotika, od čega se njih 18 koristi i u humanoj medicini (Pagel i Gautier 2012), dok se najviše financijskih sredstava izdvaja za makrolide, penicilinske antibiotike te tetracikline (WHO 2011). S obzirom na činjenicu da se neosjetljivost bakterija na makrolide razvija sporo (Yan i sur. 2006), uz činjenicu da su *C. jejuni* i *C. coli* u velikoj većini slučajeva crijevni intraluminalni patogeni i da kliconoštvo i u simptomatski liječenih osoba traje relativno kratko (2-3 tjedna), za pretpostaviti je da je uloga primjene makrolida u humanoj medicini u razvoju neosjetljivosti spomenutih bakterija mala. U prilog tome govori i podatak da iako Hrvatska spada u zemlje s visokom potrošnjom makrolida po glavi stanovnika, kao i Španjolska i Portugal (Gelbrand i sur. 2015), prema rezultatima naše studije neosjetljivost humanih izolata sojeva kampilobaktera na makrolide je u Hrvatskoj znatno niža nego u navedene dvije zemlje, koje izvještavaju o neosjetljivosti humanih izolata sojeva *C. coli* od 44,8 te 57,6% (EFSA/ECDC 2016), a također je niža od neosjetljivosti utvrđene u Norveškoj (EFSA/ECDC 2016), koja spada među zemlje s niskom potrošnjom makrolida po glavi stanovnika (Gelbrand i sur. 2015). Nadalje, prema rezultatima prijašnjeg istraživanja hrvatskih autora, hospitalno liječeni bolesnici s kampilobakteriozom u visokom postotku dobivaju empirijski adekvatan antimikrobni lijek; njih čak 1284/1632 (78.8%) (Balen Topić i sur. 2007), čime bi se mogao očekivati nepovoljan učinak na razvoj neosjetljivosti. Zanimljiv je podatak da iako se kao lijek izbora u liječenju bolesnika s kampilobakteriozom u literaturi preporuča eritromicin (Allos i sur. 2014), u navedenoj populaciji hrvatskih bolesnika je najčešće

primjenjivani antibiotik, kojim je liječeno 596/1284 (46,4%) bolesnika, bio azitromicin. Imajući u vidu uvriježenu praksu primjene jednokratne doze azitromicina u liječenju bolesnika s kampilobakteriozom u Hrvatskoj, koja se u istraživanju hrvatskih autora pokazala učinkovitom kako u liječenju tako i u skraćivanju kliconoštva (Vukelić i sur. 2010), za pretpostaviti je da se na taj način, vrlo kratkom primjenom lijeka, smanjuje mogućnost razvoja neosjetljivosti na makrolide u humanih izolata *C. jejuni* i *C. coli*. Nije jasno u kojoj mjeri je vrlo niska antimikrobna neosjetljivost humanih izolata sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na makrolide, utvrđena u našoj studiji, odraz niske potrošnje makrolida u uzgoju životinja u Hrvatskoj, jer o tome nemamo dostupnih podataka.

8. ZAKLJUČAK

- Rezultati ovog istraživanja su potvrdili hipotezu o porastu antimikrobne neosjetljivosti promatranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na kinolone u promatranom razdoblju što se pokazalo statistički značajnim, dok hipoteza o porastu antimikrobne neosjetljivosti na makrolide nije potvrđena.
- Potvrđena je hipoteza o sezonskim promjenama neosjetljivosti na kinolone promatranih sojeva kampilobaktera pri čemu je neosjetljivost bila statistički značajno veća u razdoblju od studenog do siječnja u odnosu na ostatak godine.
- Potvrđena je hipoteza prema kojoj je antimikrobna neosjetljivost na kinolone promatranih sojeva kampilobaktera značajno niža u djece <18 godina u odnosu na odrasle.

