



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Marija Cvetnić

**GENSKA TIPIZACIJA I ANTIMIKROBNA
OSJETLJIVOST BAKTERIJA RODA
CAMPYLOBACTER IZDVOJENIH
IZ PASA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija Cvetnić

**GENOTYPING AND ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA OF
THE GENUS CAMPYLOBACTER
ISOLATED FROM DOGS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Marija Cvetnić

**GENSKA TIPIZACIJA I ANTIMIKROBNA
OSJETLJIVOST BAKTERIJA RODA
CAMPYLOBACTER IZDVOJENIH
IZ PASA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
Prof.dr.sc. Zrinka Štritof

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marija Cvetnić

**GENOTYPING AND ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA OF
THE GENUS CAMPYLOBACTER
ISOLATED FROM DOGS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Zrinka Štritof, Ph.D., Full Professor

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Marija Cvetnić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Zagreb, 2024.

O MENTORICI

Prof. dr. sc. Zrinka Štritof rođena je u Zagrebu gdje je pohađala osnovnu školu, XV. gimnaziju i Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojemu je diplomirala 2003. godine. Od 2003. do 2007. zaposlena je kao znanstvena novakinja, a od 2007. do 2010. kao asistentica na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Doktorirala je 2010., a 2012., 2018. i 2023. godine izabrana je u znanstveno-nastavna zvanja docentice, izvanredne profesorice i redovite profesorice. Tijekom dvadeset godina rada na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom sudjelovala je u stručnom i znanstvenoistraživačkom radu Mikološkog laboratorija, Laboratorija za leptospire, Laboratorija za dijagnostiku bakterijskih bolesti konja, Bakteriološkog laboratorija te Klinike za zarazne bolesti Zavoda. Godine 2016. imenovana je voditeljicom Laboratorija za dijagnostiku bakterijskih bolesti konja, a 2019. godine i voditeljicom Bakteriološkog laboratorija. Sudjelovala je u izvođenju teorijske, praktične, laboratorijske i kliničke nastave iz predmeta Mikrobiologija, Imunologija, Zarazne bolesti domaćih životinja, Prijeteće zarazne bolesti, Zoonoze, Bolesti konja, Bolesti pasa i mačaka te Ambulantne klinike.

Znanstveno i stručno usavršavala se u više navrata; 2004. godine u referentnom mikološkom laboratoriju u Velikoj Britaniji (Mycology Reference Laboratory, Bristol, UK), 2007. i 2008. godine u Laboratoriju za boreliozu i leptospirozu Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Ljubljani, Slovenija, 2014. u bakteriološkom dijagnostičkom laboratoriju na Sveučilištu u Kopenhagenu, Danska (Sund Vet Diagnostik, Department for Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, Denmark), a 2018. u bakteriološkom laboratoriju institucije Animal Health Trust, Newmarket, Velika Britanija. Bila je suradnica na šest domaćih i dva međunarodna znanstvenoistraživačka projekta te voditeljica dvaju domaćih projekata. Bila je članica četiriju povjerenstava Veterinarskog fakulteta. Sudjelovala je u organizaciji više međunarodnih znanstvenih skupova. Područje znanstvenog i stručnog interesa su joj bakterijske zoonoze domaćih životinja, posebice pasa i konja, uključujući područje antimikrobne rezistencije.

Dosad je kao autorica ili koautorica objavila preko sto bibliotečnih jedinica znanstvenih i stručnih radova, od čega 28 u časopisima indeksiranim u bazi SCOPUS.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIM PET GODINA

MAJHUT, M., N. BRKLJAČA BOTTEGARO, J. HABUŠ, N. TURK, J. GOTIČ, D. HORVA-TEK TOMIĆ, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, Z. ŠTRITOF, K. LUČIĆ (2019): Salmoneloza konja. Vet.Stanica, 50, 55 – 62.

HAĐINA, S., J. BORAS, I. BATA, B. ŠKRLIN, V. STAREŠINA, LJ. BARBIĆ, V. M. PERKO, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, Z. MILAS, N. TURK, LJ. PINTER (2019): Izdvajanje i molekularna karakterizacija gljivice malassezia pachydermatis podrijetlom s kožne promjene kalifornijskog morskog lava (*Zalophus californianus*). Vet. Arh. 89, 211 – 222.

HABUŠ J., Z. POLJAK, Z. ŠTRITOF, V. M. PERKO, Z. MILAS, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, V. STAREŠINA, N. TURK (2020): Prognostički čimbenici i njihova povezanost s preživljavanjem u pasa s leptospirozom. Vet. Arh. 90, 111 – 128.

ŠTRITOF, Z., C. MITCHELL, N. TURK, J. HABUŠ, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, A. S. WALLER (2020): Seroprevalence of *Streptococcus equi* subspecies *equi* in Croatia - Short communication. Acta. Vet. Hung. 68, 361 – 363.

ESPINOSA-GONGORA, C., L. R. JESSEN, O. J. DYAR, A. BOUSQUET-MELOU, B. GONZÁLEZ-ZORN, C. PULCINI, G. RE, S. SCHWARZ, D. TIMOFTE, P. L. TOUTAIN, L. GUARDABASSI, N. D. AYAZ, A. M. BJELLAND, D. CHROBAK, S. CHVALA-MANNBERGER, J. DEWULF, M. DOLEJSKÁ, N. FEJZIC, G. FILIOUSSIS, L. FODOR, S. V. GENÇ, M. GONCUOĞLU, A. HEIKINHEIMO, S. KOBAL, S. STERNBERG-LEWERIN, J. MAVROMATI, D. MIŠIĆ, C. MUENTENER, H. NAEGELI, P. NEBBIA, R. ODORE, C. POMBA, K. PRAAKLE, D. RABOLD, M. RUŽAUSKAS, S. SACRISTAN, Z. ŠTRITOF, M. TERENTJEVA, M. TORTI, P. TROJACHANEC, J. A. WAGENAAR, I. ZDOVC (2021): Towards a better and harmonized education in antimicrobial stewardship in European veterinary curricula. Antibiotics. 10, 364.

STEVANOVIĆ, V., I. TABAIN, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, I. BENVIN, Z. HRUŠKAR, S. KOVAČ, I. ŠMIT, G. MILETIĆ, S. HAĐINA, V. STAREŠINA, L. RADIN, V. PLICHTA, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC, M. BRKLJAČIĆ, M. CVETNIĆ, J. HABUŠ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, G. JURKIĆ, I. FERENČAK, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, L. BUCIĆ, LJ. BARBIĆ (2021): The emergence of sars-cov-2 within the dog population in

croatia: Host factors and clinical outcome. *Viruses*. 13, 1430.

ĆAKIĆ, E., Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, I. ŠMIT, M. PERHARIĆ, V. STEVANOVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA (2022): Tetanus u pasa. *Vet. Stanica*, 53, 757 – 768.

HUBER, D., I. C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, Ž. GRABAREVIC (2022): Pyometra Associated With *Staphylococcus pseudintermedius* in Two Bitches. *Top. Companion Anim. Med.* 49, 100650.

TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2022): Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. from urine of dogs and cats in northwestern Croatia. *Ret. Vet. Sci.* 151, 42-46.

BENVIN, I., V.M. PERKO, M. M. MALJKOVIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, N. TURK (2023): Serological Surveillance of Equine Leptospirosis in Croatia in the Period From 2012 to 2022: A Key Insight Into the Changing Epizootiology. *JEVS*. 127, 104844.

PINTARIĆ S., Z. ŠTRITOF, V. M. PERKO, A. TUMPA, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ (2023): Detection of blaCTX-Mgenes in ESBL-producing *Klebsiella* isolates from animals in Croatia. *Acta. Vet. Hung.* 71, 12 – 15.

STEVANOVIĆ, V., M. M. MALJKOVIĆ, K. GRACIN, I. BENVIN, V. STAREŠINA, S. KOVAČ, A. ŠKRINJARIĆ, S. HAĐINA, I. ZEČEVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, LJ. BARBIĆ (2023): Seroprevalencija respiratornog koronavirusa pasa u Hrvatskoj. *Vet. Arh.* 93, 239 – 246.

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zrinki Štritof na strpljenu, potpori, savjetima, samostalnom i neometanom radu u bakteriološkom laboratoriju.

Zahvaljujem djelatnicima Hrvatskog veterinarskog instituta, izv. prof. dr. sc. Miroslavu Beniću, dr. sc. Luki Jurinoviću i dr. sc. Sanji Duvnjak na stručnoj pomoći prilikom obrade rezultata.

Velika hvala dragoj prijateljici i kolegici dr. sc. Vesni Mojčec Perko na poduci i što mi je ukazala koliko molekularna biologija može biti jednostavna i zanimljiva.

Posebno hvala dragim prijateljima i kolegama Andrei, Maji, Petri, Nikoli, Selmi i Vinki te svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom.

Najveće hvala mojoj obitelji, Luki, Antunu i Juditi koji su me bezgranično podupirali na ovome dugom putovanju.

SAŽETAK

GENSKA TIPIZACIJA I ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST BAKTERIJA RODA *CAMPYLOBACTER* IZDVOJENIH IZ PASA

Bakterije roda *Campylobacter* najčešći su uzročnici bakterijskih gastroenteritisa u ljudi. Najvažniji način infekcije ljudi jest konzumacija nedovoljno termički obrađenih namirnica životinjskog podrijetla, no procjenjuje se da je nezanemariv broj slučajeva kampilobakterioze u ljudi posljedica kontakta s kućnim ljubimcima. Ovim istraživanjem utvrđena je učestalost izdvajanja bakterija roda *Campylobacter* u različitim skupina pasa, identificirana im je vrsta, određena antimikrobna osjetljivost te su odabrani izolati analizirani MLST metodom. Izdvojena su 124 (26,6 %) izolata *Campylobacter* spp. Njih 45 % identificirano je kao *C. jejuni*, 43,7 % kao *C. upsaliensis* i 7,5 % izolata kao *C. coli*. Učestalost izdvajanja *Campylobacter* spp. u pasa dobi do godine dana bila je veća od učestalosti izdvajanja u pasa starijih od godine dana. Vrsta *C. jejuni* češće je izdvajana u pasa starosti do godine dana, dok je u pasa starijih od godine dana češće izdvajana vrsta *C. upsaliensis*. Izgledi za izdvajanje *Campylobacter* spp. bili su 2,38 puta veća u pasa iz azila nego u vlasničkih pasa. Psi hranjeni BARF-om imali su 3,09 puta veće izgleda za izdvajanje bakterija roda *Campylobacter* u odnosu na pse hranjene termički obrađenom hranom ($p = 0,001$). Izgledi za izdvajanje *C. upsaliensis* u pasa hranjenih BARF-om bili su 4,05 puta veći nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom ($p < 0,001$).

Antimikrobna osjetljivost ispitana je za 79 izolata; na ciprofloksacin je bilo rezistentno 57 % izolata, na tetraciklin 20 % izolata, a na eritromicin 2,5 % izolata *Campylobacter* spp. Rezi-stencije se nisu značajno razlikovale između različitih vrsta kampilobaktera.

MLST metodom genotipizirano je i filogenetski analizirano 27 izolata. Izolati vrste *C. jejuni* svrstani su u 11 sekvencijskih tipova te je uočena vrlo velika genetska raznolikost. Šest izolata vrste *C. coli* svrstano je u dva sekvencijska tipa, a pet izolata vrste *C. upsaliensis* u pet različitih sekvencijskih tipova.

Rezultati ovog istraživanja vrijedan su doprinos poznavanju pasa kao karike u epidemiološkom lancu kampilobakterioze i upućuju na potrebu za daljnjim istraživanjima pasa kao izvora kampilobaktera, ali i drugih bakterija, za ljude.

Ključne riječi: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, pas, antimikrobna rezistencija, MLST.

EXTENDED ABSTRACT

GENOTYPING AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER* ISOLATED FROM DOGS

Introduction: Bacteria of the genus *Campylobacter* are among the most common causes of bacterial gastroenteritis in humans. The high incidence and widespread distribution of campylobacteriosis make it a significant health and socioeconomic problem. The main route of infection for humans is the consumption of inadequately thermally processed foods of animal origin, but it is estimated that a significant number of human cases of campylobacteriosis are due to contact with domestic animals. The most common clinical manifestation of campylobacteriosis in animals is gastroenteritis. The infection can be subclinical and certain *Campylobacter* spp. are part of the intestinal microbiome of animals. Although the transmission of *Campylobacter* from dogs to humans has been demonstrated several times, pets are still relatively unexplored as a source of infection.

The number of dogs is increasing worldwide and their contact with household members is becoming closer and more intensive. Accordingly, the likelihood of various zoonotic pathogens being transmitted between dogs and humans is increasing. Nevertheless, zoonoses transmitted by pets are much less researched than zoonoses transmitted by food. *Campylobacter* spp. are transmitted via the fecal-oral route and can be shed by both healthy dogs and those with diarrhea.

As campylobacteriosis is one of the most common zoonoses, monitoring and minimising the development of antibiotic resistance is extremely important. Monitoring of antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. is carried out at European Union level, but only for isolates originating from poultry. High to very high resistance rates have been found in isolates of *Campylobacter* spp. from poultry. Similar studies are available for isolates from pigs. Much less is known about isolates from cattle and domestic animals, which are not the main source of campylobacteriosis in humans, but still pose a risk of human infection. There is little data on the antibiotic resistance of *Campylobacter* isolates from dogs, and the results of the studies that have been carried out vary widely. According to the European Centre for Disease Prevention and Control, the resistance of *Campylobacter* spp. isolated from humans and farm animals to ciprofloxacin and tetracycline is very high. Resistance to macrolides (erythromycin) is much lower.

Resistance of *C. jejuni* isolates to ciprofloxacin is continuously increasing in European countries. The aim of this study was to determine the frequency of *Campylobacter* bacteria isolation in various groups of dogs, identify the species using molecular methods such as RFLP and multiplex PCR, assess the sensitivity of the isolated bacteria to selected antimicrobial agents, and analyze chosen isolates using the MLST method to determine their sequence type.

Material and Methods: In this study, fecal samples from dogs were tested for the presence of *Campylobacter* bacteria in the bacteriology laboratory of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with the Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine. The samples came from dogs with diarrhea and from healthy dogs. They were collected for diagnostic purposes as part of routine clinical procedures at the Clinic for Infectious Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, and at clinics in the Zagreb area and Zagreb County. Archived isolates collected between October 2013 and October 2022 were selected for this study. The following data on the dogs was collected for the study: age, presence of diarrhea, ownership, type of food and whether they had contracted parvovirus. The fecal samples were processed within four hours of sampling.

To determine the frequency of *Campylobacter* shedding in dogs, this study looked for the presence of *Campylobacter* bacteria in the feces. The dogs were divided into groups: age up to one year and older than one year; without diarrhea and those with clinical signs of diarrhea; owned and shelter dogs; whether they were fed raw meat or thermally processed food; whether or not they had parvovirus.

The isolates were identified by multiplex PCR, and their susceptibility to antimicrobials was tested using the Kirby-Bauer disk diffusion method with four antimicrobials: ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin and azithromycin. In addition, selected isolates were analyzed using the MLST method and a phylogenetic analysis was performed. The genotyping of the isolates provided for the first time information on the occurrence of certain sequence types of *Campylobacter* in dogs in the Republic of Croatia.

The study highlighted the role of different categories of dogs as a source of *Campylobacter* infections for humans. The results obtained contributed to the knowledge of the epidemiology and epizootiology of campylobacteriosis in the Republic of Croatia.

The collected data were processed using the statistical program Stata 13.1 (STATA Corp. USA). Univariate analysis of the association between the isolation of *Campylobacter* bacteria and the age of the dogs, the presence of diarrhea, ownership, the type of food they were fed, the

parvovirus and the sensitivity of the isolated *Campylobacter* to antibiotics was tested using the chi-square test and Fisher's exact test. Variables that were statistically significantly associated with the isolation of *Campylobacter* bacteria were included in the logistic regression model to calculate the probability of isolating *Campylobacter* from a given category of dogs.

Results: In this study, 124 (26.6%) isolates of *Campylobacter* spp. were isolated from 446 processed samples. Of the isolates identified, 45% were *C. jejuni*, 43.7% *C. upsaliensis* and 7.5% *C. coli*. Three isolates (3.7%) were not identified as species.

Campylobacter spp. was detected in 31.9% of dogs up to one year of age and in 22.3% of dogs over one year of age, indicating that it is more frequently isolated in dogs under one year of age ($p = 0.019$). Dogs younger than one year of age mostly had diarrhea, which was also associated with more frequent shedding of the *C. jejuni* species. *Campylobacter* spp. was isolated in 25.7% of healthy dogs and 29.5% of dogs with diarrhea. The difference in the frequency of isolation of *Campylobacter* spp. in healthy dogs and in dogs with diarrhea was not statistically significant at the genus level ($p = 0.397$). However, analysis at the *Campylobacter* species level revealed that all dogs in which the *C. coli* species was identified had diarrhea. Most of the dogs (77.1%) from which *C. jejuni* was isolated had diarrhea. The lowest incidence of diarrhea (34.3%) was found in dogs from which *C. upsaliensis* was isolated.

In this study, *Campylobacter* spp. was isolated in 22.6% of the dogs owned and 41.6% of the dogs in the shelter ($p=0.001$). The frequency of *Campylobacter* isolation was higher in dogs fed BARF food than in dogs fed thermally treated food. *Campylobacter* spp. was isolated in 25.8% of dogs fed with thermally treated food and in 37.5% of dogs fed with BARF. Dogs fed BARF were 3.09 times more likely to isolate *Campylobacter* bacteria than dogs fed thermally treated food ($p=0.001$). However, most isolates (71.4%) from dogs fed BARF diets were of the *C. upsaliensis* species, suggesting that the isolates were not from raw meat, as no study or monitoring of the microbiological safety of meat has detected the presence of *C. upsaliensis* in meat. The probability of isolating *C. upsaliensis* was 4.05 times higher in dogs fed BARF food than in dogs fed thermally processed food ($p=0.001$). The species *C. upsaliensis* was isolated more frequently from dogs fed BARF food than from dogs fed thermally processed food, while the species *C. jejuni* was isolated more frequently from dogs fed thermally processed food.

Isolation of *Campylobacter* was statistically significantly associated with parvovirus, and the proportion of dogs in which the *C. jejuni* species was isolated and which also had parvovirus was higher than the proportion of dogs in which *C. jejuni* was isolated and which did not have parvovirus.

In this study, the antimicrobial susceptibility of 79 isolates was tested. Depending on the species isolated, 58.3 % of the *C. jejuni* isolates were resistant to ciprofloxacin, 44.4 % to tetracycline and 2.5 % to erythromycin; 48.6 % of the *C. upsaliensis* isolates were resistant to ciprofloxacin, 25.7 % of isolates to tetracycline and 2.9 % to erythromycin; 66.7 % of *C. coli* isolates were resistant to ciprofloxacin, while they were all sensitive to the other substances tested.

In this study, the MLST method was used for genotyping and phylogenetic analysis of 27 isolates. A total of 189 genetic loci were sequenced. The isolates belonging to *C. jejuni* were categorized into 11 STs (sequence types) or six CCs (clonal complexes): ST 1943, ST 3156, ST 19, ST 538, ST 2086, ST 572, ST 3335, ST 51, ST 10039, ST 475, ST 9354. High genetic diversity was found in the 16 *C. jejuni* isolates analyzed by MLST in this study. All STs identified in this study have already been isolated from people around the world, including ST 51 and ST 475 from individuals in the Republic of Croatia. As for *C. coli* species, all isolates in this study belong to the same clonal complex, CC ST-828. Five isolates of *C. upsaliensis* were analyzed by MLST method and classified into five different sequence types (ST 65, ST 156, ST 217, ST 218 and ST 219).

Conclusion: The most frequently isolated species in this study was *C. jejuni* (45%), followed by *C. upsaliensis* (43.7%) and *C. coli* (7.5%). Three isolates (3.7%) could not be identified to species.

The frequency of isolation of *Campylobacter* spp. was higher in dogs up to one year of age than in older dogs. *C. jejuni* was isolated more frequently in dogs up to one year of age, while *C. upsaliensis* was isolated more frequently in older dogs.

All dogs in which *C. coli* was isolated had diarrhea. Most dogs (77.1%) from which *C. jejuni* was isolated had diarrhea. The lowest incidence of diarrhea (34.3%) was observed in dogs from which *C. upsaliensis* was isolated.

The probability of isolating *Campylobacter* spp. was 2.38 times higher in dogs from shelters than in owned dogs. The probability of isolating *Campylobacter* spp. was 3.09 times higher in dogs fed BARF food than in dogs fed thermally processed food. However, the majority of isolates (71.4%) from BARF-fed dogs belonged to the *C. upsaliensis* species, indicating that the isolates did not originate from raw meat.

The highest resistance rate in *Campylobacter* spp. was found to ciprofloxacin (57 %), the lowest to tetracycline (20 %), while resistance to erythromycin was the lowest (2.5 %). Resistance did not differ significantly between the different *Campylobacter* species.

High genetic diversity was found within the isolates of *C. jejuni* and *C. upsaliensis*, while the *C. coli* isolates were most closely related. All STs of *C. jejuni* and *C. coli* identified in this study have already been detected in humans throughout the world, clearly demonstrating their zoonotic nature. The zoonotic nature of *C. upsaliensis* is evidenced by the fact that it has frequently been identified as a cause of disease in humans, with the only source being dogs.

Further research is needed to gain a better insight into the epidemiology of *C. upsaliensis* infections, as the number of isolates in the pubMLST database is still very low.

Campylobacteriosis is the most common zoonosis in Croatia and worldwide. The results of this study are a valuable contribution to the understanding of dogs as a link in the epidemiological chain of campylobacteriosis and thus contribute to public health knowledge. The fact that all isolates of the more intensively studied species, *C. jejuni* and *C. coli*, have already been isolated from humans worldwide emphasises the need for further research on dogs as a source of *Campylobacter* and other bacteria for humans.

Key words: *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli*, dog, antimicrobial resistance, MLST.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. Povijesni pregled otkrića kampilobaktera	4
2.2. Taksonomija i raširenost bakterija roda <i>Campylobacter</i>	5
2.3. Uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterija roda <i>Campylobacter</i>	11
2.4. Metode identifikacije vrsta bakterija roda <i>Campylobacter</i>	12
2.4.1. Biokemijske metode identifikacije	12
2.4.2. Molekularne metode identifikacije i genotipizacije	13
2.4.3. Matricom potpomognuta laserska ionizacija / desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona	18
2.5. Patogenost bakterija roda <i>Campylobacter</i>	19
2.6. Antimikrobna osjetljivost bakterija roda <i>Campylobacter</i>	19
2.7. Kampilobakterioza pasa	23
2.7.1. Epizootologija kampilobakterioze pasa	23
2.7.2. Klinički znakovi i dijagnostika kampilobakterioze pasa	24
2.7.3. Liječenje kampilobakterioze pasa	25
2.8. Kampilobakterioza ljudi	26
2.9. Kampilobakteri kao javnozdravstveni problem	28
3. OBRAZLOŽENJE TEME	30
4. MATERIJAL I METODE	32
4.1. Uzorci	32
4.2. Nacjepljivanje uzoraka	32
4.3. Identifikacija izolata do razine roda	32
4.3.1. Bojenje prema Gramu i mikroskopiranje	33
4.3.2. Određivanje sposobnosti tvorbe enzima citokrom-oksidge	33
4.4. Identifikacija vrste bakterija roda <i>Campylobacter</i> molekularnim metodama	33
4.4.1. Postupak izdvajanja DNK pomoću 2 %-tne otopine Chelex-100	33
4.4.2. Lančana reakcija polimerazom i polimorfizam dužine restriksijskih fragmenata gena <i>CdtB</i>	34
4.4.3. Višestruka lančana reakcija polimerazom	38

4.5. Određivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne tvari disk-difuzijskim testom prema Kirby-Baueru	43
4.6. Genotipizacija izolata	44
4.6.1. Postupak izdvajanja DNK za sekvenciranje	44
4.6.2. Tipizacija određivanjem sljedova na više genskih lokusa	45
4.6.3. Obrada nukleotidnog slijeda u informatičkim programima	49
4.6.4. Filogenetska analiza izolata <i>Campylobacter</i> spp.	50
4.7. Statistička obrada podataka	51
5. REZULTATI	52
5.1. Istraživana populacija pasa	52
5.2. Izolati <i>Campylobacter</i> spp.	52
5.2.1. Identifikacija izdvojenih bakterija roda <i>Campylobacter</i> molekularnim metodama PCR-RFLP i multipleks PCR	53
5.3. Učestalost izdvajanja bakterija roda <i>Campylobacter</i> iz različitih skupina pasa ..	55
5.3.1. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema dobi pasa.	55
5.3.2. Učestalost izdvajanja kampilobaktera s obzirom na prisutnost proljeva ..	56
5.3.3. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema vlasništvu pasa	
5.3.4. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema vrsti hrane kojom su psi hranjeni.	58
5.3.5. Učestalost izdvajanja kampilobaktera s obzirom na parvovirozu	59
5.4. Rezultati logističke regresije	60
5.5. Statistička analiza podataka s obzirom na vrstu <i>C. jejuni</i>	60
5.6. Statistička analiza podataka s obzirom na vrstu <i>C. upsaliensis</i>	62
5.7. Usporedba skupina pasa s obzirom na izdvojenu vrstu roda <i>Campylobacter</i> ...	64
5.8. Antimikrobna osjetljivost bakterija roda <i>Campylobacter</i>	64
5.9. Genotipizacija MLST metodom izolata <i>Campylobacter</i> spp.	66
5.10. Filogenetska analiza izolata <i>Campylobacter</i> spp.	69
6. RASPRAVA	79
7. ZAKLJUČCI	95
8. POPIS LITERATURE	96
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	124

POPIS POKRATA

AST – ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (engl. *antimicrobial susceptibility testing*)

ATCC – banka eukariotskih staničnih linija i izvor informacija o njima (engl. *American Type Culture Collection*)

BARF – hrana na bazi sirovog mesa (engl. *biologically appropriate raw food; bones and raw food*)

CAT agar – cefoperazon-amfotericin-teikoplanin agar

CC – klonski kompleks (engl. *clonal complex*)

CDT – citoletalni distendirajući toksin (engl. *cytholethal-distending toxin*)

CF agar – CampyFood agar

CLSI – Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *The European Food Safety Authority*)

ECDC – Europski centar za sprječavanje i kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*)

EU – Europska unija

EUCAST – Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

MALDI TOF MS – matricom potpomognuta laserska ionizacija / desorpcija spregnuta sa spektrometrijom

masa temeljenom na vremenu leta iona (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*)

mCCDA – modificirani cefoperazon-deoksikolat-agar s ugljenom (engl. *modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*)

MLST – tipizacija određivanjem sljedova na više genskih lokusa (engl. *multilocus sequence typing*)

MST – minimalno razgranato stablo (engl. *minimum spanning tree*)

Multipleks PCR – višestruka lančana reakcija polimerazom (engl. *multiplex polymerase chain reaction*)

µm – mikrometar

NPV – negativna prediktivna vrijednost (engl. *negative predictive value*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PPV – pozitivna prediktivna vrijednost (engl. *positive predictive value*)

RFLP – analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism analysis*)

ST – sekvencijski tip (engl. *sequence type*)

TO – termički obrađena hrana

1. UVOD

Bakterije roda *Campylobacter* gram-negativne su štapičaste bakterije, koje se fiziološki mogu nalaziti u crijevu mnogih vrsta kralježnjaka. Do sada je unutar roda otkriveno preko 30 vrsta bakterija (QUINN, 2003.).

Kampilobakterioza je najčešća bakterijska gastrointestinalna infekcija ljudi u cijelom svijetu. Prema podacima Europske agencije za sigurnost hrane i Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti za 2021. godinu kampilobakterioza je najčešće prijavljivana zoonoza u 36 europskih zemalja. Bolest je zoonoza, a ljudi se najčešće zaraze konzumacijom nedovoljno termički obrađenih namirnica životinjskog podrijetla, posebice mesa peradi (DE VRIES i sur., 2008., KAAKOUSH i sur., 2015.). Bolest se u ljudi očituje bolovima u abdomenu, povraćanjem i proljevom (SCALLAN i sur., 2015.). U odraslih imunokompetentnih osoba bolest je obično samoograničavajuća, no rjeđe može rezultirati i ozbiljnim komplikacijama, poput reaktivnog artritisa, hemolitičko-uremijskog sindroma i Guillain-Barréova sindroma (MAN, 2011., SCALLAN i sur., 2015., SKARP i sur., 2016.).

Najvažniji je način infekcije ljudi konzumacija nedovoljno termički obrađenih namirnica životinjskog podrijetla, no procjenjuje se da je nezanemariv broj slučajeva kampilobakterioze u ljudi posljedica kontakta s kućnim ljubimcima. Psi su, uz mačke, najbrojnija vrsta kućnih ljubimaca diljem svijeta. Bolest ljudi najčešće uzrokuju vrste *C. jejuni* i *C. coli* (EFSA, 2021.), dok se iz pasa najčešće izdvajaju *C. jejuni*, *C. coli* i *C. upsaliensis* (ACKE, 2018.). U pasa infekcija bakterijom *Campylobacter* sp. može biti supklinička ili se očitovati gastroenteritisom, ovisno o vrsti bakterije, infektivnoj dozi, istodobnim infekcijama drugim uzročnicima i vjerojatno drugim čimbenicima (ACKE, 2018.). Smatra se mogućim da je vrsta *C. upsaliensis* komenzal u crijevu pasa jer se vrlo često izdvaja iz zdravih jedinki (HALD I MADSEN, 1997.). Iz navedenog proizlazi da je identifikacija vrste izdvojenih kampilobaktera izrazito važna i u dijagnostici bolesti i procjeni kliničkog značaja nalaza, ali i u epizootiološko-epidemiološkim istraživanjima izvora infekcije i procjeni rizika od zaražavanja ljudi te kontaminacije okoliša.

Termofilne vrste roda *Campylobacter* uzgajaju se pri temperaturi od 41 ± 1 °C, a najbolje rastu u atmosferi od 2 % do 10 % ugljikova dioksida i 84 % dušika. Budući da uzorci koji se pretražuju (primjerice izmet) često sadržavaju mnoge druge bakterijske vrste, za izdvajanje se rabe visokoselektivne hranjive podloge. Identifikacija vrste kampilobaktera izrazito je važna, a može se učiniti pomoću više metoda: masena spektrofotometrija (engl. *matrix-assisted laser*

desorption/ionization – time of flight, MALDI-TOF) (BESSÈDE i sur., 2011.), gel-elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) (BAKHSHI i sur., 2016.), lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (ASAKURA i sur., 2007.), analiza dužine polimorfizma restrikcijskih odsječaka (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (KAMEI i sur., 2014.), multiplex-PCR (YAMAZAKI-MATSUNE i sur., 2007.) i tipizacija određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (engl. *multilocus locus sequence typing*, MLST) (DINGLE i sur., 2001.). Budući da je kampilobakterioza jedna od najčešćih zoonoza, izrazito je važno praćenje i minimiziranje razvoja antimikrobne otpornosti. Praćenje otpornosti kampilobaktera na antimikrobne tvari provodi se na razini Europske unije, ali samo za izolate podrijetlom iz peradi. Visoke do vrlo visoke stope otpornosti zabilježene su u izolata *Campylobacter* spp. podrijetlom iz peradi. Slična istraživanja postoje i za izolate podrijetlom iz svinja. Mnogo se manje zna o izolatima podrijetlom iz goveda i kućnih ljubimaca koji, iako nisu glavni izvor kampilobakterioze za ljude, predstavljaju rizik za infekciju ljudi. Nema mnogo podataka o antimikrobnoj otpornosti kampilobaktera izdvojenih iz pasa, a rezultati provedenih istraživanja dosta se razlikuju. Prema podacima Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti otpornost kampilobaktera izdvojenih iz ljudi i farmskih životinja na ciprofloksacin i tetraciklin vrlo je visoka. Otpornost na makrolide (eritromicin) mnogo je niža. Otpornost izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin u neprestanom je porastu u europskim zemljama.

Genska tipizacija izolata metodom čiji su rezultati međusobno usporedivi preduvjet je epidemiološko-epizootioloških istraživanja. Metoda koja se pokazala dobrom i posljednjih se godina učestalo primjenjuje za gensku tipizaciju mnogih bakterija jest tipizacija određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (engl. *multilocus locus sequence typing*, MLST). MLST se temelji na sekvenciranju više lokusa sedam održavateljskih gena. Alelnom profilu za svaki lokus, fragment gena u shemi, dodijeljen je jedinstveni broj u redosljed njegova otkrića i izolatima s identičnim sekvencijama dodjeljuje se isti broj alela. U shemi MLST-a, različiti alelni profili sedam lokusa karakteriziraju izolat i vrstu sekvencije (ST) te je određena kombinacijom alela na svakom lokusu. Skupine klonskog kompleksa (CC) tvore dva ili više izolata koji dijele identične alelne profile za najmanje četiri lokusa, a imenovan je nakon što se ST identificira kao predstavnik skupine. Prednosti MLST-a uključuju visoku diskriminaciju, ponovljivost, jednostavnost interpretacije primjenom jedne tehnike, a ne kombinacijom tehnika, i generiranje podataka koji su izravno usporedivi među laboratorijima. Na temelju sekvencijskih tipova dobivenih MLST-om moguće je napraviti filogenetsku analizu te istražiti srodnost izolata *Campylobacter* spp. iz različitih izvora i geografskih područja.

Cilj je ovog rada istražiti učestalost infekcije bakterijama roda *Campylobacter* spp. u različitim skupinama pasa na području Republike Hrvatske. Iz dobivenih izolata cilj je provesti identifikaciju vrste molekularnim metodama, odrediti antimikrobnu osjetljivost izolata i provesti analizu nukleotidnih sljedova više genskih lokusa te odrediti učestalost i proširenost dokazanih vrsta i genotipova.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Povijesni pregled otkrića kampilobaktera

Theodor Escherich objavio je 1886. godine svoja zapažanja u kojima je opisao spiralne bakterije u debelom crijevu djece umrle od dotad nepoznate crijevne bolesti. Bolest je nazvao *cholera infantum*, no nije uspio izdvojiti uzročnika na čvrstim hranjivim podlogama. Mikroskopski je primijetio spiralne mikroorganizme u uzorcima izmeta dojenčadi s proljevom. Unatoč njihovoj velikoj učestalosti od 49 % (35/72), nije bio uvjeren da su spiralne bakterije etiološki uzročnici crijevnih infekcija (BUTZLER, 2004.).

Bakterije roda *Campylobacter* prvi su put izdvojene 1906. godine iz pobačenih plodova ovaca u Ujedinjenom Kraljevstvu. Uzročnika je izdvojio i opisao John McFadyean, uz pomoć suradnika Stewarda Stockmana, tijekom istraživanja uzroka pobačaja u ovaca i goveda. U stadu od 150 ovaca u kojih je u 33 % gravidnih jedinki zabilježen pobačaj, uzročnika su dokazali u razmazu iscjetka maternice gravidne ovce. Više godina poslije sličan mikroorganizam izdvojen je u SAD-u (MCFADYEAN i STOCKMAN, 1913., SKIRROW 2006.). Theobald Smith 1919. godine izdvojio je spiralne bakterije iz 26 pobačenih fetusa goveda te ih nazvao *Vibrio fetus* (*V. fetus*) (SMITH, 1919.). JONES i suradnici (1931.) prvi put opisuju proljev u goveda uzrokovan bakterijama poput vibrija, a uzročnika nazivaju *Vibrio jejuni*. DOYLE (1944.) opisao je mikroaerofilne vibrije kod dizenterije svinja. U to je vrijeme vrsta *Vibrio fetus* (danas *Campylobacter fetus*) bila čest nalaz kod pobačaja i poremećaja u reprodukciji krava i ovaca.

VINCENT i suradnici (1947.) opisuju prvi slučaj infekcije mikroaerofilnim vibrijima u humanoj medicini. U trudnice sa simptomima nalik na gripu izdvojeni su vibriji iz hemokulture. Pobacila je nakon pet tjedana, a iz posteljice su izdvojeni vibriji. Iste se godine spominje izdvajanje vibrija iz fetusa triju trudnica od kojih su dvije pobacile (BUTZLER, 2004.).

KING (1957.) u svom istraživanju navodi da je zaprimila, iz različitih područja SAD-a, 23 izolata slična bakteriji *V. fetus*. Na temelju biokemijskih i antigenskih svojstava dokazala je *V. fetus*, ali i vrstu koja se od nje razlikuje po biokemijskim svojstvima. Nekoliko godina poslije ta je nepoznata vrsta nazvana *V. bubulus*.

Razvojem novih seroloških, biokemijskih i molekularnih metoda otkriveno je da se unutar roda *Vibrio* nalaze vrste koje se znatno razlikuju. Sebald i Véron 1963. godine predlažu da se u novi rod *Campylobacter* svrstaju *Vibrio coli*, *V. jejuni*, *V. sputorum*, *V. bubulus* i *V. fetus* (VÉRON i CAHTELAIN, 1973.). Tek 1970-tih godina kampilobakteri privlače pozornost,

kada su prepoznati kao uzročnici infekcija u ljudi, a izdvojeni su i iz ostalih vrsta životinja, hrane i vode (BUTZLER, 2004.).

DEKEYSER i suradnici (1972.) opisuju izdvajanje vibrija iz izmeta i krvi žene s jakim proljevom i groznicom. U pacijentice nisu dokazane druge crijevne infekcije.

Iz svega navedenog vidljivo je da su veterinarski mikrobiolozi uspjeli izdvojiti uzročnika pobačaja znatno ranije, a tek 1970-tih godina slični su patogeni identificirani kao uzročnici proljeva u ljudi. Klinički su mikrobiolozi u Belgiji, 1972. godine, prvi izdvojili kampilobakter iz uzoraka izmeta ljudi s proljevom. BUTZLER i suradnici (1973.) izvijestili su o izdvajanju vrste *C. jejuni* / *C. coli* u 5,3 % djece s proljevom u koje su zabilježili specifična protutijela za vrstu *C. jejuni*. Razvoj selektivnih podloga za uzgoj te osnivanje laboratorija za izdvajanje bakterija roda *Campylobacter* iz uzoraka izmeta omogućili su istraživanje stvarne učestalosti kampilobaktera u ljudi (ALTEKRUSE i sur., 1999.).

Do sredine 1980-ih kampilobakteri su postali poznati kao najčešći uzročnici bakterijskih infekcija želuca i crijeva ljudi (BUTZLER, 2004.).

SANDSTEND i suradnici (1983.) u švedskom gradu Uppsali izdavaju kampilobakter u 64 % (63/98) uzoraka pozitivnih na *Campylobacter* sp. podrijetlom od ljudi, pasa i mačaka. Svi su izdvojeni izolati bili negativni ili vrlo slabo pozitivni na katalazu. Nedugo nakon toga STEELE i suradnici (1985.) izdavaju *Campylobacter* sp. u djece s proljevom sličan onomu iz Uppsale. Na temelju kasnijih istraživanja dokazano je da se radi o novoj vrsti *Campylobacter* sp., koja je nazvana *Campylobacter upsaliensis*, prema gradu u kojemu je prvi puta opisana.

2.2. Taksonomija i raširenost bakterija roda *Campylobacter*

Kampilobakteri su sveprisutne bakterije raširene u prirodi i izdvojene iz različitih izvora poput vode, zemlje, biljaka, insekata, osobito muha, domaćih i divljih životinja. Sposobne su kolonizirati površine sluznica te uzrokovati različite bolesti životinja i ljudi (LEVIN, 2007.). Bakterijske vrste roda *Campylobacter* ne mogu se razmnožavati izvan živog organizma, pa se rezervoarima ovih bakterija smatraju toplokrvne životinje. One svojim izmetom kontaminiraju okoliš koji postaje izvorom za druge domaćine (JONES, 2001.). Različite vrste kampilobaktera uobičajeni su stanovnici želučano-crijevnog sustava mnogih divljih životinja (divljih ptica, osobito patki i galebova), domaćih životinja (goveda i svinja) i kućnih ljubimaca (pasa i mačaka), a osobito se često nalaze u peradi koja služi za prehranu ljudi (BAE i sur., 2005., THAKUR i GEBREYES, 2005., THEPAULT, 2018.).

Bakterije roda *Campylobacter* prema taksonomskoj shemi pripadaju u sljedeće kategorije:

- domena: Bacteria
- koljeno: Pseudomonadota
- razred: Epsilonproteobacteria
- red: Campylobacterales
- porodica: Campylobacteriaceae
- rod: *Campylobacter*.

Rod *Campylobacter* trenutačno se sastoji se od 57 vrsta. U tablici 1. prikazane su sve vrste, njihovi rezervoari i bolesti koje uzrokuju.

Tablica 1. Prikaz vrsta roda *Campylobacter*, rezervoari i bolesti koje uzrokuju u ljudi i životinja (bacterio.net, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature <https://lpsn.dsmz.de/genus/campylobacter>, pristupljeno 30. 9. 2022.)

Vrsta	Rezervoar	Bolest u ljudi i životinja	Izvor
<i>Campylobacter anaticus</i>	anatolijska vjeverica	nepoznato	AYDIN i sur. (2022.)
<i>Campylobacter armoricus</i>	školjke, voda	crijevne infekcije	BOUKERB i sur. (2019.)
<i>Campylobacter aviculae</i>	zeba	želučano-crijevne infekcije	BRYANT i sur. (2020.)
<i>Campylobacter avium</i>	pilići, purani	nepoznato	ROSSI i sur. (2009.)
<i>Campylobacter bilis</i>	pilići	nepoznato	PHUNG i sur. (2022.)
<i>Campylobacter blaseri</i>	tuljan	nepoznat	GILBERT i sur. (2018.)
<i>Campylobacter butzleri</i>	pilići, svinje, goveda	crijevne infekcije	KIEHLBAUCH i sur. (1991.)
<i>Campylobacter canadensis</i>	veliki ždral	nepoznato	INGLIS i sur. (2007.)
<i>Campylobacter cinaedi</i>	nepoznat	crijevne infekcije	TOTTEN i sur. (1985.)
<i>Campylobacter coli</i>	pilići, svinje, ovce, koze, goveda, psi, purani, nojevi, majmuni	želučano-crijevne infekcije, pobačaj, septikemija, meningitis, kolecistitis	VERON i CHATELAIN (1973.)

<i>Campylobacter concisus</i>	nepoznat	gingivitis, parodontoza	TANNER i sur. (1981.)
<i>Campylobacter corcagiens</i>	makaki majmuni	nepoznato	KOZIEL i sur. (2014.)
<i>Campylobacter cryaerophila</i>	više vrsta životinja	nepoznato	NEILL i sur. (1985.)
<i>Campylobacter cuniculorum</i>	kunić	nepoznato	ZANONI i sur. (2009.)
<i>Campylobacter curvus</i>	čovjek	upala želuca i crijeva, apscesi, esofagitis, parodontoza, septikemija	VANDAMME i sur. (1991.)
<i>Campylobacter estrildidarum</i>	zeba	želučano-crijevne infekcije	BRYANT i sur. (2020.)
<i>Campylobacter fetus subsp. fetus</i>	goveda, ovce, konji, kornjače, klokani	upala želuca i crijeva, septikemija, apscesi, meningitis, celulitis, endokarditis, pobačaj	ESCHER i sur. (2016.)
<i>Campylobacter fetus subsp. testudinum</i>	kornjače, gušteri, zmije	upala želuca i crijeva, apsces, bakterijemija	FITZGERALD i sur., (2014.)
<i>Campylobacter fennelliae</i>	nepoznat	crijevne infekcije u ljudi	TOTTEN i sur. (1985.)
<i>Campylobacter geochelonis</i>	kornjače	nepoznato	PICCIRILLO i sur. (2016.)
<i>Campylobacter gracilis</i>	čovjek	ulcerozni kolitis, parodontoza, apscesi	VANDAMME i sur. (1995.)
<i>Campylobacter helveticus</i>	mačke, svinje, psi	upala želuca i crijeva, parodontoza, ulcerozni kolitis, bakterijemija	STANLEY i sur. (1992.)
<i>Campylobacter hepaticus</i>	pilići	nepoznato	VAN i sur. (2016.)
<i>Campylobacter hominis</i>	čovjek	želučano-crijevne infekcije	LAWSON i sur. (2001.)
<i>Campylobacter hyoilei</i>	svinja	nepoznato	ALDERTON i sur. (1995.)
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	svinje, govedo, jeleni, ovce, psi, hrčci	želučano-crijevne infekcije, septikemija	GEBHART i sur. (1985.)
<i>Campylobacter iguaniorum</i>	gmazovi, kornjače	nepoznato	GILBERT i sur. (2015.)
<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	tuljan, morski lav	želučano-crijevne infekcije, septikemija	FORSTER i sur. (2004.)

