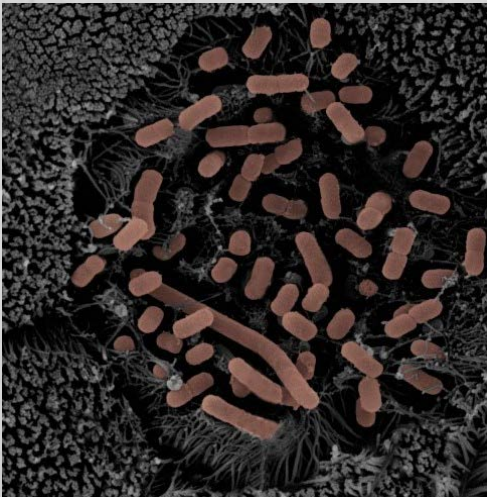


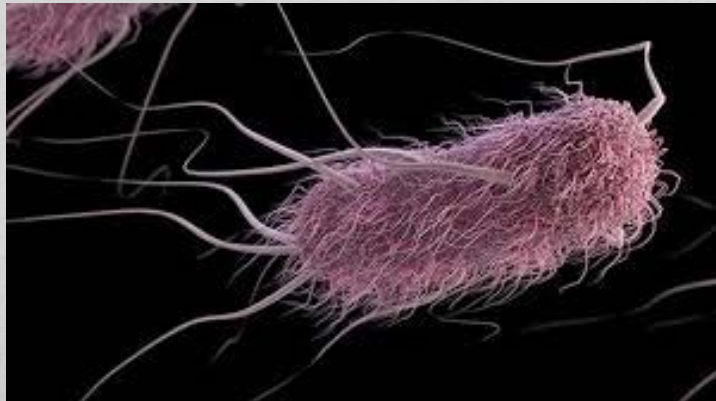
Red Enterobacterales

- Red Enterobacterales sedam familija - *Budviciaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae* i *Yersiniaceae*
- Gram negativne bakterije štapićastog oblika, fakultativni anaerobi, ne stvaraju spore



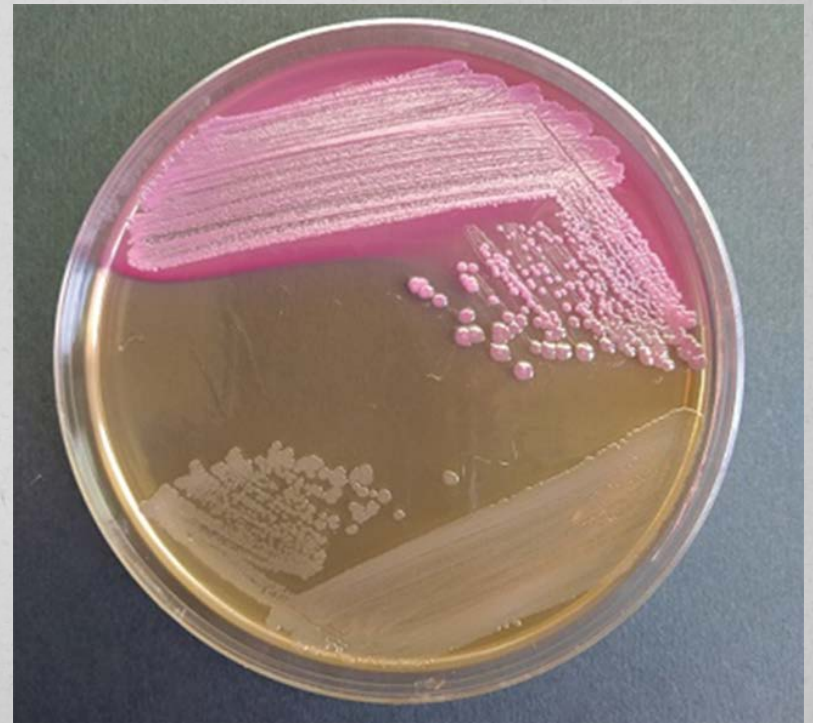
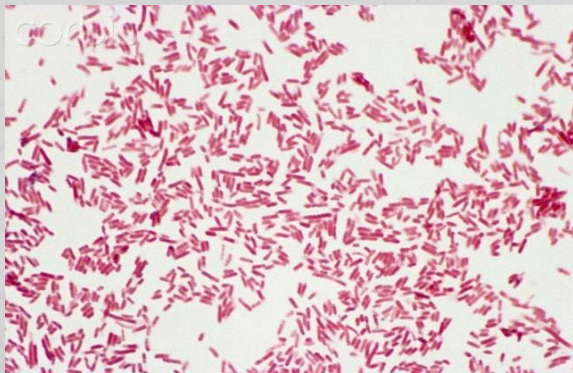
Red Enterobacterales

- Više od 30 rodova i 100 različitih vrsta bakterija.
- Prisutne u različitim ekološkim nišama i poseduju različite biohemijske karakteristike.
- Veliki broj vrsta se nalaze u intestinalnom traktu životinja i ljudi.



