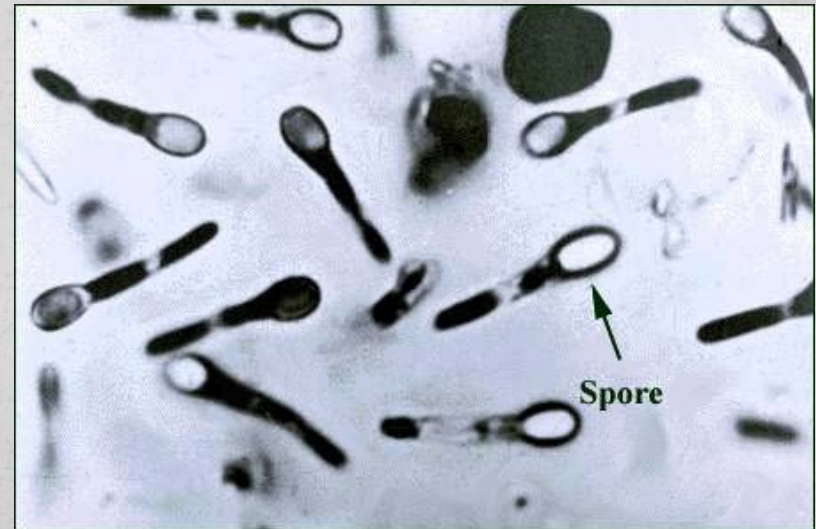


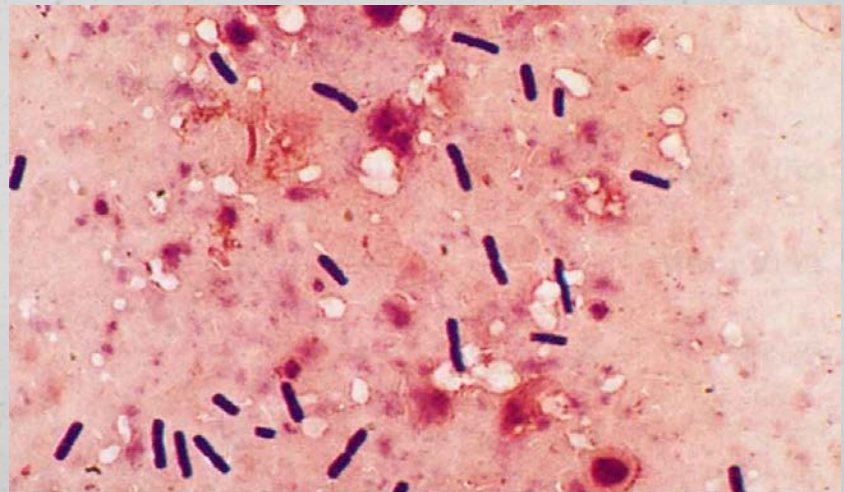
Clostridium spp

- Rod obuhvata preko 100 vrsta sporogenih anaerobnih Gram pozitivnih bakterija štapićastog oblika
- **Patogene vrste –manje od 20 vrsta** u zavisnosti od toksina koje proizvode, invazivnosti i načina infekcije podeljene u četiri grupe



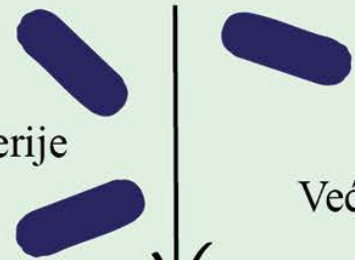
***Clostridium* spp.**

1. Neurotoksične *Clostridium* spp.
2. Histotoksične *Clostridium* spp.
3. Enteropatogene i enterotoksemične *Clostridium* spp.
4. *Clostridium* spp. uzročnici oboljenja koje indukuje primena antibiotika



Clostridium spp.

Krupni Gram-pozitivni štapići
Stvaraju spore veće od prečnika bakterije
Veći broj vrsta sastavni deo mikrobioma GIT životinja
Prisutne u zemljištu



Anaerobne bakterije
Katalaza i oksidaza negativne
Većina je pokretna (izuzetak *C. perfringens*)
Izolacija na obogaćenim podlogama
Opisano preko 200 vrsta, oko 20 su patogene

Patogene vrste proizvode **egzotoksine**
4 grupe patogenih *Clostridium* spp.

Neurotoksične *Clostridium* vrste

- C. tetani*
- C. botulinum*
- C. argentiense*



Histotoksične *Clostridium* vrste

- C. chauvoei*
- C. septicum*
- C. novyi*
- C. perfringens* tip A
- C. sordelli*
- C. haemolyticum*



Enteropatogene *Clostridium* vrste

- C. perfringens* tip A-E



Enteropatogene *Clostridium* spp.
(infekcije indukovane primenom antibiotika)

- C. difficile*
- C. spiroforme*

Neurotoksične *Clostridium* vrste

neinvazivne i stvaraju neurotoksine

- *C. tetani* – tetanus- **konji**, preživari, druge životinje i **ljudi**
- *C. botulinum* tip **A-F** – botulizam - veliki broj vrsta životinja i ljudi
- *C. argentinense* – ranije *C. botulinum* tip G- ljudi

Histotoksične Clostridium vrste

invazivne i dovode do opsežne destrukcije tkiva

- *C. chauvoei* - goveda, ovce ređe svinje
šuštavac – gangrena emphysematosa
blackleg (black quarter)
- miozitis kod konja
- *C. septicum* - goveda, ovce i svinje- **maligni edem**
parašuštavac – septicaemia gangrenosa
- ovce – **braxy-bradsot** - abomazitis
- kokoške – nekrotični dermatitis

- *C. novyi*

- **tip A** – ovce – **bolest velike glave ovnova**

- goveda i ovce- **gasna gangrena**

- **tip B** – ovce ređe goveda

- crna bolest- **nekrotični hepatitis**

- **tip C** – vodeni bufalo – **osteomyelitis**

- *C. haemolyticum* (*C. novyi* tip D)- goveda ređe ovce
bacilarna hemoglobinurija

- *C. sordellii* – goveda, ovce i konji – **gasna gangrena**

- *C. colinum* – ptice, pilići i živina-ulcerativni enteritis

- *C. piliforme* – **Tyzzler-ova bolest** – kunići, zamorci,
laboratorijske životinje, fatalna bolest ždrebadi

Enteropatogene i enterotoksemične *Clostridium* vrste

stvaranje toksina u crevima koji nakon resorpcije mogu dovesti do generalizovane toksemije

- *C. perfringens*

-tip A – ljudi- trovanje hranom

gasna gangrena

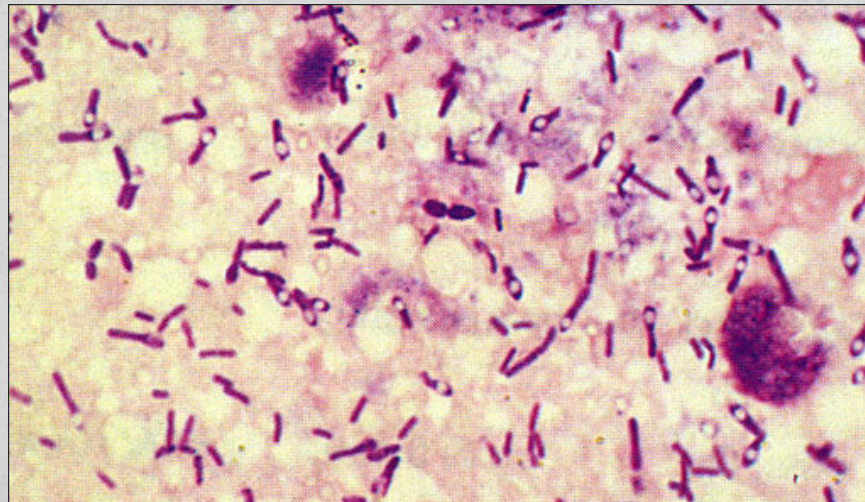
gangrenozni mastitis krava

nekrotični gastroenteritis više vrsta

nekrotični enteritis ptice

- tip B – dizenterija jagnjadi

- **tip C** - neonatalni hemoragični i nekrotizujući enteritisi - prasad, jagnjad, telad i ždrebad
 - ovce- **stuck** - iznenadna smrt
- **tip D** – enterotoksemija ovce ređe telad
 - enterotoksemija i enterocolitis koze
- **tip E** - hemoragični gastroenteritis goveda



***Clostridium* spp. uzročnici oboljenja koje indukuje primena antibiotika**

- ***C. spiroforme*** - kunići i zamorci - **enteritis** praćen prolivom

- ***C. difficile*** – ljudi, kunići, zamorci- **antibioticima indukovani enterocolitis** – od 2016. godine

Clostridioides difficile

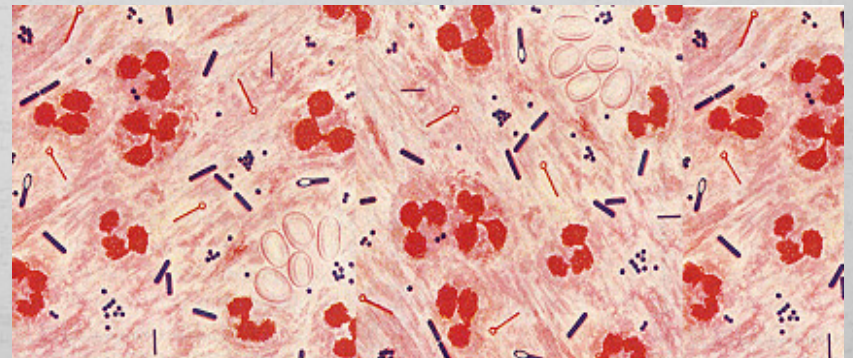
- psi, ždrebadi, svinje, laboratorijske životinje-
“spontani” prolivi

Materijal koji se šalje na bakteriološki pregled

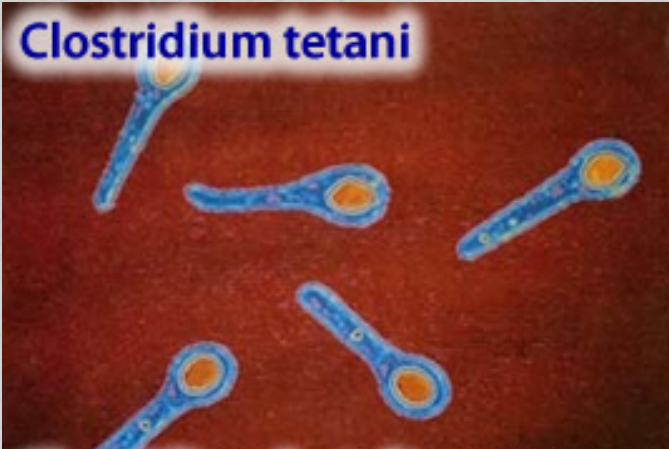
- **uzorkovanje neposredno posle uginuća**
- tkivo dimenzija 4 cm
- **transportna podloge za anaerobne mikroorganizme**
modifikovana Cary-Blair podloga sa rezazurinom, CaCl i cisteinom
- **suspektna enterotoksemija – dokazivanje toksina-**
podvezana creva

