



ПРАКТИКУМ



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ



Др Вук Врачар

# МИКРОБИОЛОГИЈА – бактериологија

ПРАКТИКУМ

МИКРОБИОЛОГИЈА – БАКТЕРИОЛОГИЈА



Нови Сад, 2023

МИКРОБИОЛОГИЈА – бактериологија  
ПРАКТИКУМ

ДР ВУК ВРАЧАР, ДОЦЕНТ

НОВИ САД 2023

## ЕДИЦИЈА ПОМОЋНИ УЏБЕНИК

Оснивач и издавач едиције  
Универзитет у Новом Саду

Пољопривредни факултет, Нови Сад,  
Трг Доситеја Обрадовића 8, 2100 Нови Сад

Година оснивања 1954.

Главни и одговорни уредник едиције

др Недељко Тица, редовни професор  
Декан Пољопривредног факултета

Чланови Комисије за издавачку делатност

Проф. др Бранислав Влаховић, председник  
Проф. др Ивана Давидов, члан  
Доц. др Дејан Беуковић, члан  
Проф. др Ксенија Мачкић, члан

CIP - Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад  
ISBN 978-86-7520-604-0



Аутор

др Вук Врачар, доцент

Главни и одговорни уредник

др Недељко Тица, редовни професор  
Декан Пољопривредног факултета у Новом Саду

Уредник

др Вук Врачар, доцент

Технички уредник

др Вук Врачар, доцент

Рецензенти

др Весна Лалошевић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Нови Сад

др Лејла Велић, редовни професор  
Ветеринарски факултет, Сарајево

Издавач

Универзитет у Новом Саду,  
Пољопривредни факултет, Нови Сад

Забрањено прештампавање и фотокопирање. Сва права задржава издавач.

Штампа:

Штампање одобрила:

Комисија за издавачку делатност, Пољопривредни факултет, Нови Сад

Тираж: 20

Место и год. штампања: Нови Сад, 2023



## ПРЕДГОВОР

*Практикум из Микробиологије – бактериологије намијењен је студентима интегрисаних студија ветеринарске медицине на Департману за ветеринарску медицину, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду.*

*Сврха овог практикума је да помогне студентима у савладавању основних метода изолације и идентификације бактерија, као и да приближи тренутне информације и ставове о неким од најзначајнијих узрочника бактеријских обољења животиња, али и људи.*

*Захваљујем се свима који су на било који начин помогли израду овог практикума.*

*У Новом Саду,  
октобар, 2023.*

*Аутор*





# САДРЖАЈ

<b>ОПШТИ ДЕО</b> .....	1
<b>1.</b> .....	2
<b>Микробиолошка лабораторија</b> .....	2
1.1. ОСНОВНА ПРАВИЛА ПОНАШАЊА У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ .....	2
1.2. БИОСИГУРНОСТ У ЛАБОРАТОРИЈИ .....	3
1.3. ДЕКОНТАМИНАЦИЈА .....	3
1.4. ПРИБОР .....	4
1.5. ЛАБОРАТОРИЈСКА ОПРЕМА .....	5
1.6. МИКРОСКОП И МИКРОСКОПИРАЊЕ .....	6
<b>2.</b> .....	11
<b>Узгајање бактерија</b> .....	11
2.1. ИСХРАНА БАКТЕРИЈА .....	12
2.2. рН .....	13
2.3. ФИЗИЧКИ ФАКТОРИ РАСТА .....	14
2.4. РАСТ БАКТЕРИЈА .....	15
2.5. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ .....	16
2.6. ЗАСЕЈАВАЊЕ БАКТЕРИЈА .....	21
<b>3.</b> .....	26
<b>Идентификација бактерија</b> .....	26
3.1. ПРИМАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	26
3.2. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	26
<b>4.</b> .....	31
<b>Микроскопски препарати</b> .....	31
4.1. НЕОБОЈЕНИ – НАТИВНИ ПРЕПАРАТИ .....	31
4.2. ОБОЈЕНИ ПРЕПАРАТИ .....	31
4.3. ПРАВЉЕЊЕ ПРЕПАРАТА .....	34
4.4. ТЕХНИКЕ БОЈЕЊА .....	35
4.5. ПОСТУПЦИ БОЈЕЊА .....	36
<b>5.</b> .....	41
<b>Биохемијска идентификација</b> .....	41
5.1. ФЕРМЕНТАЦИЈА УГЉЕНИХ ХИДРАТА .....	41
5.2. ОДРЕЂИВАЊЕ СТВАРАЊА КАТАЛАЗЕ .....	42
5.3. ТЕСТ С КАЛИЈУМ ХИДРОКСИДОМ .....	43
5.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОКРЕТЉИВОСТИ .....	43
5.4. ТЕСТ ПРОДУКЦИЈЕ ИНДОЛА .....	44
5.5. МЕТИЛ-ЦРВЕНО ТЕСТ (MR) .....	44
5.6. VOGES PROSKAUER ТЕСТ (VP) .....	44
5.7. ТЕСТ КОРИШЋЕЊА ЦИТРАТА .....	44
5.8. САМР ТЕСТ .....	45
5.9. ГОТОВИ БИОХЕМИЈСКИ ТЕСТОВИ .....	45
5.10. ЧУВАЊЕ БАКТЕРИЈСКИХ КУЛТУРА .....	45

<b>6.</b> .....	48
<b>Испитивање антимикробне осетљивости</b> .....	48
6.1. ДИСК ДИФУЗИОНИ МЕТОД .....	48
6.2. ДИЛУЦИОНИ МЕТОД.....	50
6.3. Е-ТЕСТ.....	50

## СПЕЦИЈАЛНИ ДЕО .....

<b>7.</b> .....	54
<b>Genus <i>Staphylococcus</i></b> .....	54
7.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	54
7.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	55
7.3. ОБОЉЕЊА .....	55
7.4. УЗОРЦИ.....	55
7.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	56
7.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	56
7.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	56
7.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	57
<b>8.</b> .....	59
<b>Genus <i>Streptococcus</i></b> .....	59
8.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	59
8.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	60
8.3. ОБОЉЕЊА .....	60
8.4. УЗОРЦИ.....	61
8.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	61
8.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	62
8.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	62
8.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	63
<b>9.</b> .....	65
<b>Genus <i>Bacillus</i></b> .....	65
9.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	65
9.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	66
9.3. ОБОЉЕЊА .....	66
9.4. УЗОРЦИ.....	66
9.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	66
9.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	67
9.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	68
9.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	69
<b>10.</b> .....	71
<b>Genus <i>Mycobacterium</i></b> .....	71
10.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	71
10.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	72
10.3. ОБОЉЕЊА .....	72
10.4. УЗОРЦИ.....	73
10.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	73
10.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	74
10.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	75
10.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	76
<b>11.</b> .....	78
<b>Ordo <i>Enterobacterales</i></b> .....	78

11.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РЕДА .....	78
11.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	79
11.3. ОБОЉЕЊА .....	79
11.4. УЗОРЦИ .....	80
11.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	80
11.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	80
11.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	81
11.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	82
11.9. GENUS <i>YERSINIA</i> .....	83
11.10. GENUS <i>KLEBSIELLA</i> .....	84
11.11. GENUS <i>PROTEUS</i> .....	86
<b>12.</b> .....	88
<b>Genus <i>Escherichia</i></b> .....	88
12.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	88
12.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	89
12.3. ОБОЉЕЊА .....	89
12.4. УЗОРЦИ .....	89
12.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	90
12.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	90
12.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	90
12.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	92
<b>13.</b> .....	93
<b>Genus <i>Salmonella</i></b> .....	93
13.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	93
13.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	94
13.3. ОБОЉЕЊА .....	94
13.4. УЗОРЦИ .....	95
13.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	95
13.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	96
13.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	97
13.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	99
<b>14.</b> .....	100
<b>Genus <i>Clostridium</i></b> .....	100
14.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА .....	100
14.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ .....	101
14.3. ОБОЉЕЊА .....	101
14.4. УЗОРЦИ .....	102
14.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ .....	102
14.6. ИЗОЛАЦИЈА .....	103
14.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА .....	104
14.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА .....	105
<b>Литература</b> .....	106



# ОПШТИ ДЕО

1. Микробиолошка лабораторија
2. Узгајање бактерија
3. Морфолошка идентификација
4. Микроскопски препарати
5. Биохемијска идентификација
6. Испитивање антимикробне осетљивости

## 1.

## Микробиолошка лабораторија

**М**икробиолошка лабораторија је специјализована лабораторија дизајнирана за спровођење истраживања на микроорганизмима. Овакве лабораторије опремљене су инструментима и апаратима за безбедно руковање микроорганизмима. Основни задатак микробиолошких лабораторија је изолација микроорганизама у чистој култури и њихово чување, ради проучавања њихових културелних, биохемијских и генетских особина. Изолација и култивација микроорганизама које се спроводе у микробиолошкој лабораторији важне су с два аспекта, клиничког за свакодневно управљање инфекцијама и епидемиолошког за откривање извора и путева преношења инфекције у циљу спречавања њеног ширења. Неке инфекције, попут сепсе, не захтевају трепетно познавање узрочника или његову осетљивост на антибиотике, већ се брзо дијагностикују клинички и третирају емпиријски. Дијагноза неких обољења може се поставити на основу клиничког прегледа, ипак, за највећи број неопходни су лабораторијска испитивања да би се потврдила клиничка дијагноза или сумња на инфекцију. Многе патогене бактерије стекле су отпорност на антибиотике стога је постављање етиолошке дијагнозе од изузетног значаја ради прописивања циљане антимикробне терапије.

### 1.1. ОСНОВНА ПРАВИЛА ПОНАШАЊА У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ

Велики број микроорганизама који се изолују у микробиолошкој лабораторији могу бити патогени за човека, стога се током боравка у лабораторији треба придржавати основних правила понашања.

Током боравка у лабораторији обавезно је ношење мантила, а у случају рада с веома патогеним и лако преносивим микроорганизмима, обавезно је ношење и друге заштитну опреме као што су рукавице, заштитне наочаре, хируршка капа, назувци и заштитна маска. Не сме се носити отворена обућа. Пре и након

завршеног рада у микробиолошкој лабораторији обавезно се перу руке, без обзира да ли се носе заштитне рукавице или не. Дуга коса мора бити завезана како би се спречило да се нехотице контаминира или запали на отвореном пламену, а рукама се не смеју додиривати очи, нос и уста. У микробиолошкој лабораторији се не смеју конзумирати храна, пиће. Предмети и ствари који нису намењени микробиолошким испитивањима не смеју се уносити у лабораторију.

Радне површине морају се редовно чистити и дезинфиковати, по потреби и више пута дневно, а увек пре и након завршетка рада. Дезинфекција се врши средствима која не оштећују површине на којима се примењују.

Целокупан контаминирани материјал, који остаје након завршетка рада, мора се прописно одложити у непропусну амбалажу отпорну на високе температуре и најчешће се деконтаминира стерилизацијом у аутоклаву на температури од 121° C током 15-20 минута. За деконтаминацију, поред аутоклавирања, примењују се још UV светло и хемијска средства, а ови начини су нарочито погодни за третирање већих површина (радне површине, подови и др.).

Стерилизација бактериолошких еза врши се жарењем на пламену, што се увек ради пре и након употребе. У случају да се користе стерилне пластичне езе није их потребно стерилисати на пламену, али се оне могу користити само једнократно, а након употребе се прописно одлажу и након тога аутоклавирају.

## 1.2. БИОСИГУРНОСТ У ЛАБОРАТОРИЈИ

Лабораторијска биосигурност је широк појам који се односи на скуп превентивних мера за сигурно руковање сојевима патогених микроорганизама и опасним биолошким отпадним материјалом. У односу на активности и испитивања која се спроводе у микробиолошкој лабораторији разликујемо 4 нивоа биосигурности.

Лабораторије I нивоа биосигурности прикладне су за рад који укључује добро познате узрочнике за које није познато да изазивају обољења код здравих одраслих људи и тиме представљају минималну потенцијалну опасност за лабораторијско особље и околину. У овим лабораторијама врши се дијагностика узрочника попут *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и вируса инфективног хепатитиса паса.

Већина клиничких микробиолошких лабораторија класификована је као лабораторија II нивоа биосигурности. То значи да се у њој врши дијагностика добро познатих узрочника који не изазивају озбиљна обољења или обољења која се не могу лечити код здравих одраслих

особа и представљају само умерену опасност по особље у лабораторији и по околину. Ови узрочници преносе се ингестијом, инокулацијом или преко слузокожа, а иако се генерално не преносе ваздухом опрез је неопходан како не би дошло до стварања аеросола. У лабораторијама II нивоа биосигурности врши се дијагностика узрочника као што су *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* врсте, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Helicobacter pylori*, већина *Salmonella* врста., *Yersinia pestis* и других.

Трећи ниво биосигурности имају лабораторије које врше дијагностику узрочника који могу изазвати озбиљна или потенцијално фатална обољења код здравих одраслих особа након инхалације, али за које постоје вакцине или неки други третман. У овим лабораторијама врши се дијагностика узрочника као што су *Salmonella Typhi*, вирус везикуларног стоматитиса, вирус жуте грознице, *Francisella tularensis* и *Coxiella burnetti*.

Највиши IV ниво биосигурности имају лабораторије које рукују опасним /егзотичним и лако преносивим патогеним микроорганизмима, који представљају ризик за обољења опасна по живот. Ови узрочници имају потенцијал за пренос аеросолом, најчешће имају ниску инфективну дозу и изазивају врло озбиљна и често фатална обољења за која генерално нема доступних вакцина или терапије. У овим лабораторијама врши се дијагностика узрочника као што су вирус слинавке и шапа и вирус еболе.

## 1.3. ДЕКОНТАМИНАЦИЈА

Деконтаминација је процес или третман који прибор, опрему или површину чини сигурним за руковање.

**Чишћење** је најнижи степен контроле микроорганизама и дефинише се као смањење броја патогених микроорганизама до нивоа у којој су опрема и прибор сигурни за руковање и није потребно ношење заштитне одеће. Овај процес



најчешће подразумева физичко чишћење сапунима или детерџентима и уклањање већине органског и неорганског материјала. Ово је уједно и први корак ка дезинфекцији или стерилизацији инструмената и површина. Да би средства за дезинфекцију и стерилизацију деловала морају доћи у директан контакт са свим присутним патогеним микроорганизмима, који могу бити заштићени заосталом осушеном материјом на површинама.

**Дезинфекција** је следећи степен контроле патогених микроорганизама и подељен је на 3 поднивоа и то низак, средњи и висок, у односу на њихову ефикасност. Дезинфекцијом се најчешће убија већина, ако не и све вегетативне форме бактеријских ћелија, али се овим поступком најчешће не убијају споре. Дезинфицијенси су најчешће течни хемијски агенси, али могу бити и у чврстом и гасовитом стању. Други методи дезинфекције укључују физичке агенсе попут UV светла, као и суве и влажне топлоте. Антисептици су дезинфицијенси који се користе за смањење броја патогених микроорганизама који живе на или у ткивима.

**Стерилизација** је највиши ниво контроле патогена и представља комплетну елиминацију живих организама укључујући и њихове споре. Стерилизација се постиже хемикалијама, гасовима, сувом и влажном топлотом, јонизујућим зрачењем и још неким физичким и хемијским поступцима.

#### 1.4. ПРИБОР

Многи инструменти и апарати неопходни су за рад у микробиолошкој лабораторији и ту спадају:

**Микробиолошка еза** (Слика 8.1.) је најчешће коришћен прибор у микробиолошкој лабораторији. Служи за култивацију бактерија на хранљиве подлоге, за пресејавање колонија и бујонских култура, за прављење микроскопских размаза и др. Еза се састоји од челичне жице која је утакнута у дршку отпорну на топлоту. У зависности од облика врха челичне жице, разликујемо омчасту езу на чијем крају се налази омча пречника најчешће 4 мм и убудну езу која има изглед игле.

За трансфер бактерија најчешће се користи омчаста еза, док за се убудна еза користи за инокулацију у добоке агаре и за узимање малог дела колоније из мешане културе на чврстим подлогама.

**Пламеник** је извор отвореног пламена који се користи за стерилизацију микробиолошких еза, као и за опаљивање рубова епрувета и ерленмајера током инокулације и разливања подлога. Пламен такође стерилише и околни ваздух, па пресејавање бактеријских култура треба изводити уз пламеник у циљу смањења контаминације из окружења. Најчешће коришћен модел пламеника је Bunsen-ов пламеник.

**Petri плоча** је плитка, провидна, округла посуда састављена од базе и поклопца, а израђена од стакла или пластике. У базу Petri плоче ставља се танак слој хранљиве



Слика 1.1. Омчаста бактериолошка еза (горе) и бактериолошка еза за једнократну употребу (доле) с омчастим и убудним крајем

ве подлоге која служи за узгајање бактерија и гљивица, док поклопац спречава контаминацију подлоге из ваздуха.

**Епрувете** су неизоставан део прибора у свакој микробиолошкој лабораторији. То су стаклене или пластичне, провидне цеви, које су отворене на врху и имају затворено дно. У микробиологији се примењују за култивацију у течним културама, за чување бактеријских култура, извођење биохемијских реакција, серолошких реакција, узимање течних узорака и друго. Могу бити различитих димензија, али се у бактериологији најчешће користе оне димензија 160×10-16 mm. Епрувете се затварају чеповима, који су најчешће метални или гумени.

**Предметно стакло** или предметница је плочица направљена од стакла, која служи за прављење микроскопских препарата. Величина предметних стакала најчешће је 76×26×1 mm.

**Покровно стакло** или покровница је стаклена плочица која служи за прекривање препарата, квадратног је облика чије су најчешће димензије 22×22 mm, а дебљина свега 0,17 mm.

**Пипете** су прибор за манипулацију течностима, капацитета обично између 1 и 10 ml. Могу бити стаклене када се примењују вишестрано или пластичне које служе за једнократну употребу. Пипетирање материјала (увлачење течности у пипету) у микробиолошкој лабораторији нипошто се не врши устима, већ искључиво уз помоћ пипетора.

**Микропипете** представљају полуаутоматски инструменти који служе за прецизну манипулацију малим количинама материјала у течном стању, попут бујонских култура или реагенаса. Захваљујући пластичним наставцима за једнократну употребу, који могу бити различитог капацитета (0,5 – 1000 µl), смањује се могућност унакрсне контаминације током рада.

## 1.5. ЛАБОРАТОРИЈСКА ОПРЕМА

Основни апарати за рад у микробиолошкој лабораторији су:

**Инкубатор** је уређај који осигурава жељену температуру за *in vitro* узгој микроорганизама. Састоји се од коморе с двоструким металним зидовима. Термостат контролише температуру инкубатора и искључује довод топлоте кад инкубатор постигне потребну температуру.

**Лонац за анаеробе** је посуда направљена од дебелог стакла или поликарбоната, капацитета 2,5–3,5 литара, која има поклопац за херметичко затварање.

**Аутоклав** је део опреме у микробиолошкој лабораторији који служи за стерилизацију воденом паром под притиском. Стерилизација почиње од момента кад се постигне жељена температура у апарату, а траје обично 15-20 минута, некад и дуже, на температури од 120° C и притиску од 1 атмосфере. Примарна улога аутоклава је стерилизација хранљивих подлога и прибора. Новији модели аутоклава су дигитални, док се на старијим жељени параметри подешавају ручно.

**Центрифуга** је лабораторијски уређај који служи за раздвајање течности (супернатанта) и чврсте материје (седимента) на основу њихове густине. Ово раздвајање се постиже ротацијама великом брзином, при чему настаје центрифугална сила која тежу материју потискује ка дну суда (најчешће епрувете) у којој се налази материјал.

**pH метар** је уређај за мерење вредности pH раствора.

**Фрижидер** служи за чување бактеријских култура, хранљивих подлога и реагенаса који захтевају нижу температуру чувања.

**Замрзивач** служи за дуготрајније чување бактеријских култура при температурама од -20° C до -80° C.

**Лиофилизатор** је уређај за вакуумско сушење, када при сниженом притиску и веома ниској температури, лед прелази у гас без прелажења леда у течност, па у гас. У бактериологији се користи за дехи-

драцију бактерија што омогућава дуго-трајно чување бактеријских културе.

**Биосигурносни кабинети** служе као примарна баријера од излагања инфективним микроорганизмима. Употребљавају се најчешће приликом припреме стерилних хранљивих подлога, за асептичну манипулацију материјалом и култивацију. Подељени су на различите нивое биосигурности у зависности од врсте микроорганизма, али и токсина, којима се рукује у лабораторији. Нивои биолошке сигурности (BSL) осигуравају услове за сигурно руковање микроорганизмима. Постоје четири различита нивоа биолошке сигурности; BSL1, BSL2, BSL3 и BSL4. BSL4 имају кабинети у којима се рукује најопаснијим микроорганизмима који изазивају обољења опасна по живот, док се у кабинетима BSL1 рукује микроорганизмима који могу изазвати благе инфекције.

## 1.6. МИКРОСКОП И МИКРОСКОПИРАЊЕ

Микроскоп је оптички лабораторијски инструмент који служи за посматрање објеката иначе невидљивих „голим оком“. Ово се постиже применом система сочива за оптичко увеличавање. Постоје два типа микроскопа и то светлосни и електронски микроскоп.

### 1.6.1. СВЕТЛОСНИ МИКРОСКОП

Под светлосним микроскопом подразумевамо било који микроскоп који користи видљиво светло за посматрање препарата. Због великог распона или флукуације оптичке таласне дужине, немогуће је било каквим оптичким инструментима створити савршену слику природног објекта, чак и ако су отклоњени сви недостаци у облику при производњи оптичког сочива. Зато је микроскопима, који користе изворе светлости унутар распона видљиве оптичке таласне дужине, просторна резолуција ограничена на 0,2  $\mu\text{m}$ . Дакле, структуре мање од 0,2  $\mu\text{m}$

не могу се разликовати овом врстом микроскопа.

Сваки светлосни микроскоп састоји се од оптичког и механичког дела.

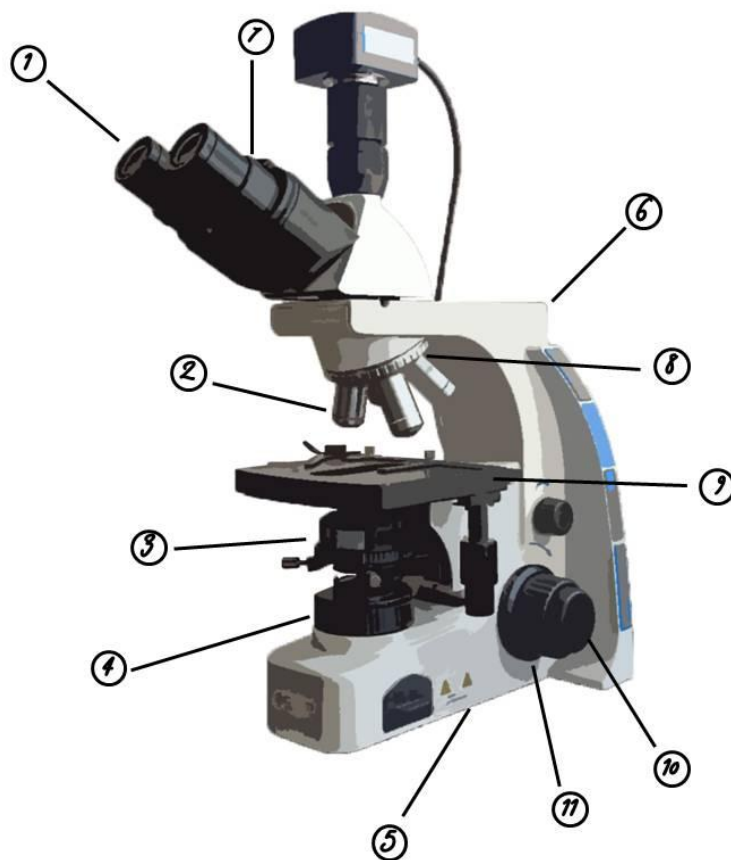
Оптички део микроскопа чине објективи, окулари, кондензори, бленда и филтери и камера код новијих модела (Слика 8.1).

**Окулар** је оптички део смештен на горњем крају тубуса. У њему се обично налази систем од два сочива, горњег очног и доњег сабирног сочива. Окулари најчешће имају способност увеличања од 10 или 15 $\times$ .

**Објектив** је један од најважнијих делова микроскопа, који је најодговорнији за квалитет слике, јер се у њему налазе сочива која су најближе узорку. Стандардни микроскоп има три, четири или пет објектива чија се моћ увеличавања креће од 4 $\times$  до 100 $\times$ . Приликом фокусирања микроскопа пази се да сочива објектива не додирују предметно стакло, јер би могла сломити стакло и уништити препарат. Увеличање микроскопа добија се множењем увеличања окулара и објектива који се користи, па тако окулар способности увеличања 10 $\times$  и објектив способности увеличања 100 $\times$  дају увеличање микроскопа од 1000 $\times$ . У бактериологији при рутинском раду најчешће се користи увеличање од 1000 $\times$ . Код објектива разликујемо два типа, суви и имерзиони. Разлика између микроскопирања, применом ова два типа објектива, је да имерзиона течност која се ставља између имерзионог објектива и препарата смањује расипање и одбијање светла од узорка и повећава способност објектива да ухвати ово иначе искривљено светло. На овај начин постиже се јаснија слика.

**Кондензор** је смештен испод сталка на који се поставља препарат, а изнад извора светлости. Служи за концентрацију и усмеравање светлости према посматраном препарату. Може се померати у смеру горе-доле чиме се утиче на интензитет осветљења препарата.

**Бленда** смештена је испод кондензора, а њеним отварањем и затварањем контро-



Слика 1.2. Делови микроскопа

Оптички делови:

1. окулар
2. објектив
3. кондензор
4. бленда

Механички делови:

5. постоље
6. статив
7. тубус
8. ротор
9. сталак
10. микр. завртањ
11. макр.завртањ

лише се угао снопа светлости, односно обезбеђују се правилно осветљење, као и контраст и дубина поља.

У механичке делове микроскопа спадају статив, тубус, ротор, сталак и микрометарски и макрометарски завртањ (Слика 1.2.).

**Постоље** служи за стабилан положај микроскопа, а у њему се налази извор светлости.

**Статив** има функцију носача тубуса и ручке за померање и преношење микроскопа.

**Тубус** је цев на чијем се горњем крају налазе окулари, а на доњем ротор с објективима.

**Ротор** је покретни механички део на ком се налазе објективи и чијим окретањем се подешава објектив са жељеним увећањем.

**Сталак** је равна платформа на коју се постављају препарати. Отвор на средини сталка омогућава пролазак светлости ка препарату. Поседује и систем за фиксирање препарата и његово померање у смеру десно-лево.

**Микрометарски и макрометарски завртањ** служе за померање сталка у смеру горе-доле у сврху проналаска и изоштравања слике.

Код светлосне микроскопије разликујемо више техника микроскопирања:

- микроскопирање у светлом пољу
- микроскопирање у тамном пољу
- фазноконтрастну микроскопију
- флуоресцентну микроскопију и
- конфокалну микроскопију.

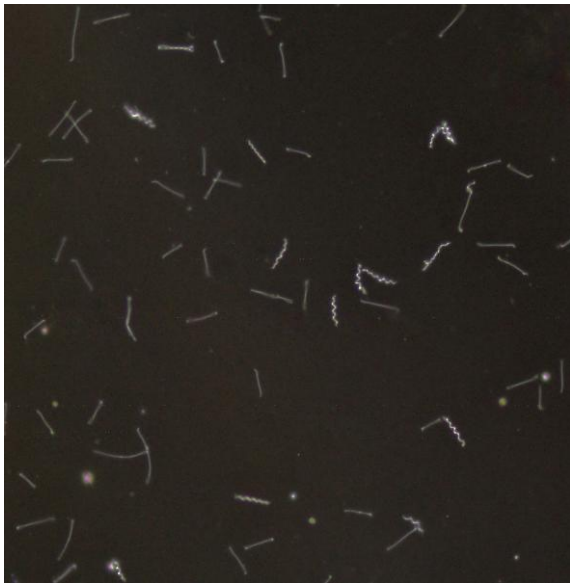
### 1.6.1.1. Микроскоп са светлим пољем

Овај инструмент садржи систем од два стандардна сочива за увећавање

узорака: окуларно сочиво у окулару и сочиво објектива смештено на ротору. Узорак је осветљен снопом волфрамове светлости која је на њега фокусирана стандардним кондензором. Резултат је узорак који изгледа тамно на светлој позадини. Велико ограничење овог система је недостатак контраста између узорка и његовог окружења, што отежава посматрање живих ћелија. Стога се већином овај тип микроскопа користи за посматрање обојених препарата.

#### 1.6.1.2. Микроскоп с тамним пољем

Микроскоп с тамним пољем заправо је само мало модификован микроскоп са светлим пољем. Основна разлика је у коришћењу другачијег типа кондензора. Користи се кондензор за тамно поље, који у себи садржи непрозирни диск који блокира светлост директно испод узорка тако да светлост до узорка допире са стране.



Слика 1.3. Мешана култура борелија и лептоспира у тамном пољу

Услед тога сочиво објектива прикупља само светлост коју је узорак рефлектовао или преломио, што резултира ћелијама које изгледају светле на тамној позадини, одакле и потиче израз "тамно поље". То омогућава посматрање живих, необојених ћелија што је посебно корисно за

посматрање покретљивост или органела еукариотских ћелија. Микроскопијом у тамном пољу најчешће се прегледају културе спирохета, лептоспира, кампилобактера (Слика 1.3.).

#### 1.6.1.3. Фазно-контрастни микроскоп

Фазно-контрастни микроскоп такође је модификовани микроскоп са светлим пољем. Овај микроскоп такође користи другачији тип кондензора, који у себи садржи непрозирни прстен, пропуштајући тако прстенасти сноп светлости. Принцип овог микроскопа заснива се на незнатној промени индекса преламања светлости и чињеници да ћелије имају другачији индекс преламања од своје околине, што резултира светлом које се мало разликује у контрасту. Разлика је појачана фазним прстеном који се налази у посебном фазном објективу. Фазне разлике могу се превести у разлике у контрасту, што резултира тамном сликом на светлој позадини. То омогућава директно посматрање живих ћелија, без претходног бојења које би их оштетило, што је опет корисно за проматрање покретљивости бактерија или детаљније истраживање структуре микроорганизама.

#### 1.6.1.4. Флуоресцентни микроскоп

Флуоресцентни микроскоп је тип светлосног микроскопа који се користи за посматрање препарата обојених флуоресцентним бојама – флуорохромима или микроорганизама који природно емитују флуоресценцију. Овај тип микроскопа поседује живину лампу која производи светло кратких таласних дужина, најчешће UV, којом се осветљава испитивани узорак. Флуорохроми унутар узорка одбијају светло краћих таласних дужина у виду светлости дужих таласних дужина, које се налазе у видном делу спектра. У зависности од коришћене боје и филтера микроорганизме видимо као флуоресцирајуће светло одређене боје на тамној позадини, па тако бактерије



обележене флуоресцин-изитиоцијанатом светле зелено.

Главна употреба флуоресцентне микроскопије је дијагностичка техника која се назива имунофлуоресценција, а која се користи за откривање антигена (директна имунофлуоресценција) и антитела (индиректна имунофлуоресценција).

### 1.6.2. ЕЛЕКТРОНСКИ МИКРОСКОП

Један приступ повећању просторне резолуције микроскопа је смањење оптичке таласне дужине применом снопа електрона уместо извора видљиве светлости. Према de Broglie-овој теорији таласа материје, кретање електрона слично је по природи флукуацији оптичког таласа. Што се електрони брже крећу, то је краћа "таласна дужина" ослобођене енергије. Ако се електрони могу довољно убрзати и ослобођена енергија може конвергирати, покретни електронски сноп такође може повећати објекте посматрања. Будући да се електрони могу убрзати до врло велике брзине, просторна резолуција електронских микроскопа досеже до 0,3 nm. Као резултат тога, многи објекти (нпр. вируси) невидљиви под оку видљивом светлом постају "видљиви" под електронским микроскопом.

Код електронског микроскопа разликујемо два типа микроскопије и то трансмисиону и скенирајућу електронску микроскопију.

У трансмисионом електронском микроскопу, електрони пролазе кроз узорак и распршују се. Магнетна сочива фокусирају слику на флуоресцентни екран или фотографску плочу.

У скенирајућем електронском микроскопу, примарни електрони прелазе преко узорка и избацују електроне с његове површине. Ове секундарне електроне скупља колектор, појачава их и преноси на екран за гледање или фотографску плочу.

### 1.6.3. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА

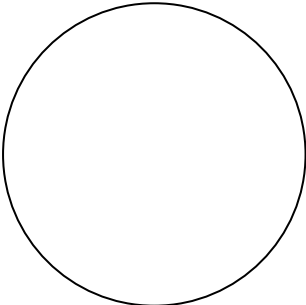
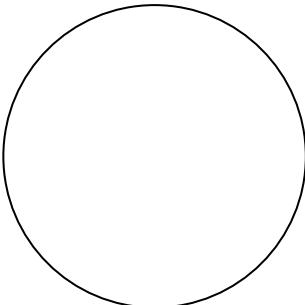
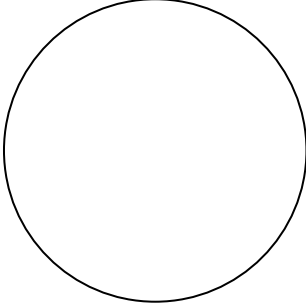
1. Укључити светло микроскопа
2. Отворити бленду на кондензору
3. Подигнути кондензор
4. Подесити објектив с најмањим увеличањем
5. Померањем макрозавртња подићи сталак
6. Поставити препарат на отвор на сталку
7. Померањем макро завртња наћи видно поље
8. Померањем микрозавртња изострити слику
9. Померањем ротора, по потреби, подешава се објектив с већим увеличањем. У случају коришћења имерзионог објектива на препарат претходно стави кап имерзионе течности.
10. Након завршетка микроскопирања окренути ротор тако да објектив с најмањим увеличањем стоји у вертикалном положају, склонити препарат, спустити сталак, а затим и кондензор, затворити бленду на кондензору и искључити светло микроскопа.
11. Након завршетка рада с микроскопом очистити окуларе, објектив и кондензор. У случају коришћења имерзионог објектива, објектив се обавезно чисти ксилолом у случају коришћења имерзионог уља или алкохолном у случају коришћења парафина.
12. Прекрити микроскоп.

# Практични рад

## Потребни материјал:

3 препарата  
светлосни микроскоп  
имерзионо уље  
ксилол  
вата

Нацртати и написати своја запажања.

Препарат			
Нацртати препарат			
Описати препарате	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>

## 2.

## Узгајање бактерија

Лабораторијска култивација патогених микроорганизама је срж дијагностике инфективних обољења изазваних бактеријама, а добијање бактерије у чистој култури је кључно за проучавање њене вирулентности, осетљивости на антибиотике и секвенце генома, како би се олакшало разумевање и лечење обољења које узрокују.

Популација бактерија узгајана у лабораторији назива се бактеријска култура. Бактеријска култура која садржи само једну врсту назива се чиста култура, док се оне са две или више врста називају мешане културе. Микроорганизми у природи не живе у чистој култури, они постоје као део сложених екосистема који се састоје од бројних других микроорганизама. Стога, први корак у узгоју микроорганизама је изолација чистих култура. Управо је проучавање чистих бактеријских култура омогућило одређивање особина одређеног организма, као што су његове метаболичке карактеристике или способност да изазове одређену болест. Такође је створило могућност класификације микроорганизама, на основу карактеристика које показују у чистој култури.

Раст бактерија и њихово преживљавање зависе од способности бактеријске ћелије да осети своје окружење и одговори на спољне стимулусе. Стимулуси могу потећи из више извора укључујући нутријенте потребне за раст, присуство секундарних метаболита, као и присуство других микроорганизама. Сви организми ослањају се на то да ће им окружење обезбедити ресурсе и услове неопходне за раст. Вероватно најочигледнија потреба организма је храна, али концепт хране је много комплекснији и он подразумева енергију и извор бројних елемената које називамо акронимом СНОРК(i)NSCaFe. Иако је одсуство било ког нутритивног захтева довољно да спречи раст бактерија, од највећег значаја су 3 елемента и то угљеник, кисеоник и азот. Неки микроорганизми могу *de novo* ("од нуле") синтетисати одређене органске молекуле који су им потребни, све док су им доступни извор угљеника и неорганске соли. Остали микроорганизми захтевају да одређене органске компоненте постоје у њиховом окружењу. Ови органски молекули, неопходни за раст, називају се фактори раста и деле се у три категорије: 1) аминокиселине, 2) пурини и пиримидини и 3) витамини.

Култивација микроорганизама, осим нутријената зависи и од низа других биолошких, хемијских и физичких фактора попут влажности, температуре, рН и дужине инкубације.



## 2.1. ИСХРАНА БАКТЕРИЈА

### 2.1.1. МАКРОНУТРИЈЕНТИ

Осим угљеника, водоника и кисеоника, ћелије требају још неколико елемената у довољној количини. Наиме, ћелијама је потребан азот за стварање протеина, нуклеинских киселина и неколико других ћелијских компоненти. Ћелијама је такође потребан фосфор, који је кључна компонента нуклеинских киселина, фосфолипида и аденозин трифосфата или АТР-а. Сумпор је неопходан за неколико аминокиселина, као и неколико витамина, калијум је потребан за ензиме, док се магнезијум користи за стабилизацију рибозома и мембране. Заједно се ти елементи (укључујући С, Н и О) називају макронутријентима.

#### 2.1.1.1. Потребе за угљеником

Микроорганизми се могу поделити у две велике групе у односу на њихову способност да користе различите изворе угљеника. Тако разликујемо аутотрофе и хетеротрофе. Аутоτροφни микроорганизми за синтезу нове органске материје користе неорганске изворе угљеника ( $\text{CO}_2$  и минералне материје), користећи било светлосну енергију, када их зовемо фотоаутотрофи или хемијску енергију из редукованих молекула из спољашње средине, када их називамо хемоаутотрофи.

Хетеротрофи с друге стране, своју хемијску енергију добијају из већ постојећих органских молекула. Они такође могу користити енергију светлости или хемијску енергију, када их називамо фотохетеротрофи или хемохетеротрофи.