<i>Campylobacter jejuni</i> <i>subsp. jejuni</i>	pilići, divlje ptice, goveda, ovce, svinje, psi, mačke, majmuni, tuljani, kune, insekti	upala želuca i crijeva, septikemija, Guillain-barréov sindrom, upala zglobova, artritis, kolecistitis, sindrom iritabilnog crijeva, celijakija, infekcija mokraćnog sustava, hemolitička uremija sindrom, meningitis	VERON i CHATELAIN (1973.)
<i>Campylobacter lanienae</i>	goveda, ovce, svinje	nepoznato	LOGAN i sur. (2000.)
<i>Campylobacter lari</i> <i>subsp. lari</i>	divlje ptice, pilići, goveda, ovce, konji, psi, tuljani, majmuni, školjke	upala želuca i crijeva, septikemija	DEBRUYNE i sur. (2009.)
<i>Campylobacter laridis</i>	galebovi	upala crijeva, bakterijemija	BENJAMIN i sur. (1983.)
<i>Campylobacter massiliensis</i>	čovjek	upala desni	ANTEZACK i sur. (2021.)
<i>Campylobacter mucosalis</i>	svinja, pas	upala želuca i crijeva	ROOP i sur. (1985.)
<i>Campylobacter mustelae</i>	tvor	nepoznato	FOX i sur. (1989.)
<i>Campylobacter nitrofigilis</i>	okoliš	nepoznato	MCCLUNG i sur. (1983.)
<i>Campylobacter novaezealandiae</i>	ptice, voda	nepoznato	BLOOMFIELD i sur. (2020.)
<i>Campylobacter ornithocola</i>	divlje ptice	nepoznato	CACERES i sur. (2017.)
<i>Campylobacter peloridis</i>	školjke	upala želuca i crijeva	DEBRUYNE i sur. (2009.)
<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	tuljan	nepoznato	GILBERT i sur. (2017.)
<i>Campylobacter portucalensis</i>	govedo	nepoznato	SILVA i sur. (2020.)
<i>Campylobacter pylori</i>	tvor	nepoznato	FOX i sur. (1988.)
<i>Campylobacter pyloridis</i>	nepoznat	upala želučane sluznice	MARSHALL i sur. (1984.)
<i>Campylobacter rectus</i>	čovjek, pas	upala želuca i crijeva, ulcerozni kolitis, parodontoza, apsces	VANDAMME i sur. (1991.)

<i>Campylobacter showae</i>	čovjek	upala desni, parodontozna, upala crijeva	ETOH i sur. (1993.)
<i>Campylobacter sputorum</i>	čovjek, govedo, ovca	nepoznato	ROOP i sur. (1986.)
<i>Campylobacter subantarcticus</i>	divlje ptice	nepoznato	DEBRUYNE i sur. (2010a.)
<i>Campylobacter taeniopygiae</i>	zeba	želučano-crijevne infekcije	BRYANT i sur., (2020.).
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	pas, mačka, govedo, ptice, glodavci	želučano-crijevne infekcije, septikemija, apscesi, pobačaji	SANDSTEDT i URSING (1991)
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	čovjek, govedo, perad, konj	želučano-crijevne infekcije, septikemija, apsces, pobačaj	VANDAMME i sur. (2010.)
<i>Campylobacter volucris</i>	crnoglavi galeb	nepoznato	DEBRUYNE i sur. (2010b.)
<i>Campylobacter vulpis</i>	lisica	nepoznato	PARISI i sur. (2021.)

Najvažnije su i najčešće proučavane vrste *C. jejuni* i *C. coli* (MAN, 2011.). Glavni su rezervoari vrste *C. jejuni* perad, goveda, ovce i divlje ptice (ALTEKRUSE i sur., 1999., NEWELL, 2002., STANLEY i JONES, 2003., DEVANE i sur., 2005., SILVA i sur., 2011.). U uzorcima izmeta ovaca, svinja i u vodi često se nalazi vrsta *C. coli*, a u pasa i mačaka najčešće se opisuju vrste *C. jejuni*, *C. upsaliensis* i *C. helveticus* (NESBAKKEN i sur., 2003., BROWN i sur., 2004., BOJANIĆ i sur., 2017.).

Vrste roda *Campylobacter* mogu se naći u potocima, rijekama i jezerima, a uzrok kontaminacije prirodnih izvora jesu ispuštanje sadržaja iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, zatim otjecanje voda s pašnjaka nakon kiše i izravna kontaminacija izmetom životinja. Važan čimbenik za preživljavanje bakterijskih vrsta roda *Campylobacter* jest stvaranje biofilma, što mikroorganizmu omogućuje preživljavanje u nepovoljnim okruženjima. Dokazano je da biofilmovi koji sadržavaju vrste roda *Campylobacter*, a koji se stvaraju u vodovodnim cijevima u nastambama brojlerskih pilića, nose rizik od ponovne pojave infekcije u novonaseljenim jatima pilića (TEH i sur., 2010.). Otjecanje voda iz zagađenih područja ima velik utjecaj na mikrobiološku kvalitetu obližnjih obalnih voda, povećavajući mogućnost za prisutnost patogenih mikroorganizama kao što je *Campylobacter*, kao i na izbijanje kampilobakterioze nakon konzumacije školjkaša uzgojenih u tako zagađenom okolišu (VAN DYKE i sur., 2010.).

Učestalost izdvajanja *Campylobacter* sp. iz izmeta goveda je od 0 do 80 % , a najčešće izdvojene vrste su *C. jejuni* i *C. coli* (GRAHAMM i SIMMONS, 2005., MOORE i sur., 2005., IDLAND i sur., 2022., SASAKI i sur., 2022.). Znatno je zastupljenija kampilobakterioza u intenzivnom uzgoju goveda (68 %) nego u goveda koja se nalaze na ispaši (7 %). Razlog je ovakve prevalencije velika gustoća životinja na malom prostoru, koje su u stalnom dodiru s vlastitim izmetom na ograničenom prostoru na kojemu može doći do onečišćenja hrane i vode (BEACH i sur., 2002., HORROCKS i sur., 2009.).

U svinja su najčešće dokazane vrste kampilobaktera iz izmeta *C. jejuni*, zatim *C. coli* i rijetko *C. lari*. OPORTO i suradnici (2007.) zabilježili su učestalost kampilobaktera u novorođene prasadi od 57,8 % , koja je do odbića porasla na 100 % . U nazimica je dokazana učestalost infekcije od 76 % , a dominirale su infekcije vrstom *C. jejuni* (76,3 %), *C. coli* (21 %) i *C. lari* (2,6 %). U gravidnih krmača najučestalija je kolonizacija vrstom *C. jejuni* (87 %) i *C. coli* (13 %). Na temelju ovog istraživanja vidljivo je da su svinje od rođenja kolonizirane kampilobakterima.

Na 15 farmi istraživana je prevalencija kampilobaktera u različitim razdobljima uzgoja. Kampilobakter nije dokazan u tek oprasene prasadi, a učestalost kampilobaktera za samo nekoliko dana povećala se na 32,8 % . Nakon odbića taj je udio iznosio 56,6 % . Prije transporta na klaonicu taj je postotak iznosio 79,1 % . Svi su izolati identificirani kao *C. coli*, a kampilobakteri su izdvojeni i iz okoliša farme. Ova studija pokazuje važnost svinja kao rezervoara vrste *C. coli* (ALTER i sur., 2005.).

Muhe kontaminiranim materijalom, koji nose na rilcima, nogama i dlakama na tijelu, mehaničkim putem kontaminiraju okoliš i tako sudjeluju u širenju kampilobaktera (NICHOLS, 2005.).

Mogući su izvori kampilobaktera i kontaminirano voće i povrće, koje se najčešće onečisti vodom za navodnjavanje, neodgovarajućim organskim gnojivima, a izvor onečišćenja mogu biti i divlje životinje. VERHOEFF-BAKKENES i suradnici (2011.) navode da je 0,23 % nepakiranog i 0,36 % pakiranog voća i povrća bilo pozitivno na *Campylobacter* sp. Smatra se da unatoč tako niskoj prevalenciji kontaminacije vrstama bakterija roda *Campylobacter*, znatna konzumacija ovih proizvoda povećava ukupni rizik od infekcije (VERHOEFF-BAKKENES i sur., 2011.).

2.3. Uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterija roda *Campylobacter*

Izdvajanje bakterija iz roda *Campylobacter* provodi se iz fekalnih ili crijevnih uzoraka koji sadržavaju velik broj bakterijskih vrsta, stoga je potrebno koristiti se selektivnim hranjivim podlogama. Za uzgoj kampilobaktera koriste se različite hranjive podloge koje su podijeljene u dvije skupine. Prvoj skupini pripadaju podloge s dodatkom krvi, primjerice Skirrowljev agar, Blaserov agar, Butzlerov agar, Campy-Cefex agar i Prestonov agar. Drugoj skupini pripadaju podloge bez krvi, a neke od njih su mCCDA (mCCDA, engl. *Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*), Karmali agar, CAT (Cefoperazone amphotericin teicoplanin) agar, te CF (CampyFood) agar (ASPINALL i sur., 1996., OYARZABAL i sur., 2005., CHON i sur., 2012., SELIWIORSTOW i sur., 2014.). Hranjiva podloga mCCDA najčešće služi za izdvajanje kampilobaktera iz izmeta pasa (HALD i MADSEN, 1997., PROCTER i sur., 2014., ACKE i sur., 2018.).

Bakterije roda *Campylobacter* najbolje rastu u mikroaerofilnim uvjetima s 3 – 15 % kisika uz koncentraciju ugljikova dioksida od 5 do 10 %. Gotovo sve vrste dobro rastu na temperaturi od 37 °C, a samo termotolerantne vrste, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis*, rastu na temperaturi između 41 i 43 °C. Vrijeme inkubacije traje od 48 sati do 96 sati (BYRNE i sur., 2001., LEVIN, 2007., VANDAMME i sur., 2010.).

Kampilobakteri su opisani kao zahtjevni zbog njihova ograničenog korištenja hranjivih tvari i sporijeg rasta u usporedbi s ostalim crijevnim bakterijama. Ne iskorištavaju ugljikohidrate, već se kao glavnim izvorom ugljika *in vivo* koriste aminokiselinama. Osjetljivi su na zamrzavanje, sušenje i kisele uvjete (pH ≤ 5,0) (ALTEKRUSE i sur., 1999., HOFREUTER, 2014.).

Morfološka svojstva kolonija kampilobaktera razlikuju se ovisno o tome na kojoj su hranjivoj podlozi uzgojene. Općenito, kolonije su sive boje, ravne ili blago uzdignute, s nepravilnim rubovima, te imaju tendenciju širenja po vlažnoj površini agara. Pouzdana identifikacija *Campylobacter* sp. moguća je ako je uz navedenu morfologiju pozitivan i biokemijski test na prisutnost oksidaze (QUINN i sur., 2003.).

Naziv *Campylobacter* potječe od grčkih riječi *kampulos* i *bakteria* što znači zakrivljeni štapić (KRELING i sur., 2020.). Bakterije roda *Campylobacter* su gram-negativni, tanki, spiralno zakrivljeni štapići, dugi 0,5 – 5,0 µm, promjera 0,2 – 0,8 µm. Gledano pod mikroskopom, navedeni zakrivljeni štapići često tvore oblik galebovih krila (QUINN, 2003.).

Na starijim kulturama, ili nakon izlaganja atmosferskom kisiku, mogu poprimiti kokoidni oblik. Bakterije roda *Campylobacter* pokretne su bakterije zbog jedne ili više flagela smještenih na jednom ili oba pola stanice. Spiralni flagelarni aparat omogućuje im brzu pokretljivost i naseljavanje sluznice želučano-crijevnog sustava (GUERRY, 2007.). Ako se mokri preparat, pripremljen iz bakterijske kulture, mikroskopira u tamnom polju, uočavaju se zavinuti štapići koji se karakteristično kreću poput spirale. Poznate su i vrste bez flagela kao što je *C. gracilis*, ali i vrste s više flagela, kao što je *C. showae* (ETOH i sur., 1993.).

2.4. Metode identifikacije vrsta bakterija roda *Campylobacter*

Prilikom identifikacije pojedinih vrsta bakterija roda *Campylobacter* primjenjuju se postupci određivanja uzgojnih i biokemijskih svojstava, zatim molekularne metode te metoda identifikacije, naziva matricom potpomognuta laserska ionizacija / desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*; MALDI-TOF MS).

2.4.1. Biokemijske metode identifikacije

Postupci određivanja uzgojnih i biokemijskih svojstava te antimikrobna osjetljivost prema nalidiksičnoj kiselini i cefalotinu prikazani su u tablici 2. (MARKEY i sur., 2013., HABRUN, 2014.). Također, od biokemijskih metoda mogu se upotrijebiti VITEK MS (SULAIMAN i sur., 2020.) te API Campy (HUYSMANS i sur., 1995.).

Tablica 2. Razlikovanje vrsta unutar roda *Campylobacter* na temelju uzgojnih i biokemijskih svojstava.

Vrsta	Rast pri		Katalaza	Hidroliza hipurata	Redukcija nitrata	Produkcija H ₂ S na TSI agaru	Rast u 1 %-tnom glicerinu	Rast u 3,5 %-tnom NaCl	Osjetljivost	
	25 °C	42 °C							Nalidiksična kiselina	Cefalotin
<i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	v	S
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	v	+	-	+	-	+	-	R	S
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	-	+	+	+	+	-	+	-	S	R
<i>C. coli</i>	-	+	+	-	+	v	+	-	S	R
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	-	+	-	V	-	S	S
<i>C. hyointestinalis</i>	v	+	+	-	+	+	+	-	R	v
<i>C. lari</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	v	R
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	-	-	v	+	-	-	v	-	v	R
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	R	S
<i>C. sputorum</i>	-	+	v	-	+	+	+	v	v	S
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	v

(+) – pozitivan rezultat; (-) – negativan rezultat; (v) – varijabilan rezultat; (S) – osjetljiv; (R) – rezistentan

2.4.2. Molekularne metode identifikacije i genotipizacije

Zbog veće pouzdanosti i brzine u identifikaciji vrsta bakterija roda *Campylobacter* povećana je upotreba molekularnih metoda.

Molekularne tehnike smatraju se nužnima u tipizaciji roda i identifikaciji pojedinih vrsta i neprocjenjive su u epidemiološkim istraživanjima u kojima je potrebna tipizacija soja i njihova usporedba (ON, 2001., KAAKOUSH i sur., 2015.). Molekularna tipizacija ključna je u poboljšanju epidemioloških istraživanja usmjerenih na praćenje izvora sporadičnih infekcija s *Campylobacter* sp. pružanjem informacija o genetskim podtipovima koji su važni u infekciji.

2.4.2.1. Lančana reakcija polimerazom i višestruka lančana reakcija polimerazom

PCR je metoda kojom se kratki dio DNK umnožava u veliki broj identičnih kopija, dok multipleks PCR umnaža dva ili više odsječaka DNK.

Dio DNK koji je predviđen za umnažanje određuje se pomoću početnica – kratkih oligonukleotidnih sljedova koji su komplementarni krajevima ciljane DNK. Reakcija se zbiva u uređaju koji podiže i snižava temperaturu u unaprijed programiranim koracima (GARIBYAN i AVASHIA, 2013.).

2.4.2.2. Analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata

Analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP) koristi se restrikcijskim endonukleazama koje cijepaju dijelove DNK (JARCHO, 2001.).

Važan je faktor virulencije u mnogih gram-negativnih bakterija, pa i kampilobaktera, CDT, koji dovodi do oštećenja DNK ciljane stanice, a sastoji se od triju podjedinica, CdtA, CdtB i CdtC, koje su kodirane genima *cdta*, *cdtb* i *cdtc* (YAMASAKI i sur., 2006.). ASAKURA i suradnici (2007.) dokazali su navedene gene u vrstama *C. jejuni*, *C. coli* i *C. fetus*, MATSUDA i sur., (2008.) u *C. lari*, FOUTS i sur. (2005.) u *C. upsaliensis*, HATANAKA i sur. (2017.) u *C. hyointestinalis*, a BOJANIĆ i suradnici (2020.) u *C. helveticus*. Budući da je *cdt* široko rasprostranjen među vrstama kampilobaktera, često se uzima za identifikaciju vrste. KAMEI i suradnici (2014.) istraživali su ovu metodu kako bi identificirali vrste unutar roda *Campylobacter*. Prije svega, umnožili su željene odsječke DNK što su u njihovu istraživanju bili geni koji kodiraju za CDT, a za endonukleaze (enzime) upotrijebili su *DdeI* i *EcoRI*. Navode da je metoda visokospecifična i osjetljiva za sve navedene vrste osim za *C. hyointestinalis*.

2.4.2.3. Gel-elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

Gel-elektroforeza s pulsirajućim poljem (PFGE) metoda je koja uključuje enzimsku restrikciju bakterijske DNK i odvajanje DNK odsječaka pomoću komore za elektroforezu s pulsirajućim poljem (NEOH i sur., 2019.). Postupak se temelji na analizi cjelokupne DNK pomoću restrikcijskog enzima. Nedostatak je ove metode dugo vrijeme izvođenja, vješto osoblje i posebna oprema.

2.4.2.4. Tipizacija određivanjem sljedova na više genskih lokusa

Genska tipizacija izolata metodom čiji su rezultati međusobno usporedivi preduvjet je epidemiološko-epizootioloških istraživanja. Godine 1998. iznesena je ideja o MLST-u kao metodi

genotipizacije bakterija. Metoda se temelji na standardiziranom prikupljanju sekvencija višestrukih lokusa koji kodiraju održavateljske (engl. *housekeeping*) gene (MAIDEN i sur., 1998.).

Tipizacija određivanjem sljedova na više genskih lokusa učinkovit je alat za razumijevanje evolucijske dinamike patogena i stjecanje uvida u njihovu genetsku raznolikost (NUNNEY i sur., 2012.). Temelji se na sekvenciranju više lokusa održavateljskih gena koji su potrebni za održavanje osnovnih staničnih funkcija. Oni se evolucijski sporije mijenjaju, tj. relativno su konstantni, te su stoga pogodan dio genoma za istraživanja. Prednosti MLST-a uključuju visoku diskriminaciju, ponovljivost, jednostavnost interpretacije primjenom jedne, a ne kombinacijom tehnika, te generiranje podataka koji su izravno usporedivi među laboratorijima.

C. jejuni i *C. coli* prirodno su kompetentni za unos strane DNK u stanicu, a ovo svojstvo, ponajprije zbog horizontalne genetske razmjene koju promiče, ima velik utjecaj na njihovu populacijsku strukturu i evoluciju. Zbog toga su *C. jejuni* i *C. coli*, ali i *C. upsaliensis* opisani kao genetski visoko raznolike bakterije (WANG i TAYLOR, 1990., HARRINGTON i sur., 1997.). U prilog tomu govori i činjenica da su u ovome trenutku raspoređeni u stotine sekvencijskih tipova. Analiza upućuje na vrlo visoke stope promjena u genomu, no s relativno malom prisutnošću točkastih mutacija (WILSON i sur., 2009.). Stoga *C. jejuni* i *C. coli* pokazuju djelomično klonsku strukturu populacije (MAYNARD SMITH i sur., 1993.).

Njihove se populacije prikazuju u skupinama srodnih klonskih tipova koje se nazivaju klonskim kompleksima (engl. *clonal complex*, CC). Klonski kompleksi obuhvaćaju skupinu od dva ili više sekvencijskih tipova (engl. *sequence type*, ST) koji dijele identične alelne profile za najmanje četiri lokusa. Klonski kompleks ime dobije nakon što se identificira ST kao predstavnik skupine. Ovisno o sekvenciji svakoga od sedam održavateljskih gena definiraju se alelni profili. Vrsta sekvencije određena je kombinacijom alela na svakom lokusu. Alelnom profilu za svaki lokus gena dodijeljen je jedinstveni broj. Broj se dodjeljuje redoslijedom alelnog otkrića. Svim izolatima s identičnom alelnom sekvencijom dodjeljuje se isti broj ST-a (DINGLE i sur., 2001.).

Alelna sekvencija uređuje se u informatičkim programima te se unosi u elektronički program Sveučilišta u Oxfordu BIGSdb (*Bacterial Isolate Genome Sequence Database*). Program se temelji na analizi mikrobnih genoma, gen po gen, kako bi se mogli identificirati geni i sustavno kategorizirati njihove interpretacije. Mrežna stranica koja prikuplja i razmjenjuje podatke o MLST sekvencijama jest pubMLST (<https://pubmlst.org/>). Stranica sadržava zbirku odabranih baza podataka otvorenog pristupa. Baze integriraju podatke o podrijetlu i fenotipu za više od 100 različitih mikrobnih vrsta i rodova.

U PubMLST *Campylobacter jejuni/coli* bazi (pristupljeno 30. 6. 2023.) evidentirano je 95 599 izolata *C. jejuni*, od toga 51 986 iz Europe, te 21 043 izolata *C. coli*, od kojih 10 054 iz Europe.

Izolati *C. jejuni* svrstani su unutar 45 CC-ova iz 54 različita izvora te nekoliko tisuća ST-ova, redom CC-ovi: 21, 45, 353, 48, 257, 206, 354, 61, 464, 42, 443, 52, 22, 607, 574, 403, 49, 460, 658, 283, 661, 508, 1034, 573, 692, 1275, 179, 677, 446, 177, 1287, 581, 682, 1332, 362, 952, 828, 702, 41, 433, 1264, 1304, 1347, 1150 i 1325. Izolati podrijetlom iz pasa (n= 287) javljaju se u 23 CC-a, a to su CC-ovi: 21, 45, 27, 206, 22, 658, 403, 353, 42, 508, 52, 257, 354, 607, 677, 283, 443, 179, 61, 1034, 464, 574, 952.

Izolati *C. coli* svrstani su unutar 26 CC-ova, i to CC-ovi: 828, 1150, 353, 45, 607, 21, 257, 354, 574, 206, 22, 464, 1034, 1332, 61, 702, 1275, 283, 42, 433, 446, 49, 52, 661, 692. Nema, do sada, upisanih izolata podrijetlom od pasa.

U tablicama 3. i 4. prikazani su izvori s najviše izolata uvrštenih u bazu MLST *C. jejuni* / *C. coli*.

U PubMLST bazi *Campylobacter non-jejuni/coli* nalazi se 219 izolata *C. upsaliensis*, 96 iz Europe, od toga 70 iz pasa, a 24 su iz izmeta ljudi. Svi su izolati iz baze smješteni unutar šest CC-ova: 42, 50, 64, 16, 45 i 35. Izolata iz pasa je 136, a nalaze se u tri CC-a: 64, 16 i 35.

Mnogi su autori MLST-om dokazali genetsku srodnost izolata izdvojenih iz različitih vrsta životinja s onima iz ljudi. KÄRENLAMPI i suradnici (2007.) u svom istraživanju utvrđuju da je najviše izolata pripadalo CC 45, te nalaze povezanost između izolata izdvojenih iz ljudi i njihovih pasa, a koji pripadaju tom CC-u. MOHAN i suradnici (2017.) iz pasa izdvajaju izolate koji pripadaju bakterijskoj vrsti *C. jejuni* te pripadaju u CC-ove 45, 50, 52 i 696, a u tim se kompleksima nalaze i izolati iz ljudi. BOJANIĆ i suradnici (2017.) navode da je u njihovom istraživanju najveći broj izolata iz pasa pripadao CC-u 45 i CC-u 474, a u tim se CC-ovima nalazi i najviše izolata iz ljudi, ali i iz peradi. Važno je napomenuti da se put prijenosa ne može dokazati, no može izazvati sumnju. Poznato je da su kućni ljubimci izvor kampilobaktera za čovjeka i obrnuto, no i jedni i drugi mogu imati isti izvor infekcije i biti zaraženi istodobno izolatima s istim genotipom (BOJANIĆ i sur., 2017.).

Tablica 3. Izvori izolata *C. jejuni* (mrežna baza MLST *C. jejuni* / *C. coli.*, pristupljeno 30. 6. 2023.).

Izvor izolata	Količina izolata	%
Ljudski izmet	28232	56,65
Kokoši	7565	15,18
Ljudski izolati (nespecificirani)	2484	4,98
Nepoznat	2459	4,93
Meso i iznutrice kokoši	2115	4,24
Goveda	1696	3,4
Divlje ptice	1406	2,82
Ovce	651	1,31
Okolišne vode	497	1
Životinje (nespecificirano)	451	0,9
Čvorci	312	0,63
Patke	249	0,5
Psi	247	0,5
Guske	220	0,44
Purani	213	0,43
Meso i iznutrice janjadi	208	0,42
Meso i iznutrice goveda	149	0,3
Hemokulture ljudi	92	0,18
Kravlje mlijeko	83	0,17
Svinja	76	0,15
Okoliš brojlera	68	0,14
Ukupno	49 473	99, 26

Tablica 4. Izvori izolata *C. coli* (mrežna baza MLST *C. jejuni* / *C. coli.*, pristupljeno 30. 6. 2023.).

Izvor izolata	Količina izolata	%
Ljudski izmet	2876	29,05
Kokoši	2657	26,84
Svinje	1232	12,44
Meso i iznutrice kokoši	742	7,49
Okolišne vode	552	5,58
Nepoznat	337	3,4
Ovce	292	2,95
Patke	232	2,34
Okoliš farme	179	1,81
Ljudi (nespecificirano)	151	1,53
Životinje (nespecificirano)	137	1,38

Goveda	130	1,31
Purani	66	0,67
Hemokulture ljudi	54	0,55
Divlje ptice	43	0,43
Meso i iznutrice svinje	36	0,36
Tlo	36	0,36
Meso i iznutrice purana	31	0,31
Okoliš brojlera	26	0,26
Meso i iznutrice goveda	25	0,25
Hrana (nespecificirano)	15	0,15
Meso i iznutrice janjadi	15	0,15
Psi	9	0,09
Ukupno	9 873	99,7

2.4.3. Matricom potpomognuta laserska ionizacija / desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona

Identifikacija na razini vrste može se učiniti MALDI-TOF MS-om koja je brz, pouzdan i visokoučinkovit dijagnostički alat za identifikaciju mikroorganizama (BESSÈDE i sur., 2011.). Tehnologija je jedinstvena u kliničkoj mikrobiologiji, omogućujući laboratorijima da identificiraju bakterijske i gljivične izolate u roku od nekoliko minuta. Brzo vrijeme obrade i minimalni trošak potrošenog materijala po uzorku u usporedbi s konvencionalnim metodama identifikacije rezultirali su sve većom primjenom MALDI-TOF MS-a u kliničkim laboratorijima diljem svijeta (BESSÈDE i sur., 2011., DINGLE i sur., 2013.).

2.5. Patogenost bakterija roda *Campylobacter*

Infekcija vrstom *C. jejuni* u ljudi opisana je ingestijom samo 800 mikroorganizama, no smatra se da je za infekciju vrstama iz roda *Campylobacter* obično potrebno 10 bakterija. Budući da je mikroorganizam osjetljiv na niski pH, u želucu može doći do smanjenja broja bakterija (BLACK i sur., 1988.).

Vrste roda *Campylobacter* posjeduju brojne čimbenike virulencije. Pokretljivost je čimbenik koji olakšava prolazak bakterija kroz želudac te omogućuje mikroorganizmu naseljavanje u crijevima (JAGANNATHAN i sur., 2001.). Gen *flaA*, osim za pokretljivost, odgovoran je za kolonizaciju, autoaglutinaciju i stvaranje biofilma (GUERRY, 2007.). Prianjanje bakterija na sluznicu omogućuje nekoliko različitih, površinski smještenih, proteinskih makromolekula – adhezina (JIN i sur., 2001.). Nadalje, važan čimbenik virulencije jesu i invazini, enzimi koji lokalno oštećuju tkivo i olakšavaju širenje uzročnika po tkivu (NEGRETTI i sur., 2021.). Kampilobakteri proizvode više vrsta toksina, a među najbolje istraženim egzotoksinima jest citoletni toksin (engl. *cythoethal-distending toxin*, CDT) (JUNG i sur., 1995., BANG i sur., 2001., ASAKURA i sur., 2007.). Ostali su čimbenici virulencije lipopolisaharidna kapsula, specifičan sustav uzimanja željeza, otpornost na žučne kiseline te brz odgovor na stres (BOLTON, 2015.).

Neki su od najviše istraženih gena *cadF* i *pldA*, odgovorni za adherenciju, *dnaJ* odgovoran za termotoleranciju te gen *csrA* kao čimbenik odgovora na stres (FIELDS i THOMPSON, 2008., PILLAY i sur., 2020.).

2.6. Antimikrobna osjetljivost bakterija roda *Campylobacter*

Zbog kontinuirane upotrebe antimikrobnih lijekova u stočarstvu i peradarstvu uočen je porast razine rezistencije kampilobaktera (SILVA i sur., 2011.). Takva je situacija javnozdravstveni problem, zbog čega je od globalne važnosti ispitivanje osjetljivosti i praćenje rezistencije (BURNHAM i sur., 2017.).

Rezistencija bakterija na antimikrobne tvari ne samo da povećava rizik od neuspjeha liječenja životinja i ljudi nego i predstavlja rizik za prenošenje gena rezistencije na druge bakterije (GONI i sur., 2017.). Ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove prije liječenja omogućuje odabir optimalnog antimikrobnog lijeka za svakog pojedinog pacijenta te praćenje rezistencije (BURNHAM i sur., 2017.).

U smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) sadržane su vrijednosti

za interpretaciju rezultata disk-difuzijskog testa. Osjetljivost kampilobaktera ispituje se na fluorokinolon ciprofloksacin, makrolide eritromicin ili azitromicin te tetraciklin ili doksiciklin koji pripadaju skupini tetraciklina (EUCAST, 2021.).

Fluorokinoloni su antibiotici širokog spektra djelovanja koji se često upotrebljavaju u empirijskom liječenju proljeva ljudi (TRIBBLE, 2017.). Oni djeluju baktericidno, inhibiraju aktivnost giraze deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i topoizomeraze IV koje sudjeluju u replikaciji, transkripciji, rekombinaciji i obnavljanju DNK (WIECZORIEK i OSEK, 2013.). Enzim DNK giraza sastoji se od podjedinica GyrA i GyrB. Rezistencija na fluorokinolone najčešće je posljedica točkaste mutacije gena *gyrA* koji kodira DNK girazu. Dio gena *gyrA* u kojem se pojavljuju mutacije naziva se determinirajućom *regijom* za rezistenciju na kinolone (engl. *quinolone-resistance determining region*, QRDR) (DIONISI i sur., 2004., GRIGGS i sur., 2009.). Osim toga, za rezistenciju na fluorokinolone odgovorna su još dva mehanizma, smanjena propusnost stanične stijenke i posjedovanje gena za sintezu efluksnih pumpi (CHARVALOS i sur., 1995., TAYLOR i TRACZ, 2005.). Visok stupanj rezistencije na fluorokinolone pojavljuje se ako su uz mutacije u genu *gyrA* prisutne i efluksne pumpe (IOVINE, 2013., WIECZOREK i OSEK, 2013.). Izolate kampilobaktera koji pripadaju klonskim kompleksima CC 21, CC 206, CC 353 i CC 354 povezuje se s rezistencijom na ciprofloksacin (KINANA i sur., 2006., HABIB i sur., 2009., KITTL i sur., 2011., KOVAČ i sur., 2015.).

Makrolidi su antibiotici prvog izbora u liječenju kampilobakterioze ljudi i životinja, a najčešće se prijavljuje eritromicin (WIECZORIEK i OSEK, 2013., MARKS i sur., 2011.). Makrolidi inhibiraju sintezu proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma. Rezistencija na makrolide pojavljuje se zbog točkastih mutacija na 23S podjedinici ribosoma. Mutacije se pojavljuju u regiji gena koji kodira peptidile. Navedene mutacije dovode do visokog stupnja rezistencije kampilobaktera na makrolide, osobito ako je uz njih prisutan i neki od gena koji kodira efluksne pumpe. Također, kao uzrok rezistencije navodi se i smanjena propusnost stanične stijenke (GIBREEL i sur., 2005., CAGLIERO i sur., 2006.). Smatra se da je upotreba makrolidnog antimikrobnog lijeka tilozina u prevenciji klostridioze u peradi dovela do izolata kampilobaktera rezistentnih na eritromicin (RYCHLIK, 2020.).

Mehanizam djelovanja tetraciklina jest inhibiranje sinteze proteina vezanjem na 30S podjedinicu ribosoma. U kampilobaktera je široko rasprostranjen plazmidni gen *tetO*. Gen kodira specifični protein koji štiti vezno mjesto za tetracikline. Uzrok rezistencije mogu biti i efluksne pumpe (CHOPRA i ROBERTS, 2001.). Velika prevalencija plazmida konjugiranih genom *tet(O)* povezuje se s rastućom neosjetljivošću kampilobaktera na tetracikline (WIECZORIEK

i OSEK, 2013.). Također, smatra se da i tetraciklinska otpornost pridonosi virulenciji i stupnju patogenosti sojeva *C. jejuni* (SAHIN i sur., 2012.).

Aminoglikozidi se upotrebljavaju u liječenju teških kliničkih oblika kampilobakterioze. Ova skupina lijekova sprječava sintezu proteina vežući se na 16S podjedinicu ribosoma (MINGEOT-LECLERCQ i sur., 1999.). Rezistencija kampilobaktera na aminoglikozide posljedica je inaktivacije antimikrobne tvari enzimima (VAKULENKO i MOBASHERY, 2003., RAMIREZ i TOLMASKY, 2010.). Rezistencija na aminoglikozide prvo je zamijećena kod *C. coli*, a posredovana je enzimom 3' aminoglikozid- fosfotransferazom (GIBREEL i sur., 2005.).

Premda EUCAST ne sadržava vrijednosti za interpretaciju rezultata dobivenih AST-om, beta-laktamski antibiotici mogu se primijeniti u liječenju kampilobakterioze ljudi i životinja (ZENG i sur., 2015.). Beta-laktamski antibiotici sprječavaju sintezu stanične stijenke. Najčešći mehanizam rezistencije na ove lijekove jest proizvodnja enzima beta-laktamaza. Navedeni enzimi dovode do hidrolize beta-laktamskog prstena te time inaktiviraju njegov antibiotski učinak. Također, uzrok rezistencije uz betalaktamaze mogu biti i efluksne pumpe te smanjen unos lijeka u stanicu putem transmembranskih proteina porina (LIN i sur., 2002., ALFREDSON i KOROLIK, 2005., IOVINE, 2013.).

Što se tiče izolata podrijetlom od pasa iz Europe, izneseni su različiti rezultati. SANDBERG i suradnici (2002.), iz Norveške, iznose rezultat o 4,5 % izolata *C. jejuni* i 90 % *C. upsaliensis* koji su bili rezistentni na streptomycin. ROSSI i suradnici (2008.), iz Italije pišu o 60 % izolata vrste *C. jejuni* te 8 % izolata vrste *C. upsaliensis* rezistentnih na ciprofloksacin i enrofloksacin te 12,5 % izolata vrste *C. jejuni* rezistentnih na tetraciklin. ACKE i suradnici (2009.) u istraživanju provedenom u Irskoj imali su 20 % izolata rezistentnih na ciprofloksacin, na tetraciklin 14 % , a na eritromicin 12 % izolata. Istraživanje iz Finske koje su proveli OLKKOLA i suradnici (2015.) na 24 izolata koja su pripadala vrsti *C. upsaliensis* bilježe tek jedan izolat koji je rezistentan na ciprofloksacin. AMAR i suradnici (2014.) iz Švicarske, MLST-om i tipiziranjem *fla* gena u 133 izolata vrste *C. jejuni*, imali su 21 % rezistentnih izolata, a od šest izolata vrste *C. coli*, 50 % rezistentnih izolata na kinolone. LEMOS i suradnici (2021.) iz Portugala, te i MURAWSKA i suradnici (2022.) iz Poljske, iznose da je oko 90 % izolata kampilobaktera u njihovu istraživanju rezistentno na ciprofloksacin.

U istraživanju iz Sjedinjenih Američkih Država koje su proveli 2004. godine LEE i suradnici 9 % izolata bilo je rezistentno na ciprofloksacin i 18 % na tetraciklin. TSAI i suradnici (2007.), s Tajvana, iznose da je 94 % izolata *C. jejuni* bilo rezistentno na azitromicin, 82 % na eritromicin, 79 % na tetraciklin, 33 % na gentamicin, a na ciprofloksacin 18%. Istraživanje iz

Indije bilježi najveći broj izolata rezistentnih na eritromicin (90 %), zatim na tetraciklin (88 %) i enrofloksacin (69 %) (KURNAR i sur., 2012.).

EFSA u izvješću za godine 2020. i 2021. iznosi podatke o rezistenciji kampilobaktera, izdvojenih iz domaćih životinja, na antimikrobne lijekove. Od važnih rezultata navode da je u izolata vrste *C. coli* na ciprofloksacin bilo rezistentno 80,4 % izolata izdvojenih iz tovnih purana, 79,7 % iz teladi, 61,9 % iz brojlera i 51,7 % iz tovnih svinja. Što se tiče vrste *C. jejuni*, na isti antibiotik bilo je rezistentno 77,9 % izolata izdvojenih iz tovnih purana te 72,8 % izolata izdvojenih iz brojlera. Rezistencija na eritromicin pojavila se u 35,7 % izolata *C. coli* izdvojenih iz teladi, 21,5 % iz tovnih pura, 12,3 % iz tovnih svinja i 4,4 % iz brojlera. Rezistencija na tetraciklin zabilježena je u 68,8 % izolata *C. jejuni* i 90,5 % izolata *C. coli* izoliranih iz teladi, dok je u tovnih svinja izolirano 43,3 % izolata *C. jejuni*, a u brojlera 67,3 % izolata *C. coli*. Rezistencija izolata kampilobaktera na gentamicin u 2020. godini iznosila je 0,0 – 0,02 %, dok je u 2021. godini zabilježen porast i dobiveni su rezultati da je 0,5 % izolata bakterijske vrste *C. jejuni* te 12,4 % izolata *C. coli* izdvojenih iz teladi rezistentno na eritromicin. Isto je zamijećeno u izolata izdvojenih iz svinja gdje je rezistencija na eritromicin utvrđena u 1,7 % izolata *C. jejuni* i u 2,6 % izolata *C. coli* (EFSA, 2023.).

STOCKDALE i suradnici (2015.) iz Ujedinjenog Kraljevstva iznose rezultate da je u njihovom istraživanju na fluorokinolone bilo rezistentno 29 %, a na makrolide 2 % izolata izdvojenih iz ljudi, dok su OLKKOLA i suradnici (2016.), iz Finske, dokazali 8 % izolata vrste *C. jejuni* rezistentnih na ciprofloksacin te na tetraciklin 2 % izolata, izdvojenih iz ljudi. U 2021. godini u zemljama EU-a rezistencija izolata vrste *C. jejuni* podrijetlom od ljudi iznosila je prosječno 64,5 % na ciprofloksacin, 45,3 % na tetraciklin, 6,6 % na amoksisilin s klavulanskom kiselinom i 0,7 % na gentamicin. Izolati vrste *C. coli* najviše su pokazali otpornost na ciprofloksacin i tetraciklin, a 70 % izolata bilo je rezistentno na ove antibiotike. Također, 9,2 % izolata bilo je otporno na amoksisilin s klavulanskom kiselinom, a na gentamicin 2,4 % (EFSA, 2023.). Prema izlaganju Akademije medicinskih znanosti Hrvatske u 2020. godini zabilježeno je 71 % rezistentnih izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin i 1 % na eritromicin (TAMBRIĆ – ANDRAŠEVIĆ i LUCIĆ, 2021). U istraživanju na humanim izolatima *C. jejuni* iz Hrvatske koje su proveli ŠOPREK i suradnici (2022.) zabilježena je rezistencija na ciprofloksacin od 77,5 % te na tetraciklin 14%.

Istraživanja o antimikrobnoj rezistenciji izolata kampilobaktera, podrijetlom od ljudi iz zemalja diljem svijeta, bilježi iduće rezultate: ciprofloksacin 41 – 100 %, tetraciklin 24 – 92 %, gentamicin 0 – 18 %, amoksisilin s klavulanskom kiselinom 0 – 36 % i eritromicin 4 – 29 %

(LIAO i sur., 2012., LENGHERH i sur., 2013., ABAY i sur., 2014., GAUDREAU i sur., 2014., RILEY i sur., 2015., THOMPSON i sur., 2015., LAPIERRE i sur., 2016., ZHOU i sur., 2016., SCHIAFFINO i sur., 2019.).

2.7. Kampilobakterioza pasa

Različite vrste roda *Campylobacter* izdvojene iz pasa, ali i mačaka, od velike su javnozdravstvene važnosti te su upravo psi i mačke potencijalni rezervoar za pojavu kampilobakterioze u ljudi (THEPAULT i sur., 2020.).

2.7.1. Epizootiologija kampilobakterioze pasa

Izvori *Campylobacter* sp. za kućne ljubimce mogu biti nedovoljno termički obrađena ili sirova hrana i kontaminirana voda, a infekcija se širi fekalno-oralnim putem (ACKE, 2018.). Najčešće su izdvojene vrste iz pasa i mačaka *C. jejuni*, *C. upsaliensis* i *C. helveticus* (MARKS i sur., 2011., QUEEN i sur., 2012., BOJANIĆ i sur., 2017., FACCIOLLA i sur., 2017.).

Unatoč tome što se u pasa uglavnom smatraju komenzalnim organizmima, s prevalencijom oko 50 % u životinja sa supkliničkom infekcijom, oni su također opisani kao patogeni, osobito u mlađih pasa (IANNINO i sur. 2019.). Učestalost infekcije veća je u mlađih pasa u odnosu na odrasle (ACKE, 2018.).

Osim dobi životinje, prevalencija *Campylobacter* sp. u pasa može znatno varirati ovisno i o drugim različitim čimbenicima, poput vrste kampilobaktera, smještaja, prisutnosti druge bolesti ili infekcije uzrokovane drugim enteropatogenim mikroorganizmima, godišnjem dobu, zemljopisnoj regiji i vrsti dijagnostičkih metoda u istraživanju (ACKE, 2018.). SELWET i suradnici (2015.) navode kako je u uzgajivačnicama koje su bile uključene u njihovo istraživanje najveća prevalencija bakterije *Campylobacter* sp. u proljeće te iznosi 81 % , a zatim zimi 64 %. CARBONERO i suradnici (2012.) spominju da je najviša prevalencija *Campylobacter* sp. u vlasničkih pasa zimi od 41 % i u proljeće 38 % . Prevalencija vrste *C. jejuni* u pasa u proljeće iznosila je 27 % te u ljeto 16 % , a vrste *C. upsaliensis* ljeti u 33 % , a u jesen u 24 % pasa. HALD i suradnici (2004.) ne nalaze sezonsku povezanost između veće prevalencije *Campylobacter* sp. i godišnjeg doba. Psi koji borave u zatvorenom prostoru imaju manje izgleda da obole od kampilobakterioze u odnosu na pse koji su stalno na otvorenom prostoru (WESTGARTH i sur., 2009.). Prevalencija uvelike ovise o vrsti dijagnostičke metode u istraživanju. PCR je osjetli-

viji u usporedbi s direktnim naciepljivanjem izmeta na hranjive podloge, pa će tako dati više pozitivnih rezultata (PLATTS-MILLS i sur., 2014.).