Mikroskopske karakteristike

- **Gram pozitivne bakterije** štapićastog oblika različitih dimenzija 0,5-1 x 4-6 μm
- Spore kod većine vrsta većeg dijametra od širine bakterijske ćelije
- Spore postavljene centralno, subterminalno ili terminalno
- Većina vrsta pokretna



Clostridium tetani



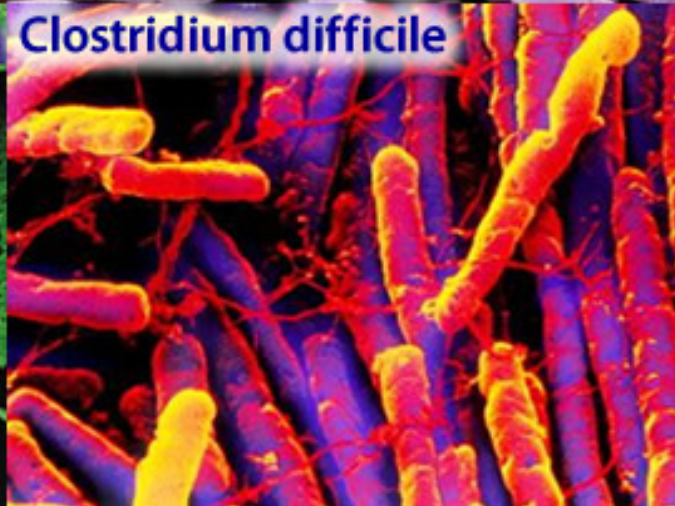
Clostridium perfringens



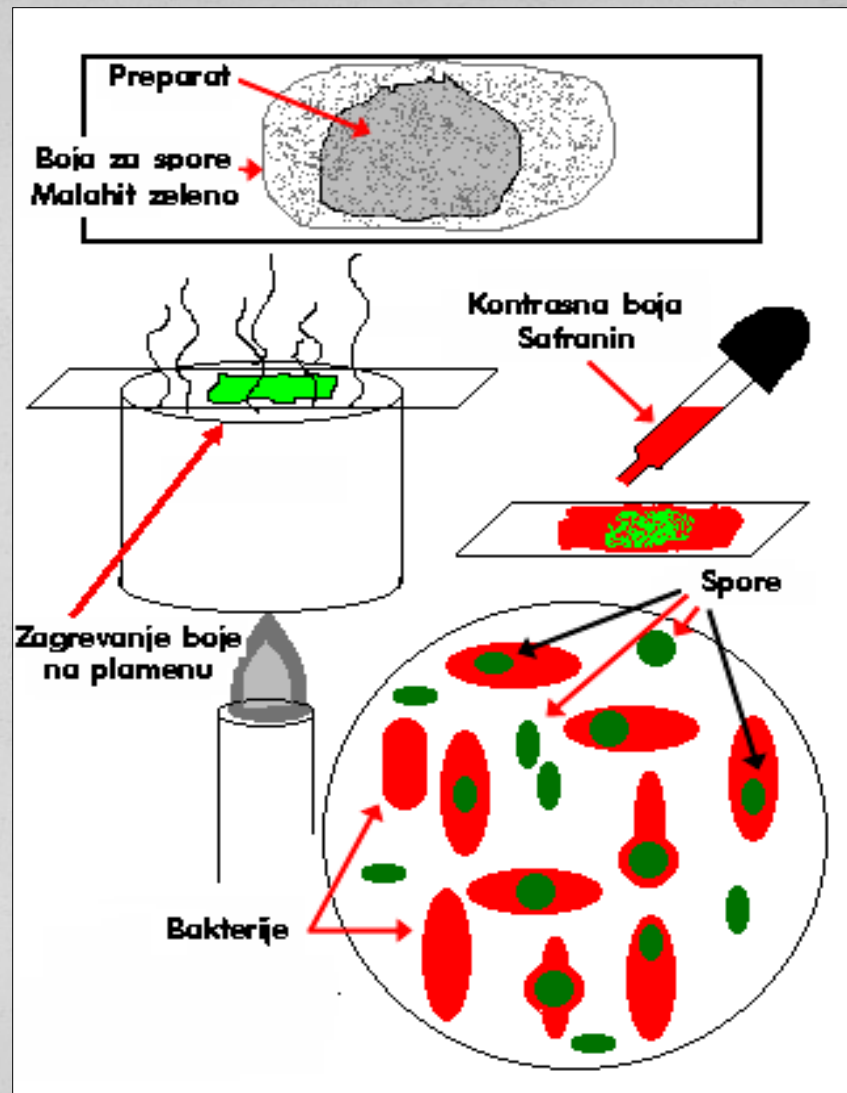
Clostridium botulinum



Clostridium difficile



Bojenje po Wirtz-u ili Schaeffer Fulton-u



- Morfološki veoma slični, izuzetak *C. spiroforme* u vidu zareza ili spirale, *C. tetani* izgleda poput palice za doboš

- *C. tetani* prav, dugačak štapić dimenzija 0,4-0,6 x 2-5 μm , sferična spora terminalno postavljena veća od širine bakterijske ćelije – preživljava 4 sata kuvanje ili sterilizaciju u autoklavu 12 minuta na temperaturi od 121°C

- Sličnog izgleda saprofitske vrste

C. tetanomorphum

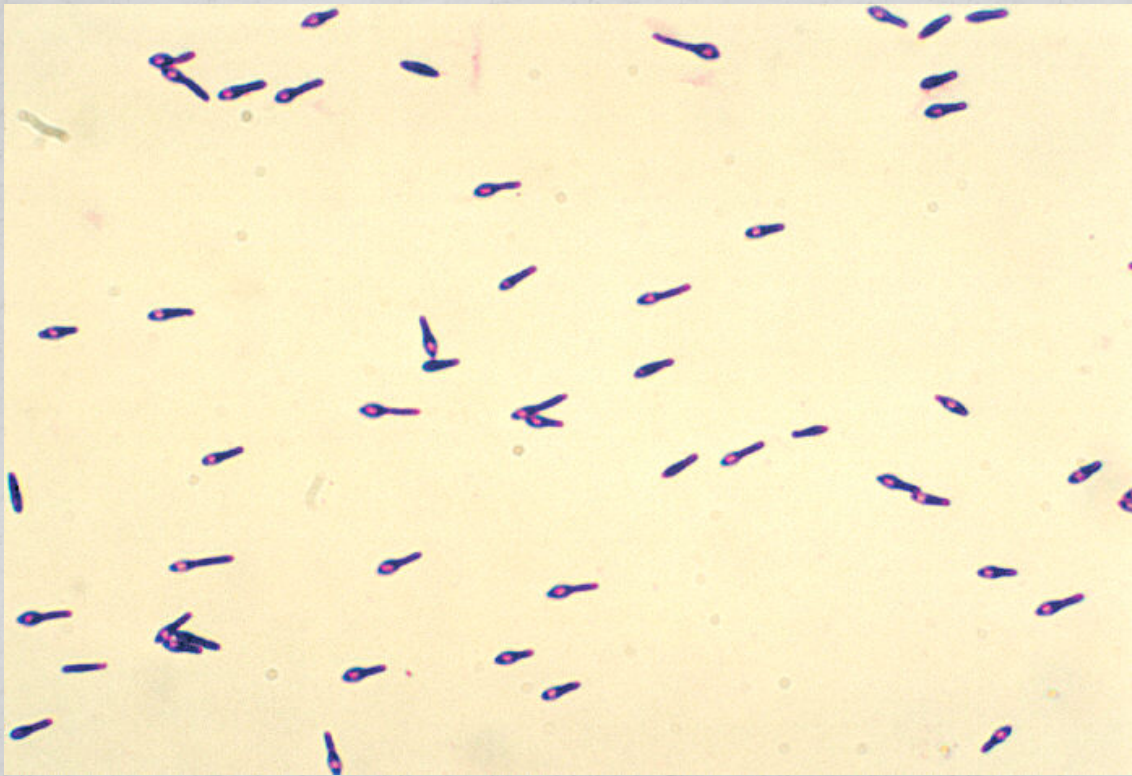
C. tetanoides

C. tetani



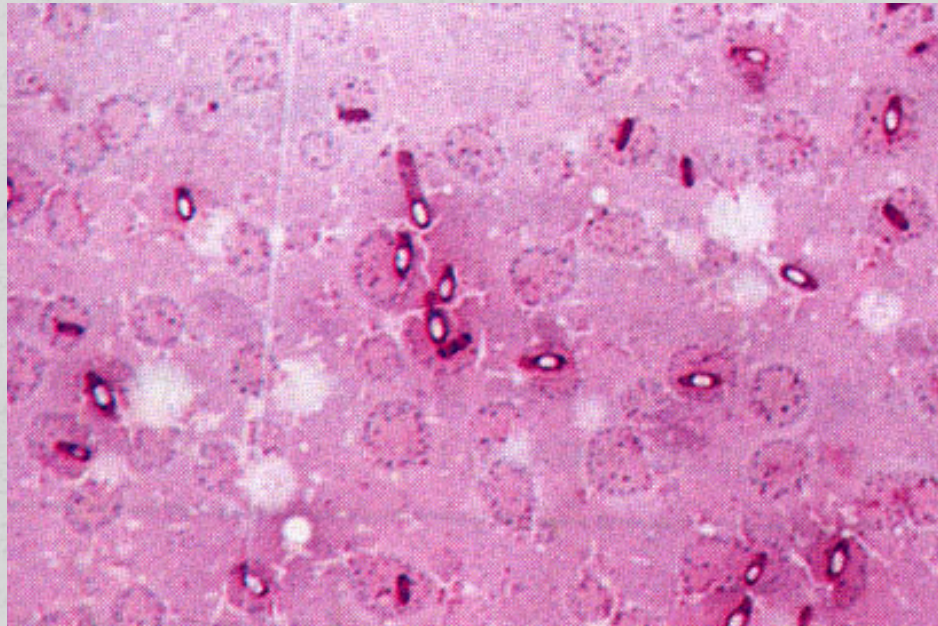
C. botulinum

- zdepastijeg oblika nego *C.tetani* 0,9-1,2 x 4-6 μm
- ovalna spora subterminalno postavljena