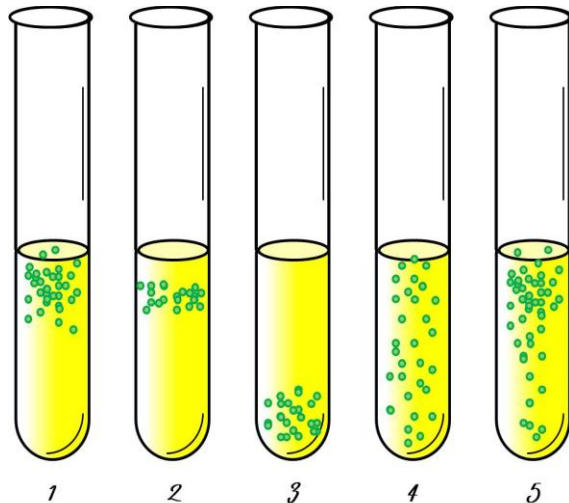
Организми који користе органске изворе материје називају се органотрофи, док се организми који користе неорганске изворе називају литотрофи.

Сви патогени микроорганизми, како они опортунистички, тако и стриктни патогени, су хетеротрофи, при чему највећи број њих припада сапрофитима тј. микроорганизмима који се хране мртвом органском материјом.

#### 2.1.1.2. Потребе за кисеоником

Микроорганизми показују велику разноликост у својој способности коришћења слободног кисеоника ( $\text{O}_2$ ) за ћелијско дисање, што је условљено типом метаболизма који врше, па се могу сврстати у пет група у односу на њихове потребе за кисеоником (Слика 2.1.).

**Облигатни аероби** захтевају присуство атмосферског  $\text{O}_2$  (21%) за раст. Ови патогени нису чести, међутим неке од њих налазимо у горњим партијама респираторног тракта. Врсте од значаја у ветеринарској медицини су оне из родова попут *Mycobacterium* и *Bacillus*, као и гљивице.



Слика 2.1. Подела бактерија у односу на потребе за кисеоником. 1 облигатни аероби, 2 микроаерофили, 3 облигатни анаероби, 4 аеротолерантни анаероби, 5 факултативни анаероби

**Микроаерофили** захтевају ниске концентрације атмосферског кисеоника за раст и расту при уделу  $\text{O}_2$  од 2-10% у атмосфери. Само неке од бактерија су микроаерофили, али неке од њих су важни узрочници обољења животиња, попут *Brucella*, *Actynomices* и *Campylobacter* врста.

**Облигатни (стриктни) анаероби** могу расти само у одсуству кисеоника. За микроорганизме из ове групе мале кон-

центрације  $O_2$  у атмосфери су леталне. Најпознатији облигатни анаероби који су од значаја у ветеринарској медицини спадају у три рода и то *Clostridium*, *Bacteroides* и *Fusobacterium*.

**Аеротолерантни анаероби** су ферментативни организми и с тога  $O_2$  није потребан за раст, али толеришу његово присуство у атмосфери. У ову групу спадају бактерије из родова *Lactobacillus* и *Streptococcus*.

**Факултативни анаероби** су најсвестранији и могу расти у атмосфери са или без  $O_2$  мењајући свој метаболизам у складу с околином. Међутим, радије расту у присуству  $O_2$ , будући да аеробно дисање ствара највећу количину енергије и омогућава бржи раст. Много је факултативних бактерија повезаних са телом животиња. На пример, бактерије које се обично налазе на кожи животиње или унутар њених црева често су факултативно анаеробне. Ове су бактерије уобичајени опортунистички патогени који узрокују инфекције ткива када су кожа и слузокожа оштећене. У ову групу спадају бактерије из великог броја родова попут *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella* и других.

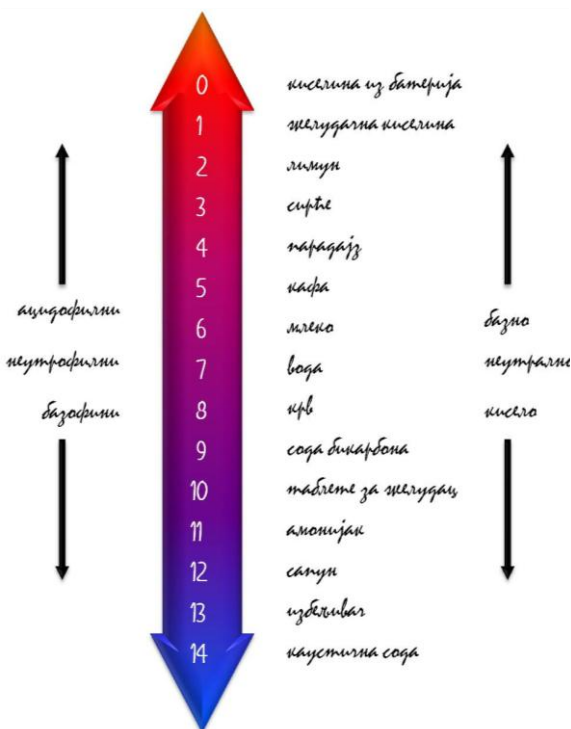
### 2.1.1.3. Концентрација $CO_2$

Свим микроорганизмима је неопходан угљендиоксид како за преживљавање, тако и за раст. Он се обезбеђује или егзогено, односно из атмосфере у којој се нормално налази 0,03%  $CO_2$ , или ендогено тј. унутар ћелије декарбоксилацијом током катаболизма. Неки микроорганизми у лабораторијским условима раст започињу и брже се размножавају када су концентрације  $CO_2$  повишене у односу на ону која се нормално налази у атмосфери. Микроорганизми које карактерише овај феномен називају се капнофилни и јавља се код многих бактерија од значаја у ветеринарској медицини. Типичне капнофилне врсте налазе се у родовима попут *Campylobacter* и *Brucella*. Тако нпр. за *C. jejuni* и *C. fetus* оптимална

атмосфера садржи 6%  $O_2$ , 10%  $CO_2$  и 84%  $N_2$ .

## 2.2. pH

Концентрација јона водоника у неком раствору назива се pH (лат. *pondus hydrogenii* – количина водоника). Чиста вода има pH 7 (Слика 2.2.).



Слика 2.2. pH скала и вредности pH у различитим срединама

Уобичајено је да ћелије преферирају pH који је сличан њиховој унутрашњости, при чему цитоплазма има неутралан pH 7,2. Ово би значило да су микроорганизми **неутрофилни**, односно да преферирају pH у опсегу од 5,5 до 8,0. Међутим, постоје и они који су еволуирали да живе у окружењу с екстремним pH и то:

**Ацидофилни** преферирају pH средине у опсегу од 0 до 5,5, морају користити различите механизме за одржавање унутрашњег pH у прихватљивим границама и за очување стабилности њихове плазма мембране. *Acidithiobacillus thiooxidans* опстаје у средини чији је pH свега 0,5.

**Алкалифилни** преферирају pH средине у опсегу од 8,0 до 11,5, морају пумпати

протоне, како би одржали рН своје цитоплазме. Алкалофилне бактеријске врсте налазе се у родовима попут *Vibrio* и *Bacillus*.

## 2.3. ФИЗИЧКИ ФАКТОРИ РАСТА

Бактерије и други микроорганизми имају лимитирану контролу над унутрашњошћу ћелије, јер за разлику од еукариота који су развили софистициране интерне контролне механизме, они су у потпуности зависни од спољних фактора. Тако мале промене у окружењу могу значајно променити и способност микроорганизма да транспортује материје кроз ћелијску мембрану, али и да обавља комплексне ензимске реакције и да одржи одговарајући цитоплазматски притисак.

### 2.3.1. ТЕМПЕРАТУРА

Температура је један од најзначајнијих фактора животне средине који утиче на раст и преживљавање микроорганизма. На ниским температурама метаболички процеси су успорени и ћелија може преживети дужи временски период. Супротно томе, с порастом температуре ензимске реакције унутар ћелије се убрзавају, уз раст који се такође убрзава све до постизања оптималне стопе раста. Мало изнад оптималне температуре раста протеини, ДНК и РНК постају ирреверзибилно денатурирани и стопа раста убрзано пада на нулу. Даље повећање температуре убија микроорганизме. Све бактерије могу се класификовати у једну од три групе у односу на температурне захтеве:

**Психрофили:** бактеријске врсте које расту у температурном опсегу од  $-5^{\circ}\text{C}$  до  $20^{\circ}\text{C}$ . Карактеристика свих психрофила је да ће расти између  $0^{\circ}$  и  $5^{\circ}\text{C}$ .

**Мезофили:** бактеријске врсте које расту у температурном опсегу од  $20^{\circ}\text{C}$  до  $45^{\circ}\text{C}$ . Карактеристике свих мезофила су њихова могућност раста на температури

људског тела ( $37^{\circ}\text{C}$ ) и немогућност раста на температурама изнад  $45^{\circ}\text{C}$ . Управо у овој групи бактерија налази се највећи број оних које су од значаја у ветеринарској медицини. Међу мезофилима разликујемо две групе:

Мезофили с оптималном температуром раста између  $20^{\circ}\text{C}$  и  $30^{\circ}\text{C}$  који су уобичајено биљни сапрофити.

Мезофили с оптималном температуром раста између  $35^{\circ}\text{C}$  и  $40^{\circ}\text{C}$  који су микроорганизми који преферирају раст у организму топлокрвних домаћина.

**Термофили:** Бактеријске врсте које ће расти на температурама од  $35^{\circ}\text{C}$  и више. Разликујемо три групе термофила:

Факултативни термофили: организми који ће расти на  $37^{\circ}\text{C}$ , с оптималном температуром раста од  $45^{\circ}\text{C}$  до  $60^{\circ}\text{C}$ .

Облигатни термофили: организми који ће расти само на температурама изнад  $50^{\circ}\text{C}$ , с оптималним температурама раста изнад  $60^{\circ}\text{C}$ .

Екстремни термофили: организми који расту на температурама од  $60^{\circ}\text{C}$  до  $100^{\circ}\text{C}$ , попут *Aquifex aeolicus* који најбоље расте у води чија је температура између  $85^{\circ}\text{C}$  и  $95^{\circ}\text{C}$ .

Када се температура подигне изнад максимума при ком је раст могућ вегетативне ћелије, али не и ендоспоре, ће изумрети. Познавање ових леталних температура користи се у процесима пастеризације и стерилизације инструмената аутоклавирањем и др..

Насупрот високим температурама, температуре испод минимума при ком је раст могућ у ћелијама микроорганизма не изазивају никаква оштећења, већ их чувају. Чување култура у фрижидеру (око  $4^{\circ}\text{C}$ ), у замрзивачу (око  $-20^{\circ}\text{C}$ ), ултрафризеру ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) или у течном азоту ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) су најчешћи начини за дуготрајно чување микробиолошких култура.

### 2.3.2. ВРЕМЕ ИНКУБАЦИЈЕ

Бактерије су међу организмима који се најбрже размножавају, већина се удвостручи у броју сваких 4 до 20 минута.

Већина клиничких патогена лако расте током 24 до 48 часа на хранљивој подлози у Petri плочи, али неколико значајних бактеријских врста захтева пуно дуже време.

24-48 часова: већина брзорастућих бактерија

48-72 часа: брзорастуће бактерије када се култивишу на селективним подлогама

4-6 дана: *Brucella* врсте  
*Campylobacter* врсте  
*Mycoplasma* врсте  
Атипичне микобактерије и брзорастуће гљивице

2-3 седмице: већина дерматофита (*T. verrucosum*) и *Mycobacterium avium*

3-8 седмица: *Mycobacterium bovis*

4-16 седмица: *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, неке *Leptospira* и *Borrelia* врсте

### 2.3.3. АТМОСФЕРСКИ УСЛОВИ КУЛТИВАЦИЈЕ

Већина бактерија патогених за људе и животиња расте у аеробним условима и култивишу се при нормалном атмосферском ваздуху.

За микроорганизме који су микроаерофили треба обезбедити микроаерофилне услове, што подразумева повећани удео  $\text{CO}_2$  (од 2 до 10%). Врсте попут *Brucella abortus*, *Brucella ovis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* и *Borrelia burgdorferii* типични су представници ове групе бактерија. Најједноставнији начин за стварање микроаерофилних услова је запаљеном свећом у лонцу за анаеробе. Свећа сагоревањем, након затварања посуде, троши  $\text{O}_2$  и ствара  $\text{CO}_2$ . Када се потроши  $\text{O}_2$  пламен се угаси, а у атмосфери лонца ствара се пожељан удео  $\text{CO}_2$ . Један од начина је и употреба анаеробних лонаца и кесица за једнократну употребу које реагују с водом у процесу у ком настају  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ , чиме се стварају микроаерофилни услови.

Анаеробне бактерије не само да не захтевају присуство  $\text{O}_2$  у атмосфери, већ ње-

гово присуство за њих може деловати токсично. Типични представници анаеробних бактерија, који су од значаја у ветеринарској медицини су *Clostridium* и *Fusobacterium* врсте. Постоје различити методи за стварање анаеробне средине. Једноставан и јефтин начин је употреба анаеробног лонца и кесица, за једнократну употребу, које стварају анаеробне услове након затварања лонца. Епрувете с бујонским културама за анаеробе, као што је тиогликолатни бујон, не морају се инкубирати у анаеробним условима јер њихове формулације садрже редукционе супстанце које ће створити анаеробну средину.

### 2.4. РАСТ БАКТЕРИЈА

Размножавање бактерија искључиво је асексуално. Уобичајено се дешава током процеса који се назива бинеарна диоба, током ког се једна бактеријска ћелија дели на две потпуно једнаке ћерке ћелије. Други, мање учестали начини размножавања, подразумевају мултиплу деобу, пупљење и стварање спора.

Обзиром да је бактерије лако узгојити у лабораторији, њихов раст је опсежно проучаван. Утврђено је да ће у затвореном систему бактерије расти према предвидљивом обрасцу, што ће резултирати кривуљом раста (Слика 2.3.).



Слика 2.3. Кривуља раста бактерија. 1 lag фаза, 2 log., 3 стационарна фаза, 4 фаза опадања



Кривуља раста се састоји од четири различите фазе раста: *lag.* фаза, експоненцијална или логаритамска фаза (*log.*), стационарна фаза и фаза смрти или опадања.

Додатно, ова кривуља раста може дати време генерације за одређени организам – количину времена која је потребна да се популација удвостручи.

Генерацијско време за одређене бактеријске врсте дато је у табели (Табела 2.1.)

**Табела 2.1.** Генерацијско време одређених бактеријских врста

Врста	Тип подлоге	Генерацијско време (мин)
<i>Escherichia coli</i>	Глукоза - соли	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	Срчани бујон	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	млијeko	66-87
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	синтетичка	792-932

## 2.5. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ

Узгајање микроорганизама у лабораторији подразумева опонашање природног станишта или животне средине организама, а то је у лабораторији могуће формулисањем хранљивих подлога које задовољавају њихове захтеве. Хранљиве подлоге су специфичне смеше нутријентна и других супстанци које омогућавају раст бактерија као и гљивица тј. квасаца и плесни.

Прве хранљиве подлоге развијене су емпиријски, користећи доступне компоненте из околне средине, попут говеђе супе одакле потиче термин бујон (фр. *bouillon* – супа). Данас се за култивацију бактерија користе многе подлоге које се разликују по саставу, намени, конзистенцији итд.

Основне подлоге садрже извор угљеника и енергије, извор угљендиоксида, факторе раста и неке елементе у траговима.

Неке често коришћене компоненте подлога укључују пептон, агар, воду, хидролизат казеина, екстракт слада, месни екстракт и екстракт квасца. Осим тога, рН подлоге треба прикладно подесити.

Ипак и неке додатне компоненте или хранљиве материје додају се подлози приликом узгајања специфичних микроорганизама.

### 2.5.1. ТИПОВИ ПОДЛОГА

Хранљиве подлоге могу се класификовати на три начина: на бази њихове конзистенције, порекла и састава и примене. Најчешћа и општа подела подлога је према конзистенцији, па тако разликујемо течне, получврсте и чврсте хранљиве подлоге.

**Течне подлоге**, односно бујони, су подлоге чије су компоненте растворене у води. Бујони омогућавају равномеран и обилан раст бактеријских сојева када се инкубирају на 37° С током 24 сата. Користе се за обилан раст микроорганизама и испитивање ферментације. Примери укључују хранљиви бујон, триптон соја бујон и MR-VP бујон.

Додавањем очвршћивача у течну подлогу добијају се **получврсте и чврсте подлоге**, а који од ова два типа зависи од његовог удела у подлози. Агар је најчешћа супстанца која се додаје као очвршћивач хранљивих подлога. То је хетерополисахарид који се добија из црвених алги *Gelidium* и *Gracilaria* и који нема нутритивну вредност за већину бактерија.

Захваљујући особини да са молекулима воде формира стабилан гел који подлози даје чврстину, а уједно и омогућава дифузију хранљивих састојака. Агар је идеално средство за очвршћивање микробиолошких подлога и због својих својстава топљења као и зато што нема хранљиву вредност за велику већину бактерија. Чврсти агар топи се на око 100° С; течни агар се учвршћује на око 42° С. Уколико подлога садржи 0,25 до 1,5% агара она је получврста, тј. добија се мека желатиозна супстанца. Углавном се користи за проучавање покретљивости

микроорганизама, разликовање покретних и непокретних сојева бактерија и за узгајање микроаерофилних бактерија. Примери получврстих подлога су SIM подлога и Амијева транспортна подлога (Amies).

Додавањем 1,5 до 3,5% агара у подлогу добијају се чврсте подлоге, које се уједно и називају агари. Чврсте подлоге користе се за узгајање микроорганизама у њиховом пуном физичком облику, припрему чистих бактеријских култура или изолацију бактерија за проучавање карактеристика колонија. Примери чврстих подлога укључују хранљиви агар, крвни агар, MacConkey агар и др.

Према пореклу и саставу подлоге делимо на:

**Природне хранљиве подлоге** су подлоге код којих тачан хемијски састав није познат. Још се називају и емпиријске подлоге. У овакве подлоге спадају крв, крвни серум, млеко, месни екстракти и др.

**Синтетске подлоге** састављене су од супстанци чији је хемијски састав познат. Ове подлоге су веома корисне за проучавање физиологије, метаболизма и нутритивних потреба микроорганизама. Типичан пример ове подлоге је Czapek-ова подлога.

**Полусинтетске подлоге** добијају се комбинацијом природних и синтетских подлога, а типичан пример је крвни агар. Према намени подлоге делимо на:

**Основне хранљиве подлоге** или хранљиве подлоге опште намене користе се за изолацију и култивацију великог броја неизбирљивих микроорганизама. Основне подлоге по свом саставу су најједноставније и садрже извор угљеника и енергије, извор CO<sub>2</sub>, факторе раста и неке елементе у траговима. Оваква подлога је хранљиви агар.

Док се хранљиве подлоге као што је хранљиви агар користе за раст широког спектра микроорганизама, друге су посебно дизајниране за изолацију и идентификацију појединих врста микроорганизама. Оне обично садрже инхибиторе

који спречавају раст нежељених бактерија, допуштајући раст циљаним бактеријама. **Селективне подлоге**, као што је Wilson Blair (бизмут-сулфитни агар), првенствено подржавају раст одређених врста бактерија. Тако јони бизмута инхибирају раст Gram позитивних, као и многих Gram негативних врста бактерија; ова подлога се користи за изолацију патогене бактерије *Salmonella Typhi*, једног од ретких организама који толерише бизмут.

Специфичне хранљиве подлоге које се називају **диференцијалне** користите се за разликовање између морфолошки и биохемијски сличних група бактерија чији раст омогућавају и то обично помоћу индикатора у боји. MacConkey агар садржи лактозу и рН индикатор који омогућава диференцијацију између бактерија које ферментису лактозу (црвене колоније) и оних који немају ту способност (бледе или светло ружичасте колоније). Многе хранљиве подлоге делују и селективно и диференцијално; MacConkey агар, на пример, садржи и жучне соли и боју кристално-љубичасту, а обе служе за инхибицију раста нежељених Gram позитивних бактерија.

"Избирљиви" микроорганизми немају способност да синтетишу низ хранљивих материја, стога имају комплексне захтеве у погледу култивације. **Обогаћене подлоге** су подлоге поред основних супстанција садрже и високо нутритивне материје као што су крв, крвни серум или екстракт квасца који су неопходни за култивисање избирљивих бактерија. Овом типу подлога припадају крвни и чоколадни агар.

**Подлоге за обогаћење** су течне хранљиве подлоге и користе се за изолацију и култивацију микроорганизама који су присутни у веома малом броју у односу на остале микроорганизме присутне у мешаној култури, односно узорку. Овакве хранљиве подлоге пружају селективне услове средине, који фаворизују раст једне врсте или групе микроорганизама. Типична подлога за обогаћење је Selenit

F бујон који фаворизује раст *Salmonella* врста.

**Транспортне подлоге** су течне подлоге подлоге које немају хранљиву вредност чиме спречавају размножавање бактерија током транспорта, али онемогућавају и исушивање бактерија чиме омогућавају њихово преживљавање. Примери транспортних подлога су Amies и Cary Blair хранљива подлога.

## 2.5.2. НАЈЗНАЧАЈНИЈЕ ПОДЛОГЕ

### 2.5.2.1. Хранљиви бујон

Хранљиви бујон је општенаменска, основна, течна подлога која обезбеђује раст широког спектра неизбирљивих организама. Обично се користи за узгајање и одржавање/чување бактеријских култура.

### 2.5.2.2. Хранљиви агар

Хранљиви агар се обично користи као подлога опште намене за узгајање широког спектра бактерија. То је основна подлога која се састоји од пептичког дигеста животињског ткива, говеђег екстракта и екстракта квасца, натријум хлорида и агара.

### 2.5.2.3. Крвни агар

Крвни агар је обогаћена подлога опште намене, које се често користи за узгајање широког опсега избирљивих организма, као и оних организама чија је бројност мала у великим мешаним популацијама, односно у узорцима попут земље и фецеса. Ова подлога служи и као диференцијална подлога омогућавајући разликовање хемолитичких од нехемолитичких бактерија. Теоријски "Крвни агар" није доследно дефинисана подлога. Израз "крвни агар" уопштено се односи на обогаћену базну подлогу којој је додато 5 до 10% дефибринисане најчешће овчје крви. Крв зеца или коња може се користити за раст организама који захтевају NAD, као што су *Haemophilus* врсте, али хемолитички обрасци могу бити недоследни онима на подлогама с овчјом крви.

### 2.5.2.4. Чоколадни агар

Подлога је име добила не по састојцима, већ због своје боје. Чоколадни агар се користи за узгајање још избирљивијих бактерија у односу на крвни агар. Користи се за изолацију врста из рода *Neisseria* (менингокока и гонокока) и *Haemophilus*. Примарне компоненте подлоге су пептон, скроб, дигест говеђег срца и овчја крв.

### 2.5.2.5. Columbia крвни агар

Ова подлога се користи за узгој *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. и разних избирљивих микроорганизама. Садржи скроб, пептон и крв (обично 5% овчје крви).

### 2.5.2.6. Endo агар

Endo агар се користи за изолацију, узгајање и диференцијацију колиформних и других цревних бактерија на темељу њихове способности ферментације лактозе. Садржи лактозу, дигест животињског ткива и базични фуксин. Бактерије које ферментишу лактозу стварају тамно-црвене колоније са златним металним сјајем. Бактерије које не ферментиршу лактозу стварају безбојне или прозирне колоније.

### 2.5.2.7. MacConkey агар

MacConkey агар користи се за изолацију Gram негативних бактерија. Садржи метил љубичасту (кристал виолет), која инхибира раст Gram позитивних бактерија и даје подлози светлоружичасту боју лаванде. Подлога такође садржи жучне соли, лактозу и рН индикатор неутрално црвену. Осим што је селективана за Gram негативане, уједно је и диференцијална подлога за бактерије из ове групе. Колиформни бацили производе киселину ферментацијом лактозе, узрокујући да колоније поцрвене од рН индикатора. *E. coli* производи још веће количине киселине узрокујући да околна подлога и колоније поцрвене. Неколиформни бацили не ферментишу лактозу и њихове

колоније на овој подлози изгледају небојене или прозирне.

#### **2.5.2.8. Манитол слани агар (MSA)**

Манитол слани агар (MSA) садржи 7,5% NaCl, проценат соли која је токсична за већину бактерија осим оних из рода *Staphylococcus*. Ово је селективна страна ове подлоге. MSA је такође диференцијална подлога јер садржи шећерног алкохола, манитол, као и рН индикатор фенол црвено. Стафилококе које ферментишу манитол и производе киселину показују жуту боју око колонија. Стафилококе које не ферментишу манитол не производе промену боје у односу на нормалну црвено-ружичасту боју подлоге.

#### **2.5.2.9. SIM хранљива подлога**

SIM је полуврста подлога разлива се у епрувете и користи се за диференцијацију чланова породице *Enterobacteriaceae* на бази производње H<sub>2</sub>S, продукције индола и покретљивости. Име је добила управо по овим реакцијама (енг. *sulfide, indole, motility*). SIM садржи пептон, говеђи екстракт, пептонизовано гвожђе и натријум тиосулфат.

#### **2.5.2.10. Amies транспортна подлога**

Ова подлог користи се за транспорт узорака брисева како би се продужило преживљавање микроорганизама. Овај подлога садржи фосфатни пуфер те јоне калцијума и магнезијума за заштиту бактеријских ћелија од лизе.

#### **2.5.2.11. Алкална пептонска пептонска вода**

Алкална пептонска вода или алкално-пептонски бујон је подлога за обогаћење одосно за повећање броја циљаних бактерија које се могу размножавати у алкалним условима, попут бактерије *Vibrio cholerae*, а истовремено инхибирајући раст контаминирајуће флоре која се не може размножавати при повишеном рН.

#### **2.5.2.13. Salmonella-Shigella arap (SS)**

Ова подлога се користи за селективну изолацију и диференцијацију патогених цревних бацила, нарочито оних који припадају роду *Salmonella*. Подлога се не препоручује за примарну изолацију врста рода *Shigella*. Садржи лактозу, жучне соли, тиосулфат, цитрат, говеђи месни екстракт, дигест казеина и животињских ткива, ферицитрат, неутрално црвено и брилијант-зелено. Бактерије које ферментишу лактозу као што су као *E. coli* или *K. pneumoniae* јављају се као мале, ружичасте или црвене колоније. Бактерије које не ферментишу лактозу, као што су *Salmonella* spp., *Proteus* spp. и *Shigella* spp. стварају безбојне колоније. Производња H<sub>2</sub>S од стране *Salmonella* spp. и *Proteus* spp. средиште колоније боји у црно.

#### **2.5.2.13. Mueller-Hinton arap**

Ова подлога се користи за изолацију патогених *Neisseria* spp., укључујући врсту *N. meningitidis*. Такође се користи за испитивање антимикробне осјетљивости разних бактеријских врста. Садржи инфузијум говеђег меса, кисели хидролизат казеина и скроб.

#### **2.5.2.14. Kligler-ov arap**

H<sub>2</sub>S настао из тиосулфата помоћу сулфатне редуктазе реагује ће са солима гвожђа како би произвео FeS, јаки црни талог. Подлога садржи панкреасни дигест казеина, гвожђе-амонијум цитрат, пептички дигест животињског ткива, натријум тиосулфат, лактозу, агар, глукозу, фенол црвено и натријум хлорид.

#### **2.5.2.15. Simmons цитратни агар**

Ова подлога се користи за диференцијацију Gram негативних бактерија у односу на способност коришћења цитрата као јединог извора угљеника. Садржи амонијум-хидрогенсулфат, калијум хидроген-сулфат, натријум-цитрат, натријум-хлорид, магнезијум сулфат, агар и индикатор бромтимол плаво.



**Слика 2.4.**  
Растворене  
хранљиве подлоге  
припремљене за  
стерилизацију  
аутоклавирањем



#### **2.5.2.16. Инфузиони možдано-срчани бујон - Brain heart infusion**

Ова подлога се користи за узгој избирљивих и неизбирљивих микроорганизама, укључујући аеробне и анаеробне бактерије, из различитих клиничких узорака. Подлога садржи дигест желатина и животињског ткива као и глукозу и инфузијум мозга и срца. Посебно је корисна за узгајање стрептокока, пнеумокока и менингокока.

#### **2.5.2.17. Löwenstein–Jensen подлога**

Ова подлога се користи за узгајање и диференцијацију *Mycobacterium* spp. Садржи скроб, аспарагин, магнезијум цитрат, малахит зелено, јаја и глицерол. Колоније *M. tuberculosis* појављују се као зрнасте, грубе, суве колоније, док нпр. *M. avium* формира глатке, безбојне колоније.

#### **2.5.2.18. Bordet-Gengou agar**

Ова подлога се користи за детекцију и изолацију врста из рода *Bordetella* из клиничких узорака. Подлога садржи дигест казеина и животињског ткива, те глицерол, инфузијум кромпира и дефинисану коњску крв. *Bordetella bronchiseptica* формира смеђе, глатке, конвексне, сјајне и готово прозирне, уобичајено са зоном слабе хемолизе.

#### **2.5.2.19. Тиогликолатни бујон**

Ова течна подлога намењена је за изолацију, култивацију и идентификацију облигатних анаеробних бактерија. Са

држи казеин хидролизат, екстракт квасца, моносахарид декстрозу и натријум-хлорид, те натријум тиогликолат који снижава редокс потенцијал одржавајући анаеробне услове у подлози.

#### **2.5.2.20. Sabouraud agar**

Ова подлога се користи за изоловање и култивацију гљивица и квасаца. Поред пептона садржи и високу концентрацију декстрозе која уз и киселу средину подлоге фаворизује раст гљивица.

### **2.5.3. ПРИПРЕМА ПОДЛОГА**

Подлоге се припремају у посуди/тиквици чији је капацитет отприлике двоструко већи од коначне запремине подлоге што омогућава мешање и пенушање подлоге током загревања (Слика 2.4.). Подлоге које не садрже агар обично могу бити растворене уз лагано мешање, међутим дехидриране подлоге које садрже агар најбоље се растварају довољњем докључања уз стално мешање, стакленим штапићем или помоћу магнетне мешалице. Након што се растворе, хранљиве подлоге обично се стерилишу у аутоклаву на температури од 121° С у трајању од 15 минута. Неке подлоге, као што је Rapoport-Vassiliadis, садрже састојке осетљиве високу температуру и морају се аутоклавирати на нижим температурама (115° С током 20 минута или према упутству произвођача). Одређене подлоге попут Wilson Blair и SS agara инхибиторне су за многе бактерије и ове подлоге се



Слика 2.5.  
Стерилисане  
хранљиве подлоге  
разливане у Petri  
плоче

само доводе до кључања, а не аутоклавирају.

Подлоге које садрже агар након аутоклавирања, а пре изливања у Petri плоче, треба охладити на 50–54° С. Агар се стврдњава на око 42° С. Стандардна (90 mm) Petri плоча треба да садржи око 15 ml подлоге, што је отприлике једна трећина запремине.

Неки адитиви за подлогу, попут серума или еритроцита, не подносе високе температуре и додају се као стерилни раствори или суспензије и то након што се подлога охлади на 50-54° С. Након што су изливане плоче, остављају се да се темељно осуше на собној температури или неколико сати у инкубатору на 37° С. За употребу, површина агара не сме садржати видљиву влагу. Плоче се чувају у фрижидеру на температури од 4° С, тако што су дном, у ком је разливен агар, окренуте према горе.

## 2.6. ЗАСЕЈАВАЊЕ БАКТЕРИЈА

Хранљиве подлоге које ће бити коришћене за засејавање морају бити потпуно суве, без конденза на поклопцу, загрејане на собну температуру и прописно обележене. Обележавање се врши на страни агара, референтним бројем узорка, датумом инокулације, типом хранљиве подлоге. Користи се водоотпорни маркер, а обележава се што је могуће ближе рубу Petri плоче, како након инкубације колоније бактерија не би биле заклоњене.

Када је узорак комад ткива, њиме је лакше манипулисати ако се прво стави у празну стерилну Petri плочу.

Пинцету и скалпел, који су претходно држани у 70% етил алкохолу, треба спалити и оставити да се охладе. Ткиво се разреже и из дубине реза, езом или Pasteur-овом пипетом, узме материјал и инокулише на подлогу.

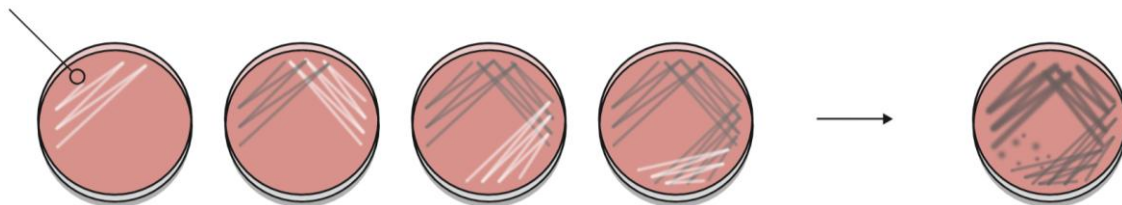
### 2.6.1. ПОСТУПАК ЗАСЕЈАВАЊА ПОТЕЗОМ

Код изолације потезом разликујемо два начина и то поступак исцрпљивања и поступак изолације неискривљивим потезом. Предност првог је у изолацији појединачних бактеријских колонија.

#### 2.6.1.1. Поступак исцрпљивања

Поступак засејавања потезом осмишљен је за изолацију чистих култура бактерија или колонија из мешаних култура једноставним механичким одвајањем. Појединачне колоније састоје се од милиона ћелија које расту у кластеру на површини или унутар агар плоче. Колонија је, за разлику од појединачне бактеријске ћелије, видљива голим оком. У теорији, све ћелије у колонији потичу од једне бактерије која је претходно нанета на агар плочу и стога се називају клоном или кластером генетски идентичних ћелија.

**Увек пре почетка култивације езу треба стерилисати!**



Слика 2.6. Засејавање бактерија поступком исцрпљивања

Узорак из којег ће Petri плоча бити инокулисана може бити или суспензија бактеријских ћелија у бујону или постојећа колонија с друге плоче с агаром. Узорак се узима и рашири на отприлике једну четвртину површине агара брзим, лаганим покретима напред-натраг више пута по површини агара од руба до средине плоче (Слика 2.6.). Ако је инокулум суспензија бактеријских ћелија, узима се омчом езе или 5 до 10  $\mu\text{l}$  Pasteur-овом или микропипетом. Ћелијску суспензију пре засејавања на плочу неопходно је претходно промућкати. Док се изводи овај корак користи се асептична техника, пали се не само омча езе, већ и руб боце или епрувете пре и након уклањања инокулума. Такође, не смеју се додиривати странице епрувете или боце езом или пипетом како би се спречила унакрсна контаминација. Ако се инокулум пипетира онда се суспензија наноси на одговарајуће место на плочи, а затим се помоћу езе, рашири по првом квадранту плоче.

Ако је инокулум колонија с друге чврсте хранљиве подлоге, колонија се лагано додирне омчом езе (потребно је само неколико бактерија из колоније, а не цела колонија), а затим рашири по првом квадранту агара. Неопходно је, пре него што се додирне колонија, проверити да ли је метална омча езе охлађена. Како би се осигурало да еза није преврућа, њоме се лагано додирне агар уз руб плоче, на

подручју на који неће бити наносен инокулум.

Ако се користи метална еза, стерилише се спаљивањем помоћу Bunsen-овог пламеника пре него што се узме инокулум за плочу. Еза се стерилише тако што се спаљивање почиње даље од омче, са жицом у врху „плаве купе пламена“, најтоплијег дела пламена, а затим помера тако да се пламен приближи петљи. Поступак траје док се жица ужари. Ова манипулација спречава стварање аеросола бактерија које су остале на петљи од претходне употребе.

Пламен убија бактерије, а конвекцијске струје из загрејаног ваздуха спречавају друге загађиваче из ваздуха да се таложу на металну жицу током накнадних руковања езом.

Након завршетка првог квадранта, плоча се окреће и враћа назад у поклопац на столу (Слика 2.6.). Еза се поново спаљује како је претходно описано.

Доња половина плоче, у којој је агар, поново се подиже, ротира за  $90^\circ$  супротно смеру кретања казаљке на сату, а затим езом додирне први квадрант близу краја задњег низа нанесеног инокулума. Користећи образац напред-натраг, прелази се преко последње линије у првом квадранту, а затим прелази на празан други квадрант. Еза се не сме враћати у прву половину потеза езом у првом квадранту где је нанесена већина оригиналног инокулума. Након што је други ква-

дрант испуњен плоча се враћа назад у поклопац.

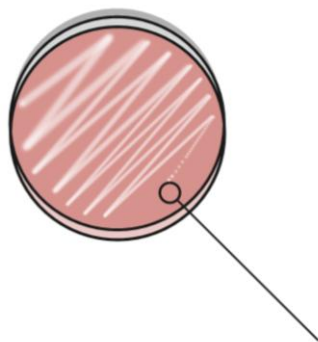
Претходно описан поступак наношења инокулума на агар треба поновити још једном за трећи квадрант. Четврти потез езом у четвртом квадрантну прави се завојитим потезима од последњег низа нанешеног инокулума у трећем квадранту према средини агара, избегавајући прелазак езом у први квадрант (Слика 2.6.). Обавезно треба спалити езу између сваког квадранта.

**Увек након завршетка засејавања езу треба стерилисати!**

Petri плоче с агаром инкубирају се дном у ком се налази агар према горе, тако да конденз који се накупи на поклопцу не капље на колоније. Недостатак овог метода је у томе што се на овакав начин могу култивисати само аеробне и факултативно анаеробне бактерије.

#### 2.6.1.2. Поступак засејавања неискривљеним потезом

Овај поступак заснива се на инокулацији узорка, узетог езом, Pasteur-овом пипетом или брисом, прављењем неискривљених, завојитих потеза преко целе површине агара (слика 2.7.). Овим поступком најчешће се не добијају појединачне колоније бактерија, што отежава њихову идентификацију и изолацију у чистој култури.



Слика 2.7. Засејавање бактерија неискривљеним потезом

#### 2.6.2. ПОСТУПАК НАЛИВАЊА

Код овог поступка прво се у стерилну Petri плочу сипа узорак с бактеријама, а затим се прелије отопљеном чврстом подлогом. Узорак и подлога се измешају лаганим, кружним покретима, а Petri плоча остави да се подлога охлади и шчврсне, након чега се стављају у инкубатор.

#### 2.6.3. ПОСТУПАК РАЗРЕЂИВАЊА

Овај поступак често се користи за бројање микроорганизама у мешаном узорку, који се додаје у растопљени агар пре његовог очвршћивања. Процес резултира колонијама равномерно распоређеним по чврстој хранљивој подлози, када се на плочу стави одговарајуће разређење узорка. Ова се техника користи за пребројавање колонија, при чему се збрајају укупан број CFU (*colony forming unit*) које формирају колоније унутар агара и на површини агара на једној плочи. Бројање колонија даје стандардизовани начин за генерисање кривуља раста, за израчунавање концентрације бактеријских ћелија у епрувети из које је узорак стављен на плочу, као и за истраживање деловања различитих окружења или услова раста на преживљавање или брзину раста бактеријских ћелија. Овај поступак заснива се на разређивању узорка у физиолошком раствору или хранљивом бујону, чија се одређена количина затим пренесе у празну, стерилну плочу. Преко овако нанешеног узорка налива се отопљена, али на 48° С охлађена чврста подлога. Садржај Petri плоче се затим промеша лаганим кружним покретима и остави да очврсне, након чега се стављају на инкубацију.

