

Ostale medicinski značajne Enterobacteriaceae

- **Rod Klebsiella**

U okviru ovog roda, najpoznatija vrsta je *K. pneumoniae* koja se može naći u crevnom sistemu čoveka, ali i u respiratornom sistemu kod 5% zdrave ljudske populacije. Ova vrsta je uzročnik oko 1% humanih pneumonija, koje mogu imati akutni i hronični oblik. Glavni faktor virulencije svih klebsijela je velika kapsula kojom se o nemogućava fagocitoza od strane ćelija imunog sistema domaćina. Zbog njenog prisustva, ovaj rod ima karakterističan rast (mukoidni izgled) na čvrstom agaru. *Klebsiella pneumoniae* je vrsta iz ovog roda koja je odgovorna za sekundarne infekcije (oportunistički patogen) i izaziva intrahospitalne pneumonije (posebno rizična grupa su alkoholičari zbog nesposobnosti da samostalno izbacuju aspirate iz donjeg respiratornog trakta), meningitis, bakterijemije, infekcije rana i urinarne infekcije.

Pored *K. pneumoniae*, često izolovana vrsta je i *K. oxytoca*, koja je takođe izazivač pneumonije.

- **Rod Enterobacter**

Vrste ovog roda naseljavaju zemljište, kanalizaciju i mogu se naći i u mlečnim proizvodima. Najčešće su izazivači infekcija urinarnog trakta, ali su izolovane i iz hirurških rana, sputuma i krvi (pneumonije i bakterijemije). Predstavljaju oportunističke patogene koji najčešće izazivaju sekundarne infekcije. Najveći broj sojeva poseduje gen *ampC* za beta laktamazu na hromozomu, koja ih čini izuzetno rezistentnim na ampicilin i cefalosporine prve i druge generacije.

- **Rodovi Citrobacter, Serratia, Morganella i Providencia** su normalni komensali crevnog sistema čoveka. Oba roda su oportunistički patogeni koji izazivaju infekcije imunokompromitovanih pacijenata, najčešće u intrahospitalnim uslovima. Izazivači su infekcija urinarnog trakta, a kod osoba sa izuzetno oslabljenim imunitetom, mogu izazvati bakterijemiju. Najpoznatije vrste humanih patogena iz navedenih rodova su *S. marcescens*, *C. koseri*, *M. morgani* i *P. stuartii*. Mnogi sojevi ovih rodova razvili su rezistenciju na pojedine klase antibiotika, pa je terapija ovih sekundarnih infekcija češće veći izazov nego izlečenje primarnih oboljenja.

- **Rod Proteus** je rod čije vrste (*P. mirabilis* i *P. vulgaris*) uzrokuju infekcije urinarnog sistema, a ređe mogu biti uzrok i infekcija rana, pneumonije, bakterijemije, sepse i meningitisa. Ove vrste se karakterišu sposobnošću produkcije enzima ureaze, koji dovodi do razlaganja uree na amonijak i ugljen dioksid. Ovaj proces podiže pH urina, što dovodi do precipitacije magnezijuma i kalcijuma i stvaranja kristala, a kao konačni rezultat nastaje tzv. kamen u bubregu. Alkalnost urina je takođe nepovoljna jer je toksična za epitel urinarnog sistema. Izuzetna pokretljivost vrsta ovog roda omogućava brzo širenje infekcije i uspešnu invaziju.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Materijal se uzima u zavisnosti od lokalizacije infekcije, pa uzorci mogu biti urin, krv, gnoj, spinalna tečnost, sputum ili drugi materijal.

Dijagnoza. Postavlja se na osnovu biohemijskih karakteristika soja izolovanog iz materijala pacijenta, uyetog na odgovarajući način.

Kultivacija. Navedene vrste se uzgajaju na krvnom agaru, a u zavisnosti od mesta infekcije može se koristiti i selektivni i/ili diferencijalni agar poput MacConkey agara.

GRAM NEGATIVNI AEROBNI NEENTERIČNI BACILI

Rod *Vibrio* (lat. vibrare-okretati se)

Pripadnici ovog roda spadaju u najčešće stanovnike površinskih voda širom sveta. Rod je karakterističan po obliku ćelije koji podseća na zarez. Pripadaju grupi fakultativno anaerobnih Gram negativnih, fermentativnih bacila, a trenutno obuhvata 119 vrsta. Pokretni su jer poseduju polarno postavljene flagele.

Vibrio cholerae

Vibrio cholerae (gr. chole - žuč) je gram negativni uvijeni štapić dužine 2-4 µm koji izaziva crevno oboljenje koleru, a po biohemijskim osobinama, vrsta deli mnoge karakteristike sa članovima familije Enterobacteriaceae. Imaju fermentativni metabolizam, rastu na većini podloga sa žučnim solima na 37 °C i poseduju O i H antigene. Bakterija živi u spoljašnjoj sredini u određenim endemskim područjima sa toplom i vlažnom klimom.

Faktori virulencije (patogenost). Pored flagela značajnih za pokretljivost, ovaj bacil poseduje i pile kao važan factor virulencije. Građa ćelijskog zida je tipična za Gram negativne bakterije i uključuje lipopolisaharide sa endotoksinom (lipid A) i O polisaharidom, na osnovu koga se vrši serotipizacija ove vrste na više od 200 serotipova.

Kolera toksin je enterotoksin koji produkuje *V. cholerae* i ima dve subjedinice (A i B), od kojih B omogućava ulazak subjedinice A u ćeliju domaćina. Toksin dovodi do hipersekrecije vode i elektrolita, a apsorpcija natrijuma i hlorida od strane mikrovila je inhibirana. Na ovaj način, kao posledica dejstva ovog toksina nastupaju ekstremna dijareja, dehidracija, šok, acidoza i smrt.

Epidemiologija, patogeneza i klinički sindrom kolere.

Prirodno se vrste roda *Vibrio* nalaze u morskim i estuarskim vodama i konzumacija morskih plodova može dovesti do *Vibrio* infekcija. U slučaju *V. cholerae*, može se javiti kao endemska bolest gde su asimptomatski nosioci izvor infekcije. U neendemičnim oblastima, epidemije kolere se šire kao posledica konzumacije kontaminirane vode i hrane, pa je najčešća u zemljama gde higijena nije na zadovoljavajućem nivou. Kolera je kao bolest imala izuzetan značaj u humanoj istoriji i više puta izazivala strašne epidemije sa mnogo smrtnih slučajeva i desetkovala populacija ljudi.