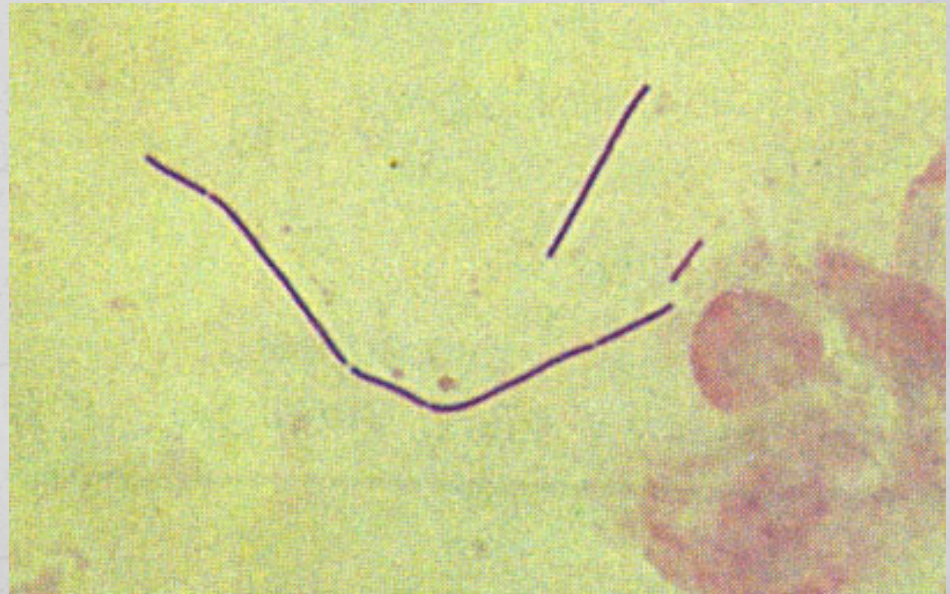
C. chauvoei

- 0,6-0,8 x 3-8 μm , velike spore centralno ili subterminalno postavljene **izgleda poput limuna**



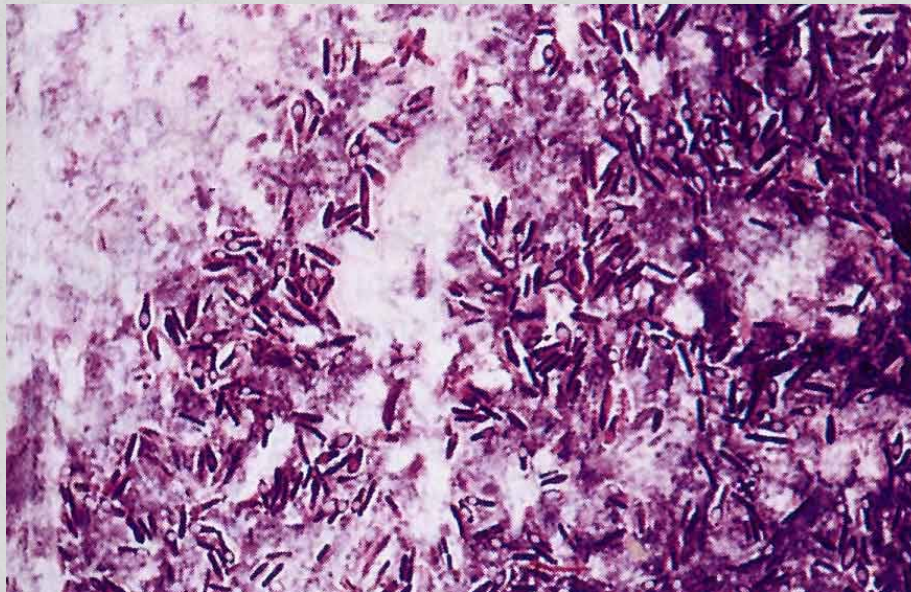
C. septicum

- sličnih dimenzija kao *C. chauvoei*, spore ovalne i subterminalno postavljane
- na preparatu iz materijala *C. septicum* dugački filamentozni oblik



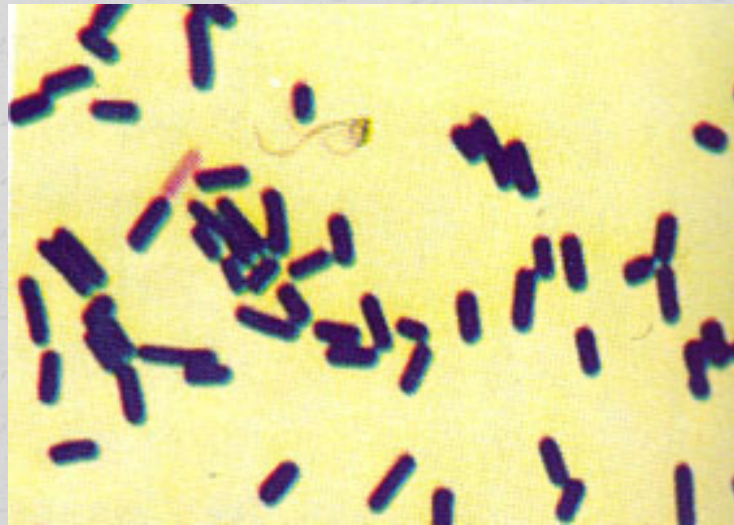
C. novyi

- 0,8-1 x 3-10 μm , ovalne ili cilindrične spore subterminalno postavljene
- *C. novyi* i *C. sordellii* spore manje od širine bakterijske ćelije



C. perfringens

- kratak zdepast štapić 0,6-0,8 x 2-4 μm , ne stvara često spore, a kada ih stvori ovalnog su oblika, subterminalno postavljene i deformišu sporangiju, stvara kapsulu, nepokretan



C. perfringens

- na preparatu iz materijala može se uočiti i u vidu lanaca



Imunofluorescencija

primena specifičnih antitela konjugovanih sa fluorohromima

C. chauvoei – crvene boje, *C. septicum* - zelene



Kulturelne karakteristike

Striktni anaerobni mikroorganizmi

izuzev *C. perfringens* koji je relativno aerotolerantan

- Metode obezbeđivanja anaerobnih uslova bez O_2 i sa 2-10% CO_2
- 1. Anaerobni lonci- zamena sastava gasa ili utrošak O_2 hemijskim reakcijama
- 2. Specijalne bočice sa preredukovanom anaerobnom sterilnom podlogom na primer BACTEC™ Plus Anaerobic/F Medium
- 3. Anaerobne komore ili anaerobne kese

McIntosh i Fildes anaerobni lonci



BD BACTEC™ FX40

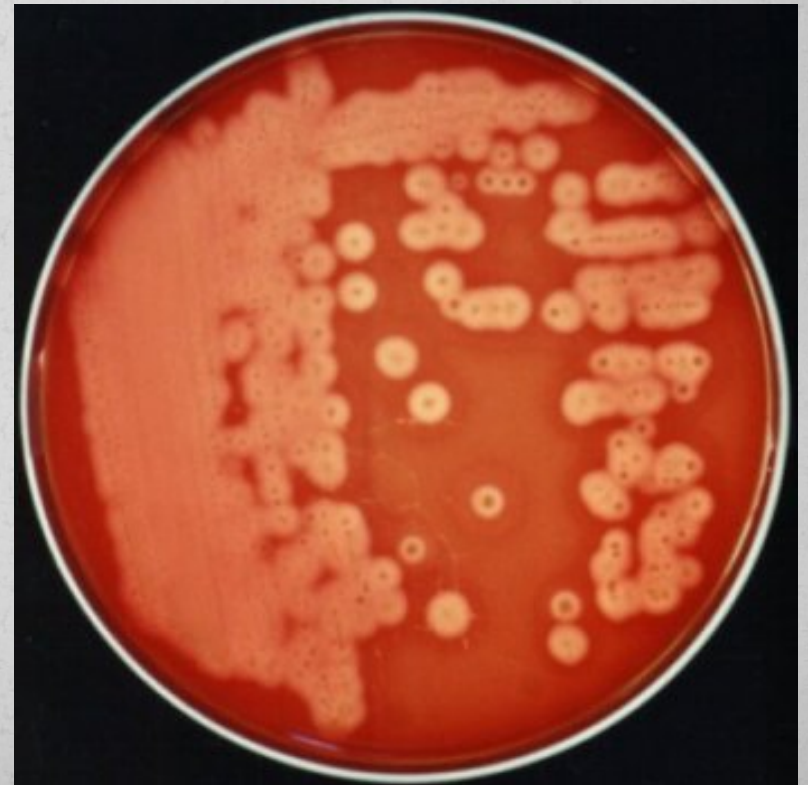
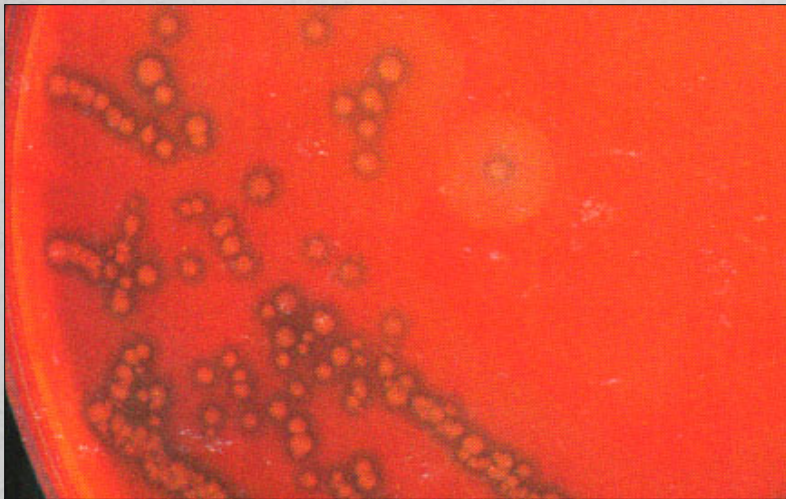


- Izolacija- specijalne podloge za anaerobe

- sveže pripravljene ili prereducovane
- inkubacija podloga– 5-6 dana na temperaturi od 37 °C
- obogaćene podloge- hemin, vitamin K, ekstrakt kvasca
- tečne konzistencije – bujon sa komadićima mesa ili jetre sa 0,4% glukoze, tioglikolatni bujon

