
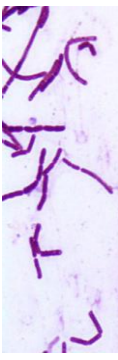


GRAM POZITIVNI SPORULIŠUĆI BACILI OD MEDICINSKOG ZNAČAJA.

Sporogeni gram pozitivni bacili značajni za medicinu pripadaju rodovima *Bacillus* i *Clostridium*.

Rod *Bacillus* obuhvata gram pozitivne štapiće (1 x 3-5 μm), koji imaju ravne krajeve i centralno postavljenu endosporu, a povezani su u lance. Ove bakterije su aerobi, katalaza pozitivni, sposobni su da razlažu makromolekule i veliki broj vrsta je prisutan u zemljištu. Rod se karakteriše dvema patogenim vrstama i to uzročnikom antraksa ili crnog prišta (*B. anthracis*) i trovanja hranom (*B. cereus*).

Tabela 8. Makroskopske i mikroskopske karakteristike pripadnika roda *Bacillus*

Oblik i izgled Ivice Boja Veličina		Kolonije		Ćelije
		Okrugle, hraapave, izdignute		Štapići, grupisani u lance
		neravne		Gram (+)
		Mat, bela, krem, žuta		ljubičaste
		mm		1,1-1,5 x 2-6 μm
		Sluzavi sloj		-
		Kapsula		-/+
		Spore		+
		Organele za kretanje		-/+

Bacillus anthracis

Bacil antraksa je najveći od svih bakterijskih patogena i predstavlja cilindrične nepokretne streptobacile (pojedinačne ćelije su dužine 3-8 μm), mada se javljaju i kao pojedinačni ili u vidu diplobacila. U svakoj ćeliji nalazi se centralno postavljena endospora širine 1-1,2 μm , osim kada se nalazi u telu domaćina, kada ćelije ne sporulišu.

Faktori virulencije (patogenost) antraksa. U faktore virulencije spadaju **kapsula** kojom bacil antraksa izbegava fagocitozu i **egzotoksini** koji dovode do edema i smrti ćelija domaćina. Virulentni *B. anthracis* nosi gene za tri komponente toksina na plazmidu pXO1. Toksini antraksa sastoje se od tri komponente, protektivnog antigena (PA), edem faktora (EF) i letalnog faktora (LF). Kada su individualni, ovi proteini nosu toksični, ali kada su veoma toksični u kombinovanom stanju.

Protektivni antigen je deo proteina koji se vezuje za receptore ćelija domaćina i formira kanal kroz koji EF i LF dospevaju u ćeliju. Edema toksin (PA+EF) izaziva edem (otok) ćelija i tkiva, dok letalni toksin (PA+LF) dovodi do poremećaja rada i urođenog i stečenog imunskog sistema, dovodi do smrti domaćinskih ćelija i poboljšava proliferaciju ćelija antraksa.

Epidemiologija. Antraks je zoonotska bolest (prenosi se sa životinja na ljude) čiji su glavni rezervoari domaće životinje i to herbivori preživari - koze, ovce i goveda. U pitanju je fakultativni parazit koji prolazi kroz ciklus vegetativnog rasta i sporulacije u zemljištu. Spore dospevaju na travu, a zatim i na preživare koji je konzumiraju i zatim preko svojih ekskreta spore ponovo vraćaju u zemljište. Ulazno mesto spora antraksa može biti koža, što je i najmanje opasna bolest (kožni antraks) pri kojoj su zahvaćeni otkriveni delovi kože - lice, vrat i donji delovi ekstremiteta. Pored kožnog antraksa, postoje i drugi, znatno opasniji oblici ove bolesti i to plućni antraks (nastaje udisanjem spora) i gastrointestinalni antraks (iz kontaminiranog mesa). Učestalost kožnog antraksa je najveća i procenjuje se da je ova forma prisutna kod 95% slučajeva antraksa, dok je plućni antraks prisutan kod oko 5% obolelih. Gastrointestinalna forma javlja se veoma retko.

Klinički sindromi izazvani antraksom

KOŽNI ANTRAKS. Mesto ulaska spora antraksa je oštećena koža i to uglavnom na eksponiranim delovima kože poput ruku, nadlaktica, lica i vrata. Nakon inkubacionog perioda (9 h - 14 dana), na mestu ulaska patogena se formira bezbolna papula koja svrbi i koja izgledom podseća na ujed insekta. Tokom naredna dva dana, oko nje se formiraju male vezikule koje su ispunjene tečnim sadržajem u kome su leukociti i bakterije, a u isto vreme okolno tkivo postaje izrazito natečeno. Nakon 5-7 dana, promena ulceriše, postaje nekrotična, uleže se i dobija karakterističnu crnu boju i tada se označava kao eskar ili maligna pustula. Lezije su veličine 1-3 cm, okolno tkivo je natečeno, a od simptoma se javljaju i limfanginitis, limfadenopatija, povišena temperatura, bol u mišićima i zglobovima, slabost i glavobolja. Nakon 10 dana od početka bolesti, kod lakših i lečenih oblika infekcije, eskar se povlači, suši i otpada tokom dužeg vremenskog perioda (do 6 nedelja) ostavljajući trajni ožiljak. Ukoliko se infekcija javi na licu odnosno na očnom kapku, tada se ne stvara pustula, već samo bled i bezbolan difuzni otok tkiva (maligni edem). Na sluzokožama dolazi do formiranja vezikula koje pucaju i na tom mestu dolazi do nekroze, pa je lokalizacija infekcije na jeziku i sluzokoži usne duplje opasno stanje koje može dovesti do ugušenja. Antibiotička terapija kožnog antraksa ne utiče na progresiju bolesti, ali može ograničiti širenje infekcije, koje može dovesti do sepse, meningitisa i smrti (20% nelečenih obolelih).

