

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

LUKA KATIĆ

OTPORNOST NA ANTIBIOTIKE I VIRULENCIJA
SOJEVA *CAMPYLOBACTER COLI* I *CAMPYLOBACTER JEJUNI* IZOLIRANIH IZ
KLINIČKIH UZORAKA U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT:
ANALIZA SEKVENCIRANJA CIJELOG GENOMA

Doktorski rad

U Splitu, 2026. godina

Ovaj doktorski rad izrađen je pod mentorstvom doc. prim. dr. sc. Anite Novak, dr. med. pri Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split te pri Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

PRISTUPNIK: Luka Katić, dr. med.

VODITELJICA RADA: Doc. prim. dr. sc. Anita Novak, dr. med.

ZAHVALA

Prije svega, želim izraziti iskrenu i duboku zahvalnost svojoj mentorici, doc. prim. dr. sc. Aniti Novak, na stručnoj podršci, vodstvu, strpljenju i povjerenju tijekom izrade ove doktorske disertacije. Njezino mentorstvo, znanstvena usmjerenost i poticaj bili su od iznimne važnosti u oblikovanju ovoga rada.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama s Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split te s Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu na suradnji, pomoći i profesionalnoj podršci tijekom provedbe ovog istraživanja. Posebnu zahvalnost upućujem i kolegicama i kolegama iz Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu na vrijednoj suradnji i doprinosu ovom znanstvenom radu.

Također zahvaljujem kolegama sa Sveučilišta Yale, osobito prof. Josephu Schlessingeru, mojem bivšem mentoru, te prof. Janošu Terziću, mojem bivšem komentoru, na suradnji tijekom drugih znanstvenih projekata provedenih tijekom mogega dokorskog studija i postdokorskog boravka na Yaleu. Njihovo znanstveno iskustvo, širina razmišljanja i poticajno akademsko okruženje značajno su utjecali na moj profesionalni i znanstveni razvoj.

Zahvaljujem dr. Petri Zubin Maslov, kao i svim kolegicama i kolegama iz bolnice Mount Sinai Morningside West, na potpori, razumijevanju i suradnji tijekom mogega kliničkog treninga i specijalizacije. Njihova podrška imala je osobitu vrijednost u razdoblju u kojem su se isprepletali zahtjevi kliničkog rada i znanstvenog usavršavanja.

S osobitom zahvalnošću mislim na svoje roditelje Ivicu i Mirjanu, sestre Mariju i Klaru te na svoje bake i djedove, a posebno na djeda Jozu Katića, čija su ljubav, žrtva, podrška i vjera u mene bili trajni oslonac kroz sve godine mogega obrazovanja i osobnog razvoja. Zahvaljujem i svim prijateljima, kolegama i ljudima koji su na različite načine bili dio ovoga puta.

Na kraju, najdublju zahvalnost upućujem svojoj supruzi Anamariji Katić. Hvala joj na ljubavi, strpljenju, razumijevanju i svakodnevnoj potpori. Ona daje smisao mojem životu, moj je dom, mir i najveća snaga. Bez njezine prisutnosti, ljubavi i vjere u mene, ovaj put ne bi imao istu vrijednost ni smisao.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Rod <i>Campylobacter</i> - osnovne mikrobiološke značajke	2
1.2. Patogeneza i virulencija	4
1.2.1 Pokretljivost.....	4
1.2.2. Adherencija, invazija i produkcija toksina	7
1.2.3. Imunomodulacija	9
1.2.4. Odnos virulencije i antimikrobne otpornosti	11
1.3. Kampilobakterioze - klinički značaj.....	13
1.4. Epidemiologija.....	14
1.4.1. Javnozdravstveni značaj kampilobakterioza	14
1.4.2. Genotipska raznolikost i geografska rasprostranjenost	16
1.5. Liječenje i mehanizmi otpornosti na antibiotike	18
1.5.1. Liječenje kampilobakterioza.....	18
1.5.2. Mehanizmi i učestalost stečene antimikrobne otpornosti.....	19
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	22
2.1. Ciljevi istraživanja	23
2.2. Hipoteze istraživanja.....	24
3. METODE I MATERIJALI.....	25
3.1. Izolati	26
3.2. Mikrobiološke i molekularne metode	27
3.2.1. Izolacija <i>Campylobacter</i> spp. standardnim mikrobiološkim metodama	28
3.2.2. Identifikacija vrste masenom spektrometrijom vremena leta uz laserski potpomognutu desorpciju / ionizaciju s matricom (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i> , MALDI-TOF MS)	28
3.2.3. Ispitivanje osjetljivosti izoliranih sojeva <i>C. jejuni</i> i <i>C. coli</i> na antibiotike metodom disk difuzije prema EUCAST protokolu	29
3.2.4. Sekvenciranje cijelog genoma (engl. <i>Whole genome sequencing</i> , WGS).....	31
3.2.5. Genotipizacija izolata određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (engl. <i>Multi Locus Sequence Typing</i> , MLST).....	32
3.2.6. Filogenetska analiza izolata <i>Campylobacter</i> spp.....	32
3.3. Statistički postupci	33
3.4. Etička načela	34

3.5. Ustroj istraživanja.....	34
4. REZULTATI.....	35
4.1. Osjetljivost izolata <i>C. jejuni</i> i <i>C. coli</i> na testirane antibiotike	36
4.2. Analiza molekularne osnove antimikrobne otpornosti.....	37
4.3. Distribucija genotipova identificirana određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (MLST analiza)	41
4.4. Analiza gena virulencije.....	43
4.4.1. Analiza gena pokretljivosti.....	43
4.4.2. Analiza gena imunomodulacije	45
4.4.3. Analiza gena adherencije, invazije i produkcije toksina	47
4.5. Filogenetska analiza i usporedba s izolatima pohranjenim u genskoj bazi.....	48
5. RASPRAVA.....	52
6. ZAKLJUČAK	59
7. SAŽETAK	61
8. LAIČKI SAŽETAK.....	63
9. SUMMARY	65
10. PLAIN LANGUAGE SUMMARY.....	68
11. LITERATURA.....	70
12. ŽIVOTOPIS	93

POPIS KRATICA

ABC - *engl. ATP-binding cassette*

ACG - *engl. American College of Gastroenterology*

ADP - adenzin-difosfat

ALPK1 - *engl. alpha-protein kinase 1*

AMR - antimikrobna rezistencija

ANI - *engl. average nucleotide identity*

CARD - *engl. Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CC - *engl. clonal complex*

CDC - *engl. Centers for Disease Control and Prevention*

CDT - *engl. cytolethal distending toxin*

CI - *engl. confidence interval*; interval pouzdanosti

CMP - citidin-monofosfat

CPS - *engl. capsular polysaccharide*

CRISPR/Cas - *engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated proteins*

DALY - *engl. disability-adjusted life years*

DDH - *engl. DNA-DNA hybridization*

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ECDC - *engl. European Centre for Disease Prevention and Control*

ESBL - *engl. extended-spectrum beta-lactamases*; beta-laktamaze proširenog spektra

EU - Europska unija

EUCAST - *engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GBS - Guillain-Barréov sindrom

G+C - guanin + citozin

HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IDSA - *engl. Infectious Diseases Society of America*

IL-1 β - interleukin 1 beta

IL-8 - interleukin 8

KBC - Klinički bolnički centar

LOS - lipooligosaharid

MALDI-TOF MS - *engl. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

MDR - *engl. multidrug resistance*

MH-F - *engl. Mueller-Hinton fastidious agar*

ML - *engl. maximum likelihood*

MLST - *engl. multilocus sequence typing*

NCBI - *engl. National Center for Biotechnology Information*

NF- κ B - *engl. nuclear factor kappa B*

NLRP3 - *engl. NLR family pyrin domain containing 3*

Pse - pseudaminska kiselina

PubMLST - *engl. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*

SAD - Sjedinjene Američke Države

SNP - *engl. single nucleotide polymorphism*

ST - *engl. sequence type*

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TLR - *engl. Toll-like receptor*

WGS - *engl. whole genome sequencing*

1. UVOD

1.1. Rod *Campylobacter* - osnovne mikrobiološke značajke

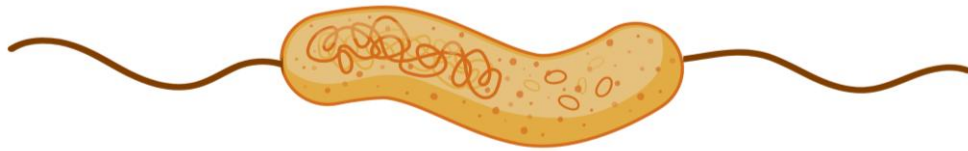
Rod *Campylobacter* obuhvaća gram-negativne, nesporogene bakterije iz obitelji *Campylobacteraceae*, koje pripadaju skupini epsilon-proteobakterija (1). Do danas je opisano više od 30 vrsta i nekoliko podvrsta, uključujući dobro poznate patogene koji se prenose hranom i kontaktom sa životinjama, ali i nedavno identificirane vrste (1–3). Razvoj i primjena molekularnih metoda istraživanja i genomskih analiza nalažu potrebu standardizacije i uvođenja nove klasifikacije (1,2).

Morfološke i strukturne karakteristike bakterija roda *Campylobacter* povezane su s njihovom sposobnošću prilagodbe i preživljavanja u različitim uvjetima. Ove bakterije imaju karakterističan spiralni ili zakrivljeni oblik štapića 0,2 - 0,8 µm širine i 0,5 - 5 µm duljine, često opisan kao „galebova krila“, što je prikazano na slici 1. (4,5). Helikalni oblik stanice održavaju enzimi koji modificiraju peptidoglikan, a promjene u njihovoj ekspresiji omogućuju varijacije oblika, uključujući spiralne, štapićaste i okrugle forme (4,6,7). Ovakva morfološka fleksibilnost omogućuje prilagodbu različitim okolišnim uvjetima i doprinosi preživljavanju izvan domaćina (4,5).

Specifični uvjeti rasta i zahtjevi za kultivaciju važni su za razumijevanje biologije ovih mikroorganizama. *Campylobacter* vrste su mikroaerofilni i kapnofilni organizmi koji zahtijevaju smanjenu koncentraciju kisika i povišenu koncentraciju ugljikova dioksida za optimalan rast (8). Najbolje rastu pri temperaturama između 37 i 42 °C, pri čemu termotolerantne vrste poput *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* preferiraju višu temperaturu (9). Rast je spor, a kolonije se obično razvijaju nakon 48 do 72 sata inkubacije na selektivnim podlogama (9). Unatoč zahtjevnim uvjetima rasta, ove bakterije mogu preživjeti u okolišu stvaranjem biofilma i vezanjem za površine, što ima važnu ulogu u njihovoj perzistenciji i prijenosu kroz hranidbeni lanac (10).

Osobitost genoma roda *Campylobacter* je visoka razina genetske prilagodljivosti i varijabilnosti. Referentni genom *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) sastoji se od relativno malog kružnog kromosoma s niskim udjelom gvanin+citozin parova i ograničenim brojem repetitivnih sekvenci (11,12). Jedna od ključnih značajki genoma je prisutnost hipervarijabilnih regija s homopolimernim nizovima nukleotida, koji omogućuju faznu varijaciju putem mehanizma pogrešnog sparivanja tijekom replikacije deoksinukleinske kiseline (DNK) (11,13). Ovaj

mehanizam omogućuje brze promjene u ekspresiji gena, osobito onih povezanih s površinskim strukturama, što doprinosi prilagodbi bakterije i izbjegavanju imunološkog odgovora (11,14).

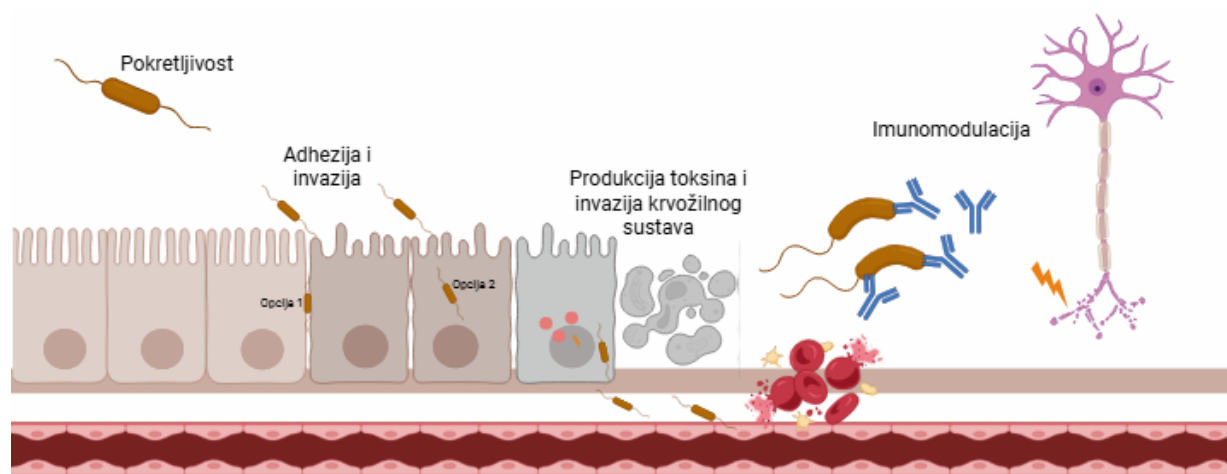


Slika 1. Animacija bakterije *Campylobacter* spp (izrađeno u BioRender, Luka Katić, 2026)

<https://BioRender.com/6h4lsik>)

1.2. Patogeneza i virulencija

Patogeneza kampilobakterioza odvija se kroz nekoliko međusobno povezanih faza: adherencija, invazija, stanično oštećenje, upala i imunomodulacija (slika 2.). Ukratko, pokretljivost olakšava bakteriji prolazak kroz mukusni sloj, nakon čega slijedi čvrsto vezanje za receptore epitelnih stanica. Invazija uključuje ulazak bakterije u stanice domaćina i intracelularni opstanak, dok citotoksičnost dovodi do oštećenja epitela i razvoja upalne reakcije. Završnu fazu čini imunomodulacija, kojom bakterija izbjegava imunološki odgovor domaćina i potencijalno inducira molekularnu mimikriju (15).



Slika 2. Animacija patogeneze kampilobakterioze (izrađeno u BioRender, Luka Katić, 2026)

<https://BioRender.com/skpu9zo>)

1.2.1 Pokretljivost

Pokretljivost je važan čimbenik virulencije kampilobaktera koji omogućava početak kolonizacije gastrointestinalne sluznice te razvoja bolesti u ljudi i životinja. Ostvaruje se putem flagela, bičastih organela smještenih na oba pola bakterijske stanice, dužine oko 3,5 μm (16–19). Dvije suprotno postavljene flagele omogućavaju kampilobakteru izuzetno brzu pokretljivost ($>100 \mu\text{m/s}$ na 42°C) kroz viskoznu sluznicu gastrointestinalnog trakta vrtložnim mehanizmom (slika 3.) (19,20). Struktura flagela je kompleksan molekularni aparat čija je sinteza kodirana visoko konzerviranim strukturnim genima nužnim za izgradnju bazalnog tijela, pasivne osovine

flageluma (kuke) i aktivnog flagelnog filamenta, te varijabilnim pomoćnim genima uključenim u glikozilaciju i posttranslacijske modifikacije flagelina. Flagelarni filament kampilobaktera sastoji se od dva homologna flagelinska proteina (FlaA i FlaB) koji su opsežno glikozilirani pseudaminskom kiselinom (Pse) i legionaminskom kiselinom. (18,21,22).

Flagelarni aparat organiziran je kroz hijerarhijsku transkripcijsku regulaciju koja uključuje rane, srednje (*RpoN*/ σ 54-ovisne) i kasne (*FliA*/ σ 28-ovisne) gene (22–24). Kod *C. jejuni* prisutan je opsežan konzervirani skup gena koji kodira bazalno tijelo (*fliF*, *fliG*, *fliM*, *fliN*, *fliY*), kukastu strukturu (*flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgG*, *flgG2*, *flgH*, *flgI*, *flgJ*, *flgK*, *flgL*), motorni kompleks (*motA*, *motB*), sekretorni sustav tipa III i izvozni aparat (*flhA*, *flhB*, *fliP*, *fliR*, *fliI*), te regulatorne proteine (*flgS*, *flgR*, *rpoN*, *fliA*, *flhF*, *flhG*, *flgM*, *flgQ*). (22,24–26)

Kampilobakteri imaju sposobnost kemotaksije tj. usmjerenog gibanja prema ili od nekog kemijskog podražaja, što je bitno za uspješnu kolonizaciju gastrointestinalne sluznice domaćina. Ovaj proces im omogućava izuzetno precizno regulirano kretanje prema nutrijentima te izbjegavanje toksičnih molekula (17). Kemotaksija je posredovana visoko konzerviranim genima *cheA*, *cheW*, *cheY* i *cheV*, koji čine osnovu signalnog prijenosnog sustava potrebnog za kolonizaciju domaćina, a inaktivacija bilo koje komponente signalne kaskade dramatično smanjuje tu sposobnost (17,27). *C. coli*, kao i *C. jejuni*, posjeduje konzervirane flagelarne gene (*flgB*, *flgC*, *flgE*, *flgJ*, *flgK*, *flgL*, *flgM*, *fliD*, *fliM*, *fliS*, *cheA*), a razlike između ove dvije vrste se očituju više u regulaciji i glikozilaciji flagelina nego u sastavu gena motiliteta (28–30).

Glavni strukturni proteini flagelnog filamenta u obje vrste kodirani su genima *flaA* i *flaB* (30). Protein *flaA* je dominantna komponenta filamenta *C. jejuni*, dok *flaB* ima pomoćnu ulogu (24). Kod *C. coli* oba proteina mogu formirati filament, te je njihova kombinacija potrebna za optimalnu pokretljivost (31). Gen *flaG* regulira duljinu filamenta, dok *flaC* kodira protein koji sudjeluje u invaziji stanica (32,33).

Varijabilni geni pokretljivosti primarno sudjeluju u glikozilaciji flagelina i posttranslacijskim modifikacijama. Biosinteza pseudaminske kiseline, važne za funkcionalnost flageluma, uključuje gene *pseA*, *pseB*, *pseC*, *pseF*, *pseG*, *pseH* i *pseI* (34). Ovaj put omogućuje dodavanje specifičnih šećernih modifikacija na flagelin, što je nužno za pravilno sastavljanje i funkciju flageluma (21). Dodatno, geni *pseD/maf2*, *pseE/maf5* i *maf4* pripadaju obitelji pomoćnih čimbenika pokretljivosti (engl. *motility accessory factor*) i podložni su faznoj varijaciji, čime

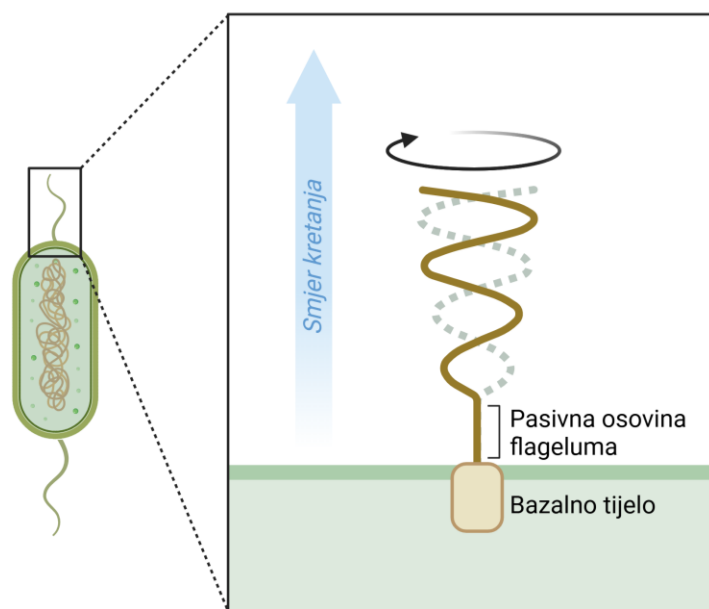
doprinosu fenotipskoj raznolikosti (34–36). Posttranslacijske modifikacije dodatno uključuju gene *ptmA* i *ptmB*, koji kodiraju enzime potrebne za sintezu CMP-pseudaminske kiseline i drugih derivata, te *eptC* koji sudjeluje u fosfoetanolaminskim modifikacijama (37,38). *C. coli* ima veću raznolikost glikozilacijskih puteva, uključujući sintezu legionaminske kiseline (Leg5Am7Ac i Leg5AmNMe7Ac) putem *ptmA-F* genske skupine (39). Također, *C. coli* koristi odvojene biosintetske puteve za acetamidino-derivate pseudaminske kiseline, za razliku od *C. jejuni*, što predstavlja još jednu razliku između ove dvije vrste (28,29).

Varijabilnost se očituje i u genima poput *flhG*, *fliA*, *fliY* i *fliN*, koji nisu uniformno prisutni u svim sojevima, osobito u izolatima *C. coli* (40). Ove razlike odražavaju evolucijske procese, uključujući horizontalni prijenos gena i rekombinaciju, koji su posebno izraženi u *C. coli* (26,41,42).

Funkcionalno, glikozilacija flagelina od presudne je važnosti za pokretljivost, autoaglutinaciju, formiranje biofilma, adherenciju i invaziju epitelnih stanica te kolonizaciju domaćina. Mutacije u genima uključenim u glikozilaciju dovode do gubitka pokretljivosti ili smanjene virulencije. Strukturna raznolikost ugljikohidratnih modifikacija doprinosi serospecifičnosti i antigenoj varijaciji, omogućujući izbjegavanje imunološkog odgovora (18,43).

Kod *C. jejuni*, bipolarni raspored flageluma reguliran je proteinima FlhF i FlhG, koji kontroliraju broj i položaj flageluma, dok snažni motorni sustav omogućuje kretanje kroz viskozni mukus putem specifičnog mehanizma (engl. „*wrapped-mode*”) (slika 3.) (15,20,44). Iako su ovi mehanizmi manje istraženi u *C. coli*, osnovna funkcionalna načela ostaju očuvana (19,41).

Razlika između konzerviranih i varijabilnih gena odražava selekcijske pritiske: dok su strukturni i regulatorni geni pod jakom purifikacijskom selekcijom radi očuvanja funkcije, geni uključeni u glikozilaciju i modifikaciju podliježu diverzificirajućoj selekciji (41).



Slika 3. Animacija pokretljivosti *Campylobacter* spp (izrađeno u BioRender, Luka Katić, 2026)
<https://BioRender.com/8gz3huo>

1.2.2. Adherencija, invazija i produkcija toksina

Za razliku od varijabilnog repertoara gena uključenih u pokretljivost, geni odgovorni za adherenciju, invaziju i produkciju toksina predstavljaju visoko konzervirani temeljni skup gena virulencije *C. jejuni*, koji je u velikoj mjeri očuvan među različitim sojevima (45–47). Ovi geni upravljaju interakcijom patogena i domaćina, uključujući početno prianjanje na epitelne stanice, invaziju u tkiva te citotoksično oštećenje (15). Njihova visoka učestalost i očuvanost naglašavaju esencijalnu ulogu u patogenezi i čine ih središnjim elementom molekularnih mehanizama infekcije (26,48).

Adherencija na epitelne stanice domaćina predstavlja prvi korak patogeneze, a posredovana je skupinom površinskih proteina, adhezina (15). Među njima se posebno ističe CadF, vanjskomembranski protein odgovoran za vezanje na fibronektin u izvanstaničnom matriksu (49,50). CadF je prisutan gotovo u svim sojevima te pokreće signalne putove u stanici domaćina, uključujući fosforilaciju proteina paksilina i reorganizaciju citoskeleta, što rezultira formiranjem adhezijskih žarišta i membranskih nabora (51,52). Dodatni adhezini uključuju JlpA, lipoprotein

uključen u vezanje na stanice domaćina, te periplazmatski vezni protein PebA, koji osim u transportu, sudjeluje u adherenciji na intestinalne stanice (15,53,54). Gen *porA* kodira glavnu vanjskomebransku porinsku komponentu, koja sudjeluje u transportu, adherenciji i kolonizaciji (53,55). Također, gen *Cj1279c*, kodira protein s fibronektinskim domenama koji dodatno pojačava adherenciju i kolonizacijski potencijal (53). Sinergističko djelovanje više adhezina, uključujući FlaA, CadF, PebA i FlpA, povezano je s povećanom sposobnošću vezanja bakterije na stanice domaćina (53,54).

Nakon adherencije slijedi invazija epitelnih stanica, koja je posredovana sekrecijom invazijskih antigena (Cia proteina) putem flagelarnog sekrecijskog sustava tipa III (15,56). Gen *ciaB* kodira invazijski protein koji se transportira u citosol stanice domaćina te inducira reorganizaciju citoskeleta i stvaranje membranskih protruzija (57). Slično tome, protein CiaC sudjeluje u remodeliranju citoskeleta i olakšava ulazak bakterije u stanicu (56). Ovi proteini zahtijevaju funkcionalan flagelarni aparat i direktan kontakt bakterije i stanice domaćina za svoju sekreciju i djelovanje (56). Visoka prevalencija gena *ciaB* u različitim izolatima potvrđuje njihovu važnost u invazivnom potencijalu (46). Dodatno, invazija je pojačana koordiniranim djelovanjem više gena, uključujući *iamA* i *tlp1*, koji zajedno doprinose maksimalnoj sposobnosti penetracije u stanice domaćina (54).

Produkcija toksina predstavlja završnu fazu patogeneze, pri čemu bitnu ulogu ima citoletalni toksin (engl. *cytolethal distending toxin*, CDT), kodiran operonom *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* (58,59). Ovaj trokomponentni toksin djeluje kao AB toksin, pri čemu CdtB predstavlja katalitičku podjedinicu s DNaza aktivnošću koja uzrokuje dvostruke lomove DNK u jezgri stanice domaćina (58,60). Posljedično dolazi do aktivacije mehanizama popravka DNK, zastoja u staničnom ciklusu u G2/M fazi te apoptotske smrti stanica (58–60). CdtA i CdtC omogućuju vezanje toksina za staničnu membranu i ulazak CdtB u stanicu putem endocitoze (61). Također, CDT ima važnu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora, inducirajući apoptozu imunoloških stanica i nekrozu epitelnih stanica, što rezultira produljenim tijekom bolesti i sporijim cijeljenjem tkiva (62). Operon *cdtABC* pokazuje gotovo univerzalnu prisutnost među sojevima *C. jejuni*, a potpuna prisutnost svih triju gena povezana je s većom citotoksičnošću i jačim upalnim odgovorom, uključujući povećanu ekspresiju interleukina 8 (IL-8) u epitelnim stanicama (46,48,54,59).