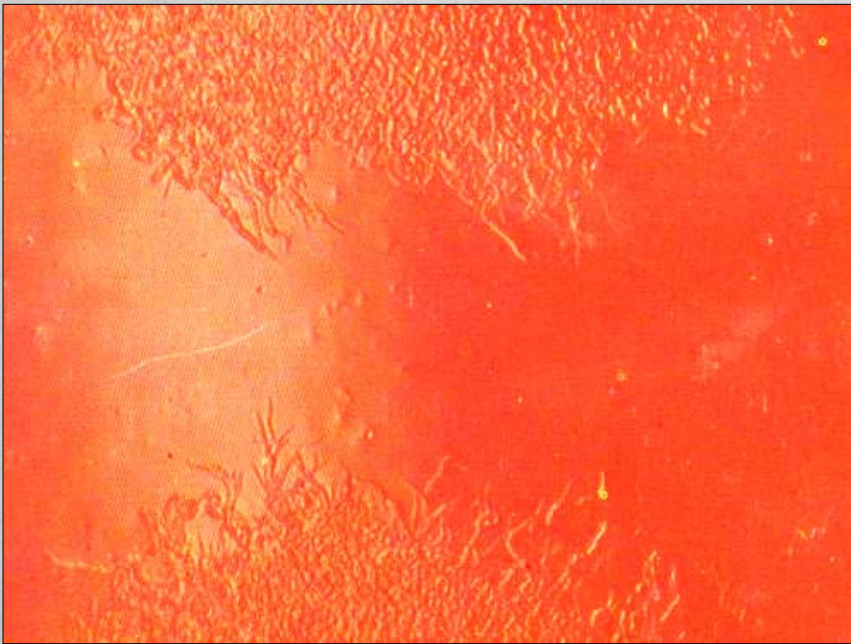
- čvrste konzistencije- obogaćeni krvni agar - **Eugon agar, Columbia agar , Trypticase soy agar, Schaedler agar i brain-heart infusion agar**

- Hemoliza- kod većine vrsta



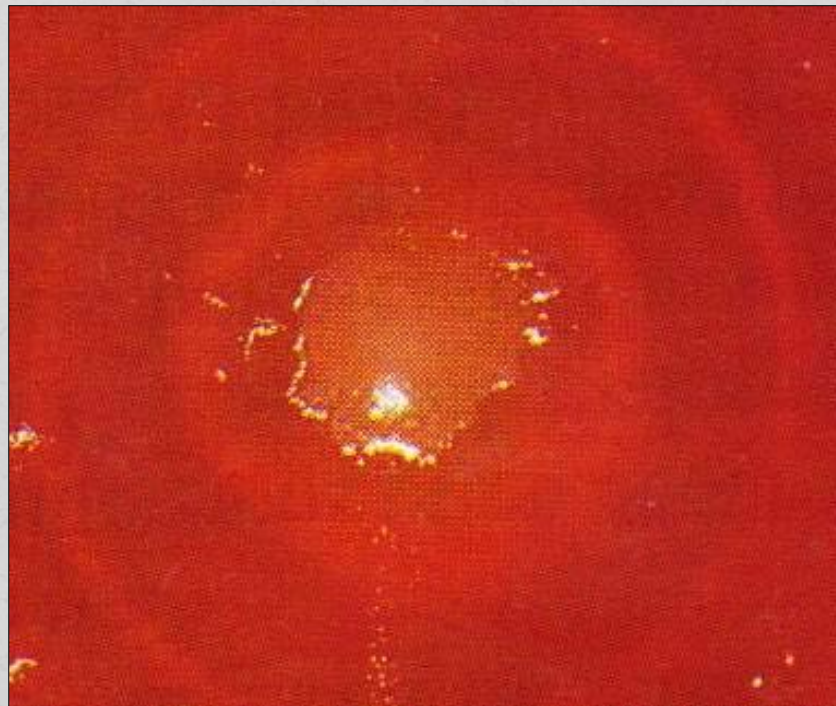
C. tetani

- Kolonije na krvnom agaru hemolitične i imaju sposobnost prerastanja
- Stiff podloga 3% umesto 2% kolonije rizoidnog oblika



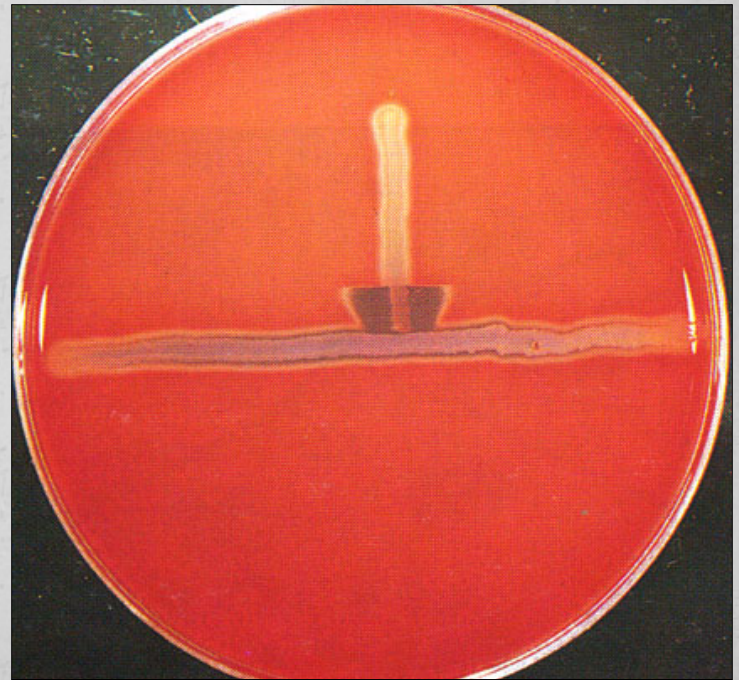
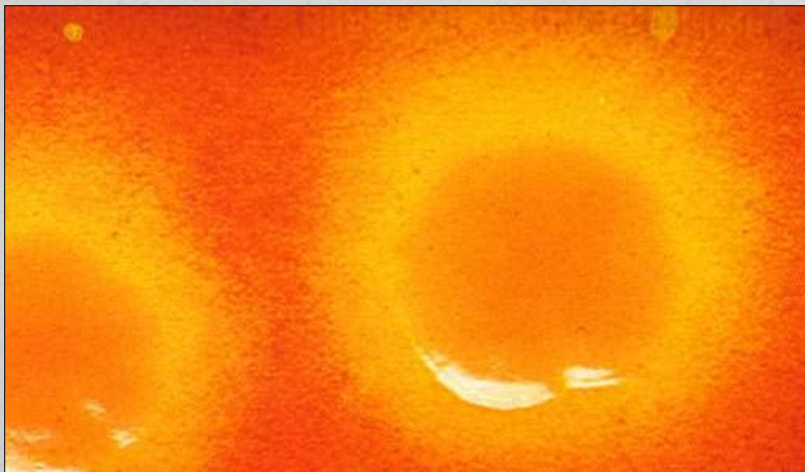
C. botulinum

- kolonije okružene hemolizom, variraju u izgledu, mogu biti blago ispupčene, narezuckanog ruba ili grube sa nepravilnom ivicom



- *C. chauvoei* – široka zona hemolize
- *C. septicum* – hemolitične sa prerastanjem podloge, neki sojevi imaju i glatke kolonije okruglog oblika
- *C. novyi* – nepravilne, rizoidne ivice, široka zona hemolize
- *C. sordellii* - nepravilne providne kolonije koje vremenom postaju beličaste boje

- *C. perfringens* - glatke, sjajne i okrugle
 - dvostruka hemoliza τ toksin potpuna hemoliza, α toksin nepotpuna hemoliza
 - Potpuna hemoliza α toksin + CAMP faktor
- Streptococcus* spp B grupe**

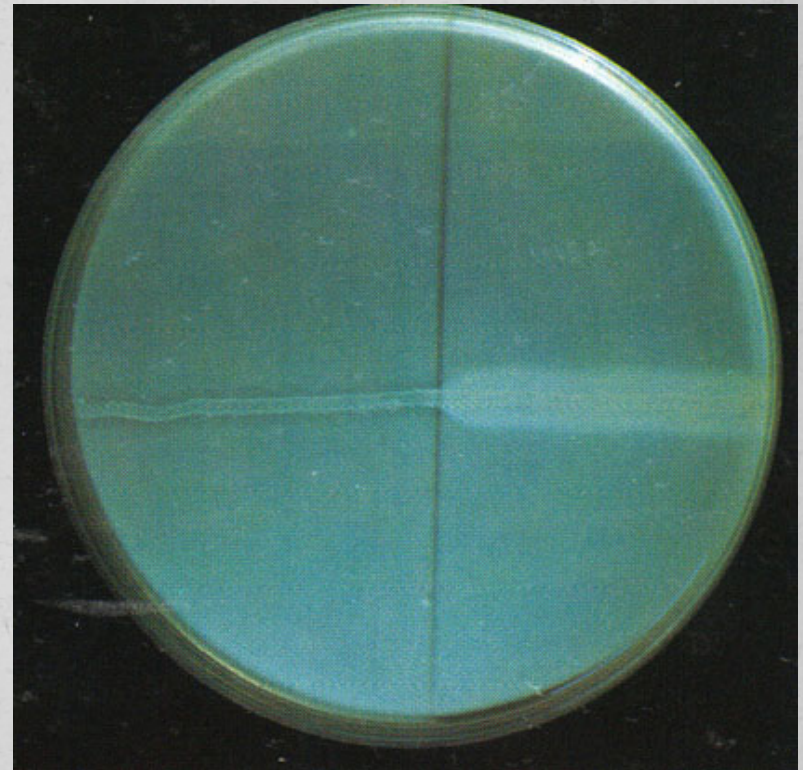


Biohemijske karakteristike

katalaza i oksidaza negativne

Nagler-ova reakcija

stvaranje lecitinaze i
lipaze na agaru sa
žumancetom



- hidroliza želatina, sposobnost razgradnje triptofana, fermentacija ugljenih hidrata...
- sposobnost razlaganja laktoze
- koagulisanje kazeina u podlozi sa mlekom
- komercijalni kitovi BBL Crystal Api ATB 32A
- ELISA, imunofluorescencija
- PCR