Nakon ingestije, bakterije dospevaju u želudac čija kiselina ubija njihov znatan broj, zbog čega je potrebna velika infektivna doza (10^8 ćelija). Neke vrste hrane uspešno štite ove organizme pri prolasku kroz želudac. U sluzokoži tankog creva, bakterije penetriraju kroz nju, pričvršćuju se za mikrovile epitela creva i umnožavaju. Bakterije ne ulaze u ćelije domaćina već proizvode kolera toksin koji remeti normalnu funkciju creva, tj. ćelija creva. Nakon njegovog vezivanja za specifične receptore ovih ćelija, aktivira se sekundarni signalni sistem (aktivaciju vrši kolera toksin) i ćelije ispuštaju znatnu količinu elektrolita u lumen creva, pri čemu se gubi i ogromna količina vode. Nakon inkubacionog perioda koji iznosi nekoliko sati do nekoliko dana, dolazi do kolere, oboljenja čiji

simptomi počinju povraćanjem, nakon čega se javlja i vodena dijareja. Stolica ljudi obolelih od kolere sadrži mnogo vode i čestice mukusa, pa je specifičnog izgleda i podseća na pirinčanu vodu. Gubici vode pri ovoj bolesti mogu biti i do litar po satu (težina nelečenog bolesnika može se redukovati na 50%), pa je ovo stanje opasno za život zbog nastupajuće dehidracije. Dehidracija vodi ka gubitku volumena krvi, acidozi (zbog gubitka elektrolita bikarbonata), grčevima u mišićima, žeđi, upalim očima, hipotenziji, tahikardiji, cijanozi i šoku nakon svega 18-24 h. Kod netretirane bolesti, smrt nastupa nakon 48 h kod više od 50% obolelih ljudi.

Procedura za dijagnostiku

Ona nije potrebna kada se jave epidemije, ali kod sporadičnih slučajeva neophodno je potvrditi da se radi o ovoj bakteriji.

Uzimanje uzorka. Izolacija se vrši iz uzorka stolice, a uzorak se prenosi u transportnoj podlozi (alkalna peptonska voda, pH=8.5).

Dijagnoza se može postaviti direktnom mikroskopijom uzorka stolice u tamnom polju, pri čemu se na preparatima uočavaju mnogobrojni uvijeni pokretni bacili. Bojenje po Gramu pokazuje slabo uvijene Gram negativne štapiće veličine 0,5-1,5 x 3 µm. Kultivisani izolati se dalje podvrgavaju biohemijskom testiranju i serotipizaciji korišćenjem polivalentnih antiseruma. Pored navedenih metoda, postoji mogućnost detekcije kolera toksina imunoesejima.

Kultivacija. Uzorci za kultivaciju morati biti sakupljeni u ranim fazama oboljenja i brzo inokulisani na podlogu. *Vibrio cholerae* se kultiviše na selektivnoj podlozi TCBS (tiosulfat-citrat- žučne soli - saharoza) agaru, mada može rasti na većini podloga poput krvnog ili MacConkey agara.

Rod *Pseudomonas*

Predstavlja rod oportunističkih patogena su kosmopoliti i nalaze se u zemljištu, morskoj i kopnenoj vodi. Kolonizuju biljke i životinje i zbog velikog rasprostranjenja, često su kontaminanti u bolnicama. *Pseudomonasi* su mali (0,5-1 x 1.5-5.0 µm) aerobni Gram negativni bacili koji imaju jednu polarno postavljenu flagelu, produkuju oksidazu i katalazu i ne fermentišu ugljene hidrate. Koriste oksidativni metabolizam i mali broj šećera - glukozu, ribozu, i sl. Kiseonik je terminalni akceptor elektrona i zbog korišćenja citohrom oksidaze, oksidaza su pozitivne pa se na taj način razdvajaju od Enterobacteriaceae. U anaerobnim uslovima, sposobne su da rastu i pri tome koriste nitrate kao terminalne akceptore elektrona. Sposobni su za rast na minimalnim podlogama a produkuju proteaze, amilaze, pektinaze, i mnoge druge enzime. Ove vrste su eurivalentne i adaptiraju se na velika variranja uslova u staništu (tolerišu veliki raspon temperatura, od 4°C - 42°C). Mnoge vrste produkuju žutu i/ili zelenu (pioverdin), crvenu ili braon (piorubin), ili plavu (piocijanin) pigmentaciju podloge na kojoj rastu, a pojedine vrste imaju veoma specifičan, prijatan miris. Veliki broj sojeva poseduje kapsulu i usled ovoga na čvrstim podlogama se karakterišu mukoidnim rastom. Takođe, mnogi sojevi su otporni na mnoge antibiotike (multirezistentni), pa antimikrobna terapija uglavnom podrazumeva korišćenje kombinacije antibiotika istovremeno.

Pseudomonas aeruginosa

Predstavlja u medicinskom smislu najbitniju vrstu u okviru ovog roda, koja se normalno može naći u zemljištu, vodi i crevnom traktu (10% populacije). Odlikuje se izuzetnom rezistencijom na fizičke i hemijske faktore kontrole.

Faktori virulencije (patogenost). Mogu se podeliti na **adhezine**, **toksine** i **enzime**. Pored njih, pseudomonas poseduje **flagele** koje mu omogućavaju pokretljivost, a mnogi sojevi poseduju sposobnost produkcije **biofilmova**. Poseduju i **sekrecioni sistem tipa III** koji omogućava efikasno sopremanje toksina do ćelije domaćina. **Adhezini** pseudomonasa su komponente na površini ćelije koje omogućavaju pričvršćivanje za ćeliju domaćina, a u njih spadaju **pili** (fimbrije), kao i **kapsula** koja pored zaštite od fagocitoze ima efekat adhezije zbog specifičnog polisaharidnog sastava (alginat). Toksini pseudomonasa su **lipid A (endotoksin)**, koji je odgovoran za simptome septičnog sindroma (groznica, šok, oligurija, leukopenija/leukocitoza, intravaskularna koagulacija, metaboličke abnormalnosti). Pseudomonas produkuje i **egzotoksin A**, koji blokira sintezu proteina ćelije domaćina. Pored toksina, ove bakterije produkuju enzim **elastazu**, koji dovodi do uništavanja elastičnih vlakana zidova krvnih sudova, što rezultuje hemoragičnim lezijama koje su karakteristične za sistemska oboljenja izazvana vrstom *P. aeruginosa*. Uz elastazu, ova vrsta produkuje i **fosfolipazu C (hemolizin)** odgovornu za razlaganje lipida i lecitina i posledičnu destrukciju tkiva, kao i egzoenzime S i T, koji dovode do oštećenja ćelija, invazije i nekroze tkiva domaćina. Pigment **piocijanin** katalizuje produkciju toksičnih formi kiseonika (superoksida i vodonik peroksida), dok **pioverdin** predstavlja siderofor koji vezuje gvožđe domaćina koje je neophodno za bakterijski metabolizam i reguliše sekreciju ostalih faktora virulencije.