Za razliku od visoko konzerviranih gena za adherenciju, invaziju i produkciju toksina, određeni geni povezani s dodatnim virulencijskim svojstvima pokazuju varijabilnost među sojevima. Primjeri takvih gena su *cstII* i *cstIII*, koji kodiraju sijaliltransferaze uključene u biosintezu sijaliliranog lipooligosaharida (LOS) (45,63–67). Prisutnost gena *cstII* i *cstIII* povezana je s težim kliničkim oblicima bolesti, a njihova distribucija varira među različitim linijama *C. jejuni* (63–65,68). Ovi geni doprinose molekularnoj mimikriji i potencijalno sudjeluju u razvoju postinfektivnih komplikacija (64,65).

Ukupno gledano, geni za adherenciju (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *flpA*), invaziju (*ciaB*) i produkciju toksina (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) čine temeljne, gotovo univerzalno očuvane skupine gena virulencije *C. jejuni* (47,48,53). Njihova visoka konzerviranost ukazuje na snažan purifikacijski selekcijski pritisak, s ciljem očuvanja funkcija nužnih za uspješnu kolonizaciju i infekciju domaćina (47). Istovremeno, ograničena varijabilnost pojedinih dodatnih gena omogućuje finu prilagodbu različitim domaćinima i kliničkim manifestacijama bolesti (26,48).

1.2.3. Imunomodulacija

Imunomodulacija predstavlja osobit aspekt patogeneze *C. jejuni*, omogućujući bakteriji izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina, uspostavu perzistentne kolonizacije te u određenim slučajevima poticanje postinfektivnih autoimunih komplikacija poput Guillain-Barré sindroma (GBS) (15,69). Imunomodulatorni kapacitet *C. jejuni* primarno je posredovan dvama glavnim površinskim glikokonjugatima: lipooligosaharidom i kapsularnim polisaharidom (*engl. capsular polysaccharide*, CPS), koji su kodirani opsežnim genskim klasterima sastavljenima od visoko konzerviranih jezgrenih gena i varijabilnih pomoćnih gena (70–72). Razumijevanje njihove distribucije i očuvanosti važno je za objašnjenje mehanizama imunološkog izbjegavanja, interakcije patogena i domaćina te razvoja autoimunih posljedica (63).

Lipooligosaharid je sastavni dio vanjske membrane *C. jejuni*, građen od lipida A i oligosaharidne jezgre, koja ima unutarnji i vanjski dio (73). Geni uključeni u biosintezu unutarnje jezgre LOS-a visoko su konzervirani među sojevima te kodiraju enzime nužne za sintezu heptozne okosnice (73). Geni *hldD* i *hldE* ključni su za sastavljanje unutarnje jezgre LOS-a, pri čemu *hldE* ima dodatnu ulogu u stvaranju ADP-heptoze, snažne proinflamatorne molekule koja aktivira signalni put *ALPK1-NF-κB* u epitelnim stanicama crijeva (74,75). Gen *htrB* sudjeluje u biosintezi lipida A, dok *waaC* i *waaF* kodiraju heptoziltransferaze koje ugrađuju heptozne ostatke u

unutarnju jezgru, a *waaV* sudjeluje u formiranju vanjske jezgre (73,76). Inaktivacija gena poput *hldE*, *hldD* ili *waaC* dovodi do skraćanja LOS strukture, povećane osjetljivosti na žučne kiseline i smanjene sposobnosti kolonizacije (77).

Za razliku od konzervirane unutarnje jezgre, geni odgovorni za sintezu vanjske jezgre LOS-a pokazuju izrazitu varijabilnost, pa se LOS lokusi klasificiraju u više genetskih klasa (78). Ova genska varijabilnost je klinički značajna jer određene strukture LOS-a oponašaju ljudske gangliozide, što može potaknuti stvaranje križno reaktivnih protutijela i razvoj GBS (79). Gen *wlaN* kodira sintezu β -1,3-galaktoziltransferaze nužne za sintezu sijaliranih LOS struktura koje oponašaju ljudski GM1 gangliozid. Prisutan je u sojevima koji se povezuju s nastankom GBS, a fazna varijacija ovog gena dodatno doprinosi antigenskoj raznolikosti (80).

Kapsularni polisaharid je dodatni faktor virulencije, a prema Pennerovoj klasifikaciji postoji više od 60 različitih serotipova (81). Modulira imunološki odgovor domaćina, doprinosi otpornosti na serum i nužan je za učinkovitu kolonizaciju crijeva (82). Geni za njegovu biosintezu organizirani su u hipervarijabilnoj regiji genoma, koja pokazuje visoku razinu genetske raznolikosti uslijed horizontalnog prijenosa gena, duplikacija, delecija i faznih varijacija (81,82).

Konzervirani geni uključeni u transport i sastavljanje kapsularnog polisaharida uključuju *kpsC*, *kpsF* i *kpsM*, koji kodiraju komponente ABC (*engl. ATP-binding cassette*) transportnog sustava odgovornog za izlučivanje kapsule kroz staničnu ovojnicu (81,83). Geni *kpsC* i *kpsS* sudjeluju u sintezi poveznice koja spaja kapsularnu strukturu s lipidnim sidrom (84).

Varijabilni geni smješteni između *kpsM* i *kpsC* određuju strukturu ponavljajućih jedinica kapsule specifičnih za pojedini serotip (81). Gen *kpsM* kodira permeazu transportnog sustava, a njegovi mutanti pokazuju smanjenu sposobnost kolonizacije i pojačanu imunološku aktivaciju (85). Gen *kpsF* sudjeluje u biosintezi prekursora CPS-a, dok geni *Cj1416c*, *Cj1417c*, *Cj1418c*, *Cj1419c*, *Cj1420c* i *Cj1427c* kodiraju glikoziltransferaze i enzime za modifikaciju šećera koji određuju strukturu kapsule (81,86–88).

Posebno važna modifikacija CPS-a je metil-fosforamidat, koji dodatno modulira imunološki odgovor domaćina. Gubitak ove modifikacije povezan je sa smanjenom sposobnošću izbjegavanja imunološkog odgovora i povećanom osjetljivošću bakterije (85). Kapsula i njezine modifikacije također utječu na aktivaciju receptora urođenog imuniteta, uključujući TLR (*engl. Toll-like receptor*) - TLR2 i TLR4, čime reguliraju intenzitet imunološkog odgovora (85).

Površinski glikokonjugati *C. jejuni* aktiviraju više signalnih puteva urođenog imuniteta. LOS aktivira TLR4 signalizaciju, dok flagelin modificiran pseudaminskom kiselinom može reagirati s receptorima poput Siglec-10, potičući antiinflamatorni odgovor. ADP-heptoza i srodni metaboliti aktiviraju ALPK1 (*engl. alpha-protein kinase 1*) put, što dovodi do aktivacije NF- κ B (*engl. nuclear factor kappa B*) i ekspresije proinflamatornih citokina (75,89,90). Također, može aktivirati NLRP3 (*engl. NLR family pyrin domain containing 3*) inflamatom u makrofazima, rezultirajući lučenjem interleukina 1 beta (IL-1 β) (91). Kapsularni polisaharid modulira ove odgovore, pri čemu kapsulirani sojevi pokazuju smanjenu aktivaciju receptora i izmijenjen citokinski profil (85).

Geni uključeni u imunomodulaciju *C. jejuni* pokazuju karakterističan obrazac: visoko konzervirani geni poput *gmhA*, *gmhB*, *hddA*, *hddC*, *hldD*, *hldE*, *htrB*, *kpsD*, *kpsE*, *kpsS*, *kpsT*, *waaC*, *waaF* i *waaV* kodiraju osnovne enzime potrebne za biosintezu LOS-a i transport CPS-a, dok varijabilni geni poput *gmhA2*, *kpsC*, *kpsF*, *kpsM*, *Cj1135*, *Cj1416c-Cj1420c*, *Cj1427c*, *Cj1442c*, *cysC* i *wlaN* određuju strukturu kapsule i specifične imunomodulatorne karakteristike (73,78,81,82,85). Posebno je važna prisutnost gena *wlaN* zbog njegove povezanosti s molekularnom mimikrijom i razvojem GBS (80).

1.2.4. Odnos virulencije i antimikrobne otpornosti

Virulencijski geni često su smješteni na mobilnim genetskim elementima i podložni su horizontalnom prijenosu putem plazmida i transpozona, što upućuje na potencijalnu povezanost virulencije i antimikrobne rezistencije (AMR) (92). Općenito, genske mutacije koje su uzrokovale AMR mogu stvoriti i strukturalne promjene na bakterijskoj stanici koje negativno utječu na njenu funkcionalnost i virulenciju. To se osobito događa u slučajevima kada je funkcija proteina koji predstavlja ciljno mjesto djelovanja antibiotika djelomično ili u potpunosti narušena (93). Primjerice, rezistencija na fluorokinolone uzrokovana mutacijom *nfxB* gena u *Pseudomonas* spp. povezana je sa smanjenom pokretljivošću bakterije, što predstavlja jasan neželjeni učinak na vijabilnost i patogenost (94). Tijekom dugotrajnije evolucijske prilagodbe taj se sekundarni učinak može djelomično ili u potpunosti kompenzirati naknadnim mutacijama (95). U *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, mutacije gena *rpsL* dovode do rezistencije na streptomycin, ali istodobno uzrokuju sporiji rast u staničnim i mišjim modelima; pritom je dokazano da je potpuni oporavak funkcionalnosti moguć isključivo reverznom mutacijom ciljnog mjesta, dok izvanciljne

mutacije omogućuju tek djelomičnu kompenzaciju rasta (96). Slični obrasci zabilježeni su i kod drugih bakterijskih vrsta. U uvjetima slobodnog rasta, selektivnu prednost imaju sojevi *Escherichia coli* osjetljiviji na antibiotike u odnosu na rezistentne, a isto je uočeno i kod kliničkih izolata *Mycobacterium tuberculosis* i *Staphylococcus aureus* (92,95). Nasuprot tome, postoje i primjeri rezistencijskih mehanizama koji ne nose mjerljiv negativni učinak na vijabilnost, već bakterija zadržava punu funkcionalnost, što je jasno demonstrirano kod vankomicin-rezistentnih enterokoka (97). Ovi podaci naglašavaju da je odnos između antimikrobne rezistencije i biološke prilagodbe kompleksan te ovisi o specifičnom mehanizmu rezistencije, zahvaćenoj staničnoj funkciji i ekološkom kontekstu u kojem se bakterija razvija.

Što se tiče kampilobaktera, kliničkim istraživanjima te *in vivo* studijama nije uočena razlika u sastavu gena virulencije sojeva izoliranih iz uzoraka pacijenata sa različitom težinom kliničke slike (pacijenti sa proljevom i pacijenti s izoliranom abdominalnom boli) (98). Nasuprot tome, zabilježene su razlike u sojeva *C. jejuni* izoliranim iz peradi. Sojevi koji su osjetljivi na antibiotike imali su više gena odgovorih za invazivnost bakterije, dok su mutacije 23S rRNA povezane s makrolidnom rezistencijom smanjile sposobnost kolonizacije (99,100). *In vitro* modeli pokazali su da *gyrA* mutacije u *C. coli* povećavaju sposobnost stvaranja biofilma, dok u *C. jejuni* dovode do veće invazije i citotoksičnosti, uz istodobno smanjenu pokretljivost (101,102). Iako rezistencija može povećati invazivnost ili potencijal stvaranja biofilma, često nosi evolucijsku cijenu u obliku smanjene kolonizacije, pri čemu individualna osjetljivost domaćina vjerojatno ima presudnu ulogu u kliničkom ishodu bolesti (98).

1.3. Kampilobakterioze - klinički značaj

Infekcija u ljudi najčešće nastaje fekalno-oralnim putem, pri čemu je konzumacija kontaminirane hrane, osobito sirovog ili nedovoljno termički obrađenog pilećeg mesa, najvažniji izvor zaraze (103,104). Nakon unosa, bakterije koloniziraju sluznicu distalnog ileuma i kolona te prolaze kroz epitelnu barijeru i šire se u okolno tkivo (16,103). Infekcija dovodi do aktivacije upalnih signalnih putova i oštećenja crijeвне barijere, što rezultira pojavom proljeva i drugih gastrointestinalnih simptoma (16,103).

Klinička slika kampilobakterioze varira od blagih do težih oblika bolesti. Najčešće se očituje kao akutni gastroenteritis s proljevom, povišenom temperaturom, bolovima u trbuhu i grčevima, a u nekim slučajevima može se razviti i krvavi proljev (103,105). Većina infekcija je samoograničavajuća i prolazi unutar nekoliko dana, bez potrebe za antibiotskim liječenjem (103,105). Teži oblici bolesti mogu zahtijevati hospitalizaciju, osobito u male djece, starijih osoba i osoba s kroničnim bolestima (106,107). Razlike između najčešćih vrsta, *C. jejuni* i *C. coli*, odražavaju se u njihovoj učestalosti i kliničkom značaju. Oko 90% infekcija u ljudi uzrokuje *C. jejuni*, dok *C. coli* sudjeluje u manjem udjelu slučajeva (103). Iako dijele mnoge biološke karakteristike, *C. jejuni* se općenito smatra virulentnijim i češće je povezan s težim kliničkim oblicima bolesti (108,109).

Postinfektivne komplikacije predstavljaju važan klinički aspekt kampilobakterioze. Iako su relativno rijetke, mogu imati značajne posljedice. GBS najvažnija je postinfektivna komplikacija i povezan je s molekularnom mimikrijom između bakterijskih struktura i komponenti perifernih živaca (79). Osim toga, može se javiti reaktivni artritis te druge komplikacije poput sindroma iritabilnog crijeva i upalnih bolesti crijeva (103).

Osim spomenutih, i druge vrste roda *Campylobacter* mogu biti klinički značajne. *Campylobacter fetus* čini manji udio infekcija, ali je izrazito patogen i često uzrokuje bakterijemiju, osobito u starijih ljudi i imunokompromitiranih bolesnika. *Campylobacter lari* najčešće uzrokuje gastroenteritis, dok *Campylobacter upsaliensis* obično dovodi do blažih oblika enteritisa. Sve veća pažnja posvećuje se i nedavno otkrivenim vrstama poput *Campylobacter concisus* i *Campylobacter ureolyticus*, koje mogu biti povezane s gastrointestinalnim upalnim bolestima (104).

1.4. Epidemiologija

1.4.1. Javnozdravstveni značaj kampilobakterioza

Kampilobakterioze predstavljaju značajan globalni javnozdravstveni problem sa trendom porasta incidencije i prevalencije posljednjih desetljeća, kako u razvijenim, tako i u nerazvijenim zemljama svijeta (104). Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), kampilobakteri spadaju u najčešće patogene koji se prenose hranom i uzrokuju približno 96 milijuna infekcija godišnje (110). Ukupno globalno opterećenje bolesti koje se prenose hranom procjenjuje se na oko 33 milijuna godina života prilagođenih invaliditetu (engl. *disability-adjusted life years*, DALY), što je mjera koja objedinjuje vrijeme života provedeno s bolešću ili invaliditetom i godine izgubljene zbog prerane smrti. Djeca mlađa od pet godina nose približno 40% ukupnog opterećenja. (111).

Ekonomsko opterećenje kampilobakterioza značajno je u svim regijama svijeta. U Njemačkoj je ukupni godišnji ekonomski teret kampilobakterioznog enteritisa i njegovih komplikacija procijenjen na 263,5 milijuna eura, pri čemu najveći dio proizlazi iz postinfektivnih komplikacija, uključujući GBS, upalne bolesti crijeva i sindrom iritabilnog crijeva (112). Značajne financijske posljedice zabilježene su i u Nizozemskoj, gdje se opterećenje povezano s termofilnim vrstama roda *Campylobacter* procjenjuje na oko 76 milijuna eura godišnje (113), kao i u Ujedinjenom Kraljevstvu, gdje ukupni izdaci za bolesnike i zdravstveni sustav dosežu približno 50 milijuna funti (114). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) ekonomski učinak infekcija uzrokovanih bakterijama *Campylobacter* spp. procjenjuje se na 11,3 milijarde američkih dolara, čime se ovaj uzročnik ubraja među vodeće uzroke financijskog opterećenja među bolestima prenosivima hranom, odmah nakon netifusne salmonele (115).

Kampilobakterioza je najčešće prijavljivana gastrointestinalna infekcija u Europskoj uniji (EU) od 2005. godine, s više od 200 000 prijavljenih slučajeva godišnje. Međutim, procjenjuje se da je stvarni broj slučajeva oko 9 milijuna godišnje, što ukazuje na znatno niži broj prijavljenih slučajeva u odnosu na stvarnu učestalost bolesti - samo 1 od 47 slučajeva (95% CI 14-117) se prijavljuje u EU (100-102). Incidencija značajno varira među europskim zemljama, pri čemu je u Češkoj Republici zabilježena jedna od najviših stopa u svijetu. Incidencija u EU je iznosila oko 71 slučaj na 100 000 stanovnika 2014. godine, pri čemu su pileće meso i svježe peradarsko meso

identificirani kao glavni izvori infekcije (116,119,120). Posljednjih godina bilježi se oko 230 000 prijavljenih slučajeva godišnje u Europi, dok je u SAD-u, Australiji i Novom Zelandu kampilobakterioza najčešće prijavljena bolest prenosiva hranom (104,119,121).

Sezonski obrasci kampilobakterioze u Europi pokazuju regionalne razlike. U nordijskim zemljama, vrhunac incidencije je izražen tijekom sredine i kasnog ljeta, dok u većini ostalih europskih zemalja (Irska, Mađarska i Slovačka) te u Ujedinjenom Kraljevstvu nastupa ranije i manje je izražen (116). Incidencija bolesti pozitivno korelira s temperaturom, pri čemu kolonizacija raste s porastom temperature (116,122). Tijekom pandemije COVID-19 zabilježen je pad prijavljenih slučajeva u većini zemalja, vjerojatno zbog promjena u prehrambenim navikama i obrascima traženja zdravstvene skrbi (119).

Infekcija je češća u muškaraca nego u žena u svim dobnim skupinama, a u razvijenim zemljama incidencija pokazuje dva vrhunca, u dojenačkoj dobi i u ranoj odrasloj dobi (104,123,124). U nekim populacijama, poput Irske, slučajevi u djece mlađe od pet godina češće su povezani s ruralnim područjima, dok su slučajevi u starijim dobnim skupinama češće povezani s urbanim načinom života (125).

Epidemiološki podaci iz Hrvatske i jugoistočne Europe ukazuju na visoku incidenciju kampilobakteria u životinja i ljudi. U Hrvatskoj je prevalencija termotolerantnih vrsta kampilobakteria u svježem pilećem mesu na maloprodajnoj razini iznosila 73,86%. Analizom 241 uzorka svježeg pilećeg mesa prikupljenog u maloprodaji tijekom 2016. godine utvrđeno je da su *C. jejuni* i *C. coli* bili prisutni u 53,53% odnosno 15,35% uzoraka (126). Povijesni podaci s područja Hrvatske iz 1985. godine ukazuju da su kampilobakteri izolirani iz 16,3% (338/2080) bolesnika s akutnim proljevom koji su se javili u Kliniku za infektivne bolesti u Zagrebu. Incidencija je bila viša u ruralnim nego u urbanim područjima te je iznosila 99 na 100 000 stanovnika godišnje u ruralnim, u usporedbi sa 71 na 100 000 stanovnika godišnje u urbanim sredinama. Ova razlika mogla se djelomično objasniti većom izloženošću poljoprivrednom okolišu, slabijom dostupnošću zdravstveno ispravne vodovodne vode, neadekvatnim sustavima odvodnje otpadnih voda te lošijim higijenskim uvjetima (127). Nasuprot tome, novija istraživanja iz Splitsko-dalmatinske županije pokazala su obrnut obrazac incidencije, pri čemu je u razdoblju od 2007. do 2012. godine incidencija u urbanim područjima iznosila 130 na 100 000 stanovnika, dok je u ruralnim područjima bila oko 60 na 100 000 stanovnika (128).

1.4.2. Genotipska raznolikost i geografska rasprostranjenost

Za epidemiološka istraživanja, osobito praćenje širenja patogena (epidemijska i pandemijska izbijanja), razvijena je molekularna metoda tipizacije sojeva primjenom višelokusnog sekvenciranja gena (engl. *Multilocus Sequence Typing*; MLST). Ova metoda analizira sedam konzerviranih gena domaćina (engl. *housekeeping genes*): *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* i *uncA*, koji su nužni za osnovno funkcioniranje bakterije (129,130). Trenutno je u bazi podataka pubMLST (engl. *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*) evidentirano preko 5.500 različitih kombinacija varijanti, tj. alela konzerviranih gena, raspoređenih u grupe sličnih klonalnih kompleksa (engl. *clonal complexes*, CC) koji dijele najmanje 5 od 7 alela (129). Oni često koreliraju sa specifičnim fenotipom, uključujući preferenciju domaćina, sličnu ili identičnu antimikrobnu rezistenciju, virulenciju i patogenost te klinički ishod (131). Za *C. jejuni* opisano je četrdesetak klonalnih kompleksa, od kojih dominira sekvencijski tip ST-21, dok *C. coli* pokazuje manju raznolikost klonova, među kojima prevladava ST-828 (129).

Analiza geografske distribucije klonalnih kompleksa *C. jejuni* ukazuje na izražene regionalne razlike, ali i na postojanje dominantnih, međunarodno rasprostranjenih linija. Podaci iz Hrvatske su ograničeni, a studija rađena na 42 izolata ukazuju na poliklonalnu genetsku pozadinu s predominacijom ST-51, ST-49 i ST-22 (132). U susjednim zemljama, Sloveniji i Austriji, dominantan je CC-21, dok talijanske studije najčešće identificiraju CC-353, CC-443, CC-206 te CC-21, pri čemu je jasno dokazana povezanost CC-206 i CC-21 s humanim infekcijama, a perad je bila glavni rezervoar u približno 70% slučajeva (133). U ostatku Europe također prevladavaju stabilni i dobro opisani klonalni kompleksi, uključujući CC-21 i CC-206, ali i CC-45 te CC-48 (134). Najčešći međunarodno rašireni klonalni kompleksi su CC-21 i CC-353, a slijede ih CC-45, CC-48, CC-257 i CC-206 (134). Nasuprot tome, pojedini klonalni kompleksi imaju ograničenu lokalnu distribuciju i ekološku povezanost, poput CC-1275 koji se povezuje s divljim pticama (135).

Dodatno, opisana je i sezonska varijabilnost, pri čemu u Ujedinjenom Kraljevstvu tijekom ljetnih mjeseci prevladavaju CC-45, CC-283 i CC-42, dok tijekom zimskih mjeseci dominiraju CC-353 i CC-403, a sličan obrazac zabilježen je i u Novom Zelandu, gdje je CC-45 najčešće

izoliran ljeti (136,137). Općenito, povezanost temperature i incidencije *Campylobacter* infekcija je kompleksna i vjerojatno indirektna. Porastom temperature raste i incidencija, pri čemu se oštar porast kampilobakterioza bilježi u rasponu temperature od 5 do 12 °C, uz dodatno blago povećanje incidencije na temperaturama do 28 °C (138).

Za razliku od *C. jejuni*, *C. coli* pokazuje znatno manju genetsku raznolikost, pri čemu je klonalni kompleks CC-828 daleko najčešći i dominantan je u Europi, Aziji, Novom Zelandu i SAD-u (129,139). CC-828 je predominantno povezan s infektivnim bolestima ljudi, ali istodobno predstavlja i dominantni klonalni kompleks u stočarstvu i peradarstvu (140). Nasuprot toj globalnoj homogenosti, opisani su i endemijski klonalni kompleksi, osobito u Kini, gdje su identificirani CC-1034 i CC-1287, koji do sada nisu zabilježeni u drugim azijskim zemljama (141).

Brojna istraživanja ukazuju na povezanost određenih MLST klonalnih kompleksa, obrazaca antimikrobne rezistencije i profila virulencijskih gena u vrstama roda *Campylobacter*. Kod *C. jejuni* pojedini klonalni kompleksi pokazuju izrazito visoku razinu antimikrobne rezistencije, pri čemu kompleks CC-353/464 u nadzornim studijama iz Ujedinjenog Kraljevstva i SAD-a bilježi više od 95% rezistencije na kinolone; unutar tog kompleksa ST-5136 (CC-464) identificiran je kao najčešći višestruko-otporni klon, koji pokazuje rezistenciju na tetracikline, ampicilin, fluorokinolone i aminoglikozide (142,143). Vrsta *C. coli*, osobito klonalni kompleks CC-828, konzistentno pokazuje višu stopu višestruko-otpornih izolata u usporedbi s *C. jejuni*, kako u azijskim, tako i u europskim i američkim istraživanjima (144). S aspekta virulencije, temeljni virulencijski geni uključeni u adheziju (*cadF*, *jlhA*, *porA*, *pebA*), invaziju (*ciaB*, *pldA*, *flaC*) te produkciju citoletalnog toksina (*cdtABC*) prisutni su u većini klonalnih kompleksa, neovisno o izvoru izolata (98). S druge strane, izolati divljih ptica, ponajprije CC-1275, često imaju nepotpun *cdt* genski klaster, za razliku od humanih i peradarskih izolata (npr. CC-21, CC-45, CC-48, CC-354), što ukazuje na ulogu CDT varijanti u specifičnosti kolonizacije domaćina (135).

1.5. Liječenje i mehanizmi otpornosti na antibiotike

1.5.1. Liječenje kampilobakterioza

Kampilobakterioze se u većini slučajeva liječe simptomatski, jer je infekcija najčešće blaga i samoograničavajuća. Rehidracija predstavlja osnovu terapije, dok antibiotici u prosjeku skraćuju trajanje bolesti za oko 1,3 dana (145,146). Primjena antibiotika indicirana je kod teških oblika bolesti, uključujući krvavi proljev, visoku temperaturu, ekstraintestinalne infekcije, progresiju ili relaps simptoma te trajanje simptoma dulje od jednog tjedna, kao i kod bolesnika visokog rizika poput trudnica, imunokompromitiranih osoba i osoba starijih od 70 godina (145). Azitromicin se smatra terapijom prvog izbora, dok je učinkovitost fluorokinolona kao alternativne terapijske opcije ograničena zbog sve učestalije antimikrobne otpornosti (145,146). U slučajevima multirezistentnih sojeva indicirana je intravenska primjena karbapenema. *Campylobacter* spp. je intrinzično rezistentan na trimetoprim i većinu beta-laktamskih antibiotika (131-133).