U posljednje je vrijeme učestalije hranjenje pasa hranom na bazi sirova mesa, tzv. BARF (engl. *biologically appropriate raw food; bones and raw food*). Konzumacija BARF-a može povećati izloženost crijevnim patogenima poput kampilobaktera, salmonele i jersinije. U 55 % uzoraka izmeta pasa hranjenih sirovim mesom i u 33 % uzoraka izmeta pasa hranjenih suhom komercijalnom hranom izoliran je *Campylobacter* spp. Iako je *Campylobacter* sp. češće prisutan u pasa hranjenih sirovim mesom nego u onih hranjenih suhom komercijalnom hranom, ova razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,158$) (FREDRIKSON-AHOMAA i sur., 2017.). BOJANIĆ i suradnici (2017.) u svojem su istraživanju komercijalne hrane na bazi sirova mesa dostupnom za mačke i pse dokazali *Campylobacter* spp. u 28 % prikupljenih uzoraka, a najučestalija vrsta bila je *C. jejuni*. Isto tako, navode da je vjerojatnost kontaminacije mesa peradi bakterijom *Campylobacter* sp. 7,6 puta veća ($p = 0,006$) odnosno, 14 puta veća ($p = 0,001$) kod vrste *C. jejuni* nego u mesu koje nije podrijetlom od peradi. Nadalje, prema njihovu istraživanju psi koji nisu hranjeni suhom komercijalnom hranom (već sirovim mesom i ostacima sa stola vlasnika) imaju 12,3 puta veću vjerojatnost da će biti nositelji bakterije *C. upsaliensis* u usporedbi sa psima koji jedu suhu hranu ($p = 0,03$). RUNESVÄRD i suradnici (2020.) potvrdili su prisutnost kampilobaktera u 48 % uzoraka izmeta zdravih pasa hranjenih BARF-om. U pasa koji su hranjeni suhom hranom kampilobakter je izdvojen u 16 % uzoraka izmeta. Ova je razlika statistički značajna ($p = 0,03$). Jedan od izolata identificiran je kao *C. jejuni*, izdvojen iz uzorka izmeta. Ostali izolati identificirani su kao *C. upsaliensis* ili *C. helveticus*.

2.7.2. Klinički znakovi i dijagnostika kampilobakterioze pasa

Infekcije uzrokovane različitim vrstama kampilobaktera u pasa obično su supkliničkog tijeka (ACKE, 2018.). Bakterije roda *Campylobacter* mogu biti primarni, no često su sekundarni uzročnici bolesti (MARKS i KATHER, 2003.).

Klinički su znakovi kampilobakterioze nespecifični i ovise o težini i proširenosti infekcije. Vrijeme inkubacije najčešće je vrlo kratko, a istraživanjima je dokazano da se znakovi pojavljuju unutar tri dana od ingestije. Kampilobakterioza se obično očituje blagim, vodenastim proljevom, koji može biti i krvav, a životinje su letargične, dehidrirane i anoreksične. Rjeđe su zabilježeni znakovi poput povraćanja, vrućice i bolova u truhu (MARKS i sur., 2011.). U pasa su opisani kolangiohepatitis, kolecistitis i bakterijemija, a zahvaćenost jetre može rezultirati žuticom i drugim kliničkim znakovima bolesti jetre (SYKES i MARKS, 2013.). Također, za-

bilježeni su pobačaji u kuja uzrokovani vrstom *C. jejuni* (ODENDAAL i sur., 1994.). SAHIN i suradnici (2014.) opisali su slučajeve perinatalne smrti, a iz placente kuje te pluća i jetre fetusa izdvojena je vrsta *C. jejuni*. Ovi nalazi perinatalne smrti i bakterijemije uzrokovane kampilobakterom u pasa pokazuju kako bi prilikom pobačaja i u prerano rođene mladunčadi trebala biti učinjena i bakteriološka pretraga na *Campylobacter* sp. (BULGIN i sur., 1984.). Akutni poliradikuloneuritis imunosno je posredovan periferni živčani poremećaj u pasa koji ima mnogo sličnosti s Guillain-Barréovim sindromom u ljudi, a smatra se da je *Campylobacter* sp. glavni pokretač ovog poremećaja (MARTINEZ-ANTON i sur., 2018.).

Kampilobakterioza se može pojaviti i kao sekundarna bakterijska infekcija u pasa oboljelih od parvoviroze (WORKMAN i sur., 2005.). Uz to, kampilobakteri su izdvajani istodobno s drugim uzročnicima proljeva kao što su koronavirus, cirkovirus, *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Isospora* sp. te različite vrste bakterije *Clostridium* sp. (HASCALL i sur., 2016.).

Kod kliničke slike gdje prevladava proljev važno je razmotriti i isključiti mogućnost infekcija uzrokovanih drugim enteropatogenim mikroorganizmima, koje također mogu prouzročiti slične znakove. Iako klinička slika može izazvati sumnju na kampilobakteriozu, za točnu je dijagnozu potrebna bakteriološka pretraga izmeta. Kada se izdvoji kampilobakter, ključno je utvrditi vrstu. Važno je uzeti u obzir da se brojne vrste kampilobaktera, zajedno s drugim crijevnim patogenima, mogu izdvojiti i u zdravih pasa. Stoga pronalazak samo ovih mikroorganizama ne podrazumijeva i dokaz bolesti (MARKS i KATHER, 2003., ACKE, 2018.).

2.7.3. Liječenje kampilobakterioze pasa

Infekcija pasa može biti supklinička ili se očitovati blagim do umjerenim enteritisom u kojim se slučajevima primjenjuje samo potporna terapija. U životinja s oslabljenom imunošću, febrilnih životinja ili u životinja s hemoragičnim proljevom može biti indicirano antimikrobno liječenje (MARKS i sur., 2011.). Različite vrste roda *Campylobacter* izdvojene iz pasa pokazale su rezistenciju na često propisivane antimikrobne lijekove pa upotreba takvih lijekova može nepotrebno poremetiti crijevnu mikrobiotu. Upotrebu antimikrobnih lijekova stoga treba primijeniti samo kada je to opravdano i, ako je moguće, ne prije uspostavljanja etiološke dijagnoze (MARKS i sur., 2011., ALLENSPACH, 2013., CHO i sur., 2014.).

Za liječenje kampilobakterioze najčešće se primjenjuju makrolidi ili fluorokinoloni, iako bi fluorokinolone trebalo izbjegavati u mladim životinja zbog njihovih mogućih štetnih učinaka na hrskavicu u razvoju. Prvi je izbor u liječenju kampilobakterioze pasa eritromicin (10 – 15 mg/

kg oralno svakih 8 sati u pasa i 10 mg/kg oralno svakih 8 sati u mačaka) ili azitromicin (5 – 10 mg/kg oralno svaka 24 sata u pasa i mačaka) (MARKS i sur., 2011., WEESE, 2011.).

Psi s bakterijemijom, kolangiohepatitisom ili kolecistitisom koji je uzrokovan vrstom *C. jejuni* uspješno se liječe cefoksitinom, eritomicinom ili enrofloksacinom ako je uzročnik osjetljiv (SYKES i MARKS, 2013.).

Prognoza kampilobakterioze u pasa je povoljna kada se liječi prema smjernicama te ako nema komorbiditeta. Ako je liječenje neuspješno, uzrok tome može biti ponovna infekcija, mogućnost netočno postavljene dijagnoze i/ili rezistencije uzročnika na upotrijebljeni antimikrobni lijek (MARKS i sur., 2011., ACKE, 2018.).

2.8. Kampilobakterioza ljudi

Kampilobakterioza ljudi jedna je od najraširenijih zaraznih gastrointestinalnih bolesti današnjice. Incidencija i prevalencija kampilobakterioze porasla je na globalnoj razini u posljednjih deset godina. Porast broja oboljelih u Sjevernoj Americi, Europi i Australiji je alarmantan, a podaci iz Afrike, Azije i Bliskog istoka ukazuju da je ova infekcija na tim prostorima endemijska, posebice u djece (KAAKOUSH i sur., 2015.). U Republici Hrvatskoj zabilježeno je 1082 slučaja u 2020. godini te 1159 slučajeva kampilobakterioze ljudi u 2021. godini, čime se bilježi pad broja slučajeva naspram prijašnjih godina (HZJZ, 2023.).

Perad je glavni rezervoar i izvor kampilobaktera za ljude (KAAKOUSH i sur., 2015., DE VRIES i sur., 2018.). Kampilobakterioza ljudi u većini slučajeva uzrokovana je vrstama *C. jejuni* i *C. coli* (EFSA, 2021.), iako neki autori navode da je vrsta *C. upsaliensis*, kojoj su glavni izvor psi, zabilježena kao drugi najčešći uzročnik kampilobakterioze ljudi (LINDBLUM i sur., 1995., LABARCA i sur., 2002., LASTOVICA, 2006.). Uz njih, identificirano je još 14 vrsta koje mogu uzrokovati infekcije u humanoj populaciji (MAN, 2011.). Kampilobakterioza se najčešće pojavljuje u djece mlađe od četiri godine i u starijih od 75 godina (LEVESQUE i sur., 2013.). Čimbenici rizika su konzumacija kontaminiranih životinjskih proizvoda i vode, kontakt sa životinjama te međunarodna putovanja (THEPAULT, 2020.). Bolest je teža u imunokompromitiranih osoba (BOURKE i sur., 1998., SNELLING i sur., 2005., KAAKOUSH i sur., 2015.).

Kampilobakterioza je skupni naziv za infekciju uzrokovanu patogenim vrstama roda *Campylobacter*, a klinički je obilježava vrućica, povraćanje, vodenasti ili krvavi proljev (SCALLAN

i sur., 2015.). Bolovi u trbuhu i proljev prisutni su u više od 80 % bolesnika, dok se vrućica, mijalgija i glavobolja pojavljuju u oko polovice bolesnika. U 10 – 15 % oboljelih pojavljuju se povraćanje i krv u izmetu. Početak može biti nagao, s proljevom koji je obično obilan i vodenast, ili mu može prethoditi prodromalna faza simptoma sličnih gripi. Stanje se najčešće stabilizira unutar četiri do sedam dana, no opisani su i slučajevi gdje proljev može trajati do 14 dana (DE VRIES i sur., 2008., GAZAIGNE i sur., 2008.). Većina se slučajeva kampilobakterioze ljudi pojavljuje kao izolirana želučano-crijevnna infekcija (WHO, 2023.). Uz to što su kampilobakteri najčešći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa ljudi u svijetu, glavni su uzrok putničkog proljeva (BULLMAN i sur., 2011.).

Osim želučano-crijevnih oblika infekcija kampilobakterima opisane su i rijetke infekcije poput septičkog tromboflebitisa, endokarditisa, neonatalne sepse, apscesa na mozgu, meningitisa i upale pluća (ALNIMR, 2014., LAGLER i sur., 2016., MAN, 2011.). Brojne druge bolesti povezane su s kampilobakterom, teška demijelinizacijska neuropatija, Guillain-Barreov sindrom, Miller-Fisherov sindrom, a povezuje ih se i s nezaraznim želučano-crijevnim bolestima poput kolorektalnog karcinoma i Barrettova jednjaka (MAN, 2011., SCALLAN i sur., 2015., SKARP i sur., 2016.).

Kampilobakterioza u ljudi često je blaga i, u većini slučajeva, nadoknada tekućine i elektrolita glavne su potporne mjere za liječenje ove infekcije (GUARINO sur., 2014.). U pacijenata s intenzivnim proljevom, visokom temperaturom ili u pacijenata s drugim teškim bolestima poput oslabljenog imunskog sustava, upotrebljavaju se antimikrobni lijekovi. Liječenje ciljanim lijekovima najučinkovitije je ako se započne unutar tri dana od početka bolesti.

Antibiotici iz skupine makrolida prvi su izbor u liječenju kampilobakterioze ljudi (WIECZORIEK i OSEK, 2013., DAI i sur., 2020.). Jedan je od razloga velik broj izolata rezistentnih na ciprofloksacin. Glavni uzrok rezistencije na ciprofloksacin jest česta primjena fluorokinolona za empirijsko liječenje želučano-crijevnih infekcija te zbog česte upotrebe ovih lijekova u peradarskoj industriji (GRAHAM i sur., 2007., LUANGTONGKUM i sur., 2009.).

Rezistencija kampilobaktera na antimikrobne tvari sve je veći problem i može ograničiti mogućnosti liječenja (DE VRIES i sur., 2018.).

Neki od načina prevencije kampilobakterioze jesu poduzimanje mjera na farmama i u klaonicama, edukacija potrošača i obuka o kućnoj higijeni kako bi se spriječio prijenos kampilobaktera iz sirove hrane, te daljnja istraživanja koja uključuju razumijevanje mehanizama virulencije, razvoj cjepiva i brzih testova za rano otkrivanje i kvantifikaciju kampilobaktera u životinjama i prehrambenim proizvodima (HANSSON i sur., 2018.).

2.9. Kampilobakteri kao javnozdravstveni problem

Od 2005. godine kampilobakterioza je najčešće prijavljivana zoonoza u Europi, a uglavnom je uzrokovana vrstama *C. jejuni* i *C. coli* (EFSA, 2021.). Kako se bakterija uglavnom prenosi hranom, bolest je često povezana s rukovanjem i konzumacijom kontaminiranog mesa. Budući da je oko 80 % infekcija kampilobakterima u ljudi povezano s peradi, epidemiološke studije i preventivni programi uglavnom su usmjereni na brojlere (MULLNER i sur., 2009.).

Jela od piletine ili rukovanje pilećim sirovim mesom glavni su čimbenik rizika za infekciju ljudi kampilobakterima (MUGHINI GRAS i sur., 2012.). S obzirom na to da je konzumiranje kontaminiranog mesa peradi u 50 – 70 % slučajeva izvor kampilobakterioze u ljudi, potrebno je primjenjivati mjere prevencije (NEWELL i FEARNLEY, 2003., FACCIOLA i sur., 2017.). Trupovi peradi mogu se kontaminirati prilikom klanja, i to za vrijeme evisceracije, pri čemu može doći do izlivanja sadržaja crijeva, te prilikom završnog pranja mesa (HAYAMA i sur., 2011.). Jedna je od mjera koja dovodi do smanjenja kontaminacije trupova uskraćivanje hrane 12 sati prije klanja (HANSSON i sur., 2018.).

U SAD-u je broj epidemija povezanih s nepasteriziranim mlijekom znatno porastao posljednjih godina. Procjenjuje se da 3 % stanovništva SAD-a pije sirovo mlijeko zbog zdravstvenih prednosti i kvalitete te ga preferira u odnosu na pasterizirano mlijeko (MUNGAI i sur., 2016.). Sirovo mlijeko i nepasterizirani mliječni proizvodi trenutačno se prodaju u mnogim zemljama. Takve proizvode izravno se kupuje od poljoprivrednika ili na automatima. Sirovo mlijeko može biti kontaminirano kampilobakterima na razne načine: loše očišćeni strojevi, mastitis te fekalna kontaminacija mlijeka iz poznatog rezervoara pogoduju onečišćenju sirova mlijeka. Postoje dokumentirani slučajevi kontaminacije sirova mlijeka kampilobakterima, dokazane su i prijavljene infekcije ljudi uzrokovane kampilobakterima, a rezervoar infekcije bilo je sirovo mlijeko (MUNGAI i sur., 2016., BERTASI i sur., 2016., MAREK i sur., 2017., WYSOK i sur., 2011.).

Unatoč tome, u obzir treba uzeti i druge izvore zaraze, poput divljih životinja, okoliša, vode te kućnih ljubimca (EFSA, 2021.a).

Provedba višestrukih biosigurnosnih mjera za sprječavanje širenja kampilobakterioze od velike je važnosti za javno zdravstvo (KAAKOUSH i sur., 2015., DE VRIES i sur., 2018.). Smanjenje prevalencije kampilobakterioze moguće je poboljšanjem sanitarnih uvjeta, od kanalizacije do opskrbe čistom vodom, podizanjem svijesti javnosti o važnosti ove bolesti te pravilnom termičkom obradom hrane.

Kućni ljubimci svojim su vlasnicima izvor radosti i sreće, a njihova privrženost može znatno poboljšati opću kvalitetu svakodnevice (KRIZMANIĆ, 2016.). Osim što životinje imaju ulogu

kućnih ljubimaca, one mogu biti uključene i u praksu pomagačkih djelatnosti. Intervencije potpomognute životinjama odnose se na aktivnosti u kojima je životinja uključena s pomagačkom ili terapijskom namjenom (LAKATOŠ i VEJMEJKA, 2018.). S druge strane, mnoge vrste *Campylobacter* sp. mogu se prenijeti s pasa na ljude. Epidemiološke analize utvrdile su vezu između crijevne bolesti uzrokovane vrstom *C. jejuni* u ljudi i prisutnosti psa u istom kućanstvu, osobito pasa mlađih od šest mjeseci (WOLFS i sur., 2001., STAFFORD i sur., 2007., ACKE, 2018.). Izravan kontakt sa štenadi s proljevom može dovesti do infekcije ljudi vrstama *C. jejuni* i *C. coli*, osobito u djece i dojenčadi s mogućnošću pojave kliničkih znakova bolesti (CARRIQUEMAS i sur., 2005., DAVIS i sur., 2013.). MUGHINI-GRAS i suradnici (2013.) dokazali su isti ST u dvoje vlasnika i u njihovih kućnih ljubimaca te tako potvrdili da postoji povećan rizik od infekcije ljudi kampilobakterima u vlasnika štenadi. Israživanja u Europi navode da je 9 – 25 % slučajeva u ljudi povezano s kućnim ljubimcima kao rezervoarima (MUGHINI-GRAS i sur., 2013., ROSNER i sur., 2017., THEPAULT i sur., 2018., IANNINO i sur., 2019.).

Opisan je slučaj neonatalne sepse uzrokovane vrstom *C. jejuni* u dojenčeta starog tri tjedna. Izvor infekcije bilo je nedavno nabavljeno štene, što je potvrđeno genotipizacijom izolata *C. jejuni* izdvojenih iz šteneta i dojenčeta (WOLFS i sur., 2001.). Svijest o mogućnosti prijenosa *Campylobacter* sp. s pasa na ljude važna je karika u sprječavanju kampilobakterioze ljudi, posebice prijemljivijih skupina, dojenčadi, male djece i ljudi s oslabljenim imunskim sustavom (PENA i sur., 2016., CAMPAGNOLO i sur., 2018.).

C. upsaliensis često je izdvajan iz pasa i mačka, a rjeđe iz drugih izvora. No LASTOVICA (2006.) iznosi podatak iz svog istraživanja gdje je u razdoblju od 1990. do 2005. godine *C. upsaliensis* izdvajan češće nego *C. coli* u djece s gastroenteritisom iz Republike Južne Afrike. Također, u djece s proljevom isti su rezultat imali LINDBLOM i suradnici (1995.) u istraživanju provedenom u Švedskoj.

Kampilobakteri rezistentni na antimikrobne lijekove velik su problem u javnom zdravstvu, povećavaju troškove zdravstvene skrbi, produljuju trajanje infekcije, što dovodi do većeg rizika te stope smrtnosti, osobito u osoba s različitim komorbiditetima (FOUNOU i sur., 2017., IGWARAN i OKOH, 2019., SILVA i sur., 2011.). Isti se antimikrobni lijekovi upotrebljavaju za liječenje kampilobakterioze ljudi i životinja, stoga je zabrinutost vezana uz rezistenciju kampilobaktera na makrolide, kinolone i aminoglikozide opravdana (IANNINO i sur., 2019.).

Zbog porasta broja rezistentnih vrsta, razvoj cjepiva je nužan, a cijepljenje ptica moglo bi pomoći u iskorjenjivanju vrsta bakterija roda *Campylobacter* iz ptica te time smanjiti stopu incidencije i u ljudi (AVCI, 2016.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Bakterije roda *Campylobacter* najčešći su uzročnici bakterijskih gastroenteritisa u ljudi. Velika pojavnost i rasprostranjenost kampilobakterioze čine je znatnim javnozdravstvenim i društveno-ekonomskim problemom. Najvažniji način infekcije ljudi jest konzumacija nedovoljno termički obrađenih namirnica životinjskog podrijetla, no procjenjuje se da je nezanemarljiv broj slučajeva kampilobakterioze u ljudi posljedica kontakta s kućnim ljubimcima. Klinički se kampilobakterioza u životinja u najvećem broju očituje gastroenteritisom. Infekcija može biti supklinička, a pojedine su vrste kampilobaktera dio mikrobioma crijeva životinja. Iako je u nekoliko navrata dokazan prijenos kampilobaktera s pasa na ljude, kućni su ljubimci kao izvor infekcije još uvijek prilično neistraženi. Broj pasa kućnih ljubimaca u porastu je u cijelom svijetu, a njihov kontakt s članovima kućanstava sve je bliži i intenzivniji. Zbog toga je i sve veća mogućnost prijenosa različitih zoonotskih patogena između pasa i ljudi. Usprkos tome, zoonoze koje se prenose s kućnih ljubimaca (engl. *pet-associated zoonoses*) znatno su manje istražene nego one koje se sa životinja na ljude prenose hranom (engl. *food-borne zoonoses*). *Campylobacter* spp. širi se fekalno-oralnim putem, a mogu ga izlučivati zdravi psi i psi s proljevom.

Da bismo odredili učestalost izlučivanja kampilobaktera u pasa, u ovom će se istraživanju provesti pretraživanje izmeta na prisutnost bakterija roda *Campylobacter*. Psi će biti podijeljeni u skupine: skupina pasa starosti do godine dana i starije od godine dana; skupina pasa bez proljeva i oni sa simptomom proljeva; vlasnički psi i psi iz azila; s obzirom na to jesu li hranjeni sirovim mesom ili termički obrađenom hranom; s obzirom na to boluju li ili ne boluju od parvoviroze.

Izdvojenim izolatima odredit će se vrsta te će se ispitati antimikrobna osjetljivost disk-difuzijskom metodom prema Kirby-Baueru na četiri antimikrobne tvari: ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin i azitromicin. Također, odabrani izolati bit će analizirani metodom MLST i provest će se filogenetska analiza. Genotipizacijom izolata po prvi će se put dobiti uvid u prisutnost pojedinih sekvencijskih tipova kampilobaktera u pasa u Republici Hrvatskoj.

Istraživanje će razjasniti ulogu različitih kategorija pasa kao izvora infekcije bakterijama roda *Campylobacter* za ljude. Dobiveni rezultati prid onijet će poznavanju epidemiologije i epizootologije kampilobakterioze u Republici Hrvatskoj.

Hipoteza znanstvenog rada

Pretpostavlja se da psi u velikom broju slučajeva mogu biti izvor infekcije bakterijama roda *Campylobacter* za ljude. Očekuje se visoka stopa otpornosti izdvojenih izolata na antimikrobne tvari iz skupine fluorokinolona. Nadalje, pretpostavlja se da će analiza sekvencijskih tipova pokazati srodnost izolata iz pasa s izolatima iz drugih izvora ovog geografskog područja.

Ciljevi istraživanja su:

1. utvrditi učestalost izdvajanja bakterija roda *Campylobacter* u različitim skupina pasa
2. identificirati vrstu izdvojenih bakterija molekularnom metodom (RFLP) i istražiti učestalost izdvajanja pojedine vrste *Campylobacter* sp. unutar istraživanih skupina pasa
3. odrediti osjetljivost izdvojenih bakterija roda *Campylobacter* na odabrane antimikrobne tvari
4. odabrane izolate analizirati MLST metodom i odrediti sekvencijski tip (ST) izolata te usporedbom dobivenih sekvencija s bazom podataka (PubMLST) procijeniti podrijetlo izolata i srodnost s izolatima iz drugih izvora ovog geografskog područja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci

U ovom istraživanju pretraženi su uzorci izmeta pasa na prisutnost bakterija roda *Campylobacter* prikupljeni u bakteriološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta. Uzorci su potjecali od pasa s proljevom i zdravih pasa. Uzorkovani su u dijagnostičke svrhe u sklopu rutinske kliničke obrade pacijenata Klinike za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te ambulanti s područja grada Zagreba i Zagrebačke županije. Za ovo su istraživanje odabrani arhivski izolati prikupljeni od listopada 2013. do listopada 2022. godine. U svrhu istraživanja zabilježeni su sljedeći podaci o psima: dob, prisutnost proljeva, vlasnički status, vrsta hrane kojom su hranjeni te boluju li od parvoviroze. Uzorci su obrađeni u roku od četiri sata od uzorkovanja.

4.2. Nacjepljivanje uzoraka

Uzorci izmeta nacjepljivani su na selektivni agar s dodatkom ugljena i cefoperazona (mCCDA, engl. *Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*) (Oxoid, UK). Nakon nacjepljivanja ploče su inkubirane u mikroaerofilnim uvjetima pri 41 ± 1 °C tijekom 48 sati. Mikroaerofilni su uvjeti osigurani pomoću plastičnih vrećica u koje je dodana mješavina plina sastava približno 5 % kisika, 10 % ugljikova dioksida i 85 % dušika (UTP d.o.o., Hrvatska). Ako nije uočen porast kolonija koje bi izgledom odgovarale kampilobakteru, inkubacija je produljena tijekom idućih 48 h.

4.3. Identifikacija izolata do razine roda

Identifikacija izolata do razine roda provedena je na temelju uzgojnih, morfoloških, fizioloških i biokemijskih svojstava.

Na mCCDA agaru vrste roda *Campylobacter* tvore tipične okrugle, sjajne kolonije ravnih rubova. Najčešće su bijele do sive boje, a često se može uočiti nepravilan rast (konfluirajuće kolonije). Svi izolati koji su odgovarali navedenim morfološkim svojstvima uključeni su u daljnje postupke identifikacije.

4.3.1. Bojenje prema Gramu i mikroskopiranje

Izolati čije su kolonije izgledom odgovarale bakterijama roda *Campylobacter*, bojani su prema Gramu (MARKEY i sur., 2013). Svim gram-negativnim, štapičastim bakterijama određivana je sposobnost tvorbe enzima citokrom-oksidade.

4.3.2. Određivanje sposobnosti tvorbe enzima citokrom-oksidade

Sposobnost tvorbe enzima citokrom-oksidade određena je komercijalnim testom impregiranim tetrametil-fenilendiamin-dihidrokloridom (Himedia, India) prema uputi proizvođača. Kolonije su nanosene na papirnati disk. U slučaju tvorbe oksidade boja diska mijenja se u plavo. Svi izolati pozitivni na oksidazu uključeni su u daljnju identifikaciju.

Izolati koji su odgovarali kampilobakterima pohranjeni su u bujonu (Oxoid, Hampshire, Engleska) s dodatkom 30 % glicerola (T. T. T. d.o.o., Sv. Nedelja) na temperaturi od -80 °C do izvođenja daljnjih postupaka.

4.4. Identifikacija vrste bakterija roda *Campylobacter* molekularnim metodama

Identifikacija vrste bakterija roda *Campylobacter* molekularnim metodama provedena je na svim izolatima za koje je prethodno opisanim metodama utvrđeno da pripadaju rodu *Campylobacter*. Prije provođenja identifikacije molekularnim metodama izdvojena je deoksiribonukleinska kiselina (DNK).

4.4.1. Postupak izdvajanja DNK pomoću 2 %-tne otopine Chelex-100

Chelex-100 (Biorad, SAD) jest pripravak u obliku praha koji je potrebno resuspendirati u sterilnoj redestiliranoj vodi kako bi se dobila 2 %-tna otopina. Postupak pripreme otopine je sljedeći:

1. odvagano je 0,1 g pripravka Chelex-100 u sterilnu staklenu čašicu
2. dodano je 5 ml sterilne redestilirane vode i sterilan magnet
3. sadržaj je miješan na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi.

Suspencija Chelex-100 vrlo se brzo taloži te je osobito važno miješanjem održavati je homogenom i upotrijebiti je odmah nakon pripreme.

1. Eppendorf epruvete volumena 2 ml označavane su odgovarajućim brojevima te su napunjene s 200 µl pripremljene 2 %-tne suspenzije Chelex-100 izravno iz čašice tijekom miješanja.
2. Bakteriološkom ušicom uzeto je nekoliko kolonija s mCCDA podloge i resuspendirano u 2 %-tnoj otopini Chelex-100.
3. Suspenzija je zagrijavana 10 minuta na 100 °C u termobloku TS-100 Thermo Shaker (Bio-San, Latvija).
4. Nakon hlađenja suspenzija je centrifugirana na 13 000 okretaja u minuti pri 4 °C tijekom 10 minuta.
5. Supernatant u kojem se nalazi izdvojena DNK prenesen je u sterilne Eppendorf epruvete označene odgovarajućim brojevima.
6. Izdvojena DNK pohranjena je na -20 °C.

4.4.2. Lančana reakcija polimerazom i polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata gena *CdtB*

U lančanoj reakciji polimerazom umnožen je dio gena *CdtB*, specifičan za rod *Campylobacter*, koristeći se početnicama prikazanim u tablici 5.

Tablica 5. Početnice korištene za umnažanje *CdtB* gena (ASAKURA i sur., 2007.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice
C-CdtBcom1	5'-ACTTGGAATTTGCAAGGC-3'
C-CdtBcom2	5'-TCTAAAATTTACHGGAAAATG-3'

Kao pozitivna kontrola upotrijebljen je referentni soj bakterije *C. jejuni* ATCC 33 560. Kao negativna kontrola upotrijebljena je reakcijska otopina bez DNK.

U svakoj PCR reakciji, ukupnog volumena 25 µL, korištena je reakcijska smjesa idućeg sastava:

1. komercijalna reakcijska smjesa EmeraldAmp PCR Master Mix, 2x (Takara Bio, Japan)

$$V = 12 \mu\text{L}$$

2. početnica C-CdtBcom1 (Metabion International AG, Njemačka)

$$V = 0,5 \mu\text{L}$$

3. početnica C-CdtBcom2 (Metabion international AG, Njemačka)

$$V = 0,5 \mu\text{L}$$

4. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD)

$$V = 11 \mu\text{L}$$

5. bakterijska DNA

$$V = 1 \mu\text{L}.$$

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj T100 Thermal Cycller (Bio-Rad, SAD) prema sljedećem temperaturnom profilu:

1. početna denaturacija	dvolančane DNA	94 °C, 5 min	} 30 ciklusa
2. denaturacija		94 °C, 30 s	
3. vezanje početnica		50 °C, 30 s	
4. produživanje lanaca		72 °C, 1 min	
5. završno produživanje lanaca		72°C, 7 min	
6. čuvanje PCR produkta		4 °C, ∞	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu. Postupak pripreme gela bio je sljedeći:

1. U tikvicu je odvagano 0,5 g agaroze (Sigma Aldrich, SAD).
2. Dodano je 50 ml TAE pufera, radne koncentracije 1 X (Tris Acetatni EDTA pufer) koji se dobije razrjeđivanjem 50X koncentrirane otopine TAE

50 X koncentrirana otopina TAE:

- 242 g Tris baze (Tris (hidroksimetil) aminometane) (Sigma Aldrich, SAD)
- 57,1 g ledene octene kiseline (Sigma Aldrich, SAD)
- 100 ml 0,5 M EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Sigma Aldrich, SAD)
- destilirana voda do 1 litre

pH otopine bio je 8,5

0,5 M otopina EDTA:

- 186,1 g EDTA (Sigma Aldrich, SAD)
- destilirana voda do 1 litre

pH otopine bio je 8,0

3. Agaroza je otopljena zagrijavanjem na 100 °C potom ohlađena na otprilike 50 °C.
4. Dodano je 3 µl boje za DNK (Diamond Nucleic Acid Dye, Promega, USA).
5. Stavljjen je češalj za jažice u kalup, otopina je izlivena i ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi gel polimerizirao.
6. Polimerizirani gel odmah je upotrijebljen za elektroforezu.

Elektroforeza u gelu provedena je u uređaju za elektroforezu (Cleaver Scientific Ltd, UK). Kadica uređaja bila je ispunjena 1 %-tnim tris-acetat-EDTA puferom, a kalup s 1 %-tnim gelom uronjen je tako da je dio gela s jažicama bio okrenut prema katodi. Za određivanje veličine PCR produkata korišten je standardizirani biljeg (100 pb PCR Molecular Ruler, Bio-Rad, Francuska) volumena 3 µL. U jažice je nakapano 5 µL uzorka (PCR produkta).

Elektroforeza je trajala jedan sat uz upotrebu istosmjerne struje napona 100 V. Nakon završetka elektroforeze rezultati su analizirani i snimljeni pomoću uređaja Gel Doc 200 (Bio-Rad, SAD) koji se sastoji od ultraljubičastog prosvjetlivača, kamere za snimanje gelova i kompjutorskog programa za obradu fotografije gela (Quantity One Basic analysis software). Veličina umnoženog odsječka DNK određena je usporedbom sa standardiziranim biljegom.

Bakterije roda *Campylobacter* dale su DNK odsječak veličine od 712 do 723 para baza.

Nakon elektroforeze u gelu metodom RFLP analizirani su izolati koji su umnažanjem dijela gena *CdtB* identificirani kao *Campylobacter* sp.

U ovoj su metodi korišteni restriksijski enzimi EcoRI (200 U) i DdeI (5 000 U) (Promega, SAD) koji režu DNK na mjestu specifičnom za svaku vrstu.

Kao pozitivna kontrola upotrijebljeni su:

- referentni soj bakterije *C. jejuni* ATCC 33 560
- izolati vrsta *C. upsaliensis* i *C. coli* kojima je prethodno dokazana vrsta umnažanjem 16S rRNA te usporedbom umnoženog odsječka u bazi referentnih sojeva Nacionalnog centra za biotehnoške informacije, Maryland, SAD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNK.

U svakoj digestijskoj smjesi volumena 25 μL korišteni su:

1. pufer za restrikcijski enzim, koncentracije 10X, $V=2 \mu\text{L}$ (MULTI-CORE Buffer, Promega, SAD)
2. albumin goveđeg seruma koncentracije $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $V = 0,2 \mu\text{L}$ (Acetylated BSA, Promega, SAD)
3. EcoRI (200 U) $V = 0,5 \mu\text{L}$
4. DdeI (5 000 U) $V = 0,6 \mu\text{L}$
5. PCR produkt $V = 5 \mu\text{L}$
6. sterilna destilirana voda $V = 16,7 \mu\text{L}$ (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD).

Smjesa je inkubirana tri sata na 37°C u uređaju MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Produkti digestije podvrgnuti su elektroforezi provedenoj kako je prethodno opisano pod točkom 4.3.2.

Vrsta izolata identificirana je prema protokolu KAMEI i suradnika (2014.), a način identifikacije prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Interpretacija PCR-RFLP-a enzimima DdeI i EcoRI.

Vrsta	Visina prvog odsječka (~pb)	Visina drugog odsječka (~pb)	Napomena
<i>C. jejuni</i>	250	350	
<i>C. upsaliensis</i>	500	150	Moguće i jedan odsječak na visini 600 – 800 pb.
<i>C. coli</i> / <i>C. helveticus</i>	500	200	Za razlikovanje ovih dviju vrsta izvodi se jednostruka digestija. Enzim DdeI reže DNK vrste <i>C. coli</i> , dok EcoRI reže DNK vrste <i>C. helveticus</i> .

4.4.3. Višestruka lančana reakcija polimerazom

Multipleks lančana reakcija polimerazom provedena je prema WANG i sur, 2002., LAWSON i sur., 1997. i YAMAZAKI-MATSUNE i sur., 2007. s početnicama proizvedenim u tvrtki Macrogen, Amsterdam, Nizozemska. U multipleks PCR-u upotrijebljene su pozitivne kontrole i negativna kontrola kao pod točkom 4.4.2.

U identifikaciji vrste *C. jejuni* ispitivana je prisutnost *hipO* (hipurikaza) gena i gen za 23S rRNA prema WANG i suradnicima, 2002. Korištene početnice prikazane su u tablicama 7. i 8.

Tablica 7. Početnica za gen *hipO* (WANG i sur., 2002.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
Uzvodna početnica CJF	5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3'	323 pb
Nizvodna početnica CJR	5'-GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'	323 pb

Tablica 8. Početnica za gen za 23S rRNA (WANG i sur., 2002.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
Uzvodna početnica 23SF	5'-TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG-3'	650 pb
Nizvodna početnica 23SR	5'-ATCAATTAACCTTCGAGCACCG-3'	650 pb

U identifikaciji vrste *C. coli* ispitivana je prisutnost gena *glyA* (serin-hidroksimentil-transferaza). Korištena početnica prikazana je u tablici 9.

Tablica 9. Početnica za *glyA* gen (WANG i sur., 2002.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
Nizvodna početnica CCF	5'-GTAAAACCAAAGCTTATCGTG-3'	126 pb
Uzvodna početnica CCR	5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG-3'	126 pb

U svakoj multipleks PCR reakciji za identifikaciju vrsta *C. jejuni* i *C. coli*, ukupnog volumena 25 μL , upotrijebljeni su:

1. Komercijalna reakcijska smjesa EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio, Japan)
($V = 12,5 \mu\text{L}$)
2. početnica CJF, 10 μM
($V = 1,25 \mu\text{L}$)
3. početnica CJR, 10 μM
($V = 1,25 \mu\text{L}$)
4. početnica 23SF, 10 μM
($V = 0,5 \mu\text{L}$)
5. početnica 23SR, 10 μM
($V = 0,5 \mu\text{L}$)
6. početnica CCF, 10 μM
($V = 2,5 \mu\text{L}$)
7. početnica CCR, 10 μM
($V = 2,5 \mu\text{L}$)
8. Sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase RNase-free, Invitrogen, SAD)
($V = 1,5 \mu\text{L}$)
9. Bakterijska DNK
($V = 2,5 \mu\text{L}$)

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj T100 Thermal Cycler (BioRad, SAD) prema sljedećem temperaturnom profilu:

- | | | | |
|-------------------------|----------------|--------------|--------------|
| 1. početna denaturacija | dvolančane DNA | 95 °C, 6 min | |
| 2. denaturacija | | 95 °C, 30 s | } 30 ciklusa |
| 3. vezanje početnica | | 59 °C, 30 s | |
| 4. produživanje lanaca | | 72 °C, 30 s | |

- | | |
|--------------------------------|--------------|
| 1. završno produživanje lanaca | 72 °C, 7 min |
| 2. čuvanje PCR produkta | 4 °C, ∞ |

U identifikaciji vrsta *C. upsaliensis* i *C. helveticus* upotrijebljene su početnice prema LAWSON i suradnicima, 1997. koje umnažaju vrsno specifičnu regiju gena 16S rRNA. Početnice su prikazane u tablicama 10. i 11.

Tablica 10. Početnica za gen za 16S rRNA vrste *C. upsaliensis* (LAWSON i sur., 1997.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
Uzvodna početnica CHCU146F	5'-GGGACAACACTTAGAAATGAG-3'	878 pb
Nizvodna početnica CU1024R	5'-CACTTCCGTATCTCTACAGA-3'	878 pb

Tablica 11. Početnica za gen za 16S rRNA vrste *C. helveticus* (LAWSON i sur., 1997.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
Uzvodna početnica CHCU146F	5'-GGGACAACACTTAGAAATGAG-3'	878 pb
Nizvodna početnica CH1371R	5'-CCGTGACATGGCTGATTAC-3'	1225 ili 1375 pb.

U svakoj multipleks PCR reakciji za identifikaciju vrsta *C. upsaliensis* i *C. helveticus* ukupnog volumena 25 µL upotrijebljeni su:

- komercijalna reakcijska smjesa EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio, Japan)
(V = 12,5 µL)
- početnica CHCU146F, 10 µM
(V = 2 µL)

3. početnica CHCU1024R, 10 μ M

(V = 2 μ L)

4. početnica CHCU1371R, 10 μ M

(V = 2 μ L)

5. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase RNase-free, invitrogen, SAD)

(V = 1,5 μ L)

6. bakterijska DNK

(V = 5 μ L)

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, SAD) prema sljedećem temperaturnom profilu:

1. denaturacija	94 °C, 30 s	} 30 ciklusa
2. vezanje početnica	58 °C, 30 s	
3. produživanje lanaca	72 °C, 1 min	
4. čuvanje PCR produkta	4 °C, ∞	

U identifikaciji vrste *C. upsaliensis* također su upotrijebljene početnice prema Yamazaki-Matsune i suradnicima, 2007., koje umnažaju vrsno specifičnu regiju gena *lpxA* (UDP-N-acetilglukozamin acetiltransferaza) te su prikazane u tablici 12.

Tablica 12. Početnica za *lpxA* vrste *C. upsaliensis* (YAMAZAKI-MATSUNE i sur., 2007.).

Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Očekivana veličina produkta
CU61F	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'	86 pb
CU146R	5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'	86 pb

U svakoj multipleks PCR reakciji za identifikaciju vrste *C. upsaliensis*, ukupnog volumena 25 μ L, korišteni su:

1. komercijalna reakcijska smjesa EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio, Japan)

(V = 12,5 μ L)

2. početnica CU61F 146F, 10 μ M
(V = 0,5 μ L)
3. početnica CU146R, 10 μ M
(V = 0,5 μ L)
4. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase RNase-free, invitrogen, SAD)
(V = 10,5 μ L)
5. bakterijska DNK
(V = 1 μ L)

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj T100 Thermal Cycller (Bio-Rad, SAD) prema sljedećem temperaturnom profilu:

1. početna denaturacija	dvolančane DNA	95 °C, 15 min	
2. denaturacija		95 °C, 30 s	} 25 ciklusa
3. vezanje početnica		58 °C, 1,5 min	
4. produživanje lanaca		72 °C, 1 min	
5. završno produživanje lanaca		72 °C, 7 min	
6. čuvanje PCR produkta		4 °C, ∞	

Produkti PCR-a analizirani su elektroforezom provedenom kako je prethodno opisano pod točkom 4.4.2.

4.5. Određivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne tvari disk-difuzijskim testom prema Kirby-Baueru

Disk-difuzijskim testom prema Kirby-Baueru određena je osjetljivost izolata *Campylobacter* spp. na antimikrobne tvari prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST, engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST, 2021.). Upotrijebljene su sljedeće antimikrobne tvari: ciprofloksacin, eritromicin, azitromicin i tetraciklin.

Bakterijska suspenzija napravljena je od nekoliko svježe uzgojenih kolonija resuspendiranih u sterilnoj fiziološkoj otopini, optičke gustoće 0,5 prema McFarlandu određene denzitometrom (Densimat, bioMerieux, Francuska). Suspenzija je nanesena na Mueller-Hintonov agar (Biolife, Italija) s dodatkom 5 % defibrinirane ovčje krvi (BioSap, Biagnost, Hrvatska) sterilnim vatiranim štapićem u tri smjera, rotirajući Petrijevu zdjelicu za 120 stupnjeva. Nakon sušenja podloge tijekom pet minuta sterilnom pincetom na površinu agara postavljeni su dijagnostički diskovi impregnirani antimikrobnim lijekovima (Oxoid, UK) te su ploče inkubirane 24 sata pri temperaturi od 41 +/- 1°C u mikroaerofilnim uvjetima.

Nakon inkubacije izmjereni su promjeri zona inhibicija te su vrijednosti izražene u milimetrima, a rezultati su interpretirani prema EUCAST-u. Izolati su podijeljeni u skupine osjetljiv (S) i rezistentan (R).

Popis oznaka dijagnostičkih kolutića impregniranih antimikrobnim tvarima, količine aktivnih tvari koju sadržavaju i nazivi navedeni su u tablici 13.

Tablica 13. Antimikrobne tvari upotrijebljene u disk-difuzijskom postupku, njihova koncentracija i smjernice za očitavanje rezultata disk-difuzijskog testa prema Kirby-Baueru (EUCAST, 2021.).

Dijagnostički kolutić aktivna tvar (oznaka)	Količina aktivne tvari (µg)	Promjer zone inhibicije (mm)	
		S≥	R<
Ciprofloksacin (CIP5)	5	50	26
Tetraciklin (TE30)	30	30	30
Azitromicin (AZM15)			
<i>C. jejuni</i>	15	20	20
<i>C. coli</i>		24	24
Eritromicin (E15)			
<i>C. jejuni</i>		20	20
<i>C. coli</i>	15	24	24

4.6. Genotipizacija izolata

4.6.1. Postupak izdvajanja DNK za sekvenciranje

Za izdvajanje DNK upotrijebljen je komercijalni komplet NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Njemačka) koji se sastoji od:

1. proteinaze K koncentracije 10 mg/ml
2. pufera za lizu T1 (Lysis Buffer T1)
3. pufera za lizu T3 (Lysis Buffer B3)
4. pufera za ispiranje BW (Wash Buffer BW)
5. pufera za ispiranje B5 (Wash Buffer B5)
6. pufera za otpuštanje DNK s membrane BE (Elution Buffer BE)
7. pufera za proteinazu K
8. epruvete sa silikagelnom membranom (NucleoSpin ® Tissue Columns)
9. epruvete sakupljačice volumena 2 ml (Collection Tubes).