9. LITERATURA

1. Ahmed D, Hoque A, Elahi MSB, Endtz HP, Hossain MA. Bacterial aetiology of diarrhoeal diseases and antimicrobial resistance in Dhaka, Bangladesh, 2005–2008. Epidemiology and infection **2012**; 140(09): 1678-1684.
2. Akiba M, Lin J, Barton YW, Zhang Q. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2006**; 57: 52–60.
3. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clinical Infectious Diseases **2001**; 32: 1201–6.
4. Allos BM, Iovine NM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and Related Species. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (Ur.). Principles and Practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsavier Saunders. **2014**.
5. Avrain L, Vernozy-Rozand C, Kempf I. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. Journal of Applied Microbiology **2004**; 97(1): 134–140.
6. Balen Topić M. Epidemiološke i kliničke osobitosti kampilobakterioza u hospitaliziranih bolesnika: (magistarski rad). Medicinski fakultet Svučilišta u Zagrebu, **2007**.
7. Balen Topić M, Beus A, Desnica B, Vicković N, Šimić V, Šimić D. Epidemiološke karakteristike kampilobakterioze u hospitaliziranih bolesnika. Infektološki glasnik **2007**; 27(1): 15–22.
8. Balen Topić M, Beus A, Desnica B, Vicković N, Šimić V, Šimić D. Kliničke osobitosti kampilobakterioza u hospitaliziranih bolesnika. Infektološki Glasnik **2007**; 27(2): 71-9.
9. Baquero F, García-Rodríguez JA, de Lomas JG, Aguilar L, Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance of 1,113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996–1997) multicenter surveillance study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **1999**; 43(2): 357-359.
10. Cagliero C, Mouline C, Cloeckaert A, Payot S. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2006**; 50(11): 3893–3896.

11. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report 2013. **2015**.
12. Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, ... & Lathrop S. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US sites, 2006-2013. Morbidity and Mortality Weekly Report **2014**; 63(15): 328-332.
13. Corcoran D, Quinn T, Cotter L et al. Relative contribution of target gene mutation and efflux to varying quinolone resistance in Irish *Campylobacter* isolates. FEMS Microbiology Letters **2005**; 253: 39–46.
14. EFSA. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. The EFSA Journal **2009**; 7(1): 1372.
15. EFSA/ECDC.The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal **2011**; 9(7): 2154.
16. EFSA/ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. EFSA Journal **2012**;10(3): 2598.
17. EFSA/ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance inzoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA Journal **2013**; 11(5): 3196.
18. EFSA/ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. EFSA Journal **2014**;12(3): 3590.
19. EFSA/ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal **2015**;13(2): 4036.
20. EFSA/ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal **2016**; 14(2): 4380.
21. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **1991**; 27(2): 199-208.

22. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Emerging Infectious Diseases **2001**; 7(1): 24–34.
23. Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, ... & Dodson RJ. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter species*. PLoS Biol **2005**; 3(1).
24. Gaunt PN, Piddock LJ. Ciprofloxacin resistant *Campylobacter spp.* in humans: an epidemiological and laboratory study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **1996**; 37(4): 747-757.
25. Gelbrand H, Miller-Petrie M, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, ... & Ndegwa L. The State of the World's Antibiotics 2015. Wound Healing Southern Africa **2015**; 8(2), 30-34.
26. Gibreel A, Kos VN, Keelan M et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. Antimicrobial Agents Chemotherapy **2005**; 49: 2753–9.
27. Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2006**; 58: 243–255.
28. Gmajnički B. Nova selektivna podloga za izolaciju *Campylobacter coli/jejuni*. Preventiva Zagrebiensis. Dani Zavoda, Zagreb, listopad **1984**; 231-238.
29. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. The Lancet **2005**; 365(9459): 579-587.
30. Harrington MG, Lopes RM, Hughes KA, Weaver JE, Parslow G, Roos RF, Brooks HJ. Antibiotic resistance in thermotolerant *Campylobacter* isolated in 2000/01 and 2010 from patients with diarrhoea in Dunedin, New Zealand. New Zealand Journal of Medical Laboratory Science **2014**; 68(1): 15-18.
31. Hart WS, Heuzenroeder MW, Barton MD. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. Journal of Veterinary Medicine B **2004**; 51(5): 216–221.
32. Hasan R, Zafar A, Abbas Z, Mahraj V, Malik F, Zaidi A. Antibiotic resistance among *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan (2001-2006). The Journal of Infection in Developing Countries **2008**; 2(04): 289-294.