Što se tiče doziranja i trajanja terapije makrolidima u liječenju kampilobakterijskog gastroenteritisa, provedeno je nekoliko randomiziranih kliničkih studija koje su ispitivale optimalan terapijski pristup. U studiji provedenoj 2007. godine na Tajlandu, koja je obuhvaćala bolesnike s putničkim proljevom, pri čemu je u 65% slučajeva uzročnik bio *Campylobacter* spp., pokazano je da je jednokratna doza azitromicina od 1 g dovela do rezolucije simptoma unutar 72 sata u 96% bolesnika, dok je trodnevna terapija azitromicinom u dozi od 500 mg dnevno rezultirala rezolucijom simptoma u 85% slučajeva (150). Međutim, mučnina kao nuspojava bila je češća u skupini koja je primila jednokratnu dozu (14%) u usporedbi s manje od 6% bolesnika liječenih trodnevnom terapijom (150). Ovi su nalazi dodatno potvrđeni randomiziranom studijom provedenom u Hrvatskoj 2010. godine u pedijatrijskoj populaciji, u kojoj je uspoređena jednokratna doza azitromicina od 30 mg/kg s petodnevnom terapijom eritromicina u dozi od 50 mg/kg, pri čemu je jednokratna doza azitromicina pokazala superiornost u bržem kliničkom oporavku (151). Unatoč navedenim rezultatima, Američko društvo za infektivne bolesti (engl. *Infectious Diseases Society of America*, IDSA) u svojim smjernicama preporučuje primjenu azitromicina u dozi od 500 mg tijekom pet dana, uz obrazloženje da takav režim, iako skraćuje trajanje simptoma u prosjeku za jedan dan, nosi manji rizik razvoja rezistencije na makrolide (145). S druge strane, Američko društvo gastroenterologa (engl. *American College of Gastroenterology*, ACG) u svojim smjernicama dopušta primjenu jednokratne doze azitromicina, s mogućnošću

produljenja terapije do tri dana, osobito u bolesnika s povišenom tjelesnom temperaturom ili krvavim proljevom (146). U skladu s navedenim, klinička praksa u Hrvatskoj najčešće podrazumijeva primjenu jednokratne doze azitromicina u bolesnika sa srednje teškom kliničkom slikom gastroenteritisa.

Prema važećim kliničkim smjernicama, ne postoje dokazi da standardna antimikrobna terapija kod infekcija uzrokovanih *Campylobacter* spp. produljuje kliconoštvo ili potiče kliničke relapse, dok se rizik povezan s primjenom liječenja smatra relativno malim (145). U bolesnika s teškom kliničkom slikom ili u imunokompromitiranih osoba, osobito u slučaju rekurentnih infekcija, produljenje trajanja antimikrobne terapije na razdoblje od dva do šest tjedana može biti razumno i klinički opravdano (145). Nasuprot tome, Američko društvo za infektivne bolesti ne preporučuje primjenu kronične supresivne antimikrobne terapije kod bolesnika s prvom epizodom infekcije, naglašavajući potrebu za individualiziranim pristupom temeljenim na kliničkoj težini bolesti i imunološkom statusu bolesnika (145).

1.5.2. Mehanizmi i učestalost stečene antimikrobne otpornosti

Rezistencija *Campylobacter* spp. na fluorokinolone u stalnom je porastu te prelazi 80% u jugoistočnoj Aziji, iznosi oko 61,2% u EU i 20-27% u SAD-u, a snažno je povezana s veterinarskom uporabom antibiotika (152–155). Rezistencija na tetracikline iznosi oko 44% u EU i često se javlja u kombinaciji s fluorokinolonskom rezistencijom (153,156). Slični rezistencijski profili humanih izolata i sojeva izoliranih iz peradi predstavljaju snažan dokaz prehrambenog prijenosa (144). Makrolidna rezistencija ostaje relativno niska, ispod 5% u većini zemalja, uz sporadična regionalna povećanja (152). U Splitsko-dalmatinskoj županiji, detaljnija analiza izolata *C. jejuni* iz 2012./2013. godine zabilježila je rezistenciju na ciprofloksacin od 60%, tetraciklin od 24% i eritromicin ispod 1%, dok su 2021. godine te vrijednosti iznosile 75%, 19% i 1% (157,158).

Prva cijelogenomska analiza izolata *C. jejuni* objavljena je 2000. godine (11). Rezistencija na fluorokinolone najčešće je posljedica mutacije *gyrA* (T86I), dok se tetraciklinska rezistencija razvija plazmidskim prijenosom gena *tet(O)* koji blokira vezanje antibiotika na 30S ribosomsku podjedinicu (159,160). Makrolidna rezistencija povezana je s mutacijom 2075A>G gena za 23S rRNA te s genom *erm(N)* koji kodira metiltransferazu veznog mjesta za eritromicin (100). Analiza cijelog genoma 42 izolata iz Hrvatske pokazala je 71% rezistencije na ciprofloksacin uz prisutnost

gyrA mutacije T86I, 20% rezistencije na tetraciklin i prisutnost gena *tet(O/32/O)*, dok su svi izolati bili potpuno osjetljivi na makrolide (132).

Za razliku od podataka dostupnih za *C. jejuni*, ne postoje istraživanja molekularne osnove rezistencije izolata *C. coli* iz Hrvatske, a ograničeni su i molekularni podaci iz susjednih država. Međutim, dostupni su fenotipski podaci rezistencije iz okolnih regija, koji omogućuju regionalnu usporedbu obrazaca antimikrobne rezistencije. Tako je u Sloveniji zabilježena vrlo visoka fenotipska rezistencija na fluorokinolone (>90% na ciprofloksacin), umjerena rezistencija na tetracikline (oko 65%) te niska rezistencija na eritromicin (4,4%) (153). Nisu rađene sustavne cijelogenomske analize kliničkih izolata, dok u studiji izolata iz otpadnih voda nije dokazana antimikrobna rezistencija (161). U Austriji je prijavljena rezistencija na ciprofloksacin i tetracikline u približno 60% izolata, bez dokaza rezistencije na makrolide, dok je cijelogenomska studija iz 2016. godine bila fokusirana ponajprije na tipizaciju klonalnih kompleksa, bez detaljnije analize mehanizama rezistencije (153,162). Suprotno tome, u Italiji su zabilježene zabrinjavajuće visoke stope rezistencije, s više od 90% izolata rezistentnih na ciprofloksacin i tetracikline te čak 13% na eritromicin. Cijelogenomska analiza iz 2023. godine pokazala je da je 12% izolata *C. coli* bilo višestruko-otporno na antimikrobne lijekove (engl. *multidrug resistance*, MDR), s niskom razinom rezistencije na makrolide (153,163). Prema zajedničkoj inicijativi Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) i Centara za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) iz 2012. godine, koja je uspostavila standardiziranu međunarodnu terminologiju za opisivanje profila stečene rezistencije, MDR se definira kao stečena neosjetljivost bakterije na najmanje jedan antimikrobni agens u tri ili više kategorija antimikrobnih lijekova. (164) AMR sojeva iz Italije je često uključivala otpornost na antibiotike iz klase fluorokinolona, tetraciklina, aminoglikozida i makrolida. (163) Važno je istaknuti da je u slučajevima otpornosti na makrolide *erm(N)* bio smješten na kromosomu, a ne na plazmidu, čime je smanjen potencijal horizontalnog prijenosa, iako je on i dalje moguć putem CRISPR/Cas (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated proteins*) sustava. Taj je sustav kod *C. coli* prisutan u oko 10% izolata, znatno rjeđe nego kod *C. jejuni* gdje prelazi 90%, što ima važne implikacije za širenje rezistencije (163).

Dostupna literatura sve više upućuje na to da je *C. coli* skloniji razvoju MDR u odnosu na *C. jejuni* (163,165). Iako točan mehanizam koji objašnjava ovu razliku još nije razriješen, jedna

od biološki uvjerljivijih hipoteza dolazi iz rada Bolinger i sur. (2017), koji sugerira utjecaj makrolidne rezistencije na bakterijsku vijabilnost (tzv. “*fitness cijena*” eritromicinske rezistencije). Prema hipotezi, eritromicin-rezistentni (E-R) *C. coli* mogu zadržati sposobnost učinkovite kolonizacije životinjskih rezervoara, dok *C. jejuni* s istim fenotipom pokazuje smanjenu kolonizacijsku mogućnost, što bi moglo ograničavati širenje E-R i posljedično MDR varijanti *C. jejuni* (100). Ova teorija je dodatno podržana i kliničkim istraživanjem ljudskih izolata iz Italije (2023.) gdje je 17% *C. coli* izoliranih sojeva bilo višestruko-otporno, za razliku od *C. jejuni* koji nije imao nijedan višestruko-otporni soj (163).

U kliničkoj praksi empirijska terapija sepse često uključuje cefalosporine treće ili više generacije (npr. ceftriakson ili cefepim) zbog njihova širokog spektra djelovanja protiv gram-negativnih bakterija; međutim, njihova učinkovitost protiv *Campylobacter* spp. je ograničena (166). Dostupni podaci pokazuju da je rezistencija *Campylobacter* spp. na cefalosporine treće generacije relativno visoka, približno 40%, pri čemu taj fenotip nije posljedica prisutnosti plazmidno kodiranih beta-laktamaza proširenog spektra (engl. *extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL) ili AmpC β -laktamaza, već prvenstveno pojačanim izbacivanjem antibiotika iz bakterijske stanice (djelovanjem CmeABC *multidrug efflux* pumpe) u kombinaciji s intrinzičnim β -laktamazama (166,167). Izostanak ESBL i AmpC plazmidnih gena u *Campylobacter* spp. može se objasniti temeljnim biološkim razlikama u mehanizmima horizontalnog prijenosa gena, budući da *Campylobacter* nema intrinzičnu molekularnu mašineriju potrebnu za prihvatanje i stabilno održavanje plazmida tipičnih za obitelj *Enterobacterales* (uključujući *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp.) (167). Nasuprot tome, dokazana je prisutnost istih gena antimikrobne rezistencije (*ermB*) u gram-pozitivnim bakterijama (*Streptococcus suis*, *Enterococcus faecium* i *Lactobacillus plantarum*) i kampilobakterima, što ukazuje na zajedničko porijeklo i horizontalni prijenos gena makrolidne rezistencije (100,168).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Glavni ciljevi:

1. Odrediti učestalost *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* koji su otporni na antibiotike te ispitati postojanje višestruko-otpornih izolata u Kliničkom bolničkom centru Split u razdoblju od siječnja do prosinca 2023. godine.
2. Analizirati molekularnu osnovu antimikrobne otpornosti izolata metodom sekvenciranja cijelog genoma i identificiranjem gena i genetskih mutacija povezanih s antimikrobnom otpornošću.
3. Ispitati postojanje gena virulencije *C. jejuni* i *C. coli* metodom sekvenciranja cijelog genoma.
4. Istražiti genetsku srodnost izolata *C. jejuni* i *C. coli* određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa.

Sekundarni ciljevi:

1. Usporediti dobivene rezultate s rezultatima istraživanja provedenim u drugim europskim zemljama, Aziji i SAD-u.
2. Istražiti postoji li fenotipska i genotipska razlika osjetljivosti na antibiotike između *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*.
3. Istražiti postoji li razlika u prevalenciji i distribuciji gena virulencije izolata *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*.
4. Analizirati ulogu dokazanih gena virulencije *C. jejuni* i *C. coli* u nastanku bolesti.
5. Ispitati genetsku srodnost izolata *C. jejuni* i *C. coli* sa izolatima iz različitih geografskih područja koji su dostupni u genskoj bazi.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Sojevi *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* iz kliničkih uzoraka posjeduju visoku otpornost na fluorokinolone i tetracikline te pripadaju različitim MLST klonovima prisutnim u Europi i svijetu.
2. Postoji fenotipska i genotipska razlika otpornosti na antibiotike te razlika u učestalosti i distribuciji gena virulencije izolata *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*.

3. METODE I MATERIJALI

3.1. Izolati

Svi uzorci proljevaste stolice bolničkih i izvanbolničkih pacijenata s kliničkom slikom gastroenteritisa, koji su zaprimljeni od siječnja do prosinca 2023. u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split, sa zahtjevom za bakteriološku dijagnostiku, sustavno su obuhvaćeni pretragom na *Campylobacter* spp.

Kriterij uključenja: svi primoizolati *C. jejuni* i *C. coli* izolirani iz proljevastih stolica pacijenata oba spola i svih dobnih skupina, u razdoblju istraživanja. Prikupljanje uzastopnih izolata uobičajeno je u mikrobiološkim istraživanjima antimikrobne otpornosti i molekularnoj genotipizaciji (67).

Kriterij isključenja: ponavljajući izolati iz više različitih uzoraka stolice istog pacijenta (tkz. *copy* sojevi).

Primoizolat je bakterijski izolat koji je u periodu istraživanja dokazan prvi puta iz različitih uzorka istog pacijenta. Svi ostali izolati iste vrste, sa istim obrascem antimikrobne otpornosti, u periodu od 14 dana, su ponavljajući (*copy*) sojevi.

Izračun veličine uzorka: sustavnom analizom svakog uzorka proljevaste stolice koji je pristigao u Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju sa sumnjom na infektivni gastroenterokolitis bakterijske etiologije osigurano je prikupljanje cijele populacije *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* koji su uzrokovali kampilobakteriozu u jednogodišnjem razdoblju. Dakle, istraživanje nije provedeno na uzorku već cijeloj populaciji kliničkih izolata *C. jejuni* i *C. coli*.

Kako je primarni ishod istraživanja bio određivanje strukture te populacije, pod pretpostavkom konačne populacije od 50 izolata, studija je imala dovoljno snage ($\geq 80\%$) da utvrdi prevalenciju određene antimikrobne otpornosti od $5\% \pm 1\%$ gdje je 1% predstavljalo željenu preciznost studije.

Do provođenja istraživanja, izolati su bili pohranjeni u tekućoj podlozi Mueller Hinton bujonu (Biolife, Italija) s dodatkom 20% glicerola (Merck, Njemačka) na -80°C .

3.2. Mikrobiološke i molekularne metode

1. Izolacija *Campylobacter spp.* iz proljevastih uzoraka stolice standardnim mikrobiološkim postupcima kultivacije na selektivnim bakteriološkim hranilištima.
2. Identifikacija vrste masenom spektrometrijom vremena leta uz laserski potpomognutu desorpciju / ionizaciju s matricom (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS).
3. Ispitivanje osjetljivosti izoliranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na antibiotike (ciprofloksacin, eritromicin i tetraciklin) Kirby-Bauer metodom disk difuzije, prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST).
4. Sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole genome sequencing*, WGS)
5. Genotipizacija izolata određivanjem MLST
6. Filogenetska analiza genotipova i usporedba sa izolatima pohranjenima u bazi PubMLST

3.2.1. Izolacija *Campylobacter* spp. standardnim mikrobiološkim metodama

Izolacija *Campylobacter* spp. iz dijarejalnih uzoraka stolice pacijenata provedena je kultivacijom na selektivnom hranilištu Karmali agar (Biolife, Italija) u mikroaerofilnoj atmosferi (6% O₂, 13% CO₂) koja je postignuta tvornički pripremljenim Genbox vrećicama (bioMerieux, Francuska).

Inokulirane mikrobiološke podloge su inkubirane u termostatu na 42°C tijekom 48 sati.

3.2.2. Identifikacija vrste masenom spektrometrijom vremena leta uz laserski potpomognutu desorpciju / ionizaciju s matricom (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS)

Identifikacija vrste je napravljena metodom MALDI-TOF MS, brze i specifične tehnike identifikacije pomoću analize proteinskog otiska.

Ukratko, čista bakterijska kultura je stavljena na metalnu pločicu (nosač) uređaja i prekrivena tvorničkim matriksom. Nakon sušenja, pripremljeni uzorak je stavljen u uređaj, a nakon postizanja vakuma, uporabom lasera, bakterijski proteini su se ionizirali i razdvojili putujući u vakumu različitim brzinama, što je stvorilo karakteristični matematički obrazac. Na koncu, dobiveni rezultati su se usporedili s bazom otisaka za specifične bakterijske vrste koji su pohranjeni u bazi podataka uređaja (microflex® LRF, Bruker, Njemačka).

Ova metoda se zasniva na činjenici da su bakterijski ribosomski proteini dovoljno jedinstveni za identifikaciju izolata na razini vrste (169).

3.2.3. Ispitivanje osjetljivosti izoliranih sojeva *C. jejuni* i *C. coli* na antibiotike metodom disk difuzije prema EUCAST protokolu

Za metodu testiranja osjetljivosti na antibiotike odabrana je Kirby-Bauer disk difuzijska metoda, a kvantitativno dobiveni rezultati (mjerenjem zona inhibicije bakterijskog rasta u mm) su interpretirani kvalitativno kao S (engl. *susceptible*; osjetljiv na antibiotik primijenjen u standardnoj dozi), I (engl. *intermediate susceptible*; osjetljiv na antibiotik primijenjen u povećanoj dozi) i R (engl. *resistant*; otporan na antibiotik). Za testiranje su odabrani antibiotici: eritromicin, ciprofloksacin i tetraciklin.

Kriteriji odabira antibiotika:

- preporuka Europskog odbora za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) (170)
- ispitivanje *in vitro* djelotvornosti antibiotika koji se koriste u liječenju humane kampilobakterioze te rano otkrivanje i praćenje učestalosti i distribucije mehanizama stečene otpornosti

Postupak testiranja metodom disk difuzije

Bakterijska suspenzija optičke gustoće 0,5 prema McFarlandu (mjereno denzitometrom Densimat, bioMerieux, Francuska) je nanesena na Mueller Hinton agar (Biolife, Italija) s dodatkom 5% defibrinizirane ovčje krvi (BioSap, Biognost, Hrvatska) i 20 mg/L β -NAD (engl. *Mueller-Hinton fastidious* agar, MH-F). Na površinu agara su postavljeni antimikrobni diskovi (Liofilchem, Italija) sterilnom pincetom. Antibiogrami su inkubirani u termostatu 24 sata pri temperaturi od 42 °C u mikroaerofilnim uvjetima (171).

Interpretacija rezultata ispitivanja osjetljivosti na antibiotike

Prema nastaloj zoni inhibicije rasta oko antibiotskih diskova (izmjerenoj u mm), osjetljivost je interpretirana kvalitativno (S, I i R) prema EUCAST kriterijima navedenima u tablici 1.

Višestruka antibiotska rezistencija je bila definirana kao stečena otpornost na barem jedan antibiotik iz tri ili više klasa antibiotika (164).

Za kontrolu kvalitete kultivacije i testiranja antimikrobne osjetljivosti korišten je *C. jejuni* ATCC 33560 soj.

Tablica 1. Referentne vrijednosti za interpretaciju antibiotske osjetljivosti *C. jejuni* i *C. coli* prema
*EUCAST standardima

Fluorokinoloni	Sadržaj (µg)	diska	Granične vrijednosti promjera zone (mm)	
			S ≥	R <
ciprofloksacin	5		50	26
Makrolidi	Sadržaj (µg)	diska	Granične vrijednosti promjera zone (mm)	
			S ≥	R <
azitromicin			može se pretpostaviti na temelju eritromicina	može se pretpostaviti na temelju eritromicina
klaritromicin			može se pretpostaviti na temelju eritromicina	može se pretpostaviti na temelju eritromicina
eritromicin <i>C. jejuni</i>	15		20	20
eritromicin <i>C. coli</i>	15		24	24
Tetraciklini	Sadržaj (µg)	diska	Granične vrijednosti promjera zone (mm)	
			S ≥	R <
doksiciklin	5		može se pretpostaviti na temelju tetraciklina	može se pretpostaviti na temelju tetraciklina
tetraciklini	30		30	30

*EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (170)

3.2.4. Sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole genome sequencing*, WGS)

Reprezentativni broj izolata (10%) *C. jejuni* i *C. coli*, koji su pokazali fenotipsku otpornost na dva ili više antibiotika je odabrana za sekvenciranje cijelog genoma u suradnoj ustanovi (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, HZJZ, Zagreb).

DNK odabranih bakterijskih izolata je izdvojena uporabom NucleoSpin Tissue kita (Macherey-Nagel, Njemačka), prema uputama proizvođača, uz trosatnu digestiju proteinazom K na 56 °C. Ekstrahirana DNK je kvantificirana na osnovu fluorescencije mjerene uređajem *Qubit 4* Fluorometer i uporabom *Qubit dsDNA HS Assay* kita (Invitrogen, SAD). DNK je normalizirana na 3,3 ng/μL uporabom *Myra* tekućeg sustava (BMS, Australija).

Za pripremu biblioteke (engl. *library preparation*) koristio se *Illumina DNA* Prep kit, a sekvenciranje se provelo na *Illumina NextSeq 550* platformi (Illumina, SAD) u formatu 2 × 150 baznih parova. Kontrola kvalitete provela se *FastQC v0.12.1* softverom (172) nakon čega je uslijedilo podrezivanje (engl. *trimming*) pomoću *Fastp v0.23.4* (173). *De novo* sastavljanje genoma u više kontinuiranih fragmenata obavilo se korištenjem *SPAdes v3.10.1* softvera (174), a tako sastavljeni genomi su provjereni prema kvaliteti i sadržaju gvanin+citozin (G + C) baza pomoću *Quast* (N50 >50kb, coverage >30×) v5.2.0 (175). Uzorci koji nisu zadovoljili kriterije kontrole kvalitete, poput gvanin + citozin (G+C) sadržaja koji odstupa više od 4% od očekivanog za tu bakterijsku vrstu ili ukupne duljine kontiga koja se značajno razlikuje od poznate veličine genoma, nisu bili uključeni u daljnju analizu.

Za detekciju prisutnosti *C. jejuni* / *C. coli* i potvrdu vrste svih izolata, koristila se *Kraken2 v2.1.2 s minikraken2_v2_8GB_201904_UPDATE* baza podataka (176). Iako je *Kraken2* predvidio *C. jejuni* / *C. coli*, provela se dodatna analiza radi preciznijeg razlučivanja vrsta. *Mash v2.3* koristio se za usporedbu *de novo* sastavljenih genoma s prilagođenom bazom koja sadržava referentne genome za *C. coli* i *C. jejuni*, što je omogućilo točniju diferencijaciju vrsta i veću pouzdanost rezultata (177). Sličnost između sojeva odredila se pomoću *dRep v3.4.5* softvera za usporedbu i grupiranje genoma. Ova je analiza izračunala ključne pokazatelje srodnosti genoma: MASH udaljenosti i prosječnu nukleotidnu identičnost (engl. *average nucleotide identity*, ANI). Stupanj genetske sličnosti (DNK-DNK hibridizacija, DDH) izračunala se pomoću *Genome-to-Genome Distance Calculator v3.0* alata (178).

3.2.5. Genotipizacija izolata određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (engl. *Multi Locus Sequence Typing*, MLST)

Nakon sekvenciranja, nukleotidni sljedovi sedam održavateljskih gena (engl. *housekeeping genes*) su uneseni u bazu podataka PubMLST (dostupno na <https://pubmlst.org/>) radi određivanja tipa sekvencije (engl. *Sequence Type*, ST) i njegova svrstavanja u klonske komplekse (engl. *Clonal Complex*, CC) (179).

Sekvence su registrirane u <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB64612>

Mehanizmi genetske otpornosti na antibiotike identificirani su korištenjem RGI v6.0.3 alata uz pretraživanje CARD (engl. *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) baze podataka v3.3.0 (180). Analiza se provela tako da su odabrani rezultati bili označeni kao „*perfect*”, „*strict*” i „*loose*”, pri čemu su „*loose*” rezultati prihvaćeni samo ako imaju $\geq 95\%$ podudarnosti sa „*strict*” rezultatima, čime je osigurana pouzdana detekcija i potvrda prisutnosti ili odsutnosti gena otpornosti.

3.2.6. Filogenetska analiza izolata *Campylobacter* spp.

Filogenetski odnosi među analiziranim sojevima *C. jejuni* i *C. coli* rekonstruirani su metodom maksimalne vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*, ML). U analizu su, uz vlastite izolate, uključeni i genomi *Campylobacter* spp. preuzeti iz javno dostupne baze podataka (GenBank, NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*)), kako bi se omogućila šira filogenetska usporedba. Uvrštene su sekvence izolata iz iste kalendarske godine (2023.) koje potječu iz Hrvatske, susjednih europskih država, Azije i SAD-a.

Genomi su najprije anotirani pomoću alata *Prokka* v1.14.6 (181). Na temelju dobivenih anotacija konstruiran je pangenom korištenjem programa *Panaroo* v1.5.2 uz *MAFFT* algoritam poravnanja i prag sličnosti od 90% , pri čemu su izdvojeni i poravnati konzervirani (jezgreni) geni (182). Rekombinantne regije uklonjene su primjenom alata *Gubbins* v3.4, čime su u daljnju analizu uključeni isključivo jednonukleotidni polimorfizmi (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koji odražavaju vertikalno nasljeđivanje (183).

Na temelju tako dobivenog poravnanja konstruirano je filogenetsko stablo metodom maksimalne vjerojatnosti koristeći program *IQ-TREE2* v2.3.6, dok je vizualizacija provedena u programu *iTOL* v.7 (184,185). Referentni genomi korišteni su kao vanjska grupa.

Filogenetska analiza temeljila se na matrici genetskih udaljenosti izračunatoj isključivo na konzerviranim dijelovima genoma, pri čemu su isključene varijabilne i rekombinantne regije (npr. insercijske sekvence, transpozoni i plazmidi), kako bi se analizirale samo promjene nastale vertikalnim prijenosom.

Duljina grana u stablu predstavlja očekivani broj supstitucija po nukleotidnoj poziciji, odnosno evolucijsku udaljenost među sojevima, pri čemu su radi bolje preglednosti prikazane numeričke vrijednosti supstitucija umjesto proporcionalnih duljina grana. U kontekstu epidemiološkog povezivanja, mali broj SNP-ova ($\leq 5-10$) u jezgrenom genomu odgovara vrlo kratkim ML duljinama grana, najčešće $< 0,001$ supstitucija po bazi, dok vrijednosti $\geq 0,002-0,003$ upućuju na udaljenije filogenetske odnose koji vjerojatno ne odražavaju nedavnu transmisiju (186).

3.3. Statistički postupci

Statistička analiza uključuje kvantitativnu evaluaciju podataka o antimikrobnoj osjetljivosti i prisutnosti gena rezistencije i virulencije. Analiza je provedena koristeći IBM SPSS *Statistics for Windows version 30* paket za statističku analizu (IBM Corp., Armonk, NY, SAD) s ciljem određivanja učestalosti i distribucije gena otpornosti i virulencije među sojevima *C. jejuni* i *C. coli*. Primijenjena je deskriptivna statistika za sažetak podataka. Usporedba frekvencija gena otpornosti i virulencije među *C. jejuni* i *C. coli* sojevima provela se korištenjem *hi-kvadrat* (χ^2) testa ili Fisherovog egzaktnog testa, ovisno o veličini uzorka. P-vrijednost manja od 0,05 smatra se statistički značajnom.