Izdvajanje DNK izvedeno je prema uputama proizvođača komercijalnog kompleta:

1. Nekoliko kolonija bakterijske kulture resuspendirano je u 180 μ L pufera T1 te je dodano 25 μ L proteinaze K.
2. Eppendorf epruveta protresena je na tresilici tijekom 25 sekundi te nakon toga centrifugirana na 11 000 RCF.
3. Uzorak je stavljen na 56 °C uz lagano tresenje na 300 okretaja u minuti u stolnu miješalicu s mogućnošću zagrijavanja za Eppendorf epruvete (ThermoMixer, Eppendorf, Njemačka) tijekom 24 h.
4. Uzorak je potom izvađen iz ThermoMixer-a i tresen na stolnoj tresilici 25 sekundi.
5. U uzorak je dodano 200 μ L pufera B3 te je tresen na tresilici 25 sekundi.
6. Uzorak je ostavljen u ThermoMixer 10 minuta, na 70 °C i 300 okretaja u minuti. Nakon toga je protresen na tresilici tijekom 25 sekundi.
7. U uzorak je dodano 210 μ L etanola te je protresen na tresilici 25 sekundi.

8. Eppendorf epruveta sa silikagel-membranom (NucleoSpin[®] Tissue Columns) stavljena je u sakupljačicu (Collection tube) te je u nju prenesen cjelokupni uzorak.
9. Uzorak je centrifugiran jednu minutu pri brzini od 1000 RCF te je nakon toga sakupljačica bačena i uzeta je nova u koju je umetnuta epruveta sa silikagel-membranom.
10. Dodano je 650 μ L pufera B5 i centrifugirano dva puta u trajanju od jedne minute pri brzini od 11 000 RCF.
11. Bačena je sakupljačica te je epruveta sa silikagel-membranom stavljena u novu Eppendorf epruvetu. Dodano je 100 μ L pufera BE.
12. Uzorak je odstojao na sobnoj temperaturi jednu minutu te je potom centrifugiran jednu minutu.
13. Eppendorf epruveta sa silikagel-membranom je bačena, a uzorak (DNK) ostavljen u Eppendorf epruveti.

4.6.2. Tipizacija određivanjem sljedova na više genskih lokusa

Metodom MLST umnažaju se nukleotidni sljedovi genskih lokusa unutar cjelokupnog genoma vrsta *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter upsaliensis*.

Nukleotidni sljedovi za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. jejuni* prikazani su u tablici 14. (DINGLE i sur., 2001.).

Tablica 14. Nukleotidni sljedovi za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. jejuni*

Genski lokus	Svrha	Počelnica	Sljedi nukleotida	Veličina produkta (~pb)
Aspartaza A	PCR	aspA A9	5'-AGTACTAATGATGCTTATCC-3'	899
		aspA A10	5'-ATTTTCATCAATTGTTCTTTGC-3'	
	Sekvenciranje	aspA S3	5'-CCAACCTGCAAGATGCTGTACC-3'	
		aspA S6	5'-TTCATTTGCGGTAATACCATC-3'	
Glutamin sintetaza	PCR	glnA A1	5'-TAGGAACTTGGCAATCATATTACC-3'	1 262
		glnA A2	5'-TTGGACGAGCTTCTACTGGC-3'	
	Sekvenciranje	glnA S3	5'-CATGCAATCAATGAAGAAAC-3'	
		glnA S6	5'-TTCCATAAGCTCATATGAAC-3'	
Citrat sintaza	PCR	gltA A1	5'-GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG-3'	1 012
		gltA A2	5'-CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG-3'	
	Sekvenciranje	gltA S3	5'-CTTATATTGATGGAGAAAATGG-3'	
		gltA S6	5'-CCAAAGCGCACCAATACCTG-3'	
Serin Hidroksimentiltransferaza	PCR	glyA A1	5'-GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG-3'	816
		glyA A2	5'-AAACCTCTGGCAGTAAGGGC-3'	
	Sekvenciranje	glyA S3	5'-AGCTAATCAAAGTGTATTATGCGG-3'	
		glyA S4	5'-AGGTGATTATCCGTTCCATCGC-3'	
Fosfo-glukomutaza	PCR	pgm A7	5'-TACTAATAATATCTTAGTAGG-3'	1 150
		pgm A8	5'-CACAAACATTTTTCATTTCTTTTC-3'	
	Sekvenciranje	pgm S5	5'-GGTTTTAGATGTGGCTCATG-3'	
		pgm S2	5'-TCCAGAATAGCGAAATAAGG-3'	
Transketolaza	PCR	tkt A3	5'-GCAAACTCAGGACACCCAGG-3'	1 102
		tkt A6	5'-AAAGCAATTGTTAATGGCTGC-3'	
	Sekvenciranje	tkt S5	5'-GCTTAGCAGATATTTAAAGTG-3'	
		tkt S6	5'-AAGCCTGCTTGTCTTTGGC-3'	
ATP sintaza α podjedinica	PCR	uncA A7	5'-ATGGACTTAAAGAATATTATGGC-3'	1 120
		uncA A8	5'-ATAAATTCCATCTTCAAATTC-3'	
	Sekvenciranje	uncA S3	5'-AAAGTACAGTGGCACAAGTGG-3'	
		uncA S4	5'-TGCCTCATCTAAATCCTAGC-3'	

Za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. coli* koristi se isti set početnica koje su prikazane u tablici 15. (DINGLE i sur., 2001.).

Tablica 15. Nukleotidni slijed za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. coli*

Genski lokus	Početnica	Slijed nukleotida	Veličina produkta (~pb)
Aspartaza A	Aspcoli S1	5'-CAACTTCAAGATGCAGTACC-3'	594
	Aspcoli S2	5'-ATCTGCTAAAGTATGCATTGC-3'	
Glutamin-sintetaza	Glncoli S1	5'-TTCATGGATGGCAACCTATTG-3'	615
	Glncoli S2	5'-GCTTTGGCATAAAAGTTGCAG-3'	
Citrat-sintaza	Gltcoli S1	5'-GATGTAGTGCATCTTTTACTC-3'	528
	Gltcoli S2	5'-AAGCGCTCCAATACCTGCTG-3'	
Serin Hidroksimentil-transferaza	Glycoli S1	5'-TCAAGGCGTTTATGCTGCAC-3'	627
	Glycoli S2	5'-CCATCACTTACAAGCTTATAC-3'	
Fosfoglukomutaza	Pgmcoli S1	5'-TTATAAGGTAGCTCCGACTG-3'	649
	Pgmcoli S2	5'-GTTCCGAATAGCGAAATAACAC-3'	
Transketolaza	Tktcoli S1	5'-AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG-3'	581
	Tktcoli S2	5'-TGACTTCCTTCAAGCTCTCC-3'	
ATP sintaza α -podjedinica	Unccoli S1	5'-AAGCACAGTGGCTCAAGTTG-3'	614
	Unccoli S2	5'-CTACTTGCCTCATCCAATCAC-3'	

Za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. upsaliensis* koristi se isti set početnica koje su prikazane u tablici 16. (MILLER i sur., 2005.)

Tablica 16. Nukleotidni slijed za umnažanje i sekvenciranje vrste *C. upsaliensis*.

Genski lokus	Početnica	Slijed nukleotida	Veličina produkta (~pb)
Adenilatkinaza	adk F	5'-TGAAAGAATTRTTTTAATCATAGG-3'	545
	adk R	5'-CTTTCATRTCWGCHACGATAGGTTC-3'	
Aspartaza A	aspA F	5'-GAAGCWAAAGCWAAAGAATAYAAAGAT-3'	690
	aspA R	5'-GAGTTTTTTGCAWGCTTCWGGATT-3'	
ATP sintaza α -podjedinica	atpA F	5'-GWCAAGGDGTTATYTGTATWTATGTTGC-3'	700
	atpA R	5'-TTTAADAVYTCAACCATTCTTTGTCC-3'	
Glutamin-sintetaza	glnA F	5'-TGATAGGMACTTGGCAYCATATYAC-3'	751
	glnA R	5'-ARRCTCATATGMACATGCATACCA-3'	
Serin hidroksimantil-transferaza	glyA F	5'-ATTCAGGTTCTCAAGCTAATCAAGG-3'	716
	glyA R	5'-GCTAAATCYGCATCTTTKCCRCTAAA-3'	
Glukoza-6-fosfat Izomeraza	pgi F	5'-TTTAGTGGGWATGGGTGGKTCAAGT-3'	660
	pgi R	5'-TCTCTAGCACCAATGAGAGCTATGG-3'	
Transketolaza	tkt F	5'-GCAAAYTCAGGMCA YCCAGGTGC-3'	730
	tkt R	5'-TTTTAATHAVHTCTTCRCCCAAAGGT-3'	

U tablici 16. vidljive su tzv. degenerirane baze koje omogućuju komplementarno vezanje više od jedne baze. Degenerirane početnice sadržavaju više kombinacija različitih baza na jednom mjestu i time omogućuju vezanje više različitih komplementarnih baza. Sadržaj degeneriranih baza je sljedeći:

- **R** = A + G
- **W** = A + T
- **H** = A + T + C
- **Y** = C + T
- **V** = G + A + C

Za izvođenje MLST-a nasumice je odabrano 27 izolata vrsta *C. jejuni*, *C. coli* i *C. upsaliensis*. Lančanom reakcijom polimerazom umnoženo je svih sedam lokusa po uzorku.

U svakoj PCR reakciji, ukupnog volumena 25 μL , korišteni su:

1. komercijalna reakcijska smjesa EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio, Japan)

$$V = 12 \mu\text{L}$$

2. početnica F (Metabion international AG, Njemačka)

$$V = 0,5 \mu\text{L}$$

3. početnica R (Metabion international AG, Njemačka)

$$V = 0,5 \mu\text{L}$$

4. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD)

$$V = 11 \mu\text{L}$$

5. bakterijska DNK

$$V = 1 \mu\text{L}.$$

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, SAD) prema sljedećem programu:

1. početna denaturacija	94 °C, 2 min	} 35 ciklusa
2. denaturacija	94 °C, 30 s	
3. vezanje početnica	50 °C, 1 min	
4. produživanje lanca	72 °C, 1 min	
5. završno produživanje lanca	72 °C, 7 min	
6. čuvanje PCR produkta	4 °C, ∞	

Umnažanje gena potvrđeno je analizom gela nakon elektroforeze i dokazom odsječaka ciljnih veličina. Uzorci DNK, s pripadajućim početnicama za sekvenciranje, poslani su na sekvenciranje u servis MacroGen, Amsterdam, Nizozemska.

4.6.3. Obrada nukleotidnog slijeda u informatičkim programima

Nakon sekvenciranja u servisu Macrogen, obrađeni su nukleotidni slijedovi i izrađeno je filogenetsko stablo u računalnim programima:

1. Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija, 2012.)
2. BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999.)
3. MEGA 11.0 (Kumar, Stecher, and Tamura, 2015.)

Nukleotidni slijedovi održavateljskih gena pregledani su u programu Chromas Lite 2.1 u oba smjera (F i R), što pruža veću točnost s obzirom na to da se mogu dogoditi greške u očitavanju samo jednog smjera, te su obrisani početni i završni dijelovi. Potom su uređeni u programu BioEdit koji je korišten za brisanje krivo očitanih dijelova nukleotidnog slijeda. Također, u istom su programu dva nukleotidna slijeda složena jedan ispod drugog. Važno je napomenuti da je slijed R prebačen u reverzni komplement kako bi se mogao usporediti sa smjerom F. Potom je korišten Mega 11.0 program gdje su dosad obrađivani nukleotidni slijedovi poravnati i spremljeni u oblik FASTA. Nakon ovog koraka nukleotidni slijedovi opet su otvoreni u programu BioEdit zbog ispravljanja grešaka u sravnjivanju komplementarnih nukleotidnih slijedova te su ponovno pregledane u programu Chromas Lite 2.1.

Uređeni nukleotidni slijed svakog izolata unesen je u bazu podataka koja je dostupna na mrežnoj stranici <http://www.mlst.net> radi dobivanja tipa sekvencije (ST, eng. *Sequence Type*) i njegova svrstavanja u klonske komplekse (CC, engl. *Clonal Complex*) pomoću računalnog programa eBURST (engl. *Based upon related sequence types*). Izolati kampilobaktera grupiraju se u isti CC kada imaju identičan slijed nukleotida pet od sedam održavateljskih gena, a pretečom svakog CC-a smatra se ST s najvećim brojem varijanti pojedinačnog lokusa.

4.6.4. Filogenetska analiza izolata *Campylobacter* spp.

Filogenetska analiza izvedena je metodom susjednog spajanja (engl. *neighbor-joining*), u MEGA11 računalnom programu. Filogenetsko stablo prikazuje povezanost taksona s obzirom na njihovu evolucijsku povijest. Izrađeno je “optimalno stablo”, tj. filogenetsko stablo koje najbolje predstavlja odnose između proučavanih sekvencija temeljem dostupnih podataka. U *bootstrap*-testu, bilo je uključeno 1000 replikata filogenetskog stabla, te je procijenjeno koliko se često određene skupine organizama (taksoni) svrstavaju zajedno u istu granu na svakom od tih replikata. Rezultati evolucijske udaljenosti izraženi su kao broj zamjena

baznih parova po svakom mjestu u genomu. Drugim riječima, mjerna jedinica koja je korištena predstavlja prosječan broj mutacija po baznom paru, što nam daje uvid u stupanj evolucijske promjene između uspoređivanih DNK sljedova. U analizu su bile uključene sve tri pozicije kodona (prva, druga i treća) te nekodirajuće pozicije DNK. Kodoni su trojke nukleotida koji kodiraju aminokiseline, a uključivanje nekodirajućih dijelova može pružiti dodatne informacije o evolucijskim odnosima (NEI i KUMAR, 2000., TAMURA i sur., 2004., TAMURA i sur., 2021.).

Minimalna razgranata stabla (engl. *minimum spanning tree*, MST) načinjena su upotrebom verzije 8.1 softvera BioNumerics (BioMerieux, Applied Maths, Belgija). Primijenjena je napredna analiza klastera s 1000 *bootstrap*-uzorkovanja. Maksimalni broj varijanti s n-lokusa bio je 5, gdje varijante s $n = 1$ lokusom imaju najveću težinu (10 000), $n = 2$ imaju težinu koja je 1000 puta manja, a sve ostale imaju težinu koja je 10 puta manja. U kontekstu MST-a težina se odnosi na relativnu važnost koja se pridaje varijantama lokusa pri konstrukciji stabla.

4.7. Statistička obrada podataka

Broj uzoraka izmeta i izolata dobivenih za daljnju analizu vrsta kampilobaktera i sekvencijskih tipova adekvatan je na temelju osjetljivosti testa od 86 % i specifičnosti testa od 97 % te razine povjerenja od 95 %. Vrijednosti prividne (engl. *apparent*) i stvarne (engl. *true*) prevalencije infekcije pasa bakterijama roda *Campylobacter* te pozitivna prediktivna vrijednost (engl. *positive predictive value*, PPV) i negativna prediktivna vrijednost (engl. *negative predictive value*, NPV) računane su upotrebom javno dostupne računalne aplikacije Epitools – Epidemiological calculators (<https://epitools.ausvet.com.au>). Prikupljeni podaci obrađivani su statističkim programom Stata 13.1 (STATA Corp. SAD). Univarijantnu analizu povezanosti izdvajanja bakterija roda *Campylobacter* s dobi pasa, prisutnošću proljeva, vlasništvom, vrstom hrane kojom su hranjeni, parvovirozom i osjetljivošću izdvojenih kampilobaktera prema antibioticima provjeravana je hi-kvadratnim i Fisherovim *exact*-testom. Varijable koje su statistički značajno povezane s izdvajanjem bakterija roda *Campylobacter* uvrštene su u model logističke regresije kako bi se izračunali izgledi za izdvajanje kampilobaktera iz pojedine kategorije pasa.

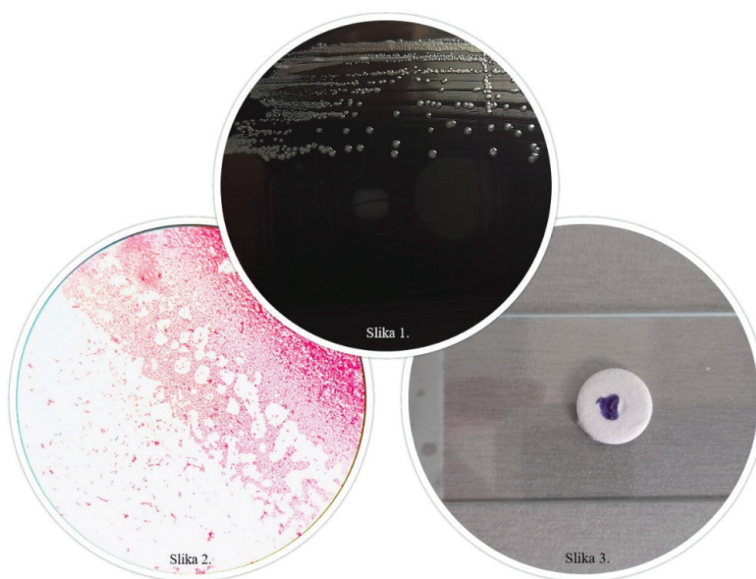
5. REZULTATI

5.1. Istraživana populacija pasa

Tijekom istraživana razdoblja, od listopada 2013. do listopada 2022. godine, pretraženo je 466 uzorka izmeta podrijetlom od pasa. Pretraženo je 216 uzoraka pasa u dobi do godine dana, 247 starijih od godine dana, i tri psa nepoznate dobi. Proljev je imalo 278 pretraženih pasa, 152 psa nisu imala proljev, a za njih 36 nije bilo poznato jesu li imali proljev. Od svih pretraženih pasa, 363 psa imala su poznate vlasnike, 101 pas bio je iz azila, a za dva psa nije bilo poznato vlasništvo. S obzirom na hranu kojom su bili hranjeni, 287 uzoraka bilo je podrijetlom od pasa hranjenih termički obrađenom hranom, 88 uzoraka potjecalo je od pasa hranjenih BARF-om, a za 91 psa nije bilo poznato koju vrstu hrane jedu. Od 466 pasa parvoviroza je potvrđena u njih 73. Psi koji su nisu imali parvovirozu, psi koji nisu bili testirani i psi za koje nije bio poznat podatak o parvovirozi, zajedno su smješteni u kategoriju „ne boluju“. U tu kategoriju svrstana su 393 psa.

5.2. Izolati *Campylobacter* spp.

Izdvojena su ukupno 124 izolata *Campylobacter* spp. od čega je pohranjivanje preživjelo 80 izolata koji su uključeni u daljnje analize PCR i RFLP metodama.



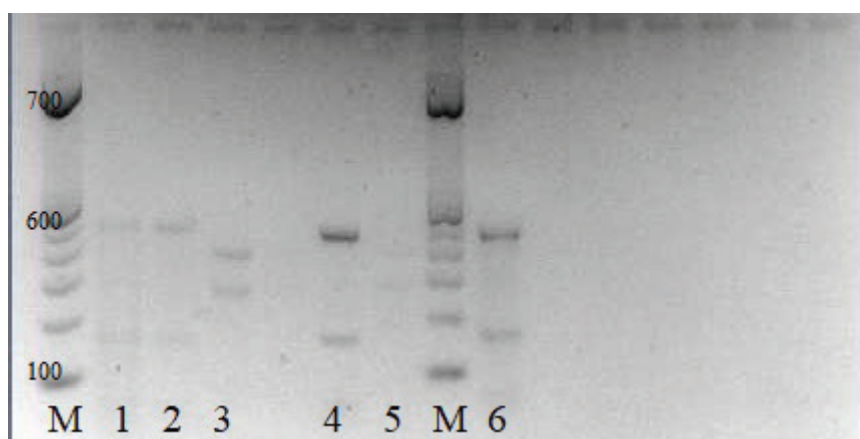
Slika 1. Kolonije bakterija roda *Campylobacter* na mCCDA podlozi

Slika 2. Mikroskopski izgled stanica kampilobaktera obojenih prema Gramu

Slika 3. Određivanje sposobnosti tvorbe citokrom-oksidaze

5.2.1. Identifikacija izdvojenih bakterija roda *Campylobacter* molekularnim metodama PCR-RFLP i multipleks PCR

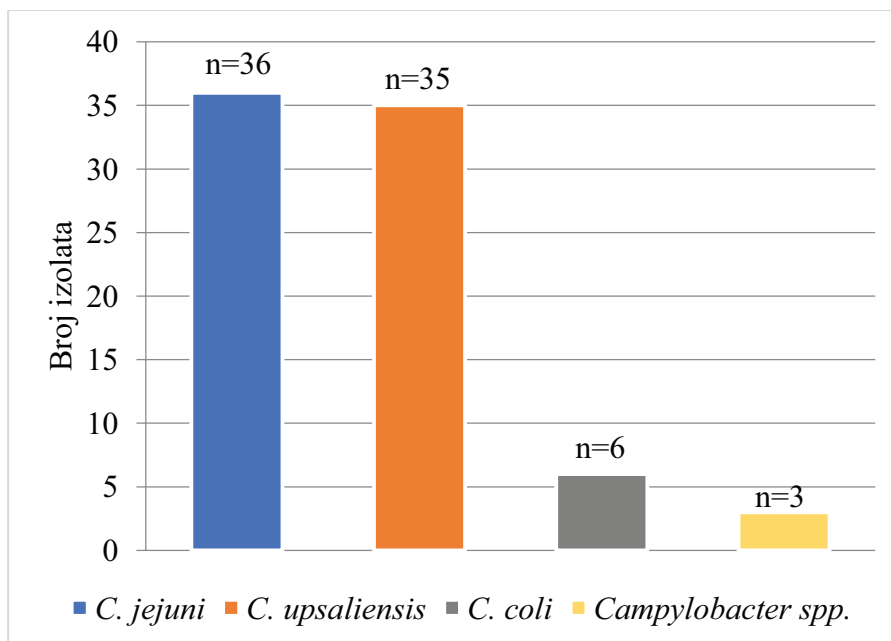
Metodom PCR-RFLP 34 (42,5 %) izolata identificirana su kao *C. jejuni*, 25 (31,3 %) kao *C. upsaliensis*, tri (3,7 %) kao *C. coli*, a za 18 (22,5 %) izolata nije bilo moguće interpretirati rezultate. Budući da metodom PCR-RFLP nije bila moguća potpuna identifikacija svih izolata, dodatno je identifikacija vrste učinjena multipleks PCR metodom za svih 80 izolata. Na slici 4. prikazan je elektroforegram odsječaka DNK za vrste *C. jejuni* i *C. upsaliensis*.



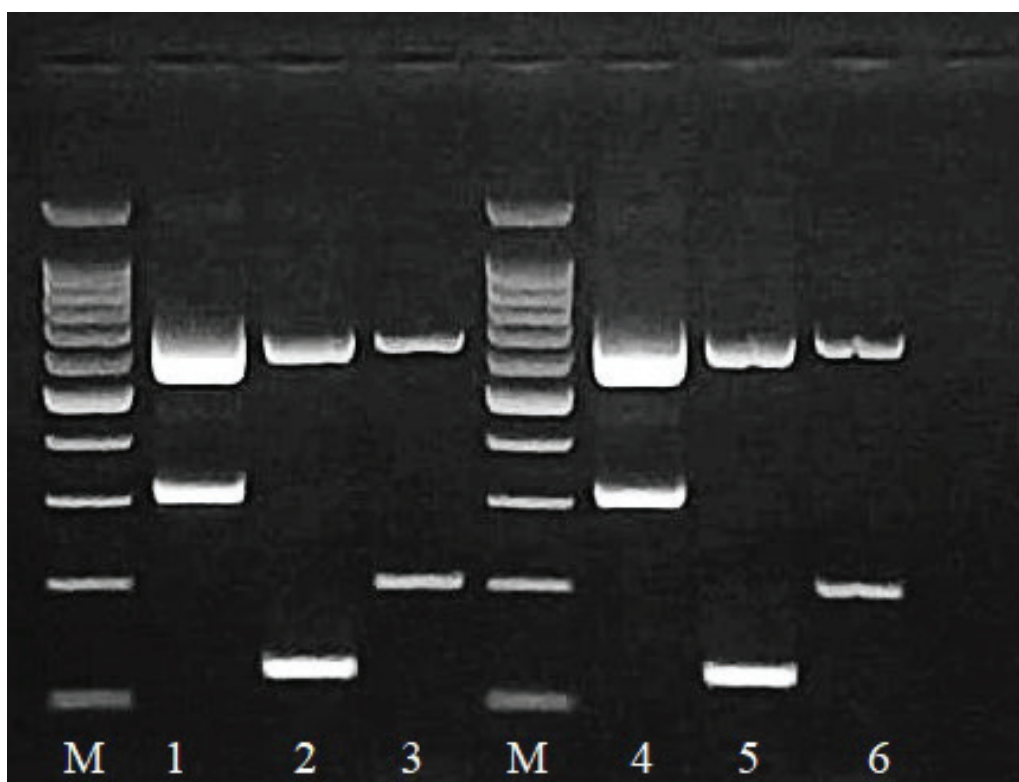
Slika 4. Elektroforegram RFLP metode s visinama odsječaka DNK za vrste *C. jejuni* i *C. upsaliensis*. Opis slike: izolati pod oznakama 1, 2, 4 i 6 pripadaju vrsti *C. upsaliensis*, a pod oznakama 3 i 5 vrsti *C. jejuni*. M – biljeg s veličinama odsječaka DNK; 1. izolat CAMP57, 2. izolat CAMP78, 3. izolat CAMP27, 4. izolat CAMP29, 5. izolat CAMP28, 6. izolat CAMP30.

Od 80 izdvojenih izolata roda *Campylobacter* multipleks PCR metodom identificirano je 36 (45%) izolata kao *C. jejuni*, 35 (43,7 %) izolata kao *C. upsaliensis*, šest (7,5 %) izolata kao *C. coli*, dok u tri (3,7 %) izolata nije identificirana vrsta.

Rezultati su prikazani na slici 5 i 6.



Slika 5. Prikaz zastupljenosti pojedinih vrsta bakterija roda *Campylobacter*



Slika 6. Elektroforegram multipleks PCR-a. Opis slike: M – biljeg s veličinama odsječaka DNK; 1. pozitivna kontrola *C. jejuni*, 2. pozitivna kontrola *C. upsaliensis*, 3. pozitivna kontrola *C. coli*, 4. izolat CAMP33, 5. izolat CAMP42, 6. izolat CAMP17.

5.3. Učestalost izdvajanja bakterija roda *Campylobacter* iz različitih skupina pasa

Analiza učestalosti izdvajanja bakterija roda *Campylobacter* iz različitih skupina pasa provedena je univarijantnim testom.

5.3.1. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema dobi pasa

Tijekom istraživnog razdoblja *Campylobacter* spp. izdvojen je iz 69 (31,9 %) pasa u dobi do godine dana i iz 55 (22,3 %) pasa starijih od godine dana. U tablici 17. prikazana je zastupljenost kampilobaktera izdvojenih iz pasa u dobi do jedne godine i starijih od jedne godine. Učestalost izdvajanja u pasa dobi do godine dana veća je od učestalosti izdvajanja u pasa starijih od godine dana, a razlika je statistički značajna ($p = 0,019$).

Tablica 17. Učestalost izdvajanja kampilobaktera iz pasa dobi do jedne godine i starijih od jedne godine

UZORCI	Dob psa		Ukupno
	≤ 1 god.	> 1 god.	
Negativni N (%)	147 (68,1)	192 (77,7)	339 (73,2)
Pozitivni N (%)	69 (31,9)	55 (22,2)	124 (26,8)
Ukupno N (%)	216 (100)	247 (100)	463* (100)

*tri su psa nepoznate dobi

Od ukupno 124 izolata *Campylobacter* spp. izdvojena tijekom istraživnog razdoblja, 80 izolata preživjelo je pohranjivanje te im je bilo moguće identificirati vrstu. U nastavku slijede rezultati analize učestalosti izdvajanja pojedinih vrsta kampilobaktera prema dobi pasa. Od 80 izolata, 42 (55 %) izdvojena su iz pasa dobi do godine dana, a 38 (45 %) iz pasa starijih od godine dana. U tablici 18. prikazana je zastupljenost pojedinih vrsta roda *Campylobacter* u analiziranim dobnim skupinama. Iako je *C. jejuni* više izdvajan u mladim, a *C. upsaliensis* u starijim pasa, opažene razlike u pojavnosti pojedinih vrsta kampilobaktera između pasa dobi do jedne godine i starijih od jedne godine nisu statistički značajne ($p = 0,173$).

Tablica 18. Zastupljenost vrsta roda *Campylobacter* u pasa dobi do godine dana i starijih od godine dana

VRSTA	Dob psa		Ukupno
	≤ 1 god	> 1 god	
<i>C. jejuni</i> N (%)	23 (54,8)	13 (34,2)	36 (45)
<i>C. upsaliensis</i> N (%)	14 (33,3)	21 (55,2)	35 (43,7)
<i>C. coli</i> N (%)	4 (9,5)	2 (5,3)	6 (7,5)
<i>Campylobacter</i> spp. N (%)	1 (2,4)	2 (5,3)	3 (3,8)
Ukupno N (%)	42 (100)	38 (100)	80 (100)

5.3.2. Učestalost izdvajanja kampilobaktera s obzirom na prisutnost proljeva

Campylobacter spp. izdvojen je u 39 (25,7 %) pasa bez proljeva i u 82 (29,5 %) psa s proljevom. Razlika u učestalosti izdvajanja *Campylobacter* spp. iz zdravih pasa i iz pasa s proljevom nije bila statistički značajna ($p = 0,397$). Rezultati su prikazani u tablici 19.

Tablica 19. Prikaz učestalosti proljeva u pretraženih pasa

UZORCI	Proljev		Ukupno
	NE	DA	
Negativni N (%)	113 (74,3)	196 (70,5)	309 (71,7)
Pozitivni N (%)	39 (25,7)	82 (29,5)	121 (28,3)
Ukupno N (%)	152 (100)	278 (100)	430*

*Za 36 pasa nije poznat podatak.

Broj izolata različitih vrsta kampilobaktera izdvojenih iz pasa s proljevom i pasa bez proljeva prikazan je u tablici 20. Svi psi u kojih je identificirana vrsta *C. coli* imali su proljev. Većina pasa iz kojih je izdvojen *C. jejuni* imala je proljev. Najniža pojavnost proljeva bila je u pasa iz kojih je izdvojen *C. upsaliensis*. Opažene razlike u pojavnosti proljeva u pasa s različitim vrstama kampilobaktera statistički su značajne ($p < 0,001$).

Tablica 20. Prikaz izdvojenih vrsta kampilobaktera u pasa s proljevom i pasa bez proljeva

VRSTA	Proljev		Ukupno
	NE	DA	
<i>Campylobacter jejuni</i> N (%)	8 (22,9)	27 (77,1)	35 (100)
<i>Campylobacter upsaliensis</i> N (%)	23 (65,7)	12 (34,3)	35 (100)
<i>Campylobacter coli</i> N (%)	0	6 (100)	6 (100)
<i>Campylobacter</i> spp. N (%)	2 (66,4)	1 (33,3)	3 (100)
Ukupno	33	46	79

Zastupljenost vrsta *C. jejuni* i *C. upsaliensis* u dvije dobne skupine pasa s proljevom i bez proljeva prikazana je u tablici 21. Uspoređujući zastupljenost vrsta *C. jejuni* i *C. upsaliensis* u dvije dobne skupine pasa s proljevom i bez proljeva, opaženo je da je vrsta *C. jejuni* češće izdvajana u pasa starosti do godine dana, dok je u pasa starijih od godine dana češće izdvajana vrsta *C. upsaliensis*. Opažena razlika statistički je značajna ($p = 0,04$). Proljev se pojavljuje češće u pasa iz kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni*. Opažene razlike u pojavnosti proljeva između pasa u kojih su izdvojene vrste *C. jejuni* i *C. upsaliensis* statistički se razlikuju ($p < 0,001$).

Budući da je količina izolata vrste *C. coli* te izolata označenih kao *Campylobacter* spp. bila premala za ovakav prikaz, oni nisu uvršteni u tablicu.

Tablica 21. Prikaz zastupljenosti vrsta *C. jejuni* i *C. upsaliensis* u dvije dobne skupine pasa i s obzirom na prisutnost proljeva

Dob	Proljev	<i>C. jejuni</i>	<i>C. upsaliensis</i>	UKUPNO
≤1 godina	NE	1	5	6
	DA	22	9	31
Ukupno		23	14	37
>1 godina	NE	7	18	25
	DA	6	3	9
Ukupno		13	21	34

5.3.3. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema vlasništvu pasa

Bakterije roda *Campylobacter* izdvojene su u 82 (22,6 %) vlasnička psa te u 42 (41,6 %) psa iz azila. U tablici 22. prikazana je učestalost izdvajanja kampilobaktera iz vlasničkih pasa i pasa iz azila. Udio pasa iz kojih je izdvojen *Campylobacter* spp. bio je dvostruko veći u pasa iz azila nego u vlasničkih pasa. Opažena razlika statistički je značajna ($p < 0,001$).

Tablica 22. Prikaz učestalosti izdvajanja kampilobaktera iz vlasničkih pasa i iz pasa iz azila

UZORCI	Vlasništvo psa		Ukupno
	Vlasnički	Azil	
Negativni N (%)	281 (77,4)	59 (58,4)	340 (73,3)
Pozitivni N (%)	82 (22,6)	42 (41,6)	124 (26,7)
Ukupno N (%)	363 (100)	101 (100)	464*

*dva su psa nepoznate dobi

5.3.4. Učestalost izdvajanja kampilobaktera prema vrsti hrane kojom su psi hranjeni

Od 287 pasa koji su hranjeni termički obrađenom hranom kampilobakteri su izdvojeni u 74 (25,8 %), dok su u pasa hranjenih BARF-om izdvojeni u 33 (37,5 %) od 88 pasa. U tablici 23. prikazana je zastupljenost kampilobaktera u pasa s obzirom na vrstu hrane kojom su hranjeni. U pasa hranjenih BARF-om zabilježena je veća učestalost izdvajanja kampilobaktera nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom. Opažena razlika statistički je značajna ($p = 0,033$). S obzirom na zastupljenost vrsta među izolatima ovog istraživanja, a odnosi se na pse hranjene BARF-om ($n = 28$), izdvojeno je 20 izolata *C. upsaliensis* (71,4 %), šest (21,4 %) izolata *C. jejuni*, te dva (7,14 %) izolata kojima nije određena vrsta. Razliku između 28 izolata iz pasa hranjenih BARF-om kojima su identificirane vrste i 33 izolata ukupno izdvojena iz pasa hranjenih BARF-om čini 5 izolata koji nisu preživjeli pohranjivanje.

Tablica 23. Prikaz učestalosti izdvajanja kampilobaktera iz pasa s obzirom na vrstu hrane kojom su hranjeni

SVI UZORCI	Vrsta hrane		Ukupno
	TO	BARF	
Negativni N (%)	213 (74,2)	55 (62,5)	268 (71,3)
Pozitivni N (%)	74 (25,8)	33 (37,5)	107 (28,5)
Ukupno N (%)	287 (100)	88 (100)	375*

*Za 91 psa nije bilo poznato čime se hrane. BARF – hrana na bazi sirovog mesa; TO – termički obrađena hrana

5.3.5. Učestalost izdvajanja kampilobaktera s obzirom na parvovirozu

Analizom parvoviroze kao promatranog čimbenika ustanovljeno je da je izdvajanje kampilobaktera bilo učestalije u pasa oboljelih od parvoviroze nego u ostalih pasa. Opažena razlika statistički je značajna ($p = 0,002$), a rezultati su prikazani u tablici 24.

Tablica 24. Izdvajanje kampilobaktera u pasa oboljelih od parvoviroze i ostalih pasa

UZORCI	Parvoviroza		Ukupno
	Ne boluju	Boluju	
Negativni N (%)	298 (87,4)	43 (12,6)	341 (100)
Pozitivni N (%)	94 (75,8)	30 (24,2)	124 (100)
Ukupno N (%)	392 (84,3)	73 (15,7)	465 (100)

*za jednog psa nije bio poznat podatak

5.4. Rezultati logističke regresije

U model logističke regresije uvršteni su čimbenici koji su bili statistički značajno povezani s izdvajanjem *Campylobacter* spp. u univarijantnom testu, a to su dob, vlasništvo, vrsta hrane i prisutnost parvoviroze. Proljev kao čimbenik nije bio statistički značajan.

Logističkom regresijom utvrđena je statistička značajnost za dva od četiri navedenih čimbenika; vlasništvo i vrstu hrane. Izgledi za izdvajanje bakterija roda *Campylobacter* bili su 2,38 puta veći u pasa iz azila nego u vlasničkih pasa, ako su drugi čimbenici konstantni ($p = 0,001$). Izgledi za izdvajanje bakterija roda *Campylobacter* bili su 3,09 puta veći u pasa hranjenih BARF-om nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom, ako su drugi čimbenici konstantni ($p = 0,001$). Rezultati logističke regresije prikazani su u tablici 25.

Tablica 25. Rezultati logističke regresije

Čimbenik	OR	SE _{OR}	Z	p	95% interval povjerenja	
Dob	0,76	0,26	-0,77	0,439	0,39	1,51
Vlasništvo	2,83	0,91	3,22	0,001	1,50	5,33
Vrsta hrane	3,09	1,03	3,38	0,001	1,61	5,93
Parvoviroza	1,84	0,64	1,77	0,077	0,94	3,62

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); SE_{OR} – standardna pogreška (engl. *standard error*); z – z-vrijednost; P – vjerojatnost

5.5. Statistička analiza podataka s obzirom na vrstu *C. jejuni*

Univarijantna statistička analiza pokazala je da su dob, vlasništvo i prisutnost parvoviroze povezani s izdvajanjem vrste *C. jejuni*, dok čimbenici proljev i vrsta hrane nisu. Udio pasa mlađih od godine dana u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni* (13,5 %) bio je veći od udjela pasa starijih od jedne godine (6,3 %). Opažene razlike statistički su značajne ($p = 0,019$). Rezultati su prikazani u tablici 26.

Tablica 26. Prikaz povezanost izdvajanja vrste *C. jejuni* s dobi pasa

		≤1 godine	> 1 godine	UKUPNO
<i>C. jejuni</i>	Negativni (N)	147	192	339
	%	86,5	93,7	90,4
	Pozitivni (N)	23	13	36
	%	13,5	6,3	9,6
UKUPNO		170	205	375

Udio vlasničkih pasa u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni* (6,6 %) manji je od udjela pasa iz azila (21,3 %). Opažene razlike statistički su značajne ($p < 0,001$). Rezultati su prikazani u tablici 27.

Tablica 27. Prikaz povezanosti izdvajanja vrste *C. jejuni* s vlasničkim statusom pasa

		Vlasnički	Azil	UKUPNO
<i>C. jejuni</i>	Negativni (N)	281	59	340
	%	93,4	78,7	90,4
	Pozitivni (N)	20	16	36
	%	6,6	21,3	9,6
UKUPNO		301	75	376

Udio pasa u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni* te su istodobno bolovali od parvoviroze (18,9 %) veći je od udjela pasa u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni*, a koji nisu bolovali od parvoviroze (8,02 %). Opažene razlike statistički su značajne ($p = 0,013$). Rezultati su prikazani u tablici 28.

Tablica 28. Prikaz povezanosti izdvajanja vrste *C. jejuni* s parvovirozom pasa

		Ne boluju od parvoviroze	Boluju od parvoviroze	UKUPNO
<i>C. jejuni</i>	Negativni (N)	298	43	341
	%	92	81,1	90,5
	Pozitivni (N)	26	10	36
	%	8,02	18,9	9,6
UKUPNO		324	53	377

Navedene varijable (dob psa, parvoviroza i vlasnički status) bile su uključene u model logističke regresije. Logistička regresija pokazala je da izdvajanje vrste *C. jejuni* nije statistički značajno povezano ni s jednim od analiziranih čimbenika. Rezultati su prikazani u tablici 29.

Tablica 29. Prikaz povezanosti promatranih čimbenika s izdvajanjem vrste *C. jejuni*

Čimbenik	OR	SE _{OR}	z	p	95% CI
Dob	0,49	0,20	-1,721	0,09	0,21 – 1,11
Vlasništvo (azil)	0,88	0,15	-0,766	0,44	0,63 – 1,22
Parvoviroza	1,99	0,91	1,503	0,13	0,81 – 4,88

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); SE_{OR} – standardna pogreška (engl. *standard error*); z – z-vrijednost; p – vjerojatnost

5.6. Statistička analiza podataka s obzirom na vrstu *C. upsaliensis*

Univarijantna statistička analiza pokazala je da su prisutnost proljeva, vlasništvo i hrana povezani s izdvajanjem vrste *C. upsaliensis*, dok čimbenici dob i parvoviroza nisu. Većina pasa iz kojih je izdvojen *C. upsaliensis* nije imala proljev, dok je u skupini pasa negativnih na *C. upsaliensis* većina pasa imala proljev. *C. upsaliensis* znatno je češće izdvajan iz pasa bez proljeva nego iz pasa s proljevom ($p = 0,001$). Rezultati su prikazani u tablici 30.

Tablica 30. Prikaz povezanosti izdvajanja vrste *C. upsaliensis* s prisutnošću proljeva

		Bez proljeva	S proljevom	UKUPNO
<i>C. upsaliensis</i>	Negativni (N)	113	196	309
	%	36,6	63,4	100
	Pozitivni (N)	23	12	35
	%	65,7	34,3	100
UKUPNO		136	208	344

Vrsta *C. upsaliensis* češće je bila izdvojena u vlasničkim pasa nego u pasa iz azila. Opažene razlike statistički su značajne ($p = 0,014$). Rezultati su prikazani u tablici 31.

Tablica 31. Prikaz povezanost izdvajanja vrste *C. upsaliensis* s obzirom na vlasnički status

		Vlasnički psi	Psi iz azila	UKUPNO
<i>C. upsaliensis</i>	Negativni (N)	281	59	340
	%	89,2	98,3	
	Pozitivni (N)	34	1	35
	%	10,8	1,7	
UKUPNO		315	60	375

Vrsta *C. upsaliensis* češće je bila izdvojena u pasa hranjenih BARF-om nego u pasa hranjenih termički obrađenom komercijalnom hranom. Opažene razlike statistički su značajne ($p < 0,001$). Rezultati su prikazani u tablici 32.

Tablica 32. Prikaz povezanosti izdvajanja vrste *C. upsaliensis* s obzirom na hranu kojom su psi hranjeni

		TO	BARF	UKUPNO
<i>C. upsaliensis</i>	Negativni (N)	213	55	268
	%	93,8	74,3	
	Pozitivni (N)	14	19	33
	%	6,2	25,7	
UKUPNO		227	74	301

BARF – hrana na bazi sirovog mesa; TO – termički obrađena hrana

Logistička regresija pokazala je da je samo vrsta hrane bila statistički značajno povezana s izdvajanjem vrste *C. upsaliensis*. Izgledi za izdvajanje vrste *C. upsaliensis* bili su 4,05 puta veći u pasa hranjenih BARF-om ($p < 0,01$) u odnosu na pse hranjene termički obrađenom hranom. Rezultati su prikazani u tablici 33.

Tablica 33. Prikaz povezanost promatranih čimbenika s obzirom na izdvajanje vrste *C. upsaliensis*

Čimbenik	OR	SE _{OR}	z	p	95 % CI
Proljev	1,06	0,60	0,097	0,923	0,35 - 3,22
Vlasništvo	0,58	0,21	-1,527	0,13	0,29 – 1,16
Vrsta hrane	4,05	2,23	2,549	0,011	1,38 – 11,14

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*); SE_{OR} – standardna pogreška (engl. *standard error*); z – z-vrijednost; p – vjerojatnost

5.7. Usporedba skupina pasa s obzirom na izdvojenu vrstu roda *Campylobacter*

Vrsta *C. jejuni* češće je izdvojena u pasa mlađih od godine dana u odnosu na *C. upsaliensis* koji je češće izdvojen iz pasa starijih od jedne godine. Opažene razlike statistički su značajne ($p = 0,04$). U pasa s parvovirozom češće je izdvojena vrsta *C. jejuni* u odnosu na *C. upsaliensis*. Opažena razlika statistički je značajna ($p = 0,036$). U pasa s proljevom češće je izdvojena vrsta *C. jejuni* u odnosu na *C. upsaliensis*. Opažena razlika statistički je značajna ($p < 0,001$).