Ако се наносе серијска разређења или низ поновљених разређења, то резултира смањењем концентрације ћелија у узорку, па је приликом бројања неопходно укључити и овај фактор. Припрема серијских разређења нужна је ако број бактеријских ћелија у узорку премашује капацитет агар плоче, у којој је статистички значајан опсег од 30 до 300 CFU. Ако на плочи има више од 300 CFU, тада



ће колоније бити претрпане и преклапају се.

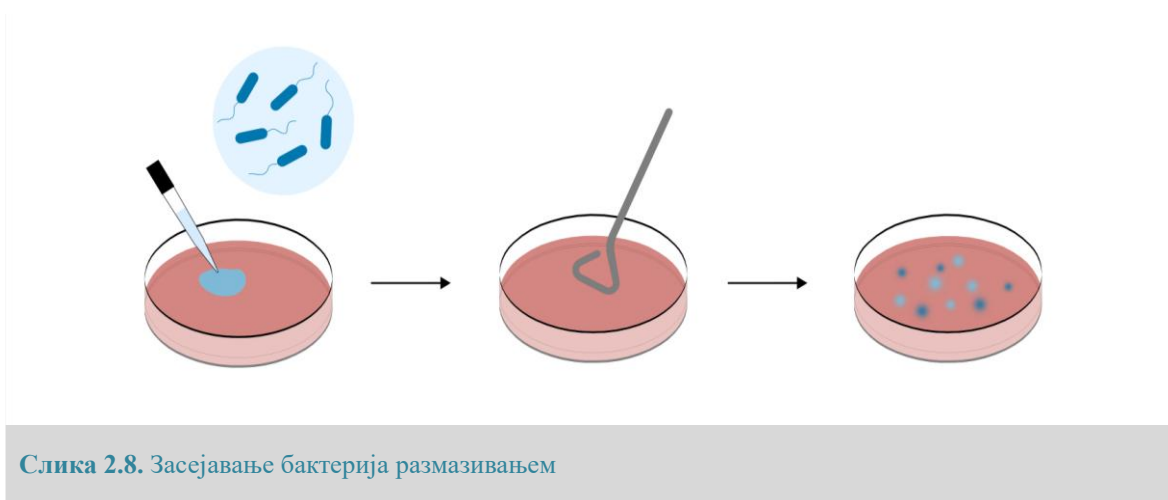
#### **2.6.4. ПОСТУПАК ЗАСЕЈАВАЊА УБОДНОМ ЕЗОМ**

Овај поступак засејавања корисити се приликом култивације изолације и култивације бактерија у чврстим дубоким агарима, тако што се стерилном убодном езом узме мали део колоније и инокулише убадањем у дубину подлоге.

#### **2.6.5. ПОСТУПАК ЗАСЕЈАВАЊА РАЗМАЗИВАЊЕМ**

Ова се техника обично користи за одваја

ње микроорганизама садржаних у малом волумену узорка, који се равномерно распоређује по површини чврсте хранљиве подлоге, што резултира стварањем дискретних колонија равномерно распо-ређених по површини агара, када се одговарајућа концентрација бактеријских ћелија постави на плочу. Изводи се тако што се на површину чврсте хранљиве подлоге нанесе течна култура или суспензија бактерија, која се затим стерилним L штапићем по Drigalski-ом кружним покретом равномерно размаже по површини агара (Слика 2.8.)



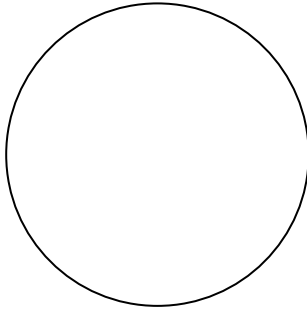
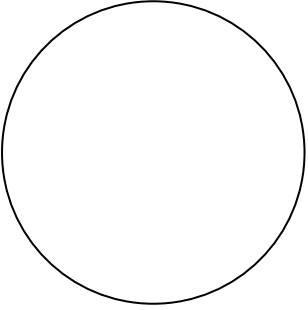
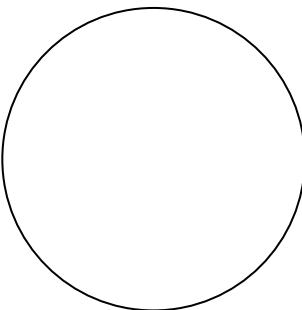
# Практични рад

## Потребни материјал:

крвни агар, Endo агар, хромогени агар  
узорак  
брис  
бујонска култура  
омчаста еза  
пламеник  
инкубатор

**Задатак:** Инокулисати подлоге одређеним поступком и ставити их на инкубацију.

Нацртати и написати поступке засејавања.

Узорак			
Нацртати начин засејавања			
Напомена	<hr/> <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/>

## Идентификација бактерија

**Т**радиционална и рутинска идентификација бактерија заснована је на утрђивању њихових фенотипских карактеристика бојењем, култивацијом и биохемијским тестовима, а по потреби тестовима као што су серотипизација и испитивање осетљивости на антибиотике. Новије молекуларне технике омогућавају идентификацију врста утврђивањем генотипских карактеристика, понекад директно из клиничког узорка

### 3.1. ПРИМАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Након што се добије чиста култура, резултати неколико релативно једноставних тестова често могу идентификовати бактерију до нивоа врсте или рода :

- раст или одсуство раста на хранљивим подлогама и морфологија израслих колонија

- размаз културе обојен по Gram-у којим се утврђује бојење по Gram-у (Gram позитивна или негативна) и ћелијска морфологија (коке, штапићи, спиралне)

- тестови каталазе и оксидазе

- тест покретљивости

- тестови оксидације и ферментације.

### 3.2. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Морфологија колонија подразумева културелне карактеристике бактеријске колоније на хранљивим подлогама и

служи за визуалну диференцијацију различитих микроорганизама.

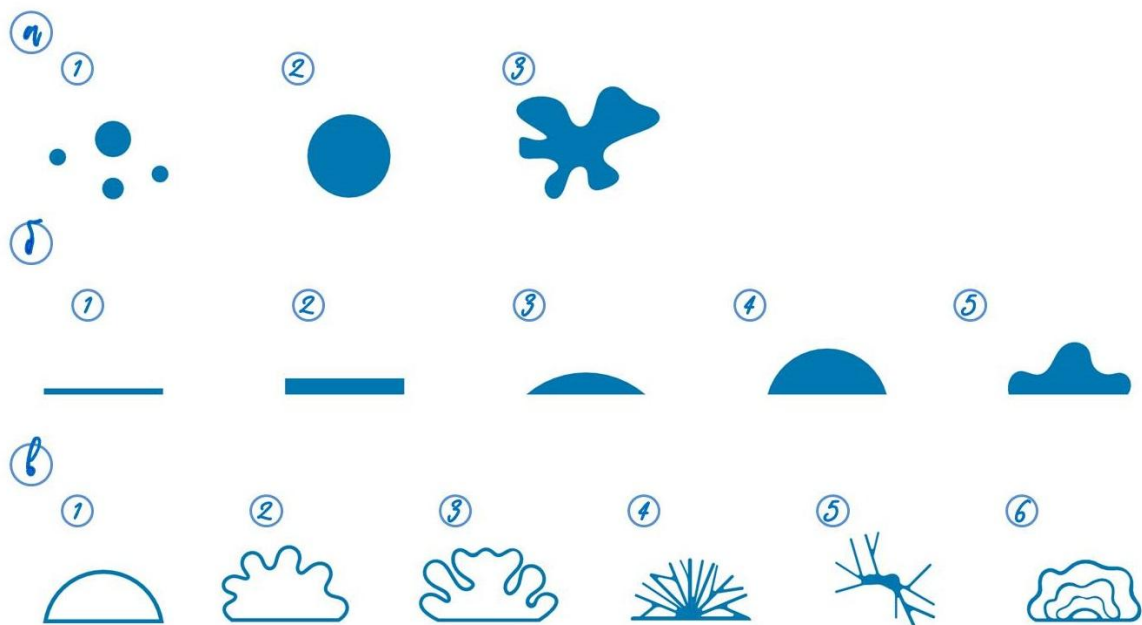
#### 3.2.1. РАСТ НА ЧВРСТИМ ПОДЛОГАМА

На чврстим подлогама теоријски потиче од једне бактеријске ћелије. Ако је добро одбојена од других колонија њена карактеристична морфологија колонија може се опазити голим оком или лупом. Под морфологијом подразумевамо и описујемо седам основних карактеристика и то величину колоније, облик, ивице, површину, профил, текстуру и оптичке карактеристике.

Величина колоније једноставно подразумева мерење њених димензија, односно пречника у случају да је округла или дужине у случају да колонија има другачији облик.

Облик колонија описује се као округао, неправилан или тачкаст/пунктиформан (Слика 3.1.).

Ивице колоније могу бити глатке (без неправилности), ундулентне, таласасте, лобуларне, филаментозне-конча-



Слика 3.1. Морфологија колонија.

а облик: 1 тачкаст, 2 округао, 3 неправилан

б профил: 1 раван, 2 издигнут, 3 конвексан, 4 пулвинатан, 5 умбонатан

в ивица: 1 глатка, 2 ундулунтна, 3 лобуларне, 4, филамнтозне, 5 ризоидне, 6 таласасте

сте, ризоидне (гранају се попут корења) (Слика 3.1.).

Површина може бити глатка, храпава, наборана, сјајна или мат-сува

Текстура може бити влажна, мукоидна-растегљива, бутирозна (конзистенције маслаца), или сува.

Профил колоније може се описати као раван, издигнут, конвексан, пулвинатан (изражено конвексан) и умбонатан (издигнут на центру) (Слика 3.1.).

Друге корисне карактеристике односе се на боју и оптичке карактеристике попут прозирности.

Карактеристике попут величине, облика, ивица и површине колоније најбоље се запажају посматрањем одозго, у отвореној Petri плочи (ако је то безбедно), уз лагано помереање како би их видели под различитим углом светла. Текстуру колоније испитујемо додиривањем колоније стерилном езом.

Профил колоније најбоље се оцењује када Petri плоча посматра док се држи у висини очију, док се прозирност запажа када плоча осветли отпозади.

Величина колоније, када је то могуће, мери се преко базе плоче.

Када се опусује морфологија бактеријских колонија важно је имати на уму на којој су хранљивој подлози расле, као и време инкубације и температуру, јер сви ови фактори утичу на њен коначан изглед.

### 3.2.1.1 Раст на крвном агару

Крвни агар је обogaћена хранљива подлога за општу употребу, која подржава раст великог броја бактерија. Осим морфологије бактеријских колонија на њој се способност соја да врши хемолизу (Табела 3.1.). На крвном агару запажају се 3 типа хемолизе:

$\gamma$  (гама) хемолиза: без лизе црвених крвних ћелија, нема значајне промене у изгледу подлоге око колоније.

$\alpha$  (алфа) хемолиза: непотпуна лиза црвених крвних ћелија, с редукијом хемоглобина у метхемоглобин, што резултира зеленкастим халом око раста бактерија.



**Табела 3.1.** Фенотипске карактеристике одређених бактеријских врста значајних у ветеринарској медицини

Врста	Облик	Боја	Величина	Ивице	Тип хемолизе
<i>Staphylococcus aureus</i>	Округао	Светло жуте до жуте	1-4 mm	равне	α
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Округао	Сиво-беле	3-4 mm	равне	β
<i>Bacillus anthracis</i>	Неправилан	Сиво-беле	2-4 mm	неправилне	γ
<i>Escherichia coli</i>	Округао	Сиво-беле	1-3 mm	равне	γ (неке β)
<i>Clostridium perfringens</i>	Неправилан	Сиво-жуте	3-5 mm	варијабилне	α и β

β (бета) хемолиза: потпуна лиза еритроцита, искоришћавање хемоглобина од стране микроорганизама резултира чистом зоном која окружује колоније.

Фенотипске карактеристике одређених бактеријских врста значајних у ветеринарској медицини дате су у табели 3.1..

### 3.2.2. РАСТ НА КОСОМ АГАРУ

Коси агари примарно се користе за култивацију и чување бактеријских сојева. Иако бактерије култивисане на овим подлогама показују различите културелне особине, њихова морфолошка карактеризација нема велики дијагностички значај. Раст бактерија на косим агарима разликује се у текстури колонија која може бити влажна или сува, оптичким карактеристикама када разликујемо прозирне и непрозирне колоније, али и по ивицама које могу бити глатке, лобуларне, ефузне, филментозне, ризоидне или ехинулатне. На косе агаре обично се засијавају чисте културе, чија је морфологија претходно описана на агару у Petri плочи, али корисне су при идентификацији микроорганизама и биохемијске карактеристике раста на косим агарима.

### 3.2.3. РАСТ У БУЈОНИМА

Под повољним условима у бујонима бактерије ће се брзо размножавати и то по предвидљивом обрасцу, а динамика њиховог раста може се представити кривуљом раста. Ова кривуља представља повећање броја бактеријских

ћелија у односу на време инкубације и може се поделити у 4 фазе и то фаза прилагођавања (*lag*. фаза), фаза експоненцијалног раста (*log*. фаза), стационарна фаза и фаза угинућа.

*Lag*. фаза је почетна фаза у којој бактеријска популација непроменљива и представља период адаптације на нове услове. Ћелијски метаболизам се убрзава, што резултира брзом биосинтезом макромолекула, првенствено ензима, у припреми за следећу фазу раста. Иако се бактеријске ћелије увећавају, нема диобе, а тиме ни повећања броја бактерија.

Након што ћелије акумулирају све што им је потребно за раст, крећу у ћелијску деобу. Експоненцијална или логаритамска фаза раста обиљежена је предвидљивим удвостручењем популације, где од једне ћелије настају 2 ћелије, од којих настају 4 итд. Ћелије у овој фази раста су најздравије и најједначеније, што објашњава зашто већина истраживања користи бактерије из ове фазе раста. Због предвидљивости раста у овој фази, ова се фаза може користити за израчунавање времена које је потребно да се бактеријска популација удвостручи у броју, које се назива генерацијско време (*g*).

У стационарној фази број ћелија које се деле једнак је број ћелија које умиру, због чега нема даљег повећања броја ћелија, а популација се неко време одржава на максимуму. Примарни разлози ово су смањење неких битних метаболита и накупљање токсичних

киселих или алкалних крајњих производа у хранљивој подлози.

У последњој фази кривуље раста, фази угинућаи или опадања, број ћелија способних за живот опада на предвидљив (или експоненцијалан) начин и скоро се поклапа секспоненцијалним растом током *log.* фазе. Теоретски, цела би популација требало да угине током временског интервала који је једнак ономе у *log.* фази, међутим то се не догађа јер мали број врло отпорних организама опстаје неодређено дуго.

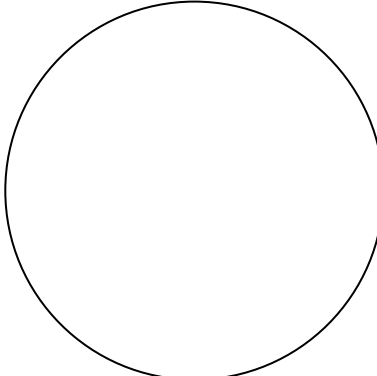
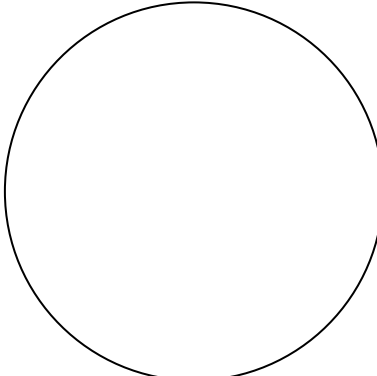
Бактерије у течним културама показују различите карактеристике раста. Неке расту на површини и формирају скраму-пеликулу, док друге могу расти на дну бујона у виду седимента. Неке бактеријске врсте бујон замућују уједначено, јер се шире дифузно, или се пак групишу попут грумуљица, што називамо флокулентан раст. Ове карактеристике раста доминантно су условљене покретљивочлу бактерија и њиховим потребама за кисеоником.

# Практични рад

## Потребни материјал:

Културе с претходне вежбе

Нацртати своје препарате и написати запажања.

Култура		
<b>Нацртати културе</b>		
<b>Описати морфологију колонија</b>	<hr/> <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/>

## 4.

## Микроскопски препарати

У циљу испитивања морфологије и покретљивости бактерија праве се бактериолошки микроскопски препарати, који су у суштини размаз испитиваног материјала на предметном стаклу, направљен различитим техникама. Основна подела микроскопских препарата је на нативне, односно необојене и на обојене препарате.

### 4.1. НЕОБОЈЕНИ – НАТИВНИ ПРЕПАРАТИ

Нативни препарат правимо када желимо посматрати живе бактерије ради доказивања њихове покретљивости. Необојене живе бактерије можемо посматрати у обичном влажном препарату и висећој капи.

#### 4.1.1. ВЛАЖНИ ПРЕПАРАТ

Влажни препарат се прави тако што се на средину очишћеног предметног стакла, стерилном езом стави кап течне културе и прекрије покровним стаклом. Када се користи култура с чврсте хранљиве подлоге мала количина колоније се суспендује у капи физиолошког раствора. Овакви препарати посматрају светлосним микроскопом, средњим или највећим увеличањем, често у тамном пољу.

#### 4.1.2. ВИСЕЋА КАП

Висећа кап се прави ради испитивања покретљивости бактерија. За овај вид препарата користе се предметна стакла с удубљењем, око чијег руба се наноси мала количина парафинског вазелина. На центар покровног стакла наноси се кап материјала који се испитује. Предметно стакло се затим окрене удубљењем према

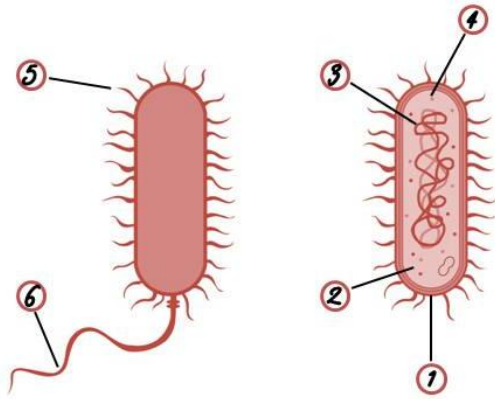
горе, а на њега се стави покровно стакло тако да се кап материјала налази у средини удубљења предметнице не додирујући његов руб. Лаганим притиском покровно стакло се прилепи за предметно стакло. Потом се, предметница с прилепљеним покровним стаклом, поново окреће тако да кап материјала на покровном стаклу виси према удубљењу предметнице.

### 4.2. ОБОЈЕНИ ПРЕПАРАТИ

Визуализација живих микроорганизама прилично је тешка, не само зато што су ситни, већ и зато што су прозирни и практично безбојни када се суспендују у водену средину. Како бисмо проучили њихове особине и поделили микроорганизме у одређене групе у дијагностичке сврхе, примењујемо разна биолошка бојења и поступке бојења у комбинацији са светлосним микроскопом. Применом различитих специфичних бојења лакше се запажа морфологија бактеријске ћелије, као и флагеле, споре и капсула у случају да их бактерија поседује (Слика 4.1.).

#### 4.2.2. МОРФОЛОГИЈА

Морфологија ћелија односи се на облик ћелије. Облик диктира како ће та ћелија



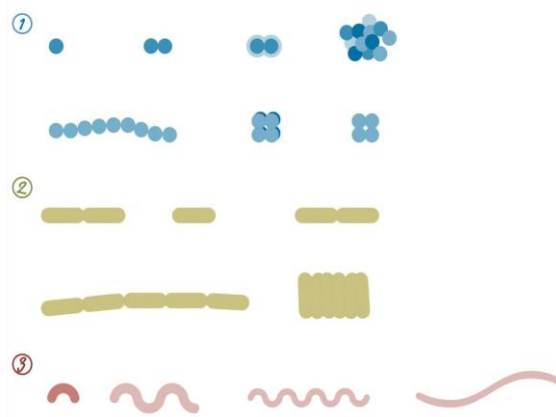
Слика 4.1. Грађа бактеријске ћелије. 1 ћелијски зид, 2 цитоплазма, 3 нуклеоид, 4 рибозом, 5 пили, 6 флагела

расти, размножавати се, добијати хранљиве материје, кретати се, а за ћелију је важно да одржава тај облик како би правилно функционисала. Ћелијска морфологија може се користити као карактеристика за помоћ у идентификацији одређених микроорганизама, али важно је напоменути да ћелије с истом морфологијом нису нужно повезане. Бактерије имају тенденцију да прикажу веома репрезентативну морфологију ћелија, али основни облици који се срећу код већине бактеријских врста су су: сферичанлоптаст, штапићаст, изувијан и кончаст (Слика 4.2.).

Облик лопте, односно кока (gr. *coccus*, pl. *cocci*), најједноставнији је облик бактеријске ћелије. Услед разлика у деоби, коке под микроскопом могу имати и различит распоред па се запажају као: монококе, диплококе, стрептококе, стафилококе, тетраде и сарцине. Коке не формирају споре и по правилу су непокретне. Управо непокретне бактерије чешће имају тенденцију да се групишу након деобе.

Облик штапића, односно бацил (lat. *bacillum*; pl. *bacilli*), је најраспрострањенији облик бактерија у природи. Посматрано под микроскопом различите врсте могу имати различит распоред, па се запажају као појединачни бацили, диплобацили, стрептобацили и палисаде.

Штапићасте бактерије такође показују разноврсност у облику краја ћелије, па они могу бити заобљени, изоштрени или засечени. Ове бактерије некада могу бити изузетно кратке и заобљених крајева, када их називамо кокобацили. Међу штапићастим бактеријама разликујемо спорогене и аспорогене штапиће, односно оне који стварају спору и оне који немају ту способност. Аспорогене бактерије ретко кад се јављају у форми ланаца.



Слика 4.2. Облици бактеријских ћелија. 1 коке, 2 штапићи, 3 изувијане и кончасте

Изувијане бактерије, односно штапићи с одређеним закривљењем, разликују се како по дужини и ширини, тако и по броју завоја које поседују. Постоје 3 групе изувијаних бактерија и то вибрио који представљају штапиће с једним закривљењем, као и спреле и спирохете који имају спирални облик, а разликујемо их према типу кретања које показују, што је могуће запазити само на влажном препарату (спирили су ригидни, док су спирохете флексибилне).

Кончаст облик бактерија карактерише се изузетном издуженошћу бактеријске ћелије. Током инфекције, одређене патогене бактерије попримају кончаст облик, како би избегле фагоцитозу. *Proteus mirabilis*, иначе дуг 2  $\mu\text{m}$ , у додиру с чврстим површинама трансформише своју ћелију из вегетативне у ројећу ћелију (енг. *Swarming cell*) у процесу у ком се она издужује за чак 20 до 50 пута.

Величина бактерија варира у зависности од врсте, па је тако просечни пречник лоптастих бактерија 0,5-2,0  $\mu\text{m}$ , а штапићастим или кончастим бактеријама, дужина се обично креће од 1-10  $\mu\text{m}$ , а пречник од 0,25-1,0  $\mu\text{m}$ . Неке бактерије попут спирохета у знатној мери премашују наведену дужину, а врста *Epiulopiscium fishelsoni*, симбионт нађен у цревима рибе плави танг, због своје дужине и до 700  $\mu\text{m}$  може се видети чак и голим оком. Одређене бактерије немају сталан облик и одликују се променљивошћу односно плеоморфизмом. Врсте рода *Rickettsia* типични су представници плеоморфних бактерија. То су у принципу кратки штапићи, величине око 0,3 x 1,0  $\mu\text{m}$ , али могу имати сферичан и кончаст облик.

#### 4.2.3. ФЛАГЕЛЕ

Флагеле су структуре на бактеријској ћелији које јој омогућавају кретање. Грађене су од протеина који се назива флагелин и најчешће су дуже од саме бактерије. Велики број Gram негативних штапића поседује флагеле. Могу се визуализовати само применом специјалних бојења. У односу на број и распоред флагела бактерије могу бити (Слика 4.3.):

Монотрихе - имају само једну флагелу

Перитрихе – имају више флагела које се налазе по целој површини бактеријске ћелије

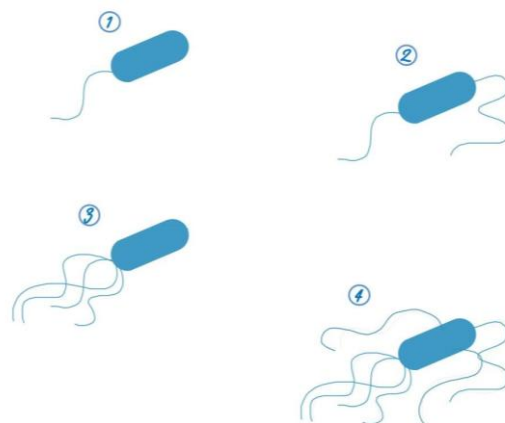
Амфитрихе – имају две флагеле на различитим крајевима бактеријске ћелије

Лофотрихе – имају више флагела на једном крају

Атрихе - немају флагеле

#### 4.2.4. ЕНДОСПОРА

Неке штапићасте бактерије попут врста из рода *Clostridium* и *Bacillus* примери су микроорганизама који имају способност постојања или као метаболички активне вегетативне ћелије или као врло отпорне, метаболички неактивне врсте ћелија које се називају споре. Када услови споља-



Слика 4.3. Подела бактерија према броју и распореду флагела. 1 монотрихе, 2 амфитрихе, 3 лофотрихе, 4 перитрихе

шће средине постану неповољни, вегетативне ћелије пролазе кроз процес који се назива спорогенеза и стварају нову унутарћелијску структуру звану ендоспора, која је окружена непропусним слојевима који се називају овојницама спора. Ако се услови наставе погоршавати, ендоспора се ослобађа из дегенерирајуће вегетативне ћелије и постаје независна слободна спора. Овојнице спору штите је од бројних физичких и хемијских агенаса попут топлоте, замрзавања и неких дезинфицијенса, али је и из истог разлога отпорна на стандарна бактериолошка бојења.

Положај ендоспоре може бити:

на крају бактеријске ћелије, када говоримо о терминалном положају споре као у случају *Clostridium tetani*

на средини бактеријске ћелије када, говоримо о централном положају споре као у случају *Bacillus anthracis* и

између центра и краја бактеријске ћелије, када говоримо о суптерминалном положају споре, као у случају *Clostridium septicum*.

Процес у ком се спора развија у вегетативну ћелију назива се герминација или клијање.

#### 4.2.5. КАПСУЛА

Капсула је полисахаридни слој који потпуно обавија бактеријску ћелију. Изузе-

так је капсула врсте *Bacillus anthracis* која се састоји од полипептида. Захваљујући својој структури отпорна је на стандардна бојења. Капсула има заштитну улогу од низа различитих фактора, као што су исушивање, хидрофобни токсични материјали (тј. детерџенти), бактериофаги и фагоцитоза. Капсула може повећати способност патогених бактерија да узрокују болест и може пружити заштиту од фагоцитозе, али може помоћи и у адхезији на површине. Бактерије које производе капсулу на чврстим агарима формирају слузаве - мукоидне колоније.

### **4.3. ПРАВЉЕЊЕ ПРЕПАРАТА**

Први корак у готово свим бактериолошким бојењима и при прављењу микроскопских препарата је прављење размаза или отисака органа и подразумева формирање танког филма ћелија преко предметног стакла, који ће затим бити осушен и фиксиран.

За прављење размаза увек се користе чиста и одмашћена предметна стакла. Нечистоћа и масноћа на предметним стаклима отежавају обојавање препарата, а уклањају се чишћењем меком памучном крпом и кратким превлачењем преко пламена, али прањем детерџентом и водом, а затим испирањем 96%-ним етанолом.

#### **4.3.1. ПРАВЉЕЊЕ РАЗМАЗА**

Прављење размаза може се урадити на више начина што зависи од врсте материјала послатог на испитивање, па тако разликујемо размазе направљене из култура и директне направљене из испитиваног материјала.

##### **4.3.1.1. Размази из течности или бујонских култура**

Праве се тако што се омчом стерилне езе узме кап течности или културе (претходно ресуспендоване лаганим мућкањем), која се пренесе на центар предметнице и кружним покретима равномерно размаже

по површини стакла и остави да се осуши на ваздуху.

##### **4.3.1.2. Размази из културе с чврстих хранљивих подлога**

Организми узгојени на чврстој подлози стварају дебео, густ површински раст и не могу се директно пренети на предметно стакло. Ове се културе морају разредити стављањем једне или две капи физиолошког раствора на средиште предметног стакла у којем ће се бактерије размутити. Бактерије се преносе стерилном езом, тако што само врх езе сме додиривати културу како би се избегло преношење превише бактеријских ћелија. Суспензија се постиже кружним покретима езе у капи физиолошког раствора или стерилне воде, што помаже у спречавању накупљања бактерија у грудвице. Готов размаз требало би да заузима подручје величине новчића и када се осуши требало би да изгледа као прозиран или полупрозиран, конфлуирајући беличасти филм.

##### **4.3.1.3. Размаз брисева**

Прави се тако што се брис по површини очишћеног предметног стакла окреће и то лаганим покретима како би се спречило оштећење ћелијских елемената и ремећење распореда бактерија.

##### **4.3.1.4. Размаз крви**

Прави се тако што се на један крај очишћеног предметног стакла стави кап крви и дотакне ужом ивицом друге предметнице наслоњене на прву под углом од 45°, а затим крв која се раширила додирном линијом размаже по површини доње предметнице лаганим потезом према њеном чистом крају.

##### **4.3.1.5. Размаз паренхиматозних органа**

Прави се тако што се у кап физиолошког раствора, кружним покретима по предметници, размаже материјал узет из дубине органа стерилном езом или Пастеур-овом пипетом.



#### 4.3.1.6. Размаз слузнице прева

Прави се тако што се ошичћеном предметницом саструже површина слузнице, а садржај се по другој чистој предметници рашири као приликом прављења крвног размаза.

#### 4.3.1.7. Отисак

Прави се када се желе доказати микроорганизми на површини органа и то на начин што се чистом предметницом, без померања по површини, притисне површина органа.

#### 4.3.2. ФИКСИРАЊЕ ПРЕПАРАТА

Препарати се фиксирају како би се убиле вегетативне форме бактерија, да би исте постале пријемчиве за боју и да би се материјал чврсто фиксирао за предметно стакло. Фиксираним и обојеним размазима треба пажљиво руковати, јер неке бактерије могу остати вијабилне, нарочито ендоспоре. Из овог разлога након употребе, обојене размазе треба аутоклавирати или их натопити у поуздан дезинфицијенс (24-48 часова) пре бацања.

За рутинско бојење размази се фиксирају брзим провлачењем предметног стакла, тако да је страна на којој је размаз окренута према горе, кроз Bunsen-ов пламен два или три пута, пазећи да се размаз не прегреје. Ово се може тестирати на надланици; стакло би требало да буде топло, али не довољно вруће да опече.

Осим топлотом препарати се могу фиксирати и хемијским средствима, за што се најчешће користе 96%-тни етилалкохол у трајању од 5-10 минута, или апсолутни метилалкохол у трајању од 3-5 минута.

Осушени препарати који ће бити бојени техником по Giemsa-и прво се фиксирају у апсолутном метил алкохолу током 3 минута, а затим се осуше.

#### 4.4. ТЕХНИКЕ БОЈЕЊА

Препарате бојимо у циљу проучавања грађе бактерија захваљујући бољем контрасту. Боје које се користе у ове сврхе

најчешће су облику соли, а могу бити киселе и базне. Најчешће коришћене боје су метиленско плаво (плава), фуксин и шафранин (црвена), генцијана виолет (љубичаста) и малахит зелено (зелена).

#### 4.4.1. ЈЕДНОСТАВНА БОЈЕЊА

У једноставном бојењу, бактеријски размаз се боји једним реагенсом, који ствара контраст између микроорганизма и позадине.

Сврха једноставног бојења је да се уоче морфологија и распоред бактеријских ћелија. Најчешће коришћене основне боје су метиленско плаво, кристал виолет и карбол фуксин.

Једноставни методи бојења уопштено укључују један корак бојења, односно бојење и испирање вишка боје водом. Ови методи се не сматрају диференцијалним или дијагностичким и имају ограничену употребу, међутим ово су брзи поступци за одређивање присуства бактерија.

#### 4.4.3. СЛОЖЕНА БОЈЕЊА

Сложена бојења односно диференцијална бојења се, у микробиологији, могу чешће користе од једноставних када за циљ имамо прикупљање информација о бактеријској врсти.

Ова бојења користе две контрастне боје и служе за класификацију бактерија (бојење по Gram-у, Ziehl-Neelsen-у), или за визуализацију структура бактерјске ћелије као што су флагеле, спора и капсула).

Сложене технике бојења технике имају више корака бојења. Раствори за бојење прелију се преко целог размаза и оставе на предметници одговарајуће време. Између сваког реагенса за бојење размаз се испере под лаганим млазом воде, уклони се вишак воде и дода се следећи реагенс. На крају се обојени размаз испере и осуши на ваздуху.



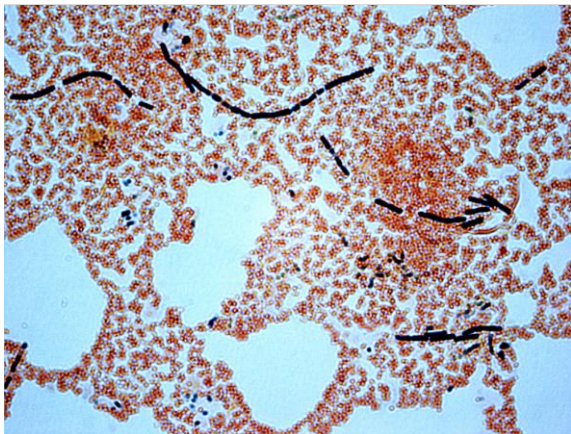
## 4.5. ПОСТУПЦИ БОЈЕЊА

### 4.5.1. БОЈЕЊЕ ПО GRAM-U

У зависности од грађе ћелијског зида, бактерије се боје по Gram-у или Ziehl Neelsen-у.

Због високог процента воска и масних киселина у грађи ћелијског зида, врсте попут припадника рода *Mycobacterium* су ацидорезистентне и боје се по Ziehl Neelsen-у. За већину осталих бактеријских врста примијењује се бојење по Gram-у.

Бојење по Gramу спада у најчешћа и најважнија диференцијална бојења у бактериологији. Према овом типу бојења бактерије се могу бојити љубичасто, када их називамо Gram позитивне, и црвено односно Gram негативне (Слика 4.4). Ове разлике у бојењу условљене су грађом ћелијског зида бактерија, тачније његовом дебљином и уделом пепдогликана и липида.



Слика 4.4. Мешана бактеријска култура обојена по Gram-у

Бојење по Gram-у припада сложеним начинима бојења и састоји се из четири фазе којима претходи припрема размаза.

На чисто предметно стакло, стерилном езом размаже се кап течне бактеријске културе или суспензија бактеријске културе тј. малог дела бактеријске колоније с чврсте подлоге, која се хомогенизује у капи физиолошког раствора. Овако направљен размаз, након сушења на ваздуху, фиксира се на тако што дођу страну

предметнога стакла 3 до 5 пута провучемо кроз пламен. Размаз се може фиксирати и метил алкохолом тако да га прелијемо и оставимо да алкохол испари.

На осушен и фиксиран препарат додаје се кристал генцијана виолет боја у трајању од 3 минута, а бактерије без обзира да ли су Gram + или Gram - попримају љубичасту боју.

Затим, ради бољег задржавања боје, препарат се прелије Lugоловим раствором у трајању од 2 минута, а све бактерије задржавају љубичасту боју.

Након тога препарат се одбојава 96%-тним алкохолом или раствором алкохола и ацетона, при чему Gram позитивне бактерије остају љубичасте, док Gram негативне, услед разградње липида у ћелијском зиду, губе боју.

Након одбојавања препарат се спере водом.

У последњем кораку бојења, препарат се прелива карболом фуксином или шафранином у трајању од 30 секунди до 1 минута, па бактерије, које су у претходној фази обезбојене, попримају црвену боју. Алкохол доводи до затварања пора на пептидогликанском слоју ћелијског зида Gram позитивних бактерија и као последица тога плава боја остаје унутар бактеријске ћелије, а црвена боја се губи коначним испирањем.

На крају препарат се испере водом и осуши.

Овакав тип бојења није значајан само за препознавање бактерија у култури већ и за непосредно прегледање клиничких узорака у тзв. директним препаратима.

### 4.5.2 БОЈЕЊЕ ПО ZIEHL-NEELEN-U (ZN)

Ћелијски зид бактерија које припадају родовима *Mycobacterium* ил *Nocardia* садрже миколичну киселину и отпорне су на продирање боја растворљивих у води као што је бојење по Gram-у, што може довести до лажног Gram позитивног резултата.

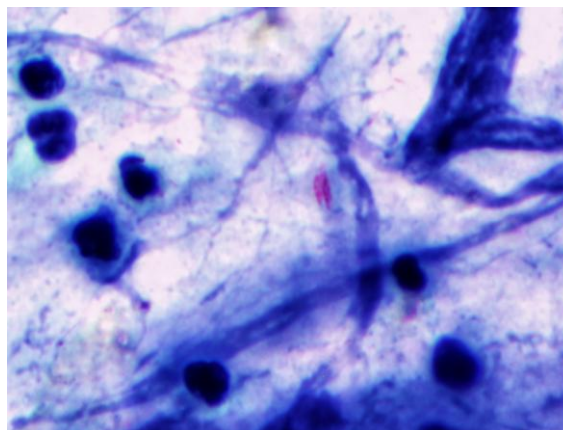
1. Фиксирани препарат прелије се Ziehl-ovim 3%-тним раствором карбол фуксина и стави изнад извора топлоте допуштајући да раствор боје на препарату почне да испарава. Овај корак траје 5 минута, при чему се води рачуна да боја не испари и по потреби се долива.
2. Боја се одлива, вишак карбол фуксина се спира водом из славине, а вода заостала на предметници се суши
3. Преперат се одбојава киселим алкохолом, додавањем реагенса кап по кап док алкохол не постане готово бистар с благом црвеном нијансом.
4. Испира се водом из славине, вода заостала на предметници се суши
5. Препарат се прелива 0,3%-тним раствором метиленско плавог у трајању од 2 минута.
6. Боја се одлива, а вишак боје спира се водом из славине и осуши

Ацидорезистентне бактерије, овом техником, боје се црвено (Слика 4.5.), а остале плаво.