bioMerieux VITEK 2 - brza identifikacija



VITEK 2™

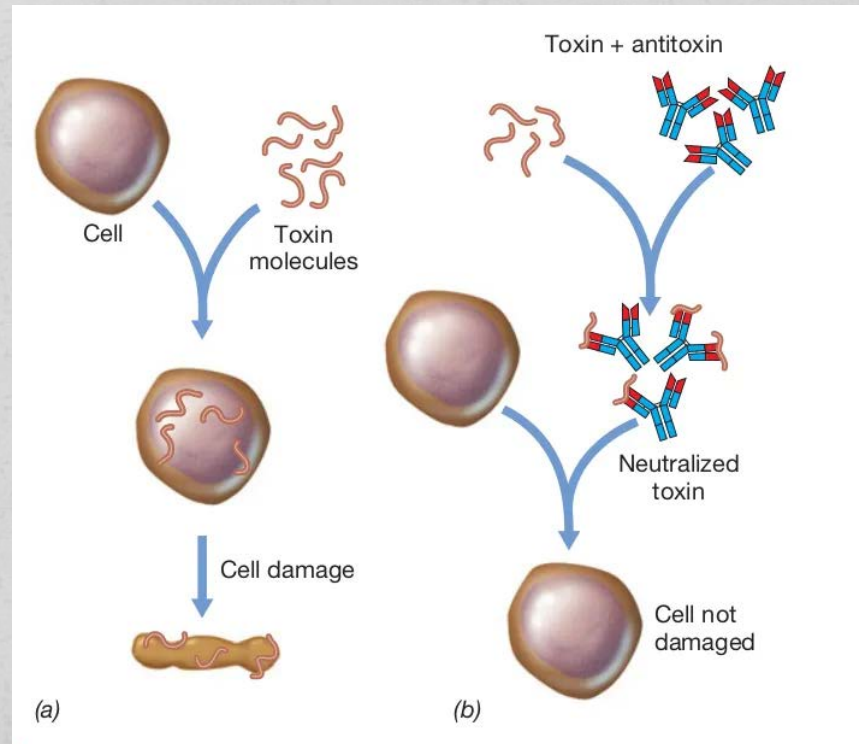


Biološki ogled

- Zamorci – inokulacija ispitivanog materijala ili kulture izolovanog soja
- Kontaminirani uzorci obrada sa 5% CaCl_2
- **Identifikacija toksina – neutralizacioni ili zaštitni testovi**
- Primena specifičnih antitela protiv određenih toksina *Clostridium* spp.

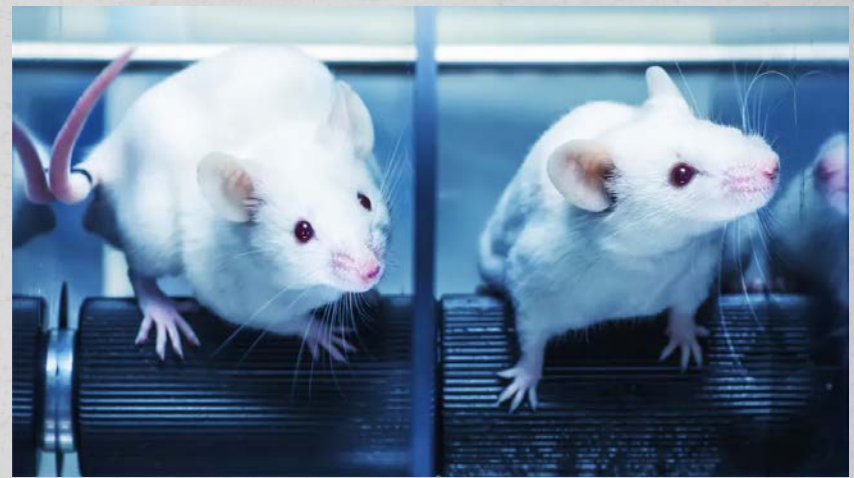
Identifikacija toksina – neutralizacioni ili zaštitni testovi

- Primena specifičnih antitela protiv određenih toksina *Clostridium* spp.

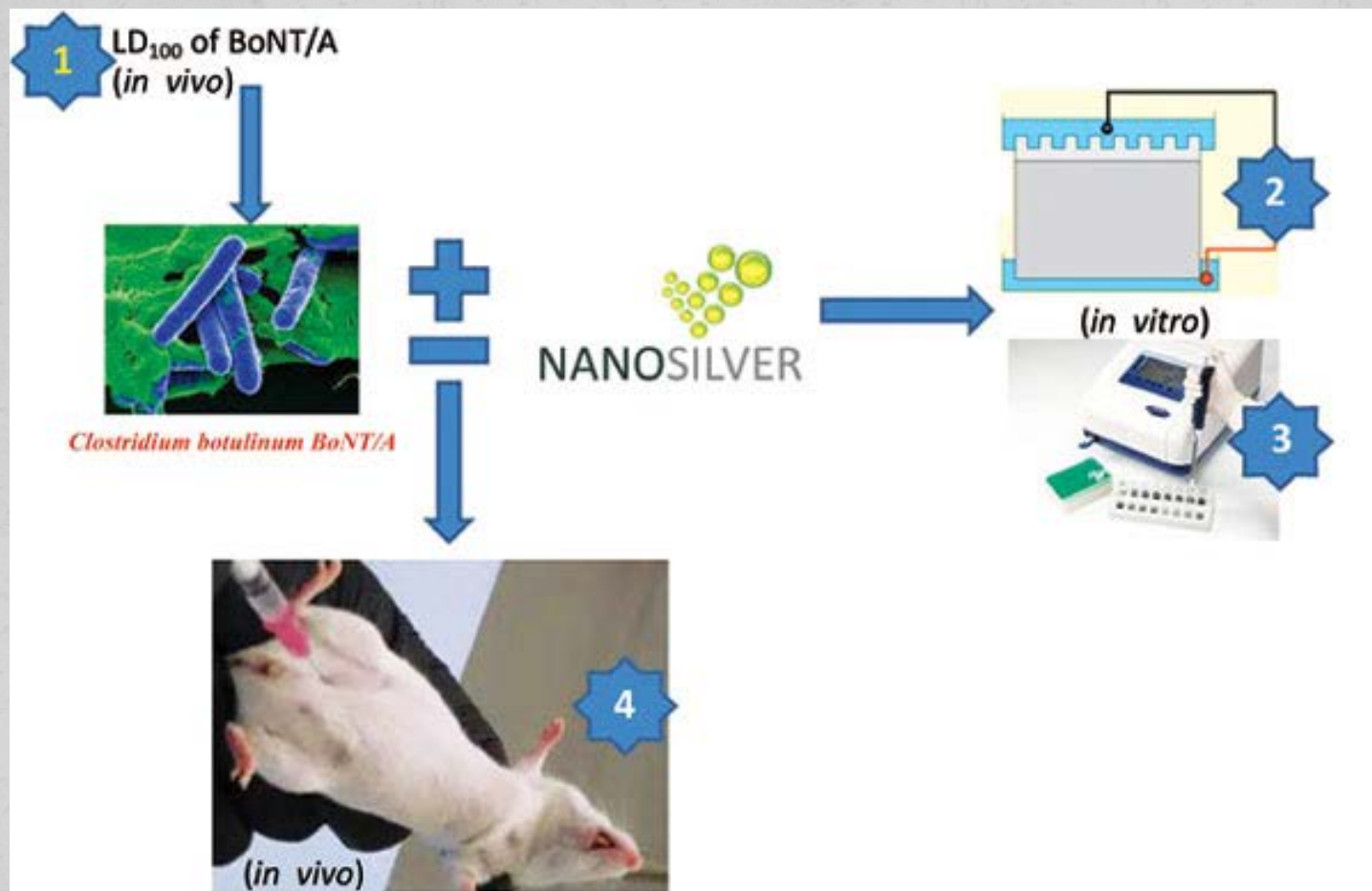


Identifikacija toksina – neutralizacioni ili zaštitni testovi

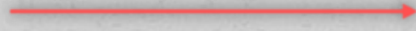
- Primena specifičnih antitela protiv određenih toksina *Clostridium* spp.



Identifikacija toksina – neutralizacioni ili zaštitni testovi



Tetanus



Botulizam



Patogeneza, klinička slika, postavljanje dijagnoze, prevencija i terapija

- saprofitski mikroorganizmi rasprostranjeni u prirodnozemljište, sediment vode
- digestivni trakt životinja, sekvestirane spore u mišićima i jetri



- Dijagnoza- dokazivanje toksina u serumu obolele životinje
- ELISA, biološki ogled, test neutralizacije toksina

Terapija i preventiva

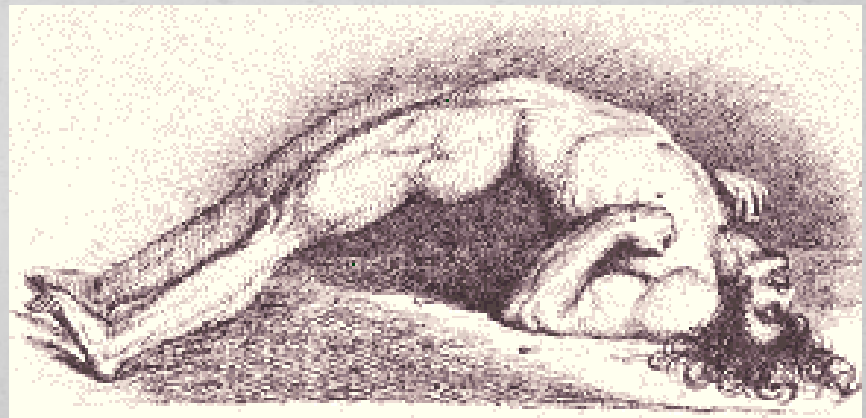
- **vakcinacija**
- polivalentni antiserumi
- anatoksin – hemijski ili toplotom inaktivisan toksin
- tetraetilamid i guanidin hidrohlorid – pospešuju oslobađanje neurotransmitera - botulizam
- obrada rane
- primena antibiotika

Tetanus – nekontagiozna bolest, teško oboljenje koje često završava fatalno

- *Clostridium tetani* nije invazivan mikroorganizam
- infekcija – trauma duboke ubodne rane, kastracija ...
- 20% infekcija ne zna se ulazno mesto
- moćan egzotoksin koji dovodi do tonično-kloničnih konvulzija – pojačana refleksna nadražljivost i trajni spazam mišića