Uzimajući u obzir samo vrste *C. jejuni* i *C. upsaliensis*, uočeno je da su gotovo svi izolati *C. upsaliensis* (97 %) izdvojeni iz vlasničkih pasa. Vrsta *C. jejuni* također je češće izdvojena iz vlasničkih pasa. Opažena razlika je statistički značajna ($p < 0,001$).

Vrsta *C. jejuni* češće je izdvojena iz pasa hranjenih termički obrađenom hranom dok je vrsta *C. upsaliensis* češće izdvojena iz pasa hranjenih BARF-om. Razlika je statistički značajna ($p = 0,004$).

5.8. Antimikrobna osjetljivost bakterija roda *Campylobacter*

Antimikrobna osjetljivost na sve pretraživane antimikrobne tvari ispitana je za 78 izolata. Za jedan izolat (CAMP23) nije ispitana osjetljivost na antimikrobne tvari, dok za jedan izolat (CAMP24) nije ispitana osjetljivost na tetraciklin.

Na ciprofloksacin je bilo rezistentno 45/79 (57 %) izolata *Campylobacter* spp., na tetraciklin 16/78 (20,5 %), na eritromicin 2/79 (2,5 %), a ni jedan izolat nije bio rezistentan na azitromicin.

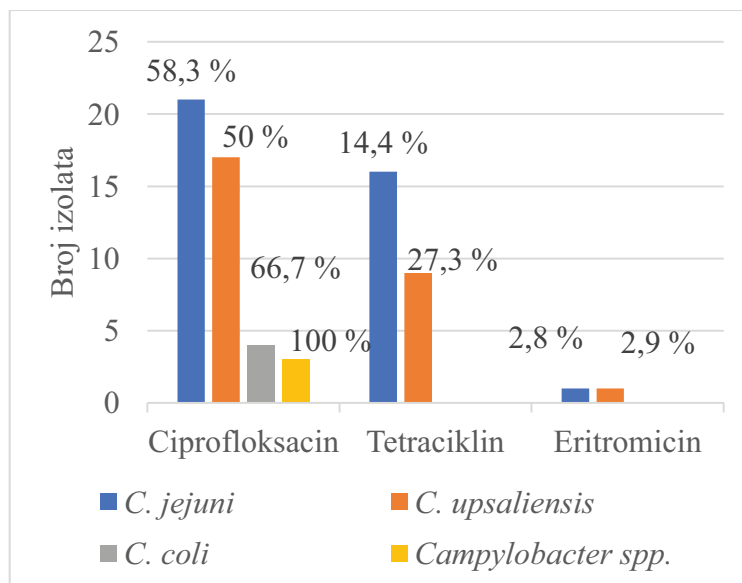
Od 36 izolata *C. jejuni* 21 (58,3 %) izolat bio je rezistentan na ciprofloksacin, 16 (44,4 %) na tetraciklin, a jedan (2,8 %) na eritromicin.

Od 34 izolata vrste *C. upsaliensis* 17 (50 %) bilo je rezistentno na ciprofloksacin, jedan (2,9 %) na eritromicin, a 9/33 (27,3 %) bilo je rezistentno na tetraciklin.

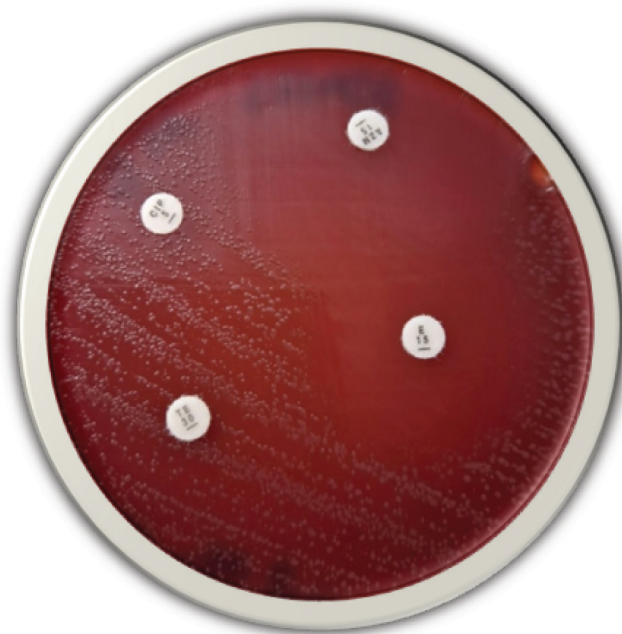
Od šest izolata *C. coli* četiri (66,7 %) bila su rezistentna na ciprofloksacin, dok su na ostale ispitivane tvari svi bili osjetljivi.

Tri izolata, kojima nije identificirana vrsta, bila su rezistentna na ciprofloksacin te osjetljiva na ostale ispitane antibiotike.

Grafički prikaz rezultata rezistentnih izolata vidljiv je na slici 7. Na slici 8. prikazan je rezultat ispitivanja antimikrobne osjetljivosti disk-difuzijskom metodom prema Kirby-Baueru za izolat CAMP2.



Slika 7. Zastupljenost rezistentnih izolata na ciprofloksacin, tetraciklin i eritromicin



Slika 8. Rezultat ispitivanja antimikrobne osjetljivosti disk-difuzijskom metodom prema Kirby-Baueru CAMP2.

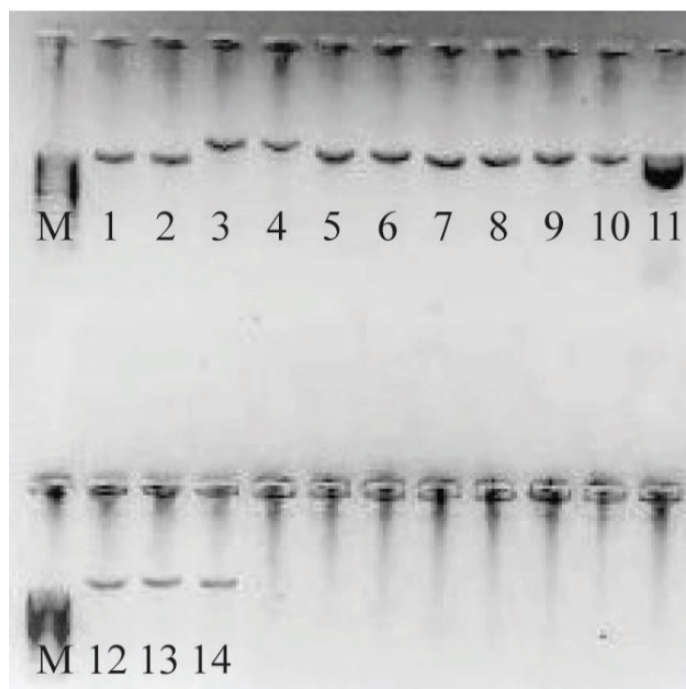
Četrnaest izolata bilo je istodobno rezistentno na ciprofloksacin i tetraciklin; 9 izolata vrste *C. upsaliensis* i 5 izolata vrste *C. jejuni*. Istodobna rezistencija na ciprofloksacin i eritromicin zabilježena je u po jednom izolatu *C. jejuni* i *C. upsaliensis*. Jedan izolat vrste *C. upsaliensis*

bio je rezistentan eritromicin i tetraciklin. Ni jedan izolat nije bio istodobno rezistentan na ciprofloksacin i azitromicin, odnosno tetraciklin i azitromicin.

Učestalost istodobne rezistencije prema ciprofloksacinu i tetraciklinu bila je najveća u vrste *C. upsaliensis* (51,52 %). Razlike u istodobnoj rezistenciji na ciprofloksacin i tetraciklin među različitim vrstama kampilobaktera statistički su značajne ($p = 0,036$). Za ostale kombinacije istodobnih rezistencija na antibiotike nije bilo statistički značajne razlike među vrstama kampilobaktera.

5.9. Genotipizacija MLST metodom izolata *Campylobacter* spp.

Od 80 izolata *Campylobacter* spp. za genotipizaciju MLST metodom odabrano je 16 izolata *C. jejuni*, 6 izolata *C. coli* te 5 izolata *C. upsaliensis*. Ukupno je sekvencirano 189 genskih lokusa. Unutar izolata vrste *C. jejuni* opisano je 11 sekvencijskih tipova koji su smješteni u šest klonskih kompleksa. Jedan izolat nije smješten ni u jedan klonski kompleks. Rezultati su skupo prikazani u tablici 34. Na slici 9. prikazan je elektroforegram PCR-a za umnažanje MLST-a održavateljskih gena vrste *C. jejuni*.



Slika 9. Prikaz elektroforegrama PCR-a za MLST održavateljskih gena vrste *C. jejuni* za izolate CAMP2 (oznake 1-7) i CAMP3 (oznake 8-14). Opis slike: M – biljeg s veličinama odsječaka DNK.

Tablica 34. Prikaz rezultata MLST-a izolata vrste *C. jejuni*

MLST oznaka izolata	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	ST	CC (MLST)
CJ1	2	1	1	3	2	226	5	1943	ST-21
CJ2	2	1	1	3	2	226	5	1943	ST-21
CJ3	4	7	10	4	42	25	1	538	ST-45
CJ4	2	4	5	25	11	1	5	2086	ST-206
CJ5	180	654	2	213	19	231	147	9354	-
CJ6	4	7	10	4	42	25	1	538	ST-45
CJ7	7	17	2	15	23	3	12	51	ST-443
CJ8	62	4	5	2	2	1	5	572	ST-206
CJ9	24	27	59	19	10	5	7	10039	ST-403
CJ10	62	4	5	10	2	1	5	3335	ST-206
CJ11	24	27	59	19	10	5	7	10039	ST-403
CJ12	24	27	59	19	10	5	7	10039	ST-403
CJ13	62	4	5	3	2	1	5	3156	ST-21
CJ14	2	1	5	3	2	1	5	19	ST-21
CJ15	2	4	1	4	19	62	5	475	ST-48
CJ16	2	1	1	3	2	226	5	1943	ST-21

Genotipizacijom šest izolata vrste *C. coli* opisana su dva sekvencijska tipa koja su smještena u isti klonski kompleks. Rezultati su prikazani u tablici 35.

Tablica 35. Prikaz rezultata MLST-a izolata vrste *C. coli*

MLST oznaka izolata	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt	uncA	ST	CC (MLST)
COLI 1	33	39	30	82	113	47	17	825	ST-828
COLI 2	33	39	30	79	104	47	17	830	ST-828
COLI 3	33	39	30	82	113	47	17	825	ST-828
COLI 4	33	39	30	82	113	47	17	825	ST-828
COLI 5	33	39	30	82	113	47	17	825	ST-828
COLI 6	33	39	30	82	113	47	17	825	ST-828

Genotipizacijom pet izolata vrste *C. upsaliensis* opisano je pet sekvencijskih tipova. Na temelju nove kombinacije već poznatih alela utvrđena su tri nova sekvencijska tipa (slike 10., 11. i 12.). Samo je jedan izolat smješten u već opisani klonski kompleks, dok ostala četiri ne pripadaju ni jednom poznatom klonskom kompleksu. Rezultati su prikazani u tablici 36.

Tablica 36. Prikaz rezultata MLST-a izolata vrste *C. upsaliensis*

MLST oznaka izolata	adk	aspA	atpA	glnA	glyA	pgi	tkt	ST	CC (MLST)
CU1	1	45	9	33	9	12	1	217*	-
CU2	10	61	1	40	13	12	49	156	-
CU3	17	11	1	9	9	12	1	65	ST-16
CU4	7	3	40	28	20	12	33	218*	-
CU5	13	3	1	40	11	1	60	219*	-

*novi sekvencijski tipovi

PubMLST Public databases for molecular typing and microbial genome diversity

Home > Organisms > *Campylobacter non-jejuni/coli* > *Campylobacter non-jejuni/coli* isolates > Isolate information

Full information on isolate CU1 (id:832)

Provenance/primary metadata

- id: 832
- isolate: CU1
- country: Croatia
- continent: Europe
- year: 2017
- disease: gastroenteritis
- source: dog

epidemiology: sporadic case

species: *Campylobacter upsaliensis*

sender: Marija Cvetnić, Veterinary Faculty of University of Zagreb

curator: William Miller, Produce Safety and Microbiology Research Unit, USDA, USA (E-mail: William.Miller@ARS.USDA.GOV)

date entered: 2023-06-05

datestamp: 2023-06-05

update history: 1 update show details

Schemes and loci Hide tree

All loci

C. upsaliensis MLST

Cupadk	CupaspA	CupatpA	CupglnA	CupglyA	Cuppgi	Cuptkt	ST	clonal complex
1	45	9	33	9	12	1	217	Not defined

Tools

Export: Sequences

Slika 10. Prikaz podataka iz pubMLST baze *Campylobacter non-jejuni/coli* za izolat CU1

PubMLST Public databases for molecular typing and microbial genome diversity

Home > Organisms > *Campylobacter non-jejuni/coli* > *Campylobacter non-jejuni/coli* isolates > Isolate information

Full information on isolate CU4 (id:835)

Provenance/primary metadata

- id: 835
- isolate: CU4
- country: Croatia
- continent: Europe
- year: 2019
- disease: gastroenteritis
- source: dog

epidemiology: hospital inpatient

species: *Campylobacter upsaliensis*

sender: Marija Cvetnić, Veterinary Faculty of University of Zagreb

curator: William Miller, Produce Safety and Microbiology Research Unit, USDA, USA (E-mail: William.Miller@ARS.USDA.GOV)

date entered: 2023-06-05

datestamp: 2023-06-05

update history: 1 update show details

Schemes and loci Hide tree

All loci

C. upsaliensis MLST

Cupadk	CupaspA	CupatpA	CupglnA	CupglyA	Cuppgi	Cuptkt	ST	clonal complex
7	3	40	28	20	12	33	218	Not defined

Tools

Export: Sequences

Slika 11. Prikaz podataka iz pubMLST baze *Campylobacter non-jejuni/coli* za izolat CU4

PubMLST Public databases for molecular typing and microbial genome diversity MY ACCOUNT

HOME ORGANISMS SPECIES ID ABOUT US UPDATES

Home > Organisms > *Campylobacter non-jejuni/coli* > *Campylobacter non-jejuni/coli* isolates > Isolate information

Full information on isolate CU5 (id:836)

Provenance/primary metadata

id: 836	epidemiology: carrier	date entered: 2023-06-05
isolate: CU5	species: <i>Campylobacter upsaliensis</i>	datestamp: 2023-06-05
country: Croatia	sender: Marija Cvetnić, Veterinary Faculty of University of Zagreb	
continent: Europe	curator: William Miller, Produce Safety and Microbiology Research Unit, USDA, USA (E-mail: William.Miller@ARS.USDA.GOV)	
year: 2019	update history: 1 update show details	
disease: carrier		
source: dog		

Schemes and loci [Hide tree](#)

- All loci
- └ C. upsaliensis MLST

C. upsaliensis MLST								
C _{wpadk}	C _{wpaspA}	C _{wpatpA}	C _{wpglnA}	C _{wpglyA}	C _{wpggi}	C _{wprkt}	ST	clonal complex
13	3	1	40	11	1	60	219	Not defined

Tools

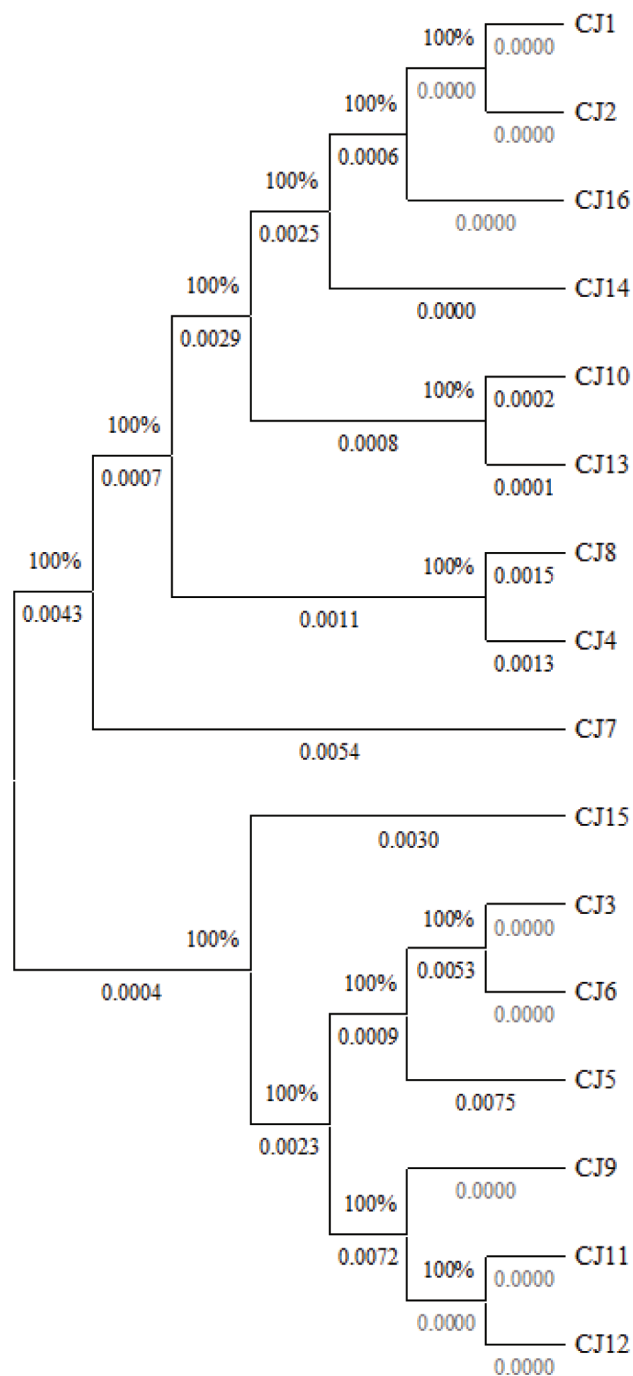
[Export: Sequences](#)

Slika 12. Prikaz podataka iz pubMLST baze *Campylobacter non-jejuni/coli* za izolat CU5

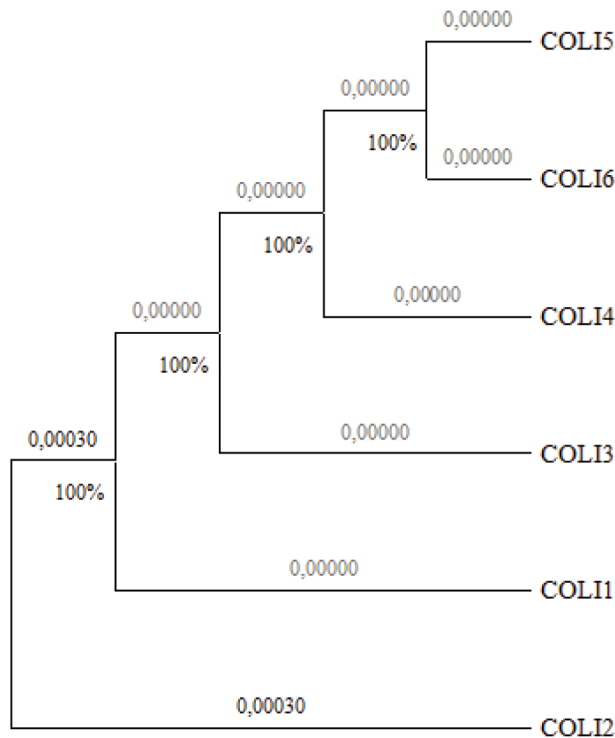
5.10. Filogenetska analiza izolata *Campylobacter* spp.

Filogenetska analiza metodom susjednog spajanja (engl. *neighbor-joining*) dala je rezultate koji su prikazani na dendrogramima 1., 2. i 3. Analiza je rezultirala “optimalnim stablom”, tj. filogenetskim stablom koje najbolje predstavlja odnose među proučavanim sekvencijama na temelju dostupnih podataka.

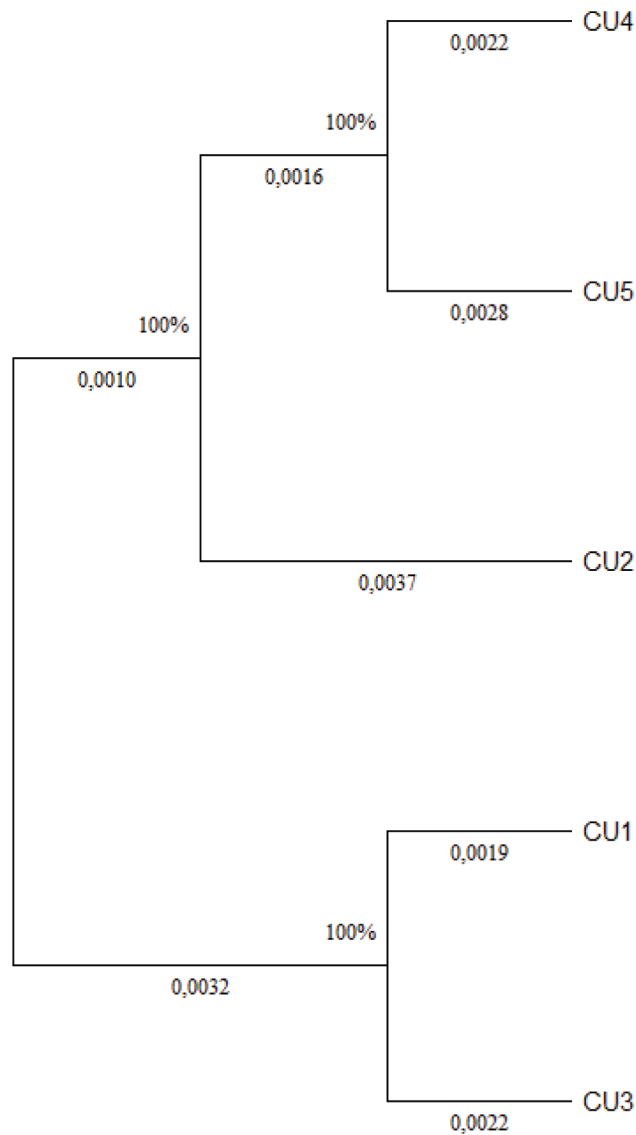
Na slikama 13., 14., 15., 16. prikazani su MST-ovi. Primijenjena je napredna analiza klastera s 1000 *bootstrap*-uzorkovanja. Maksimalni broj varijanti s n-lokusa bio je 5.



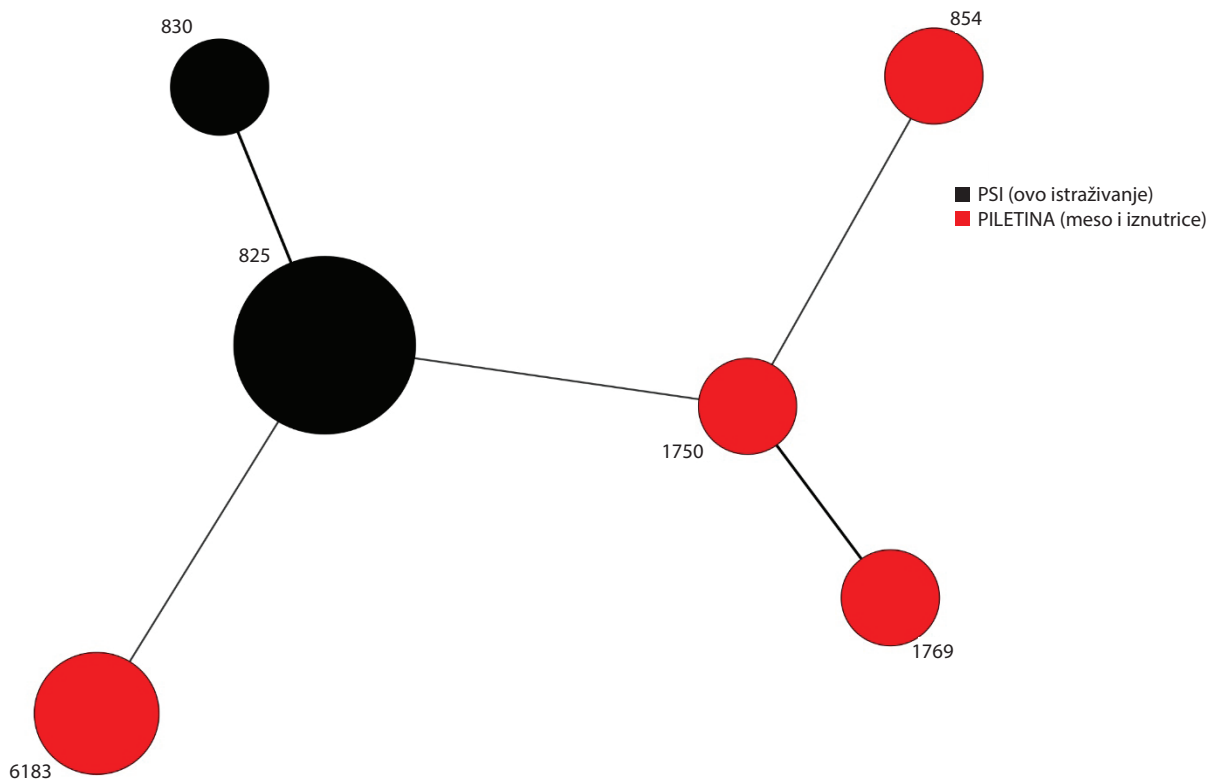
Dendrogram 1. Filogenetsko stablo vrste *C. jejuni* izolata iz ovog istraživanja. Opis stabla: Filogenetska analiza izvedena je metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*). Prikazano je optimalno stablo. Postotak replikata stabala u kojima su povezani taksoni grupirani zajedno u *bootstrap*-testu (1000 replikata) prikazan je iznad grana. Evolucijske udaljenosti izračunate su primjenom Tamura-Nei metode i izražene su u jedinicama broja zamjena baza po mjestu. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama-distribucijom (oblik parametra = 1). Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije. Ova analiza obuhvatila je 16 nukleotidnih sekvencija s ukupno 3309 pozicija u konačnom skupu podataka.



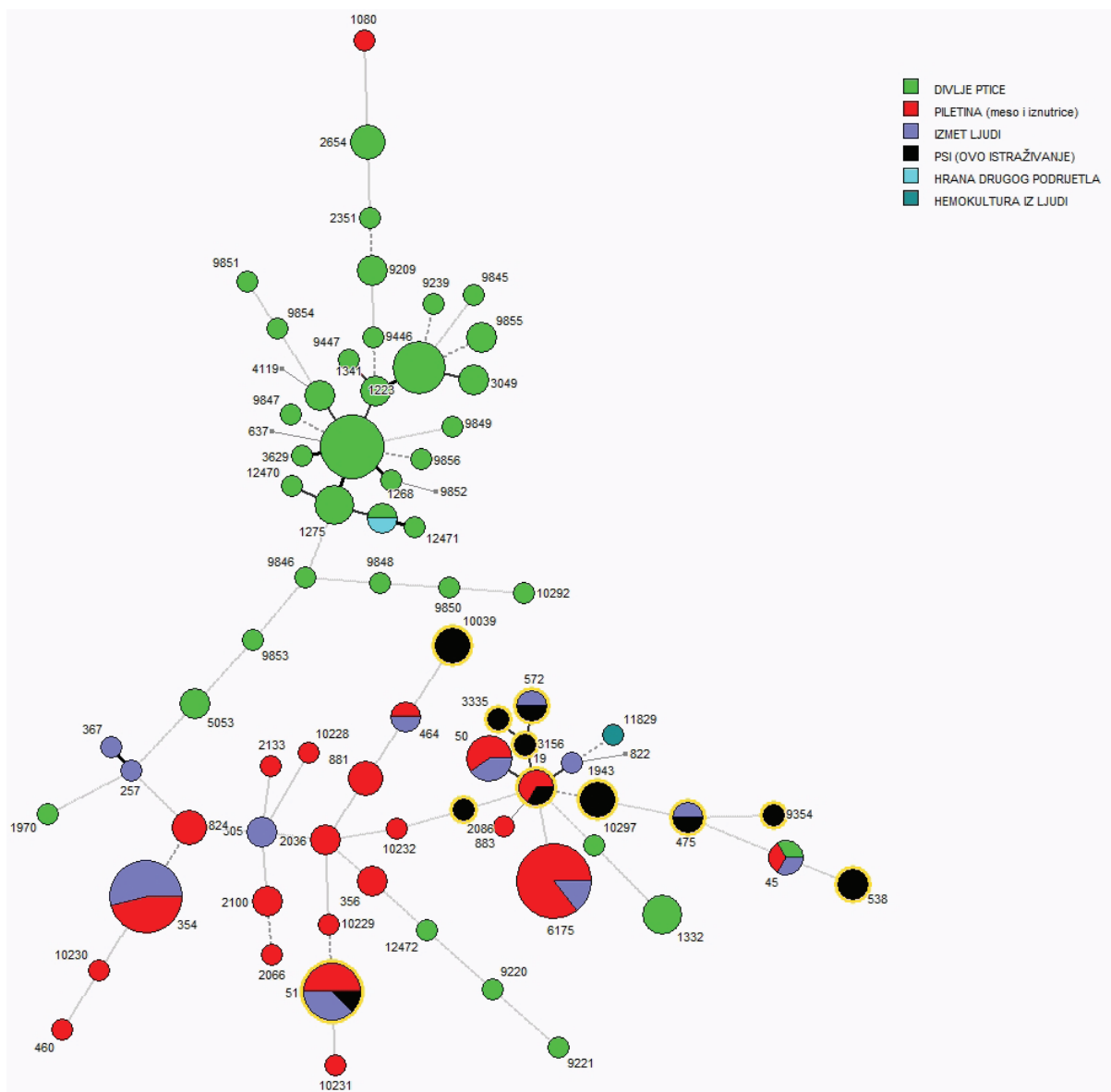
Dendrogram 2. Filogenetsko stablo vrste *C. coli*. Opis stabla: Filogenetska analiza izvedena je metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*). Prikazano je optimalno stablo. Postotak replikata stabala u kojima su povezani taksoni grupirani zajedno u *bootstrap*-testu (1000 replikata) prikazan je ispod grana. Evolucijske udaljenosti izračunate su primjenom Tamura 3-parametarsku metode i izražene su u jedinicama broja zamjena baza po mjestu. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama-distribucijom (oblik parametra = 1). Ova analiza obuhvatila je 6 nukleotidnih sekvencija, a ukupno je bilo 3309 pozicija u konačnom skupu podataka. Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije.



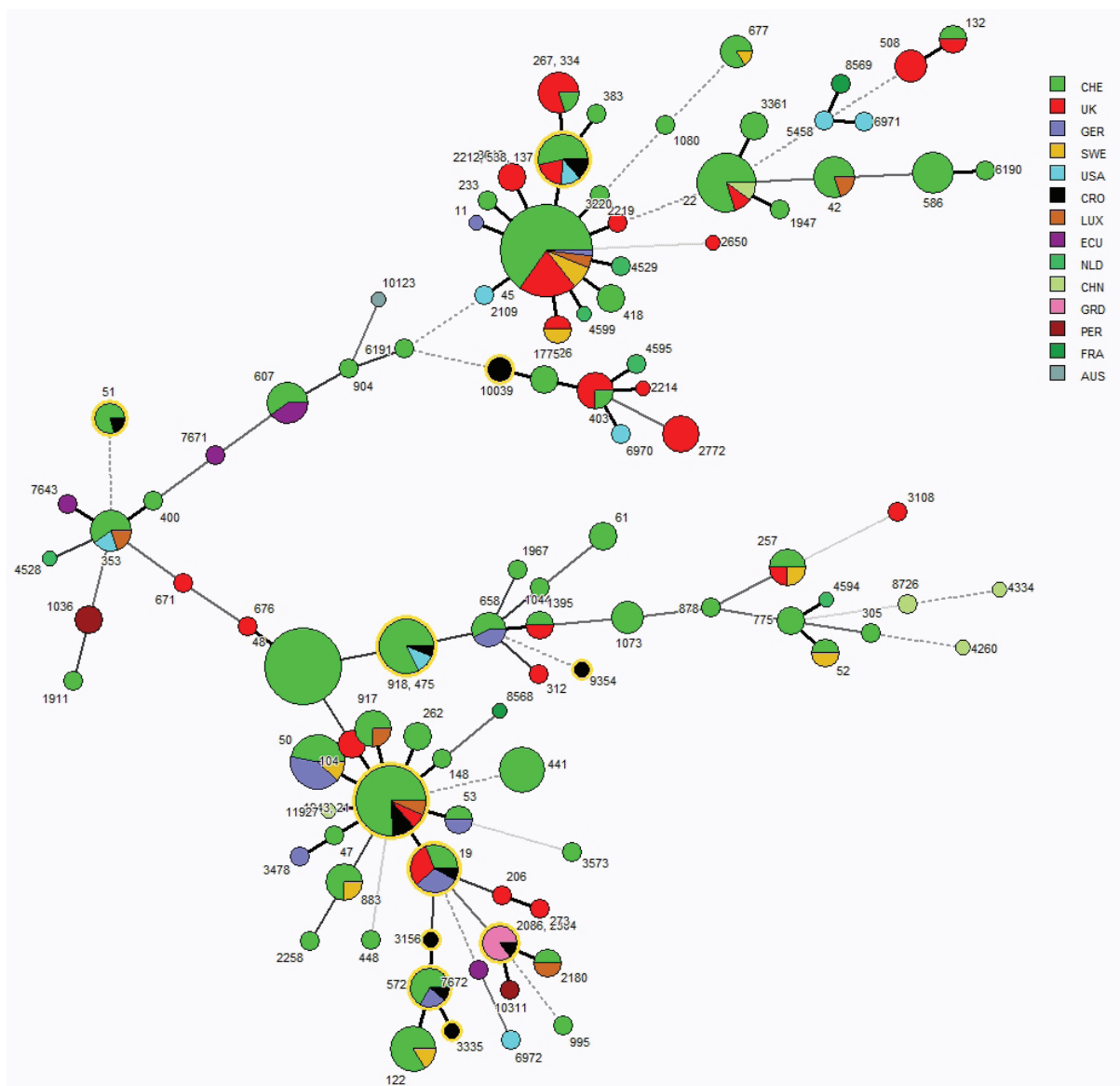
Dendrogram 3. Filogenetsko stablo vrste *C. upsaliensis*. Opis stabla: Filogenetska analiza izvedena je metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*). Prikazano je optimalno stablo. Postotak replikata stabala u kojima su povezani taksoni grupirani zajedno u *bootstrap*-testu (1000 replikata) prikazan je iznad grana. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom Tamura-Nei i izražene u jedinicama broja zamjena baza po mjestu. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama-distribucijom (oblik parametra = 1). Ova analiza uključivala je 5 nukleotidnih sekvencija, a ukupno 3243 pozicije. Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije.



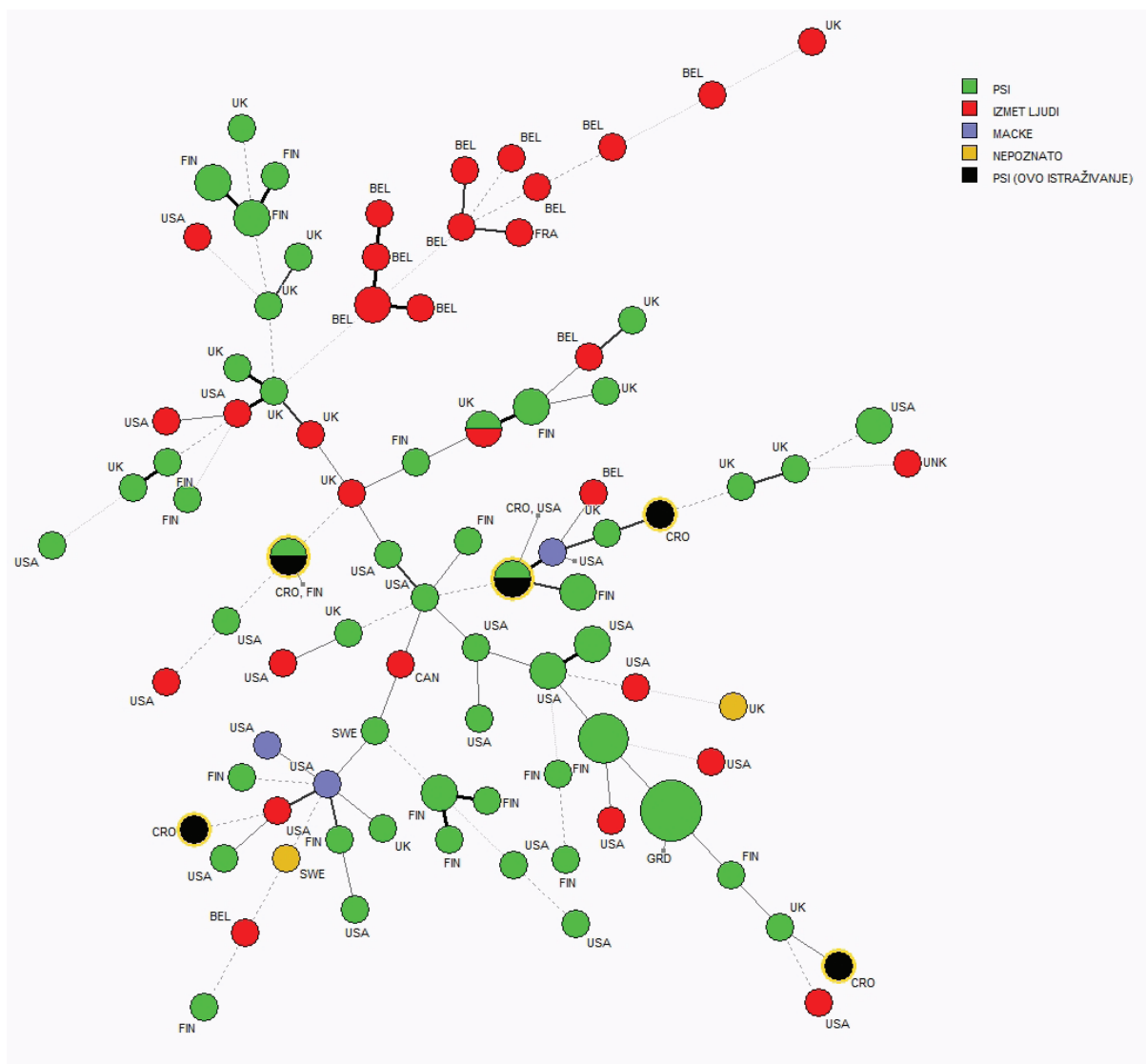
Slika 13. MST izolata *C. coli* iz Republike Hrvatske koji su upisani u pubMLST bazu. Opis slike: Prikazani su alelni profili izolata *C. coli* u odnosu na izvore izolata, koji su označeni prema legendi u gornjem desnom kutu, te međusobnu izračunatu udaljenost. Brojevi pokraj krugova označavaju ST. Krugovi većeg promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s krugovima manjeg promjera. Deblja linija upućuje na razliku od jednog alela između izolata odnosno skupinama izolata, dok tanje linije upućuju na razliku od dva odnosno tri alela.



Slika 14. MST izolata *C. jejuni* iz Republike Hrvatske koji su upisani u pubMLST bazu. Opis slike: Prikazani su alelni profili (brojevi pokraj krugova označavaju ST) izolata *C. jejuni* u odnosu na izvor izolata te međusobnu izračunatu udaljenost. Krugovi većeg promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s krugovima manjeg promjera. Najdeblje linije upućuju na razliku od jednog alela između izolata odnosno skupinama izolata, dok tanje linije upućuju na razliku od dva odnosno tri alela. Isprekidane linije upućuju na razliku od četiri alela, a točkaste linije simboliziraju razliku od više od četiri alela. Izvori izolata označeni su prema legendi desno od prikaza.



Slika 15. MST izolata *C. jejuni* iz pasa upisanih u pubMLST bazu. Opis slike: Prikazani su alelni profili (brojevi pokraj krugova označavaju ST) izolata *C. jejuni* u odnosu na državu podrijetla te međusobnu izračunatu udaljenost. Najdeblje linije upućuju na razliku od jednog alela između izolata odnosno skupinama izolata, dok tanje linije upućuju na razliku od dva odnosno tri alela. Isprekidane linije upućuju na razliku od četiri alela, a točkaste linije simboliziraju razliku od više od četiri alela. Geografsko podrijetlo (država podrijetla) alelnih profila označeno je prema legendi desno od prikaza gdje su korištene internacionalne kratice od tri slova.



Slika 16. MST izolata *C. upsaliensis* upisanih u pubMLST bazu. Opis slike: Prikazane su skupine izolata *C. upsaliensis* u odnosu na geografsko podrijetlo izolata i njihove izvore koji su prikazani u legendi. Najdeblje linije upućuju na razliku od jednog alela između izolata odnosno skupinama izolata, dok tanje linije upućuju na razliku od dva odnosno tri alela. Isprekidane linije upućuju na razliku od četiri alela, a točkaste linije simboliziraju razliku od više od četiri alela. Geografsko podrijetlo (država podrijetla) alelnih profila označeno je prema legendi desno od prikaza gdje su korištene internacionalne kratice od tri slova.