#### 4.5.3. БОЈЕЊЕ ПО GIEMSA-И

Иако примарно описано за бојење крвних размаза, због своје ефикасности бојење по Giemsa-и, осим у хематологији, нашло је своју примену у микробиологији, паразитологији и хистологији. У микробиологији ово бојење се користи за бојење интрацелуларних бактерија, спиралних бактерија, врсте *Yersina pestis* и др.

1. Осушен размаз фиксира се метилалкохолом
2. Тако фиксирани препарат прелије се Giemsa раствором разређеним водом у односу 1:10 и остави током 20 до 60 минута
3. Боја се одлива, а вишак боје спира дестилованом водом и остави да се осуши



Слика 4.5. Размаз спутума обојен по Ziehl-Neelsen-у. Микобактерије се запажају као црвено бојени штапићи.

#### 4.5.4. БОЈЕЊЕ ПРЕМА SCHAEFFER-FULTON-У

Бојење према Schaeffer-Fulton-у или малахит-зелено бојење је најчешћи метод који се користи у бактериологији за детекцију спора. Припадници родова *Clostridium* и *Bacillus* су примери организма који имају способност постојања како у форми вегетативне ћелије тако и у форми споре.

1. Фиксирани препарат прелије се малахит зеленим и стави изнад извора топлоте допуштајући да раствор боје на препарату почне да испарава. Овај корак траје 2 до 3 минута, при чему се води рачуна да боја не испари и по потреби се долива.
2. Боја се одлива, а вишак боје спира се водом.
3. Препарат се затим ради контра бојења прелива шафранином у трајању од 30 секунди
4. Боја се одлива, а вишак боје спира се водом и остави да се осуши.

#### 4.5.5. БОЈЕЊЕ ПО FOTH-У

Бојење по Foth-у користи се за бојење капсула, а нарочито за врсту *Bacillus anthracis*.

1. На претходно осушен, али нефиксирани препарат, наносе се две

- капи концентроване боје по Giemsa-и у трајању од 1 минута
2. Додаје се 1 ml дестиловане воде, а померањем предметнице, кружним покретима, током 3 до 5 минута вода се меша с бојом
  3. Боја се одлива, а вишак боје спира се водом из славине и остави да се осуши.

#### **4.5.6. BOJENJE PREMA LEIFSON-U**

Ово бојење омогућава посматрање флагела бактерија под светлосним микроскопом.

1. На претходно фиксиран препарат налије се раствор боје по Liefson-у и остави да стоји током 7 до 15 минута
2. Када се на површини боје формира златни филм, боја се одлива, а вишак боје спира се водом и остави да се осуши.

# Практични рад

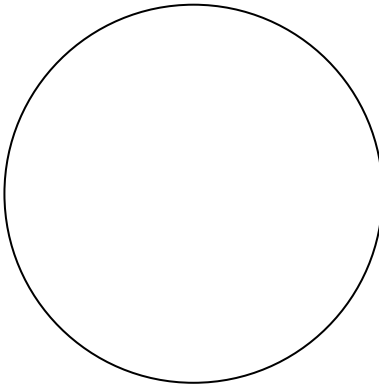
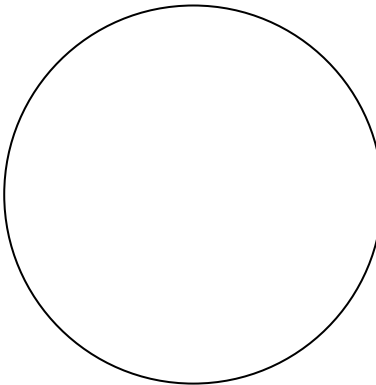
## Потребни материјал:

бактеријска култура с претходне вежбе  
предметно стакло  
еза  
пламеник  
стерилан физиолошки раствор  
комплет боја за бојење по Gram-у (генцијана виолет боја, Lugol-ов раствор, шафранин-карбол фуксин)  
96%-тни етил алкохол  
имерзионо уље

## Поступак:

1. На чисто предметно стакло нанети кап физиолошког раствора
2. Део бактеријске колоније, кружним покретима, размазати у капи физиолошког раствора
3. Оставити размаз да се осуши на ваздуху
4. Осушен размаз фиксирати на пламену, превлачењем предметнице преко пламена 3 пута
5. Фиксиран препарат поставити на сталак и размаз прелити ганцијана виолет бојом и оставити 3 минута
6. Одлити боју с препарата
7. Прелити Lugol-овим раствором и оставити 2 минута
8. Одбојити 96%-тним алкохолом
9. Одлити боју с препарата и испрати водом
10. Прелити шафранином/карбол фуксином и оставити 1 минут
11. Одлити боју, испрати водом и оставити да се препарат осуши
12. Препарат посматрати под имерзионим објективом

Нацртати своје препарате и написати запажања:

<b>Препарат</b>		
<b>Нацртати видно поље</b>		
<b>Ћелијска морфологија Облик Распоред Боја бактерије</b>	<hr/> <hr/> <hr/>	<hr/> <hr/> <hr/>

## 5.

## Биохемијска идентификација

**М**орфолошке одлике колонија и бактеријских ћелија први су кораци при микробиолошкој идентификацији врсте. Следећи корак је култивација на подлогама за утврђивање биохемијских особина бактерија, при чему се одређује њихова способност да користе различите материје кроз активност њихових ензима

### 5.1. ФЕРМЕНТАЦИЈА УГЉЕНИХ ХИДРАТА

Током ферментације супстрати попут угљених хидрата и алкохола пролазе кроз анаеробну разградњу и производе органску киселину, попут мравље или сирћетне, коју може пратити и појава гасова попут водоника или угљен диоксида. Факултативни анаероби обично су такозвани ферментатори угљених хидрата.

У циљу доказивања производње гаса током разградње угљених хидрата у одговарајућу течну подлогу стваља се Durham-ова цевчица, стаклена епруветица уроњена дном према горе, у којој се накупљају мјехурићи насталих гасова (Слика 5.1.).

Типична подлога за доказивање ферментације угљених хидрата садржи:

**Течну хранљиву подлогу** која ће обезбедити раст микроорганизама (пептонска вода, хранљиви бујон, триптон соја бујон).

**Специфични угљени хидрат** (обично 1%) који служи као супстрат за одређивање ферментацијске способности микроорганизама (моносахариди попут глукозе и манозе, дисахариди попут лактозе и сахарозе, као и полисахариди

попут скроба и инулина, али и шећерни алкохоли попут глицерола и сорбитола).



Слика 5.1. Продукција гаса у течной подлози



**pH индикатор** (фенол црвено, који је црвен при неутралном pH (7) и мења боју у жуту већ при благо киселом pH од 6,8, што значи да ће и незнатна количина киселине довести до промене боје, или Andrade индикатор који је при pH већем од 7,2 безбојан, а при pH мањем од 5,5 мења боју у ружичасту).

Инокулисане подлоге инкубирају се при температури  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Природа реакције ферментације и активност индикатора захтевају да се све културе посматрају унутар 48 часова. Продужена инкубација може прикрити реакције стварања киселине стварањем база, због ензимског деловања на супстрате који нису угљени хидрати. У случају продукције гаса опажају се мехурићи у Durham-овој цевчици.

### 5.1.1. ФЕРМЕНТАЦИЈА УГЉЕНИХ ХИДРАТА НА ТРОСТРУКОМ ШЕЋЕРУ ПО KLIGLER-У (TSI, TRIPLE SUGAR IRON)

Овај тест осмишљен је за диференцијацију различитих група или родова унутар фамије *Enterobacteriaceae*, који су сви Gram негативни бацили способни да ферментушу глукозу уз производњу киселине и гаса, као и за разликовање чланова ове фамије од осталих Gram негативних ентеричних бацила. Ова се диференцијација врши на основу разлика у обрасцима ферментације угљених хидрата и производњи  $\text{H}_2\text{S}$  од стране различитих цревних бактерија. За испитивање теста ферментације угљених хидрата као подлога користи се коси Kligler-ов агар на који се дио бактеријске колоније инокулише убодном езом у дно и по косини подлоге. Након инокулације епрувете се инкубирају током 18 до 24 часа, у аеробним условима на температури од  $37^\circ\text{C}$ . У случају ферментације само глукозе, киселине се акумулирају на дно подлоге што се манифестује променом боје дна подлоге из црвене у жуту. У случају ферментације лактозе и сахарозе, због њиховог већег удела у подлози (1%) у односу на глукозу (0,1%), велика про-

дукција киселина доведиће до промене боје како дубоког дела, тако и косине подлоге из црвене у жуту. Продукција гаса манифестује се појавом мехурића у подлози и њеним цепањем, док се продукција  $\text{H}_2\text{S}$  карактерише појавом црне боје у дубоком делу подлоге услед стварања  $\text{FeSO}_4$  (Слика 5.2.).



Слика 5.2. Култура *Salmonella* sp. на TSI агару (десно) не разграђује шећере, али разграђује пептоне (црвено) из подлоге и ствара  $\text{H}_2\text{S}$  (црно)

### 5.2. ОДРЕЂИВАЊЕ СТВАРАЊА КАТАЛАЗЕ

Овим се тестом одређује способност бактерија да стварају каталазу – ензим који водоник пероксид разграђује на кисеоник и водоник.

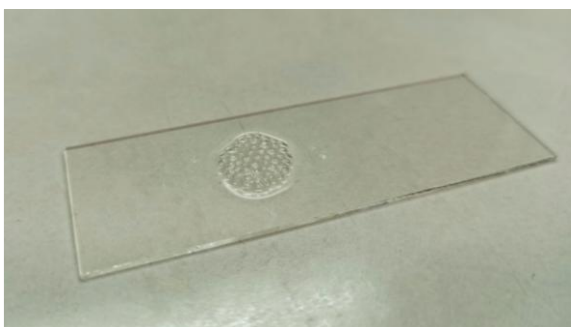
Омчом стерилне езе узимају се неколико бактеријских колонија или само бактерије с врха колонија уз избегавање додиривања подлоге, ако је у питању крвни агар због могућности да еритроцити доведу до лажно позитивне реакције. Бактерије се пренесу на чисто предметно

стакло, а затим се дода кап 3% водикпероксида (Слика 5.3.).



Слика 5.3. Материјал потребан за одређивање стварања каталазе

Стварање мехурића гаса, унутар неколико секунди, указује на производњу каталазе од стране бактерија (Слика 8.4.).



Слика 5.4. Позитивна реакција каталазе

Овај тест примењује се за разликовање Грам позитивних кока (*Staphylococcus* врсте су каталаза позитивне, док су припадници родова *Streptococcus* и *Enterococcus* каталаза негативни), за разликовање аеротолерантних врста из рода *Clostridium* које су каталаза негативне од врста рода *Bacillus* које су каталаза позитивне, као и за идентификацију врста фамилије *Enterobacteriaceae* које су каталаза позитивне.

### 5.3. ТЕСТ С КАЛИЈУМ ХИДРОКСИДОМ

Тест се изводи тако што се омчом стерилне езе неколико бактеријских колони-

ја узме с неселективне хранљиве подлоге (крвни агар) на чистом предметном стаклу помеша с једнаком количином 3% калијум хидроксида (КОН). Након темељног мешања еза се повремено одиже да се види ствара ли се гел. Ако је бактерија Грам негативна, унутар 60 секунди формира се вискозни гел, док се гел не формира у случају да је бактерија Грам позитивна.

### 5.4. ОДРЕЂИВАЊЕ ПОКРЕТЉИВОСТИ

Захваљујући томе што поседују флагеле многе бактерије имају способност кретања. Покретљивост може бити условљена и амбијенталном температуром, па су тако неке врсте попут *Listeria monocytogenes* покретне при ниским температурама, 30° С и ниже, док покретљивост потпуно губе при температури од 37° С. Два су главна начина за одређивање покретљивости и то висећа кап и раст у полуврстим хранљивим подлогама.



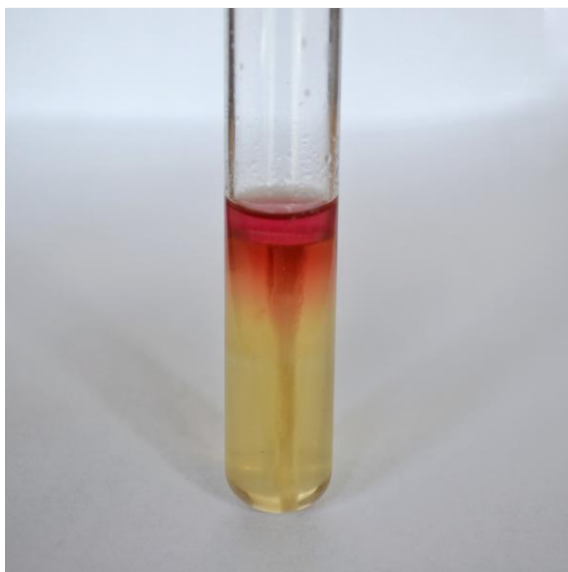
Слика 5.4. Култура непокретне врсте *Bacillus anthracis* (лево) и култура покретне врсте *Bacillus*



У дубину полуврсте, хранљиве подлоге, колонија испитујуће бактерије инокулише се убодом. За један узорак користе се две хранљиве подлоге при чему се једна инкубира на собној температури, а друга на температури од 37° С, а пораст се проверава након 24 и 48 часова. Покретне бактерије мигрирају кроз полуврсте подлоге и дифузно их замућују, док је раст непокретних бактерија ограничен на подручје око линије убода (Слика 5.4.).

#### 5.4. ТЕСТ ПРОДУКЦИЈЕ ИНДОЛА

Триптофан је есенцијална аминокиселина чијом се оксидацијом од стране неких бактерија стварају индол, пирувична киселина и амонијак. За овај тест користи се полуврста SIM подлога. Убодном езом, део испитиване бактеријске колоније инокулише се у дубину подлоге. Инокулисане подлоге затим се инкубирају при температури од 37°С током 24 часа. На подлогу се дода 10 капи Ковасевог реагенса, црвена боја (Слика 5.5.) површине подлоге значи да испитујући сој хидролизује триптофан, док у случају сојева који не поседују ензим триптофаназа боја површине подлоге је жута.



Слика 5.5. Позитиван тест продукције индола

#### 5.5. МЕТИЛ-ЦРВЕНО ТЕСТ (MR)

Овим тестом доказује се продукција стабилних киселина услед ферментације шећера. Инокулисане подлоге инкубирају се при температури 37°С током 18 до 24 часа. Након инкубације у културу се додаје метил-црвено индикатор, а позитиван MR тест манифестује се променом боје подлоге у црвену, док при негативном тесту боја подлоге остаје непромењена.

#### 5.6. VOGES PROSKAUER TEST (VP)

Voges Proskauer тестом доказује се продукција ацетоина који настаје услед ферментације шећера. За извођење овог тест култивација соја који се испитује користи се иста подлога као за метил-црвено тест, (MR-VP подлога). Инокулисане подлоге инкубирају се при температури 37°С током 18 до 24 часа. Након инкубације у културу се додаје 10 капи  $\alpha$ -нафтола, а затим и 10 капи 40%-тног КОН, након чега се садржај епрувете се промућка. Појава љубичасто-црвене боје 15 минута након додавања реагенса представља позитивну реакцију, док при негативној реакцији не долази до промене боје подлоге.

#### 5.7. ТЕСТ КОРИШЋЕЊА ЦИТРАТА

Тестом коришћења цитрата доказује се способност бактерија да користе цитрат као једини извор угљеника. У сврху испитивања коришћења цитрата користи се Simmons цитратни агар који садржи бромтимол плаво. Део бактеријске колоније инокулише се убодном езом у дно и по косини подлоге. Након инокулације епрувете се инкубирају током 18 до 24 часа, у аеробним условима на температури од 37°С. Након инкубације врши се читавање, а позитиван резултат окарактерисан је променом боје подлоге из

зелене у плаву уз видљив раст, док при негативном резултату нема промене боје подлоге и видљивог раста бактерија (Слика 5.6.).



Слика 5.6. Негативан (лево) и позитиван (десно) тест коришћења цитрата

## 7.8. CAMP ТЕСТ

Овај тест служи за идентификацију групе  $\beta$ -хемолитичких стрептокока. Заснива се на синергистичкој хемолизи *Streptococcus agalactiae* с неким другим врстама попут *Staphylococcus aureus*, када расту једне уз друге на крвном агару. CAMP (Christie–Atkins–Munch–Peterson) фактор који продукује *S. agalactiae* појачава хемолизу коју стварају стафилококе. Овај феномен се види као јасна зона хемолизе у облику врха стреле. CAMP тест може се користити и за доказивање врста *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* и *Rhodococcus equi*.

Тест се изводи тако што се на површину крвног агара, дуж средине, нанесе култура *S. aureus*. Под правим углом на линију

инокулације *S. aureus* на раздаљини од 2 mm, наносе се културе испитиваних бактерија. Засејане подлоге даље се инкубирају на  $37\pm 1^\circ\text{C}$  током 18-24 часа.

## 5.9. ГОТОВИ БИОХЕМИЈСКИ ТЕСТОВИ

Данас се у идентификацији бактерија за одређивање биохемијских особина користе готови биохемијски тестови. Овим се тестовима одређује већи број биохемијских особина и то разградња угљених хидрата, стварање ензима, индола,  $\text{H}_2\text{S}$ , уреазе и друго. Тестови се изводе тако што се дилуирана 24-часовна култура нанесе у бунарчиће с одређеним супстратом и индикатором и остави да се током ноћи инкубира при температури од  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Резултати теста читавају о односу промену на боје индикатора.

## 5.10. ЧУВАЊЕ БАКТЕРИЈСКИХ КУЛТУРА

Опште је правило да се период вијабилности бактерија продужава са смањењем температуре на којој се чувају. Када се температура чувања спушта испод  $0^\circ\text{C}$ , како би се избегло оштећење бактеријских ћелија током замрзавања, неопходно је користити криопротектанте. Културе се могу чувати на више начина, а временски период када једна бактеријска култура остаје вијабилна под одређеним условима зависи од бактеријског соја (Табела 5.1.).

### 5.10.1. КРАТКОТРАЈНО ЧУВАЊЕ

Бактеријске културе које се користе свакодневно или седмично могу се чувати на агар плочама или у дубоким агарима на температури фрижидера од  $4^\circ\text{C}$ . Како би се спречила контаминација и исушивање подлога, Petri плоче се заптивају парафилмом, а епрувете с дубоким агаром се запуше гуменим чепом. Културе у дубоким агарима су отпорније на исушивање и контаминацију. На овај начин могу се чувати бактерије из реда

*Enterobacteriaceae*, затим фамилије *Pseudomonadaceae*, родова *Staphylococcus*, *Acinetobacter* и друге.

### 5.10.2. ДУГОТРАЈНО ЧУВАЊЕ

Замрзавање је добар начин чувања бактерија и што је нижа температура култура ће дуже задржати вијабилност. Чување култура замрзавањем може се вршити на различитим температурама у лабораторијским фрижидерима, ултрафризерима и у течном азоту. Проблем који настаје током замрзавања је стварање кристала леда у бактеријским ћелијама, јер лед може оштетити бактеријске ћелије услед дехидрације изазваном повећањем концентрација соли унутар ћелије. Глицерол се често користи као криопротектор како би се смањили негативни ефекти замрзавања. Додавање глицерола до коначне концентрације од 15 – 20% помаже одржавању вијабилности културе при свим условима замрзавања. На овај начин чувају се бактеријске врсте из родова *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Bordetella* и друге.

Вода служи не само као медијум за ензимске реакције, већ и за спонтане негативне реакције као што је стварање слободних радикала, па уклањање воде из ћелије зауставља и ензимске и неензимске реакције. Лиофилизација која подразумева брзо замрзавање бактерија до  $-55^{\circ}\text{C}$  праћено сушењем помоћу вакуума, један је од метода уклањања воде из ћелије. Многе бактерије могу се врло успешно сачувати лиофилизацијом. Лиофилизоване културе растварају се додавањем физиолошког раствора и као такве инокулишу на хранљиве подлоге за даљи рад.

Табела 5.1. Начини чувања бактеријских култура

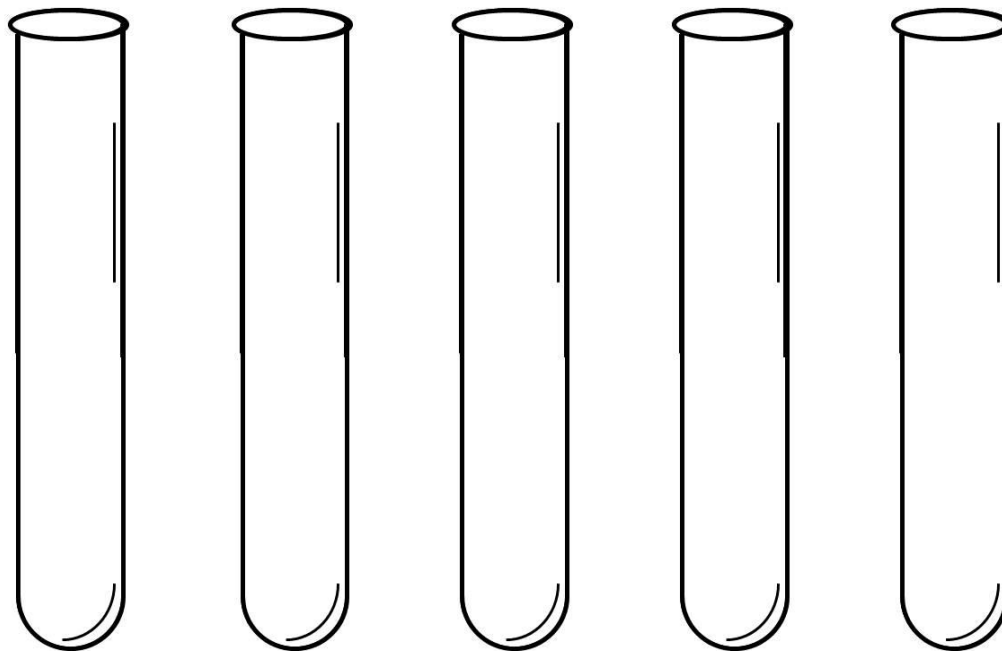
Услови чувања	Температура чувања	Дужина чувања
Агар плоче	4	4-6 с
Дубоки агар	4	3 с – 1 г
Фрижидер	-20	1 – 3 г
Ултрафризер	-80	1 – 10 г
Течни азот	-140 – -180	> 15 г
Лиофилизација	$\leq 4$	> 15 г

# Практични рад

## Потребни материјал:

- бактеријска култура с претходне вежбе
- омчаста еза
- убодна еза
- пламеник
- инкубатор
- подлоге за IMViC
- TSI агар
- реагенси за IMV
- $H_2O_2$
- 3% KOH

**Поступак:** Инокулисати подлоге културом изолованом на претходној вежби.  
Након 24-орочасовне инкубације додати реагенсе и написати запажања.




## Испитивање антимикуробне осетљивости

Неке бактерије природно су отпорне на поједине антимикуробне лекове и та отпорност може бити заједничка за цели род бактерија или само за једну врсту. Друге су ипак, услед селективног притиска изазваног употребом лекова, временом стекле отпорност и оваква отпорност типична је само за поједине сојеви одређене врсте. озбиљну здравствену опасност представљају сојеви бактерија који су стекли мултиплу резистенцију, односно резистенцију на више различитих група антибиотика, попут *S. aureus* резистентног на метицилин и ентерокока резистентних на ванкомицин.

Сврха испитивања антимикуробне осетљивости је да усмери клиничаре приликом одабира терапије на коју ће клиничко стање које се третира позитивно одговорити. Постоје три главна метода тестирања антимикуробне осетљивости у уобичајеној употреби: диск-дифузиони метод, бујон дилуциони метод и агар дилуциони метод.

### 6.1. ДИСК ДИФУЗИОНИ МЕТОД

Овај начин испитивања осетљивости колоквијално се назива још и антибиограм. Ово је квалитативни метод, а резултати теста читавају се као осетљив, умерено осетљив и резистентан.

Диск дифузиони метод је најједноставнији метод за извођење. Он укључује стављање дискова импрегнираних антимикуробним супстанцама на агар плочу на коју је засејана бактерија која се тестира. Антимикуробни агенси дифундују у агар стварајући зону засићену антибиотиком, у којој организам осетљив на тај антибиотик неће раста

Иако једноставан за извођење, поновљив и јефтин, користити се само за брзорастуће патогене. Најчешће се примењује за одређивање антимикуробне осетљивости ентеробактерија и стафилокока,

док се осетљивост сојева анаеробних бактерија, као и врста из рода *Listeria*, не може поуздано одредити овим методом.

Како би резултати били клинички поуздани, техника се мора изводити на стандардизован начин, пошто многи фактори попут густине суспензије бактеријске културе и хранљива подлога која се користи могу утицати на величину зона инхибиције. Стандардизацију поступка урадили су Kirby и Bauer 1966 године.

Овај поступак изводи се тако што се од чисте бактеријске културе, која је изолована на неселективној хранљивој подлози и није старија од 24 часа, направи суспензија оптичке густине 0,5 McFarlanda. Ово је оптичка густина при којој је концентрација бактерије *Escherichia coli*  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml.

За култивацију бактеријске културе којој се испитује осетљивост на антимикуробне

лекове користи се Mueller-Hinton агар – неселективна хранљива подлога која подржава раст већине патогених микроорганизама и не садржи материје које инхибирају активност антимикробних лекова. У случају испитивања осетљивости пробирљивих бактерија попут *Streptococcus* spp, *Mannheimia haemolytica*, или *Pasteurella multocida* у Mueller-Hinton агар се додаје 5 до 10 % дефибринисане крви. Припремљена бактеријска суспензија култивише се на подлогу у року од 15 минута од припреме. Стерилни брис се умочи у бактеријску суспензију, вишак течности оцеди о унутрашњи зид горњег дела епрувете, а затим се брисом суспензија наноси по целој површини агара, три пута у три различита правца, сто се постиже окретањем подлоге за 60° након сваког наношења. Овакав поступак требало би да обезбеди конфлуентан раст.

На агар с бактеријском суспензијом, у року од 15 минута, ручно или диспензером стављају се антибиотски дискови. Антибиотски дискови су округли комади апсорбујућег папира пречника 6 mm, који су импрегнирани растворима антибиотика тачно одређених концентрација израђених у µg или у случају пеницилина интернационалним јединицама IU. Подлоге се након стављања антибиотика, а у року од 15 минута, страном у којој је агар окренутом према горе стављају у инкубатор на 36±1°C. Инкубација се

врши током 18 до 24 часа.



Слика 6.1. Резултати диск дифузионог метода

Резултати се тумаче према смерницама прописаним међународним стандардима Института за клиничке и лабораторијске стандарде (Clinical & Laboratory Standards Institut, CLSI) или Европског комитета за испитивање антимикробне осетљивости (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) (Слика 6.2.). На основу пречника зоне инхибиције бактеријски сој се карактерише као осетљив, умерено осетљив или резистентан на дати антибиотик. Смернице за интерпретацију резултата антибиотске осе-

Табела 6.1. Зоне инхибиције раста припадника фамилије *Enterobacteriaceae* за одабране антибиотике

Антибиотик	Ознака диска/µg	Зоне инхибиције mm		
		Осетљив	Умерено ос.	Резистентан
Ампицилин	AMP-10	≥14		≤13
Амоксицилин+клавуланска киселина	AMC-30	≥19		≤18
Цефуроксим	CXM-30	≥19		≤18
Цефтриаксон	CRO-30	≥25	22-24	≤21
Гентамицин	CN-10	≥17	14-16	≤13
Триметоприм+сулфаметоксазол	SXT-25	≥14	11-13	≤10
Ципрофлоксацин	CIP-5	≥22	19-21	≤18



тљивости *E. coli* за одређене антибиотике дат је у табели 6.1.. Тумачење резултата истог лека може бити другачије за различите врсте.



Слика 6.2. Резултати диск дифузионог метода за *E. coli* ATCC 25922

За контролу поступка изведеног диск дифузионог метода користе се сојеви које прописују међународни стандарди, а који имају тачно дефинисане зоне инхибиције раста за одређене лекове. Најчешће коришћени сојеви су сој *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) (Слика 6.2.) и *S. aureus* ATCC 25923.

## 6.2. ДИЛУЦИОНИ МЕТОД

Дилуциони метод служи као референтни метод за одређивање осетљивости бактерија на антибиотике. Овај метод користи се да се квантитативно одреди минимална концентрација лека која инхибира или убија бактерије. Праве се двострука разређења антимикуробне супстанце, а најнижа концентрација која инхибира видљив раст микроорганизама сматра се минималном инхибиторном концентрацијом – МИС. Финална суспензија бактеријске културе, не старије од 24 часа, за извођење дилуционог метода треба да садржи  $1 \times 10^5$  CFU/ml. У зависности од тога у ком медијуму се изводи испитива-

ње разликујемо бујон дилуциони и агар дилуциони метод.

### 6.2.1. БУЈОН ДИЛУЦИОНИ МЕТОД

Овај метод изводи се у епруветама у течной хранљивој подлози, Mueller-Hinton бујону. У серију епрувета с двоструким разређењима антибиотика дода се једнака количина бактеријске суспензије. Инокулисане подлоге стављају се на инкубацију током 16 до 20 часова при температури од 37°C. Резултат се читава прегледом замућења подлога условљеног растом бактерија, а МИС се налази у епрувети с најмањом концентрацијом лека која је инхибирала раст испитиване бактерије, односно у епрувети у којој нема замућења подлога.

У циљу одређивања минималне бактерицидне концентрације (МБС) на Mueller-Hinton подлогу пресејаваја се садржај епрувета у којима нема видљивог бактеријског раста у виду замућења. Најмања концентрација антибиотика при којој нема видљивог бактеријског раста на Mueller-Hinton агару, након инкубације од 16 до 20 на 37° С, представља уједно и МБС.

### 6.2.2. АГАР ДИЛУЦИОНИ МЕТОД

Агар дилуциони метод укључује додавање различитих жељених концентрација антимикуробног агенса у отопљени агар, најчешће коришћењем серијских двоструких разређења, након чега следи инокулација бактеријског инокулума на површину агара. Након инкубације врши се читавање пораста колонија, а МИС преставља највеће разређење антибиотика при коме нема видљивог формирања колоније.

Предност овог теста је могућност испитивања антимикуробне осетљивости више сојева у исто време, под истоветним условима.

## 6.3. Е-ТЕСТ

Етест представља комбинацију дифузионог и дилуционог метода, односно одре-



ђивање минималне инхибиторне концентрације дифузионим методом. Хранљива подлога, као и начин припреме инокулума и инокулација исти су као код и диск дифузионог метода. У овом методу користе се пластичне траке с градуисаним концентрацијама импрегнираног ан-

тибиотика, које се стављају на површину инокулисаног агара. Минимална инхибиторна концентрација читаваја се, након 16 до 20 часова инкубације, на месту на ком ивица инхибиције раста додирује траку.

# Практични рад

## Потребан материјал:

бактеријска култура с претходне вежбе  
бактеријска култура *E. coli* ATCC 25922  
омчаста еза  
пламеник  
Muller-Hinton агар  
стерилни физиолошки раствор  
стерилни брис  
суспензија оптичке густине 0,5 McFarlanda  
антибиотски дискови  
пинцета  
70%-тни етил алкохол  
инкубатор  
лењир

**Задатак:** Испитати антимикуробну осетљивост бактеријског соја с претходне вежбе, применом диск дифузионог метода и написати резултате.

Антибиотик	Ознака диска/ $\mu\text{g}$	Зона инхибиције mm	Резултат

# СПЕЦИЈАЛНИ ДЕО

7. Genus *Staphylococcus*
8. Genus *Streptococcus*
9. Genus *Bacillus*
10. Genus *Mycobacterium*
11. Ordo *Enterobacterales*
12. Genus *Escherichia*
13. Genus *Salmonella*
14. Genus *Clostridium*

## Genus *Staphylococcus*

Класа: *Bacilli*

Ред: *Bacillales*

Фамилија: *Staphylococcaceae*

Род: *Staphylococcus* Rosenbach 1884

Врсте од значаја у ветеринарској медицини:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus pseudintermedius*

*Staphylococcus hyicus*

**К**оке које формирају неправилне гроздасте скупине, по Gram-у се боје позитивно, непокретене, неспорулишуће, факултативни анаероби, расту на небогаћеним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° C, формирају колоније беле или жуте боје, средње су величине, стварају каталазу, не стварају цитохром-оксидазу, стварање коагулазе директно корелира с патогеношћу, коменсали су коже топлокрвних животиња, изазивају гнојне инфекције.

### 7.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Припадници рода *Staphylococcus* су Gram позитивне, непокретне, лоптасте бактерије пречника од 0,5 до 1,5  $\mu\text{m}$ , које се могу јављати као појединачне коке, у паровима, тетрадама или као кратки ланци који се карактеристично деле у више од једне равни због чега формирају кластере неправилног – гроздастог облика, по чему је род и добио име (гр. *σταφύλια* – грожђе; *κόκκος* – зрнце, бобица). Иако не стварају споре стафилококе су изузетно отпорне и могу преживети многе нефизиолошке услове спољашње средине. Расту на небогаћеним хранљивим подлогама, али и на подлогама с високим уделом NaCl (и до 10%) – карактеристика која је искоришћена за

прављење селективних подлога за стафилококе. Колоније су округле, глатке, уздигнуте и светлуцаве и могу бити окружене зоном хемолize када се узгајају на подлогама које садрже крв. Многе врсте стварају жути пигмент што је карактеристика која се традиционално доводи у везу са стафилококама, али није дефинитивни критеријум за одређивање врсте или рода.

С изузетком анаеробне врсте *Staphylococcus saccharolyticus* и *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, стафилококе су факултативни анаероби. Иако стафилококе уобичајено стварају каталазу, забележени су и сојеви који су каталаза негативни. Већина врста овог рода не стварају цитохром-оксидазу. Производња ензима коагулазе најзначајнија је каракте-

ристика која корелира с вирулентношћу код стафилокока. Коагулаза-позитивни стафилококи (CoPS) представљају главне патогене врсте унутар рода. Супротно њима коагулаза-негативни стафилококи (CoNS) релативно су безначајни патогени који изазивају опортунистичке инфекције код имунокомпромитованих домаћина.

До данас је у роду *Staphylococcus* описано преко 60 врста, од којих су у ветеринарској медицини најважнији *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* и *Staphylococcus hyicus*.

## 7.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Стафилококе су примарно коменсали коже топлокрвних животиња, али могу колонизовати горње партије респираторног тракта, гастроинтестинални тракт, доње партије урогениталног тракта и млечну жлезду.

Док су око 20 до 30% здраве људске популације носиоци *S. aureus*, код животиња његова преваленција варира од врсте до врсте домаћина, до 90% код кокошака, 42% свиња, 29% оваца и између 14 и 35% крава и јуница. Колонизује кожу, обично у периоаналном пределу и пределу пазуха, као и носне шупљине. Осим тога, *S. aureus* често колонизује назофаринкс.

*S. pseudintermedius* углавном се налази на кожи, ушима и у устима здравих паса, а често се ревиди као узрочник инфекција код паса.

*S. hyicus* се изолује из носа, очију и с коже здравих свиња или из вагиналне флоре здравих крмача.

## 7.3. ОБОЉЕЊА

Уобичајена обољења од значаја у ветеринарској медицини, а које изазивају стафилококе су крпељска пијемиа, маститис, ботриомикоза, ексудативни епидермитис и пиодермија. Водећи су узрочници нозокомијалних инфекција, нарочито сојеви *S. aureus* и *S.*

*pseudintermedius* који су резистентни на метицилин и ванкомицин.

*S. aureus* је клинички најважнија врста, јер код људи и животиња може изазвати широк спектар обољења од гнојних процеса до септикемије. Поред врста *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* и *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* је водећи узрочник маститиса код крава, оваца и коза, али и кобила. Mogel-ову болест оваца и коза, првенствено млађих категорија, изазива подврста *S. aureus* subsp. *anaerobius*, а обољење се манифестује стварањем апсцеса у површинским лимфним чворовима који се обично налазе у мандибуларној регији. Код јагњаци *S. aureus* након убода крпеља може изазвати и крпељску пијемиију. Код паса може изазвати септични артритис, инфекције спољашњег и средњег ува и пиодермију. Код кунића *S. aureus* се доводи у везу са супуративним дерматитисом, апсцесима, пододерматитисом и маститисом. Код живине изазива септични артритис, субдермалне апсцесе, гангренозни дерматитис и септикемију.

*S. pseudintermedius* углавном изазива обољења код паса и мачака, а ређе код говеда и коња. Ово је узрочник бројних инфекције паса, укључујући локалне инфекције као што су пиодермија паса и *otitis externa*, као и системске инфекције уринарног, респираторног и репродуктивног тракта.

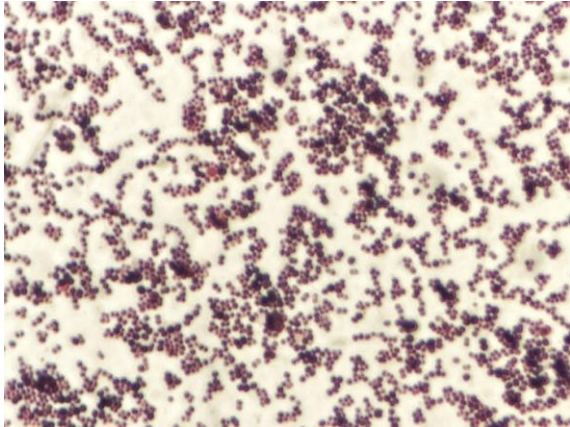
*S. hyicus* изазива ексудативни епидермитис, у народу познат као чађавост, код прасади. Такође, је одговоран за настанак кожных инфекција код говеда, коња и коза.

## 7.4. УЗОРЦИ

За лабораторијску дијагностику стафилококних инфекција узорци који се шаљу се брисеви коже, слузница и рана, ткиво захваћено променама, ексудати, млеко, урин, крв и садржај апсцеса.

## 7.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

Микроскопски препарат може се направити директно из узорака, или из изоловане културе.



Слика 7.1. Размаз културе стафилокока обојен по Грам-у

Директни микроскопски преглед може бити од помоћи приликом испитивања иначе стерилних узорака, попут цереброспиналне течности и аспирата зглобова, док се на овај начин може само поставити сумња на присуство стафилокока у лезијама. У микроскопском препарату бојеном по Грам-у запажају се Грам позитивне, непокретне, неспорулишуће коке, пречника од 0,5 до 1,5  $\mu\text{m}$ , које су распоређене најчешће у пару или тетрадама, у карактеристичним гроздастим скупинама, или чак у виду кратких ланаца састављених од 3 до 4 бактеријске ћелије (Слика 8.1.).