33. Hauri AM, Just M, McFarland S, Schweigmann A, Schlez K, Krahn J. Campylobacteriosis outbreaks in the state of Hesse, Germany, 2005–2011: raw milk yet again. Deutsche medizinische Wochenschrift **2013**; 138: 357–361.
34. Hiasa H, Shea ME. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. Journal of Biological Chemistry **2000**; 275: 34780-6.
35. Horvatek D, Prukner-Radovčić E. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* strains isolated from poultry. In XIIIth European Poultry Conference **2010**.
36. Huang DB, Musher D, Musher BL. Contagious acute gastrointestinal infections. The New England Journal of Medicine **2005**; vol. 352, no. 12, pp. 1267–1268.
37. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clinical Infectious Diseases **2005**; 41(2), S120-S126.
38. Jensen LB, Aarestrup FM. Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. Antimicrobial Agents Chemotherapy **2001**; 45: 371–2.
39. Jeon B, Muraoka W, Sahin O, Zhang Q. Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2008**; 52 (8): 2699–2708.
40. Jones RN, Biedenbach DJ, Beach ML. Influence of patient age on the susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolates in North America (2000-2001): report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagnostic microbiology and infectious disease **2003**; 46(1): 77-80.
41. Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, Hakkinen M, Kuusi M, Reiersen J, Hansson I, Olsson Engvall E, Lofdahl M, Wagenaar JA, Van Pelt W, Hofshagen M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. Preventive Veterinary Medicine **2010**; 93: 33–41.
42. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. Clinical Microbioliology Reviews **2015**; 28(3): 687-720.
43. Kalenić S. Vibrio. Kampilobakter. Helikobakter. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E i sur. (Ur.) Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb: Merkur A.B.D. **2005**.
44. Lastovica AJ, On SLW, Zhang L. The family *Campylobacteraceae*. U: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (Ur.) The Prokaryotes. USA: Springer **2014**.

45. Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant Campylobacter jejuni and C. coli strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy **2010;** 54(3), 1232-1236.
46. Lin J, Cagliero C, Guo B et al. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology **2005**; 187: 7417–24.
47. Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents Chemotherapy **2002**; 46: 2124–31.
48. Lin J, Sahin O, Michel LO et al. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity **2003**; 71: 4250–9.
49. Lin J, Akiba M, Sahin O et al. CmeR functions as a transcriptional pressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents Chemotherapy **2005**; 49: 1067–75.
50. Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang YJ, Zhang Q. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycinresistant *Campylobacter* isolates in chickens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2007**; 51(5): 1678–1686.
51. 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.
52. Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang Q. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with gyrA mutations and the function of the CmeABC efflux pump. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2003**; 47(1): 390–394.
53. Mamelli L, Prouzet-Mauléon V, Pagès JM, Mégraud F, Bolla JM. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2005**; 56: 491–497.
54. McCrackin MA, Helke KL, Galloway AM, Poole AZ, Salgado AD, Marriott BP. Effect of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne campylobacteriosis in humans: A systematic literature review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **2015**.