PLUĆNI ANTRAKS. Ovo oboljenje može imati jako dug latentni period (dva i više meseca), tokom koga se ne javljaju nikakvi simptomi. Nastaje inhalacijom spora iz prašine, vune, dlake ili drugih izvora, nakon čega spore bivaju fagocitirane u plućima i transportovane limfnom drenažom do medijastinalnih limfnih čvorova, nakon čega dolazi do njihove germinacije. Germinacija je praćena produkcijom egzotoksina koji imaju različite patološke efekte, počev od tromboze do septikemije koja tokom nekoliko sati dovodi do smrti (zbog čega je antraks veoma efikasno biološko oružje). Početni simptomi bolesti su nespecifični, pa oboleli ima povišenu temperaturu, neproduktivan kašalj i oseća slabost kao i bol u mišićima. Nakon ovog stadijuma, nastupa znatno dramatičnije stanje u kome dolazi do groznice, otoka, masivnog uvećanja medijastinalnih limfnih čvorova praćenog bolovima ispod

sternuma, respiratornog zastoja i sepse. Bez obzira na primanje terapije, kod ovog oblika antraksa, ne umanjuje se efekat toksina pa mortalitet iznosi više od 90%.

GASTROINTESTINALNI ANTRAKS je izuzetno redak i simptomi su bol u abdomenu praćen povraćanjem i krvavom dijarejom.

Procedura za dijagnostiku antraksa

Uzimanje uzorka. Uzorci koje treba obraditi su tečnost ili gnoj iz lokalnih kožnih lezija (uzimaju se brisom), kao i krv, pleuralna i cerebrospinalna tečnost (uzorkuju se aspiracijom). U slučaju gastrointestinalnog antraksa uzima se uzorak stolice koji se dalje analizira.

Dijagnoza antraksa. Materijal iz kožnih lezija je pogodan za dijagnostiku mikroskopskim pregledom, gde se na razmazu bojenom po Gramu mogu uočiti veoma krupni Gram pozitivni štapići udruženi u lance. Drugi način je korišćenje imunofluorescentnog bojenja na suvim razmazima. Kada se radi kultivacija iz uzorka, čista kultura se koristi za definitivnu potvrdu korišćenjem više dostupnih analiza: test lize ćelija antraks-specifičnim bakteriofagom, detekcija kapsule fluorescentnim antitelima i identifikacija toksin gena PCR analizom.

Kultivacija bacila antraksa vrši se na krvnom agaru, gde ovi organizmi proizvode sivkaste do bele nehemolitičke kolonije hrapavih ivica. Da bi se utvrdilo prisustvo kapsule, organizam se gaji i na bikarbonatnoj podlozi u atmosferi sa 5-7% CO₂, na kojoj stvara glatke kolonije, za razliku od rasta na krvnom agaru.

Bacillus cereus

Bacillus cereus se često može naći u uzorcima zemljišta i vazduha a veoma se brzo umnožava u kuvanoj hrani od namirnica bogatih škrobom (pirinač, krompir, grašak) i/ili mastima (meso). Postoje dve forme ove bolesti, emetički tip koji se javlja pri konzumaciji pirinča, mleka i testenine, a drugi je dijarealni tip koji se dobija konzumacijom mesa i sosova. Spore preživljavaju kratkotrajno kuvanje, a ako se hrana nalazi na sobnoj temperaturi, spore se razvijaju u vegetativne ćelije koje proizvode egzotoksin čija se koncentracija u zaraženoj hrani povećava do kritične koncentracije.

Faktori virulencije (patogenost). Emetički toksin čiji je gen kodiran na plazmidu i enterotoksini, koji postoje u vidu tri različita toksina sa sličnim efektom.

Epidemiologija. Emetička forma se javlja kada se konzumira hrana poput pirinča, na kojoj se lako mogu naći spore bacilusa. Pošto one preživljavaju kratkotrajno kuvanje, ukoliko se hrana ostavi da se polako hladi, može doći do germinacije ovih spora i produkcije emetičkog toksina koji će u tom slučaju biti prisutan u ovom jelu. Konzumacijom ovakve hrane, toksin dospeva u crevni sistem čoveka i izaziva simptome bolesti. Kod dijarealne forme, spore klijaju nakon unođenja, u samom crevnom

sistemu čoveka i tokom procesa germinacije i rasta produkuju enterotoksin koji dovodi do karakterističnih simptoma bolesti.

Klinički sindromi izazvani *B. cereus*-om.

EMETIČKA FORMA trovanja bacilusom počinje 1-5 sati nakon konzumacije hrane koja sadrži emetički toksin i manifestuje se u vidu mučnine, povraćanja, grčeva u abdomenu i, ponekad, dijareje. Oporavak se dešava spontano u roku od 24 h.