3.4. Etička načela

Za izradu ove disertacije su korišteni već prikupljeni klinički izolati kampilobaktera koji su identificirani iz uzoraka stolice pacijenata tijekom rutinskog rada Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split. Svi uzorci i podatci koji su korišteni su bili anonimizirani, tj ne mogu se ni na koji način povezati s identitetom pacijenata (zajamčena je tajnost osobnih podataka) i koriste se u skladu s opće prihvaćenim etičkim smjernicama i zakonskim regulativama važnim za zaštitu privatnosti ispitanika i etičnost istraživačkog rada. Istraživanje ne uključuje intervenciju niti eksperimente na pacijentima i životinjama.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split (klasa: 520-03/25-01/42; ur.broj: 2181-147/01-06/LJ.Z.-25-02) u skladu s odredbama o zaštiti prava i osobnih podataka ispitanika iz Zakona o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08) i Zakona o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (NN/18) te odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2013 na koje upućuje Kodeks.

3.5. Ustroj istraživanja

Provedeno je presječno (engl. *Cross-sectional*), temeljno (engl. *basic science*), opažajno istraživanje, zasnovano na podacima dobivenih analizom stolica pacijenata s gastroenterokolitisom u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split. Svaki uzorak stolice stacionarnih ili ambulantnih pacijenata KBC-a Split upućen na rutinsku bakteriološku pretragu obuhvaća izolaciju i identifikaciju vrste patogena. Svim *C. jejuni* i *C. coli* izolatima je ispitana antimikrobna osjetljivost, a dio izolata je odabran za analizu cijelog genoma. U istraživanje su uključeni svi sojevi koji su izolirani prvi puta (svaki sljedeći izolat dokazan u višestrukim uzorcima stolice istog pacijenta je bio isključen iz istraživanja).

4. REZULTATI

4.1. Osjetljivost izolata *C. jejuni* i *C. coli* na testirane antibiotike

U periodu istraživanja, ukupno su identificirana 172 primoizolata kampilobaktera te je svima ispitana osjetljivost na antibiotike. Većina izolata je identificirana kao *C. jejuni* (146/172, 85%), dok je preostalih 26 izolata identificirano kao *C. coli* (15%) (Hi-kvadrat test; $P < 0,01$). Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti su prikazani u tablici 2.

Rezistencija na ciprofloksacin zabilježena je u 69% izolata *C. coli* te u 80% izolata *C. jejuni*, dok je rezistencija na tetracikline utvrđena u 62% izolata *C. coli* i 48% izolata *C. jejuni*. Rezistencija na eritromicin bila je niska; dokazana je u jednom izolatu *C. coli*, dok su svi izolati *C. jejuni* bili osjetljivi na makrolide.

Unatoč uočenim razlikama u učestalosti rezistencije između vrsta, statistička analiza nije pokazala značajnu razliku ni za jedan od ispitivanih antibiotika (Fisherov egzaktni test; ciprofloksacin $P = 0,2$; tetraciklin $P = 0,2$; eritromicin $P = 0,16$).

Među izolatima koji su klasificirani kao osjetljivi na ispitivane antibiotike dodatno je analizirana kvalitativna raspodjela osjetljivosti, odnosno razlikovanje između izolata potpuno osjetljivih na standardnu dozu antibiotika i izolata osjetljivih pri povećanoj izloženosti antibiotiku. Svi izolati osjetljivi na ciprofloksacin, pripadali su kategoriji osjetljivosti pri povećanoj izloženosti antibiotiku. Nasuprot tomu, svi izolati *C. coli* i *C. jejuni* koji su bili osjetljivi na tetraciklin i eritromicin bili su potpuno osjetljivi pri standardnoj referentnoj dozi antibiotika.

Tablica 2. Distribucija rezistentnih izolata *C. coli* i *C. jejuni*

Izolat (N; %)	Antimikrobna rezistencija		
	Ciprofloksacin (N; %)	Tetraciklin (N; %)	Eritromicin (N; %)
<i>C. coli</i> (26; 15%)	Rezistentan (18; 69%)	Rezistentan (16; 62%)	Rezistentan (1; 4%)
<i>C. jejuni</i> (146; 85%)	Rezistentan (117; 80%)	Rezistentan (70; 48%)	Rezistentan (0; 0%)
*P<0,01	**P=0.2	**P=0.2	**P=0.16

*Hi-kvadrat test; **Fisherov egzakti test

4.2. Analiza molekularne osnove antimikrobne otpornosti

Analiza raspodjele gena antimikrobne rezistencije (prikazana u tablici 4.) i njihove povezanosti s fenotipskom rezistencijom (prikazano u tablici 5.) pokazala je visoku učestalost molekularnih determinanti rezistencije, osobito u izolata *C. jejuni*.

Mutacija *gyrA* (p.T86I), povezana s rezistencijom na fluorokinolone, bila je prisutna u svim rezistentnim izolatima *C. jejuni* (100%) te u većini rezistentnih izolata *C. coli* (66,7%). Geni rezistencije na tetraciklin, prvenstveno *tet(O/32/O)*, detektirani su u gotovo svim izolatima obje vrste (100% *C. coli*; 91,7% *C. jejuni*), dok je dodatni gen *tet(O)* bio prisutan isključivo u dijelu izolata *C. jejuni* (36,4%).

Rezistencija na eritromicin je niska i uočena je fenotipski isključivo u jednom izolatu *C. coli* (1/26; 3,3%) što je potvrđeno genotipizacijom i dokazom mutacije 23S rRNA (2075A>G). Svi izolati *C. jejuni* su bili fenotipski osjetljivi na makrolide, što je i potvrđeno cijelogenomskim sekvenciranjem.

Geni rezistencije na aminoglikozide pokazali su varijabilnu raspodjelu, pri čemu je *ant(6)-Ia* bio prisutan u 50% izolata *C. jejuni*, dok je *aph(3')-III* detektiran samo u jednom izolatu *C. coli*.

Svi izolati nosili su gene za produkciju beta-laktamaza iz obitelji *bla*_{OXA}, uz izraženu alelnu raznolikost i veću prevalenciju pojedinih varijanti u *C. jejuni* (npr. *bla*_{OXA}-193, *bla*_{OXA}-450, *bla*_{OXA}-452).

Unatoč uočenim razlikama u distribuciji pojedinih gena između vrsta, statistička analiza nije pokazala značajne razlike između ispitivanih determinanti rezistencije ($p > 0,05$), što upućuje na slične obrasce genetske podloge rezistencije između *C. coli* i *C. jejuni*, uz kvantitativne, ali ne i statistički potvrđene razlike.

Tablica 4. Raspodjela gena antimikrobne rezistencije u sojevima roda *Campylobacter* detektiranih metodom sekvenciranja cijelog genoma.

Izolat	MLST	CC	Geni rezistencije na odabrane antibiotike				Beta laktami
			Ciprofloksacin	Tetraciklin	Eritromicin	Aminoglikozidi	
<i>C. jejuni</i> (crocj1)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-193
<i>C. jejuni</i> (crocj2)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-193
<i>C. jejuni</i> (crocj3)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i> <i>tet(O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-450 <i>bla</i> OXA-451 <i>bla</i> OXA-452 <i>bla</i> OXA-461
<i>C. jejuni</i> (crocj4)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i> <i>tet(O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-450 <i>bla</i> OXA-452 <i>bla</i> OXA-A193
<i>C. jejuni</i> (crocj5)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i> <i>tet(O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-450 <i>bla</i> OXA-452
<i>C. jejuni</i> (crocj6)	6461	ST-353	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>bla</i> OXA-452
<i>C. jejuni</i> (crocj7)	50	ST-21	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-193
<i>C. jejuni</i> (crocj8)	122	ST-206	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-450
<i>C. jejuni</i> (crocj9)	122	ST-206	<i>gyrA: T861</i>	-	-	-	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-450 <i>bla</i> OXA-452
<i>C. jejuni</i> (crocj10)	367	ST-257	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i> <i>tet(O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-461
<i>C. jejuni</i> (crocj11)	464	ST-464	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-450 <i>bla</i> OXA-452
<i>C. jejuni</i> (crocj12)	9897	/	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-452
<i>C. coli</i> (crocc1)	855	ST-828	-	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-489
<i>C. coli</i> (crocc2)	8195	ST-828	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	-	-	<i>bla</i> OXA-193 <i>bla</i> OXA-452
<i>C. coli</i> (crocc3)	3020	ST-828	<i>gyrA: T861</i>	<i>tet(O/32/O)</i>	23Sr.g.2075A>G	<i>aph(3')-III</i>	<i>bla</i> OXA-193

Tablica 5. Odnos gena antimikrobne rezistencije i fenotipski dokazane rezistencije u izolatima *C. coli* i *C. jejuni*.

Izolat (N)	Geni rezistencije na odabrane antibiotike				
	Ciprofloksacin	Tetraciklin	Eritromicin	Aminoglikozidi	Ostali Beta laktami
<i>C. coli</i> (3)	gyrA.T861 (2; 66.7%)	<i>tet(O/32/O)</i> (3; 100%) <i>tet(O)</i> (0; 0%)	23S rRNA. 2075A>G (1; 33.3%)	<i>ant(6)-Ia</i> (0; 0%)	<i>bla</i> _{OXA-193} (2;66.7%) <i>bla</i> _{OXA-450} (0; 0%) <i>bla</i> _{OXA-451} (0; 0%) <i>bla</i> _{OXA-452} (1;33.3%) <i>bla</i> _{OXA-461} (0; 0%) <i>bla</i> _{OXA-489} (1; 33.3%)
	Rezistentan fenotip (2; 66.7%)	Rezistentan fenotip (3; 100%)	Rezistentan fenotip (1; 33.3%)	<i>aph(3')-III</i> (1; 33.3%)	
<i>C. jejuni</i> (12)	gyrA.T861 (12; 100%)	<i>tet(O/32/O)</i> (11; 91.7%) <i>tet(O)</i> (4; 36.4%)	23S rRNA.2075A>G (0; 0%)	<i>ant(6)-Ia</i> (6; 50%)	<i>bla</i> _{OXA-193} (9; 75%) <i>bla</i> _{OXA-450} (6; 50%) <i>bla</i> _{OXA-451} (1; 8.3%) <i>bla</i> _{OXA-452} (7;58.3%) <i>bla</i> _{OXA-461} (2;16.7%) <i>bla</i> _{OXA-489} (0; 0%)
	Rezistentan fenotip (11; 91.76%)	Rezistentan fenotip (10; 83.3%)	Rezistentan fenotip (0; 0%)	<i>aph(3')-III</i> (0; 0%)	
*P	0.2	<i>tet(O/32/O)</i> 1	0.2	<i>ant(6)-Ia</i> 0.23	<i>bla</i> _{OXA193} 1 <i>bla</i> _{OXA-450} 0.23 <i>bla</i> _{OXA-451} 0.229 <i>bla</i> _{OXA-452} 0.569 <i>bla</i> _{OXA-461} 1 <i>bla</i> _{OXA-489} 0.2
		<i>tet(O)</i> 0.505		<i>aph(3')-III</i> 0.2	

*Fisherov egzaktni test

4.3. Distribucija genotipova identificirana određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa (MLST analiza)

MLST analizom je uočena razlika u genetskoj strukturi izolata *C. jejuni* i *C. coli*, a rezultati istraživanja su prikazani u tablici 3.

Unutar vrste *C. jejuni* identificiran je dominantni sekvencijski tip ST-6461, koji pripada klonalnom kompleksu CC-353 i obuhvaća šest izolata (označenih kao crocj1, crocj2, crocj3, crocj4, crocj5 i crocj6) s identičnim alelnim profilom, što upućuje na mogući zajednički izvor ili klonalno širenje.

Ostali izolati *C. jejuni* pokazali su veću genetsku raznolikost, uključujući ST-50 (CC-21), ST-122 (CC-206), ST-367 (CC-257), ST-464 (CC-464) te jedan izolat (ST-9897) koji nije bio pridružen nijednom poznatom klonalnom kompleksu.

Za razliku od heterogene distribucije genotipova *C. jejuni*, svi analizirani izolati *C. coli* pripadaju istom klonalnom kompleksu CC-828, ali različitim sekvencijskim tipovima (ST-855, ST-8195 i ST-3020).

Ovi rezultati ukazuju na veću genetsku homogenost izolata *C. coli* u usporedbi s izolatima *C. jejuni*, uz istodobnu dominaciju jednog klonalnog kompleksa, dok *C. jejuni* pokazuje širi raspon klonalnih linija i veću genetsku raznolikost.

Tablica 3. Distribucija sekvencijskih tipova i klonalnih kompleksa *C. jejuni* i *C. coli*

*ID	Izolati	MLST **ST	MLST ***CC	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>
crocj1	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj2	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj3	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj4	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj5	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj6	<i>C. jejuni</i>	6461	353	2	17	5	2	10	59	6
crocj7	<i>C. jejuni</i>	50	21	2	1	12	3	2	1	5
crocj8	<i>C. jejuni</i>	122	206	6	4	5	2	2	1	5
crocj9	<i>C. jejuni</i>	122	206	6	4	5	2	2	1	5
crocj10	<i>C. jejuni</i>	367	257	2	2	4	62	4	5	6
crocj11	<i>C. jejuni</i>	464	464	24	2	2	2	10	3	1
crocj12	<i>C. jejuni</i>	9897	/	2	21	12	62	11	67	6
crocc1	<i>C. coli</i>	855	828	33	39	30	79	104	35	17
crocc2	<i>C. coli</i>	8195	828	33	39	30	677	104	206	17
crocc3	<i>C. coli</i>	3020	828	33	176	30	79	113	43	17

*ID - laboratorijska oznaka izolata; **ST - sekvencijski tip (engl. *Sequence Type*); ***CC - klonalni kompleks (engl. *Clonal Complex*); konzervirani geni: *aspA*, *glnA*, *gltA*, *pgm*, *tkl* i *uncA*

4.4. Analiza gena virulencije

4.4.1. Analiza gena pokretljivosti

U tablici 6. su prikazani identificirani geni za bakterijsku pokretljivost, a njihova detaljna analiza je pokazala očuvanu jezgru flagelnog sustava uz istodobno izraženu varijabilnost dodatnih, sojno-specifičnih gena, osobito u izolata *C. jejuni*. Svi analizirani izolati *C. jejuni* posjedovali su kompletan skup od 50 konzerviranih gena pokretljivosti, dok se broj dodatnih (individualnih) gena kretao od 2 (4%) do 16 (24%), pri čemu su najčešće detektirani geni uključivali *flaA*, *flaB*, *flaG*, *flgA*, *flgP*, *fliS* te gene uključene u glikozilaciju flagelina (*pseA*, *pseD/maf2*, *pseE/maf5*, *pseG*, *pseH*, *pseI*, *ptmA*, *ptmB*, *maf4*).

Unutar dominantne klonalne linije ST-353 (izolati *crocj1*, *crocj2*, *crocj3*, *crocj4*, *crocj5* i *crocj6*) uočena je relativno homogena raspodjela ovih gena, uz manje varijacije između izolata, dok su ostali *C. jejuni* izolati pokazali veću heterogenost, uključujući i izolat s minimalnim brojem dodatnih gena (npr. *crocj10*).

Nasuprot tome, izolati *C. coli* posjedovali su manji skup od 16 konzerviranih gena pokretljivosti, uz varijabilan broj dodatnih gena (3-10; 16-38%), pri čemu su dominantno zastupljeni geni povezani s glikozilacijom i strukturom flageluma (*pse* i *ptm* geni), dok su pojedini izolati sadržavali i regulatorne gene (*flhG*, *fliA*, *fliY*).

Ovi rezultati ukazuju na veću kompleksnost i genetsku raznolikost sustava pokretljivosti u *C. jejuni* u odnosu na *C. coli*, osobito u segmentu dodatnih gena povezanih s posttranslacijskim modifikacijama flagelina i potencijalnom prilagodbom na različite okolišne uvjete i domaćine.

Tablica 6. Raspodjela konzerviranih i varijabilnih gena pokretljivosti u izolatima *C. jejuni* i *C. coli*

Konzervirani		Geni pokretljivosti				
		Individualni				
50 gena	<i>C. jejuni</i> (crocj1) MLST 6461 16 (24%) <i>flaA, flaB, flaG, flgA, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseD/maf2, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB, flab</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj2) MLST 6461 15 (23%) <i>flaA, flaB, flaG, flag, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseD/maf2, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj3) MLST 6461 15 (23%) <i>flaA, flaB, flaG, flgA, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseD/maf2, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj4) MLST 6461 11 (18%) <i>flaG, flag, FlgP, fliS, pseA, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj5) MLST 6461 11 (18%) <i>flaG, flag, FlgP, fliS, pseA, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj6) MLST 6461 16 (24%) <i>flgA, flaG, fliS, flgP, flaA, flaB, pseA, pseG, pseH, pseI, maf4, pseD/maf2, pseE/maf5, ptmA, ptmB, fli</i>
	<i>C. jejuni</i> (crocj7) MLST 50 12 (19%) <i>flaA, flaB, flaG, FlgP, fliS, pseA, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj8) MLST 122 14 (22%) <i>flaA, flaB, flaG, flag, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj9) MLST 122 12 (19%) <i>flaG, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseD/maf2, pseE/maf5, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj10) MLST 367 2 (4%) <i>flaG, FlgP</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj11) MLST 464 9 (15%) <i>flaG, FlgP, fliS, maf4, pseA, pseE/maf5, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. jejuni</i> (crocj12) MLST 9897 13 (21%) <i>flgP, flgA, fliS, flag, flaA, flaB, pseG, pseH, pseE, pseI, pseE/maf5, ptmA, ptmB</i>
	<i>C. coli</i> (crocc1) MLST 855 6 (27%) <i>pseA, pseE/maf5, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	<i>C. coli</i> (crocc2) MLST 8195 3 (16%) <i>flhG, fliA, fliY</i>	<i>C. coli</i> (crocc3) MLST 3020 10 (38%) <i>flaA, flaB, pseH, pseA, pseI, ptmB, ptmA, pseD/maf2, maf4, pseE/maf5</i>			

**C. jejuni* konzervirani geni pokretljivosti (50) *Cj0371, Cj0883c, flgB, flgC, flgD, flgE, flgG, flgG2, flgH, flgI, flgJ, flgK, flgL, flgM, flgQ, flgR, flgS, flhA, flhB, flhF, flhG, fliA, fliD, fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliK, fliL, fliM, fliN, fliP (fliP), fliQ, fliR, fliW, fliY, motA, motB, pflA, pseB, pseC, pseF, rpoN, cheA, cheV, cheW, cheY, eptC, flaC*

** *C. coli* konzervirani geni pokretljivosti (16) *cheA, flaG, flgB, flgC, flgE, flgJ, flgK, flgL, flgM, fliD, fliM, fliS, pseB, pseC, pseF, pseG*

4.4.2. Analiza gena imunomodulacije

Geni odgovorni za imunomodulacijski učinak su prikazani u tablici 7. Njihova analiza je pokazala visoko očuvanu jezgru od 14 gena uključenih u biosintezu lipooligosaharida i kapsularnih polisaharida u svim analiziranim izolatima *C. jejuni*, uz istodobno izraženu varijabilnost dodatnih (individualnih) gena.

Broj individualnih gena kretao se od 2 (13%) do 13 (48%), pri čemu su najzastupljeniji bili geni povezani s kapsularnim sustavom (*kpsC*, *kpsF*, *kpsM*) te varijabilni lokusi poput *cj1416c*-*cj1420c* i *cj1427c*, koji sudjeluju u modifikacijama površinskih struktura i interakciji s imunološkim sustavom domaćina.

Unutar dominantne klonalne linije ST-353 (sljedbeno izolati od *crocj1* do *crocj6*) uočena je relativno ujednačena raspodjela individualnih gena (10-11; 42-44%), što upućuje na stabilan genetski obrazac unutar ove linije.

Nasuprot tome, ostali *C. jejuni* izolati pokazali su veću heterogenost, uključujući izolat s vrlo reduciranim repertoarom imunomodulatornih gena (*crocj12*), ali i izolat s proširenim skupom gena (*crocj11*).

Dodatno, prisutnost gena *wlaN* u pojedinim izolatima ukazuje na potencijalnu sposobnost molekularne mimikrije i povezanost s razvojem autoimunih komplikacija.

S druge strane, geni imunomodulacije nisu detektirani u *C. coli* sojevima pretragama korištenim u našem istraživanju.

Ovi rezultati ukazuju na očuvanu osnovnu strukturu imunomodulatornih mehanizama *C. jejuni* uz značajnu varijabilnost dodatnih gena koja može doprinositi razlikama u virulenciji i prilagodbi domaćinu.

Tablica 7. Raspodjela konzerviranih i varijabilnih gena imunomodulacije u izolatima *C. jejuni*.

Konzervirani	Geni Imunomodulacije					
	Individualni					
	<i>C. jejuni</i> (crocj1) MLST 6461 11 (44%)	<i>C. jejuni</i> (crocj2) MLST 6461 11 (44%)	<i>C. jejuni</i> (crocj3) MLST 6461 10 (42%)	<i>C. jejuni</i> (crocj4) MLST 6461 10 (42%)	<i>C. jejuni</i> (crocj5) MLST 6461 10 (42%)	<i>C. jejuni</i> (crocj6) MLST 6461 11 (44%)
14 gena <i>gmhA</i> , <i>gmhB</i> , <i>hddA</i> , <i>hddC</i> , <i>hldD</i> , <i>hldE</i> , <i>htrB</i> , <i>kpsD</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsS</i> , <i>kpsT</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>waaV</i>	<i>Cj1442c</i> , <i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>Cj1442c</i> , <i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>Cj1442c</i> , <i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>cysC</i> , <i>Cj1416c</i> , <i>Cj1417c</i> , <i>Cj1418c</i> , <i>Cj1419c</i> , <i>Cj1420c</i> , <i>Cj1427c</i>
	<i>C. jejuni</i> (crocj7) MLST 50 12 (46%)	<i>C. jejuni</i> (crocj8) MLST 122 12 (46%)	<i>C. jejuni</i> (crocj9) MLST 122 11 (44%)	<i>C. jejuni</i> (crocj10) MLST 367 5 (26%)	<i>C. jejuni</i> (crocj11) MLST 464 13 (48%)	<i>C. jejuni</i> (crocj12) MLST 9897 2 (13%)
	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>kpsM</i> , <i>cj1135</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cysC</i> , <i>wlaN</i>	<i>Cj1442c</i> , <i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>kpsM</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>kpsM</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>kpsM</i> , <i>cj1135</i>	<i>Cj1442c</i> , <i>gmhA2</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsF</i> , <i>kpsM</i> , <i>cj1135</i> , <i>cj1416c</i> , <i>cj1417c</i> , <i>cj1418c</i> , <i>cj1419c</i> , <i>cj1420c</i> , <i>cj1427c</i> , <i>cysC</i>	<i>Cj1135</i> , <i>kpsM</i>

4.4.3. Analiza gena adherencije, invazije i produkcije toksina

Geni zaduženi za adherenciju, invaziju i produkciju toksina prikazani su u tablici 8. Uočen je visoko konzerviran obrazac prisutnosti gena u svim analiziranim izolatima *C. jejuni*, neovisno o MLST tipu. Svi izolati sadržavali su ključne gene adherencije (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *Cj1279*), koji omogućuju vezanje za epitelne stanice domaćina. Geni invazije (*ciaB*, *ciaC*) bili su prisutni u svim izolatima, što ukazuje na očuvanu sposobnost intracelularne invazije i patogeneze. Također, svi analizirani izolati nosili su kompletan *cdtABC* operon, odgovoran za produkciju CDT, što potvrđuje uniformnu prisutnost ovog značajnog virulentnog faktora.

Dodatno, gen *cstIII*, uključen u sintezu lipooligosaharida i povezan s molekularnom mimikrijom, detektiran je u jednom izolatu (*crocj7*), što može imati implikacije za imunopatogenezu. Isti izolat (*crocj7*), koji pripada MLST 50, sadrži gene *cstIII* i *wlaN*.

S druge strane, slično genima imunomodulacije, geni za adherenciju, invaziju i produkciju toksina nisu detektirani u *C. coli* izolatima pretragama korištenim u našem istraživanju.

Tablica 8. Raspodjela gena adherencije, invazije i toksina u izolatima *C. jejuni*.

Izolat	MLST	Geni adherencije	Geni invazije	Geni toksina
<i>C. jejuni</i> <i>crocj1</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj2</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj3</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, orA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj4</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj5</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj6</i>	6461	<i>Cj1279, cadF, jlpA pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj7</i>	50	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i> <i>cstIII</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj8</i>	122	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj9</i>	122	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj10</i>	367	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>Crocj11</i>	464	<i>Cj1279, cadF, jlpA, pebA, porA,</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>
<i>C. jejuni</i> <i>crocj12</i>	9897	<i>Cj1279, cadF, jlpA pebA, porA</i>	<i>ciaC, ciaB</i>	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>

4.5. Filogenetska analiza i usporedba s izolatima pohranjenim u genskoj bazi

Rezultati filogenetske analize izolata *C. jejuni* te usporedba s nacionalnim i međunarodnim izolatima, prikazani su filogenetskim stablom na slici 4. Duljina grana u stablu predstavlja očekivani broj supstitucija po nukleotidnoj poziciji, odnosno evolucijsku udaljenost među sojevima, pri čemu su radi bolje preglednosti prikazane numeričke vrijednosti supstitucija umjesto proporcionalnih duljina grana.

U epidemiološkom kontekstu gledano, prvih šest sojeva *C. jejuni* (sljedbeno od crocj1 do crocj6) imaju visoku genetsku srodnost (0,0001), što govori o njihovoj epidemiološkoj povezanosti i vjerojatnoj pripadnosti istom epidemijskom izbijanju. Unutar ove grupe, međusobno su najbliži crocj2 i crocj6 te crocj1 i crocj4.