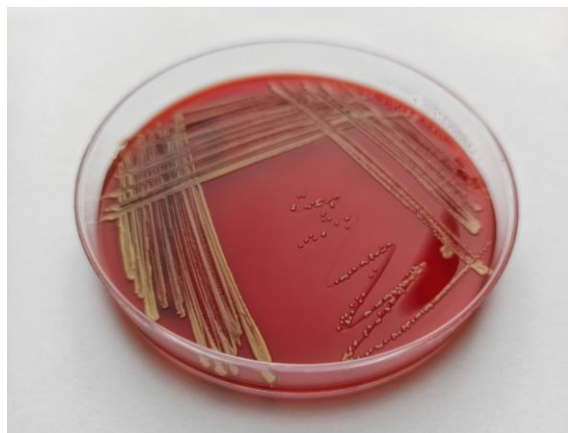
## 7.6. ИЗОЛАЦИЈА

Стафилококе добро расту на уобичајеним хранљивим подлогама, а у рутинској дијагностици најчешће се користи крвни агар. За изолацију стафилокока из узорака контаминираних другим бактеријским врстама користе се Манитол слани агар и Baird-Parker-ов агар (најчешће за изолацију из сточне хране). Засејане подлоге инкубирају се у аеробним условима на температури од 37° С током 24 часа.

## 7.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Колоније стафилокока након 24-очасовне инкубације су величине око 4 mm, округле, глатке, сјајне и непрозирне.

Врста *S. aureus* ствара колоније златно-жуте или беле боје, док врсте *S. pseudintermedius* и *S. hyicus* стварају колоније беле боје. На крвном агару зону двоструке хемолизе (уска зона  $\beta$  хемолизе око колоније и зона  $\alpha$  хемолизе на периферији) стварају већина сојева *S. aureus* и *S. pseudintermedius*, док је *S. hyicus* нехемолитичан (Слика 7.2.).



Слика 7.2. Култура нехемолитичног соја *Staphylococcus aureus* на крвном агару

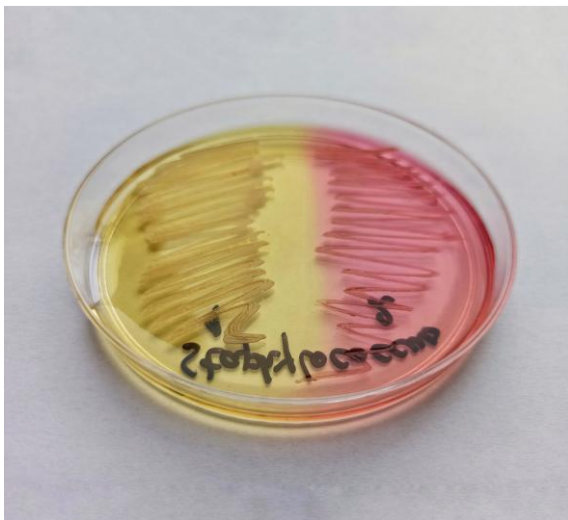
На селективној подлози Манитол сланом агару, услед разградње манитола, *S. aureus* и већина сојева *S. pseudintermedius* мењају боју подлоге око колонија у жуту, док остале врсте не разграђују овај шећер и не мењају боју подлоге (Слика 8.3.).



Слика 8.3. Култура *Staphylococcus aureus* на MSA агару



Боја самих колонија *S. aureus* на овој подлози је жута, док су колоније осталих стафилокока безбојне или ружичасте (Слика 8.4.).



Слика 7.4. Културе манитол позитивног (лево) и манитол негативног соја стафилокока на MSA агару

## 7.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Идентификација стафилокока осим прегледа микроскопског препарата и културелних особина подразумева и извођење биохемијских тестова попут ферментације угљених хидрата и утврђивања стварања коагулазе (Табела 8.1.). Осим наведених тестова изводе се и фаготипизација, серолошки методи попут латекс аглутинације, молекуларни методи и спектроскопски методи (MALDI-TOF MS).

### 7.8.1. КОАГУЛАЗА

Једна од најзначајнијих фенотипских карактеристика која се користи у класификацији стафилокока је производња коагулазе. Коагулаза је ензим који активира протромбин, чиме се подстиче коагулација плазме преласком фибриногена у фибрин. У односу на способност стварања овог ензима разликујемо коагулаза позитивне и коагулаза негативне стафилококе. Коагулаза позитивне стафилококе су: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*,

*Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus lutrae*, док *S. hyicus* и *Staphylococcus agnetis* имају варијабилну коагулазну активност. Стафилококе стварају везану и слободну коагулазу, односно коагулазу везану за бактеријску ћелију и коагулазу коју излучују из ћелије.

Присуство везане коагулазе доказује се Cadness-Graves-овим тестом. Тест се изводи на предметном стаклу тако да се кап зечје плазме дода у суспензију колонија стафилокока у капи дестиловане воде. Суспензија и плазма се помешају лаганим кружним покретима предметнице, а након 2 минута позитивна рекација би требало да се очита стварањем хрпица бактерија, које настаје као последица накупљања фибрина око њих. Присуство слободне коагулазе, али и везане, доказује се додавањем две капи бактеријске културе или густе суспензије у 0,5 ml зечје плазме, а тест је позитиван ако након 2 до 4 часа инкубације на 37° C плазма коагулише (Слика 8.5.).



Слика 7.5. Тест утврђивања присуства слобоне коагулазе; лево позитиван резултат; десно негативан резултат

За сојеве који слабијстварају коагулазу неопходна је инкубација од 24 часа,



тако су сви сојеви *S. hyicus* након 4 сата инкубације коагулаза негативни, док је 25 до 35% сојева након 24-орочасовне инкубације коагулаза позитивно.

**Табела 8.1.** Фенотипске карактеристике најзначајнијих *Staphylococcus* врста

Врста	Боја колоније	Величина колоније	Хемолиза	Коагулаза	Ферм. манитола	Ферм. малтозе
<i>S. aureus</i>	жута или бела	2-3 mm	$\alpha$ и $\beta$	+	+	+
<i>S. pseudintermedius</i>	бела	1-2 mm	$\alpha$ и $\beta$	+	v	+
<i>S. hyicus</i>	бела	1-3 mm	$\gamma$	v	-	-

v - варијабилно

## 8.

Genus *Streptococcus*

Класа: *Bacilli*

Ред: *Lactobacillales*

Фамилија: *Streptococcaceae*

Род: *Streptococcus* Rosenbach 1884

Врсте од значаја у ветеринарској медицини:

*Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus equi* subsp. *equi*

*S. equi* subsp. *zooepidemicus*

*Streptococcus suis*

*Streptococcus canis*

*Streptococcus uberis*

**К**оке које се су Грам позитивне и формирају низове бактеријских ћелија у виду ланаца, непокретене, неспорулишуће, факултативни анаероби, расту на крвљу обогаћеним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° С, формирају ситне безбојне колоније, средње величине, не стварају каталазу, не стварају цитохром-оксидазу, коменсали су слузокоже сисара и птица, изазивају гнојне инфекције.

### 8.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Стрептококе су бактерије лоптасог облика, и боје се љубичасто, односно Грам позитивно, када се примењује техника бојења по Грам-у. Ове коке су величине око 1 μm у пречнику. Непокретне су и не стварају споре. Како се ћелијска деоба *Streptococcus* врста догађа дуж једне равни, ове бактерије се јављају као појединачне коке, у паровима или у виду карактеристичних ланаца по којима је род добио име (гр. στρεπτος – ланац, уврнут; κόκκος – зрнце, бобица).

Стафилококе су осетљиве на неповољне услове спољашње средине, али као и остали лактобацили толеришу ниже вредности рН. Пошто су избирљиве, за раст захтевају додавање крви или серума у хранљиву подлогу. Стварају ситне, прозачне колоније, а на крвном агару показују различит степен хемоллизе. Зона потпуне β хемоллизе запажа се око колонија већине патогених врста стрептокока. Према степену хемоллизе и одређивању доминантног површинског антигена (антигена специфичног за групу), стрептококе се деле у групе које се састоје од једне или више врста. У односу на степен

хемоллизе разликујемо хемолитичне и ( $\alpha$  и  $\beta$ ) нехемолитичне ( $\gamma$ ). На основу специфичног састава угљених хидрата ћелијског зида, описано је двадесет различитих серотипова (групе од А до V, без I и J) које се називају Lancefield групе. Овај начин класификације не може се применити на све врсте стрептокока попут  $\alpha$ -хемолитичних вириданс стрептокока и нехемолитичних стрептокока. Класификација најзначајнијих врста стрептокока у ветеринарској медицини дата је у Табели 8.1. Стафилококе које су  $\beta$ -хемолитичне и налазе се у групама од А до G су најчешћи изазивачи обољења животиња и људи.

Стрептококе су негативне на каталазу и цитохром оксидазу. Облигатно су ферментативне, па иако могу расти у присуству  $O_2$  не користе га, већ енергију стварају искључиво ферментацијом. Глукоза и други угљени хидрати метаболишу се ферментацијски с млечном киселином као главним крајњим метаболичким продуктом, уз етанол и ацетат, а без продукције гаса.

До данас је у роду *Streptococcus* описано преко 110 врста, од којих су у ветеринарској медицини најважнији *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equi subsp. equi*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus canis* и *Streptococcus uberis*.

## 8.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Већина стрептокока од значаја у ветеринарској медицини живе као коменсали на мукозама горњег респираторног и доњег урогениталног тракта. Неке патогене врсте насељавају специфичне нише, попут *S. equi subsp. equi* који се налази у ноздрвама и ваздушним кесама коња, или *Streptococcus uberis* који настањује сисни канал вимена крава. Стафилококе су осетљиве на исушивање и обично не преживљавају дуго ван домаћина, мада ако остану хидриране у нпр. слузавом секрету, у спољашњој средини могу опстати и 7 до 9 седмица.

## 8.3. ОБОЉЕЊА

Стрептококе изазивају гнојне (пиогене) инфекције коже, млечне жлезде, горњих и доњих респираторних путева и урогениталног тракта. Обично се јављају као опортунистичке инфекције, пратећи неку другу инфекцију или након пада имунитета домаћина и симптоми могу бити од благих до тешких код великог броја различитих животињских врста.

*Streptococcus agalactiae* је облигатни паразит млечне жлезде говеда и значајан узрочник хроничног заразног маститиса. Ова врста такође може узроковати повремене случајеве неонаталне септикемије, инфекције бубрега и материце код куја и мачака. Код људи изазива неонаталне и постнаталне инфекције.

*Streptococcus equi subsp. equi* је узрочник ждребећака, заразне болести горњих респираторних путева праћене апсцесима у локалним лимфним чворова.

*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* је коменсал великог броја врста. Чест је узрок упале плућа и инфекција зглобова код коња, а забележени су и случајеви хеморагичне пнеумоније код паса. Ова врста је зоонотски узрочник, а инфекције се јављају након блиског контакта с коњима или након конзумације контаминираних млечних производа.

*Streptococcus suis* се доводи у везу са септикемијом, те с менингитисом, полиартритисом и упалом плућа код свиња. Зоонотски је патоген, који може изазвати тешке инвазивне болести код људи који су били у контакту са свињама или производима од свињског меса.

*Streptococcus canis* је опортунистички патоген који се налази као део нормалне флоре орофарингеалне, аналне и гениталне слузнице паса и мачака. Код паса, спорадични некротизирајући фасциитис и синдром токсичног шока повезани су са *S. canis*, док је заразни лимфаденитис вероватно најчешћа клиничка манифестација код мачака. Може изазвати спорадичне инфекције код људи, попут фарингитиса, целулитиса и сепсе.

**Tabela 8.1.** Клинички важне врсте стрептокока

Врста	Тип хемолize	Lancefield група	Најзначајнији домаћин	Обољење
<i>S. agalactiae</i>	$\beta$ ( $\alpha$ и $\gamma$ )	B	Крава, коза, овца, камила, пас, човек	Контагиозни бовини маститис, септикемија
<i>S. equi equi</i>	$\beta$	C	Коњ	Ждребењак, гнојне инфекције, хеморагична пурпура
<i>S. equi zooepidemicus</i>	$\beta$	C	Коњ, човек	Гнојне инфекције, метритис
<i>S. suis</i>	$\beta$	D (R, S, T)	Свиња, човек	Септикемија, гнојне инфекције, менингоенцефалитис
<i>S. canis</i>	$\beta$	G	Пас (мачка)	Гнојне инфекције, септикемија
<i>S. uberis</i>	$\alpha$	-	крава	Маститис
<i>S. iniae</i>	$\beta$ ( $\alpha$ )	-	рибе	Септикемија, менингоенцефалитис

*Streptococcus uberis* је (уз *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) један од водећих узрочника супклиничке и клиничке форме маститиса код крава.

#### 8.4. УЗОРЦИ

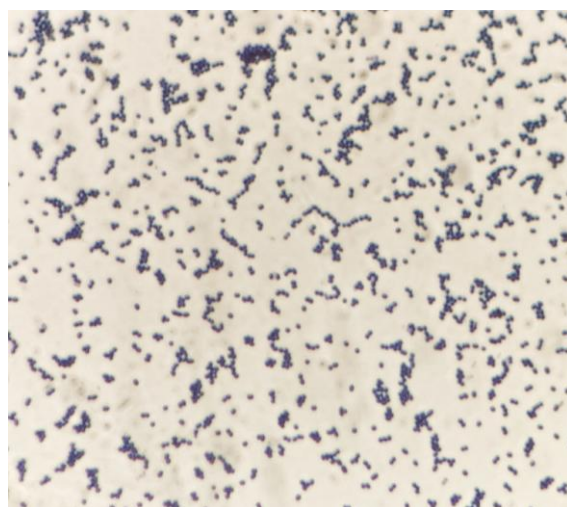
За лабораторијску дијагностику стрептококних инфекција узорци који се шаљу су садржај апсцеса, брисеви коже и слузница, ткиво захваћено променама, ексудати, млеко, урин, крв и цереброспинална течност. Због осетљивости стрептокока на исушивање брисеви се шаљу у транспортној подлози.

#### 8.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

На микроскопском препарату бојеном по Gram-у запажају се Gram позитивне, непокретне, неспорулишуће коке величине између 0,5 и 2  $\mu\text{m}$  (Слика 8.1.).

У ексудатима и старијим културама (>18 h), често се по Gram-у боје негативно, вероватно због дејства аутолизина који оштећују ћелијски зид. Стрептококе се могу запазити распоређене у пару и

распоређене у виду карактеристичних кратких ланаца (Слика 8.1.).



**Слика 8.1.** Размаз културе стрептокока бојен по Gram-у

Стрептококе узгајане у течним културама показују тенденцију стварања дужих ланаца. Овакви дужи ланци уобичајено се могу запазити и у гноју из цервикалних лимфних чворова коња инфицираних врстом *S. equi*. Врста *S. pneumoniae* доминантно се запажа у паровима. Неке врсте, попут *S. suis*, *S. equi ssp. equi* и *S. pneumoniae*, поседују капсулу.

## 8.6. ИЗОЛАЦИЈА

Стрептококе, за изолацију, захтевају коришћење подлога обогаћених крвљу или екстрактима ткива, а у рутинској дијагностици најчешће се користи крвни агар с додатком 5 до 10% овчје крви. Раст на хранљивом агару је слаб, док на Мас-Конкеу агару не расту. Засејане подлоге инкубирају се на температури од 37° С током 24 до 48 часова. Неке врсте попут *S. uberis* могу расти и на температури од 10° С. Већина патогених врста су факултативни анаероби, али је неколико анаеробно или микроаерофилно. Патогене врсте најбоље расту у присуству повишеног удела CO<sub>2</sub> (3 до 5 %), створеног свећом или у CO<sub>2</sub> инкубатору.

## 8.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Колоније већине стрептокока су ситне, величине око 1 mm, округле и непрозирне до полупрозрачне. Обично су глатке (S тип), сјајне и влажне, док се суве и храпаве колоније (R тип) ретко срећу. Од свих пиогених стрептокока *S. agalactiae* формира највеће колоније. Инкапсулирани облици, као што је *S. equi* ssp. *equi*, стварају веће мукоидне колоније (M тип).

У бујонима показују различите карактеристике раста (уједначено расту и замућују бујон или стварају седимент), али никад не стварају пеликулу.

Одређивање типа хемолизе коју производе колоније на крвном агару често је први корак у идентификацији стрептокока, а уједно и један од критеријума за њихову класификацију.

Наиме, у односу на тип хемолизе (Brown-ова класификација) делимо их на:

α-хемолитичке стрептококе, не лизирају еритроците него стварају зону зелене боје око колонија (хидроген пероксид оксидизује хемоглобин у метхемоглобин) (Слика 8.2.).



Слика 8.2. Култура α-хемолитичног стрептокока на крвном агару

Већина коменсалних стрептокока животиња су α-хемолитичне. Стрептококе које имају ову карактеристику називају се вириданс стрептококе, с изузетком *S. pneumoniae*.

β-хемолитичне стрептококе лизирају еритроците и стварају зону потпуне хемолизе, односно обезбојавање подлоге око колонија (Слика 8.3.).

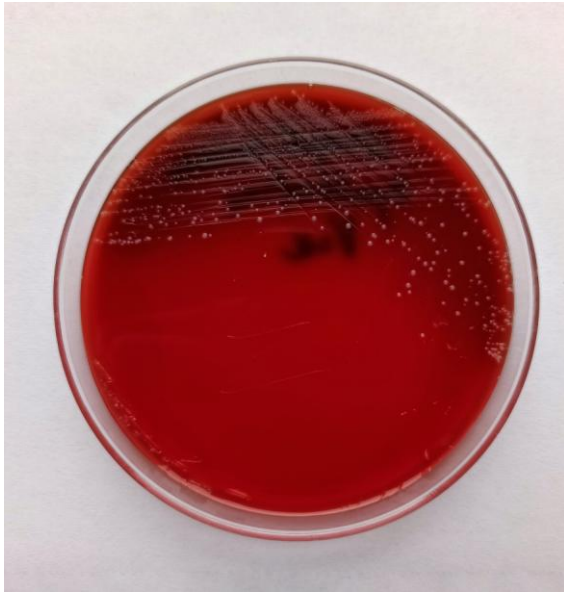


Слика 8.3. Култура β-хемолитичног стрептокока на крвном агару

Патогене стрептококе имају тенденцију да буду β-хемолитичне.

γ-хемолитичне стрептококе су нехемолитичне и не доводе до хемолизе еритроцита а тиме ни промене боје крвног агара око колонија (Слика 8.4.). Већина ових стрептокока је непатогена.





Слика 8.4. Култура  $\gamma$ -хемолитичног стрептокока на крвном агару

Колоније *S. agalactiae* могу бити равне, сивобеле или наранџасте боје (када се инкубира анаеробно), мукоидне и кремасте (Слика 8.5.).



Слика 8.5. Култура *Streptococcus agalactiae* на крвном агару

Када се инкубира аеробно, ова врста, може дати  $\alpha$ -прим хемолизу, коју представља малу зону интактних еритроцита непосредно уз бактеријску колонију, са зоном потпуне хемолизе која окружује зону интактних еритроцита.

## 8.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Идентификација стрептокока осим одређивања типа хемолизе на крвном агару и серогрупе према Lancefield-овој подгрупема и извођење биохемијских тестова попут CAMP теста (*S. agalactiae*), ферментације угљених хидрата (*S. equi equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. uberis*) одређивања осетљивости на бацитрацин (*S. pyogenes*) (Слика 8.6.) и хидролизе ескулина (*S. suis*, *S. uberis*).



Слика 8.6. Позитиван тест осетљивости на бацитрацин и пеницилин

Осим наведених тестова раде се серолошки и молекуларни методи, као и метод масене спектрометрије.

### 8.8.1. CAMP ТЕСТ

Реакцију CAMP фактора први су 1944. описали Christie, Atkins и Munch-Petersen, а односи се на синергистичку лизу еритроцита помоћу  $\beta$ -хемолизина који ствара *Staphylococcus aureus* и термостабилног хемолитичког екстрацелуларног протеина - CAMP фактора који ствара *Streptococcus agalactiae*. Присуство овог фактора може се доказати код велике већине изолата *S. agalactiae* (>98%), али се јављају и CAMP-негативни сојеви. Сој који се тестира и сој *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

инокулишу се на крвни агар под углом од 90°, у односу један на другог с размаком од 2 mm. Инокулисане подлоге се инкубирају током 24 часа на 37°C у аеробним условима. Позитивна реакција се огледа у присуству троугласте зоне појачане  $\beta$ -хемолизе у зони дифузије  $\beta$ -хемолизина који је створио *S. aureus* и CAMP фактора (Слика 8.7.). Осим *S. agalactiae* и *S. canis* већина других  $\beta$ -хемолтичних стрептокока даје негативну реакцију на овом тесту.



Слика 8.7. Позитиван CAMP тест



## 9.

Genus *Bacillus*

Класа: *Bacilli*

Ред: *Bacillales*

Фамилија: *Bacillaceae*

Род: *Bacillus* Cohn 1872

Врсте од значаја у ветеринарској медицини:

*Bacillus anthracis*

*Bacillus cereus*

*Bacillus licheniformis*

*Bacillus subtilis*

**В**елики Gram позитивни штапићи, већином покретни, спорулишући, аероби или факултативни анаероби, расту на небогаћеним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° C, формирају крупне колоније, поседују каталазу, не поседују цитохром-оксидазу, сапрофити широко распрострањени у земљишту и води.

### 9.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Врсте рода *Bacillus* су велике штапићасте бактерије дужине око 10 µm, које се по Gram-у боје позитивно, мада се могу бојити и Gram негативно. Управо због штапићастог изгледа бактеријске ћелије припадника рода род је и добио име (лат. *bacillus* – штапић). Сви припадници рода с изузетком *B. anthracis* и *B. mycoides*, поседују перитрихо распоређене флагеле, а тиме и покретне. Стварају изузетно отпорне ендоспоре округлог облика, цилиндричног или овалног облика. Ендоспоре су отпорне на топлоту, исушивање, ултраљубичасто и јонизујуће зрачење, дезинфицијенсе и низ других утицаја из спољашње средине. Оне могу остати вијабилне у земљишту и води деценијама, чекајући хранљиве материје или, у

случају патогених врста рода *Bacillus*, улазак спора у домаћина.

Сви припадници рода расту на основним хранљивим подлогама. Стварају крупне, суве колоније, неправилног облика и најчешће сиве или беле боје, а на крвном агару показују различит степен хемоллизе. Стварају каталазу и с изузетком *B. subtilis* који је варијабилан не стварају оксидазу. Аероби су или факултативни анаеробни, а оптимална температура култивације је 37° C. Међутим, род је фенотипски разнолик тако да су неке врсте аспорогене, факултативно анаеробне или стриктно аеробне, те термофилне или психрофилне.

До данас је у роду *Bacillus* описано преко 100 врста, од којих су у ветеринарској медицини значајне четири патогене врсте

*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*.

## 9.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Већина бројних врста рода *Bacillus* су сапрофити широко распрострањени у ваздуху, земљишту и води. Припадници овог рода формирају споре, које су дормантни (успавани, неактивни) бактеријски морфотип. Споре бацила могу преживети у разним стаништима јер су отпорне на топлоту, зрачење, дезинфекцију и исушивање и тиме могу остати вијабилне у тлу деценијама.

Споре врсте *Bacillus anthracis* географски су свеprisутне у земљишту на мањим или већим подручјима, која се називају антраксни дистрикти. Типична је инфекција тла и тиме овај бацил најчешће инфицира биљоједе. У природи, вегетативни (активни) облик *B. anthracis* постоји само у домаћину и не налази се у спољашњој средини.

## 9.3. ОБОЉЕЊА

Већина припадника рода *Bacillus* имају мали или никакав патогени потенцијал и ретко су повезани с болешћу, а изузев за ветеринарску медицину ветерину изузетно значајне врсте *B. anthracis*, још три патогене врсте су од спорадичног клиничког значаја и то *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*.

*Bacillus anthracis* сматра се главном патогеном врстом у роду *Bacillus*, који код великог броја врста сисара, укључујући и човека изазива антракс, обољење у народу познато као бедреница, црни пришт или простијел. Птице, изузев нојева, природно су отпорне на инфекцију овом бактеријом. Код биљоједа, често се карактерише септикемијом при којој се хипотензија, шок и изненадно угинуће углавном приписују дејству леталног токсина који *B. anthracis* ствара.

*Bacillus cereus* редак је узрочник тровања храном код паса и мачака, као и маститиса код крава.

*Bacillus licheniformis* спорадични је узрок абортуса и маститиса код крава и оваца.

*Bacillus subtilis* спорадични је узрочник маститиса код крава и абортуса код оваца.

## 9.4. УЗОРЦИ

Током прикупљања узорка за лабораторијску дијагностику и обраде узорка у лабораторији морају се предузети биосигурносне мере како би се спречило инфицирање и контаминација окружења. Код септикемијског облика обољења треба узети крв из репне или ушне вене. У случају појаве едема узима се ексудат. Код свиња, које су делимично отпорне на антракс и код којих се ретко развија бактеријемја, узима се аспират субмандибуларних или ретрофарингеалних лимфних чворова.

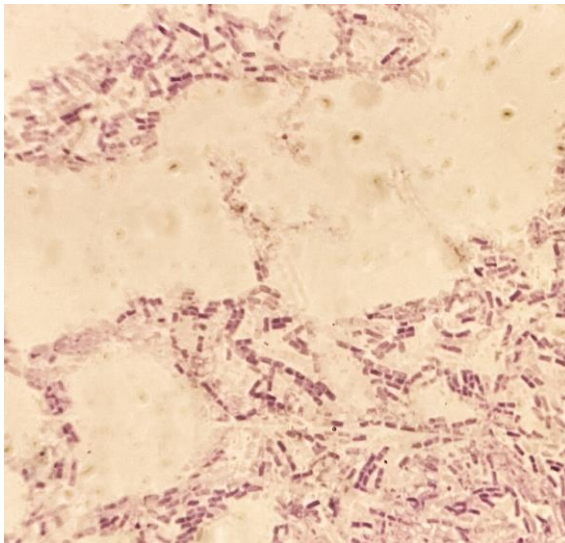
**При сумњи на антракс, леш угинуле животиње се не сме отварати!** Разлог томе је могућност контаминације окружења спорама антракса и последичне инфекције. Узима се ушна шкољка с припадајућом мускулатуром, одсечена термокаутером. У случају да је леш отворен, као материјал може бити узета слезина или, код свиња, ретрофарингеални лимфни чворови. Када су лешеве стари препоручује се узимање бриса носних отвора и очних дупљи заједно с узорцима контаминираних земље испод носа и аналног отвора животиње. У случају врло старих, трулих лешева могу се узети дуге цевасте кости.

Осим узорака који потичу од обољелих животиња, на лабораторијску дијагностику шаљу се и узорци хране, воде, земљишта, брисеви површина.

## 9.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

Иако су *Bacillus* врсте Gram позитивне, бактеријске ћелије из младих култура могу бити Gram варијабилне или чак Gram негативне због својих спора. Велике су

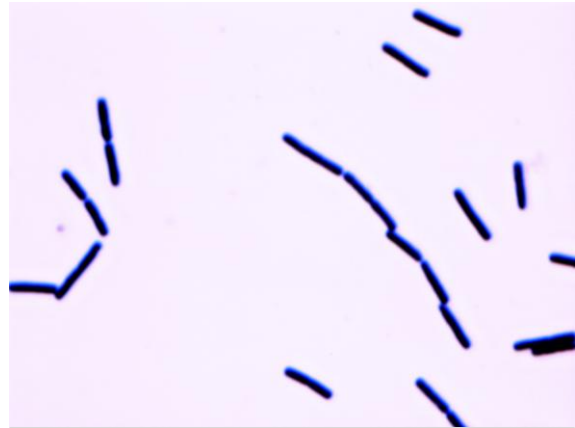
штапићасте бактерије, неке су дуже и од 10  $\mu\text{m}$  (Слика 9.1.).



Слика 9.1. Размаз културе бацилуса обојен по Gram-у

*Bacillus anthracis* спада међу највеће патогене бактерије, то је прави штапић дужине 5 до 10  $\mu\text{m}$  и ширине 1 до 3  $\mu\text{m}$ , са заобљеним или четвртасим крајевима. У препарату се може запазити појединачно, у пару или у виду кратких и дугачких ланаца (Слика 8.2.).

У размазима крви или органа запажа се појединачно и у пару и кратким ланцима, док се у препаратима из културе запажа у виду дугих ланаца који подсећају на бамбусов штап. За разлику од осталих припадника рода не поседује флагеле и поседује капсулу која се визуализује применом бојења по Giemsa-и, Foth-у или McFadyean-у. Једини изузетак акапсуларни сојеви, попут Sterne-овог вакциналног соја (34F2), који не поседују капсулу. Капсула *B. anthracis* запажа се углавном само на размазима крви органа, јер капсулу ствара у условима *in vivo* (у домаћину), а у условима *in vitro* само на подлогама с додатком бикарбоната и крвног серума при повишеном уделу  $\text{CO}_2$  у атмосфери (5 до 20%) и дефибринисаној (пожељно коњској) крви. Формира спору која је положена централно или суптерминално, величине од 0,8 до 1,5  $\mu\text{m}$ . На препарату бојеном по Gram-у запажа се



Слика 9.2. Размаз културе *Bacillus anthracis* обојен по Gram-у

као необојено подручје унутар бактеријске ћелије. Спора се запажа на препаратима направљеним од узорака из спољашње средине, размазима органа (само у случају да је узорак узет најмање неколико сати од угинућа, тј. у случају повећања нивоа слободног  $\text{O}_2$  у одређеним ткивима) и у препаратима из култура с краја log фазе раста.

Због изузетне отпорности споре *B. anthracis*, па и на топлоту током фиксирања препарата, искоришћени препарати се морају аутоклавирати.

## 9.6. ИЗОЛАЦИЈА

Врсте рода *Bacillus* нису пробирљиве и расту на уобичајеним хранљивим подлогама (хранљиви агар, крвни агар).

У рутинској дијагностици, *B. anthracis* се култивише на крвном агару при температури од 37  $^{\circ}\text{C}$ , током 24 (до 48 часова, опционо) у аеробним условима. За изолацију из клиничких материјала или узорака из спољашње средине, који су јако контаминирани другим бактеријама, потребно је корисити селективне подлоге, најбољи селективни ефекат има PLET агар (полимиксин, лизозим, EDTA, талијумацетат), а изолација на овој подлози захтева инкубацију од најмање 36 часова. Контаминирани узорци, у случају да се не користе селективне подлоге, треба претходно обрадити у циљу смањења броја сапрофитних бактерија које би иначе прерасле колоније *B. anthracis*



на хранљивој подлози. Ово се може постићи третирањем узорака топлотом у воденом купатилу на 62–65 °С током 15–20 минута, што ће убити присутне неспорулишуће бактерије, а уједно и потаћи герминацију спора *B. anthracis* током култивације.

## 9.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

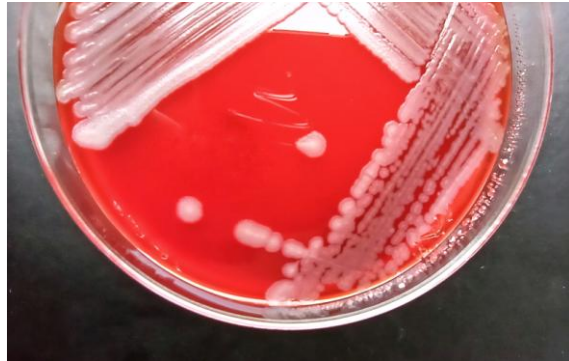
На хранљивом агару, након преконоћне инкубације, колоније су велике, храпаве (R тип) промера 3–4 mm, неправилног облика, уздигнуте, мутне, непрозирне и сивкасто-беле с изгледом „мат стакла” (брушено стакло) (Слика 8.3.).



Слика 9.3. Култура *Bacillus anthracis* на хранљивом агару

Након продужене инкубације (48 h) колоније могу имати ресасте ивице или имати увијене избочине (репове). Ово је такозвани изглед ‘Медузине главе’ (лат. *caput Medusae*). Колоније показују типичну чврстину а, додирнута езом, колонија се одлубљује с површине агара. R форме колонија карактеристика су вирулентних сојева. Авирулентни сојеви формирају платке (S тип), сјајне колоније. Након преконоћне инкубације на 37 °С на крвном агару, свеже изоловане колоније *B. anthracis* имају јединствену мор-

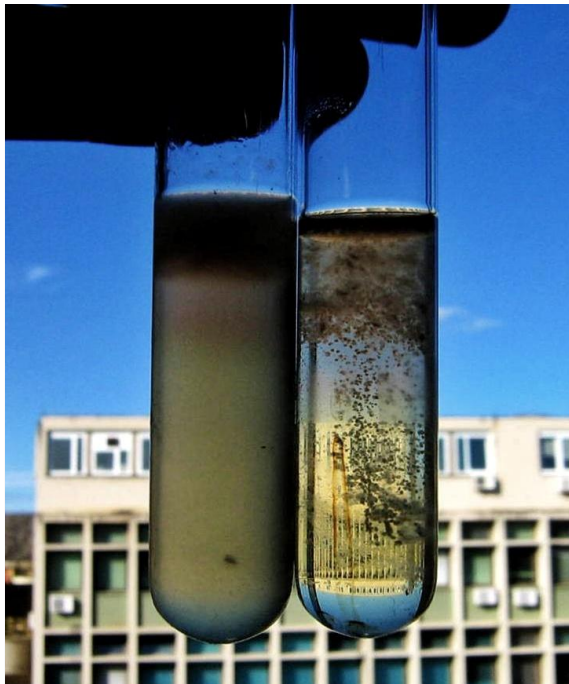
фологију у односу на остале припаднике рода, што умногоме олакшава идентификацију. Израсле колоније су беле или сиво-беле боје, нехемолитичне, величине 3-5 mm, неправилног облика с благо влажним, мат изгледом (Слика 8.4.).



Слика 9.4. Култура *Bacillus anthracis* на крвном агару

Понекад се виде ресасти изданци или репови као на хранљивом агару.

На PLET агару, након инкубације на 37 °С и током 36-48 часова, колоније *B. anthracis* величине су 2-3 mm, грубо округле, беле боје с текстуром попут брушеног стакла. Колоније су обично мање величине на овој подлози у поређењу



Слика 9.5. Културе *Bacillus cereus* (лево) *Bacillus anthracis* (десно) у течној подлози

с онима на хранљивом или крвном агару и немају чврстину, а на запајају се ни изданци на ивицама.

На бикарбонатном агару, због продукције капсуле, колоније су мукоидне (М тип) и глатке (S тип).

У бујонима раст *B. anthracis* је често веома флокуларан и не замућује подлогу (Слика 9.5.), нарочито у културама које су статичне, због склоности да ствара дуге ланце у условима *in vitro*.

У дубоким агарима расте у виду обрнуте јелке (Слика 9.6.).



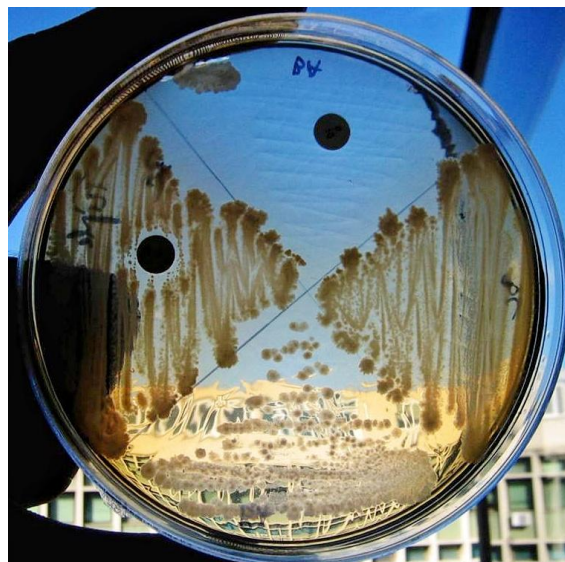
Слика 9.6. Култура *Bacillus anthracis* (десно) у дубоком агару

## 9.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Иако су врсте рода *Bacillus* релативно блиско повезане, врсту *B. anthracis* је могуће разликовати на основу морфологије колонија, доказивања присуства капсуле у микроскопском препарату и осетљивости на пеницилин (Табела 9.1.). Осим наведеног раде се и други тестови као што су биохемијско испитивање, оглед ниске бисера (оглед перли), Ascoli преципитација

Врста	Хемолиза	Капсула	Покретљивост	Осетљивост на пеницилин
<i>B. anthracis</i>	-	+	-	+
<i>B. cereus</i>	+	-	+	-
<i>B. licheniformis</i>	v	-	+	-
<i>B. subtilis</i>	+	-	+	v

Табела 9.1. Фенотипске карактеристике врста рода *Bacillus*



Слика 9.7. Инхибиција раста *Bacillus anthracis* у присуству 10 I.U. пеницилина (горњи квадрант)

ција и тест лизе гама бактериофагом, тест директне иминофлуоресценције, биолошки оглед на мишевима и молекуларни методи.

### 8.8.1. ПЕНИЦИЛИНСКИ ТЕСТ

Клинички изолати *B. anthracis* увек су осетљиви на пеницилин. Пеницилински тест изводи се по принципу диск дифузионог метода одређивања антимикуробне осетљивости, при чему се користи антибиотски диск с 10 I.U. пеницилина. Након инкубације на 37° С током 24 часа око диска пеницилина запажа се је широка зона инхибиције раста *B. anthracis* (Слика 9.7.).

### 8.8.1. ТЕСТ НИСКЕ БИСЕРА

Оглед 'ниске бисера' описали су Jensen и Kleemeuer 1953. године и заснива се на феномену да *B. anthracis* приликом раста на чврстој подлози која садржи од 0,05 до 0,5 I.U. пеницилина по ml (сублеталне дозе) након 3 до 6 часова од инокулације

на 37° С, услед оштећења ћелијског зида појављују у ланцима који личе низ би-  
ствара велике, сферичне ћелије које се се-  
сера.