Red Enterobacterales

- **Gram negativne bakterije** štapićastog oblika i do 6 μm dužine, veličine po pravilu između 0,3-0,6 x 2-3 μm .
- Rastu na neobogaćenim podlogama, **rastu na MacConkey agaru.**
- **Fakultativni anaerobi**, katalaza pozitivne.
- Asporogene, većina pokretne.
- **Oksidaza negativne.**
- Fermentišu glukozu.
- Redukuju nitrate u nitrite.



Na osnovu patogenosti podeljene su u tri grupe:

1. Saprofitske komensalne mikroorganizme
čija patogenost nije dokazana

2. Patogene bakterije

Salmonella spp

Escherichia coli

Yersinia spp

Shigella spp.

Klebsiella spp.

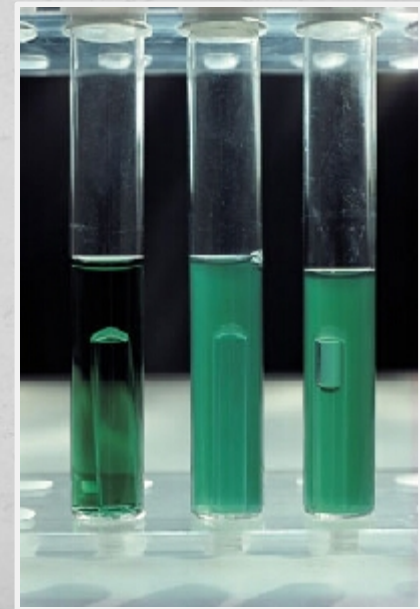


3. Oportunističke patogene koji u određenim okolnostima prouzokuju infekcije rodovi *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*

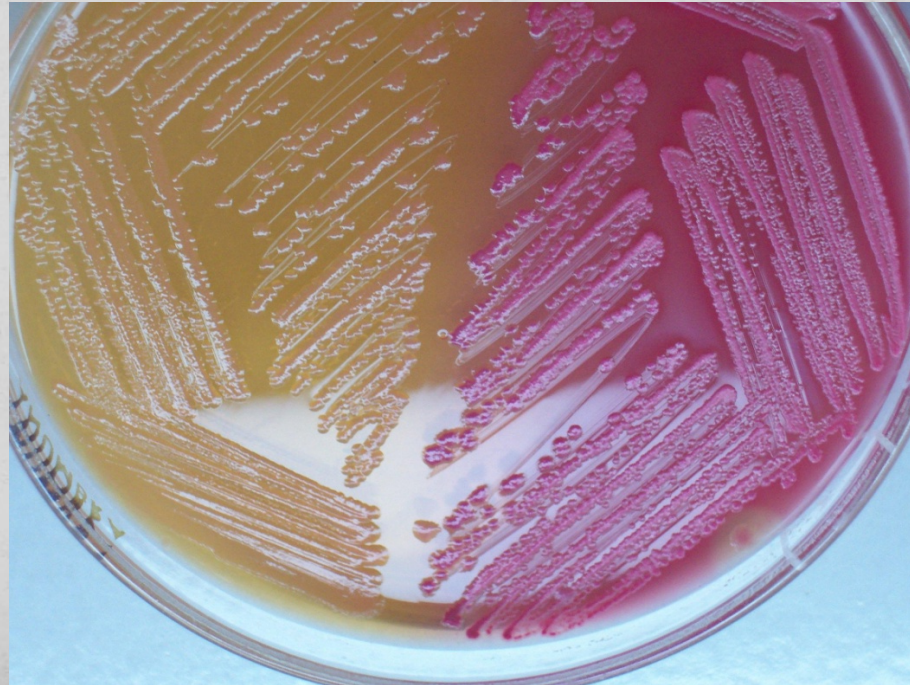
Izolacija i identifikacija

- **Veći broj selektivnih i diferencijalnih hranljivih podloga.**
- Podloge u sebi sadrže inhibitorne supstance poput žučnih soli ili brilijant zelene boje koje dovode do sprečavanja rasta Gram-pozitivnih bakterija.
- Mogu sadržati supstrate koje određeni rodovi ili vrste bakterija razlažu i indikatore koji obezbeđuju promenu boje kolonija i preliminarnu identifikaciju.