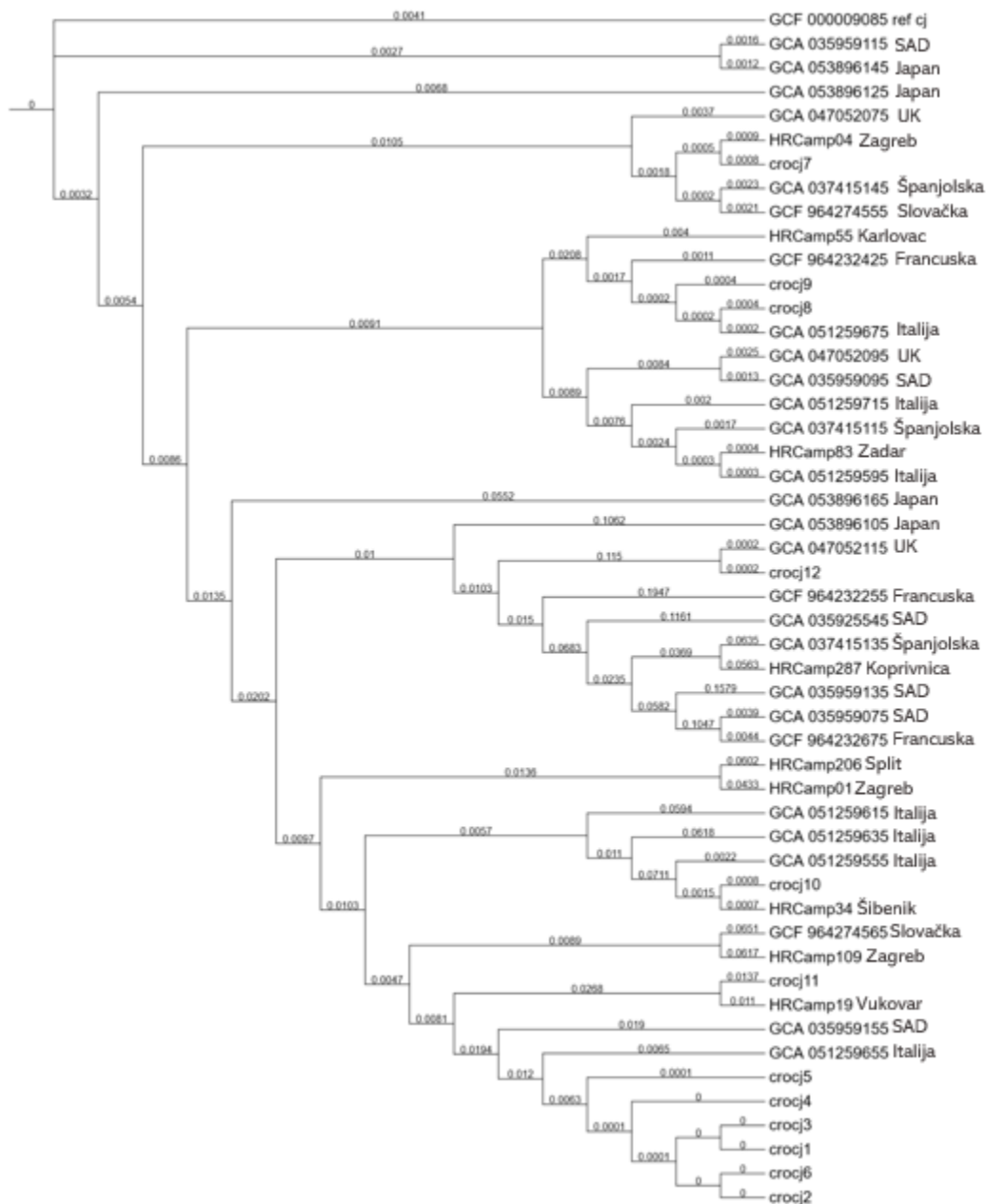
Također, izolati crocj8 i crocj9 su evolucijski gledano izuzetno bliski (0,0004) što ukazuje na zajednički izvor i transmisiju. Uočena je njihova visoka srodnost (0,0002) sa talijanskim izolatom koji je u bazi pohranjen pod oznakom GCA 051259675. Zanimljivo je da je crocj8 čak srodniji s talijanskim GCA 051259675, nego hrvatskim crocj9 izolatom, iako su te razlike minimalne u epidemiološkom kontekstu.

Izolat crocj7 je genetski vrlo srodan (0,0005) HRCamp04 soju koji je izoliran iz kliničkog uzorka pacijenta iz Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu. Ova dva izolata su genetski blisko povezana s izolatima GCA 037415145 iz Španjolske i GCF 964274555 iz Slovačke.

Izolat crocj10 pokazuje blisku genetsku povezanost s izolatima označenim kao HRCamp34, a izoliran je iz kliničkog izolata pacijenta iz Šibensko-kninske županije (0,0015), dok je izolat crocj11 genetski najbliži izolatu HRCamp19 iz Zavoda za javno zdravstvo Vukovarsko-srijemske županije, ali njihova udaljenost (0,0137) ne ukazuje na nedavnu zajedničku transmisiju.

Na koncu, dokazana je visoka srodnost izolata crocj12 i izolata GCA047052115 iz Ujedinjenog Kraljevstva (0,002) što govori u prilog epidemijskog širenja izvan granica Europske Unije.

Nasuprot tome, nije dokazana bliska genetska srodnost s izolatima iz SAD-a, Japana i drugih europskih država (duljina grana $\geq 0,002$).

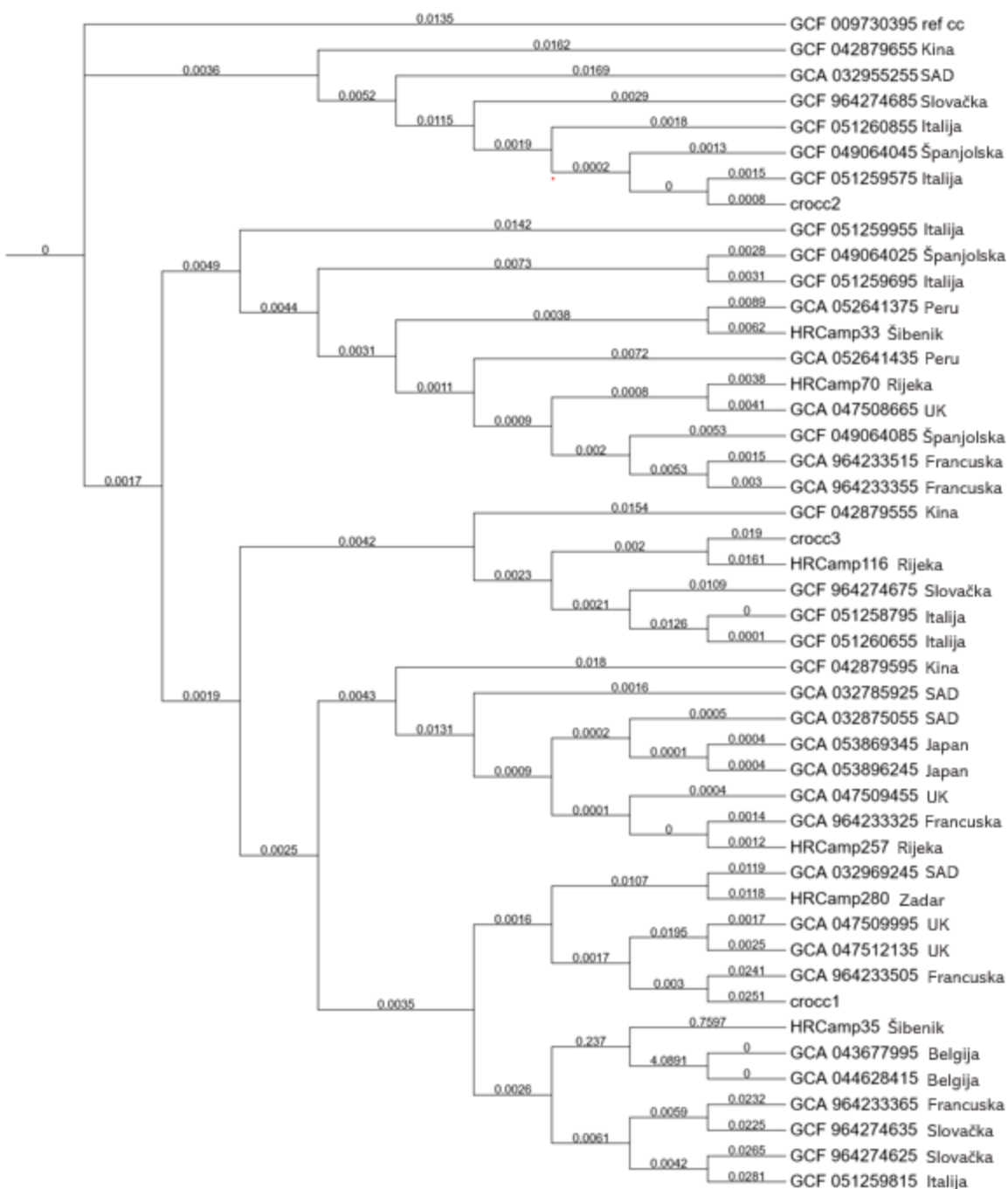


Slika 4. Filogenetsko stablo *C. jejuni* izolata konstruirano metodom maksimalne vjerojatnosti koristeći program *IQ-TREE2* v2.3.6. Brojevi na granama stabla prikazuju broj supstitucija po bazi.

Rezultati filogenetske analize *C. coli* izolata prikazani su u obliku filogenetskog stabla na slici 5. Epidemiološki su blisko povezani izolat crocc2 i izolat GCF051259575 porijeklom iz Italije (0,0015). Ovi izolati su blisko povezani s izolatom GCF 049064045 (0,0013) iz Španjolske, što govori o zajedničkoj transmisiji u mediteranskoj regiji.

Preostali izolati nisu pokazali blisku evolucijsku srodnost s analiziranim sekvencama pohranjenima u genskoj bazi. Ipak, prema rezultatima analize, izolat crocc1 je filogenetski najbliži izolatu GCA 964233595 iz Francuske (0,0241), dok je crocc3 najbliži HRCamp116 izolatu iz Rijeke (0,019).

Rezultati prikazane analize ukazuju na udaljenije filogenetske odnose izolata iz ovog istraživanja i izolata iz SAD-a, Japana, Kine, Perua, UK-a i ostalih europskih zemalja (Slovačka, Belgija, i Francuska).



Slika 5. Filogenetsko stablo *C. coli* izolata konstruirano metodom maksimalne vjerojatnosti koristeći program *IQ-TREE2* v2.3.6. Brojevi na granama stabla prikazuju broj supstitucija po bazi.

5. RASPRAVA

Kampilobakterioze su najčešće bakterijske infekcije koje se prenose hranom i vodom u razvijenim zemljama, a rastuća rezistencija kampilobaktera otežava njihovo liječenje (100). U ovom istraživanju dominantna vrsta je *C. jejuni* (85%) u odnosu na *C. coli* (15%), što je u skladu s većinom epidemioloških studija koje navode da je *C. jejuni* odgovoran za većinu humanih infekcija. Uočena visoka rezistencija na ciprofloksacin (80% kod *C. jejuni* i 69% kod *C. coli*) uklapa se u globalni trend porasta fluorokinolonske rezistencije, koja na razini Europe iznosi oko 61,2%, dok u nekim regijama prelazi 80% (136-139). Naši rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata *C. jejuni* usporedivi su s dosadašnjim podacima iz Hrvatske, i prate uzlaznu krivulju rezistencije na ciprofloksacin, s 60% u 2012. i 2013. godini, 75% u 2021. te 71% rezistentnih izolata u 2022. godini (128,132,158).

Rezistencija na tetracikline u ovom istraživanju iznosila je 48% za *C. jejuni* i 62% za *C. coli*. U prijašnjim istraživanjima, rezistencija *C. jejuni* na tetracikline u Hrvatskoj je bila 24% u 2012., 19% u 2021. te 20% u 2022. godini, dok u istim istraživanjima nije ispitivana antimikrobna osjetljivost *C. coli* izolata (128,132,158). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na znatno povećanje tetraciklinske rezistencije u Hrvatskoj, koji su trenutno usporedivi s europskim prosjekom od oko 44%, ali i s regionalnim podacima iz Slovenije i Austrije, gdje se bilježe vrijednosti od približno 60-65% (153,156,162). Ova koegzistencija rezistencije na fluorokinolone i tetracikline dodatno podupire hipotezu o zajedničkom selekcijskom pritisku, ponajprije povezanom s veterinarskom uporabom antibiotika i zoonotskim prijenosom putem hrane (144).

Makrolidna rezistencija ostala je niska, s 4% u *C. coli* i potpunom osjetljivošću svih izoliranih i testiranih sojeva *C. jejuni*, što je u skladu s literaturom koja navodi prevalenciju ispod 5% u većini zemalja (152). Ovakav nalaz također odgovara prethodnim podacima iz Hrvatske, gdje je rezistencija na eritromicin kontinuirano niska ili nije uopće bila detektirana u istraživanjima (128,132,158). Međutim, prisutnost eritromicin-rezistentnih *C. coli* izolata u našem uzorku, iako niska, podudara se s regionalnim i međunarodnim podacima (npr. u Sloveniji iznosi 4,4%, a u Italiji do 13%), što može ukazivati na veću sklonost ove vrste razvoju makrolidne rezistencije (153,163).

Iako razlike u učestalosti antimikrobne rezistencije između *C. jejuni* i *C. coli* u ovom istraživanju nisu bile statistički značajne, uočen je trend više tetraciklinske i makrolidne rezistencije u *C. coli*, što je u skladu s literaturom koja sugerira veću sklonost ove vrste razvoju

višestruke antimikrobne otpornosti (163,165). Posebno je zanimljiva uloga makrolidne rezistencije kao potencijalnog “okidača” MDR fenotipa u *C. coli*, što je uočeno u studijama koje pokazuju da eritromicin-rezistentni sojevi *C. coli* zadržavaju kolonizacijsku sposobnost, za razliku od *C. jejuni* (100).

Rezultati MLST analize u ovom istraživanju jasno potvrđuju izraženu razliku u genetskoj strukturi između *C. jejuni* i *C. coli*, što je u skladu s postojećim spoznajama o većoj genetskoj raznolikosti *C. jejuni* i relativnoj homogenosti *C. coli* (41,129,139). Dominacija sekvencijskog tipa ST-6461 unutar klonalnog kompleksa CC-353 kod *C. jejuni*, uz prisutnost više izolata s identičnim alelnim profilom, upućuje na mogući zajednički izvor ili lokalno klonalno širenje, što je u skladu s ulogom MLST-a kao alata za detekciju epidemiološki povezanih slučajeva i izbijanja (187). Istodobno, prisutnost više različitih sekvencijskih tipova i klonalnih kompleksa (CC-21, CC-206, CC-257, CC-464) potvrđuje visoku genetsku heterogenost *C. jejuni*, što je također u skladu s literaturom koja opisuje postojanje četrdesetak klonalnih kompleksa i široku distribuciju međunarodnih linija (134). Rezultati istraživanja također su kompatibilni s regionalnim podacima iz Hrvatske i Europe, gdje se među dominantnim kompleksima često navode CC-21, CC-206 i CC-353, uz izražene geografske varijacije (132,133,188).

Nasuprot tome, svi analizirani izolati *C. coli* pripadaju klonalnom kompleksu CC-828, unatoč određenim razlikama u sekvencijskim tipovima, što potvrđuje izrazitu genetsku homogenost ove vrste i dominantnu ulogu CC-828 u globalnoj epidemiologiji (41,140). Ovakav nalaz u potpunosti je u skladu s literaturom, koja CC-828 opisuje kao predominantni klonalni kompleks prisutan u Europi, Aziji i SAD-u, povezan s humanim infekcijama, ali i s rezervoarima u stočarstvu i peradarstvu, što upućuje na važnu ulogu zoonotskog prijenosa (139,140).

Dodatno, identificirani klonalni kompleksi *C. jejuni*, osobito CC-353 i CC-464, u literaturi su povezani s visokim razinama antimikrobne rezistencije, uključujući kinolone, što može djelomično objasniti i visoku učestalost rezistencije u našem istraživanju (142,143). Također, kompleksi poput CC-21 i CC-206 poznati su po širokoj ekološkoj distribuciji i sposobnosti kolonizacije različitih domaćina, što dodatno podupire njihovu prisutnost u kliničkim izolatima (136,144). Suprotno tome, homogenost *C. coli* unutar CC-828, uz istodobno veću sklonost razvoju multidrug-rezistencije, dodatno naglašava razlike u evolucijskoj dinamici i adaptacijskim strategijama između ove dvije vrste (144).

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju dominantnu ulogu mutacije *gyrA* T86I kao ključnog molekularnog mehanizma rezistencije na fluorokinolone, s potpunom prisutnošću u *C. jejuni* te visokom učestalošću u *C. coli*. Ovakav nalaz nadovezuje se na ranije hrvatske WGS studije, u kojima su svi ciprofloksacin-rezistentni izolati *C. jejuni* nosili istu mutaciju, iako molekularna karakterizacija rezistoma *C. coli* u Hrvatskoj do sada nije bila analizirana (132). Usporedivi obrasci zabilježeni su i u srednjoeuropskim zemljama, gdje je dokazana visoka genetska srodnost izolata s mutacijom T86I, što upućuje na širenje dominantnih rezistentnih klonova, a slični rezultati potvrđeni su i u talijanskim WGS analizama (163,188). Druge mutacije povezane s fluorokinolonskom rezistencijom, poput Thr-86-Ala ili supstitucija na poziciji 90, pojavljuju se znatno rjeđe i imaju manji epidemiološki značaj (189,190). Iako su u razvoju novi inhibitori bakterijskih topoizomeraza, koji zadržavaju aktivnost i u prisutnosti T86I mutacije, kao Gepotidacin (odobren za terapiju urinarnih infekata) i Zoliflodacin (odobren za terapiju gonoreje), njihova primjena u kontekstu *Campylobacter* infekcija zasad je ograničena, dijelom zbog utjecaja efluks sustava poput CmeABC, ali i zbog činjenice da je klinički tijek bolesti u većini slučajeva samoograničavajući, što smanjuje interes za razvoj ciljane antimikrobne terapije (191).

Nadalje, rezultati istraživanja ukazuju na izrazitu dominaciju mozaik gena *tet(O/32/O)* kao glavnog mehanizma rezistencije na tetracikline, pri čemu je detektiran u svim izolatima *C. coli* te u velikoj većini izolata *C. jejuni*, dok je klasični gen *tet(O)* prisutan samo u manjem udjelu izolata *C. jejuni*. Ovakav obrazac predstavlja specifičnost našeg skupa podataka i odstupa od većine europskih studija, u kojima se *tet(O)* opisuje kao dominantni determinant rezistencije (192,193). Zanimljivo, prethodna hrvatska WGS analiza *C. jejuni* izolata također je pokazala gotovo potpun izostanak gena *tet(O)*, što sugerira mogućnost postojanja regionalno specifičnih genetskih obrazaca ili nedovoljno prepoznatih varijanti gena (132). U tom kontekstu, treba uzeti u obzir metodološka ograničenja, budući da je pokazano kako bioinformatičke analize temeljene na *short-read* sekvenciranju mogu propustiti detekciju gena poput *tet(O)* i *aadE* kada su prisutni u obliku duplikata ili homolognih/mosaik varijanti (194). Studije iz Italije i Njemačke dosljedno identificiraju *tet(O)* kao dominantni gen rezistencije na tetracikline (192,193).

Također, rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je mutacija A2075G u genu 23S rRNA ključni molekularni mehanizam rezistencije na makrolide, pri čemu je detektirana isključivo u *C. coli*, dok u *C. jejuni* nije zabilježena, što jasno ukazuje na izraženu vrstno-specifičnu distribuciju. Ovakav nalaz u potpunosti je u skladu s globalnim podacima, koji dosljedno pokazuju veću

sklonost *C. coli* razvoju i održavanju makrolidne rezistencije. Francuski longitudinalni nadzor dodatno potvrđuje dominantnu ulogu mutacija u 23S rDNK, prvenstveno A2075G, kao glavnog uzroka rezistencije, ali i ukazuje na pojavu novih mehanizama putem horizontalno prenosivih gena za sintezu metiltransferaza (poput *erm* gena), čija učestalost raste tijekom vremena (168). S druge strane, talijanske studije potvrđuju A2075G kao primarni mehanizam rezistencije, osobito u *C. coli* povezanom s multidrug-rezistentnim obrascem (163). Razlike između vrsta najvjerojatnije su posljedica bioloških ograničenja, budući da mutacije u 23S rRNA kod *C. jejuni* nose značajan *fitness* trošak koji smanjuje sposobnost kolonizacije i dugoročnog opstanka, dok takav negativan učinak nije uočen kod *C. coli* (100).

Što se tiče rezistencije na β -laktamske antibiotike, rezultati pokazuju univerzalnu prisutnost *bla_{OXA}* gena u svim analiziranim izolatima, uz izraženu alelnu raznolikost, uključujući varijante *bla_{OXA}-193*, *bla_{OXA}-450* i *bla_{OXA}-452*, s većom učestalošću pojedinih alela u *C. jejuni*. Ovakav obrazac u skladu je s velikim genomskim istraživanjima, koji potvrđuju da su geni rezistencije na β -laktame najčešći geni rezistencije u *Campylobacter* vrstama, pri čemu postoje značajne geografske razlike u distribuciji pojedinih alela (195). Međutim, prisutnost *bla_{OXA}* gena sama po sebi nije dostatna za fenotipsku rezistenciju, već ključnu ulogu ima razina njihove ekspresije, što potvrđuju studije koje pokazuju da inaktivacija *bla_{OXA}-61* gena dovodi do povećane osjetljivosti na peniciline, bez značajnog učinka na cefalosporine i karbapeneme (196). Klinički podaci, međutim, ostaju heterogeni. Dok jedna velika pedijatrijska studija pokazuje visoku osjetljivost na amoksisilin-klavulansku kiselinu, sugerirajući njegovu potencijalnu terapijsku učinkovitost, eksperimentalni i veterinarski podaci ukazuju na suprotan trend, gdje visoka razina ekspresije β -laktamaza dovodi do značajne rezistencije čak i na kombinacije s inhibitorima (197,198). Ovi rezultati sugeriraju da *Campylobacter* spp. posjeduje dinamičan i regulacijski ovisan mehanizam β -laktamske rezistencije, pri čemu početna osjetljivost može biti prolazna, uz mogućnost brze selekcije rezistentnih sojeva putem povećane ekspresije intrinzičnih *bla_{OXA}* gena.

Osim analiziranih gena antimikrobne rezistencije, u ovom istraživanju je ispitan genetski potencijal virulencije kampilobaktera koji uzrokuju gastroenteritise u ljudi. Dobiveni rezultati potvrđuju temeljne postavke iz literature prema kojima je flagelarni sustav *Campylobacter* vrsta organiziran kao kombinacija visoko konzervirane jezgre i varijabilnih pomoćnih gena uključenih u posttranslacijske modifikacije. U svim analiziranim izolatima *C. jejuni* zabilježena je potpuna očuvanost ključnih strukturnih i regulatornih gena pokretljivosti, što je u skladu s opisanim

kompleksnim i hijerarhijski reguliranim flagelarnim aparatom, dok istodobno varijabilnost dodatnih gena, osobito onih uključenih u glikozilaciju flagelina (*pse*, *maf* i *ptm* geni), odražava diverzificirajuću selekciju i adaptaciju na različite domaćine i okolišne uvjete (21,22,24,35,199,200). Posebno je značajno da su upravo geni povezani s biosintezom pseudaminske kiseline i njezinim derivatima najvarijabilniji dio genoma pokretljivosti, što je u skladu s njihovom ulogom u antigenoj varijaciji, izbjegavanju imunološkog odgovora i modulaciji virulencije (29).

S druge strane, reducirani skup konzerviranih gena u *C. coli* potvrđuje postojanje minimalnog funkcionalnog flagelarnog aparata, kako je prethodno opisano u genomskim analizama, pri čemu veći relativni udio varijabilnih gena, uključujući regulatorne elemente poput *flhG*, *fliA* i *fliY*, ukazuje na drugačiji evolucijski model temeljen na otvorenom pan-genomu i intenzivnijoj rekombinaciji (26,41,42,187). Ovakva organizacija sugerira da *C. jejuni* održava stabilniju i kompleksniju jezgru pokretljivosti, dok *C. coli* pokazuje veću genetsku fleksibilnost.

Dobiveni rezultati jasno potvrđuju temeljni koncept iz literature prema kojem su geni uključeni u imunomodulaciju organizirani kao kombinacija visoko konzervirane jezgre i varijabilnih pomoćnih lokusa. U svim analiziranim izolatima *C. jejuni* zabilježena je potpuna očuvanost najznačajnijih gena uključenih u biosintezu LOS-a i kapsularnog polisaharida, što je u skladu s njihovom esencijalnom ulogom u održavanju strukture bakterijske ovojnice i interakciji s imunološkim sustavom domaćina (70,73,85). Istodobno, značajna varijabilnost dodatnih gena, osobito onih unutar CPS lokusa (*kpsC*, *kpsF*, *kpsM*) te varijabilnih regija poput *cjl416c-cjl420c* i *cjl427c*, odražava diverzificirajuću selekciju usmjerenu na modifikaciju površinskih struktura i prilagodbu imunološkom pritisku (82,201). Uočen relativno stabilan obrazac unutar klonalne linije ST-353 sugerira postojanje dobro prilagođenog i evolucijski stabilnog imunomodulatornog profila, dok veća heterogenost ostalih izolata upućuje na kontinuiranu rekombinaciju i prilagodbu. Posebno je značajna detekcija gena *wlaN*, koji je u literaturi povezan sa sintezom sijaliliranog LOS-a i molekularnom mimikrijom gangliozida, čime se objašnjava potencijalna povezanost određenih sojeva s razvojem postinfektivnih autoimunih komplikacija poput GBS (65,80).

S druge strane, analiza gena adherencije, invazije i toksina pokazuje izrazitu konzerviranost među svim izolatima, neovisno o MLST tipu, što je u skladu s literaturom koja ove gene definira kao temeljni, gotovo univerzalno očuvan genom virulencije *C. jejuni* (15,26,98). Univerzalna

prisutnost gena za sintezu esencijalnih adhezina (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *flpA*) potvrđuje njihovu bitnu ulogu u inicijalnoj adherenciji i kolonizaciji epitelnih stanica, dok konzerviranost invazijskih gena (*ciaB*, *ciaC*) odražava očuvanu sposobnost intracelularne invazije posredovane flagelarnim sekrecijskim sustavom (49,53,56). Također, potpuna prisutnost *cdtABC* operona dodatno potvrđuje važnu ulogu citoletalnog distendirajućeg toksina u patogenezi, uključujući oštećenje DNK i modulaciju imunološkog odgovora (58,59). Ograničena varijabilnost dodatnih gena, poput *cstIII* koji je detektiran samo u pojedinim izolatima, u skladu je s njegovom poznatom ulogom u molekularnoj mimikriji i potencijalnom razvoju težih kliničkih manifestacija (63,68). Interesantno je za primjetiti da je isti analizirani soj (crocj7), koji pripada MLST 50, imao i *cstIII* i *wlaN* gen, dok literatura sugerira da se geni povezani s GBS-om (*wlaN*, *cgtB*, *cst-II*) obično ne prenose zajedno jer imaju djelomično preklapajuću funkciju (63). S druge strane, opisana je sposobnost rijetkih sojeva da proizvode heterogene LOS strukture jer *wlaN*, *cst* (*cst-II* ili *cst-III*) i *cj1144-45* mogu biti fazno varijabilni (*on/off* status) (202). MLST 50 pripada u 10 najčešćih tipova globalno, dok je genomska analiza ovog MLST tipa pokazala da *wlaN* nije ravnomjerno distribuiran te je pronađen u rijetkim iznimkama (203). Stoga, analizirani soj (crocc7), koji pripada MLST 50, s *wlaN* i *cst-III*, predstavlja rijedak genotip koji može nastati mozaičnom rekombinacijom LOS lokusa kod kojeg oba gena zajedno mogu pojačati neuropatogeni potencijal kroz proizvodnju sijaliziranih LOS struktura koje oponašaju gangliozide.