55. Menninger JR, Otto DP. Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl tRNA from ribosomes. Antimicrobial agents and Chemotherapy **1982**; 21: 811–18.
56. Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, ... & Langeland N. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. BMC pediatrics **2011**; 11(19).
57. Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. Emerging infectious diseases **2002**; 8(12): 1501-1503.
58. New research reveals that antibiotic prescriptions are rising in the most deprived areas of England. EXASOL **2015**. http://www.exasol.com/en/newsroom/press-releases/new-research-conducted-by-exasol-and-antibiotics-research-uk-reveals-t/ (Pristupila 27. svibnja 2016.).
59. Nissen P, Hansen J, Ban N et al. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science **2000**; 289: 920–30.
60. Niwa H, Chuma T, Okamoto K, Itoh K. Rapid detection of mutations associated with resistance to erythromycin in *Campylobacter jejuni/coli* by PCR and line probe assay. International journal of antimicrobial agents **2001**. 18(4), 359-364.
61. Pagel SW and Gautier P. Use of Antimicrobial Agents in Livestock. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) **2012**; 31(1):145–88.
62. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, ... & Jagels K. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature **2000**; 403(6770): 665–668.
63. Payot S, Avrain L, Magras C et al. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. Internatiolan Journal Antimicrobial Agents **2004**; 23: 468–72.
64. Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Megraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in Campylobacter spp. Microbes and Infection **2006**; 8(7): 1967–1971.
65. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. Nat Rev Microbiol **2005**; 3: 870–81.

66. Polgreen PM, Yang M, Laxminarayan R, Cavanaugh JE. Respiratory fluoroquinolone use and influenza. Infection Control & Hospital Epidemiology **2011**; 32(07): 706-709.
67. Pollett S, Rocha C, Zerpa R, Patiño L, Valencia A, Camiña M, Calampa C. Campylobacter antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. BMC infectious diseases **2012**; 12(193).
68. Pumbwe L, Piddock LJ. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. FEMS Microbiology Letter **2002**; 206: 185–9.
69. Pumbwe L, Randall LP, Woodward MJ et al. Evidence for multipleantibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. Antimicrob Agents Chemother **2005**; 49: 1289–93.
70. Putnam SD, Frenck RW, Riddle MS, El-Gendy A, Taha NN, Pittner BT, ... & Clemens JD. Antimicrobial susceptibility trends in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from a rural Egyptian pediatric population with diarrhea. Diagnostic microbiology and infectious disease **2003**; 47(4): 601-608.
71. Sahin O, Plummer PJ, Jordan DM, Sulaj K, Pereira S, Robbe-Austerman , Wang L,Yaeger M J, Hoffman L J, Zhang Q. Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. Journal of Clinical Microbiology **2008**; 46(5): 1663-1671.
72. Sam WI, Lyons MM, Waghorn DJ. Increasing rates of ciprofloxacin resistant *Campylobacter*. Journal of clinical pathology **1999**; 52(9): 709.
73. Schönberg-Norio D, Hänninen ML, Katila ML, Kaukoranta SS, Koskela M, Eerola E, ... & Rautelin H. Activities of telithromycin, erythromycin, fluoroquinolones, and doxycycline against *Campylobacter* strains isolated from Finnish subjects. Antimicrobial agents and chemotherapy **2006**; 50(3): 1086-1088.
74. Skjøt-Rasmussen L, Ethelberg S, Emborg HD, Agersø Y, Larsen LS, Nordentoft S, ... & Hammerum AM. Trends in occurrence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, and human domestically acquired cases and travel associated cases in Denmark. International journal of food microbiology **2009**; 131(2): 277-279.
75. Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, Johnson BP, Moore KA, Osterholm MT. Quinolone resistant *Campylobacter jejuni*

infections in Minnesota, 1992–1998. New England Journal of Medicine **1999**; 340: 1525–1532.