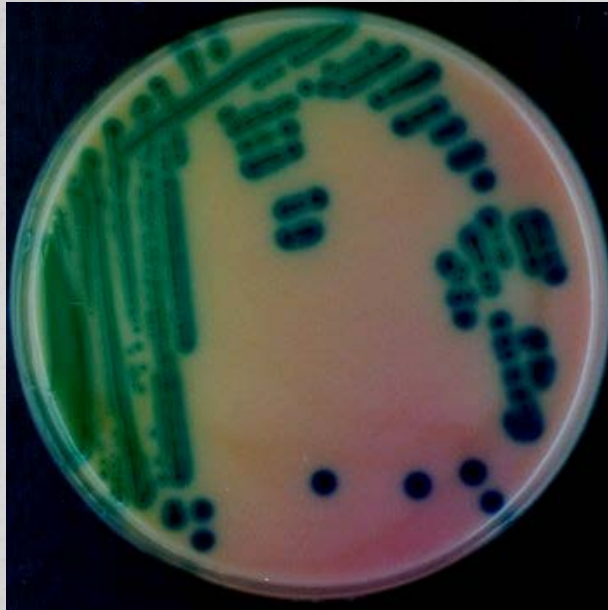
- U ispitivanom materijalu broj *Salmonella* i *Shigella* može biti mali zbog čega se koriste podloge za obogaćivanje koje favorizuju rast određenih vrsta a dovode do inhibicije rasta drugih.
- **Podloge za obogaćivanje-** Rappaport- Vassiliadis bujon, brilijant zeleni žučni bujon, laktozni bujon, MacConkey bujon i Selenit F bujon.



- U diferencijalne podloge inkorporisani su određeni supstrati- najčešće laktoza i indikatori
- **MacConkey agar** - žučne soli, kristal violet
 - laktoza negativne - **žute boje** *Salmonella, Shigella*
 - laktoza pozitivne - **crvene boje** *E. coli, Klebsiella*



- **Hektoen agar** - žučne soli, laktoza, salicin, soli gvožđa, indikator bromtimol plavo
 - ne razlažu laktozu - zelena/plavo zelena boja
 - razlažu laktozu - žuto narandžasta boja
 - produkcija H_2S -crni centar



- **Endo agar** – laktoza, indikator fenolftalein,
 - laktoza negativne- blede ružičaste
 - laktoza pozitivne- crvene boje

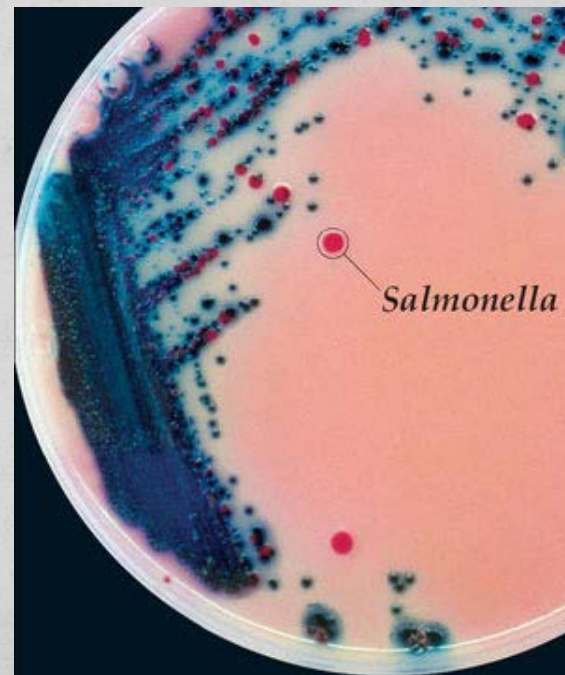
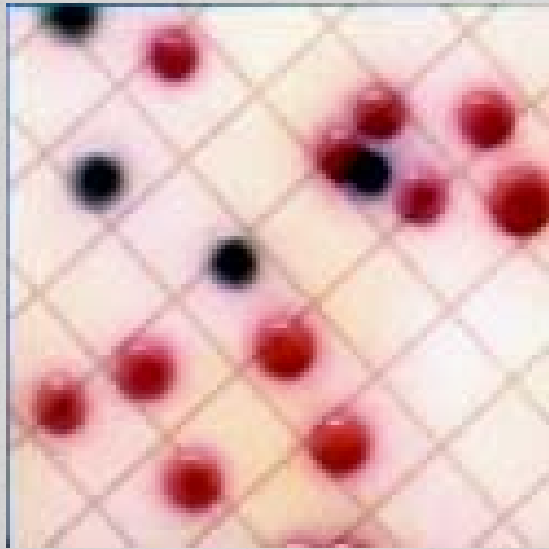