DIJAREALNA FORMA ima nešto duži period inkubacije (1-24 h) javlja se u vidu jake dijareje praćene grčevima i bolovima u abdomenu. Kod ove forme, unete spore germinišu u crevima i produkuju enterotoksin koji indukuje nakupljenje tečnosti zbog čega je glavni simptom dijareja.

INFEKCIJE OKA se javljaju samo kada spore bacilusa dospeju kroz oštećeno tkivo oka (povreda ili tokom hirurške intervencije), kada mogu izazvati veoma ozbiljan keratitis i endoftalmitis.

Pored navedenih stanja, u retkim slučajevima, *B. cereus* može biti uzročnik **lokalnih (rane)** i sistemskih infekcija poput **endokarditisa**, **bakterijemije** izazvane kateterom, **infekcija centralnog nervnog sistema**, **osteomijelitisa** i **pneumonije**.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Za dijagnostiku intoksikacije hranom se uzima uzorak stolice.

Dijagnoza. Prisustvo *B. cereus* u fecesu pacijenta nije dovoljna potvrda za dijagnozu ove bolesti, jer ova vrsta može biti i normalno prisutna u stolici. Za dijagnozu je neophodno prisustvo koncentracije veće od 10^5 ćelija po gramu fecesa.

Kultivacija se vrši na selektivnom agaru (*Bacillus cereus* Selective Agar) na kome daje karakteristične krupne, hrapave kolonije plave boje i neravnih ivica.

ROD CLOSTRIDIUM

Rod *Clostridium* su anaerobni, katalaza negativni, sporogeni bacili, koji se nalaze u vodi, zemljištu, organskom otpadu i crevnom traktu ljudi i životinja, gde žive kao saprofiti. Spore klostridije su šire od ćelije i u zavisnosti od vrste, mogu biti postavljene centralno, subterminalno ili terminalno. Od 80 vrsta, svega nekoliko je patogeno za ljude, a glavni mehanizam patogenosti je kroz produkciju jakih toksina. Ulazno mesto infekcije je oštećena koža, a u zavisnosti od vrste patogena iz ovog roda, simptomi se značajno razlikuju. Od 19 grupa (klastera) dobijenih na osnovu analiza 16S rRNK, najveći broj klinički značajnih vrsta nalazi se u grupi 1. Među ovim vrstama, najznačajnije su *Clostridioides* (ranije *Clostridium*) *difficile*, *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens*.

Clostridioides (Clostridium) difficile

Ova vrsta klostridije uzrokuje bolest pod nazivom *pseudomembranozni kolitis*, akutnu inflamatornu dijarealnu bolest koja je značajan urok mortaliteta u bolnicama. Smatra se da do 25% dijareja povezanih sa korišćenjem antibiotika nastaje kao posledica infekcije ovom bakterijskom vrstom.

Faktori virulencije (patogenost). Patogenost *C. difficile* je posledica produkcije egzotoksina i to **toksina A, toksina B** i trećeg, zvanog **binarni toksin** (*C. difficile* toxin, CDT). Toksin A je jak enterotoksin koji se vezuje za receptore crevnog epitela, dok je toksin B citotoksin. Deluju kao glikoziltransferaze koje vrše modifikaciju signalnih molekula i tako utiču na razne funkcije ćelija. Binarni toksin produkuje 20% epidemijskih sojeva ove vrste, a odgovoran je za 60% veći procenat mortaliteta kod pacijenata inficiranih CDT produkujućim sojevima usled značajno težih formi pseudomembranoznog kolitisa.

Epidemiologija. Javlja se kao posledica poremećaja ravnoteže mikrobioma digestivnog trakta usled primene antibiotika (radi lečenja neke druge infekcije), kada dolazi do prenamnožavanja ove bakterije u crevima. Uglavnom se povezuje sa primenom ampicilina, klindamicina, i fluorokinolina. Skoro je utvrđena i rezistencija na metronidazol, koji je bio jedan od lekova izbora za terapiju ovog oboljenja.

Klinički sindromi izazvani *C. difficile*

PSEUDOMEMBRANOZNI KOLITIS je akutna inflamatorna dijarealna bolest koja može imati veoma teške posledice. Simptomi ovog oboljenja su oštećenje sluzokože creva i teška, vodenasta ili krvava dijareja uz stvaranje pseudomembrana na površini crevne sluzokože (Slika 15). Oboljenje se odlikuje sa tri ili više vodenastih stolica dnevno, uz bolove u abdomenu i leukocitozom. Moguće komplikacije su toksični megakolon, perforacija creva i sistemska toksičnost praćena visokom smrtnošću.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Uzorak za analizu koji se koristi je stolica (feces) pacijenta koji pokazuje simptome.

Dijagnoza se postavlja detekcijom toksina elisa testom i genetičkom analizom u kome se utvrđuju geni za toksin u uzorku stolice, kao i endoskopskom analizom creva kojom se utvrđuje prisustvo pseudomembrana i mikroapscesa na sluzokoži creva.

Kultivacija *C. difficile* se vrši u striktno anaerobnim uslovima na podlogama poput krvnog ili moždano srčanog agara.

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum je uzrok bolesti botulizma i prisutan je u spoljašnjoj sredini (zemljište, voda), odakle može kontaminirati rane i hranu. Produkuje termostabilne endospore. Od ukupno sedam serotipova.