Tablica 37. Prikaz izolata i podataka o psu iz kojih izolat potječe

Redni broj izolata	Laboratorijska oznaka izolata	Vrsta	Dob	Godina izdvajanja	Ciprofloksacin	Eritromicin	Azitromicin	Tetraciklin	Parvoviroza	Proljevi	VI.asništvo	Vrsta hrane	MLST oznaka izolata
1.	CAMP1	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'13.	R	S	S	S	NT	NP	VI.	NP	NT
2.	CAMP2	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'13.	R	S	S	R	POZ.	DA	VI.	NP	CJ7
3.	CAMP3	<i>C. jejuni</i>	>1g	'13.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	CJ8
4.	CAMP4	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'13.	R	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ16
5.	CAMP5	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'13.	R	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ2
6.	CAMP6	<i>C. jejuni</i>	>1g	'13.	S	S	S	R	NT	DA	Azil	TO	CJ1
7.	CAMP7	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'14.	S	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	CJ3
8.	CAMP8	<i>C. jejuni</i>	>1g	'14.	R	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ5
9.	CAMP9	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'14.	R	S	S	R	POZ.	DA	Azil	TO	CJ4
10.	CAMP10	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'14.	S	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	CJ6
11.	CAMP11	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'14.	R	R	S	S	NT	DA	VI.	NP	NT
12.	CAMP12	<i>C. jejuni</i>	>1g	'16.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	CJ15
13.	CAMP13	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'17.	R	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	CU1
14.	CAMP14	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'17.	S	S	S	S	NT	NE	VI.	NP	NT
15.	CAMP15	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'17.	R	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	NT
16.	CAMP16	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'17.	R	S	S	S	NT	DA	VI.	NP	NT
17.	CAMP17	<i>C. coli</i>	>1g	'17.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	NP	COLI3
18.	CAMP18	<i>C. coli</i>	<=1g	'17.	S	S	S	S	NEG.	DA	VI.	NP	COLI4
19.	CAMP19	<i>C. jejuni</i>	>1g	'18.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	NT
20.	CAMP20	<i>C. jejuni</i>	>1g	'18.	S	S	S	R	NEG.	DA	VI.	TO	NT
21.	CAMP21	<i>C. coli</i>	>1g	'18.	R	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	COLI1
22.	CAMP22	<i>C. coli</i>	<=1g	'18.	R	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	COLI2
23.	CAMP23	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'18.	NT	NT	NT	NT	POZ.	DA	Azil	TO	NT
24.	CAMP24	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'18.	R	S	S	NT	NEG.	DA	VI.	TO	NT
25.	CAMP25	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'18.	R	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	NT
26.	CAMP26	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'18.	S	S	S	S	NT	NE	VI.	TO	NT
27.	CAMP27	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'19.	R	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	CJ10
28.	CAMP28	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'19.	R	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	NT
29.	CAMP29	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'19.	S	S	S	S	POZ.	DA	VI.	NP	CU4
30.	CAMP30	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ13
31.	CAMP31	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	DA	VI.	TO	NT
32.	CAMP32	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'19.	R	S	S	R	NEG.	DA	VI.	TO	NT
33.	CAMP33	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	S	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	CJ9
34.	CAMP34	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	S	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ11
35.	CAMP35	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	S	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	CJ12
36.	CAMP36	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'20.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	NT
37.	CAMP37	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	R	S	S	S	NT	DA	Azil	TO	NT
38.	CAMP38	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	R	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	CJ14
39.	CAMP39	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'20.	S	S	S	S	NT	DA	VI.	TO	NT
40.	CAMP40	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'20.	R	S	S	S	POZ.	DA	Azil	TO	NT

41.	CAMP41	<i>Campylobacter</i> spp.	>1g	'21.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	TO	NT
42.	CAMP42	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'21.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	TO	CU2
43.	CAMP43	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'21.	R	S	S	R	POZ.	DA	Vl.	TO	NT
44.	CAMP44	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'21.	S	S	S	S	NT	DA	Vl.	TO	NT
45.	CAMP45	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'21.	R	S	S	S	DA	DA	Azil	TO	NT
46.	CAMP46	<i>Campylobacter</i> spp.	<=1g	'21.	R	S	S	S	NT	DA	Vl.	BARF	NT
47.	CAMP47	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'21.	S	S	S	S	NT	DA	Vl.	TO	NT
48.	CAMP48	<i>C. coli</i>	<=1g	'21.	R	S	S	S	POZ.	DA	Vl.	TO	COLI5
49.	CAMP49	<i>C. coli</i>	<=1g	'21.	R	S	S	S	NEG.	DA	Vl.	TO	COLI6
50.	CAMP50	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'22.	S	S	S	S	NT	DA	Vl.	TO	CU3
51.	CAMP51	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'22.	S	S	S	S	NEG.	DA	Vl.	TO	NT
52.	CAMP52	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'22.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	TO	NT
53.	CAMP53	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'22.	R	S	S	S	POZ.	DA	Vl.	TO	NT
54.	CAMP54	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
55.	CAMP55	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
56.	CAMP56	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
57.	CAMP57	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
58.	CAMP58	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
59.	CAMP59	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
60.	CAMP60	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
61.	CAMP61	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
62.	CAMP62	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
63.	CAMP63	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	R	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	CU5
64.	CAMP64	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
65.	CAMP65	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
66.	CAMP66	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
67.	CAMP67	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
68.	CAMP68	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
69.	CAMP69	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
70.	CAMP70	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
71.	CAMP71	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
72.	CAMP72	<i>C. jejuni</i>	<=1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
73.	CAMP73	<i>C. jejuni</i>	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
74.	CAMP74	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
75.	CAMP75	<i>C. upsaliensis</i>	<=1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
76.	CAMP76	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
77.	CAMP77	<i>Campylobacter</i> spp.	>1g	'19.	R	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
78.	CAMP78	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	S	S	S	S	NT	NE	Vl.	BARF	NT
79.	CAMP79	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT
80.	CAMP80	<i>C. upsaliensis</i>	>1g	'19.	R	S	S	R	NT	NE	Vl.	BARF	NT

< = 1 g do godinu dana; > 1 g stariji od godinu dana; S – osjetljiv; R – neosjetljiv; NEG – negativno; POZ – pozitivno; NT – nije testirano; Vl. – vlasnički pas; NP – nepoznato; TO – komercijalna termički obrađena hrana; BARF – komercijalna sirova hrana.

6. RASPRAVA

Različite vrste roda *Campylobacter* široko su rasprostranjene među mnogim domaćinima, u okolišu i hrani životinjskog podrijetla. Infekcije ljudi pojedinim vrstama kampilobaktera posljednjih desetljeća imaju stalan trend porasta. U probavnom sustavu mnogih životinja smatraju se komenzalima, osobito *C. jejuni* koji prevladava u divljih i domaćih ptica (KAAKOUSH i sur., 2015.). Različite vrste *Campylobacter* spp. izdvojene iz pasa i mačaka od velike su javnozdravstvene važnosti, stoga mačke i psi predstavljaju rezervoar za pojavu kampilobakterioze u ljudi.

Od 2005. godine kampilobakterioza je najčešće prijavljivana zoonoza u ljudi u Europskoj uniji, uglavnom uzrokovana vrstama *C. jejuni* i *C. coli* (EFSA, 2021.). Kohabitacija između čovjeka i životinja nosi potencijalan rizik od prijenosa infekcije. Psi su prepoznati kao prijenosnici različitih vrsta kampilobaktera te je dokazana njihova uloga izvora infekcije za ljude (IANNINO i sur., 2019.).

U ovom istraživanju iz 446 obrađenih uzoraka izdvojena su 124 (26,6 %) izolata *Campylobacter* spp., od čega je 80 preživjelo pohranjivanje te je uključeno u daljnje analize. Metodom RFLP uspješno su identificirana 62 (77,5 %) izolata, dok za 18 (22,5 %) izolata nismo dobili rezultat. U literaturi se navode neki od razloga neuspjeha ove metode, a to je da su kampilobakteri unutar roda izrazito genetski raznoliki, a isto tako može doći do nepotpunog rezanja DNK restrikcijskim enzimima ili do neadekvatnog razdvajanja DNK odsječaka (NISHIMURA i sur., 1996., KAMEI i sur., 2014.). Metoda RFLP u našem se istraživanju pokazala boljom za identifikaciju vrste *C. jejuni* nego za *C. upsaliensis* i *C. coli*. Budući da identifikacija vrste nije uspjela za trećinu izolata vrste *C. upsaliensis* i polovicu izolata vrste *C. coli*, odlučili smo sve izolate identificirati multipleks PCR metodom. Multipleks PCR-om je od 80 izdvojenih bakterijskih izolata roda *Campylobacter* 36 (45%) identificirano kao *C. jejuni*, 35 (43,7 %) kao *C. upsaliensis* i 6 (7,5 %) izolata kao *C. coli*. Vrstu tri izdvojena izolata roda *Campylobacter* nismo uspjeli identificirati. Prema većini objavljenih istraživanja koja su provedena na izmetima pasa najčešće se izdvajaju vrste *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* i *C. coli* (MARKS i sur., 2011., QUINN i sur., 2012., BOJANIĆ i sur., 2017., FACCIOLLA i sur., 2017.).

U istraživanju iz Švedske utvrđena je prevalencija *Campylobacter* spp. od 56 % u pasa. Uzorci su direktno nacijepljeni na hranjive podloge, a vrste su identificirane PCR-om. Izdvojene su vrste *C. upsaliensis* u 42,9 %, *C. jejuni* u 11 %, *C. helveticus* 2,2 % i *C. lari* u 1,1 %

pasa (ENGVALL i sur., 2003.). HALD i suradnici (2004.) izdvojili su *C. upsaliensis* u 75 % uzoraka pasa, *C. jejuni* u 19,4 % uzoraka, *C. lari* u 2,1 % i *C. coli* u 0,7 %, a 2,8 % izolata nije identificirana vrsta. THEPAULT i suradnici (2020.) metodom predobogaćivanja pretraživali su uzorke izmeta zdravih pasa i izdvojili kampilobakter iz 38 % pasa. Vrste su identificirali MALDI-TOF-om. U 64 % uzoraka izdvojili su *C. jejuni*, zatim *C. lari* u 11,1 %, *C. upsaliensis* u 9 % i *C. coli* u 2,6 %. Istraživanje iz Republike Južne Afrike provedeno na uzorcima porijeklom od pasa potvrdilo je *C. jejuni* u 30 %, zatim *C. upsaliensis* 13 %, a *C. coli* u 5 % pasa (KARAMA i sur., 2019.). Uzorci su naciepljivani direktno na hranjive podloge. ROSSI i suradnici (2008.) izdvojili su kampilobakter iz 26 % pasa. Uzorke su naciepljivali direktno na hranjive podloge, a iduće vrste su dokazali PCR-om: *C. upsaliensis* u 43,1 % pasa, *C. jejuni* u 19,4 %, *C. helveticus* u 2,6 % te *C. lari* u 1,9 % pasa. Nadalje, PÖLZER i suradnici (2008.) iz Austrije izdvajaju kampilobakter iz 7,4 % uzoraka iz pasa te identificiraju *C. jejuni* u 39,3 %, a *C. upsaliensis* u 14,3 % pasa. Zaključuju da su razlozi za tako nisku prevalenciju ti što su uzorci dugo putovali do laboratorija te što su za uzorke odabrali obriske rektuma, a ne izmete. IFTEKHAR i suradnici (2018.) iz Indije u svome istraživanju predobogaćuju uzorke obrisaka rektuma pasa. U 28 % pasa potvrđuju kampilobakter. Najčešće izdvojena vrsta u istraživanju bila je *C. jejuni* (68 %). JU i suradnici (2023.) iz Kine izdvajaju iz 35 % pasa kampilobakter, a najčešća vrsta, u 30 % izolata, bila je *C. upsaliensis*. YILDIZ i suradnici (2024.) iz Turske direktno su naciepljivali obriske rektuma pasa na hranjive podloge. U njihovu je istraživanju (n = 126) kampilobakter utvrđen u 10 % uzoraka. Većina izolata identificirana je kao *C. jejuni* (96 %). Prevalencija kampilobaktera u provedenim istraživanjima nije nužno bila povezana s metodom istraživanja, odnosno time jesu li se autori koristili metodom predobogaćivanja kod koje bi se očekivala veća uspješnost izdvajanja, ili izravno naciepljivanje. Prevalencija kampilobakterioze u pasa može znatno varirati, što ovisi o različitim čimbenicima, poput dobi pretraživanih životinja, vrste, smještaja, prisutnosti drugih bolesti, sezone uzorkovanja, različitih regija i dijagnostičkih metoda (ACKE, 2018.). Pregledom istraživanja drugih autora vidljivo je da su, bez obzira na metodu pretraživanja i prevalenciju, najčešće dokazane vrste uvijek *C. jejuni* i *C. upsaliensis*. Nadalje, u ovom je istraživanju 45 % izolata pripadalo vrsti *C. jejuni*, što je više nego u svim drugim istraživanjima, izuzev onog IFTEKHAR i suradnika (2018.), provedenog u Indiji, THEPAULT i suradnika (2020.) provedenog u Francuskoj i YILDIZ i suradnika (2024.), provedenog u Turskoj.

Tijekom našeg istraživanja *Campylobacter* spp. dokazan je u 69/216 (31,9 %) pasa u dobi do godine dana i u 55/247 (22,3%) pasa starijih od godine, iz čega proizlazi da je češće izdvajan

u pasa mlađih od godine dana ($p = 0,019$). U drugim istraživanjima također je dokazano da je veća učestalost infekcije u pasa mlađih od godine dana u odnosu na starije pse, što sugerira da su mlađi psi izloženiji ili podložniji infekciji (LOPEZ i sur., 2002.). THEPAULT i suradnici (2020.) navode da su u njihovu istraživanju u 63 % štenadi izdvojene bakterije roda *Campylobacter*, a u istih pasa u odrasloj dobi izdvojene su iz njih 30 %. ENGVALL i suradnici (2003.) navode da su u njihovu istraživanju u 76 % slučajeva bili pozitivni psi mlađi od godine dana. HALD i suradnici (2004.) proveli su istraživanje na zdravim psima koje je trajalo dvije godine te izdvojili kampilobakter u 76,2 % uzoraka. U skupini od 26 pasa, dobi od tri do osam mjeseci, uzorkovali su izmet svakih mjesec dana tijekom dvije godine. Uzorke su nacjepljivali izravno na hranjive podloge. Izlučivanje kampilobaktera zabilježeno je u 60 % pasa u dobi od 3 mjeseca, u 100 % pasa u dobi od godine dana te u 67 % pasa u dobi od 2 godine. Izdvojili su *C. upsaliensis* u 75 % uzoraka, *C. jejuni* u 19,4 % uzoraka, *C. lari* u 2,1 % i *C. coli* u 0,7 %, a 2,8 % izolata nije identificirana vrsta. Također, donose zaključak da je *C. jejuni* češće izdvajan u pasa dobi do godine dana nego u starijih pasa, što je podudarno s rezultatima našeg istraživanja. Nadalje, u našem su istraživanju psi mlađi od godine dana većinom imali proljev, koji smo također povezali s učestalijim izlučivanjem vrste *C. jejuni*. Iako je *C. jejuni* više izdvajan u mlađih pasa, a *C. upsaliensis* u pasa starijih od godine dana, opažene razlike nisu statistički značajne. SELWET (2015.) proveo je istraživanje u Poljskoj te utvrdio da je prevalencija vrste *C. upsaliensis* veća u pasa starijih od godine dana ($p < 0,05$).

Kampilobakterioza pasa očituje se promjenom konzistencije izmeta, koji može biti kašast do vodenast, a i s primjesama krvi (MARKS i sur., 2011.). Neka istraživanja potvrđuju veću prevalenciju *Campylobacter* spp. u pasa s proljevom u usporedbi s onima bez proljeva (CARBONERO i sur., 2012., VERMA i sur., 2014.). U našem je istraživanju *Campylobacter* spp. izdvojen u 25,7 % pasa bez proljeva i u 29,5 % pasa s proljevom. Razlika u učestalosti izdvajanja *Campylobacter* spp. iz zdravih pasa i iz pasa s proljevom nije bila statistički značajna ($p = 0,397$) kada se promatrala na razini roda. No analizom na razini vrste kampilobaktera postalo je očito da su svi psi u kojih je identificirana vrsta *C. coli* imali proljev. Većina pasa iz kojih je izdvojen *C. jejuni* imala je proljev. Iz ovoga je još jednom vidljiva važnost identifikacije vrste kampilobaktera. Najniža pojavnost proljeva bila je u pasa iz kojih je izdvojen *C. upsaliensis*. ROSSI i suradnici (2008.) istraživali su *Campylobacter* spp. u 27 % zdravih pasa i 63 % pasa s proljevom. Izdvojili su u kampilobakter iz ukupno 26 % pasa. U zdravih pasa, zastupljenost vrste *C. jejuni* bila je 11,5 %, dok je u pasa s proljevom iznosila 8 %. S druge strane, *C. upsaliensis* je utvrđen u 31 %, zdravih pasa i u 12 % pasa s proljevom. Autori ističu da njihovo

istraživanje nije pokazalo statistički značajnu povezanost između izdvajanja kampilobaktera i pojave proljeva.

Način držanja pasa također utječe na učestalost izdvajanja kampilobaktera. Tijekom ovog istraživanja *Campylobacter* spp. izdvojen je u 22,6 % vlasničkih te u 41,6 % pasa iz azila. Opažena razlika statistički je značajna ($p < 0,001$). Iz naših rezultata vidljivo je da psi iz azila imaju 2,83 puta veće izgleda za izdvajanje kampilobaktera. Također, u ovome istraživanju, utvrđeno je da je udio vlasničkih pasa u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni* manji od udjela pasa iz azila. Većina pasa iz azila bila je mlađa od godine dana, a takav rezultat podudara se i s istraživanjem iz Švedske koje su proveli HOLMBERG i suradnici (2015). Nadalje, *C. upsaliensis* češće je izdvojen u vlasničkih pasa, što je i podudarno s činjenicom da većina vlasničkih pasa u ovome istraživanju nije imala proljev. Učestalije izdvajanje kampilobaktera iz pasa držanih u azilima u odnosu na vlasničke pse podudarno je s rezultatima drugih autora. LEAHY i suradnici (2017.) dokazali su da je rizik za infekciju u pasa iz azila znatno povećan te su utvrdili veću prevalenciju, od 57 % do čak 93 %. TSAI i suradnici (2007.) izdvajaju kampilobakter u 2,7 % vlasničkih pasa i u 23,8 % pasa iz azila. U istraživanju iz Italije *Campylobacter* spp. statistički je značajno više izdvojan iz pasa iz azila (IANNINO, 2022.). Ovi su rezultati logični jer psi u azilima borave u lošijim higijenskim uvjetima i obično u većim skupinama, zbog čega je i mogućnost fekalno-oralnog prijenosa različitih crijevnih patogena, pa i kampilobaktera veća nego u pojedinačno, kućno držanih pasa.

Hranjenje kućnih ljubimaca sirovim mesom posljednjih godina sve je učestalije. Iako je korisno za životinje, može predstavljati zdravstveni rizik za kućne ljubimce i njihove vlasnike, budući da meso može biti kontaminirano crijevnim patogenima poput kampilobaktera i drugih (FREDRIKSSON-AHOMA i sur., 2017.). U našem istraživanju pasa hranjenih BARF-om zabilježena je veća učestalost izdvajanja kampilobaktera nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom. *Campylobacter* spp. izdvojen je iz 25,8 % pasa hranjenih termički obrađenom hranom i 37,5 % pasa hranjenih BARF-om. Psi hranjeni BARF-om imali su 3,09 puta veće izgleda za izdvajanje bakterija roda *Campylobacter* naspram pasa hranjenih termički obrađenom hranom ($p = 0,001$). Da bi se moglo procijeniti je li razlog češćem izdvajanju kampilobaktera iz pasa hranjenih sirovim mesom upravo infekcija podrijetlom od mesa kao izvora, izrazito je važno identificirati vrste izdvojenih kampilobaktera. Naime, ako se radi o vrsti *C. jejuni*, moguće je da je podrijetlom iz kontaminiranog mesa. Ako se radi o vrsti *C. upsaliensis*, izvor gotovo sigurno nije meso kojim je pas hranjen jer se *C. upsaliensis* smatra komenzalom u crijevu pasa (SANDBERG i sur., 2002., ROSSI i sur., 2008.). U našem je istraživanju većina izolata (71,4 %)

izdvojenih iz pasa hranjenih BARF-om pripadala vrsti *C. upsaliensis*, što govori u prilog tome da izvor kampilobaktera u tih pasa zasigurno nije bilo termički neobrađeno meso, jer ni jedno istraživanje ni praćenje mikrobiološke ispravnosti mesa, nije utvrdilo prisutnost *C. upsaliensis* u mesu. Izgledi za izdvajanje *C. upsaliensis* u pasa hranjenih BARF-om bili su 4,05 puta veći nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom ($p < 0,001$). Samo je 21,4 % izolata iz pasa hranjenih BARF-om identificirano kao *C. jejuni*, što je u nesuglasju s uvriježenim mišljenjem da je hranjenje BARF-om rizično zbog povećane mogućnosti kontakta pasa s bakterijama podrijetlom iz kontaminiranog mesa. Ako to i jest istina, na temelju rezultata ovog istraživanja svakako se ne može zaključiti da je hranjenje sirovim mesom čimbenik rizika za izlučivanje kampilobaktera izmetom. Naime, ako psi hranjeni sirovim mesom i jesu izloženiji ingestiji *C. jejuni* iz mesa, to ne znači da ih učestalije izlučuju izmetom. Detaljnije zaključke o tome mogli bismo donositi da je istodobno pretraživana i hrana koju su psi konzumirali. No i bez toga može se reći da je malo istraživanja koja propitkuju općeprihvaćene zaključke u vezi s rizikom od kampilobakterioze, koje nosi hranjenje pasa sirovim mesom. Naime, autori koji su istraživali izlučivanje kampilobaktera u pasa hranjenih sirovim mesom nisu identificirali vrstu kampilobaktera ili su samo potvrdili da nisu dokazali *C. jejuni* i *C. coli* (FREDERIKSON-AHOMA i sur., 2017., RUNESVÄRD i sur., 2020.). U našem je istraživanju vrsta *C. upsaliensis* češće izdvojena u pasa hranjenih BARF-om nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom, dok je vrsta *C. jejuni* češće izdvajana iz pasa koji se hrane termički obrađenom hranom. *C. upsaliensis*, kao najčešću vrstu izdvajanu iz pasa hranjenih sirovim mesom, dokazali su i BOJANIĆ i suradnici, 2017., FREDERIKSON-AHOMA i suradnici, 2017., i RUNESVÄRD i suradnici, 2020.

FREDERIKSON-AHOMA i suradnici (2017.) proveli su istraživanje na sirovom mesu za prehranu pasa podrijetlom od 12 proizvođača iz Finske. Tijekom 2013. i 2014. godine prikupili su 50 uzoraka izmeta porijeklom od 29 pasa koji jedu sirovo meso i od 21 psa koji jedu termički obrađenu hranu. Tijekom 2015. i 2016. godine prikupili su 88 uzoraka sirove hrane: 43 % govedina, 41 % piletina, 27 % svinjetina i u manjem broju konjetina, janjetina i meso podrijetlom od ribe. Svi psi uključeni u istraživanje bili su zdravi. Sve uzorke hrane i izmeta zamrznuli su do provođenja laboratorijskih metoda. Nakon odmrzavanja uzoraka, predobogatili su ih u hranjivom bujonu te su dio bujona, nakon inkubacije, nacijepili na hranjive podloge i paralelno iz bujona izdvajali DNK. Kulturnom pretragom nisu izdvojili ni jedan izolat. Navode kako je mogući razlog za to što su bakterije tijekom procesa zamrzavanja uginule. Metodom PCR dokazali su enteropatogene bakterije u 28 % uzoraka sirove hrane, od kojih je u više od pola

uzoraka dokazan *Campylobacter* spp. U 21 % uzoraka sirovog govedskog mesa dokazali su kampilobakter. Vrste kampilobaktera nisu identificirane. FREDERIKSON-AHOMA i suradnici (2017.) izdvojili su kampilobakter u 55 % pasa hranjenih sirovim mesom i 33 % pasa hranjenih termički obrađenom hranom, no razlika nije bila statistički značajna. Kampilobakteri su izdvojeni iz ukupno 23 uzorka izmeta pasa; 90 % ih je pripadalo vrsti *C. upsaliensis*. *C. jejuni* je dokazan u dva psa, i to ona koja su hranjena sirovim mesom. Budući da istraživanje nije paralelno provedeno na psima i uzorcima hrane koju jedu, ne može se sa sigurnošću reći jesu li dva izolata *C. jejuni* izdvojena iz pasa hranjenih sirovim mesom zaista podrijetlom iz mesa.

BOJANIĆ i suradnici (2017.) istraživali su prevalenciju *Campylobacter* spp. u kućnih ljubimaca hranjenih hranom na bazi sirovog mesa. Pretraživanjem uzoraka sirovog mesa za pse, *Campylobacter* spp. izdvojen je iz 28 % uzoraka, a identificirane su vrste *C. jejuni* (22 %), *C. lari* (6 %) i *C. coli* (6 %). No istraživanjem kampilobaktera u izmetu pasa hranjenih sirovim mesom 23 % izolata bilo je *C. upsaliensis*, a 13 % *C. jejuni*. Autori nisu utvrdili statistički značajnu povezanost između izdvajanja kampilobaktera i hranjenja sirovim mesom.

HELLGREN i suradnici (2019.) u 5 % uzoraka sirovog mesa za prehranu pasa dokazuju *C. coli*. Iako je pretraživano meso bilo zamrznuto, očekivali su veću prevalenciju kampilobaktera jer su uzorke predobogaćivali. RUNESVÄRD i suradnici (2020.) pretraživali su izmete pasa hranjenih sirovom hranom i suhom (termički obrađenom) hranom. U skupini pasa hranjenih sirovom hranom *Campylobacter* spp. izdvojen je iz 12/25 (48 %) uzoraka izmeta, dok je u skupini pasa hranjenih suhom hranom kampilobakter dokazan u 4/25 (16 %) uzoraka izmeta. Iz uzoraka izmeta pasa iz skupine koji su jeli sirovu hranu, većina je izolata identificirana kao *C. upsaliensis* ili *C. helveticus*, dok je jedan izolat identificiran kao *C. jejuni*. CANDELLONE i suradnici (2023.) opisali su slučaj potvrđene infekcije šteneta francuskog buldoga, starog šest mjeseci, hranjenog sirovom hranom na bazi peradi. Ubrzo nakon udomljavanja ljubimac i njegov vlasnik pokazali su teške želučano-crijevne simptome i bila im je potrebna hospitalizacija. Iz psa i vlasnika izdvojeni su *C. jejuni* i *C. upsaliensis*.

Sirovo meso za prehranu kućnih ljubimaca može predstavljati rizik s mikrobiološkog gledišta ne samo za pse nego i za ljude koji rukuju hranom i izmetom pasa. Što se kampilobakterioze tiče, usprkos tome što logika nalaže da je izloženost pasa hranjenih sirovim mesom infekciji veća, nema istraživanja čiji rezultati upućuju na učestalije izlučivanje kampilobaktera podrijetlom iz mesa u pasa hranjenih sirovim mesom. Jedan od mogućih razloga može biti i niski pH želuca kojemu je u mesoždera jedna od funkcija da ubije bakterije unesene hranom. Kako je u mnogim istraživanjima zabilježena veća učestalost izlučivanja *C. upsaliensis* u pasa hranjenih

sirovom hranom, bilo bi zanimljivo nekim daljnjim istraživanjima istražiti što je zapravo fiziološko stanje pasa. Za to bi bilo potrebno uključiti više pasa i sofisticiranije metode detekcije i kvantifikacije kampilobaktera.

Što se zdravstvenog stanja tiče, istraživanja potvrđuju veću prevalenciju *Campylobacter* spp. u životinja s proljevom u usporedbi s onima bez proljeva (CARBONERO i sur., 2012., VERMA i sur., 2014.). Virusni ili parazitski enteritis smatra se predisponirajućim čimbenikom za izdvajanje *Campylobacter* spp., odnosno za razvoj kampilobakterioze (FOX i sur., 1984., OLSON i SANDSTEDT, 1987.). U našem istraživanju izdvajanje kampilobaktera statistički je bilo značajno povezano s parvovirozom, te je udio pasa u kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni*, a istodobno su bolovali od parvoviroze, bio veći od udjela pasa iz kojih je izdvojen *C. jejuni*, a nisu imali parvovirozu. Navedeni rezultati poklapaju se s činjenicom da prisutnost druge bolesti ili infekcije s drugim enteropatogenim bakterijama može biti važan čimbenik u infekciji kampilobakterima (ACKE, 2018.). Akutni proljev jedan je od najčešćih kliničkih znakova koji potencijalno dovodi do ozbiljne dehidracije i smrti (HUBBARD i sur., 2007.). Pseći parvovirus (CPV) i pseći koronavirus (CCoV) smatraju se najčešćim virusnim crijevnim infekcijama u pasa diljem svijeta (DECARO i BUONAVOGLIA, 2012.). DUIJVESTIJN i suradnici (2016.) opisali su istraživanje u kojem su identificirali specifične enteropatogene mikroorganizme u pasa mlađih od godine dana, s proljevom i bez proljeva. Izmeti 168 štenaca s proljevom (n = 113) i bez proljeva (n = 59) pretraženi su na parvovirus, koronavirus, salmonelu, ešerihiju, giardiju, toksokaru, klostridij i cistosisporu. Jedan ili više uzročnika otkriveno je u 86,5 % štenadi s proljevom i u 77,8 % štenadi bez proljeva. Samo su parvovirus i koronavirus bili značajno povezani s prisutnošću proljeva, zbog čega se kod pojave akutnog proljeva u štenadi, posebice u skupnom držanju poput azila i uzgajivačnica, preporučuje testiranje štenadi na ova dva uzročnika.

Zbog bliskog suživota pasa i ljudi sve je veća mogućnost prijenosa kampilobaktera s pasa na ljude. U tom je smislu izrazito važno i praćenje antimikrobne osjetljivosti izolata izdvojenih iz pasa. Kada bismo znali da je izvor *C. jejuni* za pse meso, kao i za ljude, moglo bi se očekivati da će osjetljivosti *C. jejuni* odgovarati osjetljivosti izolata iste vrste izdvojenima iz mesa i ljudi. No osjetljivost *C. upsaliensis* ne može se predvidjeti niti uopće mora biti slična osjetljivosti kampilobaktera izdvojenih u sklopu praćenja mikrobiološke sigurnosti hrane ili dijagnostike bolesti u ljudi, s obzirom na to da se i u jednom i u drugom slučaju *C. upsaliensis* rijetko ili nikada ne izdvaja. Jedino istraživanje u kojemu je *C. upsaliensis* izdvojen iz drugog izvora, osim psa i čovjeka, jest ono iz Republike Južne Afrike istraživača KARAMA i suradnici, 2019., u kojemu je

10 % izolata kampilobaktera izdvojenih iz izmeta goveda pripadalo vrsti *C. upsaliensis*. Autori pretpostavljaju da su izvor *C. upsaliensis* za goveda bili psi koji su živjeli na farmi. Rezistencija *C. upsaliensis* izdvojenih iz pasa na antimikrobne tvari može biti posljedica liječenja pasa antimikrobnim tvarima, što je danas sve češći slučaj. Isto tako, može biti posljedica prijenosa gena između crijevnih bakterija. Praćenje rezistencije različitih bakterija izdvojenih iz pasa sve je važniji dio javnozdrastvenih aktivnosti, jer sve bakterije imaju zoonotski potencijal.

Tijekom ovog istraživanja antimikrobna osjetljivost ispitana je za 79 izolata, a antimikrobna otpornost prema barem jednoj antimikrobnoj tvari utvrđena je za 47 (60,3 %) izolata.

U našem istraživanju na ciprofloksacin je bilo rezistentno 57 % izolata. Nižu razinu rezistencije iznose IANNINO i suradnici, 2022., iz Italije, koji objavljuju rezultate o 22,3 % izolata podrijetlom od pasa i rezistentnih na ciprofloksacin. U Portugalu i Poljskoj posljednjih se godina bilježi i veća prevalencija rezistencije na ciprofloksacin izolata kampilobaktera izdvojenih iz pasa, oko 90 % (LEMOS i sur., 2021., MURAWSKA i sur., 2022.). Prema EFSA-inu izvješću iz 2023. godine Poljska prijavljuje da je 100 % izdvojenih izolata *C. jejuni* iz ljudi rezistentno na ciprofloksacin, a isto prijavljuje i Portugal za vrstu *C. coli*.

Na tetraciklin je bilo rezistentno 20,5 % izolata našeg istraživanja. Što se tiče izolata iz pasa, bilježe se različiti rezultati rezistencije na ovu tvar, od 18 % u SAD-u (LEE i sur., 2004.), preko 64 % u Portugalu (LEMOS i sur., 2022.), do 100 % u Indiji (IFTEKHAR i sur., 2018.).

Na eritromicin je bilo rezistentno 2,5 % izolata našeg istraživanja. ACKE (2009.) iz Irske objavljuje rezultate gdje je 12 % izolata izdvojenih iz pasa bilo rezistentno na eritromicin. Rezistencija na eritromicin u izolata *Campylobacter* spp. podrijetlom iz ljudi i životinja koje se koriste za prehranu u Europi još je uvijek relativno niska (EFSA, 2023.).

U našem je istraživanju 58,3 % izolata vrste *C. jejuni* bilo rezistentno na ciprofloksacin. Što se tiče izolata vrste *C. jejuni* izdvojenih iz pasa, podatci o rezistenciji na ciprofloksacin još su uvijek vrlo oskudni, dostupni iz samo četiri istraživanja; ROSSI i suradnici (2008.) iz Italije bilježe 60 %, TSAI i suradnici (2007.) iz Tajvana 18 %, ACKE (2009.) iz Irske 20 %, a SANDBERG i suradnici (2002.) iz Norveške 0 % rezistentnih izolata izdvojenih iz pasa. Molekularnim dokazivanjem prisutnosti mutacije u genu *gyrA*, odgovornom za rezistenciju na fluorokinolone, AMAR i suradnici (2014.) dokazuju 21 % rezistentnih izolata vrste *C. jejuni* u pasa. Što se tiče izolata *C. jejuni* izdvojenih iz drugih izvora u Hrvatskoj, 71 % izolata iz ljudi (TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ i LUCIĆ, 2021.), 100 % izolata *C. jejuni* iz goveda (EFSA, 2018.) i 85 % izolata iz trupova brojlera (EFSA, 2023.) bilo je rezistentno na ciprofloksacin.

U našem je istraživanju 44,4 % izolata vrste *C. jejuni* bilo rezistentno na tetraciklin. Što se tiče izolata vrste *C. jejuni* izdvojenih iz pasa, podatci o rezistenciji na tetraciklin dostupni su iz istih istraživanja; TSAI i suradnici, iz Tajvana (2007.), bilježe 79 % izolata, ROSSI i suradnici (2008.) iz Italije bilježe 12,5 %, a SANDBERG i suradnici (2002.) iz Norveške ne bilježe ni jedan izolat rezistentan na tetraciklin.

Rezistencija na tetraciklin izolata *C. jejuni* iz ljudi u različitim zemljama Europe bila je 43,7 % u 2020. i 45,3 % u 2021. U izolata *C. jejuni* izdvojenih iz farmskih životinja rezistencija na tetraciklin iznosila je 43,3 % u izolata iz tovnih svinja i 68,8 % u izolata iz teladi (EFSA, 2023.). Općenito govoreći, od 2009. do 2020. godine zabilježen je znatan porast rezistencije na ciprofloksacin i tetraciklin u izolata *C. jejuni* izdvojenih iz farmskih životinja i mesa u Hrvatskoj (EFSA, 2023.).

Jedan izolat vrste *C. jejuni* iz našeg istraživanja bio je rezistentan na eritromicin, a ni jedan na azitromicin. Rezistencija kampilobaktera izdvojenih iz različitih izvora na makrolide redovito je znatno manja nego na fluorokinolone i tetracikline. Dostupni podatci o rezistenciji na makrolide izolata *C. jejuni* izdvojenih iz pasa vrlo su oskudni. Tri istraživanja provedena u Italiji, Norveškoj i SAD-u na ukupno 57 izolata *C. jejuni* iz pasa nisu zabilježila rezistenciju na eritromicin (SANDBERG i sur., 2002.; LEE i sur., 2004., ROSSI i sur., 2008.). Suprotno tome, izrazito visoka rezistencija na makrolide izolata *C. jejuni* izdvojenih iz pasa zabilježena je na Tajlandu; 82 % izolata bilo je rezistentna na eritromicin, a 94 % na azitromicin (TSAI i sur., 2007). U istom su istraživanju izolati iz ljudi i kokoši bili osjetljiviji na eritromicin nego izolati iz pasa. Različita osjetljivost na antimikrobne lijekove izolata podrijetlom od ljudi i izolata podrijetlom od pasa može odražavati različitu upotrebu antimikrobnih lijekova u veterinarskoj i humanoj medicini. U Europi je rezistencija izolata vrste *C. jejuni* izdvojenih iz farmskih životinja i mesa na eritromicin niska (EFSA, 2023.). U Hrvatskoj je u 2020. godini samo 1 % izolata *C. jejuni* izdvojenih iz ljudi bilo rezistentno na eritromicin (TAMBRIĆ-ANDRAŠEVIĆ i LUCIĆ, 2021.).

U našem istraživanju 48,6 % izolata vrste *C. upsaliensis* bilo je rezistentno na ciprofloksacin. U istraživanjima izolata iz pasa drugih autora u Europi rezistencija prema ciprofloksacinu bila je znatno manja. ROSSI i suradnici (2008.) izdvojili su 8 % rezistentnih izolata, dok skandinavski istraživači SANDBERG i suradnici (2002.) i OLKKOLA i suradnici (2015.) nisu ustanovili rezistenciju vrste *C. upsaliensis* na ciprofloksacin, kao ni KARAMA i suradnici (2019.) iz Republike Južne Afrike. SUBEJANO i PENULIAR (2023.) iz Filipina bilježe izrazito visoku rezistenciju (93 %) izolata *C. upsaliensis* izdvojenih iz pasa na ciprofloksacin. Visoku rezisten-

ciju *C. upsaliensis* na ciprofloksacin (90 %), dokazivanjem mutacija na genu *gyrA* izolata iz pasa, ustanovili su i JU i suradnici (2023.) u Kini.

Tako visok postotak rezistencije izolata podrijetlom od ljudi u Kini bilježe ZHANG i suradnici (2020.), i to 94,5 % u vrste *C. jejuni* i 94,4 % u vrste *C. coli*.

U našem je istraživanju 25,7 % izolata vrste *C. upsaliensis* bilo rezistentno na tetraciklin. ROSSI i suradnici (2008.) u pasa ne bilježe ni jedan izolat ove vrste rezistentan na tetraciklin, a OLKKOLA i suradnici (2015.) dokazali su samo jedan rezistentan izolat vrste *C. upsaliensis*. SUBEJANO i PENULIAR (2023.) izdvojili su 14 izolata *C. upsaliensis* iz pasa u Manili na Filipinima te utvrdili visoku otpornost na tetraciklin (100 %).

Samo je jedan izolat (2,9 %) vrste *C. upsaliensis* u ovom istraživanju bio rezistentan na eritromicin. Podaci o rezistenciji vrste *C. upsaliensis* iz pasa na eritromicin vrlo su oskudni. U istraživanju VANDERBERGA i suradnika (2006.) rezistentno je bilo 12,9 % izolata iz pasa, a u istraživanjima SANDBERG i suradnika (2002.), ROSSI i suradnika (2008.) i OLKKOLA i suradnika (2015.) svi su izolati bili osjetljivi.

Četiri izolata (66,7 %) koja su pripadala vrsti *C. coli* bila su rezistentna na ciprofloksacin, dok su na ostale ispitivane tvari svi bili osjetljivi. Podataka o osjetljivosti *C. coli* izdvojenih iz pasa, kao i za ostale kampilobaktere izdvojene iz pasa, vrlo je malo. AMAR i suradnici (2014.) dokazuju mutacije u genu *gyrA* u 3/6 izolata *C. coli* iz pasa i time potvrđuju da su rezistentni na fluorokinolone. Najveća je rezistencija na ciprofloksacin zabilježena u izolata *C. coli* izoliranih iz tovnih purana u 2020. godini (80,4 %). Također, iznimno visoka razina rezistencije na ciprofloksacin (79,7 %) dokazana je u *C. coli* izdvojenih iz teladi u 2021. godini i iz pilića (61,9 %) u 2020. godini. Što se tiče izolata *C. coli*, vrlo visoka razina rezistencije na tetraciklin uočena je ljudi (74,0 % u 2020. i 70,3 % u 2021.) i životinja koje se koriste za ljudsku prehranu (u rasponu od 67,3 % kod izolata s pilića u 2020. do 90,5 % kod izolata s teladi u 2021. godini) (EFSA, 2023.). Rezistencija na eritromicin *C. coli* iznosila je 35,7 % u izolata iz teladi, 21,5 % iz tovnih purana, 12,3 % iz tovnih svinja i 4,4 % iz pilića (EFSA, 2023.).

U našem istraživanju nismo ustanovili statistički značajnu razliku u osjetljivosti različitih vrsta kampilobaktera prema pojedinom antibiotiku.

Opažene razlike u istodobnoj rezistenciji na ciprofloksacin i eritromicin između različitih vrsta kampilobaktera nisu statistički značajne ($p = 0,643$), kao i u kombinaciji istodobne rezistencije na ciprofloksacin i azitromicin ($p = 0,424$), eritromicin i tetraciklin ($p = 0,632$) te tetraciklin i azitromicin ($p = 0,448$). Opažene razlike u istodobnoj rezistenciji na ciprofloksacin

i tetraciklin među različitim vrstama kampilobaktera statistički su značajne ($p = 0,036$), tako da je najviša u vrste *C. upsaliensis* (51,52 %), dok je u drugih vrsta niža (*C. jejuni* 36,1 %). Istraživanje iz Filipina u 95 % izolata vrste *C. upsaliensis* iz pasa potvrđuje višestruko rezistentne izolate, i to najčešće na kombinaciju ciprofloksacin, eritromicin i tetraciklin; od 14 izolata, 13 ih je bilo istodobno rezistentno na ciprofloksacin, eritromicin i tetraciklin, a jedan na eritromicin i tetraciklin (SUBEJANO i PENULIAR, 2023.).

CAREV (2019.) istraživala je izolate roda *Campylobacter* izdvojenih iz ljudi u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Iznosi da je najčešća istodobna rezistencija bila na ciprofloksacin i tetraciklin (TcR/CipR korezistentni izolati). Utvrđena je umjereno visoka rezistencija izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin i TcR/CipR korezistencija te porast rezistencije na ciprofloksacin i TcR/CipR korezistencije između 2010. i 2012./13. godine. Porast udjela TcR/CipR korezistentnih izolata *C. jejuni* bio je popraćen i naglim pojavljivanjem klonski povezanih TcR/CipR korezistentnih izolata. Korezistentni klonski povezani TcR/CipR izolati pojavili su se 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. Zaključuje da visoka rezistencija izolata na ciprofloksacin te pojava umjereno visokog udjela TcR/CipR korezistentnih izolata može značajno ograničiti empirijski izbor antibiotika u terapiji kampilobakterioze.

ŠOPREK i suradnici (2022.) u 45 izolata *C. jejuni* izdvojenih iz ljudi sekvencirali su cjelokupni genom te su proveli ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne tvari. Izvori izolata bili su izmeti i primarno sterilni uzorci. U 20 % izolata dokazuju istodobnu rezistenciju na ciprofloksacin i tetraciklin, a ti su izolati potjecali iz Splita i Pule. No ST im je bio različit, te se ne može reći da je došlo do klonskog širenja.

Pojava i širenje gena odgovornih za rezistenciju na antimikrobne lijekove u roda *Campylobacter* vjerojatno su potaknuti uporabom antibiotika u životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Ti su geni ili povezani s genomskim otocima višestruke otpornosti na lijekove ili preneseni konjugativnim plazmidima. Analiza sekvencija u istraživanjima snažno sugerira da su nastali od gram-pozitivnih bakterija, kao što su *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*. Ova nedavna otkrića, zajedno s prethodno identificiranim horizontalno stečenim genima odgovornima za rezistenciju, impliciraju da često dolazi do prijenosa gena među bakterijama roda *Campylobacter* i gram-pozitivnim bakterijama u prirodnom okruženju (GIBREEL i sur. 2004., WANG i sur., 2014., JEHANNE i sur., 2021., TANG i sur., 2021., WANG i sur., 2022.). Još uvijek nije jasno kako dolazi do razmjene gena, ali se pretpostavlja da su geni prvo uneseni

u kampilobaktere iz gram-pozitivnog izvora konjugacijom, a zatim integrirani u kromosome kampilobaktera ili plazmide. Kao rezultat široke rasprostranjenosti, kampilobakter je izložen antibioticima koji se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini što je dovelo do sve veće prevalencije kampilobaktera otpornih na antimikrobne lijekove (ZHANG i sur., 2023.).

U ovome je istraživanju MLST metodom genotipizirano i filogenetski analizirano 27 izolata, 16 izolata *C. jejuni*, pet izolata *C. upsaliensis* i šest izolata *C. coli*. Ukupno je sekvencirano 189 genskih lokusa. Ovo je istraživanje po prvi put dalo uvid o zastupljenosti ST-ova i CC-ova izolata kampilobaktera izdvojenih iz pasa na području Republike Hrvatske.

Svih je 16 izolata *C. jejuni* analiziranih MLST-om izdvojeno iz pasa s proljevom, hranjenih termički obrađenom hranom. Četiri su psa bila vlasnička, a ostalih 12 iz azila. Genotipiziranjem izolata opisano je 11 sekvencijskih tipova svrstanih u šest klonskih kompleksa. Jedan izolat nije smješten ni u jedan do sada opisani klonski kompleks.