Podloge sa obojenim supstratom
inkorporisana jedinjenja konjugovana sa
hromogenima ili fluoresentnom bojom

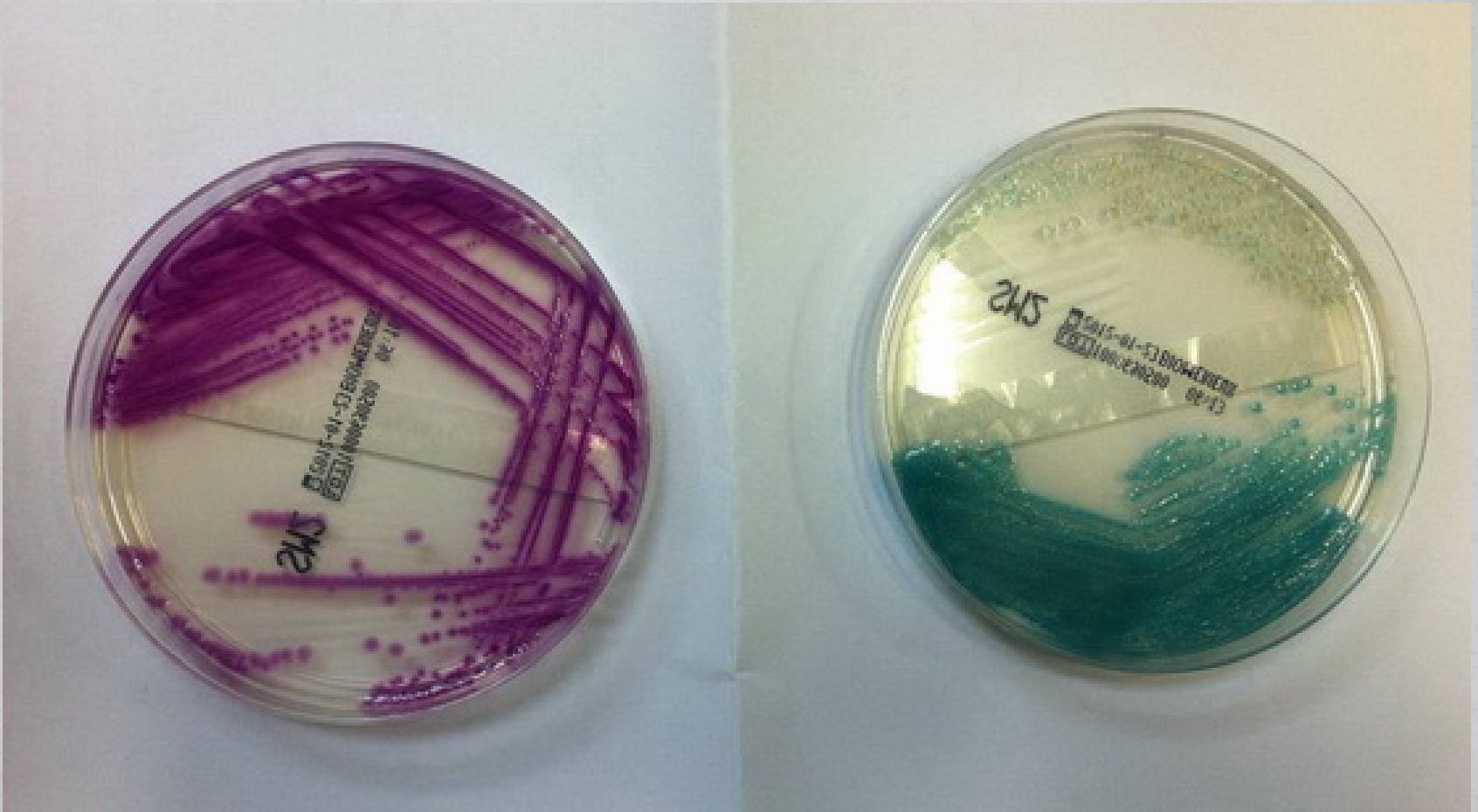


- bakterije koje se odlikuju sposobnošću korišćenja tih jedinjenja, unose ih iz podloge i ugrađuju u sebe - posledica različite boje kolonija i njihova laka identifikacija