Faktori virulencije (patogenost). Tokom rasta i autolize bakterijskih ćelija, u okolnu sredinu se oslobađa toksin **botulin**. Postoji sedam antigenih varijanti ovog toksina, od kojih su A, B, E i F najčešći humani patogeni. Toksin se apsorbuje od strane crevnog epitela, ulazi u cirkulaciju i vezuje se za receptore na presinaptičkim membranama motornih neurona perifernog nervnog sistema i kranijalnih nerava. Kada se veže, toksin deluje tako što blokira oslobađanje neurotransmitera acetilholina, zaduženog za prenošenje signala na mišić, zbog čega se on ne kontrahuje.

Epidemiologija. Spore ove bakterije su prisutne u zemljištu i zbog toga često kontaminiraju povrće i voće. Nekompletni toplotni tretman kontaminirane hrane tokom njenog pakovanja u konzerve ili boce (anaerobni uslovi) omogućava opstanak spora i produkciju toksina botulina. Nakon konzumacije hrane koja sadrži toksin, dolazi do pojave simptoma bolesti. Rizik od infekcije može biti redukovan ako se hrana prokuva duže od 20 minuta pre konzumacije. Botulin predstavlja još jedan toksin od značaja kao biološko oružje.

Klinički sindromi izazvani C. botulinum

INTOKSIKACIJA HRANOM. Bolest se javlja od 6 - 48 h nakon konzumacije zaražene hrane i manifestuje se mlitavom paralizom koja kreće od kranijalnih nerava, tj. od glave. Zbog toga se najpre javljaju suva usta i disfagija (nemogućnost gutanja) i zamućen vid uz proširene zenice, ali uz očuvanu senzornu funkciju. Često se javljaju i konstipacija i abdominalni bol. Značajan simptom je bilateralna slabost perifernih mišića koja se spusta od gornjeg ka donjim delovima tela. Usled paralize mišićne mase za disanje, može doći do smrti.

DEČIJI BOTULIZAM. Kod dečijeg botulizma, toksin se oslobađa u telu dece mlađe od jedne godine, koja su konzumirala hranu zaraženu klostridijom. Kao simptomi se javljaju konstipacija, paraliza i respiratorni zastoj.

BOTULIZAM RANE je najređa forma ove bolesti, gde se toksin oslobađa u zaraženoj rani. Simptomi su isti kao kod intoksikacije hranom, ali je njihova pojava prolongirana na 4 i više dana. Takođe, gastrointestinalni simptomi su značajno slabiji nego kod intoksikacije hranom.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Uzorak za analizu koji se koristi je stolica (feces) ili serum pacijenta koji pokazuje simptome ili hrana na koju se sumnja da je izvor intoksikacije.

Dijagnoza se postavlja na osnovu simptoma i anamneze (konzumiranje sumnjive hrane). Dokazivanje toksina radi potvrde se može vršiti u hrani, fecesu i serumu (osim u slučaju dečijeg botulizma, kada se u serumu ne može detektovati toksin).

Kultivacija *C. difficile* se vrši u anaerobnim uslovima, ali se ne koristi u dijagnostičke svrhe.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens je organizam koji se nalazi u crevnom traktu čoveka i životinja, kao i u spoljašnjoj sredini i to zemljištu i vodi kontaminiranim fecesom. Ova bakterija se povezuje sa više bolesti, od kojih je gasna gangrena bolest koja je opasna po život.

Faktori virulencije (patogenost). Ova bakterija formira **kapsulu** i produkuje veliki broj toksina, od kojih je **lecitinaza C** (α -toksin) najvažniji. **Lecitinaza** lizira eritrocite, trombocite, leukocite i endotelne ćelije i efekat ovog toksina je proporcionalan destrukciji lecitina, koji je važan sastavni deo ćelijske membrane. Toksin deluje tako što razlaže lecitin na fosforilholin i diglicerid. Kao posledice njegovog dejstva javljaju se povećana vaskularna propustljivost sa masivnom hemolizom i hemoragijom, destrukcija tkiva, otkazivanje jetre i disfunkcija srčanog mišića. **Beta toksin** je enterotoksin, odgovoran za nekrotične lezije na crevima koje se javljaju kod nekrotičnog enterokolitisa. Nakon unosa konzumacijom hrane u kojoj je prisutan, toksin izaziva intenzivnu dijareju. **Ipsilon toksin** je proteolitički enzim koji povećava vaskularnu permeabilnost zida creva, dok **teta toksin** dovodi ima hemolitičke efekte uz nekrotičnu aktivnost, ali ne pripada grupi lecitinaza.

Epidemiologija. Spore preživljavaju kuvanje od više sati na 100 °C. Sporama iz zemljišta ili fecesa klostridija kontaminacijom dospeva do devitaliziranih tkiva rana (slaba prokrvljenost), gde se spore razvijaju u vegetativne ćelije koje produkuju toksine (hemolizine). Toksini su termolabilni i razlažu se pri kuvanju na 100 °C u trajanju od 20 minuta. Spadaju u najjače toksine u prirodi, a letalna doza za čoveka je 1- 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nakon dospevanja u tkivo, spore germinišu, a vegetativne ćelije se umnožavaju, fermentišu šećere koji su prisutni u tkivu i tokom ovog procesa vrše produkciju gasa. Oticanje tkiva i izmenjen dotok krvi zajedno sa produkcijom toksina i hijaluronidaze formiraju anaerobnije uslove sredine i brzu progresiju bolesti.