Na koncu, potrebno je istaknuti određena ograničenja ovog istraživanja. Sekvenciranje cijelog genoma provedeno je na reprezentativnom uzorku od 10% izolata odabranih na temelju fenotipske rezistencije na dva ili više antibiotika, što može rezultirati pristranosti prema rezistentnijim sojevima i podcjenjivanjem genetske raznolikosti u ukupnoj populaciji. Nadalje, analiza je ograničena na jednogodišnje razdoblje i jednu zdravstvenu ustanovu, što onemogućuje procjenu vremenskih trendova i geografske varijabilnosti unutar Hrvatske. Također, izostanak kliničkih podataka o težini bolesti i ishodima liječenja onemogućuje izravnu korelaciju genotipskih nalaza s kliničkom prezentacijom.

6. ZAKLJUČAK

Učestalost antimikrobne rezistencije *Campylobacter* spp. je visoka. Većina izolata *C. jejuni* (80%) i *C. coli* (69%) je rezistentna na ciprofloksacin, dok je 48% izolata *C. jejuni* te 62% izolata *C. coli* rezistentno na tetracikline. Rezistencija na makrolide je dokazana samo u *C. coli* (4%) čime je potvrđena hipoteza o obrascima antimikrobne otpornosti specifičnima za pojedinu vrstu.

Mutacija *gyrA* (T86I) prisutna je u svim sekvencioniranim *C. jejuni* izolatima te u 66,7% *C. coli* izolata. Dokazana je dominacija mozaik gena *tet(O/32/O)* za tetraciklinsku rezistenciju, što predstavlja regionalnu specifičnost koja odstupa od većine europskih studija gdje prevladava klasični *tet(O)*.

Mutacija 23S rRNA (A2075G) koja je temeljni mehanizam makrolidne rezistencije, prvi je put molekularno potvrđena u izolatu *kampilobaktera* iz Hrvatske.

Svi *C. jejuni* izolati posjeduju osnovne gene virulencije, dok *C. coli* ima manju količinu i bioraznolikost gena virulencije. Dokazana je prisutnost konzerviranih i jedinstvenih gena za adherenciju (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *flpA*), invaziju (*ciaB*, *ciaC*) i produkciju toksina (*cdtABC*), s prvim opisom GBS-povezanih gena *wlaN* i *cstIII* u Hrvatskoj.

Identificirani su klonalni kompleksi CC-353, CC-21, CC-206, CC-257, CC-464 (*C. jejuni*) i CC-828 (*C. coli*), s dominacijom CC-353 (ST-6461) čime je potvrđena hipoteza o pripadnosti najčešćim europskim i svjetskim klonalnim linijama (CC-353, CC-21, CC-828).

7. SAŽETAK

Uvod: *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* vodeći su uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u svijetu. Porast antimikrobne rezistencije, osobito na fluorokinolone i tetracikline, predstavlja rastući javnozdravstveni problem. Sekvenciranje cijelog genoma (WGS) omogućuje detaljnu analizu molekularnih mehanizama rezistencije i virulencije.

Ciljevi: Odrediti učestalost i molekularnu osnovu antimikrobne rezistencije te analizirati virulencijske gene i genetsku srodnost izolata *C. jejuni* i *C. coli* iz ljudskih uzoraka Kliničkog bolničkog centra Split.

Metode: Presječno istraživanje obuhvatilo je sve primoizolate *Campylobacter* spp. iz proljevastih stolica prikupljenih tijekom 2023. godine. Identifikacija vrste provedena je MALDI-TOF MS, a osjetljivost na antibiotike (ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin) disk-difuzijskom metodom prema EUCAST smjernicama. Reprezentativni uzorak (10%) analiziran je WGS metodom na platformi Illumina NextSeq 550. Provedena je MLST tipizacija, analiza gena rezistencije (CARD baza) te filogenetska analiza metodom maksimalne vjerojatnosti.

Rezultati: Od 172 izolata, 146 (85%) pripadalo je vrsti *C. jejuni*, a 26 (15%) vrsti *C. coli*. Rezistencija na ciprofloksacin zabilježena je u 80% izolata *C. jejuni* i 69% *C. coli*, na tetraciklin u 48% odnosno 62%, dok je rezistencija na eritromicin bila rijetka (0% *C. jejuni*; 4% *C. coli*). WGS analiza potvrdila je mutaciju *gyrA* (p.T86I) u 100% izolata *C. jejuni* i 66,7% *C. coli*. Mozaik gen tet(O/32/O) detektiran je u gotovo svim izolatima (91,7-100%), dok je mutacija 23S rRNA (A2075G) identificirana samo u jednom izolatu *C. coli*, što predstavlja prvu mutaciju rezistencije na eritromicin opisanu u Hrvatskoj u *Campylobacter* spp. MLST analiza pokazala je dominaciju CC-353 (ST-6461) kod *C. jejuni* te isključivu pripadnost CC-828 kod *C. coli*. Svi sekvencionirani izolati nosili su konzervirane gene adherencije (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *flpA*), invazije (*ciaB*, *ciaC*) i toksina (*cdtABC*), uz varijabilnu distribuciju gena imunomodulacije, uključujući prvi opis *wlaN* i *cstIII* gena u Hrvatskoj, direktno odgovornih za rizik razvoja GBS.

Zaključak: Istraživanje potvrđuje visoku učestalost fluorokinolonske i tetraciklinske rezistencije uz očuvanu osjetljivost na makrolide. Dominacija mozaik gena tet(O/32/O) predstavlja regionalnu specifičnost. Rezultati podupiru postojeće terapijske smjernice i naglašavaju potrebu kontinuiranog genomskog nadzora.

8. LAIČKI SAŽETAK

Kampilobakterioza je najčešća bakterijska crijevna infekcija u Europi i Hrvatskoj. Uzrokuju je bakterije *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*, koje se prenose konzumacijom nedovoljno termički obrađenog pilećeg mesa ili kontaminirane hrane. Bolest se očituje proljevom, bolovima u trbuhu i povišenom temperaturom. Većina slučajeva prolazi spontano, ali kod težih oblika ili osjetljivih bolesnika potrebna je antibiotska terapija.

Posljednjih desetljeća bilježi se zabrinjavajući porast otpornosti ovih bakterija na antibiotike, što otežava liječenje i predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem. Razumijevanje genetske osnove otpornosti ključno je za odabir učinkovite terapije i sprječavanje širenja rezistentnih sojeva.

U ovom istraživanju analizirani su svi izolati *Campylobacter* bakterija iz uzoraka stolice bolesnika s proljevom obrađenih u KBC Split tijekom 2023. godine. Prikupljeno je 172 izolata (85% *C. jejuni*, 15% *C. coli*). Dio uzoraka podvrgnut je sekvenciranju cijelog genoma, koje omogućuje otkrivanje točnih genetskih promjena.

Rezultati pokazuju da je većina izolata otporna na ciprofloksacin i tetraciklin, dok je otpornost na eritromicin rijetka. Genetska analiza potvrdila je da otpornost na ciprofloksacin uzrokuje specifična mutacija u genu *gyrA*, a otpornost na tetraciklin povezana je s posebnim regionalnim genom. Makrolidi, poput azitromicina, ostaju učinkoviti u liječenju, ali se i na njih pojavila genetska rezistencija.

Sve ispitane bakterije posjeduju gene virulencije potrebne za prijanjanje na crijevnu sluznicu, prodiranje u stanice i proizvodnju toksina, što potvrđuje njihov visok patogeni potencijal te dio testiranih bakterija ima rizične gene za razvoj autoimune bolesti Guillain-Barré sindroma.

Genetska tipizacija pokazala je da izolati iz Splita pripadaju skupinama koje cirkuliraju u ostatku Europe, što ukazuje na zajedničke izvore zaraze povezane s međunarodnim prometom hrane.

Zaključak: Azitromicin ostaje lijek izbora za liječenje kampilobakterioze, dok fluorokinoloni više nisu pouzdana opcija. Ovi podaci važni su za javnozdravstvene mjere i praćenje otpornih sojeva.

9. SUMMARY

Title: ANTIBIOTIC RESISTANCE AND VIRULENCE OF *CAMPYLOBACTER COLI* AND *CAMPYLOBACTER JEJUNI* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES AT THE UNIVERSITY HOSPITAL CENTRE SPLIT: A WHOLE GENOME SEQUENCING ANALYSIS

Introduction: *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* are leading causes of bacterial gastroenteritis worldwide. The increasing antimicrobial resistance, particularly to fluoroquinolones and tetracyclines, is becoming a growing public health issue. Whole-genome sequencing (WGS) enables detailed analysis of the molecular mechanisms of resistance and virulence.

Objectives: This study aimed to analyze the prevalence and molecular basis of antimicrobial resistance, along with virulence genes and genetic relatedness of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from human samples at the University Hospital Center Split.

Methods: This cross-sectional study included all primary *Campylobacter* spp. isolates from diarrheal stool samples collected during 2023. Species identification was performed using MALDI-TOF MS, and antibiotic susceptibility testing (ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin) was done using the disk diffusion method according to EUCAST guidelines. A representative sample (10%) was analyzed using WGS on the Illumina NextSeq 550 platform. MLST typing, resistance gene analysis (CARD database), and phylogenetic analysis using the maximum likelihood method were performed.

Results: Of 172 isolates, 146 (85%) were *C. jejuni* and 26 (15%) were *C. coli*. Resistance to ciprofloxacin was observed in 80% of *C. jejuni* and 69% of *C. coli* isolates, tetracycline resistance in 48% and 62%, respectively, while erythromycin resistance was rare (0% in *C. jejuni*; 4% in *C. coli*). WGS analysis confirmed the *gyrA* (p.T86I) mutation in 100% of *C. jejuni* and 66.7% of *C. coli* isolates. The mosaic *tet(O/32/O)* gene was detected in nearly all isolates (91.7-100%), while the 23S rRNA mutation (A2075G) was identified in only one *C. coli* isolate, representing the first reported erythromycin resistance mutation in *Campylobacter* spp. in Croatia. MLST analysis showed dominance of CC-353 (ST-6461) in *C. jejuni* and CC-828 in *C. coli*. All sequenced isolates carried conserved adhesion genes (*cadF*, *jlpA*, *pebA*, *porA*, *flpA*), invasion genes (*ciaB*, *ciaC*), and toxin genes (*cdtABC*), with variable distribution of immunomodulatory genes, including the first

description of *wlaN* and *cstIII* genes in Croatia, directly associated with the risk of Guillain-Barré syndrome (GBS).

Conclusion: The study shows a high prevalence of fluoroquinolone and tetracycline resistance, while susceptibility to macrolides remains intact. The dominance of the mosaic *tet(O/32/O)* gene represents a regional specificity. These findings support current treatment guidelines and highlight the need for continuous genomic surveillance.

10. PLAIN LANGUAGE SUMMARY

Campylobacteriosis is the most common bacterial intestinal infection in Europe and Croatia. It is caused by the bacteria *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, which are transmitted through the consumption of undercooked poultry or contaminated food. The disease presents with diarrhea, abdominal pain, and fever. Most cases resolve spontaneously, but in more severe cases or in vulnerable patients, antibiotic therapy is required.

In recent decades, there has been a concerning increase in antibiotic resistance among these bacteria, complicating treatment and representing a serious public health problem. Understanding the genetic basis of resistance is essential for selecting effective therapy and preventing the spread of resistant strains.

In this study, all *Campylobacter* isolates from stool samples of patients with diarrhea processed at the University Hospital Centre Split during 2023 were analyzed. A total of 172 isolates were collected (85% *C. jejuni*, 15% *C. coli*). A subset of samples was subjected to whole genome sequencing, which enables the identification of specific genetic changes.

The results show that most isolates are resistant to ciprofloxacin and tetracycline, while resistance to erythromycin is rare. Genetic analysis confirmed that resistance to ciprofloxacin is caused by a specific mutation in the *gyrA* gene, while tetracycline resistance is associated with a specific regional gene. Macrolides, such as azithromycin, remain effective in treatment; however, genetic resistance to this class has also emerged.

All examined bacteria possess virulence genes required for adhesion to the intestinal mucosa, invasion of host cells, and toxin production, confirming their high pathogenic potential. Additionally, some isolates harbor genes associated with an increased risk of developing the autoimmune Guillain–Barré syndrome.

Genetic typing showed that isolates from Split belong to lineages circulating across the rest of Europe, indicating common sources of infection linked to the international food supply.

Conclusion: Azithromycin remains the treatment of choice for campylobacteriosis, while fluoroquinolones are no longer a reliable option. These findings are important for guiding public health measures and monitoring the spread of resistant strains.

11. LITERATURA

Popis literature:

1. Wu R, Payne M, Zhang L, Lan R. Uncovering the boundaries of *Campylobacter* species through large-scale phylogenetic and nucleotide identity analyses. *mSystems*. 2024;9(4):e0121823. doi:10.1128/msystems.01218-23 PubMed PMID: 38530055; PubMed Central PMCID: PMC11019964.
2. On SLW, Miller WG, Houf K, Fox JG, Vandamme P. Minimal standards for describing new species belonging to the families *Campylobacteraceae* and *Helicobacteraceae*: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* spp. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67(12):5296–311. doi:10.1099/ijsem.0.002255 PubMed PMID: 29034857; PubMed Central PMCID: PMC5845751.
3. Zhou Y, Bu L, Guo M, Zhou C, Wang Y, Chen L, et al. Comprehensive genomic characterization of *campylobacter* genus reveals some underlying mechanisms for its genomic diversification. *PLoS One*. 2013;8(8):e70241. doi:10.1371/journal.pone.0070241 PubMed PMID: 23940551; PubMed Central PMCID: PMC3734277.
4. Frirdich E, Biboy J, Pryjma M, Lee J, Huynh S, Parker CT, et al. The *Campylobacter jejuni* helical to coccoid transition involves changes to peptidoglycan and the ability to elicit an immune response. *Mol Microbiol*. 2019;112(1):280–301. doi:10.1111/mmi.14269 PubMed PMID: 31070821; PubMed Central PMCID: PMC6767375.
5. Ng LK, Sherburne R, Taylor DE, Stiles ME. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J Bacteriol*. 1985;164(1):338–43. doi:10.1128/jb.164.1.338-343.1985 PubMed PMID: 4044525; PubMed Central PMCID: PMC214249.
6. Esson D, Mather AE, Scanlan E, Gupta S, de Vries SPW, Bailey D, et al. Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci Rep*. 2016;6:38303. doi:10.1038/srep38303 PubMed PMID: 27910897; PubMed Central PMCID: PMC5133587.
7. Stahl M, Frirdich E, Vermeulen J, Badayeva Y, Li X, Vallance BA, et al. The Helical Shape of *Campylobacter jejuni* Promotes In Vivo Pathogenesis by Aiding Transit through Intestinal Mucus and Colonization of Crypts. *Infect Immun*. 2016;84(12):3399–407. doi:10.1128/IAI.00751-16 PubMed PMID: 27647867; PubMed Central PMCID: PMC5116718.
8. Macé S, Haddad N, Zagorec M, Tresse O. Influence of measurement and control of microaerobic gaseous atmospheres in methods for *Campylobacter* growth studies. *Food Microbiol*. 2015;52:169–76. doi:10.1016/j.fm.2015.07.014 PubMed PMID: 26338132.
9. Barata AR, Saavedra MJ, Almeida G. From Basics to Breakthroughs: A Review on the Evolution of *Campylobacter* spp. *Culture Media. Microorganisms*. 2026;14(2):498. doi:10.3390/microorganisms14020498 PubMed PMID: 41753784; PubMed Central PMCID: PMC12943296.

10. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, van Vliet AHM. Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(7):2122–8. doi:10.1128/AEM.01878-09 PubMed PMID: 20139307; PubMed Central PMCID: PMC2849235.
11. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 2000;403(6770):665–8. doi:10.1038/35001088 PubMed PMID: 10688204.
12. O'Loughlin JL, Eucker TP, Chavez JD, Samuelson DR, Neal-McKinney J, Gourley CR, et al. Analysis of the *Campylobacter jejuni* genome by SMRT DNA sequencing identifies restriction-modification motifs. *PLoS One.* 2015;10(2):e0118533. doi:10.1371/journal.pone.0118533 PubMed PMID: 25695747; PubMed Central PMCID: PMC4335053.
13. Lango-Scholey L, Aidley J, Woodacre A, Jones MA, Bayliss CD. High Throughput Method for Analysis of Repeat Number for 28 Phase Variable Loci of *Campylobacter jejuni* Strain NCTC11168. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159634. doi:10.1371/journal.pone.0159634 PubMed PMID: 27466808; PubMed Central PMCID: PMC4965091.
14. Bayliss CD, Bidmos FA, Anjum A, Manchev VT, Richards RL, Grossier JP, et al. Phase variable genes of *Campylobacter jejuni* exhibit high mutation rates and specific mutational patterns but mutability is not the major determinant of population structure during host colonization. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):5876–89. doi:10.1093/nar/gks246 PubMed PMID: 22434884; PubMed Central PMCID: PMC3401435.
15. Kemper L, Hensel A. *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023;107(9):2725–54. doi:10.1007/s00253-023-12456-w PubMed PMID: 36941439; PubMed Central PMCID: PMC10027602.
16. Lopes GV, Ramires T, Kleinubing NR, Scheik LK, Fiorentini ÂM, Padilha da Silva W. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog.* 2021;161(Pt A):105265. doi:10.1016/j.micpath.2021.105265 PubMed PMID: 34699927.
17. Korolik V. The role of chemotaxis during *Campylobacter jejuni* colonisation and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019;47:32–7. doi:10.1016/j.mib.2018.11.001 PubMed PMID: 30476739.
18. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 2007;15(10):456–61. doi:10.1016/j.tim.2007.09.006 PubMed PMID: 17920274.
19. Yamamoto T, Takano T, Higuchi W, Hung WC, Reva I, Yabe S, et al. Unique features of the motility and structures in the flagellate polar region of *Campylobacter jejuni* and other species: an electron microscopic study. *Microbiol Immunol.* 2013;57(2):83–90. doi:10.1111/1348-0421.12013 PubMed PMID: 23252968.

20. Cohen EJ, Nakane D, Kabata Y, Hendrixson DR, Nishizaka T, Beeby M. *Campylobacter jejuni* motility integrates specialized cell shape, flagellar filament, and motor, to coordinate action of its opposed flagella. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):e1008620. doi:10.1371/journal.ppat.1008620 PubMed PMID: 32614919; PubMed Central PMCID: PMC7332011.
21. Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A. Flagellin glycosylation with pseudaminic acid in *Campylobacter* and *Helicobacter*: prospects for development of novel therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(7):1163–78. doi:10.1007/s00018-017-2696-5 PubMed PMID: 29080090; PubMed Central PMCID: PMC11105201.
22. König F, Svensson SL, Sharma CM. Interplay of two small RNAs fine-tunes hierarchical flagella gene expression in *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun.* 2024;15(1):5240. doi:10.1038/s41467-024-48986-8 PubMed PMID: 38897989; PubMed Central PMCID: PMC11187230.
23. Fernando U, Biswas D, Allan B, Willson P, Potter AA. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol.* 2007;118(2):194–200. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.038 PubMed PMID: 17761334.
24. Hendrixson DR, DiRita VJ. Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol Microbiol.* 2003;50(2):687–702. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03731.x PubMed PMID: 14617189.
25. Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:389–410. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102908 PubMed PMID: 21939377; PubMed Central PMCID: PMC6238628.
26. Zhong C, Qu B, Hu G, Ning K. Pan-Genome Analysis of *Campylobacter*: Insights on the Genomic Diversity and Virulence Profile. *Microbiol Spectr.* 2022;10(5):e0102922. doi:10.1128/spectrum.01029-22 PubMed PMID: 36069574; PubMed Central PMCID: PMC9602946.
27. Reuter M, Ultee E, Toseafa Y, Tan A, van Vliet AHM. Inactivation of the core *cheVAWY* chemotaxis genes disrupts chemotactic motility and organised biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett.* 2020;367(24):fnaa198. doi:10.1093/femsle/fnaa198 PubMed PMID: 33264398.
28. Logan SM, Kelly JF, Thibault P, Ewing CP, Guerry P. Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol.* 2002;46(2):587–97. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03185.x PubMed PMID: 12406231.
29. Goon S, Kelly JF, Logan SM, Ewing CP, Guerry P. Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the *Cj1293* gene. *Mol*

- Microbiol. 2003;50(2):659–71. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03725.x PubMed PMID: 14617187.
30. Alm RA, Guerry P, Trust TJ. Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. J Bacteriol. 1993;175(10):3051–7. doi:10.1128/jb.175.10.3051-3057.1993 PubMed PMID: 8098328; PubMed Central PMCID: PMC204625.
 31. Guerry P, Alm RA, Power ME, Logan SM, Trust TJ. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. J Bacteriol. 1991;173(15):4757–64. doi:10.1128/jb.173.15.4757-4764.1991 PubMed PMID: 1856171; PubMed Central PMCID: PMC208154.
 32. Inoue T, Barker CS, Matsunami H, Aizawa SI, Samatey FA. The FlaG regulator is involved in length control of the polar flagella of *Campylobacter jejuni*. Microbiology (Reading). 2018;164(5):740–50. doi:10.1099/mic.0.000648 PubMed PMID: 29595414.
 33. Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, et al. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. Mol Microbiol. 2004;53(2):541–53. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04175.x PubMed PMID: 15228533.
 34. McNally DJ, Hui JPM, Aubry AJ, Mui KKK, Guerry P, Brisson JR, et al. Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81-176 using a focused metabolomics approach. J Biol Chem. 2006;281(27):18489–98. doi:10.1074/jbc.M603777200 PubMed PMID: 16684771.
 35. Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Wren BW. A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. Microbiology (Reading). 2002;148(Pt 2):473–80. doi:10.1099/00221287-148-2-473 PubMed PMID: 11832511.
 36. van Alphen LB, Wuhler M, Bleumink-Pluym NMC, Hensbergen PJ, Deelder AM, van Putten JPM. A functional *Campylobacter jejuni* maf4 gene results in novel glycoforms on flagellin and altered autoagglutination behaviour. Microbiology (Reading). 2008;154(Pt 11):3385–97. doi:10.1099/mic.0.2008/019919-0 PubMed PMID: 18957592.
 37. Guerry P, Doig P, Alm RA, Burr DH, Kinsella N, Trust TJ. Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin. Mol Microbiol. 1996;19(2):369–78. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.369895.x PubMed PMID: 8825781.
 38. Cullen TW, O'Brien JP, Hendrixson DR, Giles DK, Hobb RI, Thompson SA, et al. EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence. Infect Immun. 2013;81(2):430–40. doi:10.1128/IAI.01046-12 PubMed PMID: 23184526; PubMed Central PMCID: PMC3553815.
 39. McNally DJ, Aubry AJ, Hui JPM, Khieu NH, Whitfield D, Ewing CP, et al. Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives

- as novel flagellar glycans. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14463–75. doi:10.1074/jbc.M611027200 PubMed PMID: 17371878.
40. Koolman L, Whyte P, Burgess C, Bolton D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(5):424–32. doi:10.1089/fpd.2014.1883 PubMed PMID: 25826607.
 41. Sheppard SK, Maiden MCJ. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(8):a018119. doi:10.1101/cshperspect.a018119 PubMed PMID: 26101080; PubMed Central PMCID: PMC4526750.
 42. Méric G, Yahara K, Mageiros L, Pascoe B, Maiden MCJ, Jolley KA, et al. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One*. 2014;9(3):e92798. doi:10.1371/journal.pone.0092798 PubMed PMID: 24676150; PubMed Central PMCID: PMC3968026.
 43. Guerry P, Ewing CP, Schirm M, Lorenzo M, Kelly J, Pattarini D, et al. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol*. 2006;60(2):299–311. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05100.x PubMed PMID: 16573682; PubMed Central PMCID: PMC1424674.
 44. Gulbranson CJ, Ribardo DA, Balaban M, Knauer C, Bange G, Hendrixson DR. FlhG employs diverse intrinsic domains and influences FlhF GTPase activity to numerically regulate polar flagellar biogenesis in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*. 2016;99(2):291–306. doi:10.1111/mmi.13231 PubMed PMID: 26411371; PubMed Central PMCID: PMC4821507.
 45. Truccollo B, Whyte P, Burgess C, Bolton D. Genetic characterisation of a subset of *Campylobacter jejuni* isolates from clinical and poultry sources in Ireland. *PLoS One*. 2021;16(3):e0246843. doi:10.1371/journal.pone.0246843 PubMed PMID: 33690659; PubMed Central PMCID: PMC7943001.
 46. de Oliveira MG, Rizzi C, Galli V, Lopes GV, Haubert L, Dellagostin OA, et al. Presence of genes associated with adhesion, invasion, and toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates and effect of temperature on their expression. *Can J Microbiol*. 2019;65(4):253–60. doi:10.1139/cjm-2018-0539 PubMed PMID: 30532987.
 47. Panzenhagen P, Portes AB, Dos Santos AMP, Duque S da S, Conte Junior CA. The Distribution of *Campylobacter jejuni* Virulence Genes in Genomes Worldwide Derived from the NCBI Pathogen Detection Database. *Genes (Basel)*. 2021;12(10):1538. doi:10.3390/genes12101538 PubMed PMID: 34680933; PubMed Central PMCID: PMC8535712.
 48. Wysok B, Wojtacka J, Kivistö R. Pathogenicity of *Campylobacter* strains of poultry and human origin from Poland. *Int J Food Microbiol*. 2020;334:108830. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108830 PubMed PMID: 32841810.

49. Konkel ME, Talukdar PK, Negretti NM, Klappenbach CM. Taking Control: *Campylobacter jejuni* Binding to Fibronectin Sets the Stage for Cellular Adherence and Invasion. *Front Microbiol.* 2020;11:564. doi:10.3389/fmicb.2020.00564 PubMed PMID: 32328046; PubMed Central PMCID: PMC7161372.
50. Oh HB, Yoon SI. Crystal structures of *Campylobacter jejuni* CadF reveal a potential role for the arginine residue R268 in peptidoglycan recognition and pocket formation. *Sci Rep.* 2025;15(1):36733. doi:10.1038/s41598-025-20604-7 PubMed PMID: 41120626; PubMed Central PMCID: PMC12540904.
51. Eucker TP, Konkel ME. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol.* 2012;14(2):226–38. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01714.x PubMed PMID: 21999233; PubMed Central PMCID: PMC3262099.
52. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology (Reading).* 2003;149(Pt 1):153–65. doi:10.1099/mic.0.25820-0 PubMed PMID: 12576589.
53. Flanagan RC, Neal-McKinney JM, Dhillon AS, Miller WG, Konkel ME. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infect Immun.* 2009;77(6):2399–407. doi:10.1128/IAI.01266-08 PubMed PMID: 19349427; PubMed Central PMCID: PMC2687328.
54. Ohadi E, Bakhshi B, Talebi M, Irajian G. A genomic concept in cellular interaction of clinical *Campylobacter* spp. with human epithelial colorectal adenocarcinoma cells. *Infect Genet Evol.* 2020;86:104596. doi:10.1016/j.meegid.2020.104596 PubMed PMID: 33075509.
55. Ferrara LGM, Wallat GD, Moynié L, Dhanasekar NN, Aliouane S, Acosta-Gutiérrez S, et al. MOMP from *Campylobacter jejuni* Is a Trimer of 18-Stranded β -Barrel Monomers with a Ca^{2+} Ion Bound at the Constriction Zone. *J Mol Biol.* 2016;428(22):4528–43. doi:10.1016/j.jmb.2016.09.021 PubMed PMID: 27693650; PubMed Central PMCID: PMC5090048.
56. Neal-McKinney JM, Konkel ME. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:31. doi:10.3389/fcimb.2012.00031 PubMed PMID: 22919623; PubMed Central PMCID: PMC3417660.
57. Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1999;32(4):691–701. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01376.x PubMed PMID: 10361274.