U našem istraživanju klonskom kompleksu CC ST 21 pripadalo je pet izolata vrste *C. jejuni* (CJ1, CJ2, CJ14, CJ13, CJ16) svrstanih u tri ST-a: ST 1943, ST 3156 i ST 19. Izolati CJ1, CJ2 i CJ16 opisani su kao ST 1943. Sva tri izolata potječu od pasa iz istog azila, hranjenih termički obrađenom hranom, različite životne dobi, a izdvojeni su u razmaku od nekoliko dana. Tri psa iz kojih su izdvojeni nisu boravila zajedno u kavezu, ali postoji mogućnost da su bili u izravnom kontaktu ili da su imali kontakt s istim izvorom. Izolata u bazi pubMLST *C. jejuni* / *C. coli* opisanih kao ST 1943 ukupno je 24, a izdvojeni su u 12 zemalja s dva kontinenta: Finska, Grčka, Italija, Luksemburg, Nizozemska, Norveška, Njemačka, Poljska, SAD, Švicarska, UK (Engleska) i UK (Škotska). Izvori iz kojih potječu pretežno su izmeti ljudi te u nešto manjem broju izmeti kokoši i goveda. Izolat CJ13 opisan je kao ST 3156, a potječe od psa iz istog azila kao i CJ1, CJ2 i CJ16, ali je izdvojen nekoliko godina poslije. Samo su dva izolata iz ST 3156 upisana u bazu, a izdvojena su iz izmeta čovjeka u Škotskoj. Izolat CJ14, opisan kao ST 19, izdvojen je iz vlasničkog psa i nema nikakve povezanosti s azilom u kojem su boravili psi iz kojih su izdvojena ostala četiri izolata iz CC-a ST-21. U bazi pubMLST do sada je upisano 1074 izolata koji pripadaju ST 19, a izdvojeni su u 28 zemalja s pet kontinenata: Belgija, Bocvana, Curaçao, Egipat, Finska, Francuska, Hrvatska, Indija, Iran, Italija, Izrael, Južna Koreja, Kanada, Kina, Litvanija, Luksemburg, Nizozemska, Njemačka, SAD, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, UK (Engleska), UK (Sjeverna Irska), UK (Škotska), UK (Vels) i Vijetnam. ST 19 najčešće je izdvajan iz izmeta kokoši i piletine te izmeta čovjeka. ŠOPREK i suradnici (2023.) u Hrvatskoj su istraživali izolate *C. jejuni*, pripadnike CC-a ST-21, izdvojene iz stolice i izmeta ljudi, galeba, bijele rode i brojlera. Dva izolata iz izmeta ljudi i dva izolata iz brojlera pripadala su

ST 19. U CC ST-21 pripadaju mnogi izolati *C. jejuni* izdvojeni iz ljudi i brojlera, ali ne i oni iz divljih ptica. ŠOPREK i suradnici 2023. zaključuju da su divlje ptice važan čimbenik u širenju izolata kampilobaktera, pa samim time i rezistentnih sojeva, jer mogu preletjeti velike dužine u kratkom vremenu. U CC ST-21 u manjem su broju svrstani izolati iz izvora osim ljudi i brojlera; izmeta goveda, ovaca, pura te poretine i govedine. Od svih 45 klonskih kompleksa *C. jejuni*, u CC ST-21 pripada najviše izolata iz ljudi i brojlera diljem svijeta. CC ST-21 ističe se izrazitom raznolikošću u usporedbi s drugim klonskim kompleksima, naime to je najraznovrsniji CC u strukturi populacije *C. jejuni* (JOLLEY i sur., 2018.). Dva od četiri naša izolata svrstana u CC ST-21 bila su rezistentna na ciprofloksacin. Spomenuti CC često se povezuje s rezistencijom na ciprofloksacin, odnosno fluorokinolone (HABIB i sur., 2009., KOVAČ i sur., 2015.).

Izolati CJ3 i CJ6 opisani su kao ST 538 unutar CC-a ST-45. Izdvojeni su iz dva šteneta iz istog legla koja su bolovala od parvoviroze, stoga nije neobično da pripadaju istom ST-u, iako štenad iz istog legla može biti inficirana i kampilobakterima različitih ST-ova. U pubMLST bazi *C. jejuni/C. coli* 142 izolata opisana kao ST 538 izdvojena su u 14 zemalja s četiri kontinenta: Australija, Belgija, Finska, Francuska, Japan, Kanada, Kina, Luksemburg, Nizozemska, Novi Zeland, Njemačka, SAD, Švedska, UK (Škotska) i UK (Engleska). Izvori iz kojih potječu pretežno su izmeti ljudi i kokoši, piletina, a u nešto manjem broju izmeti goveda, svinja, guski te vode iz okoliša. Iz velikog broja spomenutih izvora može se zaključiti da je CC ST-45 izrazito raširen među različitim izvorima. ZHANG i suradnici (2010.) navode da su izolati svrstani u CC ST-45 specifične klonske linije povezane s Guillain-Barréovim sindromom u ljudi. Izolati CJ3 i CJ6 osjetljivi su na fluorokinolone, a takav nalaz opisuju i drugi autori za izolate tog ST-a (WIECZOREK i sur., 2017.).

Unutar CC-a ST-206 svrstana su tri izolata: CJ4 (ST 2086), CJ8 (ST 572) i CJ10 (ST 3335). Izolat pod oznakom CJ4, opisan kao ST 2086, izdvojen je iz šteneta istog legla kao i štene iz kojeg je izdvojen CJ6, što potvrđuje da psi iz istog legla mogu nositi / biti inficirani s izolatima različitog ST-a. Izolat CJ8, opisan kao ST 572, izdvojen je iz psa koji je boravio u istom azilu kao i psi iz kojih su izdvojeni izolati CJ4 i CJ6, ali godinu dana kasnije. Izolat CJ10, opisan kao ST 3335, također je izdvojen iz psa iz istog azila nekoliko godina kasnije. U pubMLST bazu *C. jejuni / C. coli* upisano je 12 izolata ST 2086, izdvojenih iz izmeta čovjeka i kokoši u četiri države: Brazil, Grenada, UK (Škotska) i UK (Engleska). Izolata *C. jejuni* ST 572 u bazi je 691, izdvojenih u 24 europske države (Austrija, Belgija, Hrvatska, Češka, Egipat, Estonija, Finska, Francuska, Njemačka, Grčka, Izrael, Italija, Luksemburg, Norveška, Poljska, Portugal, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, Nizozemska, UK (Engleska), UK (Škotska)) i SAD-u.

Najčešće je podrijetlo izolata ovog ST-a izmet čovjeka i kokoši te piletina, a rjeđe izmet goveda i vode iz okoliša. Samo su tri izolata izdvojena iz pasa, i to u Njemačkoj i Švicarskoj. Sedamnaest izolata ST 3335 upisanih u bazu pubMLST podrijetlom su iz Njemačke, Švicarske, UK (Engleska), UK (Škotska), UK (Vels) i SAD-a, a izdvojeni su iz izmeta ljudi i kokoši.

Izolat CJ7 opisan je kao ST 51 unutar CC-a ST-443, a izdvojen je iz vlasničkog psa. Do sada je u bazu pubMLST upisano 1890 izolata ST 51 izdvojenih u 28 država na pet kontinenata: Belgija, Bocvana, Curaçao, Egipat, Finska, Francuska, Hrvatska, Indija, Iran, Italija, Izrael, Južna Koreja, Kanada, Kina, Latvija, Luksemburg, Nizozemska, Norveška, Njemačka, SAD, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, UK (Engleska), UK (Sjeverna Irska), UK (Škotska) i UK (Vels). Izvori iz kojih potječu ovi izolati pretežno su izmeti ljudi i kokoši, piletina, poneki izolat iz uzoraka podrijetlom iz purana, gusaka, goveda, te jedan izolat iz psa (Švicarska). U Hrvatskoj su ŠOPREK i suradnici (2022.) iz ljudi izdvojili izolate opisane kao ST 51. Izvor infekcije nije bio poznat.

Izolati CJ9, CJ11 i CJ12 opisani su kao ST 10039 koji pripada CC-u ST-403. Sva su tri izolata iz štenadi istog legla koja je bolovala od parvoviroze. Zanimljivo je da je do sada u bazi upisan samo jedan izolat pod navedenim ST-om, i to podrijetlom iz izmeta čovjeka iz Luksemburga.

Izolat CJ15 opisan je kao ST 475 koji pripada u CC ST 48, a izdvojen je iz vlasničkog psa. Do sada je izdvojeno 479 izolata opisanih kao ST 475, i to u 20 država na pet kontinenata: Argentina, Belgija, Brazil, Čile, Hrvatska, Curaçao, Danska, Finska, Francuska, Njemačka, Luksemburg, Portugal, Slovenija, Švedska, Švicarska, Nizozemska, UK (Engleska), UK (Škotska), Urugvaj i SAD. Podrijetlo izolata pretežno je iz izmeta ljudi i kokoši, poneki je izolat iz drugih vrsta peradi i okoliša, a jedan je izolat iz psa i SAD-a.

Izolat CJ5 opisan je kao ST 9354, koji ne pripada ni jednom do sada poznatom CC-u, a izdvojen je iz vlasničkog psa. Opisano je 19 izolata ST 9354 u bazi, podrijetlom iz Kanade, UK-a i SAD-a, a izvori su najvećim dijelom nepoznati, iako je nekoliko izolata izdvojeno iz izmeta kokoši, čovjeka, voda iz okoliša i goveda.

U 16 izolata *C. jejuni* analiziranih MLST-om u ovom istraživanju uočena je vrlo velika genetska raznolikost. Svi ST-ovi identificirani u ovom istraživanju već su izdvojeni iz ljudi u raznim dijelovima svijeta, a ST 51 i ST 475 i iz ljudi u Republici Hrvatskoj. Trinaest izolata *C. jejuni* pripadalo je ST-ovima koji do sada nisu izdvojeni iz pasa, a samo su tri izolata *C. jejuni* pripadala ST-ovima prethodno opisanima u pasa, izdvojenima u Njemačkoj, Švicarskoj i SAD-u. Činjenica da su svi sekvencijski tipovi bakterije *C. jejuni* izdvojeni iz pasa u ovom

istraživanju prethodno već izdvojeni iz ljudi potvrđuje zoonotski karakter ovih izolata.

Što se tiče vrste *C. coli*, svi izolati izdvojeni u ovom istraživanju pripadaju istom klonskom kompleksu, CC-u ST-828. Iz navedenog proizlazi da je u usporedbi s *C. jejuni* uočena mnogo manja genetska raznolikost. Raznolikost do sada u svijetu izdvojenih izolata *C. coli* općenito je manja, pa tako od oko 21 000 izolata upisanih u bazu pubMLST i svrstanih u 26 CC-a njih 84 % pripada istom klonskom kompleksu, CC-u ST-828.

Izolati COLI 1, COLI 3, COLI 4, COLI 5, COLI 6 opisani su kao ST 825 i izdvojeni su iz vlasničkih pasa, dok je izolat COLI 2 opisan kao ST 830 i izdvojen je iz psa smještenog u azilu. Svi psi iz kojih je izdvojen *C. coli* imali su proljev. Psi iz kojih su izdvojeni COLI 1 i COLI 2 u isto su vrijeme boravili na Klinici za zarazne bolesti, u zajedničkom prostoru, no pokazalo se da nije riječ o istom ST-u. S obzirom na općenito malu učestalost izdvajanja *C. coli* iz pasa, u ovom konkretnom slučaju izdvajanja dva izolata *C. coli* iz dva šteneta istog legla, da nije provedena MLST analiza, sigurno bismo zaključili da se radi o istoj bakteriji, što nije bio slučaj.

Psi iz kojih su izdvojeni COLI 3 i COLI 4, odnosno COLI 5 i COLI 6, bez obzira na isti sekvencijski tip i godinu izdvajanja, nemaju nikakvu epidemiološku poveznicu.

Naši su izolati prvi izolati vrste *C. coli* podrijetlom od pasa upisanih u bazu. Većina ih pripada ST-u 825, unutar kojeg je do sada u bazu pubMLST upisano 1149 izolata podrijetlom iz 21 države sa šest kontinenata: Australija, Kina, Ekvador, Egipat, Njemačka, Italija, Luksemburg, Novi Zeland, Nigerija, Peru, Poljska, Portugal, Španjolska, Švicarska, Nizozemska, UK (Engleska), UK (Sjeverna Irska), UK (Škotska), UK (Vels), SAD i Vijetnam. Izolati ST 825 najčešće su podrijetlom iz izmeta kokoši, piletine, zatim izmeta ljudi, ali i iz koza, ovaca, purana, svinja, iz voda iz okolišna i uzoraka tla. Jedan izolat u našem istraživanju pripada ST 830, kojih je do danas u bazu pubMLST upisano oko deset puta manje nego ST 825, samo 129. Podrijetlom su iz 14 država sa šest kontinenata: Brazil, Kina, Egipat, Njemačka, Italija, Japan, Jordan, Nigerija, Peru, Portugal, Švicarska, UK (Engleska), UK (Škotska) i SAD. ST 830 najčešće je izdvojen iz izmeta svinja i svinjetine, izmeta kokoši i piletine te izmeta ljudi.

Oba ST-a *C. coli* izdvojena u ovom istraživanju već su izdvojena iz ljudi diljem svijeta, što opet upućuje na zoonotski karakter ovih izolata. U pubMLST bazi *C. jejuni* / *C. coli* upisano je pet izolata *C. coli* iz piletine/kokoši i jedan iz divlje ptice, izdvojenih u Hrvatskoj, koji također pripadaju CC-u ST-828.

Metodom MLST analizirano je pet izolata vrste *C. upsaliensis*, koji su svrstani u pet različitih sekvencijskih tipova (ST 65, ST 156, ST 217, ST 218 i ST 219). Uspoređujući naše rezul-

tate s bazom pubMLST, uočili smo da su samo dva od pet ST-ova već upisana u bazu. Dva su izolata ST 65 izdvojena iz psa i mačke u SAD-u. Mačka i pas, iz kojih su izdvojeni, nisu bili ni na koji način povezani. ST 65 jedini je svrstan u već opisani klonski kompleks, CC ST-16. ST 156 prethodno je izdvojen iz psa u Finskoj, a za sada ne pripada ni jednom opisanom klonskom kompleksu. Preostala tri ST-a (ST 217, ST 218 i ST 219) još nisu identificirana. To je vjerojatno posljedica još uvijek vrlo malog broja izolata *C. upsaliensis* upisanih u bazu (oko 220), mnogo manjeg od broja izolata *C. jejuni* (oko 96000) i *C. coli* (oko 21000). Svi *C. upsaliensis* u bazi pubMLST podrijetlom su iz pasa i ljudi. Vrlo mali broj analiziranih izolata vrste *C. upsaliensis* mogući su razlog i toga što ni jedan do sada opisani ST nije izdvojen iz psa i iz čovjeka. S povećanjem broja analiziranih izolata vrste *C. upsaliensis* MLST-om upisuje se sve veći broj novih ST-ova, a veći broj istraživanja neminovno će upotpuniti znanja o različitim aspektima epidemiologije kampilobakterioze. Budući da je glavni izvor *C. upsaliensis* pas, te da je infekcija mnogo puta dokazana u čovjeka, možemo zaključiti da je zoonotski potencijal *C. upsaliensis* neupitan. U izolata vrste *C. upsaliensis*, i prethodno upisanih u bazu i onih iz ovog istraživanja, uočena je velika genetska raznolikost.

7. ZAKLJUČCI

1. Učestalost izdvajanja *Campylobacter* spp. u pasa dobi do godine dana bila je veća od učestalosti izdvajanja u pasa starijih od godine dana.
2. Vrsta *C. jejuni* češće je izdvajana u pasa starosti do godine dana, dok je u pasa starijih od godine dana češće izdvajana vrsta *C. upsaliensis*.
3. Svi psi iz kojih je izdvojena vrsta *C. coli* imali su proljev. Većina pasa iz kojih je izdvojena vrsta *C. jejuni* imala je proljev. Najmanja učestalost proljeva zabilježena je u pasa iz kojih je izdvojena vrsta *C. upsaliensis*.
4. U pasa iz azila češće je izdvajan *Campylobacter* spp. nego u vlasničkih pasa.
5. U pasa hranjenih BARF-om *Campylobacter* spp. je češće izdvajan nego u pasa hranjenih termički obrađenom hranom. Većina izolata iz pasa hranjenih BARF-om pripadala je vrsti *C. upsaliensis*, što upućuje na to da izolati nisu bili podrijetlom od sirovog mesa.
6. Najveća razina rezistencije *Campylobacter* spp. zabilježena je na ciprofloksacin, manja na tetraciklin, dok je rezistencija na eritromicin bila najniža. Rezistencije se nisu značajno razlikovale među različitim vrstama kampilobaktera.
7. Unutar izolata vrsta *C. jejuni* i *C. upsaliensis* uočena je velika genetska raznolikost, dok su međusobno najsirodniji bili izolati vrste *C. coli*.
8. Svi ST-ovi koji su pripadali vrstama *C. jejuni* i *C. coli* identificirani u ovom istraživanju već su dokazani u ljudi u raznim dijelovima svijeta, što nedvojbeno dokazuje njihov zoonotski karakter. Zoonotski karakter vrste *C. upsaliensis* dokazuje činjenica da je mnogo puta dokazan kao uzročnik bolesti u ljudi, a jedini mu je izvor pas. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se dobio bolji uvid u epidemiologiju infekcija vrstom *C. upsaliensis* s obzirom na to da je u bazi pubMLST još uvijek vrlo mali broj izolata.
9. Kampilobakterioza je najčešća zoonoza u Hrvatskoj i svijetu. Rezultati ovog istraživanja vrijedan su doprinos poznavanju pasa kao karike u epidemiološkom lancu kampilobakterioze i u tom smislu pridonose javnozdravstvenim spoznajama te upućuju na nužnost daljnjih istraživanja pasa kao izvora kampilobaktera, ali i drugih bakterija, za ljude.

8. POPIS LITERATURE

ABAY S., T. KAYMAN, B. OTLU, H. HIZLISOY, F. AYDIN, N. ERTAS (2014): Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 29-38.

ACKE E., K. MCGILL, O. GOLDEN, B. R. JONES, S. FANNING, P. WHYTE (2009): Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. *Vet. Rec.* 164, 44-47.

ACKE, E. (2018): *Campylobacteriosis* in dogs and cats: a review. *New Zealand Vet. J.* 66, 221-228.

ALDERTON, M. R., V. KOROLIK, P. J. COLOE, F. E. DEWHIRST, B. J. PASTER (1995): *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 61-66.

ALFREDSON, D.A. i V. KOROLIK (2005): Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 2515-2518.

ALLENSPACH, K. (2013): Diagnosis of small intestinal disorders in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 43, 1227-1240.

ALNIMR, A. M. (2014): A case of bacteremia caused by *Campylobacter fetus*: an unusual presentation in an infant. *Infect. Drug Resist.* 7, 37-40.

ALTER, T., F. GAULL, S. KASIMIR, M. GURTLER, H. MIELKE, M. LINNEBUR, K. FEHLHABER (2005): Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Vet. Microbiol.* 108, 251-261.

ALTEKRUSE, S. F., N. J. STERN, P. I. FIELDS, D. L. SWERDLOW (1999): *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28-35.

AMAR, C., S. KITTL, D. SPRENG, A. THOMANN, B. M. KORCZAK, A. P. BURNENS, P. KUHNERT (2014): Genotypes and antibiotic resistance of canine *Campylobacter jejuni* isolates. *Vet. Microbiol.*, 168, 124-130.

ANTEZACK, A., M. BOXBERGER, C. ROLLAND, M. BEN KHEDHER, V. MONNET – CORTI, B. LA SCOLA (2021): Isolation and characterization of *Campylobacter massiliensis* sp. nov., a novel *Campylobacter* species detected in a gingivitis subject. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71, 5039.

ASAKURA, M., W. SAMOSORNUSUK, M. TAGUCHI, K. KOBAYASHI, N. MISAWA, M. KUSUMOTO, K. NISHIMURA, A. MATSUHISA, S. YAMASAKI (2007): Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.* 42, 174-183.

ASPINALL S. T., D. R. WAREING, P.G. HAYWARD, D. N. HUTCHINSON (1996): A comparison of a new campylobacter selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 645-650.

AVCI, F. Y. (2016): A chicken vaccine to protect humans from diarrheal disease. *Glycobiology.* 26, 1137-1139.

AYDIN, F., S. ABAY, T. KAYMAN, E. KARAKAYA, H. KANAN, H. K. MUSTAK, I. MUSTAK, N. BILGEN, M. GONCUOGLU, A. DUZLER, O. GURAM, O. SAHIN, I. B. SATICIOGLU (2021): *Campylobacter anatolicus* sp. nov., a novel member of the genus *Campylobacter* isolated from feces of Anatolian Ground Squirrel (*Spermophilus xanthopyrmnus*) in Turkey. *Syst. Appl. Microbiol.* 44, 126265. doi: 10.1016/j.syapm.2021.126265.

BAE, W., K. N. KAYA, D. D. HANCOCK, D. R. CALL, Y. H. PARK, T. E. BESSER (2005): Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 71,169-174.

BAKHSHI B., M. KALANTAR, A. RASTEGAR-LAR, F. FALLAH (2016): PFGE genotyping and molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat. *Iran J. Vet. Res.* 17, 177-183.

BANG, D. D., F. SCHEUTZ, P. AHRENS, K. PEDERSEN, J. BLOM, M. MADSEN (2001): Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. *J. Med. Microbiol.* 50:1087e1094.

BEACH, J., E. MURANO, G. ACUFF (2002): Prevalence of Salmonella and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *J. Food Protect.* 65, 1687-1693.

BENJAMIN, J., S. LEAPER, R. J. OWEN, M. B. SKIRROW (1983): Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr. Microbiol.* 8, 231-238.

BERTASI, B., M. N. LOSIO, P. DAMINELLI, G. FINAZZI, A. SERRAINO, S. PIVA; F. GIACOMETTI, E. MASSELLA, F. OSTANELLO (2016): Seasonal Variability of Thermophilic *Campylobacter* Spp. in Raw Milk Sold by Automatic Vending Machines in Lombardy Region. *Ital. J. Food Saf.* 5, 5848.

BESSÈDE, E., O. SOLECKI, E. SIFRÉ, L. LABADI, F. MÉGRAUD (2011): Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1735-1739.

BLACK, R. E., M. M. LEVINE, M. L. CLEMENTS, T. P. HUGNES, M. J. BLASER (1988): Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157, 472-479.

BLOOMFIELD, S., D. WILKINSON, L. ROEDERS, P. BIGGS, N. FRENCH, V. MOHAN, M. SAVOIAN, P. VENTER, A. MIDWINTER (2020): *Campylobacter novaezeelandiae* sp. nov., isolated from birds and water in New Zealand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 3775-3784.

BOJANIĆ, K., A. C. MIDWINTER, J. C. MARSHALL, L. E. ROGERS, P. J. BIGGS, E. ACKE (2017): Isolation of *Campylobacter* spp. from Client-Owned Dogs and Cats, and Retail Raw Meat Pet Food in the Manawatu, New Zealand. *Zoon. Pub. Health*, 64, 438-449.

BOJANIĆ, K., A. C. MIDWINTER, E. ACKE, J. C. MARSHALL, A. J. CORNELIUS, P. J. BIGGS (2020): Draft Genome Sequences of Eight Strains of *Campylobacter helveticus* Isolated from Cats and a Dog in New Zealand. *Microbiol. Resour. Announc.* 9, e01244-19. doi:10.1128/MRA.01244-19.

BOLTON, D. J. (2015): *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.*, 48, 99-108.

BOUKERB, A. M. C. PENNY, J. SERGHINE, C. WALCZAK, H. M. CAUCHINE, W. G. MILLER, S. LOSCH, C. RAGIMBEAU, J. MOSSONG, F. MEGRAUD, P. LEHOURS, L. BENEJAT, M. GOURMELON (2019): *Campylobacter armoricus* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from surface water and stools from humans with enteric infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 3969-3979.

BOURKE, B., V. L. CHAN, P. SHERMAN (1998): *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the wings. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 440-449.

BROWN, P. E., O. F. CHRISTENSEN; H. E. CLOUGHT, P. J. DIGGLE, C. A. HART, S. HAZEL, R. KEMP, A. J. H. LEATHERBARROW, A. MOORE, J. SUTHERST, J. TURNER, N. J. WILLIAMS, E. J. WRIGHT, N. P. FRENCH (2004): Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6501-6511.

BRYANT, E., Z. SHEN, A. MANNION, M. PATTERSON, J. BUCZEK, J. G. FOX (2020): *Campylobacter taeniopygiae* sp. nov., *Campylobacter aviculae* sp. nov., and *Campylobacter estrildidarum* sp. nov., Novel Species Isolated from Laboratory-Maintained Zebra Finches. *Avian Dis.* 64, 454-466.

BULGIN, M. G., A. C. WARD, N. SRIRANGANATHAN, P. SARAS (1984): Abortion in the dog due to *Campylobacter* species. *Amer. J. Vet. Res.* 45, 555-556.

BULLMAN, S., D. CORCORAN, J. O'LEARY, B. LUCEY, D. BYRNE, R. D. SLEATON (2011): *Campylobacter ureolyticus*: an emerging gastrointestinal pathogen? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 228-230.

BURNHAM, C. A., J. LEEDS, P. NORDMANN, J. O'GRADY, J. PATEL (2017): Diagnosing antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 697–703. doi.org/10.1038/nrmicro.2017.103.

BUTZLER, J. P. (1973). Related vibrios in Africa. *The Lancet.* 302, 858. doi:10.1016/s0140-6736(73)90915.

BUTZLER, J. P. (2004): *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 868-876.

BYRNE, C., D. DOHERTY, A. MOONEY, M. BYRNE, D. WOODWARD, W. JOHNSON, F. RODGERS, B. BOURKE (2001): Basis of the superiority of cefoperazone amphotericin teicoplanin for isolating *Campylobacter upsaliensis* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2713-2716. doi:10.1128/JCM.39.7.2713-2716.2001.

CACERES, A., I. MUNOZ, G. IRAOLA, F. DIAZ-VIRAQUE, L. COLLADO (2017): *Campylobacter ornithocola* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from wild bird faecal samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1643-1649.

CAGLIERO, C., C. MOULINE, A. CLOECKAERT, S. PAYOT (2006): Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3893–3896. doi.org/10.1128/AAC.00616-06.

CAMPAGNOLO, E. R., L. M. PHILIPP, J. M. LONG, N. L. HANSHAW (2018): Pet-associated campylobacteriosis: a persisting public health concern. *Zoon. Pub. Health* 65, 304-311.

CANDELLONE, A., P. BADINO, F. GIROLAMI, M. CEQUETELLA, P. NEBIA, L. ARESU, S. ZOPPI, D. BERGERO, R. ODORE (2023): Concomitant *Campylobacteriosis* in a Puppy and in Its Caregiver: A One Health Perspective Paradigm in Human-Pet Relationship. *Vet. Sci.* 10, 244.

CARBONERO, A., A. TORRALBO, C. BORGE, I. GARCÍA-BOCANEGRA, A. ARENAS, A. PEREA (2012): *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 505-512.

CAREV, M. (2019): Epidemiološke i mikrobiološko-molekularne značajke kampilobakterioza u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Disertacija. <https://repozitorij.mefst.unist.hr/>.

CARRIQUE-MAS, J., Y. ANDERSSON, M. HJERTQVIST, A. SVENSSON, A. TORNER, J. GIESECKE (2005): Risk factors for domestic sporadic campylobacteriosis among young children in Sweden. *Scandinavian J. Infect. Dis.*, 37, 101-110.

CHARVALOS E., Y. TSELENTIS, M. M. HAMZEHPUR, T. KÖHLER, J. C. PECHERE (1995): Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2019-2022. doi:10.1128/AAC.39.9.2019.

CHO, H., S. KIM, W. MIN, B. KU, J. KIM, Y. KIM (2014): Characterization of antimicrobial resistance and application of RFLP for epidemiological monitoring of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from dogs and humans in Korea. *Korean J. Vet. Res.* 54, 91-99.

CHON, J.W., J. Y. HYEON, J. H. PARK, K. Y. SONG, K. H. SEO (2012): Comparison of 2 types of broths and 3 selective agars for the detection of *Campylobacter* species in whole-chicken carcass-rinse samples, *Poul. Sci.*, 91,2382-2385.

CHOPRA, I. i M. ROBERTS (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2012.): Performance standards for antimicrobials disk susceptibility test. CLSI, Wayne, PA.

DAI, L., O. SAHIN, M. GROVER, Q. ZHANG (2020): New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. *J. Transl. Med.* 223, 76–88.

DAMBORG, P., K. E. P. OLSEN, E. M. NIELSEN, L. GUARDABASSI, (2004): Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 42,1363-1364.

DAVIS, M. A., D. L. MOORE, K. N. K. BAKER, N. P. FRENCH, M. PATNODE, J. HENSLEY, K. MACDONALD, T. E. BESSER (2013): Risk factors for campylobacteriosis in two Washington state counties with high numbers of dairy farms. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3921-3927.

DEBRUYNE, L., S. L. ON, E. DE BRAND, P. VANDAMME (2009): Novel *Campylobacter* lari-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1126-1132.

- DEBRUYNE, L., T. BROMAN, S. BERGSTROM, B. OLSEN, S. L. ON, P. VANDAMME (2010a): *Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60,815-819.
- DEBRUYNE, L., T. BROMAN, S. BERGSTROM, B. OLSEN, S. L. ON, P. VANDAMME (2010b): *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1870-1875.
- DECARO, N., C. BUONAVOGLIA (2012): Canine parvovirus-a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1-12.
- DE VRIEES, J. J., N. L. ARENTS, W. L. MANSON (2008): *Campylobacter* species isolated from extra-oro-intestinal abscesses: a report of four cases and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 1119-1123.
- DE VRIES, S. P. W., M. VURAYAI, M. HOLMES, S. GUPTA, M. BATEMAN, D. GOLDFARB, D. J. MASKELL, M. I. MATSHEKA, A. J. GRANT (2018): Phylogenetic analyses and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* spp. from diarrhoeal patients and chickens in Botswana. *PLoS One.* 13, e0194481. Doi: 10.1371/journal.pone.0194481.
- DEKEYSER, P., M. GOSSUIN-DETRAIN, J. P. BUTZLER, J. STERNON (1972): Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125, 390-392.
- DEVANE, M. L., C. NICOL, A. BALL, J. D. KLENA, P. SCHOLES, J. A. HUDSON, M. G. BAKER, B. J. GILPIN, N. GARRETT, M. G. SAVILI (2005): The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J. Appl. Microbiol.* 98, 980-990.
- DINGLE, K. E., F. M. COLLES, D. R. WAREING, R. URE, A. J. FOX, F. E. BOLTON, H. J. BOOTSMA, R. J. WILLEMS, R. URWIN, M. C. MAIDEN (2001): Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 14-23.
- DINGLE, T. C., S. M. BUTLER-WU (2013): Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin. Lab. Med.* 33. 589–609.
- DIONISI, A. M., I. LUZZI, A. CARATTOLI (2004): Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* and analysis of the *gyrA* gene by the LightCycler mutation assay. *Mol. Cell. Probes.* 18, 255-261.
- DOYLE, L. P. (1944.): A vibrio associated with swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* 5, 3-5.
- DUIJVESTIJN, M., L. MUGHINI-GRAS, N. SCHUURMAN, W. SCHIJF, J. A. WAGENAAR,

H. EGBERING (2016): Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-) occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet. Microbiol.* 195, 115-122.

EFSA (2018): Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in foodstuffs, animals and feedingstuffs. *EFSA J.* 16, 262.

EFSA and ECDC (2021): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19, e06406.

EFSA (2021a): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J.* 19, 6490.

EFSA (2023): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA J.* 21, 7867.

ENGVALL, E. O., B. BRÄNDSTROM, L. ANDERSSON, V. BÅVERUD, G. TROWALDWIGH G, L. ENGLUND (2003): Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in faecal samples from Swedish dogs. *Scand. J. Infect. Dis.* 35, 713-718.

ESCHER, R., C. BRUNNER, N. VON STEIGER, I. BRODART, S. DIAZ, C. ABRIL, P. KUHNERT (2016): Clinical and epidemiological analysis of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infections in humans and comparative genetic analysis with strains isolated from cattle. *Infect. Dis.* 16, 198.

ETOH, Y., F. E. DEWHIRST, B. J. PASTER, A. YAMAMOTO, N. GOTO (1993): *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 631-639.

EUCAST (2021): The European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (EUCAST). https://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/.

FACCIOLLA, A, R. RISO, E. AVVENTUROSO, G. VISALLI, S. A. DELIA, P. LAGANA (2017): *Campylobacter*: From microbiology to prevention. *J. Prev. Med. Hyg.* 58, E79-E92.

FIELDS, J. A., S. A. THOMPSON (2008): *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *J. Bacteriol.* 190, 3411-3416. doi:10.1128/JB.01928-07.

FITZGERALD, C., Z. CHAO TU, M. PATRICK, T. STILES, A. J. LAWSON, M. SANTOVENIA, M. j. GILBERT, M. VAN BERGEN, K. JOJCE, J. PRUCKLER, S. STROICA, B. DUIM, W. G. MILLER, V. LOPAREV, J. C. SINNIGE, P. I. FIELDS, R. V. TAUXE, M. J. BLASER, J. A. WAGENAAR (2014): *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2944-2948.

FORSTER, G., B. HOLMES, A. G. STEIGERWALT, P. A. LAWSON, P. THORNE, D. E. BYRER, H. M. ROSS, J. XERRY (2004): *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2369-2373.

FOUNOU, R. C., L. L. FOUNOU, S. Y. ESSACK (2017): Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 12, e0189621. Doi: 10.1371/journal.pone.0189621.

FOUTS, D. E., E. F. MONGODIN, R. E. MANDRELL, W. G. MILLER, D. A. RASKO, J. RAVEL, L. M. BRINKAC, R. T. DEBOY, C. T. PARKER, S. C. DAUGHERTY, R. J. DODSON, A. S. DURKIN, R. MADUPU, S. A. SULLIVAN, J. U. SHETTY, M. A. AYODEJI, A. SHVARTSBEYN, M. C. SCHATZ, J. H. BADGER, C. M. FRASER, K. E. NELSON (2005): Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species. *PLoS Biol.*, 3, e15. doi.org/10.1371/journal.pbio.0030015.

FOX, J. G., K. O. MAXWELL, J. I. ACKERMAN (1984): *Campylobacter jejuni* associated diarrhea in commercially reared beagles. *Lab. Anim. Sci.* 34, 151-155.

FOX, J. G., N. S. TAYLOR, P. EDMONDS, D. J. BRENNER (1988): *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* subsp. nov. isolated from the gastric mucosa of ferrets (*Mustela putorius furo*), and an emended description of *Campylobacter pylori*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 367-370.

FOX, J. G., T. CHILVERS, C. S. GOODWIN, N. S. TAYLOR, P. EDMONDS, L. I. SLY, D. J. BRENNER (1989): *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 301-303.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., T. HEIKKILA, N. PERNU, S. KOVANEN, A. HIELM-BJORKMAN, R. KIVISTO (2017): Raw meat-based diets in dogs and cats. *Vet. Sci.*, 4, 33. doi. 10.3390/vetsci4030033.

GARIBYAN, L., N. AVASHIA (2013): Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1-4. doi:10.1038/jid.2013.1.

GAUDREAU C., F. BOUCHER, H. GILBERT, S. BEKAL (2014): Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained in Montreal, Quebec, Canada, from 2002 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2644-2646.

GAZAIGNE, L., P. LEGRAND, B. RENAUD, B. BOUTTA, E. TAILLANDIER, C. BRUN-BUISSON, P. LESPRIT (2008): *Campylobacter fetus* bloodstream infection: risk factors and clinical features. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 185-189.

GEBHART, C. J., P. EDMONDS, G. E. WARD, H. J. KURTZ, D. J. BRENNER (1985): “*Campylobacter hyointestinalis*” sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.* 21, 715-720.

GILBERT, M. J., M. KIK, W. G. MILLER, B. DUIM, J. A. WAGENAAR (2015): *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 975-982.

GILBERT, M. J., W. G. MILLER, J. S. LEGER, M. H. CHAPMAN, A. J. TIMMERMAN, B. DUIM, G. FOSTER, J. A. WAGENAAR (2017): *Campylobacter pinnipediorum* sp. nov., isolated from pinnipeds, comprising *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* subsp. nov. and *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *caledonicus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1961-1968.

GILBERT, M. J., A. L. ZOMER, A. J. TIMMERMAN, M. P. SPANINKS, A. RUBIO-GARCIA, J. W. ROSSEN, B. DUIM, J. A. WAGENAAR (2018): *Campylobacter blaseri* sp. nov., isolated from common seals (*Phoca vitulina*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1787-1794.

GIBREEL, A., V. N. KOS, M. KEELAN, C. A. TRIEBER, S. LEVESQUE, S. MICHAUD, S., D.E. TAYLOR (2005). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 2753–2759. doi.org/10.1128/AAC.49.7.2753-2759.2005.

GONI, M. D., I. J. MUHAMMAD, M. GOJE, M. G. ABATCHA, A. A. BITRUS, M. A. ABBA (2017): *Campylobacter* in Dogs and Cats; Its detection and Public Health Significance: A Review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 5, 239-248.

GRAHAMM, C. i N. L. SIMMONS (2005): Functional organization of the bovinerumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, 173-181.

GRAHAM, J. P., J. J. BOLAND, E. SILBERGELD (2007): Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Pub. Health Rep.* 122, 79-87.

GRIGGS, D. J., M. M. JOHNSON, J. A. FROST, T. HUMPHREY, F. JØRGENSEN, L. J. PIDDOCK (2005): Incidence and Mechanism of Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter* spp. Isolated from Commercial Poultry Flocks in the United Kingdom before, during, and after Fluoroquinolone Treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* Feb. 49, 699–707. doi: 10.1128/AAC.49.2.699-707.2005

GUARINO, A., S. ASHKENAZI, D. GENDREL, A. L. VECCHIO, R. SHAMIR (2014): European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition/European society for pediatric infectious diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59, 132-152.

GUERRY, P. (2007): *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 15, 456-461.

HABIB, I., W. G. MILLER, M. UYTENDAELE, K. HOUF, L. DE ZUTTER (2009): Clonal population structure and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in chicken meat from Belgium. *Appl Environ. Microbiol.* 75, 4264–4272. doi: 10.1128/AEM.00168-09.

HABRUN, B. (2014): Kunička veterinarska bakteriologija. Rodovi *Campylobacter* i *Archobacter*. Medicinska naklada. Str. 274- 282.

HALD B. i M. MADSEN (1997): Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3351-3352. doi:10.1128/JCM.35.12.3351-3352.1997.

HALD, B., K. PEDERSEN, M. WAINO, J. C. JORGENSEN, M. MADSEN (2004): Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2003 – 2012.

HALL, T.A. (1999): BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

HANSSON, I., M. SANBERG, I. HABIB, R. LOWMAN, E. E. OLSSON (2018): Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 30-48

HARRINGTON, C. S., F. M., THOMSON-CARTER, P. E. CARTER (1997): Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2386-2392.

HASCALL, K. L., P. H. KASS, J. SAKSEN, A. AHLMANN, A. V. SCORZA, M. R. LAPPIN, S. L. MARKS (2016): Prevalence of Enteropathogens in Dogs Attending 3 Regional Dog Parks in Northern California. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1838-1845. doi: 10.1111/jvim.14603.

HATANAKA, N., K. KAMEI, S. SOMROOP, S. P. AWASTHI, M. ASAKURA, N. MISAWA, A. HINENOYA, S. YAMASAKI (2017): A PCR-RFLP assay to detect and type cytolethal distending toxin (cdt) genes in *Campylobacter hyointestinalis*. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 336-342. doi: 10.1292/jvms.16-0263.

HAYAMA, Y., T. YAMAMOTO, F. KASUGA, T. TSUTSUI (2011): Simulation model for *Campylobacter* cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses. *Zoonoses Public Health* 58, 399-406.

HELLGREN, J., L. S. HÄSTÖ, C. WIKSTRÖM, L. L. FERNSTRÖM, I. HANSSON (2019): Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* in raw meat-based diets for dogs. *Vet. Rec.* 6;184, 42.

HOFREUTER, D. (2014): Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 137.

HOLMBERG, M., T. ROSENDAL, E. O. ENGVALL, A. OHLSON, A. LINDBERG (2015): Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta. Vet. Scand.* 57, 19.

HORROCKS, S. M., R. C. ANDERSON, D. J. NISBET, S. C. RICKE (2009): Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe.* 15, 18-25.

HUBBARD, K., B. J. SKELLY, J. MCKELVIE, J. L. WOOD (2007): Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Vet. Rec.* 161, 755-757.

HUYSMANS, M.B., J. D. TURNIDGE, J. H. WILLIAMS (1995): Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3345-3346. doi:10.1128/jcm.33.12.3345-3346.1995.

HZJZ (2023): Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2021. – tablični podaci. <https://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2021-tablicni-podaci/>. Pristupljeno 23.2. 2023.

IANNINO, F., S. SALUCCI; G. DI DONATO, G. BADAGLIACCA, G. VINCIFORI, E. DI GIANNATALE (2019): *Campylobacter* and antimicrobial resistance in dogs and humans: “One health” in practice. *Vet. Ital.*, 55, 203-220.

IANNINO, F., G. DI DONATO, S. SALUCCI, E. RUGGIERI, G. VINCIFORI, M. L. DANZETTA, P. DALLA VILLA, E. DI GIANNATALE, G. LOTTI, F. DE MASSIS (2022): *Campylobacter* and risk factors associated with dog ownership: a retrospective study in household and in shelter dogs. *Vet. Ital.* 58, 59-66.

IDLAND, L., E. G. GRANQUIST, M. ASPHOLM, T. LINDBÄCK (2022): The prevalence of *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Norwegian dairy cattle farms: A comparison between free stall and tie stall housing systems. *J. Appl. Microbiol.* 132, 3959-3972. doi:10.1111/jam.15512.

- IFTEKHAR, A., A. K. VERMA, A. KUMAR (2018): Prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter* species among dogs attending veterinary practices at Veterinary University, Mathura, India. *Vet. Anim. Sci.* 6, 6-11.
- IGWARAN, A. i A. A. I. OKOH (2019): Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon.* 5, e02814. Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02814.
- INGLIS, G. D., B. M. HOAR, D. P. WHITESIDE, D. W. MORCK (2007): *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2636-2644.
- IOVINE, N. M. (2013): Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence.* 4, 230-240. doi:10.4161/viru.23753.
- JAGANNATHAN, A., C. CONSTANTINIDOU, C. W. PENN (2001): Roles of rpoN, fliA, and flgR in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriology*, 183, 2937–2942.
- JARCHO, J. (2001): Restriction fragment length polymorphism analysis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 2:Unit 2.7. doi: 10.1002/0471142905.hg0207s01.
- JEHANNE, Q., L. BÉNÉJAT, A. DUCOURNAU, C. DOMINGUES-MARTINS, T. COUSINOU, E. BESSÈDE, P. LEHOURS (2021): Emergence of Erythromycin Resistance Methyltransferases in *Campylobacter coli* Strains in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18;65, e0112421.
- JIN, S., A. JOE, J. LYNETT, E. K. HANI, P. SHERMAN, V. L. CHAN (2001): JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. microbiol.*, 39, 1225–1236.
- JOLLEY, K. A., J. E. BRAY., M. C. J. MAIDEN (2018): Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open res.*, 3, 124.
- JONES, F. C., M. ORCUTT, R. B. LITTLE (1931): Vibrios (*Vibrio jejuni* n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J. Exp. Med.* 53, 853-864.
- JONES, K. (2001): Campylobacters in water, sewage and the environment. *J. Appl. Microbiol.* 90, 68S-79S.
- JU, C., Y. MA, B. ZHANG, G. ZHOU, H. WANG, M. YU, J. HE, Y. DUAN, M. ZHANG (2023): Prevalence, genomic characterization and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolates in pets in Shenzhen, China. *Front Microbiol.* 1, 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1152719.

JUNG, H. C., L. ECKMANN, S. K. YANG, A. PANJA, J. FIERER, E. MORZYCKA-WROBLEWSKA, M. F. KAGNOF (1995): A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95, 55-65.

KAAKOUSH, N. O., N. CASTANO-RODRIGUEZ, H. M. MITCHEL, S. M. MAN (2015): Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microb. Rev.* 28, 687-720.

KAMEI, K., M. ASAKURA, S. SOMROOP, N. HATANAKA, A. HINENOYA, A. NAGITA, N. MISAWA, M. MATSUDA, S. NAKAGAWA, S. A. YAMASAKI (2014): PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 63, 659-666.

KARAMA, M., B. T. CENCI-GOGA, A. PROSPERI, E. ETTER, S. EL-ASHRAM, C. MCCRINDLE, J. N. OMBUI, A. KALAKE (2019): Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* spp. occurrence in healthy dogs visiting four rural community veterinary clinics in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 86, e1-e6.

KÄRENLAMPI, R., H. RAUTELIN, D. SCHÖNBERG-NORIO, L. AULIN, M. L. HÄNNINEN (2007): Longitudinal study of Finnish *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from humans, using multilocus sequence typing, including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle. *AEM*, 73, 148-155.

KIEHLBAUCH, J. A., D. J. BRENNER, M. A. NICHOLSON, C. N. BAKER, C. M. PATTON, A. G. STEIGERWALT, I. K. WACHSMUTH (1991): *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* 29, 376-385.

KINANA, A. D., E. CARDINALE, F. TALL, I. BAHSOUN, J. M. SIRE, B. GARIN, S. BREUREC, C. S. BOYE, J. D. PERRIER-GROS-CLAUDE (2006): Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3309–3313. doi: 10.1128/AEM.72.5.3309-3313.2006.