Klinički sindromi izazvani *C. perfringens*.

GASNA GANGRENA (klostridijalna mionekroza). Pored ove vrste, često se kao uzročnici javljaju i druge bakterije u tzv. mešovitoj bakterijskoj infekciji, pa se mogu izolovati i druge vrste klostridija, kao i različite koke i gram negativne bakterije. Bolest se javlja do 3 dana nakon povrede i nastaje na mestu rane ili hirurške intervencije, a karakteriše se jako bolnom ranom, napetom kožom, plavo-crnom obojenošću rane i njenim neprijatnim i neuobičajenim mirisom. Zbog brzog širenja nekroze, mogući su sepsa i smrt pa se ova bolest ne potvrđuje laboratorijski već samo na osnovu simptoma, a

terapija se daje odmah. Od sistemskih simptoma, prisutni su povišena telesna temperatura, znojenje i tahikardija. U kasnijoj fazi bolesti, razvijaju se šok, insuficijencija bubrega i, u velikom broju slučajeva, smrt.

Pored gasne gangrene (mionekroze), ova bakterija može dovesti do nastanka *celulitisa* i *fasciitisa*.

TROVANJE HRANOM. Ova vrsta klostridije uzrokuje i trovanje hranom koje se karakteriše kratkim inkubacionim periodom (8-24 h nakon konzumiranja zaražene namirnice). Uzročnik je termolabilni enterotoksin koji nastaje u hrani i to onoj koja sadrži meso. Enterotoksin se oslobađa pri produkciji spora u kolonu, a deluje tako što remeti permeabilnost membrana ćelija ileuma i jejunuma. Kada se konzumacijom unese više od 10^8 ćelija, u gastrointestinalnom traktu dolazi do formiranja toksina prilikom njihove sporulacije i pojave simptoma u vidu vodenaste dijareje (usled hipersekrecije jejunuma i ileuma). Ona dovodi do znatnog gubitka tečnosti i elektrolita, a može biti praćena mučninom, a veoma retko i povraćanjem i ponekad povišenom temperaturom.

Veoma retko se može javiti *NEKROTIČNI ENTEROKOLITIS*, koji predstavlja akutni proces nekroze creva pri kome se javlja krvava dijareja praćena jakim bolovima u trbuhu, peritonitisom i šokom. Mortalitet dostiže do 50%.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Uzorci za analizu koji se koriste kod gasne gangrene su materijal iz rane, gnoj i tkivo, dok se kod intoksikacije hranom koriste feces ili hrana na koju se sumnja da je izvor intoksikacije.

Dijagnoza se postavlja na osnovu mikroskopije kojom se detektuju gram pozitivni bacili u kliničkim uzorcima i porastom kulture u anaerobnim uslovima za manje od 24 h (u idealnim uslovima, ćelija klostridijuma se deli na svakih 8 minuta). Intoksikacije hranom se dijagnostikuju određivanjem brojnosti i to 10^5 ćelija po gramu hrane ili 10^6 ćelija po gramu fecesa nakon 24 h od konzumacije.

Kultivacija. Materijal se inokulira u mesno-glukoznu podlogu, tioglikolatnu podlogu i na krvni agar, a inkubacija se vrši u anaerobnim uslovima. Porast sa jedne od podloga se prebacuje u mleko, a nakon inkubacije od 24 h, koagulum pocepan gasom ukazuje na *C. perfringens*. Čiste kulture se podvrgavaju biohemijskim testovima (fermentacija šećera u tioglikolотноj podlozi, lecitinazna aktivnost) i određivanju tipa hemolize. Konačna identifikacija se zasniva na potvrdi toksina neutralizacijom specifičnim antitoksinom.

Clostridium tetani

Bakterija je mali (0.5-2 x 2-18 μm), pokretni, sporogeni bacil koji se često boji gram negativno, a nalazi se u zemljištu. Terminalne spore daju ćelijama izgled palice za doboš. Veoma su široko rasprostranjene i mogu se naći u zemljištu i fecesu nekih životinja (npr. konja).

Faktori virulencije (patogenost). Mogućnost ove bakterije da izazove bolest zasnovana je na produkciji dva toksina.

Tetanospazmin je termolabilni neurotoksin koji se proizvodi tokom stacionarne faze rasta i oslobađa nakon lize ćelije. On deluje blokirajući oslobađanje neurotransmitera inhibitornih sinapsi, čime se omogućava neregulirana ekscitativna sinaptička aktivnost. Sastoji se od dve subjedinice, lake i teške, pri čemu je laka cink-endopeptidaza, koja vrši razlaganje proteina uključenih u oslobađanje inhibitornih neurotransmitera (glicin i GABA – gama aminobuterna kiselina). Proizvodnja ovog toksina se dešava usled ekspresije gena koji se nalazi na plazmidu. Odgovoran je za kliničke manifestacije tetanusa, a njegovo vezivanje je ireverzibilno, pa oporavak zavisi od mogućnosti formiranja novih aksonskih krajeva. **Tetanolizin** je hemolizin koji se razlaže u prisustvu kiseonika.