## 10.

Genus *Mycobacterium*

Класа: *Actinomycetes*

Ред: *Mycobacteriales*

Фамилија: *Mycobacteriaceae*

Род: *Mycobacterium* Lehmann et Neumann 1896

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*

*M. tuberculosis* var. *tuberculosis*

*Mycobacterium avium* ssp. *avium*

*M. avium* ssp. *paratuberculosis*

**А**цидорезистентни штапићи, непокретни, неспорулишући, аероби, за изолацију се користе селективне подлоге обогаћене јајима, оптимална температура раста је 37° С, патогене врсте изузетно споро расту, морфологија колонија условљена је врстом и могу бити храпаве до глатке, боја колонија креће се у спектру од белих до наранжастих или розих, стварају термолабилну и термостабилну каталазу, не стварају цитохром-оксидазу, извор патогених врста већином су инфициране животиње док су атипичне врсте сапрофити широко распрострањени у земљишту и води, веома отпорне у спољашњој средини

### 10.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Микобактерије се обично јављају како танки штапићи различите дужине (0,2–0,6 × 1–10 μm). Понекад се јављају разгранати филаментозни облици, али се они лако фрагментирају у штапиће. Иако су цитохемијски Gram позитивне, микобактерије не примају боје по Gram-у јер им је ћелијски зид богат липидима, посебно миколичном киселином. Они су карактеристично отпорни на киселину и када ћелије једном усвоје боју, не обезбојавају се лако, чак ни киселим алкохолом. Имају тенденцију да се неправилно боје и често имају изглед перли. Микобактерије су блиско повезане с *Nocardia* и

*Rhodococcus* врстама и сва три рода имају сличан тип ћелијског зида. Не стварају споре и не поседују флагеле – непокретне су. Једна од карактеристика микобактерија је и реалтивно спор раст, с генерацијским временом у распону од 2 до 20 часова. Оптимална температура раста највећег броја врста је 37° С. Микобактерије се култивишу у аеробним условима, а додатак 2 до 10% CO<sub>2</sub> поспешује раст током примарне изолације. На чврстим хранљивим подлогама формирају колоније различите морфологије, али обично су суве и мрвљиве. Управо због колонија које изгледом подсећају на гљивице род и је добио име (гр. *μύκης* – гљивица; *βακτήριον* – шта-

пић). Неке врсте производе каротеноидне пигменте. Микобактерије су веома отпорне на физичке утицаје и задржавају вијабилност у земљишту и деловима осушеног фецеса и више месеци. Атипичне микобактерије су распрострањене у земљишту, пашњацима, мочварама, као и води.

До данас је у роду *Mycobacterium* описано преко 190 врста, а род укључује патогене животиња и људи, као и сапрофитне врсте које се често називају „атипичним“ или „нетуберкулозним“ микобактеријама. Неки од њих повремено могу изазвати обољења код животиња. Најзначајније врсте у ветеринарској медицини су *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* var. *tuberculosis*, *Mycobacterium avium* ssp. *avium* и *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

## 10.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Од свих познатих врста рода *Mycobacterium*, већина су опортунитички патогени из спољашње средине, који живе као сапрофити у тлу и води. Природни резервоар *M. tuberculosis* var. *bovis* су преживари, али је познато и да перзистирају у спољашњој средини, што им олакшава трансмисију међу врстама и унутар врста. Доказана је и његова способност преживљавања у различитој сточној храни и органским материјама. *Mycobacterium tuberculosis* var. *tuberculosis* облигатни је патоген код људи и ређе се идентификује код других сисара. Доминантно се преноси с човека на човека, а нема значајнијих резервоара у спољашњој средини. Микобактерије које не изазивају туберкулозу попут *M. avium* се обично појављују у природи у води, системима за дистрибуцију пијаће воде, тлу и прашини, главни пут ширења им је путем аеросола. Дуготрајно преживљавање у земљишту карактеристика је *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, који се највероватније и размножава у при-

родним водама, тлу и на површини биљака.

## 10.3. ОБОЉЕЊА

Код многих врста, патогене микобактерије пролазе кроз продужени асимптоматски или латентни период, након чега се болест поновно активира код одређеног броја инфицираних домаћина. Иако су *Mycobacterium tuberculosis* var. *tuberculosis* и *Mycobacterium leprae* најзначајније патогене микобактерије примарно људи, *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium* и *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* и друге микобактерије (Табела 9.1.) су узрок важних обољења код људи и широког спектра животињских врста укључујући говеда, овце, козе, псе, мачке, јелене, опосуме, јазавце, слонове, птице, водоземце и рибе. Штавише, микобактерије као што је *M. tuberculosis* var. *bovis* представљају озбиљне зооноске патогене и постале су важни узрочници у интеракцији између људи, домаћих и дивљих животиња.

Туберкулоза је хронично грануломатозно обољење животиња и људи изазвано микобактеријама из *M. tuberculosis* комплекса и *M. avium* комплекса.

Група блиско повезаних микобактерија које изазивају туберкулозу, код људи и сисара означене су као *Mycobacterium tuberculosis* комплекс. *Mycobacterium avium* комплекс обухвата оне микобактерије које изазивају авијарну туберкулозу. У медицинском смислу, комплекс је група микроорганизама који производе сличну болест, али термин нема таксономске импликације. Најновија таксономска номенклатура ове микобактерије сматра варијететима (лат. *varietas*). Нетуберкулозне микобактерије (НТМ) су микобактерије које не припадају *M. tuberculosis* комплексу и не изазивају лепру. У овој групи микобактерија налази се *M. avium* комплекс. Бактерије из овог комплекса изазивају обољења код птица.

*Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* изазива туберкулозу код великог броја топлокрвних животиња, говеда, паса, макача, свиња, папагаја, јазаваца, јелена, камила, неких птица грабљивица, а такође и примата укључујући људе.

*Mycobacterium tuberculosis* var. *tuberculosis* изазива туберкулозу код људи, примата, паса, говеда, пситацина и канарица.

*Mycobacterium avium* subsp. *avium* изазива туберкулозу код живине, канарица, ређе код говеда, коза, оваца и свиња.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* изазива Johnе-ову болест односно паратуберкулозу, прогресивно хронично обољење које се карактерише обилном дијарејом која доводи до мршављења и угинућа.

#### 10.4. УЗОРЦИ

Због ниске инфективне дозе *M. tuberculosis* var. *tuberculosis* за људе и зооноског потенцијала *M. tuberculosis* var. *bovis*, узорци из сумњивих или познатих случајева туберкулозе морају се сматрати потенцијално заразним и њима треба руковати уз примену одговарајућих биосигурносних мера.

Док се спутум и серум чешће прикупљају од људи, код животиња, посебно преживара, узорци укључују аспириране телесних шупљина или биоптате активних лезија, трахеобронхијални испирак, лимфне чворове, урин или фецес. При сумњи на туберкулозни маститис узоркује се млеко у количини од 50 ml. У случају угинућа животиње, узимају се свежи узорци промењеног ткива и ткива фиксираног у 10%-тном формалину за хистопатолошки преглед. Плућа и лимфни чворови повезани са респираторним трактом, уз ждрело и лимфне чворове цревног тракта, уобичајена су места на којима се локализују лезије, па се

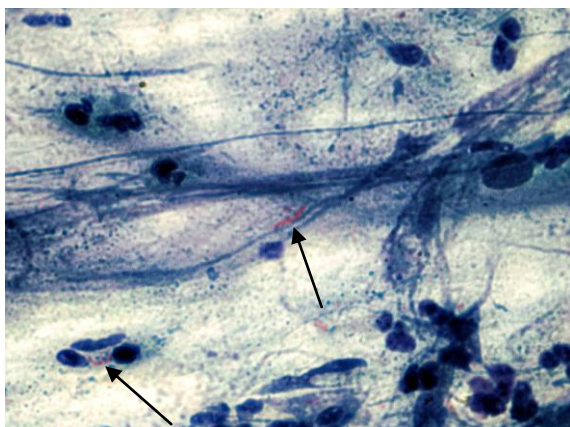
селективно узоркују на обдукцији и када нема лезија видљивих „голим оком“. За мрзавање узорака током транспорта или држање ткива у натријум борату чува вијабилност микобактерија и смањује раст бактерија конатминената.

С лезија коже кућних љубимаца најбоље је узети вишеструке или подељене узорке биопсије, фиксирани у формалину за патохистологију, охлађене или у натријум борату за култивацију и замрзнуте за молекуларну дијагностику.

Од живих животиња са сумњом на Johnе-ову болест, узима се инцизионни биоптат ректума или састругана мукоза ректума. Ови узорци су пожељнији од узорака фецеса, јер се *M. avium* subsp. *paratuberculosis* фецесом изулучује интермитентно (спорадично). Ако је доступан, биоптат мезентеричног лимфног чвора може бити користан узорак. Узорци од угинулих животиња укључују део илеоцекалне валвуле испране од фецеса, мезентеријалне лимфне чворове (често најбољи узорак од оваца и коза) и делове илеоцекалне валвуле у 10%-тном формалину за хистопатологију.

#### 10.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

Уобичајено бојење по Gram-у није погодно за микобактерије. Ове бактерије могу бити невидљиве на препарату бојеном по Gram-у, могу се појавити као чисте зоне или као гранулисани Gram позитивни штапићи, посебно у случају брзорастућих врста. Метод избора за бојење микобактерија је по Ziehl-Neelsen-у. Бојени овим методом микобактерије се запажају као црвени, типично танки штапићи дужине од 1 до 10  $\mu\text{m}$  и ширине од 0,2 до 0,6  $\mu\text{m}$ , који могу изгледати закривљено или савијено (Слика 10.1.).



Слика 10.1. Ацидорезистентни штапићи *Mycobacterium tuberculosis* (црвено) у размазу спутума

Појединачни бацили могу показати јако обојена подручја и подручја наизменичних мрља, стварајући гранулиран изглед. Одређене микобактерије, укључујући *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, могу одбацити свој ћелијски зид, стварајући сферопласте који се не откривају бојењем према Ziehl-Neelsen-у.

Култивисан у течној подлози, *M. tuberculosis* често испољава раст у виду ужади или влакана (енг. *serpentine cording*), али овакве формације се запажају и код неких НТМ врста. Надаље, НТМ могу изгледати плеоморфно, тј. као дуги филamenti или кокоидни облици, уједначено обојени.

Врсте рода *Mycobacterium* немају ни флагеле ни спору.

## 10.6. ИЗОЛАЦИЈА

Већина узорка узетих за култивацију микобактерија састоји се од сложеног органског матрикса контаминаног различитим организмима. Будући да микобактерије споро расту увек постоји могућност да их друге врсте из узорка прерасту на подлогама. Услед тога, изолацији микобактерија из клиничких узорка претходи припрема узорка која има за циљ смањење броја или елиминацију бактерија контаминаната и у исто време ослобађање микобактерија заробљених у муцину и ћелијама. Деконтаминација

узорка врши се 5%-тном оксалном киселином или 2-4%-тним NaOH. Процес деконтаминације уједно убија и велики број микобактерија у узорку, па се оне затим концентришу да би се побољшала детекција у обојеним размазима и у култури. Концентрација микобактерија у узорку постиже се центрифугирањем, након чега се добијени седимент ресуспендује у 1 ml дестиловане воде, чиме се добија узорак адекватан за даљу бактериолошку дијагностику.

Већина врста рода *Mycobacterium* лако се прилагођава расту на релативно једноставним супстратима користећи амонијак или аминокиселине као изворе азота и глицерол као извор угљеника, у присуству минералних соли. Неколико врста, од малог клиничког значаја, попут *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium haemophilum* и *Mycobacterium genavense* су избирљиве и у подлогама захтевају додатак једињења попут микобактина и хемина, док до данас *M. leprae* није успешно узгојена у условима *in vitro*, јер не успева расти на вештачким хранљивим подлогама. Раст микобактерија може се подстаћи угљен диоксидом и масним киселинама, које се могу обезбедити додавањем жуманцета јајета. Глицерол је уобичајени састојак медијума за раст пошто га већина врста микобактерија ефикасно метаболише у пируват, а једини изузетак је *M. tuberculosis* var. *bovis*, који боље расте у подлогама који садрже пируват. За изолацију микобактерија користе се различите хранљиве подлоге, али најчешћа је управо селективна подлога с додатком јајета, Löwenstein-Jensen (LJ) подлога, која садржи високе концентрације малахит зеленог чиме је превазиђен проблем контаминације другим бактеријама. Поред јаја, подлога садржи и кромпиров скроб и глицерол. Осим ове подлоге, у ветеринарској медицини често се користи Стонебринк подлога.

На основу брзине раста, микобактерије се могу класификовати као:



брзо-растуће, колоније се развијају на чврстим подлогама за 7 дана или мање попут *M. smegmatis* и *M. fortuitum* и споро-растуће, колонијама је потребно више од 7 дана да се развијати на чврстим подлогама, попут *M. tuberculosis* и *M. avium*.

**Табела 10.1.** Температура и време инкубације најзначајнијих микобактерија

Врста	Температура	Дужина (дани)
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i>	37° C	28
<i>M. tuberculosis</i> var. <i>tuberculosis</i>	37° C	28
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	37° C	14-28
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	37° C	35-112
<i>M. ulcerans</i>	30° C	30-90
<i>M. smegmatis</i>	37° C	2-3

Већина патогених врста споро расте, јер имају време генерисања од 12 часова и више. Оптимална температура раста може да се креће од 28 до 45° C, при чему већина врста ствара видљиве колоније између 7 дана и 6 седмица. Дужина и температура инкубације најзначајнијих врста микобактерија у ветеринарској медицини дати су у Табели 10.1. Међутим, већина врста најбоље расте између 35 и 37° C, иако *M. chelonae* и *M. ulcerans* имају ниже оптималне температуре раста. Брзо-растуће врсте стварају видљиве колоније између 3 и 7 дана.

За оптималан раст и посебно примарну изолацију погодна је повећана концентрација CO<sub>2</sub>, а препоручује се 2–10% CO<sub>2</sub> током инкубације. Свеће се не препоручују јер не снижавају довољно концентрацију O<sub>2</sub> за добар раст микобактерија. Ако CO<sub>2</sub> инкубатори нису доступни, може се користити комерцијални анаеробни систем са кесицама које производе CO<sub>2</sub>.

До данас, није успела изолација и култивација врсте *Mycobacterium leprae* на хранљивим бактериолошким подлогама, већ се она узгаја *in vivo* у животињским моделима (армадиљо и голокожи мишеви који немају тимус).

## 10.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Микобактерије показују широк спектар варијабилности колонија, од глатких до храпавих и од непигментисаних до крем боје и светло жуте.

Још једна карактеристика корисна у класификацији микобактерија, осим већ наведене брзине раста у *in vitro* условима култивације, је присуство каротеноидних пигмената жуте или наранџасте боје од стране неких врста, због чега их делимо на хромогене и нехромогене. Варијетети *M. tuberculosis* не стварају пигменте, док их нетуберкулозне микобактерије стварају. Врсте код којих је стварање пигмената зависно од светлости називају се фотохромогене, док се врсте које пигмент стварају у мраку називају скотохромогене. Ernest Runyon, 1959. описао је класификацијску схему за НТМ према брзини раста и производњи пигмента. Runyon-ова схема укључује:

- Група I Фотохромогене које стварају пигмент при излагању свјетлу
- Група II Скотохромогене које производе пигмент у мраку
- Група III Нехромогене који не производе пигмент
- Група IV Брзо-растуће.

*M. tuberculosis* var. *bovis* има слаб раст на подлози која садржи глицерол (Löwenstein-Jensen) и овакав оскудан раст се назива дисгоничан. Колоније су глатке, безбојне и округле. Међутим, овај варијетет *M. tuberculosis* добро расте на подлогама које садрже пируват без глицерола.

Бујан раст карактерише *M. tuberculosis* на подлогама које садрже глицерол, дајући карактеристичне колоније „храпаве, чврсте и бујне“ (Слика 10.2.).



Слика 10.2. Раст *Mycobacterium tuberculosis ssp. tuberculosis* на LJ подлози

Овакав раст познат је као еугоничан. Колоније су суве, непигментусане, површина је нодуларна, а обод је танак тј. Односно сливен и својим изгледом подсећају на карфиол.

Раст *M. avium* на подлогама које садрже глицерол је такође описан као еугоничан. Колоније су беличасте, глатке, избочене, влажне и лако се одвајају од подлоге. Одређени изолати могу формирати и храпави тип колонија.

Прве колоније *M. avium ssp. paratuberculosis* се појављују око 7 седмица након инокулације (од 5, па чак и до 16 седмица). Колоније су веома мале, пречника око 1 mm, безбојне, провидне и полулопасте. Колоније постају непрозирније, сувље и повећавају се у величини како се инкубација наставља, до-

стижући максимални пречник од око 4 mm. Храпавост се повећава са старошћу колоније, некад могу бити и наборане. Ивице су округле и равне, а површине глатке и сјајне.

Раст микобактерија у течним подлогама одликује се стварањем пеликуле - скраме на површини и волуменозног талога на дну.

## 10.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Микобактерије се традиционално идентификују фенотипским методима заснованим на култури, а који подразумевају морфолошке карактеристике, брзину раста, жељену температуру култивације, пигментацију и серију биохемијских тестова.

Након утврђивања о којој се микобактерији ради, споро или брзо-растућој, као и утврђивања раста на LJ подлози с 5% NaCl или глицерола, раде се бројни биохемијски тестови који сужавају избор при идентификацији врсте. Неки од биохемијских тестова који се изводе су редукција нитрата, испитивање стварања нијацина, испитивање стварања пиразинамидазе, испитивање стварања каталазе (Табела 10.2.). Два најисплативија и најефикаснија биохемијска метода за идентификацију микобактерија су редукција нитрата и испитивање стварања нијацина. Редукција нитрата идентификује микобактерије на основу присуства нитрат редуктазе, док нијацин игра улогу у оксидационо-редукционим реакцијама метаболичке синтезе код

Табела 10.2. Фенотипске карактеристике најзначајнијих микобактерија

Врста	Брзина раста	Глицерол	5% NaCl	Ниацин	Пираз.	Каталаза	Редукција нитрата
<i>M. tuberculosis var. bovis</i>	S	-	-	+	+	-	+
<i>M. tuberculosis var. tuberculosis</i>	S	+	-	-	-	-	-
<i>M. avium ssp. avium</i>	S	+	+	-	-	-	-
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	S	+	-	-	-	-	-



свих микобактерија. Иако све врсте микобактерија производе нијацин, *M. tuberculosis* акумулира највећу количину у подлози на којој расте.

Традиционално дијагноза микобактериозе се постиже или потврђивањем присутности патогена поменутих фенотипским методима или испитивањем имунолошког одговора домаћина на узročника.

### **10.8.1. ТУБЕРКУЛИНСКИ ТЕСТ**

Туберкулинизација је тест који се примењује у националним шемама ерадикације и заснован је на реакцији преосетљивости касног типа која се јавља код животиња, инфицираних бацилима туберкулозе, након интрадермалне инокулације мале количине (обично 0,1 ml) туберкулина. Ова инокулација, код инфицираних јединки, доводи до отока који се јавља на месту апликације након 48–72 часа. Туберкулин је пречишћени протеински дериват (PPD) припремљен од *M. tuberculosis* var. *bovis* или *M. avium* ssp. *avium*.

## 11.

Ordo *Enterobacterales*

Класа: *Gammaproteobacteria*

Ред: *Enterobacterales* Adeolu et al. 2016

Фамилија: *Enterobacteriaceae* Rahn 1937

Род: *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Escherichia coli*

Род: *Salmonella* Lignieres 1900

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Salmonella enteritidis*

Род: *Klebsiella* Trevisan 1885

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Klebsiella pneumoniae*

Фамилија: *Yersiniaceae* Adeolu et al. 2016

Род: *Yersinia* van Loghem 1944

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Yersinia pestis*  
*Y pseudotuberculosis*  
*Yersinia enterocolitica*

Фамилија: *Morganellaceae* Adeolu et al. 2016

Род: *Proteus* Hauser 1885

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Proteus mirabilis*  
*Proteus vulgaris*

**Ш**тапићасте Gram негативне бактерије, већином покретне, неспорулишуће, факултативни анаероби, имају једноставне нутритивне потребе, оптимална температура раста је 37° С, стварају каталазу, не стварају цитохром оксидазу, настањују различита станишта укључујући интестинални тракт животиња и људи.

### 11.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РЕДА

Припадници реда *Enterobacterales* су Gram негативне штапићасте или кокобациларне бактерије чија се просечна дужина креће се од 1 до 6  $\mu\text{m}$ , а ширина од 0,3 до 1  $\mu\text{m}$  и које не стварају ендоспору. Уопштено говорећи то су покретне бактерије које имају перитрихо или

поларно постављене флагеле, с изузетком припадника родова *Klebsiella* и *Roultella*, неких врста попут *Shigella sonnei* и *Yersinia pestis*, или сероваријетета врсте какав је *Salmonella enterica* ssp. *enterica* var. *Gallinarum-Pullorum*.

Температурни опсег у ком расту *Enterobacterales* врсте креће се од 2° до

54° C, мада неки психротрофилни сојеви *Enterobacter* и *Hafnia* врста могу расти и при температури од 0° C. Типични су факултативни анаероби који брзо расту у аеробним или анаеробним условима. Њихова способност раста у присуству или одсуству кисеоника одражава и респираторни и ферментацијски тип метаболизма, мада је ферментација чешћи начин коришћења угљених хидрата. Иако већина врста ентеробактерија има једноставне нутритивне захтеве способни су да користе читав низ супстрата за раст. Неке врсте су способне да користите глукозу као једини извор угљеника. *Enterobacterales* врсте стварају каталазу, а изузетак је врста *Shigella dysenteriae* која је не ствара. Због недостатка цитохрома ц негативни су на оксидазу. Нитрате редукују у нитрите, а изузетак су врсте које припадају роду *Yersinia*.

Све *Enterobacterales* врсте су веома биохемијски активне и разграђују аминокиселине, као и велики број угљених хидрата и алкохола до киселина, а велика већина су и аерогене, односно стварају и гас као крајњи продукт разградње. Управо разнородност биохемијских карактеристика служи за разликовање и идентификацију родова и врста из овога реда. Способност разградње лактозе једна је од карактеристика која служи за диференцијацију родова (лактоза позитивни *Escherichia* и *Klebsiella*, лактоза негативни *Salmonella*, *Yersinia* и *Proteus*). Имају веома сложену антигенску грађу на основу које се врсте деле на серогрупе и серотипове.

Данас се, на основу генетски засноване филогеније, ред *Enterobacterales* састоји од 7 фамилија с валидно објављеним и тачним именима *Budviciaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae* и *Yersiniaceae*. Оваква подела тачније осликава сличности и разлике међу различитим родовима овога реда, којих тренутно има преко 60. Патогене врсте које су од значаја за ветеринарску медицину налазе се у родовима *Esche-*

*richia* и *Salmonella* (fam. *Enterobacteriaceae*) и роду *Yersinia* (fam. *Yersiniaceae*), док се значајне условно патогене врсте налазе у родовима *Klebsiella* (fam. *Enterobacteriaceae*) и *Proteus* (fam. *Morganellaceae*).

## 11.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Врсте реда *Enterobacterales* су убиквитарне односно широко су распрострањене у природи, а многе врсте настањују интестинални тракт људи и животиња, укључујући и инсекте, код којих могу узроковати цревна или системска обољења или остати као коменсални организми. Неке врсте јављају се и као биљни патогени. Међутим, нису сви родови или врсте унутар истог рода патогени, већ се само се мали број врста сматра стриктним патогенима. Неке врсте или сојеви заузимају ограничене еколошке нише попут *S. Typhi* која се налази само код људи, или се јављају на ограниченом географском подручју попут *S. Sendai* која се јавља само на Блиском истоку.

## 11.3. ОБОЉЕЊА

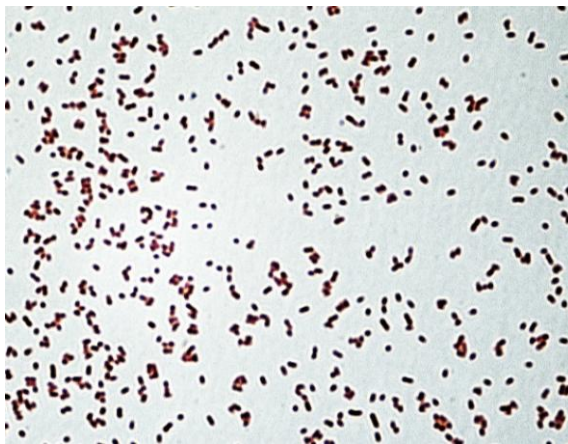
Ред *Enterobacterales* укључује бактерије са широким потенцијалом за изазивање обољења и укључује корисне коменсалне микробиоте, опортунистичке патогене који могу условити знатан морбидитет и морталитет код имунокомпромитованих јединки, као и примарно патогене врсте које могу изазвати обољења код јединки савршеног здравља. Овај варијабилни патогени потенцијал одраз је експресије или недостатка специфичних фактора вируленције који играју улогу у патогенези обољења. Ове врсте доводе се у везу с обољењима попут гастроентеритиса, инфекција урогениталног тракта, септикемије, пнеумоније, инфекције рана и др.

## 11.4. УЗОРЦИ

Узорци за микробиолошку дијагностику инфекција изазваних ентеробактеријама зависе од клиничке манифестације инфекције и најчешће подразумевају узорке фецеса, брисеве ректума и клоаке, узорке крви, урина, млека, вагиналне брисеве, брисеве рана и друго, а како су неки од припадника реда *Enterobacterales* и значајни узрочници обољења који се преносе храном и водом, узорци подразумевају и узорке сточне хране, јаја, воде за пиће и др.

## 11.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

Већина врста су кратки штапићи просечне дужине око 2-4  $\mu\text{m}$  и ширине око 0,6  $\mu\text{m}$  с паралелним странама и заобљеним крајевима, који у микроскопском препарату немају специфичан распоред (Слика 11.1.).



Слика 11.1. Размаз културе ентеробактерија обојен по Gram-у

Gram негативне су и боје се равномерно, с изузетком врсте *Yersinia pestis* која се може бојити „биполарно“. Припадници реда *Enterobacterales* не стварају спору, међутим постоје изузеци од ове опште ћелијске морфологије. Неки сојеви су готово кокобациларног облика, попут *Yersinia* врста, други су дуги и понекад филаментозни попут врсте *Proteus mirabilis*. Типичне *Enterobacterales* врсте

поседују флагеле и покретне су. Најзначајнији изузеци су родови *Klebsiella*, *Leminorella*, *Moellerella* и *Shigella*. *Yersinia pestis* је непокретна, за разлику од осталих врста у роду, које су покретне на нижим температурама, али непокретне тј. атрихе при температури од 37° C. Већина сојева *E. coli* је покретна, а у роду *Salmonella*, једини константно атрихи, односно непокретни серотипови су Gallinarum и Pullorum. У другим родовима повремено се појављују непокретни мутанти. Флагеле су увек перитрихијалне, с изузетком *Tatumella* врста, чије су флагеле обично постављене поларно, субполарно или чак латерално. Неке врсте стварају капсулу и формирају мукоидне колоније при примоиолацији, међутим способност стварања капсуле може се изгубити супкултивацијама. Количина капсуларног материјала енормно варира од соја до соја. Типично инкапсулисане врсте налазе се у роду *Klebsiella*, а срећу се и код неких сојева *E. coli*, *Enterobacter* врста и серовара *Salmonella*.

Важно је напоменути да се врсте реда *Enterobacterales* имају сличну морфологију и међусобно се не могу разликовати при прегледу микроскопских препарата. Немају специфичан распоред у препарату и запајају се појединачно и у пару.

## 11.6. ИЗОЛАЦИЈА

Типичне *Enterobacterales* врсте расту на једноставним подлогама које садрже само пептоне и месне екстракте. Иако се већина врста од клиничког значаја самим тиме лако култивишу на крвном и чоколадном агару, методи за њихову изолацију умногоме варирају од врсте узорка, односно од тога да ли узорак садржи интестиналне или друге микробиоте или је нормално стерилан. Не захтевају додаток NaCl за раст, али неки сојеви телеришу со у концентрацијама и изнад 6%. Расту и у аеробним и у анаеробним условима, али је раст бољи у

атмосфери с приближно 20% O<sub>2</sub>. Температурни опсег у ком се одвија раст прилично је широк, од највише око 54° C до око тачке смрзавања воде, али оптимална температура за већину врста од медицинског значаја је 35-37° C. *Yersinia enterocolitica* је један од значајних изузетака и може се брзо размножавати на 4° C што може бити важно због њене улоге у обољењима која се преносе храном, а препоручена температура за њену култивацију је 25° C. Све врсте, с изузетком *Klebsiella* сојева изолованих из респираторног тракта, расту у присуству жучних соли и добро расту на MacConkey агару. Осим MacConkey и крвног агара за изолацију ентеробактерија користе се селективно-диференцијалне подлоге попут XLD агара, Брилијант зеленог агара, Endo агара, SS агара.

## 11.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

На чврстим подлогама колоније *Enterobacterales* су релативно крупне, просечног пречника од 2-3 mm, али значајно варирају у величини. Могу бити округле, уздигнуте и ниско конвексне, с пуном ивицом и глатке површине, могу бити равне с храпавом површином, сливеном и неправилном ивицом, или могу попримити добро познати облик листа винове лозе који се обично описује као карактеристичан за *S. Typhi*. Чак и код свеже изолованих сојева варијације су честе, а различити облици колонија могу се запазити када се испитују стари лабораторијски сојеви. Неколико родова и врста има врло специфичну морфологију колонија која омогућава тренутно препознавање. Такви су мукоидне колоније *Klebsiella* врста и феномен ројења сојева *Proteus* врста. Диференцијална вредност мукоидног типа колонија само је мало умањена чињеницом да неки

други припадници реда, попут неких сојева врсте *E. coli* и серовара *Salmonella* могу стварати овакав тип колонија.

У бујонима их карактерише бујан и хомогено мутан раст. При продуженој инкубацији стварају талог који се диспергује при протресању епрувете. *Yersinia pestis* и *Y. pseudotuberculosis* су изузеци јер стварају благо замућење у средишту епрувете с бујоном, а на странама и дну епрувете стварају наслаге. „Аутоаглутинација у бујону” је користан метод откривања патогених сојева *Yersinia*. Неке врсте на површини бујона стварају пеликулу – скраму.

На крвном агару *Enterobacterales* врсте формирају уобичајено округле колоније пречника 2 до 3 mm, сивобеле боје, ниске и конвексне, с хемоллизом или без, глатке или мукоидне, а *Proteus* врсте испољавају феномен ројења.

Све ентеробактерије расту на MacConkey агару. Врсте које ферментишу лактозу на MacConkey агару формирају колоније ружичасте боје, док врсте које не ферментишу овај шећер имају безбојне колоније. Величина и облик колонија варирају у зависности од бактеријске врсте. *Proteus* врсте на овом агару не испољавају феномен ројења.

На XLD агару врсте које ферментишу лактозу и сахарозу формирају жуте колоније, а уједно мењају и боју подлоге око себе у жуту. Врсте које не ферментишу лактозу и сахарозу боје колоније у црвену боју, као и подлогу око њих. Стварање H<sub>2</sub>S испољава се црном бојом у центру колоније, а запажа се код већине сојева *Salmonella* и *Proteus* врсте.

Врсте које ферментишу лактозу и сахарозу на Брилијант зеленом агару мењају рН подлоге и боја њихових колонија је жуто-зеленкаста, док врсте које не ферментишу ове шећере, услед разградње пептона имају црвену боју колонија, а такве боје постаје и подлога око колонија.



Табела 11.1. Фенотипске карактеристике најзначајнијих *Enterobacteriales* врста

Врста	I	MR	VP	C	Kligler	H <sub>2</sub> S	Флагеле	Капсула
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	a/a	-	+	v
<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	-	+	-	+	b/a	+	+	v
<i>Yersinia pestis</i>	-	+	-	-	b/a	-	-	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+	-	-	b/a	-	+	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	v	v	v	-	a/a	-	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	a/a	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	+	a/a	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	v	a/a	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	v	v	a/a	+	+	

+, позитивна већина сојева; -, негативна већина сојева; v, варијабилно – зависно од соја; a (*acidum*), кисело; b (*basis*), базно

На Endo агару колоније ентеробактерија које ферментишу лактозу су ружичасте боје, док су колоније лактоза негативних бактерија безбојне. Колоније врсте *Escherichia coli* због кристализације фуксина добијају метално-зелени сјај. Клебсијеле на овој подлози формирају крупне мукоидне колоније.

Салмонеле на SS агару стварају безбојне и прозирне колоније с црним центром, који изостаје код сојева који не продукују H<sub>2</sub>S, а такве су и колоније шигела. Колиформне бактерије формирају колоније розе боје.

## 11.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Родови и врсте реда *Enterobacteriales* традиционално се диференцирају на основу фенотипских и биохемијских карактеристика. Биохемијске реакције за диференцијацију и идентификацију ентеробактерија подразумевају IMViC (индол, Metil Red, Voges-Proskauer, и коришћење цитрата) тест и карактеристике раста на TSI агару. Неке од фенотипских карактеристика и биохемијских реакција најзначајнијих врста ентеробактерија приказане су у табели (Табела 11.1.) Осим наведеног раде се и други тестови као што су серолошки и молекуларни методи PCR и PFGE, као и

масена спектрометрија (MALDI-TOF MS).

### 11.8.1. РЕАКЦИЈА ENTEROBACTERIALES ВРСТА НА TSI ПОДЛОЗИ

Троструки шећер по Kligler-у није селективна подлога јер не садржи инхибиторне супстанце, већ служи као диференцијална подлога за идентификацију ентеробактерија на основу њихових способности да ферментишу три шећера и то глукозу, лактозу и сахарозу, као и да стварају H<sub>2</sub>S. Продукција гаса као крајњег производа појединих бактерија огледа се у стварању мехурића гаса у подлози.

Реакције на овој подлози тумаче се на следећи начин:

Алкална - базна (црвена) косина и кисело (жуто) дно значе да бактеријска култура разграђује само глукозу.

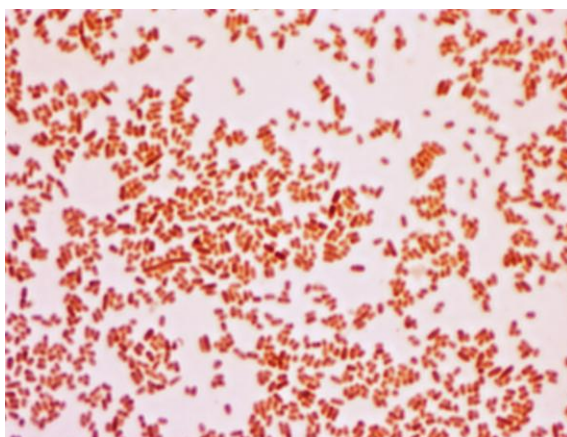
Кисела косина (жута) и кисело (жуто) дно значе да бактеријска култура разграђује лактозу и/или сахарозу, уз глукозу.

Црно пребојавање подлоге значи да бактеријска култура ствара H<sub>2</sub>S.



## 11.9. GENUS *YERSINIA*

*Yersinia* врсте, као и остали чланови реда *Enterobacterales* су Gram негативни штапићи до кокобацили који не стварају споре и биполарно се боје, нарочито у примарним културама обојеним по Giemsa-и (Слика 11.2). Јерсиније су мање од осталих чланова реда, ширина им се креће између 0,5 и 0,8  $\mu\text{m}$ , дужина између 1 и 3  $\mu\text{m}$ , а такође их карактерише и спорији раст.

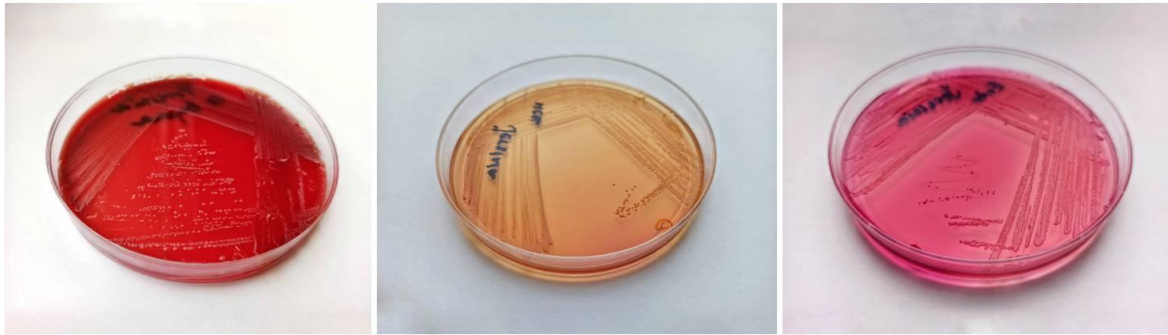


Слика 11.2. Размаз културе *Yersinia enterocolitica* обојен по Gram-у

Већина *Yersinia* врста покретна је на температурама нижим од 30° C захваљујући перитрихијалним или поларним флагелам. Патогене *Yersinia* врсте или супресирају (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*), или су кроз мутацију изгубиле, способност експресије (*Y. pestis*) флагела у домаћину – *in vivo*, чиме ефикасно избегавају стимулацију урођеног имуног одговора. Јерсиније су факултативни анаероби који расту на температурама у распону од 4 до 43° C, мада им је оптимална температура раста од 25° до 29° C. Ферментишу глукозу уз производњу киселине, али су анаерогене, позитивне су на каталазу и негативне на оксидазу и немају специфичне нутритивне захтеве. Већина сојева расте на MacConkey, крвном и чоколадном агару. Због споријег раста и потребног времена инкубације од 48 часова, при изолацији из клиничких узорака узетих с несте-

рилних места, нарочито из узорака из спољашње средине, могу их прерастати друге ентеробактерије. Како би се спречило прерастање, приликом изолације врста *Y. enterocolitica* и *Y. Pseudotuberculosis* може се применити поступак хладног обогаћења. Култивација јерсинија у бујонима се карактерише slabим растом, при чему не стварају хомолого замућење подлоге попут других ентеробактерија.

1884. године швајцарски бактериолог Alexandre Emile Jean Yersin идентификовао *Y. pestis* – узročника куге, а 1994. године њему у част род *Yersinia* је добио име. Тренутно, овај род чини 26 врста с валидно објављеним и тачним именима, од којих су 3 патогене бактерије од значаја у ветеринарској медицини и то *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*. Хабитати *Yersinia* врста се разликују, па тако *Y. pseudotuberculosis* перзистира у глодарима, птицама и спољашњој средини, *Y. enterocolitica* се налази у дигестивном тракту домаћих и дивљих животиња, док се *Y. pestis* доминантно преноси бувама с глодара који су резервоар ове врсте. Врсте рода *Yersinia* изазивају обољења која се називају јерсиниозе. *Y. pestis* је узročник куге, септикемијског обољења од изузетног значаја за људе и глодаре, а повремено и за домаће животиње које се примарно заражавају преко убодних рана бува глодара. Обољења која изазива код пријемчивих животиња (доминантно мачака) очитују се локалним лимфаденитисом, пнеумонијом или септикемијом. *Y. enterocolitica* најчешће изазива обољење домаћих животиња и примата и најчешћа је врста код људи. Надаље, доводи се у везу с мезентеричним лимфаденитисом, терминалним илеитисом, акутним гастроентеритисом, као и септикемијом. *Y. pseudotuberculosis* најчешће изазива обољења глодара и птица, а повремено домаћих животиња и примата. Доводи се у везу с мезентеричним лимфаденити-



Слика 11.3. Култура *Yersinia enterocolitica* на крвном, MacKonkey и Endo агару

сом, терминалним илеитисом, акутним гастроентеритисом, као и септикемијом.