Epidemiologija. Zbog široke rasprostranjenosti i velike otpornosti na fizičko- hemijske faktore kontrole, pseudomonas je izuzetno značajan oportunistički patogen i čest izazivač intrahospitalnih infekcija.

Klinički sindromi.

PRIMARNE INFEKCIJE KOŽE I MEKIH TKIVA. Rana od opekotine praćena lokalnim vaskularnim oštećenjem i nekrozom tkiva je česta manifestacija infekcije pseudomonasom, koja se može iskomplikovati u bakterijemiju. Vlažna sredina u opekotini i odsustvo neutrofilnog odgovora su idealna sredina za razvoj pseudomonasa. Ove infekcije je veoma teško izlečiti uobičajenim topikalnim tretmanima, već je neophodna oralna terapija antibioticima. Karakteristika ovih infekcija je da imaju specifičan miris i primetnu boju eksudata u zahvaćenim tkivima (plavi gnoj), koja nastaje kao posledica produkcije pigmenta piocijanina. Folikulitis se može javiti kao posledica boravka u vodi kontaminiranoj pseudomonasom (đakuži kade, bazeni).

PLUĆNE INFEKCIJE. Pseudomonas je čest kod infekcija donjeg respiratornog trakta, a bolesti i simptomi mogu veoma varirati, od uobičajenih i lako izlečivih (relativno bezazleni traheobronhitis) do izuzetno ozbiljnih i opasnih po život (nektorična bronhopneumonija).

INFEKCIJE UHA. Upala spoljašnjeg ušnog kanala izazvana ovom bakterijom je česta kod plivača. Ova bolest je uglavnom lokalizovana, ali se ponekad može proširiti na okolna tkiva pa je neophodna invazivna hirurška metoda i jaka antibiotska terapija za njeno izlečenje.

INFEKCIJE OKA nastaju nakon izlaganja očiju sa traumatizovanom rožnjačom vodi koja je kontaminirana ovom bakterijom. Infekcija rezultuje nastankom kornealnih ulcera koji mogu dovesti do gubitka oka ukoliko se ne tretiraju.

BAKTERIJEMIJE koje izaziva ova bakterija se karakterišu visokom smrtnošću, a posebno rizične grupe su pacijenti oboleli od dijabetesa, sa neutropenijom, hematološkim malignitetima i velikim opekotinama. Bakterijemije ovom bakterijom počinju kao infekcije respiratornog trakta, urinarnog trakta ili kože i mekih tkiva. Tokom ove bolesti mogu se razviti karakteristične hemoragične lezije koje mogu preći u nekrozu i ulceracije na koži. Za nastajanje infekcije pseudomonasima je neophodan vlažno stanište za bakterije kao rezervoar infekcije, kao i poremećen ili odsutan imuni odgovor domaćina (trauma kože, neutropenija, korišćenje antibiotika).

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Materijal se uzima u zavisnosti od lokalizacije infekcije, pa uzorci mogu biti lezije na koži, gnoj, urin, krv, gnoj, spinalna tečnost, sputum ili drugi materijal.

Dijagnoza. Pseudomonas nema specifičnu morfologiju i ne može se razlikovati od drugih Gram negativnih bacila, pa mikroskopija ovde može biti primenjena u cilju određivanja bojenja po Gramu. Dijagnoza se postavlja na osnovu biohemijskih karakteristika sojeva izolovanih iz uzoraka, pri čemu se morfologija kolonija, boja, tip hemolize, miris kulture i rezultati brzih biohemijskih (npr. oksidaza) testova mogu koristiti za brzu preliminarnu identifikaciju.

Kultivacija. Pseudomonas ima jednostavne nutritivne prohteve, pa se lako gaji na većini laboratorijskih podloga opšte namene poput krvnog ili MacConkey agara.

Pored *Pseudomonas*-a, njemu srodne bakterije (koje pripadaju istom redu Pseudomonadales) od medicinskog značaja su rodovi ***Moraxella* i *Acinetobacter***. U okviru roda *Acinetobacter*, *A. baumannii* je vrsta koja je najznačajniji humani patogen. Često se nalazi na opremi za terapiju respiratornih bolesti i aparata za monitoring pacijenata. Spada u oportunističke patogene, a najčešće izaziva sekundarne respiratorne infekcije. U okviru roda *Moraxella*, najznačajnija je *M. catarrhalis* koja je deo normalne orofaringealne flore, ali može dovesti do otitisa, sinuzitisa, bronhitisa i bronhopneumonije. Veliki broj sojeva je otporan na antibiotike usled produkcije β -laktamaze. Dijagnostika i kultivacija ovih vrsta je slična onoj za pseudomonas, a zasniva se na biohemijskim karakteristikama sojeva.

Rod *Haemophilus*

Haemophilus (prevod - voli krv) je oksidaza pozitivni, neenterični patogeni rod, koji se karakteriše malim, ponekad pleomorfim Gram negativnim bacilima. Najpoznatije vrste su *H. influenzae* i *H. ducreyi*, koje su obligatni paraziti prisutni u sluzokoži čoveka i životinja. Ostali pripadnici roda su članovi normalne mikrobiote i retko kada su izazivači infekcija, po pravilu oportunističkog tipa. Veliki broj vrsta hemofilusa zahteva dodatak jednog ili kombinacije dva faktora rasta i to X faktora ("nepoznati faktor", hemin) i V faktora ("vitaminski faktor", NAD-nikotinamid adenin dinukleotid). Iako su oni prisutni u krvnom agaru, krv mora biti polako zagrevana kako bi se navedeni faktori

oslobodili i ujedno uništiti inhibitori V faktora, pa hemofilus uspeva samo na čokoladnom agaru, čija je priprema ovakva.