najpoznatije hromogene podloge su Coli ID agar, Rambach-agar i DIASALM



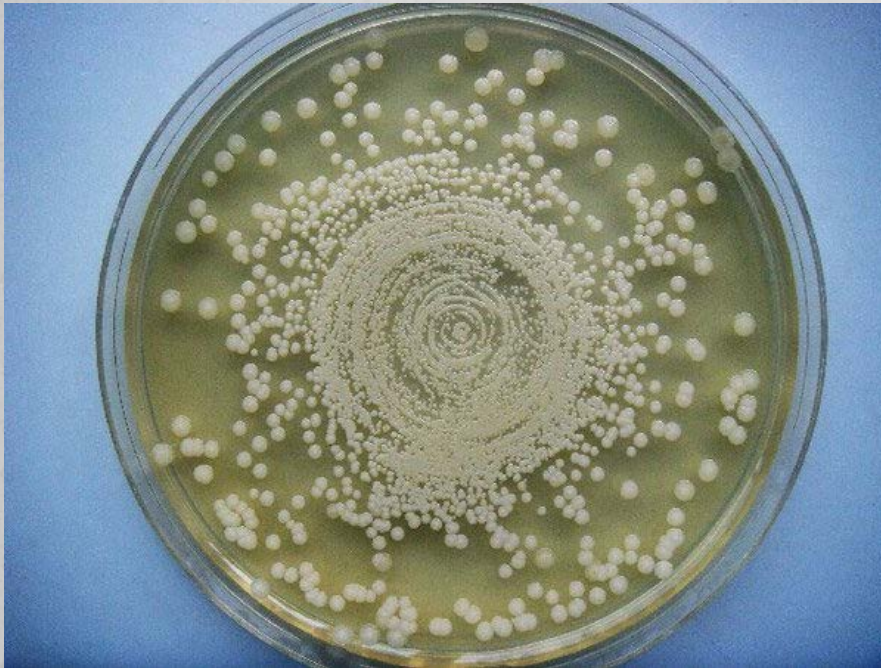
chromID™ Salmonella Agar (SM2)



- Enterobakterije se lako kultivišu i rastu ne samo na selektivnim i diferencijalnim, nego na svim standardnim hranljivim podlogama uključujući običan i krvni agar.
- Inkubacija se vrši u aerobnim uslovima sredine, na temperaturi od 37 °C u trajanju od 24 časa.



- Kolonije enterobakterija su veoma slične, relativno velike prečnika 2-3 mm, okrugle, sjajne i sivkaste boje
- Izuzetak – **rojenje** – *Proteus mirabilis* i *P. vulgaris*



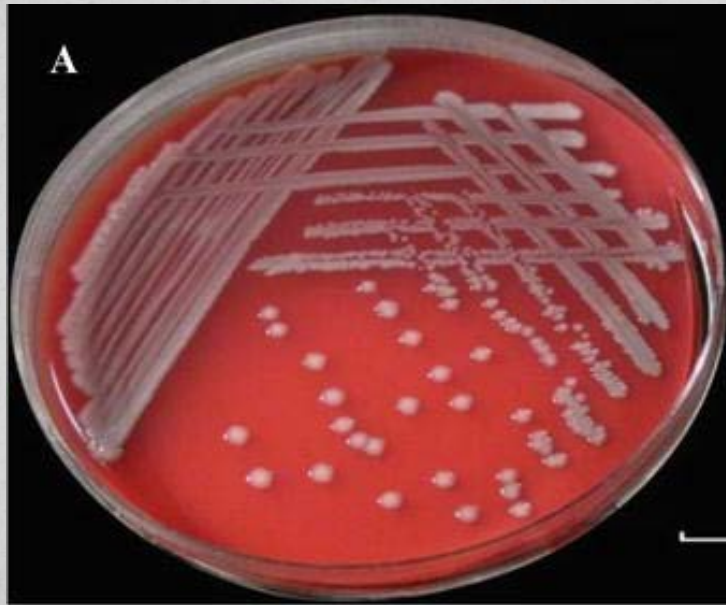
- Izuzetak - **sluzave kolonije** – *Klebsiella*, *Enterobacter*



- Samo nekoliko vrsta enterobakterija stvara pigment
Serratia marcescens, *S. rubidaea* crvene boje
Pantoea agglomerans raniji naziv
Enterobacter agglomerans žute boje.