### 11.9.1. МИКРОБИОЛОШКА ДИЈАГНОСТИКА

За микробиолошку дијагностику јерсениоза, у зависности од клиничке манифестације, могу се узети делови некротичног ткива унутрашњих органа, лимфни чворови, фецес и крв.

Директно микроскопирање нема дијагностички значај јер се јерсеније морфолошки не могу разликовати од осталих ентеробактерија.

Приликом изолације јерсенија врста може се применити поступак хладно обogaћења који подразумева култивацију у натријум-фосфатном пуферу на 4° С током 3 седмице.

У рутинској дијагностици, за изолацију се најчешће користе крвни, MacConkey agar (Слика 11.3.) и CIN (Cefsulodin-Igrasan-Novobiocin) агар.

Изолација се при примоиолацији врши у аеробним условима, на 22° до 25° С, током 24 часа.

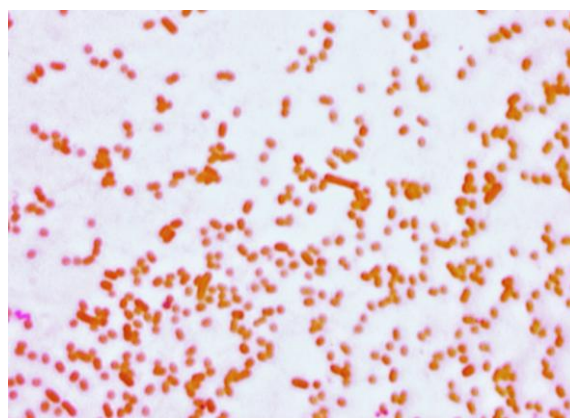
Коначна потврда идентитета врши се на основу биохемијских карактеристика (Слика 11.4.).



Слика 11.4. Резултати IMViC теста за врсту *Yersinia enterocolitica*. На TSI агару не ферментише глукозу, VP негативна, MR позитивна, цитрат негативна и индол позитивна

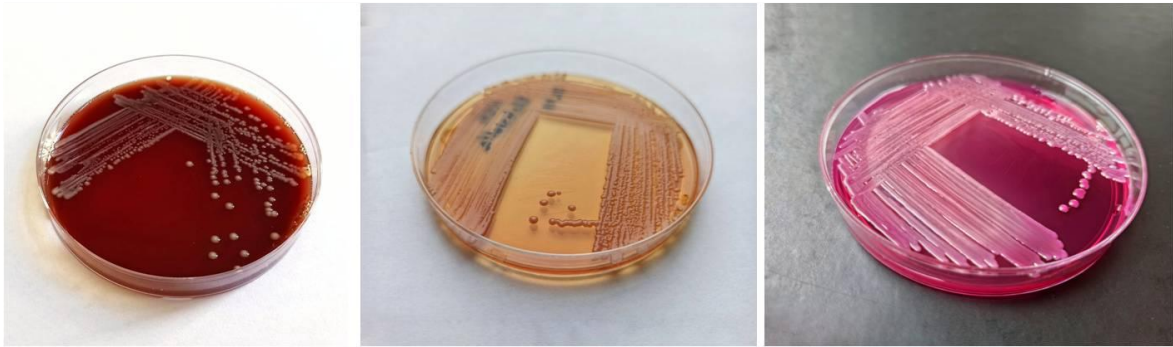
### 11.10. GENUS *KLEBSIELLA*

Врсте рода *Klebsiella* су Gram негативне, штапићасте бактерије дужине од 1 до 3 μm и ширине од 0,5 до 1 μm, које се у препарату често запајају у пару или појединачно (Слика 11.5.).



Слика 11.5. Размаз културе *Klebsiella pneumoniae* обојен по Gram-у





Слика 11.6. Култура *Klebsiella pneumoniae* на крвном, MacKonkey и Endo агару

Стварају капсулу у условима *in vivo* и *in vitro*, која 2 до 3 пута већа од бактеријске ћелије. Једне су од ретких припадника реда *Enterobacteriales* које су непокретне и не поседују флагеле.

Клебсијеле су факулативни анаероби. Расту на уобичајеним хранљивим подлогама попут крвног и MacKonkey агара. Оптимална температура култивације је 37° С, а вријеме 24 часа. Колоније на крвном агару након 24 часа раста су промера 2 до 3 mm, нехемолитичне, мукоидне и вискозне. Велике мукоидне колоније понекад куполастог облика стварају се због обилне производње капсула. Након супкултивације, клебси-

јеле губе капсулу и стварају мале колоније. На MacKonkey агару, као и другим селективно-диференцијалним подлогама које садрже лактозу, стварају ружичасто обојене колоније услед ферментације овог шећера. Потврда идентитета клебсијела врши се биохемијским тестовима.

Као и већина других колиформних бактерија коменсали дигестивног тракта животиња и људи, изолују се из респираторног тракта, а широко су распрострањене као сапрофити у земљишту и површинским водама.

Род *Klebsiella* име је добио по немачко-швајцарском бактериологу Edwin-у Klebs-у. У роду *Klebsiella* до данас је валидно описано 17 врста од којих су само две условно патогене врсте од значаја у ветеринарској медицини и то *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*. Врста *Klebsiella pneumoniae* дели се на 3 подврсте од којих је *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* узročник колиформног маститиса говеда, цервицитиса и метритиса кобила, уринарних инфекција паса, затим пнеумоније и супуративних стања код ждребади и телди.

*Klebsiella oxytoca* узročник је урогениталних инфекција, упале средњег ува, пнеумоније и апсцеса код лабораторијских глодара, те урогениталних инфекција коња.



Слика 11.7. Резултати IMViC теста за врсту *Klebsiella pneumoniae*. На TSI агару не ферментише глукозу, VP позитивна, MR негативна, цитрат позитивна и индол негативна

### 11.10.1. МИКРОБИОЛОШКА ДИЈАГНОСТИКА

Као узорак за микробиолошку дијагностику узимају се урин, спутум,

брисеви рана, брис цервикса, крв, брис ува, фецес и др.

Директно микроскопирање нема дијагностички значај јер се клебсијеле морфолошки не могу разликовати од осталих ентеробактерија.

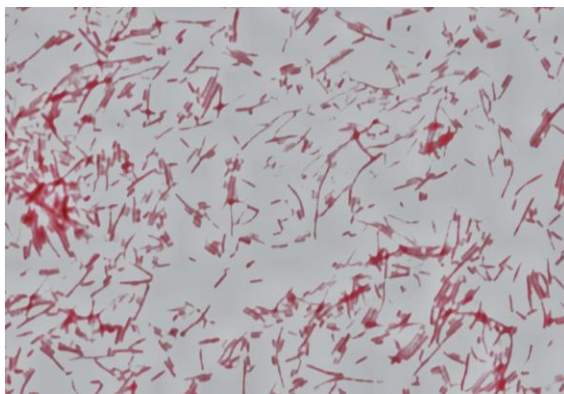
У рутинској дијагностици за изолацију *Klebsiella* врста најчешће се користе крвни, MacConkey и Endo агар (Слика 11.6.).

Изолација се врши у аеробним условима, на 37° С, током 24 часа.

Коначна потврда идентитета врши се на основу биохемијских карактеристика (Слика 11.7.).

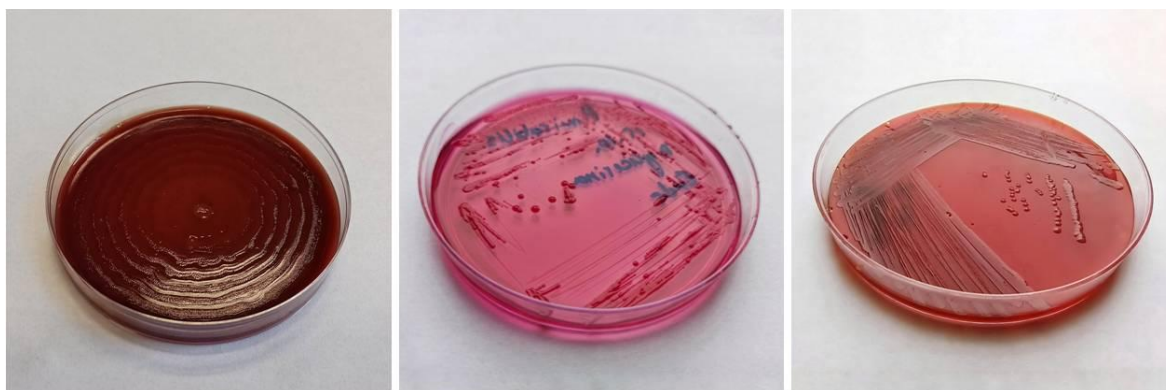
### 11.11. GENUS *PROTEUS*

Врсте рода *Proteus* су Gram негативни штапићи који не формирају спору, немају капсулу и у препарату се запажају као појединачни, у пару или у виду дужих ланаца. Дужина бактеријске ћелије креће се од 1,0 до 3,0  $\mu\text{m}$ , а ширина од 0,4 до 0,8  $\mu\text{m}$ . Међутим, код ових врста запажа се и феномен трансформације из штапића у дуге филаментозне форме (Слика 11.8.), па и име рода потиче од имена јунака Протеуса из Хомерове Одисеје, који је поседовао моћи трансформације. Све врсте су покретне захваљујући перитрихијалним флагелама. Расту у температурном опсегу од 10° до 43° С. Иако могу преживети и у базној и у киселој средини чији се рН креће од 4 до 11, најбољи раст се запажа при неутралном рН. Протеуси су факулта-



Слика 11.8. Размаз културе *Proteus mirabilis* обојен по Gram-у

тивни анаероби и имају респираторни и ферментативни тип метаболизма. Ферментишу глюкозу и још неке угљене хидрате до киселине уз продукцију гаса. Као и друге ентеробактерије имају једноставне нутритивне захтеве и добро расту на уобичајеним хранљивим подлогама. Једна од карактеристика која олакшава фенотипску карактеризацију припадника овог рода је и феномен ројења на површини чврстих хранљивих подлога. Овај феномен последица је изузетне покретљивости и огледа се у прекривању подлоге у форми танког биофилма и стварању концентричних кругова око места инокулације. С места инокулације веома се брзо шире прерастајући колоније других бактерија, чиме онемогућавају њихову изолацију. Овај феномен јавља се при температури инкубације од 20° до 37° С, а може се зауставити култивацијом на MacConkey агару због дејства жучних соли из подлоге. На крвном агару карактерише их непријатан



Слика 11.9. Култура *Proteus mirabilis* на крвном (феномен ројења), MacConkey и крвном агару (појединачне колоније без ројења)

мирис који подсећа на мирис ужегле рибе, а боју крвног агара мењају из црвене у чоколадну. У течним подлогама попут хранљивог бујона и пептонске воде

карактерише их хомоген замућен раст и пудераст талог и непријатан мирис на амонијак.

Као и већина других колиформних бактерија коменсали су дигестивног тракта животиња и људи, а налазе се у земљишту и контаминираној води.

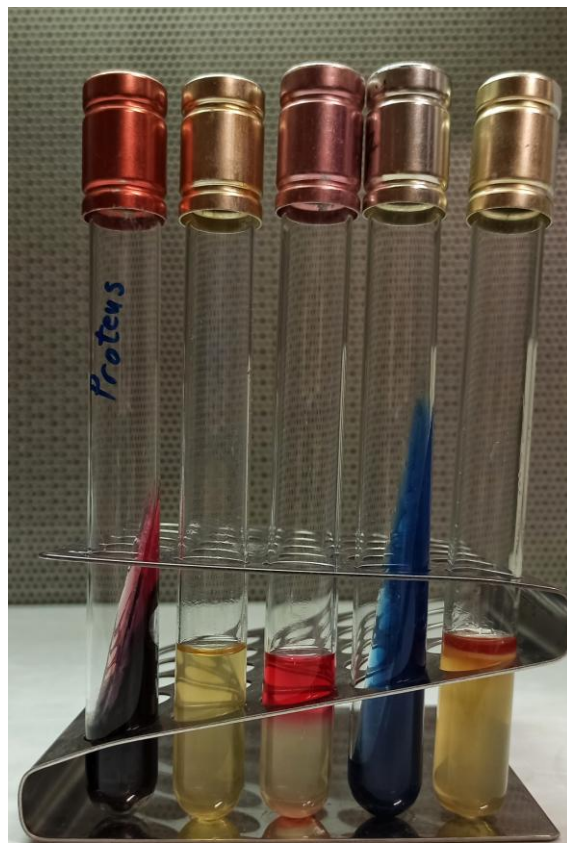
До данас у роду *Proteus* валидно је описано 10 врста. Као условно патогене врсте од значаја у ветеринарској медицини су *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*. Ове бактерије могу изазвати уринарне инфекције паса и коња, доводе се у везу с запаљењем спољашњег ува паса и мачака, те изазивају дијареју код млађих јединки и то ласица, јагњади, телади, јаради и штенади. Могу се јавити као контаминенти намирница.

### 11.11.1. МИКРОБИОЛОШКА ДИЈАГНОСТИКА

На микробиолошку дијагностику инфекција изазваних врстама рода *Proteus* шаљу се урин, брисеви ува, фецес и др. Директно микроскопирање нема дијагностички значај јер се протеуси морфолошки не могу разликовати од осталих ентеробактерија. У рутинској дијагностици за изолацију *Proteus* врста најчешће се користе крвни, Endo и MacConkey агар.

Изолација се врши у аеробним условима, на 37° С, током 24 часа.

Конечна потврда идентитета врши се на основу биохемијских карактеристика (Слика 11.10).



Слика 13.7. Резултати IMViC теста за *Proteus mirabilis*. На TSI агар у не разграђује шећере из подлоге и ствара H<sub>2</sub>S, VP негативна, MR позитивна, цитрат позитивна и индол позитивна



## 12.

Genus *Escherichia*

Класа: *Gammaproteobacteria*

Ред: *Enterobacterales*

Фамилија: *Enterobacteriaceae*

Род: *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Escherichia coli*

**П**р̀ави, Грам негативни штапићи, покретни, неспорулишући, факултативни анаероби, расту на основним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° С, ферментишу глукозу до киселине, стварају каталазу, не стварају оксидазу, налазе се у интестиналном тракту животиња и људи и широко су распрострањени у земљишту и води.

### 12.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Род *Escherichia* састоји је се од бактерија које одговарају опису општих карактеристика реда *Enterobacterales*, будући да је и сам род типски род овога реда, а врста *Escherichia coli* његова типска врста. Род *Escherichia* име је добио по немачком педијатру Theodor-у Escherich-у који је први изоловао типску врсту *E. coli* из столице одојчета. Врсте овога рода су кратки цилиндрични штапићи који се по Gram-у боје негативно и који не формирају спору. Ширина ћелије ешерихија креће се од 0,4 од 1,5 μm, а дужина од 1 до 6 μm. Већина сојева је перитрихо обрасла флагелама, али срећу се и атрихи односно непокретни сојеви. Расту у аеробним и анаеробним условима и имају како ферменататвини тако и респираторни тип метаболизма, а срећу се и анаерогени сојеви. Нису захтевне за

изолацију и веома добро расту на једноставним хранљивим подлогама попут хранљивог агара. Толеришу широк температурни опсег, али најбољи раст је евидентан при температурама од 21° С до 37° С, а неки сојеви могу расти и при ниским температурама од свега 7° С, или високим до 49° С. Због веома кратког генерацијског времена раст је видљив већ након 12 часова инкубације. Ешерихије стварају каталазу, али не стварају оксидазу. Све врсте ферментишу глукозу и већина производи гас током ферментације овог супстрата и других ферментабилних угљених хидрата. Лактозу ферментише већина сојева *E. coli*, а у случају других врста она може бити спора или потпуно изостати код свих или већине сојева других припадника рода. Натријум ацетат често користе као једини извор угљеника.



До данас је у роду *Escherichia* описано 6 врста с валидно објављеним и тачним именима, *Esherichia albertii*, *Esherichia coli*, *Esherichia fergusonii*, *Esherichia hermannii*, *Esherichia marmotae* и *Esherichia ruysiae*. До сада су све врсте осим *E. ruysiae* биле повезане с обољењима животиња и/или људи, али *E. coli* је једина врста од патогеног значаја за животиње.

## 12.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

*Escherichia coli* је природни становник дебелог и доњих партија танког црева топлокрвних животиња, па је самим тиме обилно заступљена у окружењу које животиње насељавају. Дисталне партије цревног тракта сматрају се „примарним стаништем”, а спољашња средина „секундарним стаништем” *E. coli*. Обично је присутана у већем броју код месождера и сваштоједа него код биљоједа. Излучује се изметом и може да преживи у деловима фецеса, прашина и води недељама или месецима. Како је убиквитарна у фецесу животиња и људи, присуство *E. coli* у узорцима воде за пиће сматра се индикатором фекалног загађења.

## 12.3. ОБОЉЕЊА

Многи сојеви врсте *E. coli* су коменсали цревног тракта, посебно дебелог црева, међутим многи сојеви су и опортунистички узрочници инфекција или су примарно патогени. Патогени сојеви *E. coli* се деле на дијаројичне (DEC) и екстраинтестиналне (ЕхРЕС) сојеве, који се даље деле на патотипове на основу главних фактора вируленције и клиничких обољења које изазивају.

Дијаројичне *E. coli* су економски важни патогени новорођених прасади, телади и јагњади. Осим тога залучена прасад изузетно су пријемчива на колибацилозу и едемску болест, обољења која се одликују високом стопом морбидитета и морталитета.

Екстраинтестиналне инфекције уобичајено се јављају у крви, уринарном тракту, материци, пупку, плућима и ранама локализованим на било ком месту и ове инфекције се могу јавити код већине животињских врста. *Escherichia coli* изазива септикемију - колисептикемију код новорођенчади већине врста, посебно телади, прасади, јагњади, ждребади, кунића, штенади и мачади, али изазива и опортунистичку септикемију код старијих јединки с ослабљеним имунитетом. Код крава и крмача ова врста једна је од узрочника колиформног маститиса, обољења које се у перакутном и акутном току може манифестовати тешким клиничким знацима. Код птица *E. coli* је важан узрочник запаљења ваздушних кеса - сакулитиса, перикардитиса и омфалитиса, као и многих других клиничких манифестација системске инфекције. Зоонотске инфекције изазване ентерохеморагичним сојевима *E. coli* (ЕНЕС) и DEC специфичним за домаћина, као и екстраинтестиналне инфекције од великог су значаја у хуманој медицини.

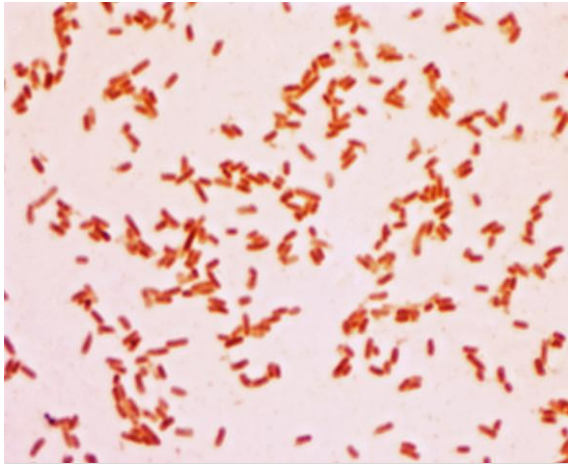
## 12.4. УЗОРЦИ

За дијагностику инфекција изаваних патогеним сојевима *E. coli* узимају се узорци у зависности од клиничке манифестације обољења. Код енетеричних инфекција узима се свежи фецес, одмах након дефекације или директно из ректума животиње, а могу се узети и ректални брисеви. Узорци фецеса за изолацију *E. coli* требало би да буду обрађени одмах након узорковања, уобичајено у року од 24 часа. Када то није могуће узорке је потребно чувати на температури фрижидера, како би се успорила деоба бактерија, а у исто време и омогућило њихово преживљавање. У случају септикемије узорци се узимају с иначе стерилних места у организму попут коштане сржи, зглобова, слезине или крви. Секрет вимена узима се у случају колимаститиса, брис или исцедак

цервикса материце при сумњи на метритис, средњи млаз урина при сумњи на инфекцију уринарног тракта, брисеви рана или делови инфилтрираног ткива.

## 12.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

*Escherichia coli* је Gram негативна штапићаста бактерија која не формира спору и која се у препарату запажа појединачно или у пару (Слика 12.1).



Слика 12.1. Размаз културе *Escherichia coli* обојен по Gram-у

Уобичајено, ћелије *E. coli* су кратки и прављ штапићи дужине 1 до 3  $\mu\text{m}$  и ширине 0,4 до 0,7  $\mu\text{m}$ , међутим величина варира у зависности од хранљиве подлоге у којој се узгаја, а ћелије које брже расту су и веће јер морају имати више рибозома да би направиле више протоплазме у јединици времена, а сами рибозоми заузимају већи простор. Већина сојева ове врсте је покретна захваљујући перитрихо распоређеним флагелама. Поседује полисахаридну капсулу која се лако може визуализовати бојењем India ink методом. Важно је напоменути да се *E. coli* бојењем и микроскопским прегледом не може разликовати од других штапићастих Gram негативних врста. Стога, директан микроскопски преглед узорака узетих с иначе стерилних места у телу може обезбедити само прелиминарну инди-

кацију коју категорију бактерија треба изоловати из узорка, односно које хранљиве подлоге користити и које услове култивације обезбедити.

## 12.6. ИЗОЛАЦИЈА

*Escherichia coli* има једноставне нутритивне захтеве и веома добро расте и на небогаћеним хранљивим подлогама попут хранљивог агара, а за њену изолацију традиционално се користе крвни агар, Endo агар и MacConkey агар. Инкубација се изводи у аеробним условима, иако је ова врста факултативно анаеробна. *Escherichia coli* добро расте у температурном опсегу од 10° Ц до 40° С, мада је температурни оптимум за већину сојева 37° С. Неки лабораторијски сојеви расту на температурама и до 49° С. Ова врста може преживети рН у опсегу 4,5-9,5, али најбољи раст се запажа на 7,0 тј. неутралном рН. Као и у случају других фактора, рН захтеви варирају у зависности од соја *E. coli*. Време трајања инкубације је 18 до 24 часа, јер *E. coli* изузетно брзо формира видљиве колоније, имајући у виду да има генерацијско време од 20 минута.

## 12.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

*Escherichia coli* на хранљивом агару ствара велике, дебеле, сивкасто-беле, влажне, глатке, непрозирне или прозирне колоније које су округлог облика и величине 1 до 3 mm. Глатки облици (S) колонија запажају се при примарној изолацији и лако се емулгују физиолошком раствору. Храпави облици (R) колонија запажају се у старијим културама, имају суву површину и непрозирне су, тешко се емулгују физиолошком раствору и аутоаглутинативне су. S-R варијација јавља се као резултат поновљених супкултивација и повезана је с губитком површинских антигена, а често и вируленције. Сојеви који споседују капсулу на свим хранљивим подлогама па и на

харанљивом агару формирају мукоидне колоније.

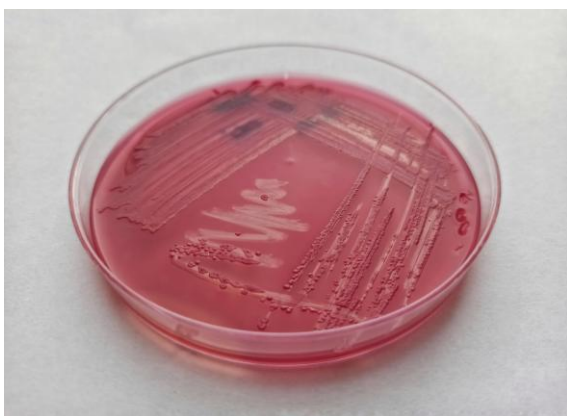
На крвном агару колоније су крупне, округле, правилних ивица, пречника 2 до 3 mm, испупчене, сиве боје и влажне (Слика 12.2.).



Слика 12.2. Култура *Escherichia coli* на крвном агару

Неки сојеви су  $\beta$  хемолитични, нарочито они изоловани из патолошког материјала, док сојеви изоловани из здравих јединки често су  $\gamma$  хемолитични односно нехемолитични.

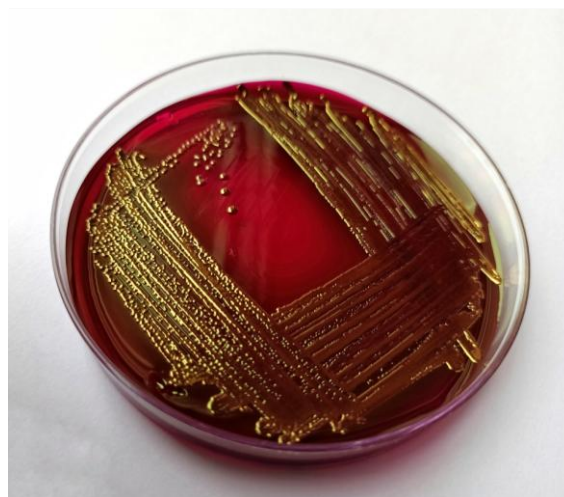
На MacConkey агару колоније су округле, влажне, глатке и окружене су тамном ружичастом зоном преципитираних жучних соли. Величине су 2 до 3 mm (Слика 8.3.).



Слика 12.3. Култура *Escherichia coli* на MacConkey агару

Боја колонија је ружичаста услед ферментације лактозе, што је важна фенотипска карактеристика која помаже у диференцијацији од других бактерија у узорку, нарочито *Salmonella* врста које не ферментишу лактозу и стварају безбојне колоније на овој подлози.

На Endo агару колоније *E. coli* су лактоза позитивне и ружичасте, које временом добијају карактеристичан метално-зелени сјај услед кристализације фукси-на. Округле су, испупчене, величине 1 до 3 mm и правилних су ивица (Слика 12.4.).



Слика 12.4. Култура *Escherichia coli* на Endo агару

У дубоком агару расту целом дужином убода езе, а у зависности од тога да ли су покретне или не, прорастају целом ширином подлоге или расту само из линију убода.

У течним подлогама карактерише их хомогено мутан раста након свега 12 часова. R форме спонтано аглутинирају и стварају талог на дну епрувете. Приликом продужене инкубације (>72 часова), формирају пеликулу на површини подлоге.

## 12.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Традиционални методи идентификације *E. coli* подразумевају фенотипску карактеризацију, односно опис морфологије колонија и извођење биохемијских тестова, конкретно IMViC теста (Слика 12.5.) који служи за разликовање ове врсте од осталих Gram негативних штапићастих ентеробактерија које ферментишу лактозу. Осим наведених дијагностичких метода раде се и други тестови као што су серолошка типизација, доказивање токсина имуноензимским тестовима или на култури Vero ћелија, молекуларни методи дијагностике и MALDI-TOF MS.



Слика 12.5. Резултати IMViC теста за врсту *Escherichia coli*. На TSI агару ствара киселину (жуто) и гас, VP негативна, MR позитивна, цитрат негативна и индол позитивна



## 13.

Genus *Salmonella*

Класа: *Gammaproteobacteria*

Ред: *Enterobacterales*

Фамилија: *Enterobacteriaceae*

Род: *Salmonella* Lignieres 1900

Врсте од значаја у ветеринарској медицини: *Salmonella enterica* (subsp. *enterica*)

**П**рави Gram негативни штапићи, покретни, неспорулишући, факултативни анаероби, расту на основним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° C, стварају каталазу, не стварају оксидазу, не ферментишу лактозу, налазе се у интестиналном тракту животиња и људи и широко су распрострањени у земљишту и води.

### 13.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Врсте рода *Salmonella* морфолошки одговарају општим карактеристикама фамилије *Enterobacteriaceae*. То су Gram негативне, штапићасте ентеробактерије димензија 0,7-1,5 × 2-5 μm. Покретне су захваљујући перитрихо распоређеним флагелама, а изузетак су серовари *Gallinarum* и *Pullorum* који су атрихи. Не стварају спору и уопштено не стварају капсулу.

Род *Salmonella* име је добио у част америчког ветеринара и бактериолога Daniel-а E. Salmon-а.

Салмонеле толеришу широк температурни опсег, у зависности од серотипа од 2° до 54° C, а расту и при рН од 3,7 до 9,4. Прилично су отпорне у спољашњој средини и дуг временски период могу преживети и у сувим условима. Салмонеле су аероби и факултативни анаероби.

Типично се дефинишу способношћу да користе цитрат као једини извор угљеника, лизин као извор азота и продукцијом H<sub>2</sub>S на троструком шећеру по Kligler-у, изузеци од ових особина служе за дефинисање врста, подврста и серотипова. Док већина серовара формира крупне колоније које имају 2 до 4 mm у пречнику, срећу се и серовари попут *Abortusovis* који стварају ситне колоније пречника око 1 mm. Колоније су округлог облика, конвексне су и глатке. Већина салмонела је аерогено, међутим важан изузетак је серовар *Typhi* који никада не производи гас. Могу се срести и анаерогене варијанте серовара који иначе производе гас, а такав случај је чест са сероваром *Dublin*. Иако је стварање H<sub>2</sub>S карактеристика је већине салмонела, али постоје серовари који не стварају овај гас, а такви су већина сојева серовара *Paratyphi* и серовара *Choleraesuis*. Једна од најдис-

криминаторнијих карактеристика у односу на друге ентеробактерије је одсуство способности ферментације лактозе, па већина селективних подлога које се примењују у изолацији салмонела садрже лактозу и рН индикатор. Салмонеле стварају каталазу, али не стварају оксидазу.

До данас су у роду *Salmonella* описане 3 врсте с валидно објављеним и тачним именима и то *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* и *Salmonella subterranea* од којих је искључиво *S. enterica* од значаја за ветеринарску и хуману медицину. Врста *Salmonella enterica* дели се на 6 подврста и то *enterica* (позната као subspecies I), *salamae* (subspecies II), *arizonae* (subspecies IIIa), *diarizonae* (subspecies IIIb), *houtenae* (subspecies IV) и *indica* (subspecies VI). Subspecies V рекаласификована је као *S. bongori*. Типска врста је *S. enterica* ssp. *enterica*, а типски сој *S. enterica* ssp. *enterica* серотип Typhimurium сој LT2 (Lilleengen сој тип 2). Подврста I уобичајено се изолује из животиња и људи. *Salmonella enterica* укључује више од 2600 антигено различитих серотипова који се још називају серовари (ser.) или варијетети (var.), а отприлике 60% њих потпада под подврсту I. Због обиља серотипова и тиме компликоване таксономске номенклатуре име серотипа не пише се у курзиву, при чему је прво слово имена велико, па се тако нпр. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium при првом помињању у тексту пише као *S. enterica* ser. Typhimurium, а касније једноставно *S. Typhimurium*.

### 13.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Резервоар салмонела је цревни тракт топлокрвних и хладнокрвних животиња, од којих су већина супклинички носиоци. Међутим, салмонеле могу преживети и до девет месеци или више у спољашњој средини, на местима као што су влажно тло, вода, фецес и храна за животиње, нарочито у крвно-коштаном и

рибљем брашну. Иако су неки серовари салмонела стриктно адаптирани на домаћина већина их се може наћи код великог броја врста попут серовара Typhimurium. Сматра се да су салмонеле најзаступљеније на подручјима с интензивном животињским узгојем, нарочито свиња, телади и живине.

### 13.3. ОБОЉЕЊА

Већи број случајева салмонелозе код људи и домаћих животиња доводи се у везу с релативно малим бројем серовара и они се могу поделити у три групе у односу на адаптираност на домаћина. У првој групи налазе се серовари специфични за одређену животињску врсту. Они обично изазивају системска обољења код малог броја филогенетски повезаних врста, тако се серовар Abortusovis готово искључиво доводи у везу са системским обољењем оваца, серовар Pullorum са системским обољењем пилића и Paratyphi с инфекцијама људи. У другу групу спадају сојеви адаптирани на домаћина. Они су углавном повезани с једном или две блиско повезане врсте домаћина, али могу изазвати обољења код других врста. На пример, серовар *S. enterica* Choleraesuis и серовар Dublin генерално су повезани с тешком системском болешћу свиња односно говеда, међутим ови се серовари јављају као узрочници инфекција код других животињских врста и људи. Трећа група обухвата сероваре, као што су Infantis и Enteritidis, који немају специфичног домаћина и нису адаптирани на одређену врсту и који обично изазивају гастроентеритис код већег броја филогенетски неповезаних врста домаћина. Природа и карактер инфекција изазваних салмонелама код различитих животињских врста веома варирају и на њих утичу многи фактори који подразумевају серовар, вирулентност соја и инфективну дозу салмонела, као и врсту, старост и имунолошки статус домаћина, али и географску регију.



Врста	Домаћин	Обољење
<b>S. Dublin</b>	Говеда, могуће инфекције оваца и људи	Ентеритис, септикемија, менингитис код телаци, абортус, остеомијелитис, артритис, сува гангрена код телаци, абортус и дијареја код оваца, септикемија код људи
<b>S. Choleraesuis</b>	Свиње, могуће инфекције људи	Септикемија и ентеритис код свиња, код људи могући септикемија, артритис, пнеумонија и кутани апсцеси
<b>S. Abortusovis</b>	Овце	Абортус и дијареја
<b>S. Abortusequi</b>	Коњи	Абортус
<b>S. Gallinarum</b>	Живина, углавном адулти	Тифус живине
<b>S. Pullorum</b>	Живина, искључиво пилад	Бели пролив пилића
<b>S. Typhi</b>	Људи	Трбушни тифус
<b>S. Paratyphi A</b>	Људи	Трбушни паратифус
<b>S. Enteritidis</b>	Многе врста животиња и људи	Ентеритис и септикемија
<b>S. Typhimurium</b>	Многе врста животиња и људи	Ентеритис и септикемија

**Табела 13.1.**  
Обољења  
изазвана  
*Salmonella*  
*enterica* ssp.  
*enterica*  
сероварима

Уопштено говорећи, салмонеле могу изазвати широк спектар клиничких обољења, укључујући акутну септикемију, акутну или хроничну дијареју, респираторна обољења, побачаје и артритис (Табела (13.1)).

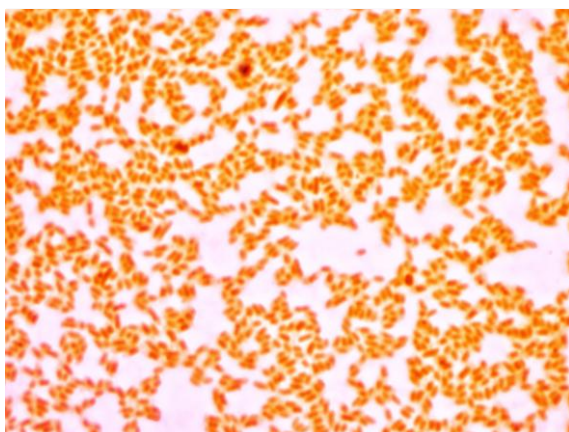
Важно је напоменути да се асимптоматских клицоноша узимају 3 узастопна узорка фецеса, да би се избегли лажно негативни резултати култивације узроковани интермитентним излучивањем салмонела фецесом.

### 13.4. УЗОРЦИ

За дијагностику интестиналних инфекција узимају се узорци фецеса или брисеви ректума и клоаке за копрокултуру, а у случају системске инфекције узима се крв за хемокултуру. Ако су инфицирани репродуктивни органи, ако дође до побачаја, за изолацију салмонела неопходно је узети вагинални брис, плаценту, садржај желуца фетуса или ембрионисана јаја. За *post mortem* дијагностику салмонелозе, односно за изолацију, узимају се слезина, коштана срж, танка црева, дебело црево, јетра и мезентеријални лимфни чворови. Такође, као узорци за изолацију салмонела могу се узимати узорци воде и сточне хране.

### 13.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

*Salmonella* врсте су Gram негативне штапићасте бактерије ширине од 0,7 до 1,5  $\mu\text{m}$  и дужине од 2 до 5  $\mu\text{m}$ . У микроскопском препарату немају специфичан распоред (Слика 13.1.). Готово сви серовари салмонела поседују флагеле које су распоређене по целој површини бактеријске ћелије. Изузетак су серовари Gallinarum и Pullorum који не поседују флагеле и самим тиме су непокретни. Салмонеле генерално не поседују капсулу, а изузетак од овог правила су серовари Dublin, Typhi и Paratyphi који могу поседовати капсулу. Сојеви салмонела који поседују капсулу су вурulentнији.



Слика 13.1. Размаз културе салмонела обојен по Gram-у

Као и у случају *E. coli* директан микроскопски преглед нема дијагностички значај јер се салмонеле бојењем и микроскопским прегледом не могу разликовати од других припадника фамилије *Enterobacteriaceae*.

### 13.6. ИЗОЛАЦИЈА

Методи култивације и хранљиве подлоге које могу најбоље резултате у одређеној дијагностичкој ситуацији зависе од низа фактора који укључују серовар салмонеле, порекло и врсту узорака, животињску врсту од које потиче узорак и избор подлога за селективно обогаћење и селективну изолацију. Приликом изолације треба водити рачуна да серотипови који су високо адаптирани на свиње и живину пробирљивији су од већине осталих серотипова салмонела и не толеришу Selenit F бујон и Брилијант зелени агар.

Салмонеле се сматрају бактеријама које нису избирљиве и расту на основним подлогама, али узорци који се узимају за микробиолошку дијагностику, попут фецеса и хране за животиње, обично садрже комплексне скупине бактеријских врста. Из тог разлога, неходно је користити селективне подлоге које инхибирају раст коменсалних бактерија и омогућавају диференцијацију салмонела од осталих ентеричних бактерија на основу њихових културелних особина.

Надаље, разлике међу сероварима захтевају употребу више од једне хранљиве подлоге, па изолација и идентификација салмонела траје 5 дана. У узорцима попут фецеса асимптоматских клицоноша, узорцима узетим из спољашње средине и узорцима хране за животиње број салмонела је уобичајено мали и бактеријске ћелије често су оштећене, па овакви узорци најчешће захтевају примену подлога за пред-обогачење, као што је пуферисана пептонска вода, а у циљу опоравка ћелија салмонела. Однос узорка и пептонске воде је 1:9, а инкубација се врши у аеробним условима, на 37° C и најдуже 18 до 20 часова, јер продужена инкубација доводи до пренамножавања других бактерија у узорку.