KING, E. O. (1957): Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.* 101, 119-128.

KITTL, S., P. KUHNERT, H. HÄCHLER, B. M. KORCZAK (2011). Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *J. Appl. Microbiol.*, 110, 513–520. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04906.x.

KOVAČ, J., N. ČADEŽ, B. STESSL, K. STINGL, I. GRUNTAR, M. OCEPEK, M. TRKOV, M. WAGNER, S. SMOLE MOŽINA (2015): High genetic similarity of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* in central Europe. *Front. microbiology.* 6, 1169.

- KOZIEL, M., P. O'DOHERTY, P. VANDAMME, G. D. CORCORAN, R. D. SLEATOR, B. LUCEY (2014): *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 2878-2883.
- KRELING, V., F. H. FALCONE; C. KEHRENBURG, A. HENSEL (2020): *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods - new molecular targets for innovative antiviral drugs? Appl. Microbiol. Biotechnol. 104, 10409-10436.
- KRIZMANIĆ, M. (2016). O životinjama i njihovim ljudima: zajedništvo koje nas raduje i obogaćuje. Zagreb. V.B.Z.
- KUMAR, S., G. STECHER, K. TAMURA (2015): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 33, 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- KURNAR R., A. K. VERMA, A. KURNAR, M. SRIVASTAVA, H. P. LAL (2012): Prevalence and antibiogram of *Campylobacter* infections in dogs of Mathura, India. Asian J. Animal Vet. Adv., 7, 434-440.
- LABARCA, J. A., S. JOAN, B. LEE, S. NANCY, M. H. SYDNEY, L. ELEANOR, R. ROSHAN, AND M. LAURENE (2002): *Campylobacter upsaliensis*: another pathogen for consideration in the United States. Clin. Infect. Dis. 34, e59–e60.
- LAGLER, H., B. KIESEWETTER, M. RADERER (2016): Infection with multidrug-resistant *Campylobacter coli* mimicking recurrence of carcinoid syndrome: a case report of a neuroendocrine tumor patient with repeated diarrhea. BMC Infect. Dis. 16, 409.
- LAKATOŠ, M., L. VEJMEĽKA (2018): Značaj životinja za djecu: implikacije za pomagačke profesije. Ljetopis socijalnog rada, 25, 101-130.
- LAPIERRE L., M. D. L. A. GATICA., V. RIQUELME, C. VERGARA, J. M. YAÑEZ, B. SAN MARTÍN, R. FLORES (2016): Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans. Microb. Drug. Resist. 22, 432-444.
- LASTOVICA, A. J. (2006): Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. Clin. Microbiol. Newsl. 28, 49–56.
- LAWSON A. J., D. LINTON, J. STANLEY, R. J. OWEN (1997): Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. J. Appl. Microbiol. 83, 375-380.

LAWSON, A. J., S. L. ON, J. M. LOGAN, J. STANLEY (2001): *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 651-660.

LEAHY, A. M., K. J. CUMMINGS, L. D. RODRIGUEZ-RIVERA, S. A. HAMER, S. D. LAW-HON (2017): Faecal *Campylobacter* shedding among dogs in animal shelters across Texas. *Zoonoses Public Health.* 64, 623-627.

LEE M.K., S. J. BILLINGTON, L. A. JOENS (2004): Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from food and companion animals. *Foodborne Path. Dis.* 1, 223-230.

LEMONS, M. L., A. NUNES, M. ANCORA, C. CAMMÀ, P. M. D. COSTA, M. OLEASTRO (2021). *Campylobacter jejuni* in Different Canine Populations: Characteristics and Zoonotic Potential. *Microorganisms.* 9, 2231. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112231>.

LENGERHA, F. MOGES, C. UNAKAL, B. ANAGAW B. (2013): Prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter* species among under five diarrheic children at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics*, 13, 1-13.

LEVESQUE, S., E. FOURNIER, N. CARRIER, E. FROST, R. D. ARBEIT, S. MICHAUD (2013): *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.* 8, 83731.

LEVIN, R. E. (2007): *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection, *Food Biotechnology.* 21, 271-347.

LIAO, C. H., C. Y. CHUANG, Y. T. HUANG, P. I. LEE, P. R. HSUEH (2012): Bacteremia caused by antimicrobial resistant *Campylobacter* species at a medical center in Taiwan, 1998-2008. *J. Infect.* 65, 392-9.

LIN J., L. O., MICHEL, Q. ZHANG (2002): CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 2124-2131.

LINDBLOM, G.-B., E. SJÖGREN, J. HANSSON-WESTERBERG, B. KAIJSER (1995): *Campylobacter upsaliensis*, *C. sputorum sputorum* and *C. concisus* as common causes of diarrhoea in Swedish children. *Scand. J. Infect. Dis.* 27, 187-188.

LOGAN, J. M., A. BURNENS, D. LINTON, A. J. LAWSON, J. STANLEY (2000): *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 865-872.

LÓPEZ, C. M., G. GIACOBONI, A. AGOSTINI, F. J. CORNERO, D. M. TELLECHEA, J. J. TRINIDAD (2002): Thermotolerant *Campylobacter* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. *Prev. Vet. Med.* 55, 193-200.

LUANGTONGKUM, T., B. JEONG, J. HAN, P. PLUMMER, C. M. LOGUE, Q. ZHANG (2009): Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol* 4,189-200.

MAIDEN, M. C. J., J. A. BYGRAVES, E. FEIL, G. MORELLI, J. E. RUSSELL, R. URWIN, Q. ZHANG, J. ZHOU, K. ZURTH, D. A. CAUGANT, I. M. FEAVERS, M. ACHTMAN, B. G. SPRATT (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 3140–3145.

MAN, S. M. (2011): The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 669-685.

MAREK, L., V. PASZTO (2017). Spatio-temporal outbreaks of campylobacteriosis and the role of fresh-milk vending machines in the Czech Republic: A methodological study. *Geospat. Health.* 12, 572.

MARKEY, B., F. LEONARD, M. ARCHAMBAULT, A. CULLINANE, D. MAGUIRE (2013): *Clinical veterinary microbiology*, 2nd ed., Elsevier Health Sciences. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto. 335-342.

MARKS, S. L., E. J. KATHER (2003): Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 33, 029-60.

MARKS, S. L., S. C. RANKIN, B. A. BYRNE, J. S. WEESE (2011): Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J. Vet. Intern. Med.*, 25, 1095-1208.

MARSHALL, B. J., H. ROYCE, D. I. ANNEAR, C. S. GOODWIN, J. W. PEARMAN, J. R. WARREN, J. A. ARMSTRONG (1984): Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios. Lett.* 25, 83-88.

MARTINEZ-ANTON, L., M. S. MARENDA, S. M. FIRESTONE, R. N. BUSHELL, G. CHILD, A. I. HAMILTON, S. N. LONG, M. A. R. LE CHEVOIR (2018): Response from Dr. Martinez-Anton, et al. to Dr. Foster letter to editor regarding Investigation of the role of *Campylobacter* infection in suspected acute polyradiculoneuritis (APN) in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 1843-1845.

MATSUDA, M., M. SHIGEMATSU, A. TAZUMI, T. SEKIZUKA, S. TAKAMIYA, B. C. MILLAR, I. TANEIKE, J. E. MOORE (2008): Cloning and structural analysis of the full-length cytolethal distending toxin (cdt) gene operon from *Campylobacter lari*. Br. J. Biomed. Sci. 65, 195–199. <https://doi.org/10.1080/09674845.2008.11732828>.

MAYNARD SMITH, J., N. H. SMITH, M. O’ROURKE, B. G. SPRATT (1993): How clonal are bacteria? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4384-4388.

MCCLUNG, C. R., D. G. PATRIQUIN, R. E. DAVIS (1983): *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 605-612.

MCFADYEAN, J. i S. STOCKMAN (1913): Abortion in sheep. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. H. M. S. O., London.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P., Y. GLUPCZYNSKI, P. M. TULKENS (1999): Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 727-737. doi:10.1128/AAC.43.4.727.

MOHAN, V., M. A. STEVENSON, J. C. MARSHALL, N. P. FRENCH (2017): Characterisation by multilocus sequence and porA and flaA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from samples of dog faeces collected in one city in New Zealand. NZVJ. 65, 209–213. doi.org/10.1080/00480169.2017.1311810.

MOORE, J. E., D. CORCORAN, J. S. G. DOOLEY, S. FANNING, B. LUCEY, M. MATSUDA, D. A. MCDOWELL, F. MEGRAUD, B. C. MILLAR, R. O. MAHONEY, L. O. RIORDAN, M. O. ROURKE, J. R. RAO, A. SAILS, P. WHYTE (2005): *Campylobacter*. Vet. Res. 36,351-382.

MUGHINI GRAS, L., J. H. SMID, J. A. WAGENAAR, A. G. DE BOER, A. H. HAVELAAR, I. H. FRIESEMA, N. P. FRENCH, L. BUSANI, W. VAN PELT (2012): Risk factors for *Campylobacteriosis* of chicken, ruminant, and environmental origin: A combined case-control and source attribution analysis. PLoS One 2012;7:e42599.

MUGHINI GRAS, L., J. H. SMID, J. A. WAGENAAR, M. G. J. KOENE, A. H. HAVELAAR, I. H. FRIESEMA, N. P. FRENCH, C. FLEMMING, J. D. GALSON, C. GRAZIANI, L. BUSANI, W. VAN PELT (2013). Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. Epidemiol. Infect., 141, 2526-2535. doi:10.1017/S0950268813000356.

MULLNER, P., S. E. F. SPENCER, D. J. WILSON, G. JONES, A. D. NOBLE, A. C. MIDWINTER, J. M. COLLINS-EMERSON, P. CARTER, S. HATHAVAJ, N. P. FRENCH (2009): Assigning the source of human campylobacteriosis in New Zealand: A comparative genetic and epidemiological approach. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1311-1319.

MUNGAI, E. A., C. B. BEHRAVESH, L. H. GOULD (2015): Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 119-122.

MURAWSKA, M., M. SYPECKA, J. BARTOSIK, E. KWIECIEŃ, M. RZEWUSKA, A. SAŁAMASZYŃSKA-GUZ (2022): Should We Consider Them as a Threat? Antimicrobial Resistance, Virulence Potential and Genetic Diversity of *Campylobacter* spp. Isolated from Varsovian Dogs. *Antibiotics (Basel)*. 11, 964. doi: 10.3390/antibiotics11070964.

NEGRETTI, N. M., C. R. GOURLEY, P. K. TALUKDAR, G. CLAIR, C. M. KLAPPENBACH, C. J. LAURITSEN, J. N. ADKINS, M. E. KONKEL (2021): The *Campylobacter jejuni* CiaD effector co-opts the host cell protein IQGAP1 to promote cell entry. *Nat. commun.*12, 1339.

NEILL, S. D., J. N. CAMPBELL, J. J. O'BRIEN, S. T. C. WEATHERUP, W. A. ELLIS (1985): Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 342-356.

NEI, M., KUMAR S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

NEOH, H. M., X. E. TAN, H. F. SAPRI, T. L. TAN (2019): Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect. Genet. Evol.* 74:103935. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103935.

NESBAKKEN, T., K. ECKNER, H. K. HOIDAL, O. J. ROTTERUD (2003): Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 231-240.

NEWELL, D. G. (2002): The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment. *Int. J. Infect. Dis.* 6, S16-S21.

NEWELL, D. G. i C. FEARNLEY (2003): Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343-4351.

NICHOLS, G. L. (2005): Fly Transmission of *Campylobacter*. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 361-364.

NISHIMURA, M., M. NUKINA, J. M. YUAN, B. Q. SHEN, J. J. MA, M. OHTA, T. SAIDA, T. UCHIYAMA (1996): PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 133-138.

NUNNEY, L., S. ELFEKIH, R. STOUTHAMER (2012): The importance of multilocus sequence typing: cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopathol.* 102,456-460. doi:10.1094/PHYTO-10-11-0298.

ODENDAAL, M. W., K. G. De CRAMER, M. L. VAN DER WALT, A. D. BOTHA, P. M. PIETERSON (1994): First isolation of *Campylobacter jejuni* from the vaginal discharge of three bitches after abortion in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61, 193-195.

ON, S. L. W. (2001): Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.* 90, 1-15.

OLKKOLA S., S. KOVANEN, J. ROINE, M. L. HÄNNINEN, A. HIELM-BJÖRKMAN & KIVISTÖ R. (2015): Population genetics and antimicrobial susceptibility of canine *Campylobacter* isolates collected before and after a raw feeding experiment. *PloS one.* 10, e0132660.

OLKKOLA S., S. NYKÄSENOJA, S. RAULO, A. K. LLARENA, S. KOVANEN, R. KIVISTÖ, M. L. HÄNNINEN (2016): Antimicrobial resistance and multilocus sequence types of finnish *Campylobacter jejuni* isolates from multiple sources. *Zoonoses Public Health,* 63, 10-19.

OLSON, P., K. SANDSTEDT (1987): *Campylobacter* in the dog: a clinical and experimental study. *Vet. Rec.* 121, 99-101.

OPORTO, B. J., I. ESTEBAN, G. ADURIZ, R. A. JUSTE, A. HURTADO (2007): Prevalence and strain diversity of thermophilic *Campylobacters* in cattle, sheep, and swine farms. *J. Appl. Microbiol.* 103, 977-984.

OYARZABAL, O. A. , K. S. MACKLIN, J. M. BARBAREE, R. S. MILLER (2005): Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3351-3354.

QUINN, P. J., B. K. MARKEY, M. E. CARTER, W. J. DONNELLY, F. C. LEONARD (2003): *Campylobacter* species. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Blackwell Science. Oxford, UK. Str. 168-172.

PARISI, A., M. CHIARA, M. CAFFARA, D. MION, W. G. MILLER, M. CARUSO, C. MANZARI, D. FLORIO, L. CAPOZZI, A. M. D'ERCHIA (2021): *Campylobacter vulpis* sp. nov. isolated from wild red foxes. *Syst. Appl. Microbiol.* 44,126204.

PENA, A., K. ABARCA, T. WEITZEL, J. GALLEGOS, J. CERDA, P. GARCIA, J. LOPEZ (2016): One health in practice: a pilot project for integrated care of zoonotic infections in immunocompromised children and their pets in Chile. *Zoon. Pub. Health* 63, 403-409.

- PHUNG, C., P. C. SCOTT, C. DEKIWADIA, R. J. MOORE, T. T. HAO VAN (2022): *Campylobacter bilis* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 72. Doi: 10.1099/ijsem.0.005314.
- PICCIRILLO, A., G. NIERO, L. CALLEROS, R. PEREZ, H. NAYA, G. IRAOLA (2016): *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 3468-3476.
- PILLAY, S., D. G. AMOAKO, A. L. K. ABIA, A. M. SOMBORO, C. O. SHOBO, K. PERRETT, L. A. BESTER, S. Y. ESSACK (2020): Characterisation of *Campylobacter* spp. Isolated from Poultry in KwaZulu-Natal, South Africa. Antibiotics. 9, 42. doi.org/10.3390/antibiotics9020042.
- PLATTS-MILLS, J. A., J. LIU, J. GRATZ, E. MDUMA, C. AMOUR, N. SWAI, M. TANIUCHI, S. BEGUM, P. PEÑATARO YORI, D. H. TILLEY, G. LEE, S. SHEN, M. T. WHARY, J. G. FOX, M. MCGRATH, M. KOSEK, R. HAQUE, E. R. HOUPPT (2014): Detection of *Campylobacter* in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. J. Clin. Microbiol. 52, 1074–1080. <https://doi.org/10.1128/JCM.02935-13>.
- PÖLZLER, T., H. P. STÜGER, H. LASSNIG (2018): Prevalence of most common human pathogenic *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Styria, Austria. Vet. Med. Sci. 4, 115-125.
- PROCTER, T. D., D. L. PEARL, R. L. FINLEY, E. K. LEONARD, N. JANECKO, R. J. REID-SMITH, J. S. WEESE, A. S. PEREGRINE, J. M. SARGEANT (2014): A cross-sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in south-western Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. Zoonoses and public hlth., 61, 208–218.
- QUEEN, E. V., S. L. MARKS, T. B. FARVER (2012): Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from northern California. J. Vet. Inter. Med., 26, 54-60.
- QUINN, P.J., B.K. MARKEY, M.E. CARTER, W.J. DONNELLY, F.C. LEONARD (2003): *Campylobacter* species. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science. Oxford, UK. Str. 168-172.
- RAMIREZ, M. S. i M. E. TOLMASKY (2010): Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13, 151-171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003.

- RILEY, A., A. ESHAGHI, R. OLSHA, V. G. ALLEN, S. N. PATEL (2015): Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Ontario, Canada during 2011-2013. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 292-294. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.020.
- RODRIGUES, C. G., R. T. MELO, B. B. FONSECA, P. A. MARTINS, F. A. FERREIRA, M. B. J. ARAUJO, D. A. ROSSI (2015): Occurrence and characterization of *Campylobacter* spp. isolates in dogs, cats and children. *Pesquisa Vet. Brasil.* 35, 365–370. doi: 10.1590/S0100-736X2015000400009.
- ROOP, R. M., R. M. SMIBERT, J. L. JOHNSON, N. R. KRIEG (1985): *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb. nov.: emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 189-192.
- ROOP, R. M., R. M. SMIBERT, J. L. JOHNSON, N. R. KRIEG (1986): Designation of the neotype strain for *Campylobacter sputorum* (Prévot) Véron and Chatelain 1973. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 348.
- ROSNER, B. M., A. SCHIELKE, X. DIDELOT, F. KOPS, J. BREIDENBACH, N. WILLRICH, G. GÖLZ, T. ALTER, K. STINGL, C. JOSENHANS, S. SUERBAUM, K. STARK (2017): A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. *Sci. Rep.* 7, 5139. Doi.10.1038/s41598-017-05227-x.
- ROSSI M., M. L. HÄNNINEN, J. REVEZ, M. HANNULA, R. G. ZANONI (2008): Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet. Microbiol.* 129, 304-314.
- ROSSI, M., L. DEBRUYNE, R. G. ZANONI, G. MANFREDA, J. REVEZ, P. VANDAME (2009): *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2364-2369.
- RUNESVÄRD, E., C. WIKSTRÖM, L. L. FERNSTRÖM, I. HANSSON (2020): Presence of pathogenic bacteria in faeces from dogs fed raw meat-based diets or dry kibble. *Vet. Rec.* 187, e71. doi:10.1136/vr.105644.
- RYCHLIK, I. (2020): Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Animals.* 10, 103. <https://doi.org/10.3390/ani10010103>.
- SAHIN, O., C. FITZGERALD, S. STROIKA, S. ZHAO, R. J. SIPPY, P. KWAN, P. J. PLUMMER, J. HAN, M. J. YAEGER, Q. ZHANG (2012): Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 50, 680-687.

- SAHIN, O., E. R. BURROUGH, N. PAVLOVIĆ, T. S. FRANA, D. M. MADSON, Q. ZHANG (2014): *Campylobacter jejuni* as a cause of canine abortions in the United States. J. Vet. Diagnost. Invest., 26, 699-704.
- SANDBERG M., B.BERGSJØ, M. HOFSHAGEN, E. SKJERVE, H. KRUSE (2002): Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. Prev. Vet. Med. 55, 241-253.
- SANDSTEDT, K., J. URSING, M. WALDERN (1983): Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. Curro Microbiol. 8, 209-213.
- SANDSTEDT, K. i J. URSING (1991): Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. previously known as the CNW group. Syst. Appl. Microbiol. 14, 39-45.
- SASAKI, Y., H. ASAKURA, T. ASAI (2022): Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Campylobacter* spp. isolated from beef cattle in Japan. Anim. Dis. 2, 15. <https://doi.org/10.1186/s44149-022-00048-6>.
- SCALLAN, E., R. M. HOEKSTRA, B. E. MAHON, T. F. JONES, P. M. GRIFFIN (2015): An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. Epidemiol. Infect. 143, 2795-2804.
- SCHIAFFINO, F., J. M. COLSTON, M. PAREDES-OLORTEGUI, R. FRANÇOIS, N. PISANIC, R. BURGA, P. PEÑATARO-YORI, M. N. KOSEK (2019): Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Species in a Pediatric Cohort Study. Antimicrobial agents and chemotherapy, 63, e01911-18.
- SELIWIORSTOW T., J. BARÉ, B. VERHAEGEN, M. UYTTENDAELE, L. DE ZUTTER (2014): Evaluation of a new chromogenic medium for direct enumeration of *Campylobacter* in poultry meat samples. J. Food. Prot. 77, 2111-2114.
- SELWET, M., T. CLAPA, M. GALBAS, R. SLOMSKI, F. PORZUCEK (2015): The prevalence of *Campylobacter* spp. and occurrence of virulence genes isolated from dogs. Polish J. Microb. 64, 73-76.
- SELWET, M. (2019): The Prevalence of Virulence Genes and Multidrug Resistance in Thermophilic *Campylobacter* Spp. Isolated from Dogs. Open Life Sci. 14, 681-687.
- SILVA, J., D. LEITE, M. FERNANDES, C. MENA, P. A. GIBBS, P. TEIXEIRA (2011): *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. Front. Microbiol. 2, 1-12.

SILVA, M. F., G. PEREIRA, C. CARNEIRO, A. HEMPHILL, L. MATEUS, L. LOPES-DA-COSTA, E. SILVA (2020): *Campylobacter portucalensis* sp. nov., a new species of *Campylobacter* isolated from the preputial mucosa of bulls. PLoS One 15:e0227500.

SKARP, C.P.A., M. L. HÄNNINEN, H. I. K. RAUTELIN (2016): Campylobacteriosis: the role of poultry meat. Clin. Microbiol. Infect. 22,103-109.

SKIRROW, M. (2006): John McFadyean and the Centenary of the First Isolation of Campylobacter Species. Clin. Infect. Dis. 43,1213-1217.

SMITH, T. (1919): The etiological relation of Spirilla (*V. foetus*) to bovine abortion. J. Exp. Med. 30, 313-323.

SNELLING, W. J., M. MATSUDA, J. E. MOORE, J. S. DOOLEY (2005): *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 41, 297-302.

STAFFORD, R. J., P. SCHUTER, M. KIRK, A. WILSON, L. UNICOMB, R. ASHBOLD, J. GREGORY (2007): A multi-center prospective case-control study of Campylobacter infection in persons aged 5 years and older in Australia. Epidemiol Infect. 135, 978-988.

STANLEY, J., A. P. BURNENS, D. LINTON, S. L. ON, M. COSTAS, R. J. OWEN (1992): *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. J. Gen. Microbiol. 138, 2293-2303.

STANLEY, K., K. JONES (2003): Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. J. Appl. Microbiol. 94, 104-113.

SKIRROW, M. B. (1977): *Campylobacter* enteritis: a 'new' disease. Br. Med. J. 2, 9-11.

STEELE, T. W., N. SANGSTER, J. A. LANSER (1985): DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in Central and South Australia. J. Clin. Microbiol. 22, 71-74.

STOCKDALE, A. J., N. J. BEECHING, J. ANSON, M. B. BEADSWORTH (2016): Emergence of extensive fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* gastroenteritis in Liverpool, UK. J. Infect. 72, 398-400.

SUBEJANO, M. S. E. P. i G. M. PENULIAR (2023): Multidrug resistance and high genotypic diversity in *Campylobacter upsaliensis* from household dogs in Metro Manila, Philippines. New Microbiol. 46, 303-307. PMID: 37747476.

SULAIMAN, I. M., Y. H. HSIEH, S. SIMPSON (2020): Species identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw poultry products by MALDI TOF MS and rRNA sequence analysis. J. AOAC Inter. 103, 197-204.

SYKES, J. i S. MARKS (2013): *Campylobacteriosis*. U: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Saunders, Philadelphia, SAD. pp: 452-457.

ŠOPREK, S., S. DUVNJAK, G. KOMPES, L. JURINOVIĆ, A. TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ (2022): Resistome Analysis of *Campylobacter jejuni* Strains Isolated from Human Stool and Primary Sterile Samples in Croatia. *Microorganisms*. 10, 1410.

ŠOPREK, S., J. UJEVIĆ, G. KOMPES, L. JURINOVIĆ, A. TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ (2023): First Report of *Campylobacter jejuni* Strains Belonging to ST-21 Clonal Complex Isolated from Human, Poultry and Wild Birds in Croatia: Antimicrobial Resistance and Genetic Distance. *Microorganisms*. 11, 1884.

TAMBIĆ – ANDRAŠEVIĆ, A., S. LUCIĆ (2021): Rezistencija bakterijskih izolata u 2020. godini. Poglavlje 1. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020. g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. Str. 117–119. https://iskra.bfm.hr/wp-content/uploads/2021/12/Knjiga-2020.-za-web_novo.pdf (pristupljeno 22. svibnja 2022.).

TAMURA, K., M. NEI, S. KUMAR (2004): Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101,11030-11035.

TAMURA, K., G. STECHER, S. KUMAR (2021): MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022-3027.

TANG, B., Y. WANG, Y. LUO, X. ZHENG, X. QIN, H. YANG, Z. SHEN (2021): Coexistence of *optrA* and *fexA* in *Campylobacter*. *Sphere*. 6, e00125-21.

TANNER, A. C. R., S. BADGER, C. H. LAI, M. A. LISTGARTEN, R. A. VISCONTI, S. S. SOCRANSKY (1981): *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 432-445.

TAYLOR, D. E. i D. M. TRACZ (2005): Mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter*. In J. M. Ketley i M. E. Konkel: *Campylobacter: Molecular and cellular biology* (pp. 193e204). Horizon Bioscience. Norfolk, UK.

TEH, K. H., S. FLINT, N. FRENCH (2010): Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *Int. J. Food. Microbiol.* 143, 118-124.

THAKUR, S. i W. A GEBREYES (2005): Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. J. Food Prot. 68, 2402-2410.

THEPAULT, A., V. ROSE, S. QUESNE, T. POEZEVARA, V. BEVEN, E. HIRCHAUD, F. TOUZAIN, P. LUCAS, G. MERIC, L. MAGEIROS, S. K. SHEPARD, M. CHEMALY, K. RIVOAL (2018): Ruminant and chicken: Important sources of campylobacteriosis in France despite a variation of source attribution in 2009 and 2015. Sci. Rep. 8, 9305. Doi.10.1038/s41598-018-27558-z.

THEPAULT, A., V. ROSE, M. QUEQUINER, M. CHEMALY, K. RIVOAL (2020): Dogs and Cats: Reservoirs for Highly Diverse *Campylobacter jejuni* and a Potential Source of Human Exposure. Animals, 10, 833. Doi. 10.3390/ani10050838.

THOMPSON C.N., M.V. PHAN., N.V.M HOANG., P. VAN MINH, N. T. VINH, C. T. THUY, V. V. PHAT (2015): A prospective multi-center observational study of children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. Am. J. Trop. Med. Hyg., 92, 1045-1052.

TOTTEN, P. A., C. L. FENNELL, F. C. TENOVER, J. M. WEZENBERG, P. L. PERINE, W. E. STAMM, K. K. HOLMES (1985): *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. J. Infect. Dis. 151, 131-139.

TRIBBLE, D. R. (2017): Antibiotic Therapy for Acute Watery Diarrhea and Dysentery. Mil. Med. 182, 17–25.

TSAI, H. J., H. C. HUANG, C. M. LIN, Y.Y. LIEN, C. H. CHOU (2007): Salmonellae and Campylobacters in household and stray dogs in northern Taiwan. Vet. Res. Commun. 31, 931-939.

VAN, T. T., E. ELSHAGMANI, M. C. GOR, P. C. SCOTT, R. J. MOORE (2016): *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 4518-4524.

VAN DYKE, M. I., V. K. MORTON, N. L. MCLELLAN, P. M. HUCK (2010): The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. J. Appl. Microbiol. 109,1053-1066.

VANDAMME, P., E. FALSEN, R. ROSSAU, B. HOSTEH,P. SEGERS, R. TYTGAT, J. DE LEY (1991): Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 88-103.

- VANDAMME, P., M. I. DANESHVAR, F. E. DEWHIRST, B. J. PASTER, H. GOOSSENS, C. W. MOSS (1995): Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 145-152.
- VANDAMME, P., L. DEBRUYNE, E. DE BRANDT, E. FALSEN (2010): Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2016-2022.
- VANDENBERG, O., K. HOUF, N. DOUAT, L. VLAES, P. RETORE, J. P. BUTZLER, A. DEDISTE (2006): Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 908-13.
- VAKULENKO, S. B. i S. MOBASHERY (2003): Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 430-450. doi:10.1128/CMR.16.3.430-450.2003.
- VERHOEFF-BAKKENES, L., H. A. JANSEN, P. H. IN 'T VELD, R. R. BEUMER, M. H. ZWIETERING, F. M. VAN LEUSDEN (2011): Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 406-412. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.027.
- VERMA, A. K., K. AMIT, S. K. SINGH, R. ANU, A. IFTEKHAR, S. DEEPTI, A. P. SINGH, S. LALIT (2014): Prevalence and resistance to antimicrobial agents of *Campylobacter* sp. Isolated from dogs in India. *J. Biol. Sci.* 14, 142-148.
- VERON, M. i R. CHATELAIN (1973): 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. System. Bacteriol.* 23,122-134.
- VINCENT, R., J. DUMAS, N. PICARD (1947): Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibrion. Avortement consécutif. *Bull. Acad. Nat. Med. Paris*, 90—92.
- WANG, Y. i D. E. TAYLOR (1990): Natural transformation in *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.*, 172, 949-955.
- WANG, G., C. G. CLARK, T. M. TAYLOR, C. PUCKNELL, C. BARTON, L. PRICE, D. L. WOODWARD, F. G. RODGERS (2002): Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol.*, 4744-4747.

- WANG, Y., M. ZHANG, F. DENG, Z. SHEN, C. WU, J. ZHANG, Q. ZHANG, J. SHEN (2014): Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:05-12.
- WANG, T., W. ZHAO, S. LI, H. YAO, Q. ZHANG, L. YANG (2022): Characterization of erm (B)-carrying *Campylobacter* spp. of retail chicken meat origin. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 30,173–7.
- WEESE, J. S. (2011): Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Vet. Clin. North Amer: Small Anim. Pract.* 41, 287-309.
- WESTGARTH, C., C. J. PORTER, L. NICOLSON, R. J. BIRTLES, N. J. WILLIAMS, C. A. HAR, S. DAWSON (2009): Risk factors for the carriage of *Campylobacter upsaliensis* by dogs in a community in Cheshire. *Vet. Rec.*, 165, 526-530.
- WHO (2023): *Campylobacter*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>. Pristupljeno 10.2. 2023.
- WIECZOREK, K. i J. OSEK (2013): Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed. research international.* 340605. doi.org/10.1155/2013/340605.
- WIECZOREK. K., E. DENIS, B. LACHTARA, J. OSEK (2017): Distribution of *Campylobacter jejuni* multilocus sequence types isolated from chickens in Poland. *Poult Sci.* 96, 703-709.
- WILSON, M. K., A. B. LANE, B. F. LAW, W. G. MILLER, L. A. JOENS, M. E. KONKEL, B. A. WHITE (2009): Analysis of the Pan Genome of *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Reveals Different Discriminatory Capabilities. *Microb. Ecol.* 58, 843–855. doi.org/10.1007/s00248-009-9571-3.
- WOLFS, T. F., B. DUIM, S. P. GEELLEN, A. RIGTER, F. THOMSON-CARTER, A. FLEER, J. A. WAGENAAR (2001): Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy. *Clin. Infect. Dis.* 32, E97-E99.
- WORKMAN, S. N., G. E. MATHISON, M.C. LAVOIE (2005): Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2642-2650. doi:10.1128/JCM.43.6.2642-2650.2005.
- WYSOK, B., A. WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, J. URADZINSKI, J. SZTEYN (2011): Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in raw milk in the selected areas of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 14, 473-477.

YAMASAKI, S., A. MASAHIRO, T. TSUKAMOTO, S. M. FARUQUE, R. DEB, T. RAMAMURTHY (2006): Cytolethal distending toxin (cdt): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease, *Toxin Rev.* 25, 61-88. doi: 10.1080/15569540500320938.

YAMAZAKI-MATSUNE, W., M. TAGUCHI, K. SETO, R. KAWAHARA, K. KAWATSU, Y. KUMEDA, M. KITAZATO, M. NUKINA, N. MISAWA, T. TSUKAMOTO (2007): Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microbiol.* 56, 1467-1473.

YILDIZ, M., O. SAHIN, M. C. ADIGUZEL (2024): Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species in shelter-housed healthy and diarrheic cats and dogs in Turkey. *Vet. Med. Sci.* doi: 10.1002/vms3.1327.

ZANONI, R. G., L. DEBRUYNE, M. ROSSI, J. REVEZ, P. VANDAMME (2009): *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59,1666-1671.

ZHANG M., Y. GU, L. HE, L. RAN, S. XIA, X. HAN, H. LI, H. ZHOU, Z. CUI, J. ZHANG (2010): Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. *J. Med. Microbiol.* 59, 1171-1177.

ZHANG, Q. A. F. BEYI, Y. YIN (2023): Zoonotic and antibiotic-resistant *Campylobacter*: a view through the One Health lens. *One Health Adv.* 1, 4. Doi.org/10.1186/s44280-023-00003-1.

ZENG X., B. GILLESPIE, J. LIN (2015): Important role of a putative lytic transglycosylase Cj0843c in β -lactam resistance in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers Microbiol.* 6, 1292.

ZHOU J., M. ZHANG, W. YANG, Y. FANG, G. WANG, F. HOU (2016): A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. *Int. J. Infect. Dis.* 42, 28-33.

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Marija Cvetnić rođena je 30. ožujka 1991. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne i srednje škole, 2010. godine upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2016. godine i stekla titulu doktorice veterinarske medicine. Tijekom studija sudjelovala je u radu udruge „IVSA“ te sudjelovala u organizaciji razmjene studenata putem udruge.

Zaposlena je na radno mjesto asistentice na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom 2017. godine. Doktorski studij upisuje 2018. godine. Sudjelovala je u izvođenju nastave iz kolegija „Zarazne bolesti domaćih životinja“. Trenutačno sudjeluje u izvođenju nastave na hrvatskom i engleskom jeziku iz kolegija „Opća mikrobiologija“, „Specijalna mikrobiologija“, „Veterinarska imunologija“ i „Veterinarska klinička mikrobiologija“.

Sudjelovala je u stručnom radu Laboratorija za infektivnu anemiju kopitara i Laboratorija za leptospire, prvenstveno kako bi se upoznala s izvođenjem metoda, s ciljem podizanja kvalitete nastavnog rada u području mikrobiologije. Također, od 2019. do 2021. godine aktivno je sudjelovala u radu Klinike za zarazne bolesti. Od 2019. godine do danas bavi se stručnim radom u Bakteriološkom laboratoriju. Rad u Bakteriološkom laboratoriju i rad na Klinici za zarazne bolesti doveli su do sjedinjenja te dvije jedinice u njenom znanstvenom interesu, koji se ponajprije odnosi na kampilobakteriozu pasa.

Pohađala je edukaciju u sklopu CEEPUS stipendije u Institutu za mikrobiologiju i parazitologiju pri Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija, u vremenskom periodu 13.9. - 4.10.2021. godine.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

CVETNIĆ, Ž., S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, I. REIL, M. MIKULIĆ, M. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ (2017): Swine Brucellosis caused by *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. Slov. Vet. Zb., 54, 149-154.

CVETNIĆ, Ž., M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, I. REIL, M. MIKULIĆ, Ž. PAVLINEC, M. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ (2018): Rezervoari *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa i njihovo značenje u infekciji životinja i ljudi. Vet. stanica, 49, 261-271.

OSTOJIĆ, M., M. HUBANA, M. CVETNIĆ, M. BENIĆ, Ž. CVETNIĆ (2021): Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine in hospital patients and outpatients. Arch. Biotechnol Blomed. 5, 001-007.

CVETNIĆ, L., M. SAMARDŽIJA, S. DUVNJAK, B. HABRUN, M. CVETNIĆ, V. JAKI TKALEC, D. ĐURIČIĆ, M. BENIĆ (2021): Multi Locus Sequence Typing and spa Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from the Milk of Cows with Subclinical Mastitis in Croatia. Microorganisms, 9 (4). doi: 10.3390/microorganisms9040725.

CVETNIĆ, L., M. SAMARDŽIJA, S. DUVNJAK, B. HABRUN, M. CVETNIĆ, V. JAKI TKALEC, D. ĐURIČIĆ, M. BENIĆ (2021): Multi Locus Sequence Typing and spa Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from the Milk of Cows with Subclinical Mastitis in Croatia. Microorganisms. 9, 725, 16.

JAKI TKALEC, V., S. FURMEG, M. BUKVIĆ, M. CVETNIĆ, J. SOKOLOVIĆ, P. MUSTAPIĆ, Ž. CVETNIĆ (2021): Učestalost serovarova *Salmonella* spp. u pilećem mesu s područja sjeverozapadne Hrvatske. Veterinarska stanica, 52 (4). doi: 46419/vs.52.4.11.

ŠTRITOF, Z., R. MATIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, S. PINTARIĆ, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ (2021): Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with respiratory disease // FEMS Online Conference on Microbiology: Electronic Abstract Book, 5-5. Beograd, Srbija.

MOHOROVIĆ, N., V. M. MOJČEC, LJ. PINTER, Z. ŠTRITOF, I. BENVIN, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, S. HAĐINA (2021): Molecular identification of animal – derived *Candida* species and their susceptibility to miconazole determined by the broth microdilution method. 9th International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, Hrvatska, 9. listopada 2021., Book of Abstracts, str. 93-93.

BENVIN, I., V. STEVANOVIĆ, S. KOVAČ, A. ŠKRINJARIĆ, V. STAREŠINA, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, N. TURK, Z. MILAS, LJ. BARBIĆ (2021): Aetiology of viral gastroenteritis in dogs - prevalence and risk factors. 9th International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, Hrvatska, 9. listopada 2021., Book of Abstracts str. 90-90.

KAJMIĆ, A., A. JUTRIŠA, V. MOJČEC PERKO, J. HABUŠ, S. HAĐINA, S. PINTARIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): High carriage rate of methicillin-resistant staphylococci in small animal veterinary clinicians – indirect evidence of zoonotic transmission. 9th International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, Hrvatska, 9. listopada 2021., Book of Abstracts str. 46-46.

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, D. BROZIĆ, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog feces. 9th International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, Hrvatska, 9. listopada 2021., Book of Abstracts str. 45-45.

ZEČEVIĆ, I., Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, I. BENVIN, M. CVETNIĆ, K. MARTINKOVIĆ, J. HABUŠ (2021): Therapeutic potential of faecal microbiota transplantation in dogs. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts / Brkljača Bottegaro, Nika ; Lukač, Maja ; Zdolec, Nevijo et al. (ur.). Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 95-95.

STEVANOVIĆ, V., M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, I. BENVIN, I. TABAIN, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, S. KOVAČ, Ž. HRUŠKAR, V. STAREŠINA, I. ŠMIT, L. RADIN, M. BRKLJAČIĆ, S. HAĐINA, Z. VRBANAC, B. ŠKRLIN, V. PLICHTA, M. CVETNIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, K. MARTINKOVIĆ, M. PERHARIĆ, I. ZEČEVIĆ, G. JURKIĆ, L. BUCIĆ, LJ. BARBIĆ (2021): Značaj kućnih ljubimaca u epidemijologiji COVID-19: što danas znamo? (Re-)emergentni arbovirusi u sjeni pandemije COVID- 19, 10.-11. lipnja 2021., virtualni simpozij, Program i zbornik sažetaka, str. 61-62.

KNEŽEVIĆ, K., V. DOBRANIĆ, D. ĐURIČIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, I. GETZ, M. EFENDIĆ, L. CVETNIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, M. CVETNIĆ, M. MAZIĆ, N. MAĆEŠIĆ (2021): Primjena broja somatskih stanica za dijagnostiku mastitisa i utjecaj na kakvoću mlijeka. Vet. stanica, 52, 6; 751-764. doi:10.46419/vs.52.6.11.

STEVANOVIĆ, V., I. TABAIN, T. VILIBIĆ- ČAVLEK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, I. BENVIN, Ž. HRUSKAR, S. KOVAČ, I. ŠMIT, G. MILETIĆ, S. HAĐINA, V. STAREŠINA, L. RADIN, V. PLICHTA, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC, M. BRKLJAČIĆ, M. CVETNIĆ, J. HABUŠ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, G. JURKIĆ, I. IVANA, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, L. BUČIĆ, LJ. BARBIĆ (2021): The Emergence of SARS-CoV-2 within the Dog Population in Croatia: Host Factors and Clinical Outcome. *Viruses-Basel*, 13, 8; 1430-1430 doi:10.3390/v13081430.

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2022): Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from dogs with diarrhea. 4th INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY MICROBIOLOGY- Book of abstracts. str. 49-50.

CVETNIĆ, L., S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, B. HABRUN, V. KATALINIĆ - JANKOVIĆ, M. CVETNIĆ, M. ZDELAR - TUK, I. REIL, S. DUVNJAK, Ž. CVETNIĆ, M. BENIĆ (2022): Mastitisi u krava prouzročeni brzorastućim mikobakterijama iz okoliša. *Vet. stanica*, 53, 493-501. doi:10.46419/vs.53.5.11.

MAČEŠIĆ, N., T. FUMIĆ, S. DUVNJAK, G. BAČIĆ, L. CVETNIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, B. HABRUN, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. EFENDIĆ, M. CVETNIĆ, M. BENIĆ (2022): Podudarnost mikrobiološke i molekularne metode identifikacije izolata streptokoka iz kravljeg mlijeka. *Vet. stanica*. 92, 381-387.

CVETNIĆ, L., B. HABRUN, V. JAKI TKALEC, S. DUVNJAK, G. KOMPES, M. ĐURIĆ JARIĆ, M. CVETNIĆ, M. SAMARDŽIJA, Ž. CVETNIĆ, M. BENIĆ (2022): Nalaz gena *spa*, *mecA*, *mecC* i *pvl* u bakterije *S. aureus* izdvojene iz mlijeka krava višestrukom lančanom reakcijom polimeraze (Multiplex PCR). Zbornik sažetaka 44. međunarodnog simpozija mljekarskih stručnjaka. Volarić, Vera (ur.). Zagreb, Hrvatska. Hrvatska mljekarska udruga (HMU). 62-62.

BENIĆ, M., B. HABRUN, S. DUVNJAK, G. KOMPES, S. ŠPIČIĆ, V. JAKI TKALEC, M. ĐURIĆ JARIĆ, M. CVETNIĆ, M. SAMARDŽIJA, Ž. CVETNIĆ, CVETNIĆ, L. (2022): Tipiziranje bakterije *S. aureus* otporne na meticilin (MRSA) izdvojene iz mlijeka krava pomoću Multi Locus Sequence Typing – MLST. Zbornik sažetaka 44. međunarodnog simpozija mljekarskih stručnjaka, Volarić, Vera (ur.). Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga (HMU). 55-55.

PINTARIĆ, S., Z. ŠTRITOF, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2022): Resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. Proceedings of the conference Antimicrobial resistance in veterinary medicine : current state and perspectives. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, 128-140.

PINTARIĆ S., Z. ŠTRITOF, V. M. PERKO, A. TUMPA, M. CVETNIĆ, L. HADŽIĆ (2023): Detection of blaCTX-Mgenes in ESBL-producing *Klebsiella* isolates from animals in Croatia. Acta. Vet. Hung. 71, 12 – 15.

ŠTRITOF, Z., K. MARTINKOVIĆ, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, V. STEVANOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, I. BENVIN, S. PINTARIĆ, M. CVETNIĆ, S. HAĐINA (2023): Dermatofitoze pasa i mačaka. Hrvat. vet. vjesn. 31, 36-46.

BENVIN, I., V.M. PERKO, M. M. MALJKOVIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, N. TURK (2023): Serological Surveillance of Equine Leptospirosis in Croatia in the Period From 2012 to 2022: A Key Insight Into the Changing Epizootiology. JEVS. 127, 104844.

STEVANOVIĆ, V., M. M. MALJKOVIĆ, K. GRACIN, I. BENVIN, V. STAREŠINA, S. KOVAČ, A. ŠKRINJARIĆ, S. HAĐINA, I. ZEČEVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, LJ. BARBIĆ (2023): Seroprevalencija respiratornog koronavirusa pasa u Hrvatskoj. Vet. Arh. 93, 239 – 246.