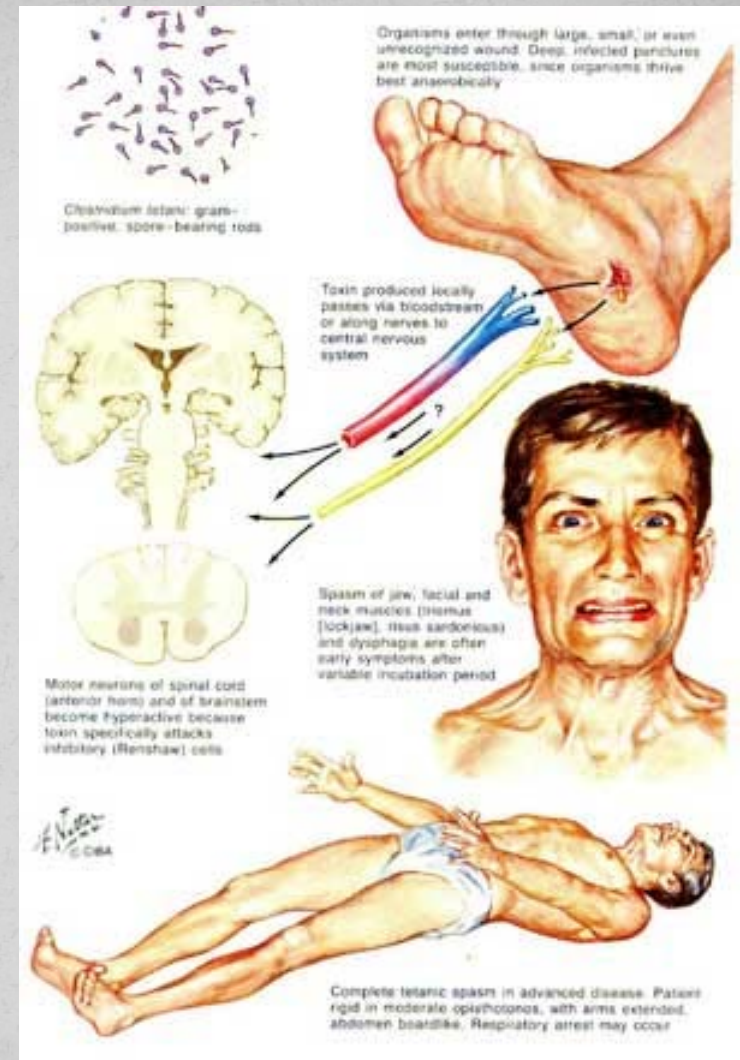
- Osetljivost

1. konji, ljudi
2. preživari, svinje
3. psi, živina



Tetanus

- Pet vekova pre nove ere – **Hipokrat** opisao korelaciju između rana i fatalnog spazma muskulature
- **1884: Arthur Nicolaier izolovao *C. tetani***
- **1884: Antonio Carle i Giorgio Rattone potvrdili prenosivost tetanusa**
- **1889: Kitasato Shibasaburo potvrio neutralizaciju tetanusa**
- **1924: Descombey proizveo vakcinu protiv toksina *C.tetani***



Tetanus – *Clostridium tetani*

- zli grč – nema poremećaja svesti, jak bol
- prisutan u tlu naročito ako je kontaminirano fecesom
- može biti prisutan u crevima konja i drugih životinja
- sporadično pojavljivanje



Tetanus kod konja



- Ukočenost ušiju,
- Preplašen pogled,
- Istegnuti
ekstremiteti,
- Opistotonus.

Dva toksina

- **tetanolizin**

- **tetanospazmin - neurotoksin**



Tetanospazmin

- **motorni neuroni**

- **ventralni rogov
kičmene moždine**

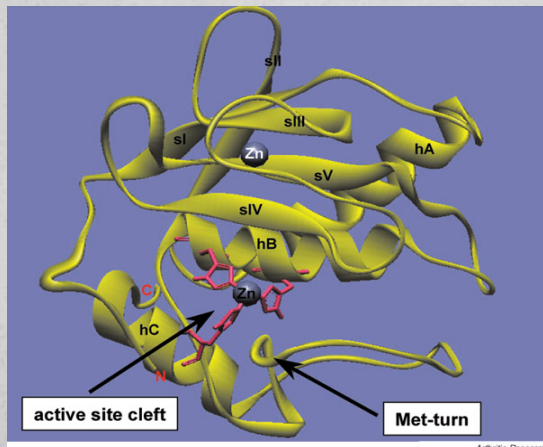
Inkubacija 5-10 dana, produžena i 3 nedelje

Tetanospazmin

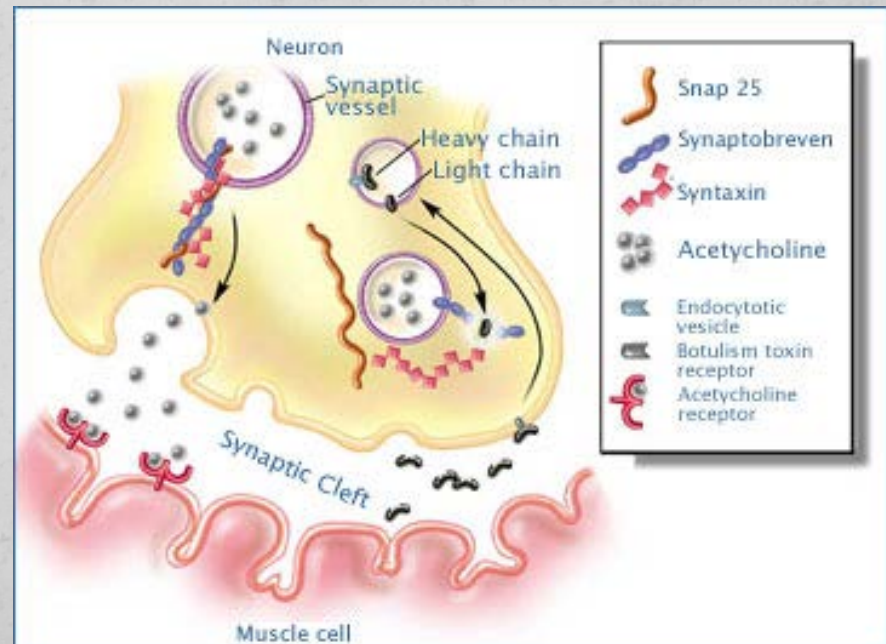
Jedan od najjačih toksina

Minimalna letalna doza za ljude 2.5 ng/kg telesne težine

Dovodi do blokiranja inhibitornih impulsa interferencijom sa neurotransmiterima - glicinom i gama amino buternom kiselinom - GABA



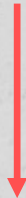
Arthritis Research



Toksin razgrađuje sinaptobrevine



Blokada transmisije inhibitornih signala



Spastična paraliza

- **ascendentni tetanus** - obuhvaćene samo nervne ćelije čiji su završeci u okolini produkcije toksina
- **descendentni tetanus** toksin se širi u organizmu i krvotokom

Terapija i preventiva

1. Kontrola spazma

2. Sprečavanje produkcije toksina

3. Neutralizacija dejstva toksina

- antitoksin/hiperimuni serum – intravenozno ili subarahnoidno
- toksoid/anavakcina - supkutano
- visoke doze penicilina
- hiruško čišćenje rane i ispiranje sa H_2O_2
- smeštanje u mračne tihe prostorije - sedativi
- spazmolitik - miorelaksansi
- vakcinacija

People of all ages need TETANUS VACCINES



DTaP
for young children

- ✓ 2, 4, and 6 months
- ✓ 15 through 18 months
- ✓ 4 through 6 years

Tdap
for preteens

- ✓ 11 through 12 years

Td or Tdap
for adults

- ✓ Every 10 years

www.cdc.gov/tetanus



Botulizam – alimentarna intoksikacija - botulinusni toksin u neadekvatno konzerviranoj hrani

Stvaraju ga:

1. *Clostridium botulinum* grupa I
 2. *Clostridium botulinum* grupa II
 3. *Clostridium botulinum* grupa III i *C. argentinense*
 4. Određeni sojevi *C. baratii* i *C. butyricum*
- Latinska reč *botulus* - kobasica
 - Justinus Kerner opisao simptome 1820 godine.
 - Bakterija i neurotoksin klasifikovani 1895 godine Emile Pierre van Ermengem