Epidemiologija. Prirodni rezervoar bacila tetanusa je digestivni sistem nekih domaćih i divljih životinja. Dospevanjem u spoljašnju sredinu, bakterija prelazi u sporogeni oblik. Spore se zadržavaju u zemlji, travi, senu, predmetima iz čovekove okoline. Čovek se zarazi sporama kada one dospeju u povređeno tkivo. Bitno za prevenciju ove bolesti je adekvatan tretman dubokih, posebno ubodnih rana koje omogućavaju anerobne uslove, koje je neophodno dobro očistiti nakon zaustavljanja krvarenja i naneti im antibiotsku mast ili prašak. Klasičnim tetanogenim ranama se smatraju ubodi, posekotine prljavim i zagađenim predmetima i razderotine. Anaerobni uslovi se razvijaju i u mešovito inficiranim ranama, u kojima piogene aerobne bakterije potrošnjom kiseonika pomažu nastanak anaerobnih uslova. Anaerobna sredina se može razviti i naknadno, na mestu hronično oštećenog i slabije ishranjenog tkiva, kao što su dijabetične ulceracije ili ulceronekrotične rane kod drugih vaskularnih oboljenja. U tetanogene rane spadaju, takode, kraš sindromi, smrzotine i opekotine. Takođe, osobe koje nisu sigurne u svoj imunološki status treba da odu na revakcinaciju nakon ovakvih povreda.

Klinički sindromi

TETANUS (ZLI GRČ) je bolest koja nastaje nakon inkubacionog perioda koji varira od nekoliko dana do nekoliko nedelja. Trajanje perioda inkubacije direktno je povezano sa udaljenošću ulazne rane od centralnog nervnog sistema. Pod dejstvom tetanospazmina, dolazi do permanentne kontrakcije mišića (spazam mišića žvakača je posebno značajan početni simptom koji daje podrugljiv izraz licu), otežanog gutanja, ukočenosti vrata, trbušnih i leđnih mišića. Napadi ukočenosti mogu biti trajni (tonični) i povremeni (paroksizmalni), kada traju po nekoliko minuta a obično su isprovocirani svetlošću, bukom i drugim podražajima. Ovi simptomi su praćeni znojenjem, visokom temperaturom, hipertenzijom i tahikardijom. U najtežem obliku bolesti, celokupna poprečno prugasta muskulatura zahvaćena je 24 h nakon pojave prvog simptoma bolesti (grč facijalne perioralne muskulature).

Smrtnost od tetanusa u današnje vreme je još uvek visoka i kreće se oko 50% za generalizovani oblik bolesti, a oko 80-90% za ginekološki i neonatalni tetanus. Zbog obavezne vakcinacije u našoj zemlji (DI-TE-PER vakcina; difterija-pertusis-tetanus), ova bolest je izuzetno retka jer je imunitet trajan, do 10 godina.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Za dijagnozu tetanusa može se uzeti materijal iz rane, ali je veoma teško dobiti pozitivnu kulturu (kod oko 30% pacijenata) jer se bakterije sporo dele i bivaju brzo uništene zbog izloženosti kiseoniku.

Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničkih simptoma koji se ispoljavaju kod pacijenta. Toksin se ne može naći ni u tkivu ni u serumu pacijenta usled njegovog brzog vezivanja.

Kultivacija. Bacil tetanusa se može gajiti na podlogama za anaerobni rast (tioglikolatna podloga, krvni agar) u anaerobnim uslovima.

ASPOROGENI GRAM POZITIVNI BACILI OD MEDICINSKOG ZNAČAJA

Neporulišuci Gram pozitivni bacili su veoma heterogena grupa bakterija, među kojima se nalaze neki veoma poznati humani patogeni i propadaju grupama i aerobnih i anaerobnih mikroorganizama. Među anaerobima, veoma su značajni propadnici roda *Propionibacterium*, dok su od aerobnih nesporogenih bacila veoma značajni rodovi *Corynebacterium* i *Listeria*. Pripadnici ovih rodova predstavljaju članove normalne mikrobiote kože i sluzokože čoveka, ali su vrste *Corynebacterium diphtheriae* i *Listeria monocytogenes* isključivo patogene za čoveka. *Corynebacterium* i njima srodne vrste imaju neregularan oblik ćelija, koji često ima batinast izgled (proširen na jednom kraju), pa se termin korineformi ili difteroidi odnosi na označavanje grupe bakterija koje imaju ovakav izgled.

Corynebacterium diphtheriae

Rod *Corynebacterium* je rod gram pozitivnih štapića koji su aerobi ili fakultativni anerobi. Ćelije nakon deobe često ostaju povezane i formiraju palisadni raspored ili on podseća na kineska slova. Na krvnom agaru formiraju male kolonije (oko 1mm), katalaza su pozitivni i ne vrše hemolizu. Sojevi ove bakterije mogu i ne moraju imati strukturni gen za difterija toksin koji je posledica prisustva genoma specifičnog bakteriofaga. Korinebakterije su veličine 0,3-0,8 x 1-8 µm i poseduju neregularan oblik ćelija, širi na jednom kraju štapićaste ćelije.