76. Suda KJ, Hicks LA, Roberts RM, Hunkler RJ, Taylor TH. Trends and seasonal variation in outpatient antibiotic prescription rates in the United States, 2006 to 2010. Antimicrobial agents and chemotherapy **2014**: 58(5); 2763-2766.
77. Sun L, Klein EY, Laxminarayan R. Seasonality and temporal correlation between community antibiotic use and resistance in the United States. Clinical Infectious Diseases **2012**.
78. Talsma E, Goettsch WG, Nieste HLJ, Schrijnemakers PM, Sprenger MJW. Resistance in Campylobacter species: increased resistance to fluoroquinolones and seasonal variation. Clinical infectious diseases **1999**; 29(4): 845-848.
79. Unicomb LE, Ferguson J, Stafford RJ, Ashbolt R, Kirk MD, Becker NG, ... & Australian Campylobacter Subtyping Study Group. Low-level fluoroquinolone resistance among Campylobacter jejuni isolates in Australia. Clinical Infectious Diseases **2006**; 42(10): 1368-1374.
80. Vacher S, Menard A, Bernard E et al. PCR–restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter spp*. Antimicrobial Agents Chemotherapy **2003**; 47: 1125–8.
81. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin S, Robinson TP et al. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. Proceedings of theNational Academy of Sciences **2015**; 112(18): 5649-54.
82. 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. Clinical microbiology and infection **2007**; 13(3): 305-310.
83. Vučković D, Plečko V. Kampilobakter. Helikobakter. U: Kalenić S i sur. (Ur.) Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada **2013**.
84. Vukelic D, Trkulja V, Salkovic-Petrisic M. Single oral dose of azithromycin versus 5 days of oral erythromycin or no antibiotic in treatment of campylobacter enterocolitis in children: a prospective randomized assessor-blind study. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition **2010**; 50(4), 404-410.

85. Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. BioMed Research International **2013**: 12.
86. Wistrom J, Norrby SR. Fluoroquinolones and bacterial enteritis, when and for whom? Journal of Antimicrobial Chemotherapy **1995**; 36: 23-39.
87. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: Draft Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva. **2015**.
88. Yan M, Sahin O, Lin J, Zhang Q. Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2006**; 58(6): 1154–1159.
89. Zhang Q, Sahin O, McDermott PF, Payot S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. Microbes and Infection **2006**; 8(7): 1972–1978.
90. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, Lam C, Folster JP, Whichard JM, McDermott PF. Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter spp.* Applied and Environmental Microbiology **2016**; 82(2): 459–466.
91. Zhou J, Zhang M, Yang W, Fang Y, Wang G, Hou F. A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. International Journal of Infectious Diseases **2016**; 42: 28-33.

10. ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mirjani Balen Topić na stručnom vodstvu i podršci u izradi mog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem dr. Ivi Butić na velikoj pomoći oko prikupljanja podataka pri Zavodu za mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

Zahvaljujem se roditeljima i bratu te cijeloj obitelji na neizmjernoj podršci koju su mi pružili.

11. ŽIVOTOPIS

Paula Šupraha je rođena 24.06.1990. u Zadru. Osnovnu školu „A. G. Matoš“ je pohađala u Kolanu i Novalji. Također je završila Osnovnu glazbenu školu „Mirković“ u Novalji. Obje škole je završila s odličnim uspjehom. Opću gimnaziju „Bartul Kašić“ je završila u gradu Pagu također s odličnim uspjehom. Aktivno govori engleski i talijanski jezik te poznaje osnove njemačkoga jezika.

Medicinski fakultet je upisala godine 2009. Od godine 2010.-2012. je demonstrator pri Katedri za anatomiju. Dobitnica je rektorove nagrade godine 2014., zajedno sa druge dvije kolegice, za rad „Glikozilacija proteina u plazmi bolesnika s Parkinsonovom bolešću“, pod vodstvom prof. dr. sc. Frana Borovečkog. Tijekom fakulteta također fotografira i piše za studentski časopis „Medicinar“ u kojem do sada ima objavljena tri članka. Potpredsjednica je i članica Pjevačkog zbora studenata Medicinskog fakulteta u Zagrebu „Lege artis“.