Botulizam

1 gram toksina letalna doza 200 000 miševa

intoksikacija ili toksoinfekcija, osam tipova toksina

A – ljudi- meso, konzerve; deca – toksoinfekcija;
psi, svinje - meso

B – ljudi, toksoinfekcija- deca i ždrebad

C_{α} i C_{β} -živina, goveda, ovce, konji, psi – silaža, trulo
povrće, seno

D – goveda, ovce, konji – kontaminirana hrana

E – ribe, ptice, ljudi

F – ljudi

G – ljudi

- **termostabilan toksin** – kuvanje u trajanju od 20 minuta ga uništava

- najčešće tip C i D

- apsorpcija iz digestivnog trakta, širenje krvotokom, nervnomišićne sinapse

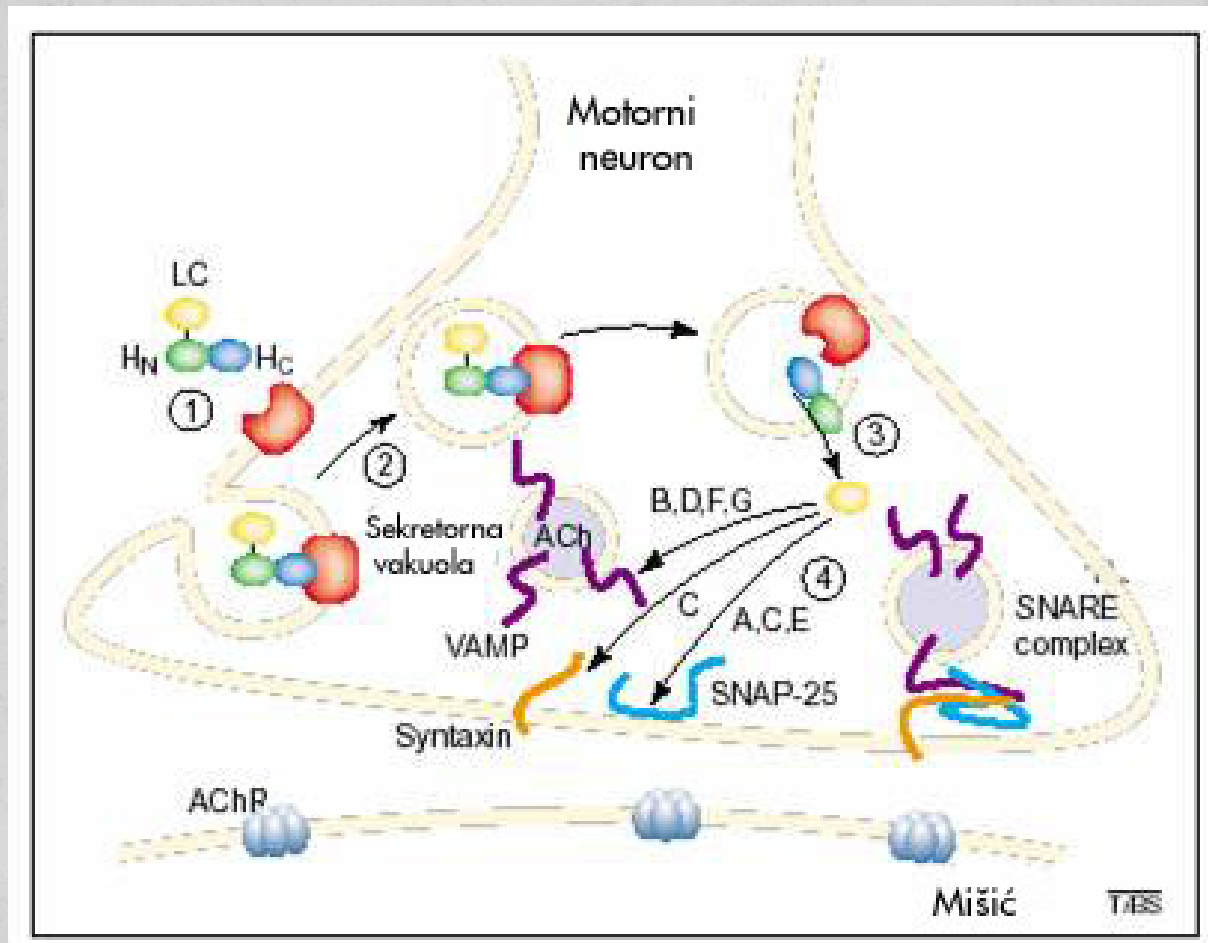


Dejstvo botulinusnog toksina na nervne ćelije

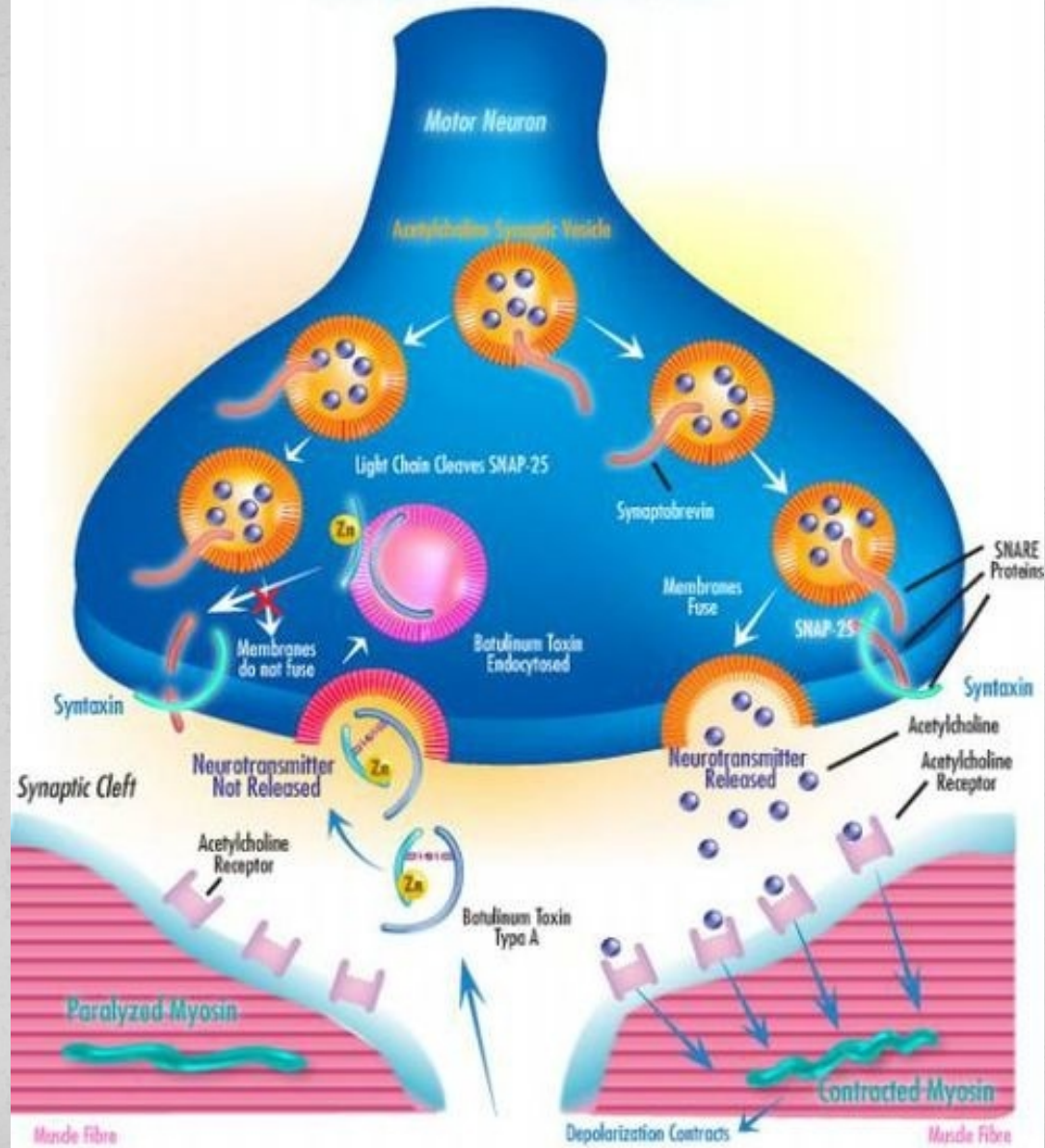
1. vezivanje za membranu
2. endocitoza ukazak u vezikuli
3. izlazak iz vezikule u citoplazmu
4. blokiranje oslobađanja neurotransmitera – acetil holina - razaranjem SNARE proteina sprečeno oslobađanje vezikularnog sadržaja izvan ćelije – sprečavanje egzocitoze
5. posledično paraliza mišića

Flacidna paraliza u kome su mišići slabi, opuštteni i bez tonusa

- Paraliza- abdominalno dihanje, nekordinisano kretanje, proširena zenica, suve sluznice...

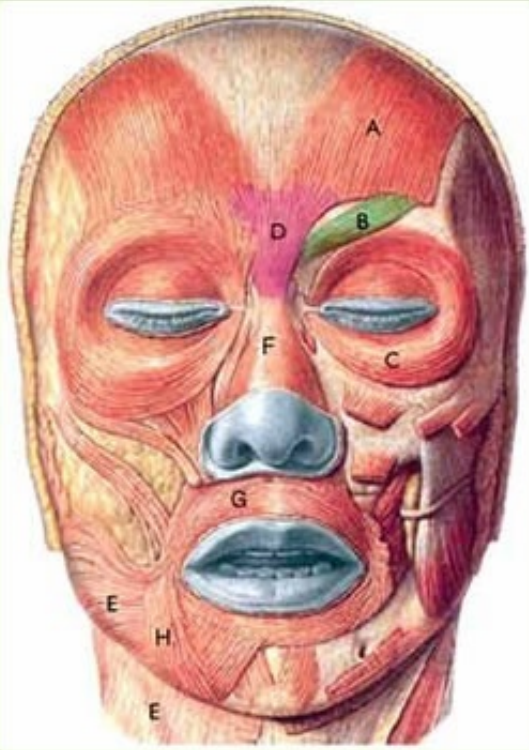


Molecular Mechanism of Action



- Vakcinacija nema naročit značaj i prevenciji botulizma
- Primena hiperimunih seruma nije efikasana za toksin koji se već vezao za nerve, i deluje na zaustavljanju napredovanja i pogoršanja bolesti
- Terapija – sredstva koja stimulišu produkciju neurotransmitera – guanidin hidrohlorid
- Edukacija – propisno čuvanje hrane, ne treba konzumirati trulo voće i povrće, nadute konzerve ili suhomesnate proizvode neprijatnog mirisa ili promenjenog izgleda.

Botox



The primary muscles of facial expression treated with BOTOX:

- (A) Frontalis
- (B) Corrugator and Depressor supercilli complex
- (C) Orbicularis oculi
- (D) Procerus
- (E) Platysma
- (F) Nasalis
- (G) Orbicularis oris
- (H) Depressor anguli oris



Histotoksične Clostridium spp

- veći broj toksina- lokalna nekroza tkiva i sistemsko delovanja
- mogu biti latentno prisutne u organizmu
- *C. chauvoei* i retko *C. septicum* – mišići
- *C. novyi* tip B i *C. haemolyticum* – jetra
- infekcija – rane
- oboljenja gasna gangrena i maligni edem koja protiču u perakutnom i akutnom toku

C. chauvoei – šuštavac- blackleg

- akutna bolest goveda i ovaca
- goveda 3 meseca- 2 godine, ovce bez obzira na starost
- **endogena infekcija**, trauma mišić
- gangrenozni celulitis i miozitis
- otok i oslobađanje gasa pucketanje pod prstima



C. chauvoei – šuštavac- blackleg

- α toksin – hemolizin -nekrotični faktor, β toksin – DNK-aza, neuraminidaza , chauveolysin – δ -toksin - citotoksin vezuje se za holesterol
- nalazi se u crevima, jetri, spore u mišićima
- u zemljištu, infekcija i preko rane
- germinacija spora – lokalni anaerobni uslovi
- metabolički aktivne bakterije oslobađaju gas

C. chauvoei – šuštavac- blackleg

- promene suve, crne, emfizematozne, periferija edematozna i hemoragična



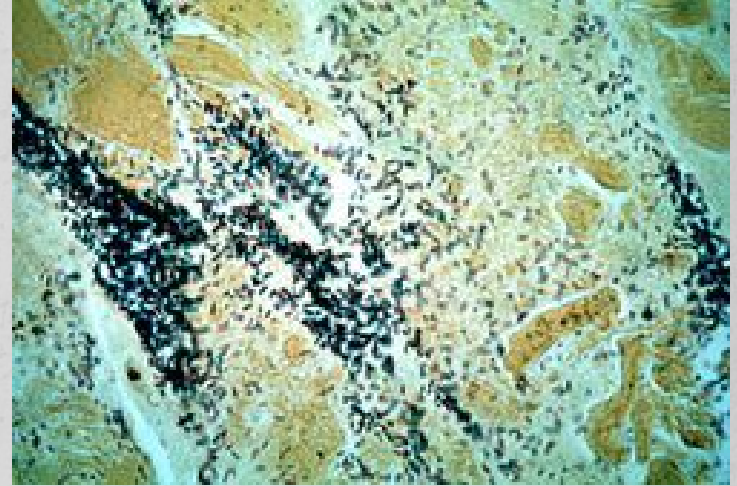
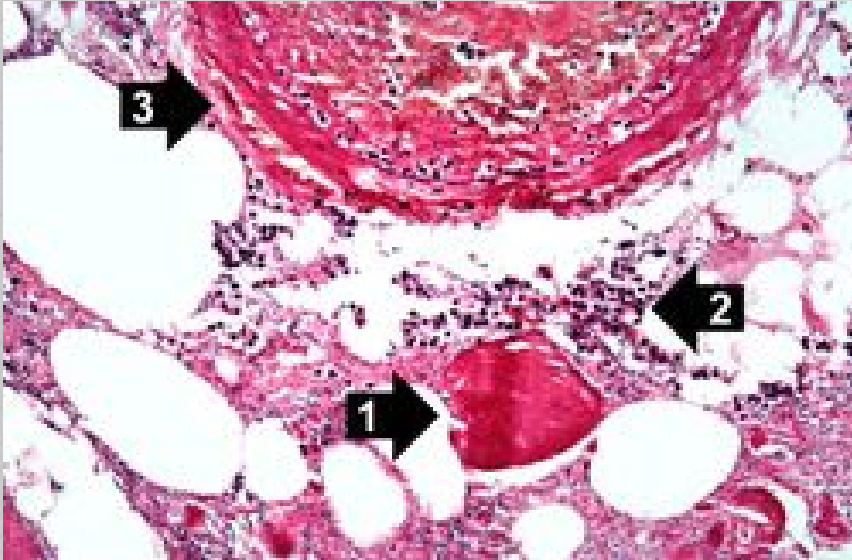
Maligni edem i gasna gangrena