58. Lai CK, Chen YA, Lin CJ, Lin HJ, Kao MC, Huang MZ, et al. Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:9. doi:10.3389/fcimb.2016.00009 PubMed PMID: 26904508; PubMed Central PMCID: PMC4746238.
59. Lara-Tejero M, Galán JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun.* 2001;69(7):4358–65. doi:10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001 PubMed PMID: 11401974; PubMed Central PMCID: PMC98507.
60. Kailoo S, Shreya null, Kumar Y. Cytolethal distending toxin: from genotoxin to a potential biomarker and anti-tumor target. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(9):150. doi:10.1007/s11274-021-03117-z PubMed PMID: 34379213.
61. Dixon SD, Huynh MM, Tamilselvam B, Spiegelman LM, Son SB, Eshraghi A, et al. Distinct Roles for CdtA and CdtC during Intoxication by Cytolethal Distending Toxins. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143977. doi:10.1371/journal.pone.0143977 PubMed PMID: 26618479; PubMed Central PMCID: PMC4664275.
62. Smith JL, Bayles DO. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2006;32(4):227–48. doi:10.1080/10408410601023557 PubMed PMID: 17123907.
63. Nayeem MAJ, Hayat S, Asad A, Mostafa MG, Faruque SN, Begum R, et al. Genomic variability of lipooligosaccharide biosynthesis locus and sequence type among *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré syndrome. *Microbiol Spectr.* 2025;13(8):e0006225. doi:10.1128/spectrum.00062-25 PubMed PMID: 40631742; PubMed Central PMCID: PMC12323628.
64. Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N. *Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2005;65(9):1376–81. doi:10.1212/01.wnl.0000176914.70893.14 PubMed PMID: 16162859.
65. Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, et al. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect Dis.* 2006;193(4):547–55. doi:10.1086/499969 PubMed PMID: 16425134.
66. Yuki N. *Campylobacter* sialyltransferase gene polymorphism directs clinical features of Guillain-Barré syndrome. *J Neurochem.* 2007;103 Suppl 1:150–8. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04707.x PubMed PMID: 17986150.
67. Zautner AE, Ohk C, Tareen AM, Lugert R, Gross U. Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. *BMC Microbiol.* 2012;12:171. doi:10.1186/1471-2180-12-171 PubMed PMID: 22873291; PubMed Central PMCID: PMC3487957.

68. Nachamkin I, Liu J, Li M, Ung H, Moran AP, Prendergast MM, et al. *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré syndrome preferentially expresses a GD(1a)-like epitope. *Infect Immun*. 2002;70(9):5299–303. doi:10.1128/IAI.70.9.5299-5303.2002 PubMed PMID: 12183587; PubMed Central PMCID: PMC128258.
69. Kreling V, Falcone FH, Kehrenberg C, Hensel A. *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(24):10409–36. doi:10.1007/s00253-020-10974-5 PubMed PMID: 33185702; PubMed Central PMCID: PMC7662028.
70. Huizinga R, van Rijs W, Bajramovic JJ, Kuijf ML, Laman JD, Samsom JN, et al. Sialylation of *Campylobacter jejuni* endotoxin promotes dendritic cell-mediated B cell responses through CD14-dependent production of IFN- β and TNF- α . *J Immunol*. 2013;191(11):5636–45. doi:10.4049/jimmunol.1301536 PubMed PMID: 24166974.
71. Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM. Novel Clinical *Campylobacter jejuni* Infection Models Based on Sensitization of Mice to Lipooligosaccharide, a Major Bacterial Factor Triggering Innate Immune Responses in Human *Campylobacteriosis*. *Microorganisms*. 2020;8(4):482. doi:10.3390/microorganisms8040482 PubMed PMID: 32231139; PubMed Central PMCID: PMC7232424.
72. Richards VP, Lefébure T, Pavinski Bitar PD, Stanhope MJ. Comparative characterization of the virulence gene clusters (lipooligosaccharide [LOS] and capsular polysaccharide [CPS]) for *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and related *Campylobacter* species. *Infect Genet Evol*. 2013;14:200–13. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.010 PubMed PMID: 23279811; PubMed Central PMCID: PMC3622452.
73. Kanipes MI, Tan X, Akelaitis A, Li J, Rockabrand D, Guerry P, et al. Genetic analysis of lipooligosaccharide core biosynthesis in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol*. 2008;190(5):1568–74. doi:10.1128/JB.01696-07 PubMed PMID: 18156268; PubMed Central PMCID: PMC2258656.
74. Zhou P, She Y, Dong N, Li P, He H, Borio A, et al. Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. *Nature*. 2018;561(7721):122–6. doi:10.1038/s41586-018-0433-3 PubMed PMID: 30111836.
75. Cui J, Duizer C, Bouwman LI, van Rooijen KS, Voogdt CGP, van Putten JPM, et al. The ALPK1 pathway drives the inflammatory response to *Campylobacter jejuni* in human intestinal epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2021;17(8):e1009787. doi:10.1371/journal.ppat.1009787 PubMed PMID: 34339468; PubMed Central PMCID: PMC8360561.
76. Gilbert M, Karwaski MF, Bernatchez S, Young NM, Taboada E, Michniewicz J, et al. The genetic bases for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. *J Biol Chem*. 2002;277(1):327–37. doi:10.1074/jbc.M108452200 PubMed PMID: 11689567.

77. Iwata T, Chiku K, Amano KI, Kusumoto M, Ohnishi-Kameyama M, Ono H, et al. Effects of lipooligosaccharide inner core truncation on bile resistance and chick colonization by *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 2013;8(2):e56900. doi:10.1371/journal.pone.0056900 PubMed PMID: 23437265; PubMed Central PMCID: PMC3577681.
78. Hameed A, Ketley JM, Woodacre A, Machado LR, Marsden GL. Molecular and in silico typing of the lipooligosaccharide biosynthesis gene cluster in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. PLoS One. 2022;17(3):e0265585. doi:10.1371/journal.pone.0265585 PubMed PMID: 35358234; PubMed Central PMCID: PMC8970381.
79. Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome. Lancet. 2021;397(10280):1214–28. doi:10.1016/S0140-6736(21)00517-1 PubMed PMID: 33647239.
80. Guirado P, Paytubi S, Miró E, Iglesias-Torrens Y, Navarro F, Cerdà-Cuellar M, et al. Differential Distribution of the *wlaN* and *cgtB* Genes, Associated with Guillain-Barré Syndrome, in *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Broiler Chickens, and Wild Birds. Microorganisms. 2020;8(3):325. doi:10.3390/microorganisms8030325 PubMed PMID: 32110976; PubMed Central PMCID: PMC7142995.
81. Karlyshev AV, Champion OL, Churcher C, Brisson JR, Jarrell HC, Gilbert M, et al. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. Mol Microbiol. 2005;55(1):90–103. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04374.x PubMed PMID: 15612919.
82. Guerry P, Poly F, Riddle M, Maue AC, Chen YH, Monteiro MA. *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:7. doi:10.3389/fcimb.2012.00007 PubMed PMID: 22919599; PubMed Central PMCID: PMC3417588.
83. Kuklewicz J, Zimmer J. Molecular insights into capsular polysaccharide secretion. Nature. 2024;628(8009):901–9. doi:10.1038/s41586-024-07248-9 PubMed PMID: 38570679; PubMed Central PMCID: PMC11041684.
84. Willis LM, Whitfield C. KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(51):20753–8. doi:10.1073/pnas.1312637110 PubMed PMID: 24302764; PubMed Central PMCID: PMC3870700.
85. Maue AC, Mohawk KL, Giles DK, Poly F, Ewing CP, Jiao Y, et al. The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. Infect Immun. 2013;81(3):665–72. doi:10.1128/IAI.01008-12 PubMed PMID: 23250948; PubMed Central PMCID: PMC3584872.
86. Xiang DF, Narindoshvili T, Raushel FM. Identification and Functional Characterization of the Polymerizing Glycosyltransferase Required for the Transfer of d-Ribose to the d-GalNAc Moiety of the Capsular Polysaccharide of *Campylobacter jejuni*. Biochemistry.

- 2025;64(10):2226–36. doi:10.1021/acs.biochem.5c00052 PubMed PMID: 40310874; PubMed Central PMCID: PMC12096443.
87. Xiang DF, Riegert AS, Narindoshvili T, Raushel FM. Identification of the Polymerizing Glycosyltransferase Required for the Addition of d-Glucuronic Acid to the Capsular Polysaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry*. 2025;64(3):581–90. doi:10.1021/acs.biochem.4c00703 PubMed PMID: 39854648; PubMed Central PMCID: PMC11800397.
 88. Xiang DF, Narindoshvili T, Raushel FM. Functional Characterization of Two Polymerizing Glycosyltransferases for the Addition of N-Acetyl-d-galactosamine to the Capsular Polysaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry*. 2025;64(3):591–9. doi:10.1021/acs.biochem.4c00704 PubMed PMID: 39854681; PubMed Central PMCID: PMC11800379.
 89. Stephenson HN, John CM, Naz N, Gundogdu O, Dorrell N, Wren BW, et al. *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide sialylation, phosphorylation, and amide/ester linkage modifications fine-tune human Toll-like receptor 4 activation. *J Biol Chem*. 2013;288(27):19661–72. doi:10.1074/jbc.M113.468298 PubMed PMID: 23629657; PubMed Central PMCID: PMC3707672.
 90. Phongsisay V. The immunobiology of *Campylobacter jejuni*: Innate immunity and autoimmune diseases. *Immunobiology*. 2016;221(4):535–43. doi:10.1016/j.imbio.2015.12.005 PubMed PMID: 26709064.
 91. Bouwman LI, de Zoete MR, Bleumink-Pluym NMC, Flavell RA, van Putten JPM. Inflammasome activation by *Campylobacter jejuni*. *J Immunol*. 2014;193(9):4548–57. doi:10.4049/jimmunol.1400648 PubMed PMID: 25267974; PubMed Central PMCID: PMC4201959.
 92. Zhang L, Levy K, Trueba G, Cevallos W, Trostle J, Foxman B, et al. Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(11):6733–40. doi:10.1128/AAC.01094-15 PubMed PMID: 26282415; PubMed Central PMCID: PMC4604409.
 93. Vanacker M, Lenuzza N, Rasigade JP. The fitness cost of horizontally transferred and mutational antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2023;14:1186920. doi:10.3389/fmicb.2023.1186920 PubMed PMID: 37455716; PubMed Central PMCID: PMC10348881.
 94. Stickland HG, Davenport PW, Lilley KS, Griffin JL, Welch M. Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res*. 2010;9(6):2957–67. doi:10.1021/pr9011415 PubMed PMID: 20373734.
 95. Johnsen PJ, Townsend JP, Bøhn T, Simonsen GS, Sundsfjord A, Nielsen KM. Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(6):357–64. doi:10.1016/S1473-3099(09)70105-7 PubMed PMID: 19467475.

96. Maisnier-Patin S, Berg OG, Liljas L, Andersson DI. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 2002;46(2):355–66. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03173.x PubMed PMID: 12406214.
97. Foucault ML, Depardieu F, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Inducible expression eliminates the fitness cost of vancomycin resistance in enterococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16964–9. doi:10.1073/pnas.1006855107 PubMed PMID: 20833818; PubMed Central PMCID: PMC2947908.
98. Wysok B, Wojtacka J, Hänninen ML, Kivistö R. Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Markers in *Campylobacter* Strains From Diarrheic and Non-diarrheic Humans in Poland. *Front Microbiol*. 2020;11:1799. doi:10.3389/fmicb.2020.01799 PubMed PMID: 32849410; PubMed Central PMCID: PMC7417443.
99. Lapiere L, Gatica MA, Riquelme V, Vergara C, Yañez JM, San Martín B, et al. 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*. 2016;22(5):432–44. doi:10.1089/mdr.2015.0055 PubMed PMID: 26779841.
100. Bolinger H, Kathariou S. The Current State of Macrolide Resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(12):e00416-17. doi:10.1128/AEM.00416-17 PubMed PMID: 28411226; PubMed Central PMCID: PMC5452823.
101. Whelan MVX, Ardill L, Koide K, Nakajima C, Suzuki Y, Simpson JC, et al. Acquisition of fluoroquinolone resistance leads to increased biofilm formation and pathogenicity in *Campylobacter jejuni*. *Sci Rep*. 2019;9(1):18216. doi:10.1038/s41598-019-54620-1 PubMed PMID: 31796849; PubMed Central PMCID: PMC6890674.
102. Zeitouni S, Guyard-Nicodème M, Kempf I. Comparison of adhesion, invasion, motility, and toxin production of *Campylobacter* strains and their resistant mutants. *Microb Drug Resist*. 2013;19(2):130–7. doi:10.1089/mdr.2012.0132 PubMed PMID: 23095083.
103. Ross AGP, Olds GR, Cripps AW, Farrar JJ, McManus DP. Enteropathogens and Chronic Illness in Returning Travelers. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(19):1817–25. doi:10.1056/NEJMr1207777
104. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):687–720. doi:10.1128/CMR.00006-15 PubMed PMID: 26062576; PubMed Central PMCID: PMC4462680.
105. Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*. 2001;32(8):1201–6. doi:10.1086/319760 PubMed PMID: 11283810.
106. Emberland KE, Wensaas KA, Litleskare S, Iversen A, Hanevik K, Langeland N, et al. Clinical features of gastroenteritis during a large waterborne *Campylobacter* outbreak in

- Askøy, Norway. *Infection*. 2022;50(2):343–54. doi:10.1007/s15010-021-01652-3 PubMed PMID: 34215942; PubMed Central PMCID: PMC8942940.
107. Mortensen N, Jonasson SA, Lavesson IV, Emberland KE, Litleskare S, Wensaas KA, et al. Characteristics of hospitalized patients during a large waterborne outbreak of *Campylobacter jejuni* in Norway. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248464. doi:10.1371/journal.pone.0248464 PubMed PMID: 33755697; PubMed Central PMCID: PMC7987138.
 108. Wanja DW, Mbindyo CM, Mbuthia PG, Bebola LC, Aboge GO. Molecular Detection of Virulence-Associated Markers in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Isolates From Water, Cattle, and Chicken Faecal Samples From Kajiado County, Kenya. *Biomed Res Int*. 2024;2024:4631351. doi:10.1155/2024/4631351 PubMed PMID: 39166218; PubMed Central PMCID: PMC11335418.
 109. Rossler E, Olivero C, Soto LP, Frizzo LS, Zimmermann J, Rosmini MR, et al. Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain. *Int J Food Microbiol*. 2020;326:108641. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108641 PubMed PMID: 32371295.
 110. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med*. 2015;12(12):e1001921. doi:10.1371/journal.pmed.1001921 PubMed PMID: 26633831; PubMed Central PMCID: PMC4668831.
 111. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*. 2015;12(12):e1001923. doi:10.1371/journal.pmed.1001923 PubMed PMID: 26633896; PubMed Central PMCID: PMC4668832.
 112. Schorling E, Lick S, Rosner B, Knorr S, Wilking H, Steinberg P, et al. The disease and economic burden of notified and underestimated *Campylobacter* enteritis cases and associated sequelae in Germany. *PLoS One*. 2025;20(9):e0331298. doi:10.1371/journal.pone.0331298 PubMed PMID: 40906672; PubMed Central PMCID: PMC12410716.
 113. Mangen MJJ, Bouwknegt M, Friesema IHM, Haagsma JA, Kortbeek LM, Tariq L, et al. Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *Int J Food Microbiol*. 2015;196:84–93. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.022 PubMed PMID: 25528537.
 114. Tam CC, O'Brien SJ. Economic Cost of *Campylobacter*, Norovirus and Rotavirus Disease in the United Kingdom. *PLoS One*. 2016;11(2):e0138526. doi:10.1371/journal.pone.0138526 PubMed PMID: 26828435; PubMed Central PMCID: PMC4735491.

115. Hoffmann S, White AE, McQueen RB, Ahn JW, Gunn-Sandell LB, Scallan Walter EJ. Economic Burden of Foodborne Illnesses Acquired in the United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2025;22(1):4–14. doi:10.1089/fpd.2023.0157 PubMed PMID: 39354849.
116. Lake IR, Colón-González FJ, Takkinen J, Rossi M, Sudre B, Dias JG, et al. Exploring *Campylobacter* seasonality across Europe using The European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016. *Euro Surveill.* 2019;24(13):1800028. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028 PubMed PMID: 30940318; PubMed Central PMCID: PMC6446507.
117. Tedersoo T, Roasto M, Mäesaar M, Kisand V, Ivanova M, Meremäe K. The prevalence, counts, and MLST genotypes of *Campylobacter* in poultry meat and genomic comparison with clinical isolates. *Poult Sci.* 2022;101(4):101703. doi:10.1016/j.psj.2022.101703 PubMed PMID: 35124442; PubMed Central PMCID: PMC8819112.
118. Havelaar AH, Ivarsson S, Löfdahl M, Nauta MJ. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol Infect.* 2013;141(2):293–302. doi:10.1017/S0950268812000568 PubMed PMID: 22717051; PubMed Central PMCID: PMC9152072.
119. Liu F, Lee SA, Xue J, Riordan SM, Zhang L. Global epidemiology of campylobacteriosis and the impact of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:979055. doi:10.3389/fcimb.2022.979055 PubMed PMID: 36519137; PubMed Central PMCID: PMC9742372.
120. Bless PJ, Schmutz C, Mäusezahl D. The recurrent campylobacteriosis epidemic over Christmas and New Year in European countries, 2006-2014. *BMC Res Notes.* 2017;10(1):266. doi:10.1186/s13104-017-2587-8 PubMed PMID: 28693589; PubMed Central PMCID: PMC5504853.
121. Hansson I, Sandberg M, Habib I, Lowman R, Engvall EO. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65 Suppl 1:30–48. doi:10.1111/tbed.12870 PubMed PMID: 29663680.
122. Urdaneta S, Lorca-Oró C, Dolz R, López-Soria S, Cerdà-Cuéllar M. In a warm climate, ventilation, indoor temperature and outdoor relative humidity have significant effects on *Campylobacter* spp. colonization in chicken broiler farms which can occur in only 2 days. *Food Microbiol.* 2023;109:104118. doi:10.1016/j.fm.2022.104118 PubMed PMID: 36309430.
123. Geissler AL, Bustos Carrillo F, Swanson K, Patrick ME, Fullerton KE, Bennett C, et al. Increasing *Campylobacter* Infections, Outbreaks, and Antimicrobial Resistance in the United States, 2004-2012. *Clin Infect Dis.* 2017;65(10):1624–31. doi:10.1093/cid/cix624 PubMed PMID: 29020144.
124. Kuhn KG, Nygård KM, Löfdahl M, Trönnberg L, Rimhanen-Finne R, Sunde LS, et al. Campylobacteriosis in the Nordic countries from 2000 to 2015: Trends in time and space.

- Scand J Public Health. 2020;48(8):862–9. doi:10.1177/1403494819875020 PubMed PMID: 31763953.
125. Boudou M, ÓhAiseadha C, Garvey P, O'Dwyer J, Hynds P. An ecological study of the spatiotemporal dynamics and drivers of domestically acquired campylobacteriosis in Ireland, 2011–2018. PLoS One. 2023;18(11):e0291739. doi:10.1371/journal.pone.0291739 PubMed PMID: 37976287; PubMed Central PMCID: PMC10655977.
 126. Mikulić M, Humski A, Njari B, Ostović M, Duvnjak S, Cvetnić Ž. Prevalence of Thermotolerant *Campylobacter* spp. in Chicken Meat in Croatia and Multilocus Sequence Typing of a Small Subset of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates. Food Technol Biotechnol. 2016;54(4):475–81. doi:10.17113/ftb.54.04.16.4647 PubMed PMID: 28115906; PubMed Central PMCID: PMC5253990.
 127. Popović-Uroić T. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* diarrhoea in rural and urban populations in Yugoslavia. Epidemiol Infect. 1989;102(1):59–67. doi:10.1017/s095026880002968x PubMed PMID: 2917618; PubMed Central PMCID: PMC2249310.
 128. Carev M, Tonkić M, Boban N. A six-year epidemiological surveillance study in Split-Dalmatia County, Croatia: urban versus rural differences in human campylobacteriosis incidence. Int J Environ Health Res. 2018;28(4):407–18. doi:10.1080/09603123.2018.1481497 PubMed PMID: 29869522.
 129. Sheppard SK, Jolley KA, Maiden MCJ. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. Genes (Basel). 2012;3(2):261–77. doi:10.3390/genes3020261 PubMed PMID: 24704917; PubMed Central PMCID: PMC3902793.
 130. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2001;39(1):14–23. doi:10.1128/JCM.39.1.14-23.2001 PubMed PMID: 11136741; PubMed Central PMCID: PMC87672.
 131. Colles FM, Maiden MCJ. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. Microbiology (Reading). 2012;158(Pt 11):2695–709. doi:10.1099/mic.0.062000-0 PubMed PMID: 22986295.
 132. Šoprek S, Duvnjak S, Kompes G, Jurinović L, Tambić Andrašević A. Resistome Analysis of *Campylobacter jejuni* Strains Isolated from Human Stool and Primary Sterile Samples in Croatia. Microorganisms. 2022;10(7):1410. doi:10.3390/microorganisms10071410 PubMed PMID: 35889129; PubMed Central PMCID: PMC9322926.
 133. Di Giannatale E, Garofolo G, Alessiani A, Di Donato G, Candeloro L, Vencia W, et al. Tracing Back Clinical *Campylobacter jejuni* in the Northwest of Italy and Assessing Their Potential Source. Front Microbiol. 2016;7:887. doi:10.3389/fmicb.2016.00887 PubMed PMID: 27379033; PubMed Central PMCID: PMC4904018.

134. Poorrashidi M, Hitchcock M, Xu J. Meta-analyses of the global multilocus genotypes of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Genome*. 2024;67(6):189–203. doi:10.1139/gen-2023-0041 PubMed PMID: 38427983.
135. Iglesias-Torrens Y, Miró E, Guirado P, Llovet T, Muñoz C, Cerdà-Cuellar M, et al. Population Structure, Antimicrobial Resistance, and Virulence-Associated Genes in *Campylobacter jejuni* Isolated From Three Ecological Niches: Gastroenteritis Patients, Broilers, and Wild Birds. *Front Microbiol*. 2018;9:1676. doi:10.3389/fmicb.2018.01676 PubMed PMID: 30116225; PubMed Central PMCID: PMC6083060.
136. Cody AJ, McCarthy NM, Wimalarathna HL, Colles FM, Clark L, Bowler ICJW, et al. A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical campylobacter isolates in Oxfordshire, United kingdom. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3193–201. doi:10.1128/JCM.01086-12 PubMed PMID: 22814466; PubMed Central PMCID: PMC3457434.
137. Friedrich A, Marshall JC, Biggs PJ, Midwinter AC, French NP. Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human campylobacteriosis in the Manawatu region, New Zealand. *Epidemiol Infect*. 2016;144(4):820–8. doi:10.1017/S0950268815002009 PubMed PMID: 26344515.
138. Oberheim J, Höser C, Luchters G, Kistemann T. Small-scaled association between ambient temperature and campylobacteriosis incidence in Germany. *Sci Rep*. 2020;10(1):17191. doi:10.1038/s41598-020-73865-9 PubMed PMID: 33057048; PubMed Central PMCID: PMC7560705.
139. Ghatak S, Milton AAP, Das S, Momin KM, Srinivas K, Pyngrope DA, et al. *Campylobacter coli* of porcine origin exhibits an open pan-genome within a single clonal complex: insights from comparative genomic analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1449856. doi:10.3389/fcimb.2024.1449856 PubMed PMID: 39415896; PubMed Central PMCID: PMC11480030.
140. Duarte A, Santos A, Manageiro V, Martins A, Fraqueza MJ, Caniça M, et al. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: high genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(4):306–13. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.06.012 PubMed PMID: 25130097.
141. Zhang P, Zhang X, Liu Y, Jiang J, Shen Z, Chen Q, et al. Multilocus Sequence Types and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolates of Human Patients From Beijing, China, 2017-2018. *Front Microbiol*. 2020;11:554784. doi:10.3389/fmicb.2020.554784 PubMed PMID: 33193135; PubMed Central PMCID: PMC7604515.
142. van Vliet AHM, Thakur S, Prada JM, Mehat JW, La Ragione RM. Genomic Screening of Antimicrobial Resistance Markers in UK and US *Campylobacter* Isolates Highlights Stability of Resistance over an 18-Year Period. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(5):e0168721. doi:10.1128/aac.01687-21 PubMed PMID: 35404076; PubMed Central PMCID: PMC9112873.

143. Lopes BS, Strachan NJC, Ramjee M, Thomson A, MacRae M, Shaw S, et al. Nationwide Stepwise Emergence and Evolution of Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni* Sequence Type 5136, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(7):1320–9. doi:10.3201/eid2507.181572 PubMed PMID: 31211671; PubMed Central PMCID: PMC6590748.
144. Mouftah SF, Cobo-Díaz JF, Álvarez-Ordóñez A, Elserafy M, Saif NA, Sadat A, et al. High-throughput sequencing reveals genetic determinants associated with antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from farm-to-fork. *PLoS One.* 2021;16(6):e0253797. doi:10.1371/journal.pone.0253797 PubMed PMID: 34166472; PubMed Central PMCID: PMC8224912.
145. Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2017;65(12):e45–80. doi:10.1093/cid/cix669 PubMed PMID: 29053792; PubMed Central PMCID: PMC5850553.
146. Riddle MS, DuPont HL, Connor BA. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG.* 2016;111(5):602. doi:10.1038/ajg.2016.126
147. Lariviere LA, Gaudreau CL, Turgeon FF. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* to twenty-five antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 1986;18(6):681–5. doi:10.1093/jac/18.6.681 PubMed PMID: 3493235.
148. Karmali MA, De Grandis S, Fleming PC. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;19(4):593–7. doi:10.1128/AAC.19.4.593 PubMed PMID: 7247381; PubMed Central PMCID: PMC181484.
149. Yabe S, Higuchi W, Takano T, Razvina O, Iwao Y, Isobe H, et al. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Infect Chemother.* 2010;16(3):174–85. doi:10.1007/s10156-010-0040-1 PubMed PMID: 20225076.
150. Tribble DR, Sanders JW, Pang LW, Mason C, Pitarangsi C, Baqar S, et al. Traveler's diarrhea in Thailand: randomized, double-blind trial comparing single-dose and 3-day azithromycin-based regimens with a 3-day levofloxacin regimen. *Clin Infect Dis.* 2007;44(3):338–46. doi:10.1086/510589 PubMed PMID: 17205438.
151. Vukelic D, Trkulja V, Salkovic-Petrisic M. Single oral dose of azithromycin versus 5 days of oral erythromycin or no antibiotic in treatment of campylobacter enterocolitis in children: a prospective randomized assessor-blind study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;50(4):404–10. doi:10.1097/MPG.0b013e3181a87104 PubMed PMID: 19881393.