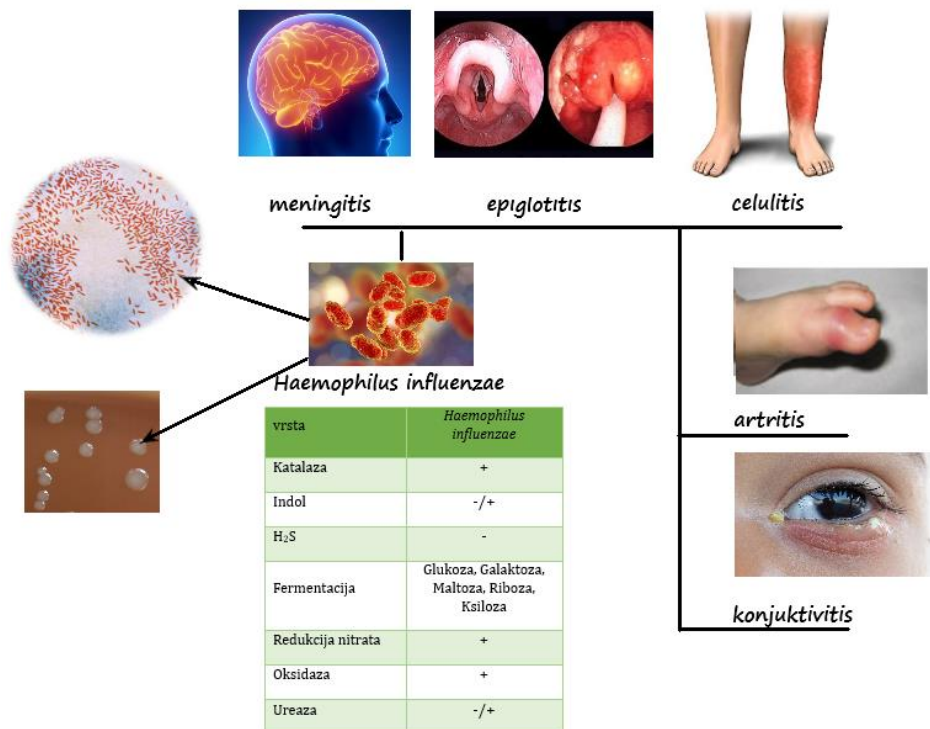
Faktori virulencije (patogenost). Građa ćelijskog zida je tipična za gram negativne bakterije i odlikuje se prisustvom **endotoksina**, kao i **kapsule** ali samo u slučaju vrste *H. influenzae*. Na osnovu antigena u kapsuli postoji šest serotipova hemofilusa obeleženih slovima a-f. Pored endotoksina i kapsule, značajan faktor virulencije produkovan od strane *H. influenzae* je **IgA proteaza**, koja ometa humoralni imunitet.

Epidemiologija. Mnoge vrste hemofilusa već u prvom mesecu života kolonizuju gornji respiratorni trakt skoro svih ljudi, posebno *H. parainfluenzae* i nekapsulirane *H. influenzae*. Ponekad oni mogu da pređu u okolna tkiva i izazovu sinusitis, otitis ili bronhitis, ređe pneumoniju. *H. influenzae* sa kapsulom nisu uobičajeno prisutne u gornjem respiratornom traktu, ali su često uzrok epiglotitisa i pedijatrijskog meningitisa. Organizam je sposoban da iz nosne submukoze pređe u krvotok i izvrši infekciju mozga ili nekog drugog organa. Prenosenje infekcije vrši se respiratornim putem.

Klinički sindromi.

Haemophilus influenzae izaziva:

1. MENINGITIS izazvan serotipom b, a najčešći je kod dece uzrasta 3-18 meseci.
2. EPIGLOTITIS koji se karakteriše zapaljenjem ždrelo, otokom supraglotičnog tkiva, groznicom i otežanim disanjem. Najčešće se javlja kod dece uzrasta 2-4 godina i predstavlja po život opasno stanje.
3. CELULITIS je zapaljenje potkožnog tkiva koje se javlja kod veoma male dece u vidu crvenkasto plave boje na obrazima i periorbitalnom delu lica.
4. ARTRITIS je čest kod male dece i javlja se kao oboljenje jednog velikog zgloba. Izazvan je zbog širenja hemofilusa tipa b putem krvotoka, a retko se može naći i kao oboljenje odraslih.
5. KONJUKTIVITIS je endemsko oboljenje
6. Nekapsulirani sojevi mogu izazvati **INFEKCIJE GORNJIH I DONJIH DISAJNIH PUTEVA** i ponašaju se kao oportunistički patogeni. Najčešće manifestacije su otitis, sinuzitis, a kod pacijenata sa hroničnim plućnim oboljenjima, izazivaju bronhitis i pneumoniju.



Slika 27. Makromorfološke osobine, mikroskopske karakteristike, klinički sindromi i osnovne biohemijske reakcije za identifikaciju *H. influenzae*

Haemophilus ducreyi je značajan uzrok **GENITALNIH ULCERA (ČIREVA)** u Africi i Aziji, retko u Evropi. Bolest se naziva čankroid. Čankroid je seksualno prenosiva bolest i najčešće se dijagnostikuje kod muškaraca, jer žene nemaju vidljive simptome. Nakon 5-7 dana od infekcije, mekane papule sa eritematoznom osnovom se javljaju na genitalijama ili perianalnom području kože. Lezija prelazi u bolan čir, a ingvinalna limfadenopatija je veoma čest prateći simptom. Zbog sličnosti simptoma sa sifilisom, genitalnim herpesom i limfogranulomom venereum, neophodno je jasno izdvojiti hemofilus kao uzročnika.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Za bolesti izazvane vrstom *Haemophilus influenzae*, uzorak se uzima u zavisnosti od simptoma i to mogu biti sputum i ostale vrste respiratornih uzoraka (npr. bris nosa, grla itd.), gnoj, krv i cerebrospinalna tečnost (likvor). Za uzorke iz uha i sinusa, potrebna je direktna aspiracija uzorka iglom.