Faktori virulencije (patogenost). Svi toksigeni sojevi *C. diphtheriae* imaju sposobnost produkcije egzotoksina koji se naziva difterija toksin. U pitanju je termolabilni peptid koji je letalan u dozi 0,1 µg/kg. Toksin ima i lokalno i sistemsko dejstvo. Pretpostavlja se da je njegovo dejstvo sprečavanje sinteze proteina u ribozomima ćelije domaćina, što dovodi do nekrotizirajućeg i neurotoksičnog efekta ovog toksina.

Epidemiologija. Jedini poznati rezervoar infekcije su ljudi. Izvor infekcije je populacija imunih ljudi, koji su asimptomatski nosioci ove bakterije na koži ili u orofarinksu. Bolest se prenosi respiratornim putem tj, kapljično ili direktnim kontaktom sa sekrecijama zaražene osobe, tj. kožnim lezijama, a ređe preko predmeta.

Klinički sindromi izazvani *C. diphtheriae*.

Klinički se bolest može manifestovati kao infekcija kože, nazofarinksa ili larinksa.

RESPIRATORNA DIFTERIJA. Period inkubacije je 2-4 dana, nakon čega se javljaju slabost, bolovi u grlu, faringitis i niska povišena temperature. Faringitis koji je i najčešći oblik difterijeima karakterističan symptom u vidu zeleno crnih pseudomembrana na tonzilama, zadnjem zidu farinksa i larinksa, a koje mogu dovesti do opstrukcije disanja. Toksin lokalno deluje na epitelne ćelije u kojima se javljaju inflamacija i nekroza. Kao posledica dejstva toksina nastaju pseudomembrane koje se sastoje od fibrinskih ugrušaka, leukocita i ćelijskog debrija (ostataka), a njihova najčešća lokacija su tonzile (krajnici). Pokušaj uklanjanja ovih membrana rezultuje krvarenjem. Takođe, javlja se veoma jak otok limfnih čvorova, koji toliko otiču da menjaju izgled celog vrata i mogu ometati disanje. Bacili difterije nastavljaju razmnožavanje i produkciju toksina u membranama, odakle kroz mukozu toksin može dospeti u krv i zahvatiti više organa (najopasniji oblik je akutni miokarditis).

DIFTERIJA KOŽE ILI RANE nastaje usled kontakta kože sa inficiranom osobom. Organizam vrši kolonizaciju kože i ukoliko postoji oštećenje na koži, dospeva do potkožnog tkiva gde se razmnožava i produkuje toksin. Na inficiranom mestu formira papula koja progresira u hronični (nezarastajući) ulcer koji često prekriva sivkasta membrana. Ova forma difterije je znatno lakša zbog slabe apsorpcije toksina, pa su sistemski efekti zanemarljivi.

Procedura za dijagnostiku

Uzimanje uzorka. Za dijagnozu difterije uzima se bris nazofarinksa i grla ili rane, koji se zatim zasejava na krvni i selektivni agar.

Dijagnoza. Mikroskopija ne daje značajne rezultate jer mikromorfologija nije specifična za bacil difterije, tj. ne može se razlikovati od drugih koliforma. Iz kolonija dobijenih zasejavanjem uzorka, a na koje se sumnja da su *C. diphtheriae*, brza identifikacija se bazira na testovima produkcije enzima cistinaze i odsustva pirazinamidaze, a svi izolati ove vrste testiraju se na produkciju difterija toksina. Najčešća detekcija toksina vrši se imunodifuzionim testom (Elek test) ili PCR metodom, koja detektuje *tox* gen u izolatima ili direktno u kliničkim uzorcima. Pored ovih testova, toksin se može detektovati i imunoenzimskim (ELISA) testom, kao i visoko senzitivnim testom koji koristi imunohromatografske trake i brzo daje rezultate (nekoliko sati).

Kultivacija. Bacil difterije se može gajiti na podlogama sa teluritom (CTBA – cistein telurit krvni agar; Tinsdejl podloga, kolistin naliksidna kiselina agar), koji *C. diphtheriae* redukuje i pri tome produkuje crno sivu boju na agaru. Telurit takođe ometa rast velikog broja komensala gornjeg respiratornog trakta, kao i nekih Gram negativnih bakterija. Gajenje se vrši u atmosferi sa 5% CO₂. Zbog obavezne vakcinacije u našoj zemlji (DI-TE-PER vakcina; difterija-pertusis-tetanus), ova bolest je izuzetno retka jer je imunitet trajan. Pošto prirodnom odbranom organizam stvara antitoksin antitela na

difterija toksin, vakcinom se unosi difterija toksoid koji ima isti efekat. Za razliku od toksina, toksoid je njegov inaktiviran oblik, koji zadržava antigene osobine ali nema toksične efekte.

Listeria monocytogenes

Rod *Listeria* odlikuje se samo jednom vrstom od značaja za medicinu i to *L. monocytogenes*, koja izaziva oboljenja kod male dece, trudnica i starijih osoba. Ova vrsta je kratak, gram pozitivni, asporogeni, katalaza pozitivan fakultativni anaerob koji ima specifičan obrazac kretanja na sobnoj temperaturi ali ne i na 37°C. Javljaju se pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima, a na krvnom agaru pokazuju slabu β -hemolitičku aktivnost. Opseg temperature rasta ove vrste je veliki i moguće je njeno preživljavanje i pri 4°C, uslovima niske pH i visokog osmotskog pritiska (koncentracije soli), pa opstaje u raznim namirnicama. U slučaju konzumiranja hrane zaražene listerijom, nastaje oboljenje pod nazivom LISTERIOZA. Serološkom klasifikacijom razlikuju se 13 serotipova ove vrste na osnovu O i H (flagelarnih) antigena.