Након предобогачења узорак се пресејава у бујоне за обогаћење, који селективно омогућавају раст салмонела, а инхибирају раст других бактерија. У сврху обогаћења користе се бујони Selenit F, Rappaport-Vassiliadis, Müller-Kauffmann, Брилијант зелено и други. Инкубација траје најдуже 24 часа, јер инхибиторно дејство ових подлога временом опада. Због боље селективности бујони за обогаћење инкубирају се на температури од 43° C. Ипак, неки серотипови, конкретно већина сојева серотипа *S. Dublin*, ипак не расту на овој температури у Rappaport-Vassiliadis бујону, па се инкубација врши на температури од 41° до 42° C. Због инхибиторног дејства Selenit F бујона на серотипове *S. Choleraesuis*, *Typhisuis*, *Gallinarum* и *Pullorum* за обогаћење узорака који потичу од живине и свиња најчешће се примењује Rappaport-Vassiliadis бујон. Управо због инхибиторног дејства одређених подлога и температура инкубације на неке серотипове салмонела препоручује се коришћење најмање две селективне подлоге за обогаћење, при чему се једана инкубира на 37° C, а друга на адекватној вишој температури, а обе у аеробним условима током 18 до најдуже 24 часа.

Култура из селективне подлоге за обогаћење или узорци фецеса и крви од оболелих животиња засејавају се на чврсте селективне подлоге, односно селективно-диференцијалне подлоге. Када се пресејава бујонска култура узима се пуна омча езе. Ако се узорак инокулише директно на подлоге прави се суспензија узорка. Велики број диференцијалних подлога користи се за изолацију салмонела и оне се разликују по својој селективности. Подлоге ниске селективности за изолацију салмонела су MacConkey агар и Еозин-метилен плави агар, док у подлоге средње селективности спадају *Xylose lysine deoxycholate* (XLD) агар, *Salmonella-Shigella* (SS) агар и Нектоен ентерични агар. У подлоге високе селективности спадају Бизмут сулфитни агар и Брилијант зелени агар, међутим ове подлоге уједно су подложне већој учесталости лажно позитивних колонија, уз то да Брилијант зелени агар није погодан за изолацију серовара адаптираних на домаћина. За селективну изолацију салмонела данас је доступан и велики број хромогених чврстих подлога попут Rambach агара.

У рутинској изолацији салмонела, за исти узорак, користе се две чврсте подлоге од којих је прва најчешће XLD агар, а као друга подлога може се користити SS агар, MacConkey агар или неки други селективно-диференцијални агар. Инкубација се врши у аеробним условима, током 24 часа при температури од 37° С.

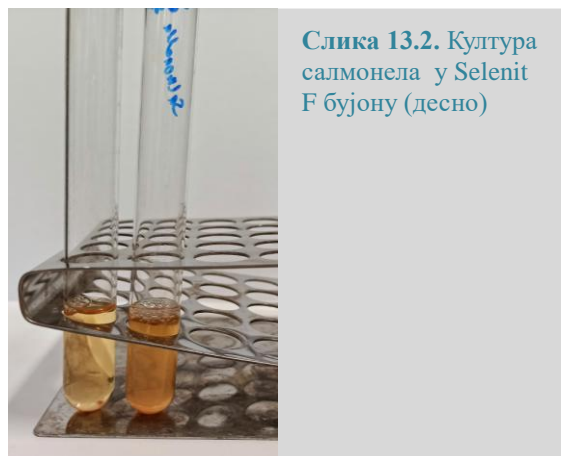
*Salmonella Abortusovis* је спорорастућа салмонела и као таква захтева продужену инкубацију од 72 часа, али и примену неселективних подлога попут крвног агара или нискоселективног MacConkey агара.

Ради добијања чисте културе за биохемијску идентификацију и серотипизацију суспектне колоније пресејавају се на хранљиви агар, а затим на троструки шећер по Kligler-у (TSI). Инокулисане подлоге инкубирају се током 24 часа у

аеробим условима при температури од 37° С.

### 13.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Раст у бујонима попут Rapraport-Vassiliadis i Selenit F бујона карактерише се бујним растом и хомогеним замућењем подлоге (Слика 13.2.).



Слика 13.2. Култура салмонела у Selenit F бујону (десно)

При продуженој инкубацији на површини бујона формирају танку пеликулу. R варијанте формирају талог и дебљу пеликулу.

Салмонеле на чврстим подлогама уобичајено формирају крупне колоније до 4 mm у пречнику, које су округлог облика, конвексне и сјајне.

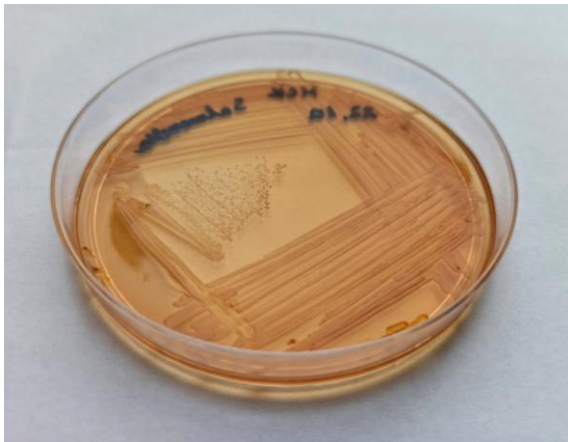
Ипак, неки сојеви *Salmonella enterica*, могу стварати мукоидне колоније, те глатке и сјајне колоније, а срећу се и храпаве и суве колоније конкретно код неких сојева серовара *Typhimurium*.

На XLD агару салмонеле стварају округле колоније које су величине 2 до 3 mm након преконоћне инкубације. Боја колонија је ружичаста до црвена, а како већина серовара ствара H<sub>2</sub>S њихове колоније имају црни центар. Колоније H<sub>2</sub>S негативних салмонела су ружичасте и немају црни центар, а такве су колоније већине сојева серовара *Choleraesuis*, *Abortusequi*, *Abortusequi*, *Gallinarum*, *Pullorum* и једног броја сојева серовара *Paratyphi A* и *Typhi*.

Како не ферментишу лактозу, салмонеле на MacConkey агару стварају небојене



или бледо жуте, прозирне колоније пречника 1 до 3 mm. Округлог су облика, глатке и конвексне (Слика 13.3.).



Слика 13.3. Култура салмонела на MacConkey агару

Салмонеле на SS агару стварају округле, глатке, безбојне и прозирне колоније које имају црни центар у случају да стварају H<sub>2</sub>S (Слика 13.4).



Слика 13.4. Култура H<sub>2</sub>S позитивног серовара салмонела на SS агару

На Брилијант зеленом агару стварају округле колоније величине 1 до 3 mm које су ружичасте окружене зоном црвене боје услед разградње пептона и накупљања алкалних супстанци у подлози.

Салмонеле на Еозин-метиленско плавом агару су округлог облика, величине 1 до 3 mm, безбојне и прозирне.

На крвном агару колоније салмонела су сиво-беле боје, округлог облика, конвек-

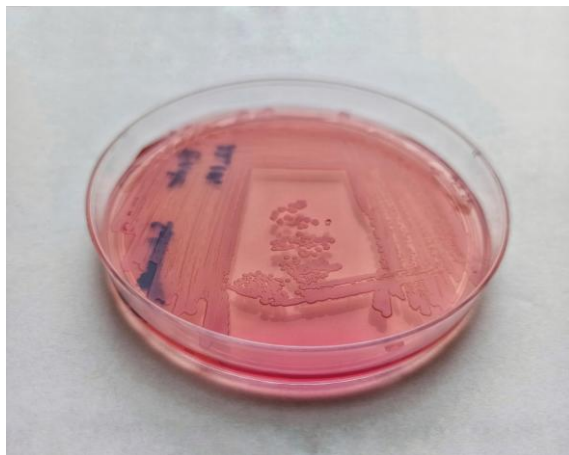
сне, нехемолитичне, влажне, пуних ивица и након 24-ворочасовне инкубације величине 2 до 3 mm (Слика 13.5.).



Слика 13.5. Култура салмонела на крвном агару

Међутим, величина и прозирност колонија условљене су сероваром.

Колоније салмонела на Endo агару су безбојне до бледо ружичасте, величине 2 до 3 mm, округле и сјајне (Слика 13.6).



Слика 13.6. Култура салмонела на Endo агару

На храњивом агару, након 24 сата на 37°C, колоније већине сојева *Salmonella* су крупне, промера 2 до 4 mm прљаво беле, влажне, глатке конвексне површине и потпуних ивица. Већина сојева врсте *Salmonella enterica* на TSI карактерише се црвеном бојом косине подлоге и жутом бојом дна подлоге што указује на то да оне ферментишу само глукозу уз стварање H<sub>2</sub>S који се огледа црним пребојавањем дубине подлоге.

## 13.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Традиционални методи идентификације *Salmonella* врста подразумевају фенотипску карактеризацију и одређивање биохемијских карактеристика (Слика 13.7.), а дефинитивна идентификација заснива се на одређивању соматских O и флагеларних H антигена, али и овојног Vi антигена који поседују само 3 серовара салмонела *S. Typhi*, *S. Paratyphi* и *S. Dublin*. Осим наведених дијагностичких метода раде се и други тестови као што су имуноензимски, серумска аглутинација, фаготипизација, молекуларни методи дијагностике, гел-електрофореза у пулсирајућем пољу (PFGE), мултилокусна секвентна типизација (MLST) и MALDI-TOF MS.

### 13.8.2 БИОХЕМИЈСКА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

*Salmonella enterica* ферментише глукозу, сорбитол, манитол и малтозу, а уобичајено не ферментишу лактозу и сахарозу, већина серотипова ствара H<sub>2</sub>S, негативно је на уреазу, ствараће индола и Voges-Proskauer, а позитивно је на метил црвено и цитрат (осим *S. Typhi* и *S. Paratyphi A*) (Слика 13.7). Салмонеле разлажу аминокиселине, мада је *S. Typhi* изузетак јер не ствара орнитин декарбоксилазу, а *S. Paratyphi A* не ствара лизин декарбоксилазу.

### 13.8.2 СЕРОТИПИЗАЦИЈА

Суспектне колоније с диференцијално-селективних подлога фенотипски се идентификују као *Salmonella* spp. Како се ради о разноврсној групи бактерија код које нису неуобичајени и фенотипски атипични сојеви, фенотипска идентифи-



Слика 13.7. Резултати IMViC теста за *Salmonella* sp. на TSI агар у не разграђује шећере из подлоге и ствара H<sub>2</sub>S, VP негативно, MR позитивно, цитрат позитивно и индол негативно

кација се комбинује са серотипизацијом ради крајње потврде идентитета серовара. Бактеријске колоније за суптипизацију узимају се с хранљивог агара или TSI агара јер колоније са сеективних подлога често нису погодне за типизацију.

Серотипизација салмонела се заснива на Kauffmann-White-овој шеми и подразумева одређивање O, H и Vi антигена, изводи се аглутинацијом на плочици коришћењем специфичних антисерума.



## 14.

Genus *Clostridium*

Класа: *Clostridia*

Ред: *Eubacteriales*

Фамилија: *Clostridiaceae*

Род: *Clostridium* Prazmowski 1880

Врсте од значаја у ветеринарској медицини:

*Clostridium perfringens*

*Clostridium chavouei*

*Clostridium septicum*

*Clostridium haemolyticum*

*Clostridium novyi* tip A i tip B

*Clostridium tetanii*

*Clostridium botulinum*

**К**рупни Грам позитивни штапићи, већином покретни, спорулишући, већина врста су облигатни анаероби, расту на обогаћеним хранљивим подлогама, оптимална температура раста је 37° С, формирају крупне колоније, не стварају каталазу, не стварају оксидазу, сапрофити широко распрострањени у земљишту и води и налазе се у интестиналном тракту животиња.

#### 14.1. ГЕНЕРАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ РОДА

Клостридије су штапићасте бактерије које се обично боје позитивно по Gram-у. Величина клостридија може значајно да варира (0,2 – 4 x 1,5 – 20 μm) као и положај ендоспора, које обично визуелно проширују бактеријску ćелију, која изгледом подсећа на вретено, због чега је род добио име (гр. *κλωστήρ* – вретено). Ендоспоре могу бити сферичне или овалне, веома су отпорне на топлоту, хемикалије и исушивање, па стога могу да преживе у неповољном окружењу где могу да клијају и претворе се у потпуно активну вегетативну ћелију под

повољним условима. Готово сви припадници рода *Clostridium* су перитрихо обрасли флагелами и тиме и покретни. Изузетак је врста *Clostridium perfringens* која не поседује флагеле и која је уједно једина патогена врста клостридија која у ткивима домаћина ствара капсулу.

Већина клостридија захтева обогаћене хранљиве подлоге које укључују аминокиселине, угљене хидрате, витамине и крв или серум. Раст је видљив у року од једног или 2 дана. Уобичајено, колоније су често неправилног облика, али неколико врста клостридија показује феномен ројења преко влажног агара, без формирања колонија. Клостридије су

метаболички веома активне и усавршиле су разградњу угљених хидрата, протеина, липида и нуклеинских киселина. Већина врста ствара хемолизу на крвном агару. Иако су врсте *Clostridium* обично негативне на каталазу, код неких сојева, као што је *C. perfringens*, може се открити активност овог ензима у траговима. Поред тога, кластридијама недостаје цитохромски систем и зато су негативне на оксидазу. Кластридије се често јављају у природи и у инфекцијама као агломерати мешовитих врста, у којима аеробни и факултативни организми троше кисеоник, обезбеђују хранљиве материје или друге факторе и стварају окружење повољно за раст кластридија. Већина врста су стриктни анаероби, али постоје и аеротолерантне врсте попут *Clostridium perfringens* који може расти у атмосфери с 2 до 10% CO<sub>2</sub>. Оптималан раст патогених кластридија се јавља на 37°C.

Кластридије производе више врста протеинских токсина него било који други бактеријски род, а идентификовано је више од 25 токсина смртоносних – леталних за мишеве и укључују неуротоксине, ентеротоксине, цитотоксине, колагеназе, некротизирајуће токсине, липазе, хемолизине, протеиназе и друге од којих су неки једноставно познати као летални токсини.

До данас је у роду *Clostridium* описано преко 230 врста с валидно објављеним и тачним именима, од којих су у ветеринарској медицини најзначајније врсте *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* тип А и тип В, *Clostridium tetanii* и *Clostridium botulinum*.

## 14.2. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ

Кластридије су широко распрострањене у земљишту, слаткој води и морским седиментима широм света, мада су неке врсте или типови присутни само у локализованим географским областима.

Споре које стварају омогућавају им дуго преживљавање у неповољним условима спољашње средине. Многе од патогених кластридија су нормални становници цревног тракта животиња и људи и често изазивају ендogene инфекције. Друге кластридије су чешће присутне у земљишту и узрокују егзогене инфекције контаминацијом рана или ингестијом.

## 14.3. ОБОЉЕЊА

Кластридијалне инфекције су озбиљне инфекције због моћних токсина које производе ове бактерије. У односу на стварање токсина и ткива домаћина која токсини оштећују, разликују се четири групе патогених кластридија и то:

хистотоксичне кластридије, које изазивају локална оштећења ткива попут мишића уз могућност настанка токсемije у које спадају *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* тип А, *C. haemolyticum* и *C. novyi* типови А и В.

ентеротоксичне кластридије, изазивају инфекције гастроинтестиналног тракта с ентеротоксемијом у које спадају *C. perfringens* (типови А-Е)

неуротоксичне кластридије, оштећују неуромускулатурну функцију без видљивог оштећења ткива у које спадају *C. tetanii*, *C. botulinum* и

атипична кластридија *C. piliforme* која изазива Tizzer-ову болест код већег броја животињских врста од којих су најпријемчивији ждребад, зечеви и мали лабораторијски сисари.

*Clostridium perfringens* изазива ентерична обољења и ентеротоксемије укључујући некротични ентеритис пилића, дизентерију јагњади, хеморагични и некротични гастроентеритис код подмлатка и понекад старијих фармских животиња, мада се налази и код других врста, затим болест "кашастог бубрега" (енг. *pulpy kidney*) код преживара, тровање храном код људи и могуће паса, гасну гангрену и гангренозни маститис крава.

*Clostridium chauvoei* изазива гасну гангрену код преживара, обољење познато

као шуштавац и које се карактерише едемом и стварањем гаса у великим мишићима екстремитета и трупа.

*Clostridium septicum* изазива малигни едем (парашуштавац) код преживара и свиња који настаје инфекцијом рана, гангренозни дерматитис живине, брадсот - тешки абомазитис јагњади, као и јатрогени миозитис коња.

*Clostridium haemolyticum* такође изазива парашуштавац, као и бациларну хемоглобинурију преживара.

*Clostridium novyi* је још један од узрочника парашуштавца, поред ког изазива и некротични хепатитис оваца (typus B), као и синдром велике главе овнова (typus A).

*Clostridium tetani* узрочник је тетануса, акутног неконтагиозног обољења различитих врста животиња које се карактерише тонично-клоничним конвулзијама.

*Clostridium botulinum* изазива ботулизам, тешко обољење животиња (тип I A-E) и људи (тип I A-G) које се карактерише млиставом парализом мишића.

#### 14.4. УЗОРЦИ

Узорке треба узимати убрзо након угинућа животиње јер бактерије као што су *C. perfringens*, *C. septicum* и ентерични факултативни анаероби се *post mortem* брзо проширују ткивима. За изолацију кластридија узимају се делови захваћеног ткива (4 cm<sup>3</sup>), телесне течности попут крви и серума, фецес, али и храна, који се транспортују у лабораторију у посудама без ваздуха, када је то могуће, како се кластридије не би излагале леталном дејству атмосферског кисеоника. Ако се исечци ткива узимају за патохистологију похрањују се у формалин. Када се узимају брисеви рана морају се ставити у Cary-Blair транспортну подлогу или другу доступну транспортну подлогу. Код неких кластридијалних обољења, као што су ентеротоксемије, за дијагнозу је потребно доказивање продукције токсина. Брисеви нису погодан узорак, када се

жели доказати присуство токсина у узорку узима се садржај танког црева од леша недавно угинуле животиње и доставља у лабораторију што је пре могуће и на температури фижидера, јер су токсини лабилни.

#### 14.5. МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТ

Веgetативне форме свих патогених кластридија су правилног штапићастог облика са заобљеним, али некад и шиљатим крајевима, једини изузетак је *C. spiroforme* која је спиралног облика. У микроскопском препарату кластридије се запајају у паровима или кратким ланцима (Слика 14.1.).



Слика 14.1. Размаз културе кластридија обојен по Gram-у

Димензије бактеријске ћелије условљене су врстом и дужине су од 1,5 до 20 μm и ширине од 0,2 до 4 μm. У раним фазама раста на подлогама по Gram-у се боје позитивно, мада се неке врсте могу бојити и Gram негативно. Неколико врста попут *C. tetani* јављају се као Gram негативне када формирају спору. Спора је овалног или округлог облика и може бити положена терминално, суптерминално или централно, а и облик и положај су конзистентни унутар врсте. Терминалан положај ендоспоре *C. tetani* и њен округлао облик чине да ова врста у препарату игледа као палица за бубњеве.

Споре осталих врста од значаја у ветеринарској медицини имају суптерминалан положај. Споре *C. perfringens* ретко се запажају *in vivo* и још ређе у *in vitro* условима обзиром да не спорулише на стандарним чврстим подлогама, а јављају се и неспорулишући сојеви. Већина врста су покретне захваљујући перитрихијалним флагеллама, а срећу се и непокретне врсте од којих је најзначајнија *C. perfringens*.

*Clostridium perfringens* је штапић с тупим крајевима, дужине 1,3 – 19,0  $\mu\text{m}$  и ширине 0,6 – 2,4  $\mu\text{m}$ . У препарату се запажа појединачно или у пару, док се споре запажају ретко у препаратима култура узгојених *in vivo* и уобичајеним условима *in vitro*. У случају стварања споре она је овална и запажа се суптерминално.

*Clostridium chauvoei* је прави штапић, мада се често запажа форма лимуна. Вегетативне ћелије ове врсте у старијим културама могу бојити Gram негативно. Величине је 0,5–1,7  $\times$  1,6–9,7  $\mu\text{m}$  и јавља се појединачно или у пару. Споре су овалне, централне до суптерминалне и визуално шире ћелију.

*Clostridium septicum* је прави или закривљени штапић који се појављује појединачно или у пару, и величине је 0,6–1,9  $\times$  1,9–35,0  $\mu\text{m}$ . Ова врста је перитриха са суптерминалном, овалном спором. Вегетативна ћелија се у млађим културама по Gram-у боји позитивно док је у старијим културама бојење неједнако која се огледа у интезивно плавим тачкама прошараним обезбојеним подручјима.

*Clostridium haemolyticum* је прави штапић димензија 0,6–1,6  $\times$  1,9–17,3  $\mu\text{m}$ , који се на препарату запажа у пару ли појединачно. У веома младим културама, вегетативне ћелије по Gram-у се боје позитивно, али веома брзо постају Gram негативне. Перитрихо је обрастао флагеллама, а овална спора је положена суптерминално.

*Clostridium novyi* је прави штапић, перитрихо обрастао флагеллама, који се у препарату запажа појединачно и у пару. Димензије вегетативне ћелије *tipa A* ове

врсте су 0,6–1,4  $\times$  1,6–17  $\mu\text{m}$ , док су вегетативне ћелије *tipa B* крупније 1,1–2,5  $\times$  3,3–22,5  $\mu\text{m}$ . Спора је овалног облика и положена је суптерминално или централно.

*Clostridium tetani* је величине 0,5–1,7  $\times$  2,1–18,1  $\mu\text{m}$  и често поседују округле, терминалне ендоспоре које им дају изглед палице за бубањ или шибице. Вегетативна ћелија ове врсте поседује перитрихијалне флагеле.

*Clostridium botulinum* је прави до благо закривљени штапић димензија 0,6–1,4  $\times$  3,0–20,2  $\mu\text{m}$ . У препарату се запажа појединачно или у пару, а поседује перитрихијалне флагеле. Спора је овална и положена је суптерминално.

#### 14.6. ИЗОЛАЦИЈА

За изолацију већине патогених врста, у рутинској дијагностици користи се крвни агар. Врсте које су избирљивије, попут *C. chauvoei*, захтевају додавање екстракта јетре и глукозе крвном агару, док *C. haemolyticum* и *C. novyi* *typus B* осим наведених додатака захтевају и додаток екстракта квасца крвном агару. Већина врста су облигатни анаероби, иако толеранција на кисеоник увелико варира, па ће неке врсте, попут *C. perfringens*, расти али неће спорулисати у присуству кисеоника, при нормалном атмосферском притиску. Додатак 5 до 10%  $\text{CO}_2$  у атмосфери поспешује раст кластридија. За већину врста раст је најбржи при pH 6,5–7 и на температурама између 30 и 37° C. Од патогених врста изузетак је опет *C. perfringens*, чија је оптимална температура раста 45° C, иако ће добро расти и на температури од 37° C. Видљив раст *Clostridium* врста евидентан је након 40 до 48 часова инкубације.

Када се сумња на кластридије у ранама или узорцима апсцеса (нпр. гасна гангрена), материјал такође треба инокулисати на агар с додатком жуманца јаја. Култивација на подлогама с додатком жуманца изводи се у анаеробним условима на 37° C током 24 часа.



Течне подлоге тиогликолатни бујон и Robertson-ов кувани месни бујон, које имају смањени редокс потенцијал, погодне су за пресејавање, умножавање и чување чистих изолованих култура клостридија. Течне подлоге ипак нису погодне за примарну изолацију клострија јер ће факултативно анаеробне бактерије које су присутне у узорку прерасти клостридије, што узрокује лажно негативан резултат.

Приликом инокулације подлога треба водити рачуна да се користе или свеже припремљене подлоге или подлоге чуване у анаеробним условима, јер подлоге временом апсорбују атмосферски кисеоник чиме постају неадекватне за култивацију клостридија.

## 14.7. МОРФОЛОГИЈА КОЛОНИЈА

Клостридије уобичајено показују добар раст на крвном агару већ након једног до два дана од почетка инкубације у анаеробним условима, а колоније имају изражен полиморфизам који је условљен не само припадношћу врсти већ и сојем исте врсте.

Агар с жуманцем јаја проверава се ради доказа производње лецитиназе и/или липазе. На активност лецитиназе указује развој нерастворљивог, непрозирног, белчастог талоба унутар агара (Nagler-ова реакција). Иридесцентни сјај или изглед уља на води (бисерни слој) указује на активност липазе. Културе у дубоком агару, у случају аеротолерантних врста, одликују се бујним растом у дубини подлоге, а број колонија смањује се према површини агара, док облигатни аероби неће расти унутар 1 cm подлоге од површине агара.

На крвном агару дају различите типове хемоллизе (Слика 14.2.).

*Clostridium perfringens* формира велике, глатке и испупчене колоније правилних ивица, али могу се јавити и храпаве колоније које су равне и неправилних ивица. На крвном агару обичајено ствара



Слика 14.2. Култура *Clostridium* sp. на крвном агару

зону двоструке хемоллизе, а на подлогама с додатком жуманца запажа се лецитиназна, али не и липазна активност.

*Clostridium chavouei* на крвном агару формира крупне округле колоније пречника од 0,5 до 3 mm, окружене зоном  $\beta$  хемоллизе. Могу бити благо испупчене до издигнуте, прозирне, али и непрозирне, гранулисане, сјајне или суве с ивицама које могу бити потпуне али и неправилне. На подлогама с додатком жуманца не запажају се нити лецитиназна нити липазна активност.

*Clostridium septicum* на чврстим подлогама уобичајено се карактерише феноменом ројења, па имају изглед танког филма. Феномен ројења може се зауставити скраћеном инкубацијом или већим уделом агара у подлози. Колоније на површини крвног агара су пречника 1 до 5 mm, кружне с изразито неправилним до ризоидним ивицама, благо издигнуте, прозирне, сиве, сјајне и  $\beta$  хемолитичне. Потповршинске колоније у 1%-тном агару су лоптасте или сочивасте и провидне, а у 2%-тном агару колоније су браонкасто-жуте боје и у облику срца. На подлогама с додатком жуманца не запажају се ни активност лецитиназе ни липазе.

*Clostridium haemolyticum* на крвном агару формира колоније 1 до 3 mm у пречнику, округле, издигнуте до конвексне, прозирне, сиве, сјајне, са зрнастом или



мозаичном површином и с еродираним или благо назубљеним ивицама. Око колонија запажа се јака хемолиза. На подлогама с додатком жуманца запажа се активност лецитиназе, али не и липазе.

*Clostridium novyi* формира веома крупне колоније, пречника 1 до 5 mm, издигнуте и округлог облика. Колоније старијих култура постају равније и неправилног облика, са кристалном или мозаичном унутрашњом структуром и заобљеном, ундулентном, лобуларном или ризоидном ивицом. Колоније ове врсте имају тенденцију да се стапају и шире, а на крвном агару стварају зону дупле хемолизе. *Tip A* ствара и лецитиназу и липазу, док се код *tipa B* уочава само лецитиназна активност, јер липаза коју продукује не доводи до реакције на подлогама с додатком жуманца.

Колоније *Clostridium tetanii* на површини крвног агара су промера 4-6 mm, пљоснате, прозирне, сиве, мат површине, неправилних и ризоидних ивица, а обично стварају уску зону  $\beta$  хемолизе. Имају тенденција ројења која је израженија на влажним подлогама. Колоније у агару су прозирне и врло вунасте. На подлогама с додатком жуманца не запажају се ни активност лецитиназе ни липазе.

*Clostridium botulinum* формира крупне колоније пречника око 3 mm, округлог до неправилног облика. Ивице су фибриларне и могу да се шире, боја сивкаста, глатке су и прозирне. На крвном агару, код већине сојева, запажа се зона  $\beta$  хемолизе, док је на подлогама с додатком јаја евидентна активност липазе.

## 14.8. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Традиционални методи за фенотипску карактеризацију и идентификацију клостридија осим морфологије бактеријских ћелија и бактеријских колонија подразумевају одређивање ферментацијских профила и других биохемијских карактеристика попут способности хидролизе желатина, стварања лецитиназе и липазе, дигестије казеина и стварања индола (табела 9.1.).

Осим наведених метода идентификације раде се и други тестови као што су доказивање токсина имуноензимским тестовима или биолошким огледом на младим заморцима или мишевима, молекуларни методи и масена спектрометрија (MALDI-TOF MS).

Табела 14.1. Фенотипске карактеристике најзначајнијих *Clostridium* врста

Врста	Лецитина	Липаза	Хидролиза желатина	Дигестија казеина	Индол	Ферм. глукозе	Ферм. лактозе
<i>C. perfringens</i>	+	-	+	+	-	+	+
<i>C. chavouei</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>C. septicum</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. haemolyticum</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. novyi</i>	+	v	+	v	v	+	-
<i>C. tetani</i>	-	-	+	-	v	-	-
<i>C. botulinum</i>	-	+	+	v	v	v	-

# Литература

1. Ahern H. 2018. Microbiology: A Laboratory Experience: State University of New York Oer Services.
2. Athumani Msalale L. 2017. Isolation and Characterization of Escherichia coli from Animals, Humans, and Environment. In: Escherichia coli, (Amidou S, ed.) IntechOpen, Rijeka, Ch. 10.
3. Basavaraju M, and Gunashree BS. 2022. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. In: Escherichia coli, (Marjanca Starčić E, ed.) IntechOpen, Rijeka, Ch. 1.
4. Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, and Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. Infection and immunity 66, 4579-4587.
5. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, and Khelaiifia S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New microbes and new infections 34, 100622.
6. Bruslind L. 2020. General Microbiology: Oregon State University.
7. Cappuccino JG, and Welsh CT. 2016. Microbiology: A Laboratory Manual: Pearson Education.
8. Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, and Warnock DW. 2019. Manual of Clinical Microbiology: Wiley.
9. Chen X, Zheng B, and Liu H. 2011. Optical and digital microscopic imaging techniques and applications in pathology. Analytical cellular pathology (Amsterdam) 34, 5-18.
10. Darby A, Lertpiriyapong K, Sarkar U, Seneviratne U, Park DS, Gamazon ER, Batchelder C, Cheung C, Buckley EM, Taylor NS et al. . 2014. Cytotoxic and pathogenic properties of Klebsiella oxytoca isolated from laboratory animals. PloS one 9, e100542.
11. Donnenberg MS. 2015. 220 - Enterobacteriaceae. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition), (Bennett JE, Dolin R, and Blaser MJ, eds.) W.B. Saunders, Philadelphia, 2503-2517.e2505.
12. El-Hajj ZW, and Newman EB. 2015. How much territory can a single E. coli cell control? Frontiers in microbiology 6: 309.
13. Farmer III JJ, Farmer MK, and Holmes B. The Enterobacteriaceae: General Characteristics. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.
14. Goodfellow M. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria: Springer. 2131 p.
15. Haag AF, Fitzgerald JR, and Penadés JR. 2019. Staphylococcus aureus in Animals. Microbiology spectrum 7.
16. Habrun B. 2014. Klinička vterinarska bakteriologija. Zagreb, Hrvatska: Medicinska naklada Zagreb. 354 p.
17. Health TWOfA. 2022. Salmonellosis. In: WOA H Terrestrial Manual, 1-19.
18. Hossain Z. 2014. Bacteria: Streptococcus. In: Encyclopedia of Food Safety, (Motarjemi Y, ed.) Academic Press, Waltham, 535-545.
19. Janda JM, and Abbott SL. 2021. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: Enterobacterales): New Members, Taxonomic Issues,

Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical microbiology reviews* 34, 10.1128/cmr.00174-00120.

20. Kumar S. 2012. *Textbook of Microbiology*. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited.
21. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, and Raoult D. 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 28, 208-236.
22. Lalošević V, Jarak M, Vidić B, Pašalić Š, Mihajlović Ukropina M, Jelisić Z, Kulauzov M, and Boboš S. 2011. *Mikrobiologija za studente vetrinarske medicine*. Novi Sad, Srbija: Mala Knjiga. 272 p.
23. Leber AL. 2020. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*: Wiley.
24. Leboffe MJ, and Pierce BE. 2019. *Microbiology: Laboratory Theory and Application, Essentials*: Morton Publishing Company.
25. Malone KM, and Gordon SV. 2017. *Mycobacterium tuberculosis Complex Members Adapted to Wild and Domestic Animals*. In: *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*, (Gagneux S, ed.) Springer International Publishing, Cham, 135-154.
26. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, and Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology, Second Edition*: Elsevier Health Sciences. 901 p.
27. Marques P. 2021. *Veterinary Bacteriology*. Burlington, Canada: Delve Publishing.
28. Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, and Torres-Jiménez A. 2019. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *Journal of infection in developing countries* 13, 265-273.
29. Moxley RA. 2022. Enterobacteriaceae. In: *Veterinary Microbiology*, 56-74.
30. Otter A, and Uzal FA. 2020a. Clostridial diseases in farm animals: 1. Enterotoxaemias and other alimentary tract infections. In *Practice* 42, 219-232.
31. Otter A, and Uzal FA. 2020b. Clostridial diseases in farm animals: 2. Histotoxic and neurotoxic diseases. In *Practice* 42, 279-288.
32. Palmer MV, Welsh MD, and Hostetter JM. 2011. Mycobacterial diseases of animals. *Veterinary medicine international* 2011, 292469.
33. Parish T, and Kumar A. 2022. *Mycobacteria Protocols*: Springer US.
34. Payeur JB. 2014. Mycobacterium. In: *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, (Batt CA, and Tortorello ML, eds.) Academic Press, Oxford, 841-853.
35. Percival SL, and Williams DW. 2014. Chapter Nine - Mycobacterium. In: *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, (Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, and Gray NF, eds.) Academic Press, London, 177-207.
36. Pickard J. 2023. *Bacterial and fungal diseases of animals*: James Cook University.
37. Samanta I, and Bandyopadhyay S. 2020. Chapter 17 - Streptococcus. In: *Antimicrobial Resistance in Agriculture*, (Samanta I, and Bandyopadhyay S, eds.) Academic Press, 217-232.
38. Sanders ER. 2012. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3064.
39. Savini V. 2018. *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*: Elsevier Science.
40. Saviola B, and Bishai W. 2006. The Genus Mycobacterium--Medical. In: *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, and Stackebrandt E, eds.) Springer New York, New York, NY, 919-933.
41. Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, Arts JJC, and Habibovic P. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models.

European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 37, 187-208.

42. Scott McVey D, Keneddy M, and Chengappa MM. 2013. Veterinary Microbiology, 3rd Edition. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc. 629 p.
43. Scott McVey D, Keneddy M, Chengappa MM, and R. W. 2022. Veterinary Microbiology, Fourth Edition. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc.
44. Serpil Kahya D. 2017. Salmonellosis in Animals. In: Salmonella, (Maria Teresa M, ed.) IntechOpen, Rijeka, Ch. 2.
45. Smith M, and Selby S. 2016. Microbiology for Allied Health Students. Houston, Texas: OpenStax Rice University. 1266 p.
46. Starčić Erjavec M. 2023. Escherichia coli. Rijeka: IntechOpen.
47. Sy AM, Sandhu J, and Lenox T. 2013. Salmonella enterica Serotype Choleraesuis Infection of the Knee and Femur in a Nonbacteremic Diabetic Patient. Case Reports in Infectious Diseases 2013, 506157.
48. Trivedi PC, Pandey S, and Bhadauria S. 2010. Textbook of Microbiology. Jaipur, India: Aavishkar Publishers, Distributors.
49. Velazquez-Guadarrama N, Olivares-Cervantes AL, Salinas E, Martinez L, Escorcía M, Oropeza R, and Rosas I. 2017. Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. Revista Argentina de microbiología 49, 15-23.
50. Wallace E, Hendrickson D, Tolli N, Mehaffy C, Peña M, Nick JA, Knabenbaur P, Watkins J, Simpson A, Amin AG et al. . 2021. Culturing Mycobacteria. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) 2314, 1-58.
51. WHO. 2008. Annex 1. Laboratory procedures for diagnosis of anthrax, and isolation and identification of Bacillus anthracis. In: Anthrax in Humans and Animals, 4th Ed. World Health Organization, Geneva.
52. Wiegand I, Hilpert K, and Hancock REW. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3, 163-175.
53. Yu D, Banting G, and Neumann NF. 2021. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus Escherichia and the type species Escherichia coli. Canadian Journal of Microbiology 67, 553-571.
54. Zasada AA. 2020. Detection and Identification of Bacillus anthracis: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. Microorganisms 8, 125.

## Извод из рецензије

*„.....Посебна лепота овог рукописа је брижљиво одабран дизајн односно естетски доживљај током читања, а велико богатство су оригиналне фотографије...*

*.....„МИКРОБИОЛОГИЈА – бактериологија - ПРАКТИКУМ“ представља драгоцену прилогу нашој науци и пракси, а наравно и практичној обуци студената за рад у микробиолошкој лабораторији, што је циљ савременог образовања. По садржини и форми, овај рукопис показује изузетну преданост и завидан ниво искуства и у писању и у микробиолошкој техници, младог аутора, доц. др Вука Врачара.....“*

Нови Сад,  
19.10.2023. године

Рецензент  
др Весна Лалошевић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Нови Сад

*„.....У опћем дијелу аутор уводи читатеља у основна начела рада у микробиолошкој лабораторији, основни прибор и опрему као и технике узгоја, изолације бактерија у лабораторијским условима. Након сваке цјелине у дијелу Практични рад студент имају прилику проверити стечено знање што има даје могућност савладavanja вјештина те стичања компетенција првог дана.*

*У специјалном дијелу аутор користи најновију литературу како би обрадио тренутну таксонску класификацију горе наведених бактерија, описао културалне, морфолошке и бојилне карактеристике најважнијих бактерија те могућности њихове идентификације у различитим узорцима.*

*Уз све наведено аутор користи велики број vlastitih фотографија, цртежа, дијаграма уз детаљан опис методе узгоја, добивања чистих култура, микроскопски преглед нативних и обојених препаратата које ће студентима у великој мјери помоћи у разумјевању поступака приликом идентификације у микробиолошкој лабораторији.*

*Дјело „МИКРОБИОЛОГИЈА-БАКТЕРИОЛОГИЈА“ је базирано на искуственом знању аутора и сматрам да рукопис садржajно и методички одговара предмету за који је намењен што га чини вриједним доприносом научној заједници.....“*

Сарајево,  
10.10.2023. године

Рецензент  
др Лејла Велић, редовни професор  
Ветеринарски факултет, Сарајево