Za izolaciju *Haemophilus ducreyi*, brisom se sakuplja uzorak sa ivice čira ili se vrši aspiracija gnoja iz natečenog limfnog čvora.

Dijagnoza. Mikroskopija se koristi za preliminarnu identifikaciju u slučajevima detekcije hemofilusa u likvoru kod meningitisa ili aspiratu iz artritisa, kao i u uzorcima infekcija donjeg respiratornog trakta (sputum kod pneumonije). Uočavaju se Gram negativni štapići čiji oblik može varirati od kokoidnog do dugih, pleomorfni filamenata.

Identifikacija se radi na osnovu potrebe za X i V faktorima.

Kultivacija. Uzorci se gaje na čokoladnom agaru obogaćenim IsoVitaleX dodatkom, a diferencijacija od ostalih Gram negativnih bacila radi se na osnovu potrebe za faktorima V i X. Hemofilus raste na krvnom agaru samo oko celuloznih diskova koji sadrže navedene faktore.

Rod Francisella

Medicinski značajna vrsta ovog roda je *Francisella tularensis* (Edward Francis, osoba koja je otkrila ovu bakteriju; Tulare County, California, mesto gde je prvi put izolovana). Izaziva bolest tularemiju (mišja groznica/glodarska kuga), zoonotsko oboljenje koje se javlja na severnoj hemisferi. Ovaj bacil je veoma malih dimenzija (0,2 x 0,2 – 0,7 µm), nepokretan i poseduje kapsulu.

Faktori virulencije (patogenost). Francisella je intracelularni patogen koji se umnožava u makrofagima, neutrofilima, epitelnim ćelijama i endotelu. Kroz sekreciju **proteina** koji sprečavaju fuziju fagozoma i lizozoma, ova bakterija uspeva da izbegne digestiju i izađe iz fagozoma u citoplazmu, gde se umnožava. Posedovanje polisaharidne **kapsule** ovoj bateriji omogućava izbegavanje fagocitoze, dok Gram negativna građa zida podrazumeva posedovanje **endotoksina** koji takođe predstavlja značajan faktor virulencije.

Epidemiologija. Glavni rezervoar infekcije su zečevi, miševi, veverice i drugi glodari ali to mogu biti i neke domaće životinje. Vektori za prenošenje su brojni i preko 20 vrsta ujeđa i ljude i životinje (komarci, grinje, buve i krpelji). Infekcija se dešava kontaktom sa obolelom životinjom gde bakterija dospeva u oči ili kožu, inhalacijom ili se prenosi ujedom vektorskog organizma.

Klinički sindromi

TULAREMIJA. Infektivna doza je jako niska kod ove bakterije i iznosi svega 10-50 organizama. Inkubacioni period iznosi nekoliko dana do 3 nedelje, nakon čega se javljaju akutni simptomi bolova u glavi, vratu, leđima, povišene temperature i slabosti praćenim bolovima u zahvaćenom regionu tela (Slika 28). Kliničke manifestacije zavise od mesta ulaska bakterije, pa mogu biti u vidu ulcerativnih promena na koži, natečenih limfnih žlezdi (koje tokom vremena mogu postati nekrotične), zapaljenja konjunktive, bolnog grla, respiratornih ili gastrointestinalnih simptoma. Bolest se uspešno leči antibioticima.

Procedura za dijagnostiku

Izolacija. Vršiti se iz uzoraka sakupljenih sa obolelih mesta, zavisno od vrste tularemije (ulceroglandularna, okuloglandularna, tonziloglandularna, plućna ili septična).

Dijagnoza postavlja na osnovu anamneze i kliničke slike, kao i serološkim testovima. Mikroskopija ne daje zadovoljavajuće rezultate zbog slabog bojenja organizma, kao i njegovih malih dimenzija.

Kultivacija. Za rast ove bakterije neophodan je dodatak cisteina podlozi poput krvnog, čokoladnog ili Tajer Martin (*Thayer-Martin*) agara i inkubacija u CO₂ tokom 2-5 dana.

Rod Bordetella

Postoji nekoliko vrsta u okviru ovog roda, od kojih je *Bordetella pertussis* najznačajnija kao humani patogen. Ova vrsta je dobila ime po Jules-u Bordet-u koji je otkrio (lat. *per* - ozbiljno, opasno; *tussis* - kašalj), a uzrokuje tzv. veliki kašalj (*pertussis*) (Slika 28). Ova bakterija je veoma mali Gram negativni kokobacil (do 0,5 μm) koji ima bipolarne metahromatske granule koje se boje toluidin plavom bojom.

Faktori virulencije (patogenost). Pored Gram negativne građe i, samim tim prisutnosti **endotoksina**, bordetela poseduje i **kapsulu** kao značajan faktor virulencije. **Adhezini** pertaktin, filamentozni hemaglutinin i fimbrije služe za pričvršćivanje za trepljasti epitel respiratornog trakta, nakon čega je omogućena dalja proliferacija infekcije, oštećenje tkiva i sistemska toksičnost. Toksini koje ova bakterija proizvodi dovode do lokalizovane ishemije (**dermonekrotični toksin**), dok **trahealni toksin** inhibira pokretljivost treplji epitela i na taj način ometa normalan mehanizam čišćenja pluća. **Pertuzis toksin** dovodi do sistemske toksičnosti.

Epidemiologija. Bolest se prenosi isključivo sa čoveka na drugog čoveka i to kapljičnim putem, a bakterija ne preživljava dug period van tea domaćina. Najčešće obolevaju deca, dok su simptomi kod starijih osoba znatno blaži.

Klinički sindrom velikog kašlja

U Srbiji je ova bolest (**VELIKI KAŠALJ**) iskorenjena zbog obavezne vakcinacije u okviru DiTePer vakcine, ali se u svetu javlja sve češće iako je njena učestalost duže vreme vakcinacijom bila svedena na minimum.

Bolest predstavlja akutni respiratorni sindrom, koji usled čestih komplikacija, kod beba i male dece (do 4 godina starosti) može predstavljati stanje opasno po život. Usled dejstva toksina dolazi do oštećenja trepljastog epitela, a gubitak ovih ćelija dovodi do nedostatka mehanizma za izbacivanje sluzi iz respiratornog sistema, pa se ona nakuplja i blokira disajne puteve. Period inkubacije iznosi 7-10 dana, nakon čega nastupa prva, kataralna faza ove bolesti.