Faktori virulencije (patogenost). Virulencija ove vrste zasniva se na posedovanju nekoliko **adhezina** (Ami, Fbp A i flagelin proteini). Posедуje i protein na površini ćelijskog zida koji se zovu **internalin** (A i B), a funkcija im je vezivanje za receptor na epitelnim ćelijama E- kadherin, čime se promoviše fagocitoza ovih bakterija u ćeliju. Nakon što bivaju fagocitorane, u fagolizozomu niska pH vrednost sredine inicira produkciju glavnog faktora virulencije, listeriolizina O. **Listeriolizin O** lizira membranu fagolizozoma i omogućava bakteriji da dospe u citoplazmu domaćinske ćelije, gde ActA površinski protein bakterijske ćelije indukuje polimerizaciju aktina domaćina i na taj način dospevaju do ćelijske membrane. Kada dođu do ćelijske membrane, indukuje se stvaranje struktura koje se nazivaju filopodije i koje bivaju ingestirane od strane okolnih ćelija, čime se postuže dalje širenje infekcije, dok su u isto vreme ćelije listerije zaštićene od napada ćelija imunog sistema. Gvožđe je značajan faktor virulencije jer listerije produkuju siderofore i imaju mogućnost uzimanja gvožđa iz transferina.

Epidemiologija. Listerija se nalazi u vodi, zemljištu, vegetaciji i životinjama. Poznato je da ljudi mogu biti asimptomatski nosioci listerije (1-5% populacije). Osnovni izvor infekcije je zaražena hrana, dok se u slučaju trudnice obolele od listerioze bakterija može preneti na dete *in utero* ili pri porođaju. Incidenca bolesti je znatno veća kod imunokompromitovanih članova populacije i to novorođenčadi, starih ljudi, trudnica i osoba sa ozbiljnim defektima u ćelijski posredovanom imunitetu (transplantacije, limfomi, AIDS i druga stanja).

Klinički sindromi izazvani L. monocytogenes

NEONATALNA LISTERIOZA. Postoje dve forme ove bolesti, rana i kasna. *Rana forma* dobija se transplacentalno (in utero) i predstavlja diseminovanu formu infekcije koja se manifestuje kao neonatalna sepsa pri kojoj se formiraju apscesi i granulomi u mnogim organima bebe (granulomatosa infantiseptica), smrtnost je veoma visoka, a smrt može nastupiti pre ili nakon porođaja. *Kasna forma* bolesti dovodi do razvoja meningitisa ili meningoencefalitisa sa septikemijom u periodu do tri nedelje nakon rođenja.

INFEKCIJE KOD TRUDNICA. Najčešće infekcije javljaju se kod trudnica u trećem trimestru, kada je ćelijski imunitet najslabiji. Inficirane žene najčešće osećaju simptome slične gripu, koji prolaze spontano, pa veoma često infekcija listerijom prođe neopaženo.

LISTERIOZE KOD ZDRAVIH ODRASLIH OSOBA. Kod osoba sa normalnim imunitetom koje konzumiraju zaraženu hranu, javiće se gastroenteritis sa povišenom temperaturom. Simptomi se javljaju nakon 6-48 h od unosa hrane u organizam i manifestuju se kao glavobolja, bol u mišićima, bolovi u abdomenu, groznica i dijareja. Bolest se obično spontano smiri nakon tri dana i dođe do potpunog ozdravljenja. Kod imunokompromitovanih osoba, listerija može dovesti do meningitisa, bakterijemije, endokarditisa, a ređe su zahvaćeni drugi organi.

Procedura za dijagnostiku listerioze

Uzimanje uzorka. Za dijagnozu difterije uzima se cerebrospinalna tečnost ili uzorak hrane na koji se sumnja da je izvor listerioze.

Dijagnoza. Mikroskopija cerebrospinalne tečnosti ne daje značajne rezultate jer su ćelije obično prisutne u veoma maloj koncentraciji. Ukoliko Gram bojenje pokaže bakterije, one se vide kao Gram pozitivni intracelularni ili ekstracelularni kokobacili. Iz beta hemolitičkih kolonija dobijenih zasejavanjem uzorka, dalja potvrda radi se biohemijskim testovima (katalazna aktivnost i produkcija H₂S), gajenjem na niskoj temperaturi, potvrdom pokretljivosti na sobnoj temperaturi (ali ne i na temperaturi od 37 °C), kao i CAMP testom.

Kultivacija. Vršiti se na krvnom agaru na kome vrše slabu beta hemolizu, a rastu kao sitne okrugle kolonije. Ukoliko se u uzorku mogu nalaziti i drugi mikroorganizmi, tada je potrebna selektivna podloga i kultivacija u hladnim uskovima kako bi se omogućilo umnožavanje samo ove bakterije. U tečnoj podlozi na sobnoj temperaturi, ova bakterija kretanjem formira oblik koji u epruveti podseća na izvrnuti kišobran. Opisana pokretljivost zajedno sa beta hemolitičkom aktivnošću omogućavaju razdvajanje listerije od ostalih difteroida.