Maligni edem - celulitis sa minimalnom gangrenom i formiranjem gasa, hladan otok tkiva- mišića

Gasna gangrena – opsežna destrukcija mišićnog tkiva, produkcija gasa



Maligni edem i gasna gangrena



1. Nekroza mišićnog tkiva
2. *Clostridium* bakterije u tkivu
3. Tromboza krvnog suda

Maligni edem – *C. septicum*

- **Najčešći uzročnik infekcija rana – gasne gangrene – malignog edema -**
- **α toksin - citotoksin endotelne ćelije, β toksin – DNK-aza, leukocitotoksičan, γ toksin – hijaluronidazu, streptolizin O – holesterol vezujući citotoksin...**
- **digestivni trakt, zemljište**
- **hiruška intervencije**
- **stavljanje ušnih markica**
- **aplikacija injekcija**
- **hladna – smrznuta hrana**



Maligni edem – *C. septicum*

- alfa toksin – stvaranja pora - šok, citotoksično delovanje na celice endotela krvnih sudov



Gasna gangrena- *C. perfringens* tip A

- *C. novyi* tip A, *C. chauvoei* i *C. sordellii*
- trauma, nizak red-oks potencijal, alkalna pH



- **Bolest velike glava ovnova** – borba – rane – ***C. novyi* tip A**
 α toksin, δ toksin – novilizin – citotoksin - holesterol



- **Braxy – Bradsot** – ***C. septicum*** - hladna hrana, zimi, ovce,
abomazitis

- **Infektivni nekrotični hepatitis** – ovce ređe goveda
- ***C. novyi* tip B** – povezano sa kretanjem metilja i oštećenjem parenhima jetre, crna bolest- tamna koža subkutana kongestija – black disease
- α toksin, β toksin – citotoksin fosfolipaza C



Bacilarna hemoglobinurija - goveda ređe ovce
– *C. haemolyticum* – endogena infekcija, β toksin –
intravaskularna hemoliza, nekroza jetre

- Toksin fosfolipaza C – opsežne hemoragije

Terapija i preventiva

- lečenje uglavnom bezuspešno

- vakcinacija

Enteropatogene i enterotoksemične *Clostridium* spp

- umnožavaju se u digestivnom traktu i stvaraju toksine koji deluju ne samo lokalno nego i sistemski
- ***C. perfringens* – najznačajniji tip B, C i D**

Predisponirajući faktori

- **slaba proteolitička aktivnost**
- **neonatalno odsustvo formirane normalne mikroflore**
- **ishrana-** preobilna, previše proteina i energije - mleko, legiminoze i žita
- **nesvarena hrana u crevima,**
- **usporena peristaltika.**

Clostridium perfringens

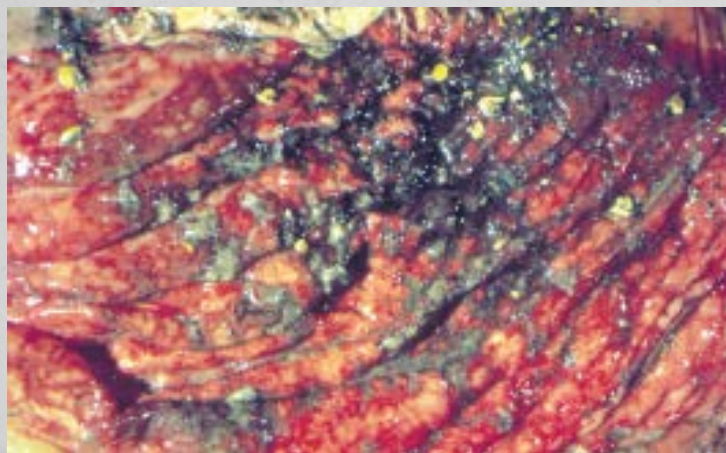
- Adhezini – vezuju se za fibronektin i kolagen
- Kapsula
- Proteolitički enzimi – autotrof za 15 aminokiselina, deoba svakih 10 minuta, najkraći generacijski period kod bakterija
- **četiri glavna toksina - α , β , ϵ i ι toksini**
- α toksin – fosfolipaza C - lecitinaza
- β toksin – oštećuje membranu epitelnih, endotelnih i nervnih ćelija
- ϵ toksin – meta holesterol i sfingolipidi – mozak, bubrezi
- ι toksin – citotoksin

Clostridium perfringens

- enterotoksin – 5% *C. perfringens* tip A
- nekrotični enteritis toiksin B
- drugi toksini
- κ toksin – kolagenaza
- μ – toksin – hijaluronidaza
- perfringolizin – citolizin – neuraminidaza
- *C. perfringens* prisutan u digestivnom traktu i zemljištu

C. perfringens tip A

- enteritis – hemoragična ili nekrotična forma
- telad – nekrotičan i emfizematozan abomasitis
- konji – kolitis nakon primene gentamicin
- ljudi – trovanje enterotoksin



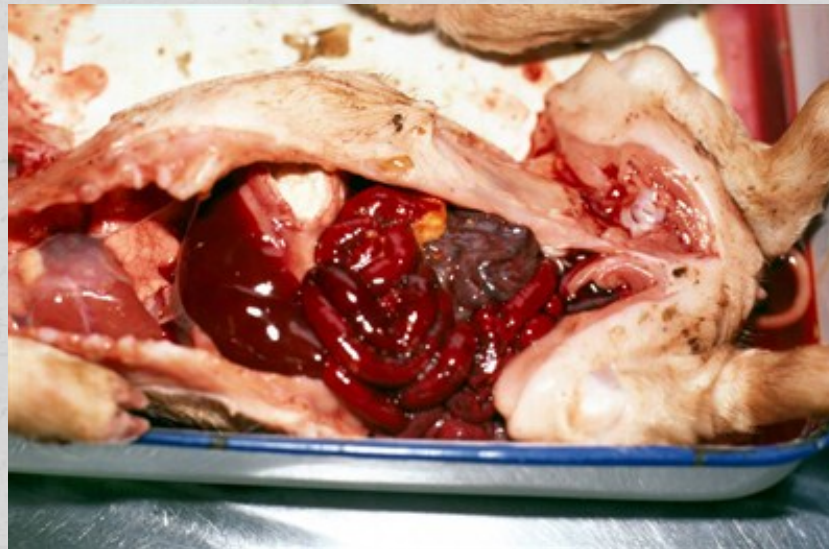
Dizenterija jagnjadi

- *C. perfringens* tip B, prva nedelja života, krvavi proliv, hemoragični enteritis – β toksin – osetljiv na tripsin
- beta toksin – stvaranje pora – nervni sistem
- direktno delovanje na autonomni nervni sistem – stvaranje kanala – protok jona Na i K, depolarizacija membrane



***C. perfringens* tip C** – neonatalni hemoragični i nekrotizujući enteritisi prasada, jagnjad, telad i ždrebad

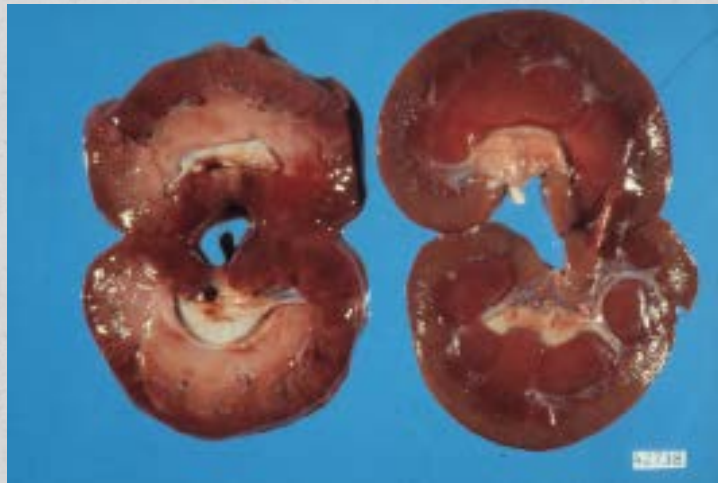
Hemoragični enteritis prasadi - *C. perfringens* tip C novorođena prasada, krvavi proliv, smrtnost i preko 80%, loša higijena



Struck - *C. perfringens* tip C akutna enterotoksemija odraslih ovaca, paša, β toksin- krvarenja, ulceracija u jejunumu, hiperemija tankih creva, tečnost u peritonealnoj šupljini



Bolest mekanog bubrega - *C. perfringens* tip D,
preobilna ishrana, ε toskin, toksemija, jagnjad stari 3-10
nedelja, nervni simptomi, nadimanje, proliv,
postmortalno- kašasti mekani bubreg



- ***C. perfringens* tip D** – enterotoksemija ovce ređe telad
 - enterotoksemija i enterocolitis koze
- ***C. perfringens* tip E** - hemoragični gastroenteritis goveda

Terapija i preventiva

- akutne infekcije- ne pomaže antibiotska tertapija
- vakcinacija

***Clostridium* spp. uzročnici oboljenja koje indukuje primena antibiotika**

Clostridioides difficile – ljudi, kunići, zamorci-
antibioticima indukovani enterocolitis - klindamicin,
cefalosporini III generacije

- psi, ždrebci, svinje, laboratorijske životinje- “spontani”
prolivi

- terapija – metronidazol, vankomicin

Enterocolitis uzrokovan *Clostridioides difficile*