Tok bolesti ima tri faze: kataralnu u kojoj je nos zapušen i jako curi, dete kija i povremeno kašlje. U drugom, paroksizmalnom ili konvulzivnom stadijumu (stadijum zacenjivanja), dete neprestano kašlje i to na specifičan način, gde se javljaju serije napornog isprekidanog kašlja praćene plaženjem jezika i dubokim udahom koji pri prolasku kroz dušnik umanjenog promera proizvodi veoma specifičan zvuk (sličan lavežu pasa ili njakanju magarca, pa se bolest još zove i magareći kašalj). Treća faza je faza rekonvalescencije, tj. oporavka (Slika 28). Antibiotiska terapija pomaže samo u početnim stadijumima bolesti, pa uz nju bolest ukupno traje još 3-6 nedelja nakon konvulzivnog stadijuma, a 6-10 nedelja ako se ne leči. Kod beba mlađih od 6 meseci, bolest može pri napadu kašlja dovesti do prestanka disanja. U slučaju starije dece i adolescenata, smatra se da se bolest javlja, ali su manifestacije veoma blage i prolaze u vidu zrelog kašlja.

Procedura za dijagnostiku

Uzorkovanje. Uzima nazofaringealni bris, koji se zatim dalje koristi za razne procedure u cilju potvrde *B. pertussis* kao uzročnika.

Dijagnoza se postavlja uglavnom lako usled karakteristične kliničke slike, ali se radi potvrde vrše i direktna imunofluorescencija materijala dobijenog brisom nazofaringsa, kao i serološko testiranje. Serološka dijagnoza bolesti postavlja se na osnovu prisustva antitela klase IgM i IgG u krvi, ili IgA klase u respiratornim sekretima, a koja se dokazuju imunoenzimskom metodom (ELISA)

Kultivacija. Ova bakterija se gaji na selektivnom agaru (Regan-Lowe medium), koji se nakon zasejavanja inkubira u aerobnim i vlažnim uslovima na 35- 36°C tokom 3-5 dana.

Rod *Mycobacterium*

Rod sadrži oko 50 vrsta bacila, koji se karakterišu specifičnom građom ćelijskog zida, karakterističnom po visokom sadržaju voska, što onemogućava klasično bojenje po Gramu. Ćelijski zid mikobakterija ima znatnu količinu peptidoglikana, poput Gram pozitivnih bakterija, ali je on prekriven lipidima od kojih su najznačajniji mikolična kiselina i voskovi A, B, C i D. Ukratko, peptidoglikanski sloj je kovalentno povezan sa mikoličnom kiselinom koja je povezana sa molekulima arabinogalaktana (D-arabinoza i D-galaktoza). Oni čine sloj preko koga su slobodni lipidi i polipeptidi. Površinski molekuli, pre svega glikolipidi imaju antigenu funkciju. Lipid koji je na površini ćelije, a naziva se kord faktor je odgovoran za karakterističan raspored ćelija – poput užeta. Zbog toga se ove bakterije boje samo po Ziehl-Neelsenu (acid-fast bojenje) dok se Gram bojenjem (ni drugim bojenjima) one ne mogu obojiti. Mikobakterije su osetljive na antibiotike različite od onih koji deluju na Gram pozitivne bakterije. Izuzetno sporo rastu – u zavisnosti od vrste generaciono vreme varira od 2 h do više dana. Pojedini predstavnici ovog roda proizvode karotenoide na svetlosti, pa daju žute, narandžaste ili crvene kolonije. Rod sadrži nekoliko vrsta značajnih za ljude u smislu patogenosti. Određeni broj predstavnika su oportunistički patogeni, dok su dve vrste izazivači poznatih humanih oboljenja – tuberkuloze i lepre.

Mycobacterium tuberculosis (lat. *tuberculum* – kvrga, otok, ispupčenje)

Izazivač je bolesti pod nazivom tuberkuloza (TBC, sušica), za koju se smatra da je odnela najviše života i po brojnosti umrlih je u rangu sa kugom (jedina razlika je što ne ubija brzo i ne deluje u vidu pandemija, mada se po brojnosti obolelih tokom 18. i 19. veka mogla smatrati epidemijom). Zbog visoke smrtnosti nosi naziv bela kuga. Tuberkulozu uglavnom izaziva vrsta *Mycobacterium tuberculosis*, ali ponekad i druge poput *M. bovis*, a sve vrste koje je mogu izazvati su svrstane u zajedničku grupu – kompleks *tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* i *M. microti*). Izdužen i tanak gram pozitivni bacil (1-10 µm x 0,2-0,6 µm, najčešće 0,4 x 3,0 µm) koji nema kapsulu, asporogen je i nepokretan. Na preparatu koji se boji acid-fast metodom, bacili su raspoređeni u vidu X, Y, Z slova. Ako je preparat napravljen iz kulture (striktan aerob, raste u atmosferi sa 3-10% CO₂ na 37°C), mikrokolonije liče na užad – kordove (cord factor). Zbog hidrofobne površine, mikobakterije su otporne na sušenje, dezinfekciona sredstva, kiseline i baze, dok su osetljive na sunčevu svetlost, toplotu (pasterizaciju), UV i X zrake.

Faktori virulencije (patogenost). Ova vrsta nema toksine niti enzime, ali se smatra da strukture na površini njenog ćelijskog zida poput tuberkuloproteina – PPD (purified protein derivative se koristi za testiranje na koži), CORD faktora (stvaranje njega i samim tim specifičnog obrasca na preparatu je

proporcionalan virulenciji soja), mikolične kiseline i arabinogalaktana značajno doprinose virulenciji ove bakterije.

Lipidi koji sačinjavaju ćelijski zid mikobakterija se smatraju odgovornim za unutarćelijsko preživljavanje i ometanje imunog odgovora domaćina. Na primer, liparabinomanan inhibira sazrevanje fagozoma, dok trehaloza 6,6-dimikolat (kord faktor) ima više bioloških funkcija uključujući angiogenezu, inhibiciju acidifikacije fagolizozoma, prevenciju fuzije fagozoma i lizozoma i modifikaciju imunog odgovora domaćina koji vodi stvaranju tuberkuluma.

Specifični sistemi za sekreciju mikobakterija uključuju razne transportne sisteme koji im omogućavaju kontrolu kretanja molekula kao i adekvatnu interakciju sa ćelijama domaćina.