152. Amatya B, Pandey P, McGuinness SL, Grobusch MP, Muhi S, Leder K, et al. GeoSentinel Analysis of Travelers' Diarrhea Antimicrobial Resistance Patterns. *JAMA Netw Open*. 2025;8(12):e2551089. doi:10.1001/jamanetworkopen.2025.51089
153. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J*. 2019;17(2):e05598. doi:10.2903/j.efsa.2019.5598 PubMed PMID: 32626224; PubMed Central PMCID: PMC7009238.
154. Sodagari HR, Sohail MN, Varga C. Temporal, regional, and demographic differences among antimicrobial-resistant domestic *Campylobacter jejuni* human infections across the United States, 2013-2019. *Int J Antimicrob Agents*. 2025;65(5):107467. doi:10.1016/j.ijantimicag.2025.107467 PubMed PMID: 39986401.
155. Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, et al. Quinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Infections in Minnesota, 1992–1998. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(20):1525–32. doi:10.1056/NEJM199905203402001
156. Tramuta C, Garcia-Vozmediano A, CeRTiS Clinical Laboratories Group null, Maurella C, Bianchi DM, Decastelli L, et al. Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles of Human *Campylobacter* Species Isolated in Northwest Italy, 2020-2023. *Microorganisms*. 2024;12(3):426. doi:10.3390/microorganisms12030426 PubMed PMID: 38543478; PubMed Central PMCID: PMC10972507.
157. Carev M, Kovačić A, Novak A, Tonkić M, Jerončić A. *Campylobacter jejuni* strains coresistant to tetracycline and ciprofloxacin in patients with gastroenteritis in Croatia*. *Infectious Diseases*. 2017;49(4):268–76. doi:10.1080/23744235.2016.1258487 PubMed PMID: 27900889.
158. Viduka D, Mrčela D, Carev M. Rise in *Campylobacter* species antimicrobial resistance in Split-Dalmatia County in a ten-year period. *ST-OPEN*. 2024;5:1–10. doi:10.48188/so.5.7
159. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(2):459–66. doi:10.1128/AEM.02873-15 PubMed PMID: 26519386; PubMed Central PMCID: PMC4711122.
160. Pérez-Boto D, Herrera-León S, García-Peña FJ, Abad-Moreno JC, Echeita MA. Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol*. 2014;43(2):176–82. doi:10.1080/03079457.2014.898245 PubMed PMID: 24689432.
161. Lorenzen S, Dieckmann AL, Možina SS, Zelenik K, Marquardt P, Tersteegen A, et al. Characterization of aquatic clade 2 and 3 *Campylobacter coli* isolates from Slovenia reveals admixture with other *Campylobacter* species. *BMC Microbiol*. 2025;25:322. doi:10.1186/s12866-025-04042-z PubMed PMID: 40413380; PubMed Central PMCID: PMC12102941.

162. Jelovcan S, Lepuschitz S, Blaschitz M, Selinschek M, Ledolter A, Indra A, et al. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Austria. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;53:68. doi:10.1016/j.ijid.2016.11.172
163. García-Fernández A, Artuso I, Marotta F, Di Romualdo R, Arena S, De Marchis ML, et al. WGS-based surveillance for *Campylobacter* spp. in human infections and chicken meat production in Italy (2023). *BMC Microbiol*. 2025;25:696. doi:10.1186/s12866-025-04272-1 PubMed PMID: 41152732; PubMed Central PMCID: PMC12570518.
164. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x PubMed PMID: 21793988.
165. Liao YS, Chen BH, Teng RH, Wang YW, Chang JH, Liang SY, et al. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from Human *Campylobacteriosis* in Taiwan, 2016 to 2019. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(1):e0173621. doi:10.1128/AAC.01736-21 PubMed PMID: 34748382; PubMed Central PMCID: PMC8765299.
166. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, Turgeon F. Susceptibilities of beta-lactamase-positive and -negative strains of *Campylobacter coli* to beta-lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(5):1174–6. doi:10.1128/AAC.37.5.1174 PubMed PMID: 8390812; PubMed Central PMCID: PMC187926.
167. Shen Z, Wang Y, Zhang Q, Shen J. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol Spectr*. 2018;6(2). doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017 PubMed PMID: 29623873; PubMed Central PMCID: PMC11633568.
168. Jehanne Q, Bénéjat L, Ducournau A, Aptel J, Pivard M, Gillet L, et al. Increasing rates of *erm(B)* and *erm(N)* in human *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* erythromycin-resistant isolates between 2018 and 2023 in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2025;69(2):e0166824. doi:10.1128/aac.01668-24 PubMed PMID: 39745413; PubMed Central PMCID: PMC11823653.
169. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021;39(4):192–200. doi:10.1016/j.eimc.2020.02.027 PubMed PMID: 32345492.
170. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):141–60. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x PubMed PMID: 22117544.
171. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):O255-266. doi:10.1111/1469-0691.12373 PubMed PMID: 24131428.

172. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [citirano 2026 Mar 25]. Dostupno: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
173. Chen S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *Imeta*. 2023;2(2):e107. doi:10.1002/imt2.107 PubMed PMID: 38868435; PubMed Central PMCID: PMC10989850.
174. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2020;70(1):e102. doi:10.1002/cpbi.102
175. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018;34(13):i142–50. doi:10.1093/bioinformatics/bty266 PubMed PMID: 29949969; PubMed Central PMCID: PMC6022658.
176. Lu J, Rincon N, Wood DE, Breitwieser FP, Pockrandt C, Langmead B, et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc*. 2022;17(12):2815–39. doi:10.1038/s41596-022-00738-y PubMed PMID: 36171387; PubMed Central PMCID: PMC9725748.
177. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol*. 2016;17(1):132. doi:10.1186/s13059-016-0997-x PubMed PMID: 27323842; PubMed Central PMCID: PMC4915045.
178. Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2021;50(D1):D801–7. doi:10.1093/nar/gkab902 PubMed PMID: 34634793; PubMed Central PMCID: PMC8728197.
179. Avershina E, Khezri A, Ahmad R. Clinical Diagnostics of Bacterial Infections and Their Resistance to Antibiotics-Current State and Whole Genome Sequencing Implementation Perspectives. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(4):781. doi:10.3390/antibiotics12040781 PubMed PMID: 37107143; PubMed Central PMCID: PMC10135054.
180. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D690–9. doi:10.1093/nar/gkac920 PubMed PMID: 36263822; PubMed Central PMCID: PMC9825576.
181. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9. doi:10.1093/bioinformatics/btu153 PubMed PMID: 24642063.
182. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol*. 2020;21(1):180. doi:10.1186/s13059-020-02090-4

183. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):e15. doi:10.1093/nar/gku1196
184. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268–74. doi:10.1093/molbev/msu300 PubMed PMID: 25371430; PubMed Central PMCID: PMC4271533.
185. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(W1):W78–82. doi:10.1093/nar/gkae268
186. Bloomfield SJ, Midwinter AC, Biggs PJ, French NP, Marshall JC, Hayman DTS, et al. Genomic adaptations of *Campylobacter jejuni* to long-term human colonization. *Gut Pathog.* 2021;13(1):72. doi:10.1186/s13099-021-00469-7
187. Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MCJ. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):340–7. doi:10.1128/JCM.43.1.340-347.2005 PubMed PMID: 15634992; PubMed Central PMCID: PMC540151.
188. Kovač J, Čadež N, Stessl B, Stingl K, Gruntar I, Ocepek M, et al. High genetic similarity of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* in central Europe. *Front Microbiol.* 2015;6:1169. doi:10.3389/fmicb.2015.01169 PubMed PMID: 26557112; PubMed Central PMCID: PMC4615952.
189. Griggs DJ, Johnson MM, Frost JA, Humphrey T, Jørgensen F, Piddock LJV. 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.* 2005;49(2):699–707. doi:10.1128/AAC.49.2.699-707.2005 PubMed PMID: 15673754; PubMed Central PMCID: PMC547197.
190. Bachoual R, Ouabdesselam S, Mory F, Lascols C, Soussy CJ, Tankovic J. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist.* 2001;7(3):257–61. doi:10.1089/10766290152652800 PubMed PMID: 11759087.
191. Fukuda D, Powell D, Mulgirigama A, Vojtek I, Ozeki H, Yoshimoto D, et al. Bacterial DNA topoisomerase IV and DNA gyrase inhibitors: history of the quinolones, their clinical usage and potential alternatives for the future. *J Antimicrob Chemother.* 2026;81(3):dkag054. doi:10.1093/jac/dkag054 PubMed PMID: 41710965.
192. Marotta F, Garofolo G, di Marcantonio L, Di Serafino G, Neri D, Romantini R, et al. Antimicrobial resistance genotypes and phenotypes of *Campylobacter jejuni* isolated in Italy from humans, birds from wild and urban habitats, and poultry. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223804. doi:10.1371/journal.pone.0223804 PubMed PMID: 31603950; PubMed Central PMCID: PMC6788699.

193. Dasti JI, Groß U, Pohl S, Lugert R, Weig M, Schmidt-Ott R. Role of the plasmid-encoded tet(O) gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 6):833–7. doi:10.1099/jmm.0.47103-0 PubMed PMID: 17510271.
194. Zarske M, Luu HQ, Deneke C, Knüver MT, Thieck M, Hoang HTT, et al. Identification of knowledge gaps in whole-genome sequence analysis of multi-resistant thermotolerant *Campylobacter* spp. *BMC Genomics*. 2024;25(1):156. doi:10.1186/s12864-024-10014-w PubMed PMID: 38331708; PubMed Central PMCID: PMC10851486.
195. Cobo-Díaz JF, González Del Río P, Álvarez-Ordóñez A. Whole Resistome Analysis in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Genomes Available in Public Repositories. *Front Microbiol*. 2021;12:662144. doi:10.3389/fmicb.2021.662144 PubMed PMID: 34290678; PubMed Central PMCID: PMC8287256.
196. Griggs DJ, Peake L, Johnson MM, Ghori S, Mott A, Piddock LJV. Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3357–64. doi:10.1128/AAC.01655-08 PubMed PMID: 19506058; PubMed Central PMCID: PMC2715628.
197. Schiaffino F, Colston JM, Paredes-Olortegui M, François R, Pisanic N, Burga R, et al. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Species in a Pediatric Cohort Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(2):e01911-18. doi:10.1128/AAC.01911-18 PubMed PMID: 30420482; PubMed Central PMCID: PMC6355604.
198. Casagrande Proietti P, Guelfi G, Bellucci S, De Luca S, Di Gregorio S, Pieramati C, et al. Beta-lactam resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* chicken isolates and the association between blaOXA-61 gene expression and the action of β -lactamase inhibitors. *Vet Microbiol*. 2020;241:108553. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108553 PubMed PMID: 31928700.
199. Guerry P, Logan SM, Thornton S, Trust TJ. Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *J Bacteriol*. 1990;172(4):1853–60. doi:10.1128/jb.172.4.1853-1860.1990 PubMed PMID: 2318805; PubMed Central PMCID: PMC208679.
200. Logan SM, Hui JPM, Vinogradov E, Aubry AJ, Melanson JE, Kelly JF, et al. Identification of novel carbohydrate modifications on *Campylobacter jejuni* 11168 flagellin using metabolomics-based approaches. *FEBS J*. 2009;276(4):1014–23. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06840.x PubMed PMID: 19154343.
201. Liang H, Zhang A, Gu Y, You Y, Zhang J, Zhang M. Genetic Characteristics and Multiple-PCR Development for Capsular Identification of Specific Serotypes of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165159. doi:10.1371/journal.pone.0165159 PubMed PMID: 27788180; PubMed Central PMCID: PMC5082957.

202. Semchenko EA, Day CJ, Moutin M, Wilson JC, Tiralongo J, Korolik V. Structural heterogeneity of terminal glycans in *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *PLoS One*. 2012;7(7):e40920. doi:10.1371/journal.pone.0040920 PubMed PMID: 22815868; PubMed Central PMCID: PMC3397941.
203. Wallace RL, Cribb DM, Bulach DM, Ingle DJ, Joensen KG, Nielsen EM, et al. *Campylobacter jejuni* ST50, a pathogen of global importance: A comparative genomic analysis of isolates from Australia, Europe and North America. *Zoonoses Public Health*. 2021;68(6):638–49. doi:10.1111/zph.12853 PubMed PMID: 34041858.

12. ŽIVOTOPIS

Luka Katić, dr. med.

Datum i mjesto rođenja: 14. Listopada 1996. Split, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvat

Mjesto trenutnog prebivališta: New York, SAD

Jezici: Hrvatski, Engleski

Email: luka.katic@mountsinai.org ; luka.katic11@windowslive.com

RADNO ISKUSTVO

Specijalizant interne medicine

Mount Sinai Morningside West, New York, SAD

07/2023 - danas

Poslijedoktorski istraživač (engl. *Postdoctoral Associate*)

Yale Sveučilište, Zavod za farmakologiju, New Haven, SAD

11/2021 - 05/2023

OBRAZOVANJE

Doktor medicine (dr. med.)

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

10/2015 - 07/2021

- Dobitnik Dekanove nagrade

Doktorski studij (PhD - Evidence-Based Medicine)

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Hrvatska

10/2021 - danas

LICENCA

Doktor medicine - aktivna licenca

Hrvatska liječnička komora

ID: 52131

25.08.2021 - danas

NAGRADE I PRIZNANJA

Nagrada za istaknuti poster, Mount Sinai Fuster Heart Hospital Research Symposium (2024)

Dekanova nagrada, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2021)

Prvo mjesto - Sveučilišno prvenstvo Hrvatske u košarci (2020)

Nagrada za najbolje usmeno izlaganje, *International Society for Pathophysiology*, St. Petersburg (2019)

Drugo mjesto - Prvenstvo Hrvatske U-18 u košarci (2014)

STRUČNE I ZNANSTVENE AKTIVNOSTI

- Član *ESCMID Young Scientist* (od 2025)
- Član *American College of Cardiology (ACC)* (od 2024)
- Recenzent časopisa *Cureus* (od 2024)
- Član *Sigma Xi* (od 2023)
- Alumni *Yale University* (postdoktorski program)
- Suosnivač Studentske sekcije za patofiziologiju i Studentske sekcije za hipertenziju (Medicinski fakultet Zagreb)

DOBROTVORNI RAD

Osnivač inicijative „*Running for Young Hearts*“ u suradnji s *Mount Sinai Adolescent Medicine* programom

- Promocija zdravlja kroz sudjelovanje na NYC maratonu

ZNANSTVENI PROFIL

Google scholar - [Luka Katic](#)

Research Gate - [Luka Katic](#)

ORCID - [0000-0003-0196-4138](#)

PUBLIKACIJE

H-index: 4

Izvorni znanstveni radovi (engl. *peer-reviewed*)

Katic L, Sivalokanathan S, Choi J, Kong D, Torelli VA, Silverman A, Nagourney A, Saeedullah U, Jafri K, Zaidi S, Farhan S, Correa A. “A Comparative Analysis of Cardiac Amyloidosis and Cardiac Sarcoidosis: A Single-Center Experience” *J Clin Med*. 2025. PMID: 40943826

Katic L, Ferencak I, Gveric-Grginic A, Goic-Barisic I, Rubic Z, Radic-Skelin M, Marinovic J, Smolic D, Kuzle J, Skara Abramovic L, Tabain I, Juric D, Tonkic M, Osorio G, Novak A. “Phenotypic and Whole-Genome Sequencing-Based Profiling of Antimicrobial Resistance and Virulence in *Campylobacter spp.* Isolated from Human Stool in a Croatian University Hospital.” *Foodborne Pathog Dis*. 2025. PMID: 40053320

Ferencak I, Gveric Grginic A, Juzbasic T, Tabain I, Tonkic M, Goic-Barisic I, Juric D, Jankovic H, **Katic L**, Novak A. “Unravelling the Persistence of the Rare Serovar *Salmonella* Mikawasima in a Hospital Setting: A Whole-Genome Sequencing Study.” *Pathogens*. 2025. PMID: 40430729

Katic L, Mihaljevic B, Pirija M, Goic-Barisic I, Tonkic M, Novak A. “Comparison of AccuPower Diarrhea V1&V2 RT-PCR to a Chromatographic Immunoassay for Detecting Viral Pathogens from Human Diarrheal Stool Specimens.” *Trop Med Infect Dis*. 2025. PMID: 39998037

Torelli VA, Sivalokanathan S, Silverman A, Zaidi S, Saeedullah U, Jafri K, Choi J, **Katic L**, Farhan S, Correa A. “Role of Multimodality Imaging in Cardiac Sarcoidosis: A Retrospective Single-Center Experience.” *J Clin Med*. 2024. PMID: 39685791

Khurana S, Gulati A, Rivera Boadla ME, Tan S, **Katic L**, Sharma A, Vinayak M, Kumar K, Kumar S, Hooda A. “Chunky Mitral Annular Calcification: Caseoma or a Tumor?” *Cureus*. 2024. PMID: 38738040

Katic L, Choi J, Diaz Saravia S, Silverman A, Nagourney A, Torelli V, Gupta S, Glavan M, Gulati A, Khurana S, Tsyvkin E. “The Interplay Between Cardiovascular Disease and Lung Cancer.” *Cureus*. 2024. PMID: 39044884

Katic L, Priscan A. “Multifaceted Roles of ALK Family Receptors and Augmentor Ligands in Health and Disease: A Comprehensive Review.” *Biomolecules*. 2023. PMID: 37892172

Krimmer SG, Bertolotti N, Suzuki Y, **Katic L**, Mohanty J, Shu S, Lee S, Lax I, Mi W, Schlessinger J. “Cryo-EM analyses of KIT and oncogenic mutants reveal structural oncogenic plasticity and a target for therapeutic intervention.” *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)*. 2023. PMID: 36943885

Ostale publikacije i kongresni sažeci

Torelli V, Torelli V, Choi J, Jafri K, Saeedullah U, Bonilla H, Silverman A, **Katic L**, Farhan S. “Rethinking Fasting Before Catheterization: Enhancing Patient Satisfaction Without Compromising Safety.” *JACC*. 2025. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(25\)01492-5](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(25)01492-5).

Katic L, Choi J, Diaz Saravia S, Nagourney A, Silverman A, Torelli V, Correa A. “Cardiac Sarcoidosis: Presence of Q Wave is Associated With More Frequent VT Episodes and ICD Placements.” *JACC*. 2025. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(25\)00693-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(25)00693-X).

Choi J, Torelli V, Diaz S, Vaish E, **Katic L**, Nagourney A, Khan Z, Silverman A, Farhan S. “AI-Enhanced Recognition of Occlusion in Acute Coronary Syndrome (AERO-ACS): A Retrospective Review.” *Circulation*. 2024.

https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circ.150.suppl_1.4144910

Gupta S, Choi J, Hart H, **Katic L**, Correa A, Mahmood K, Fox AL. “Unmasking the 'Heart of the Matter': Navigating the Mysteries of DSP Variant ARVD.” *JACC*. 2024.

[https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(24\)05273-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(24)05273-2).

Tarnovski L, Frkanec S, **Katic L**, Strbac T, Lovakovic J, Susnjara P, Rasic F, Sekulic M, Josipovic J, Begic Z, Barisic K, Prelevic V, Radunovic D, Jelakovic A, Gellineo L, Domislovic M, Velkovski O, Dapic K, Jelakovic B. “The pharmacists’ and mobile applications’ role in the treatment of hypertension.” *Journal of Hypertension*. 2022.

[doi:10.1097/01.hjh.0000838716.45397.1b](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000838716.45397.1b).

Tarnovski L, Frkanec S, **Katic L**, Strbac T, Susnjara P, Lovakovic J, Kolaric M, Stupin A, Josipovic J, Baretic M, Boljesic M, Begic Z, Barisic K, Bilajac L, Radunovic D, Prelevic V, Jelakovic A, Gellineo L, Domislovic M, Jelakovic B. “Poor hypertension control and disappearance of mediterranean life style on the Croatian adriatic islands. Hunt on the silent killer (hsk) - opportunistic public health action.” *Journal of Hypertension*. 2022.

[doi:10.1097/01.hjh.0000837560.50096.d4](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000837560.50096.d4)

Frkanec S, **Katic L**, Strbac T, Trobonjaca A, Jelakovic A, Djapic K, Domislovic V, Gellineo L, Rak B, Tarnovski L, Jelakovic B. “Electrocardiogram changes in prehypertensive subjects - epidemiology of hypertension in Croatia-1 (eh uh-1) study.” *Journal of Hypertension*. 2022. doi: [10.1097/01.hjh.0000837616.97062.0b](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000837616.97062.0b)

Frkanec S, **Katic L**, Strbac T, Tarnovski L, Boban M, Sekulic M, Stojic V, Trobonjaca A, Begic Z, Barisic K, Jelakovic A, Blagus L, Bosnjak V, Gellineo L, Stevanovic R, Rak B, Jelakovic B. "Epidemiology of hypertension in Croatia (ehuh study) -ecg findings and cardiovascular mortality data after 17 years of follow-up." *Journal of Hypertension*. 2022. [doi:10.1097/01.hjh.0000837612.84295.15](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000837612.84295.15)

Domislovic M, Gellineo L, Jelakovic A, Fucek M, Begic Z, Frkanec S, **Katic L**, Radunovic D, Prelevic V, Stevanovic R, Dika Z, Karanovic S, Domislovic V, Bukal N, Premuzic V, Jelakovic B. "Prevalence of chronic kidney disease - preliminary results eh-uh 2 study (Croatian scientific foundation)." *Journal of Hypertension*. 2022. [doi:10.1097/01.hjh.0000838100.80604.73](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000838100.80604.73)

Bosnjak V, Blagus L, Frkanec S, **Katic L**, Domislovic V, Matasin M, Glavic MM, Kos J, Vrkic TZ, Pecin I, Jelakovic A, Premuzic V, Dika Z, Karanovic S, Jelakovic B. "Estimated pulse wave velocity (epwv) distribution in a cohort study - eh-uh study (Croatian scientific foundation)." *Journal of Hypertension*. 2021. [doi:10.1097/01.hjh.0000746340.51731.44](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000746340.51731.44)

Blagus L, Bosnjak V, Frkanec S, **Katic L**, Domislovic V, Matasin M, Glavic MM, Kos J, Vrkic TZ, Pecin I, Jelakovic A, Premuzic V, Dika Z, Karanovic S, Kriksic V, Capak K, Stevanovic R, Jelakovic B. "Estimated pulse wave velocity (epwv) and mortality in subjects with healthy vascular ageing (hva) and early vascular ageing (eva) in general population. eh-uh study." *Journal of Hypertension*. 2021. [doi:10.1097/01.hjh.0000746336.69196.25](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000746336.69196.25)

Glavic MM, Blagus L, Bosnjak V, Frkanec S, **Katic L**, Domislovic V, Matasin M, Kos J, Vrkic TZ, Pecin I, Jelakovic A, Premuzic V, Dika Z, Karanovic S, Kriksic V, Capak K, Stevanovic R, Jelakovic B. "Characteristics of healthy vascular ageing (hva) and early

vascular ageing (eva) in general population. eh-uh study (Croatian scientific foundation).” *Journal of Hypertension*. 2021. [doi:10.1097/01.hjh.0000745076.39504.af](https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000745076.39504.af)

POZVANA PREDAVANJA

Katic L. “Multifaceted Roles of ALK Family Receptors and Augmentor Ligands in Health and Disease - cardiological aspects.” Prezentirano na *Advanced Cardiology and Cardiovascular Innovations Conference*. Amsterdam, Nizozemska 27-28. Lipnja 2024.

Katic L. “Critical appraisal of intervention studies, including internal validity, external validity, significance, and relevance.” Prezentirano na **Icahn School of Medicine at Mount Sinai**. New York, New York, SAD 21. Svibnja 2024.

KONGRESNA IZLAGANJA

Katic L, Sinatra V, Engstrom K. “New Presentation of Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy Following Chemotherapy.” Prezentirano na *Mount Sinai Morningside-West Internal Medicine Residency Research Day*. New York, New York, SAD 8. Svibnja 2025.

Katic L, Choi J, Diaz Saravia S, Nagourney A, Silverman A, Torelli V, Correa A. “Cardiac Sarcoidosis: presence of Q wave is associated with more frequent VT episodes and ICD placements.” Prezentirano na *American College of Cardiology (ACC) Annual Scientific Session*. Chicago, Illinois, SAD 29-31. Ožujka 2025.

Katic L, Sheikh H, Silverman A, Gore A, Barman N, Ahmadi A. “In-Stent Thrombosis Thrice In 30 Days.” Prezentirano na *Mount Sinai Morningside-West Internal Medicine Residency Research Day*. New York, New York, SAD 14. Svibnja 2024.

Katic L, Sheikh H, Silverman A, Gore A, Barman N, Ahmadi A. "In-Stent Thrombosis Thrice In 30 Days." Prezentirano na **2nd Annual Mount Sinai Fuster Heart Hospital Research Symposium**. New York, New York, SAD 15. Ožujka 2024. (Nagrada za istaknuti poster)

Katic L. "Epidemiology of Hypertension in Croatia (EHUH Study) - Mortality Data After 17 Years of Follow-up (HRZZ Croatian Science Foundation)." Prezentirano na **5th Sarajevo International Medical Student Congress (SAMED)**. Sarajevo, Bosna i Hercegovina 20-22. Veljače 2020.

Katic L. "Hemodynamic, pulmonary and immunological etiopathogenesis within the cirrhotic multiorgan syndrome." Prezentirano na **XXII International Conference 'Fundamental Science and Clinical Medicine'**. St. Petersburg, Rusija 2019. (Nagrada za najbolje usmeno izlaganje)

Katic L. "West Syndrome and malnutrition." Prezentirano na **Zagreb International Medical Summit (ZIMS)**. Zagreb, Hrvatska 5-8. Prosinca 2019.

Katic L. "Young patient with dilatative cardiomyopathy and paroxysmal atrial fibrillation (PAF) - ablation therapy." Prezentirano na **15th International Croatian Student Summit of Biomedical Students and Young Scientists (CROSS)**. Zagreb, Hrvatska 9-12. Travnja 2019.