Strategije za preživljavanje unutar ćelija imunog sistema domaćina su različite i uključuju prethodno navedenu inhibiciju sazrevanja fagozoma, otpornost na antimikrobne reaktivne vrste kiseonika i azota koje se stvaraju u makrofagima, kao i inhibiciju apoptoze domaćinskih ćelija.

Epidemiologija. Smatra se da trećina ljudske populacije u sebi nosi bacil tuberkuloze, ali se on ispoljava samo kod nekih, što zavisi od stanja imunog sistema, genetskih predispozicija i drugih faktora. Mikobakterije se prenose kapljicama manjim od 25 µm kada inficirana osoba kine, kašlje ili govori. Pri jednom kašlju se produkuje preko 300 kapljica, dok je svega 10 ćelija bacila TBC-a dovoljno da kod osetljive osobe izazove bolest. Ova činjenica govori dalje o povećanim faktorima rizika – čest kontakt sa obolelom osobom, blizina kontakta, broj provetranja prostorije itd. Retko izvori zaraze mogu biti i domaće životinje, npr. ingestijom mleka zaražene krave (što je iskorenjeno pronalaskom procesa pasterizacije) ili još ređe kroz povrede na koži. Kapi aerosoli evaporisu, ostavljajući bakterije koje su dovoljno male da kada se inhaliraju dospeju do alveola. Tada dolazi do PRIMARNE INFEKCIJE.

Profilaksa protiv tuberkuloze. BCG (Bacille Calmette-Guerin) vakcina je imunizacija koja se dobija odmah po rođenju (jer se primenjuje isključivo na osobama neobolelim od TBC-a), a sadrži oslabljeni *Mycobacterium bovis*. Daje se intradermalno, a reakcija uključuje lokalnu inflamaciju i leziju u kojoj se razmnožavaju bacili, a nakon koje se dešava spontano izlečenje uz stvaranje ožiljnog tkiva.

Klinički sindrom tuberkuloze

Efikasnost bakterijske eliminacije ćelijama imunog sistema zavisi u velikoj meri od broja inhaliranih mikobakterija i podložnosti domaćina. U alveolama, imuni sistem domaćina reaguje stvarajući citokine i limfokine koji stimulišu alveolarne monocite i makrofage. Mikobakterije se umnožavaju u makrofagima koji su ih fagocitirali jer imaju sposobnost sprečavanja stvaranja fagolizozoma, a nakon određenog vremena, ovi makrofagi liziraju. Oslobođene bakterije bivaju fagocitirane od strane krvnih makrofaga i T limfocita, gde se umnožavaju bez liziranja ćelije, što im omogućava širenje putem krvotoka i limfotoka. Iz pluća, bacil TBC-a dospeva u limfne čvorove, odakle može i ne mora dospeti u krvotok i druge organe. Na mestima u plućima gde infekcija postoji, javlja se intenzivan odgovor imunog sistema domaćina sa ciljem izolovanja mesta infekcije i formiranja granuloma, koji kasnije dobija fibrinski omotač. Ovo je prvi ili latentni stadijum TBC-a koji nema simptome i može trajati godinama. Granulomi nastaju od alveolarnih makrofaga, epiteloidnih ćelija i Langhansovih ćelija u

kojima su mikobakterije i ove ćelije sačinjavaju centralnu masu okruženu debelim slojem CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitima, kao i NK ćelija. Kada fibrozno tkivo okruži granulome, dolazi do njegove nekroze u centru (tada se promene nazivaju tuberkule ili kvržice) i zaustavljanja procesa razmnožavanja bakterije. Ovde može biti kraj infekcije u slučaju da su bakterije umrle u tuberkulumu, dok je moguće i njihovo preživljavanje i duži period mirovanja tokom koga ostaju vijabilni. Čitav opisani proces prolazi bez vidljivih simptoma, a intracelularno preživljavanje dodatno otežava proces lečenja. Bitno je napomenuti da obolela osoba u latentnom stadijumu TBC-a nije infektivna. U stadijumu reaktivacije, dešava se širenje infekcije koje počinje u dobro ventiliranim tkivima sa slabijom limfnom drenažom (vrhovi pluća, najčešće). Ovaj proces se javlja nakon perioda loše ishrane, dužeg alkoholizma, stresnog perioda ili starosti osobe, što je sve u stvari povezano sa oslabljenim imunim sistemom. Tada dolazi do pojave simptoma poput produktivnog kašlja čiji sekret sadrži svežu krv; povišene temperature, umora, gubitka apetita i težine, noćnog znojenja, bolova u grudima, a kada je bolest zahvatila i druge organe, javljaju se različiti simptomi koji ukazuju na ovu bolest. Aktivna forma TBC-a je infektivna i može se preneti kijanjem, kašljanjem, smejanjem ili običnim pričanjem.

Procedura za dijagnostiku

Uzorkovanje. Vršiti se uzimanje svežeg sputuma, urina, pleuralne tečnosti, cerebrospinalne tečnosti, krvi ili drugog materijala na koji se sumnja da sadrži bacil tuberkuloze.

Dijagnoza tuberkuloze. Bojenje sputuma, eksudata ili drugog materijala acid fast metodom je od velike koristi za dijagnostiku prisustva mikobakterija u uzorku. Mikroskopski razmazi tek uzetog materijala (sputum) obojenog po Cil Nilsenu (acid fast metodom) na kome se vide tanki bacilli su dovoljni za preliminarnu potvrdu tuberkuloze. Međutim, od izuzetnog je značaja potvrditi nalaz sa razmaza kulturom, identifikacijom i testiranjem osetljivosti izolata na antibiotike. Pored acid fast bojenja, veoma osetljiva metoda mikroskopije je i bojenje auramin-rodamin bojom i posmatranje fluorescentnim mikroskopom.

Za uvrđivanje izloženosti pacijenta bacilu tuberkuloze koristi se tuberkulin test, koji je pozitivan već nakon 3 do 4 nedelja od kontakta sa bacilom. Zasniva se na intradermalnom injektiranju PPD-a (purified protein derivative), na koji se javlja kožna reakcija čiji se promer meri i na taj način određuje kao pozitivna ili negativna reakcija. Mana ovog testa je što pacijent može pokazati pozitivnu reakciju kao posledicu vakcinacije BCG vakcinom, ali se generalno javlja kao slabija reakcija u odnosu na promer reakcije kod skorije izloženosti bacilu koji iznosi više od 20 mm. Kao alternativa tuberkulin testu može se izvršiti i imunoesej kojim se detektuje produkcija IFN- γ ili detekcija sekvenci DNK specifičnih za mikobakterije, za šta postoje komercijalno dostupni kitovi.

Kultivacija. Uzorci sa prirodno zaštićenih mesta koja nemaju normalnu floru se direktno zasejavaju, a uzimanje je sterilno. Suprotno od njih, uzorci koji normalno sadrže više vrsta kao normalnu floru moraju se tretirati bazama, kiselinama ili germicidnim deterdžentom kako bi se uništili sve nepoželjne vrste. Pre zasejavanja, uzorak sputuma se mora tretirati N-acetil-L-cisteinom u cilju rastvaranja sluzi iz uzorka, a kako bi se uklonile druge bakterije koje bi bez ovoga tokom perioda inkubacije prerasle željenu kulturu, uzorak se tretira i rastvorom natrijum hidroksida koji deluje antimikrobno. Zatim se vrši neutralizacija pufferom i koncentracija uzorka centrifugiranjem, nakon čega se vrši zasejavanje uzorka. Kolonije ove vrste koje su beličaste, hrapave, suve, neprozirne i

neravnih ivica se kultivišu na *Lowenstein-Jensen* agaru. Zbog sporog rasta (generaciono vreme je 18 h), kultivacija traje i do 8 nedelja. Za brži rast, može se koristiti tečna ili polučvrsta Middlebrook podloga, koja je selektivna jer sadrži malahit zeleno i određene antibiotike koji sprečavaju rast ostalih bakterija.

Mycobacterium leprae

Ova bakterija uzrokuje bolest lepru (gubu) i predstavlja acid fast bacil koji do sada nije uzgojen u kulturi, već samo u životinjama (miševima). Poput ostalih mikobakterija, imaju veoma dugo generaciono vreme koje iznosi 12-14 dana. Utvrđeno je da imaju sličan sastav zida sa ostalim mikobakterijama, osim fenolnog glikolipida I (PGL-I) koji se sintetiše samo u ovoj vrsti u velikim količinama. Obligatni je intracelularni parazit koji se razmnožava u ćeliji domaćina i to Švanovim ćelijama ili makrofagima.

Faktori virulencije (patogenost). *Fibronektin*, koji pomaže pričvršćivanje bakterije i njenu ingestiju od strane epitelnih i Švanovih ćelija. Proteini koje stvara ova bakterija (***rani antigeni protein i protein 10***) učestvuju u prevenciji fuzije fagozoma i lizozoma, omogućavajući rast i razmnožavanje bakterije unutar ćelije domaćina. ***Lipoarabinomanan (LAM)*** je sastavni deo ćelijskog zida koji ometa aktivnost makrofaga i ujedno omogućava rezistenciju bakterije na slobodne radikale. ***Fenolni glikolipid 1 (PGL-1)*** je glikolipid prisutan na samoj površini ćelijskog zida, koji se vezuje za C3 komponentu komplementa i tako omogućava fagocitozu posredovanu CR1, CR3 i CR4 receptorima. Ujedno, PGL-1 pruža zaštitu bakteriji od slobodnih radikala unutar ćelije domaćina tako što se vezuje za njih.

Epidemiologija. Tačan način prenošenja ove bolesti još uvek nije utvrđen, ali je rezervoar infekcije uvek bolestan čovek. Pretpostavlja se da bacil ulazi u zdrav organizam putem respiratornih kapi ili kroz male povrede na koži. Inkubacioni period varira od 2-7 godina, pa do više decenija. Pošto bacil lepre nije visoko virulentan, mala je verovatnoća da će osoba koja dođe u kontakt sa bacilom zaista oboleti, već za to mora postojati predisponirajući faktor: defect u regulaciji T ćelija, dugotrajni kontakt sa obolelim, slaba ishrana i dr. Utvrđeno je da su jedini prirodni rezervoari ove bolesti armadilosi.

Klinički sindrom lepre

Nakon ulaska u telo, bacili dospevaju do ćelija (makrofagi i Švanove ćelije) i u njima se razmnožavaju. Inkubacioni period traje 3 meseca do 40 godina. Ukoliko se ne tretira, a u zavisnosti od ćelija koje su zahvaćene, razlikuju se dva osnovna oblika ove bolesti: **tuberkuloidna lepra i lepromatozna lepra**. Postoje i prelazni oblici između ova dva kranja stanja, a prvi može preći u drugi oblik.

TUBERKULOIDNA LEpra nastaje tako što se na licu, trupu i udovima razvijaju asimetrične makule koje su u ravni sa kožom ali imaju izdignute, eritematozne ivice i suve, blede bezdlake centralne delove. Ovo je najblaža forma ove bolesti, a mikroskopski se mogu videti granulomi i uvećani kožni nervi.

LEpromatozna LEpra je forma bolesti na koju se najčešće pomisli pri pomenu ovog oboljenja a manifestuje se velikim brojem bacila u lezijama, koji su se višestruko umnožili i raširili po čitavom

organizmu. Bacili se najpre razmnožavaju u makrofagima hladnijih delova tela, uključujući nos, uši, obrve, bradu i testise. Kožne promene su velike, simetrične, difuzne, posebno na licu, sa zadebljanjima i granulomatoznim promenama na usnama, čelu, i ušima. Oštećenje može biti toliko da zahvata nosne kosti i septu, ponekad prste i druge delove tela. Ovaj oblik lepre u naprednom stadijumu dovodi do totalnog gubitka osetljivosti zahvaćenih delova tela, što vodi ozbiljnim komplikacijama usled povreda i sekundarnih infekcija.

Procedura za dijagnostiku

Uzorkovanje. Vršiti se uzorkovanje zahvaćenih delova kože, posebno sa ušiju i nosa.

Dijagnoza. Uz anamnezu koja pruža uvid da li je osoba bila u kontaktu sa leproznim pacijentom, potvrda obuhvata mikroskopiranje uzorka sa kože koji je obojen acid-fast metodom. Pored mikroskopiranja, može se uraditi i biopsija tkiva i serološki test na PGL-1.

Kultivacija. Organizam do sada nije uspešno kultivisan osim u živim sistemima.