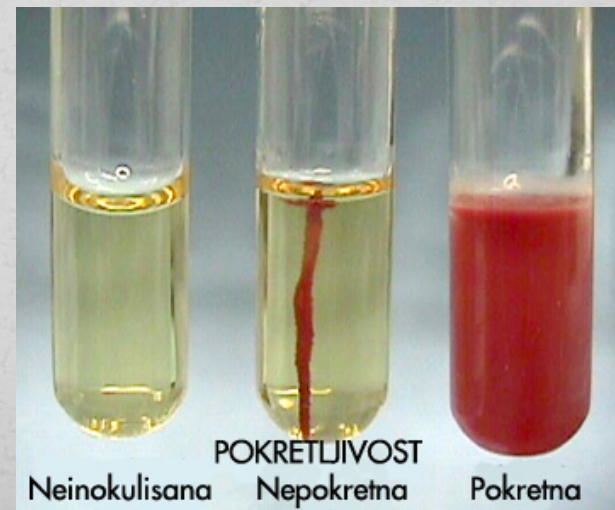
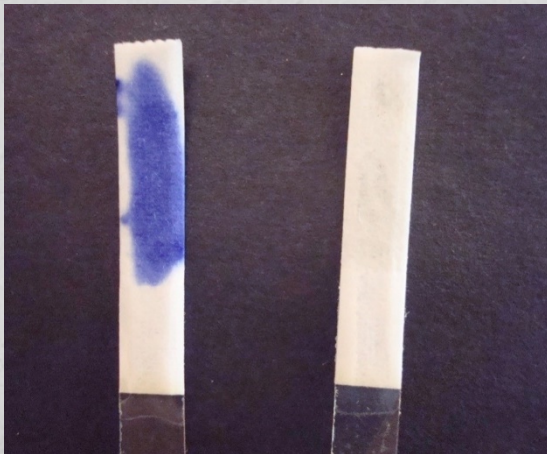


- Na krvnom agaru većina enterobakterija se ne odlikuje hemolizom
- Neki patogeni sojevi *Escherichia coli* imaju α i β hemolizine i dovode do hemolize eritrocita na krvnom agaru.

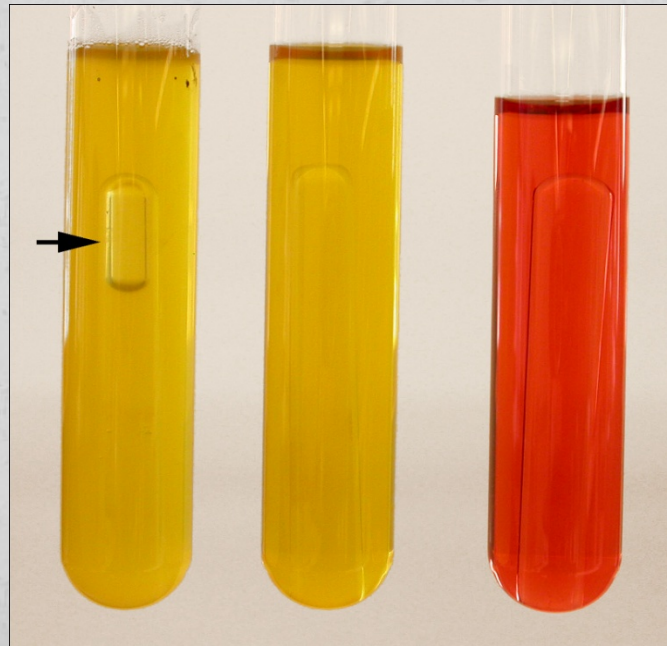


Ispitivanje fiziološko- biohemijskih osobina

- sve fermentišu glukozu
- sve redukuju nitrate u nitrite
- ne produkuju citohrom oksidazu
- sve su pokretne izuzetak *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia*

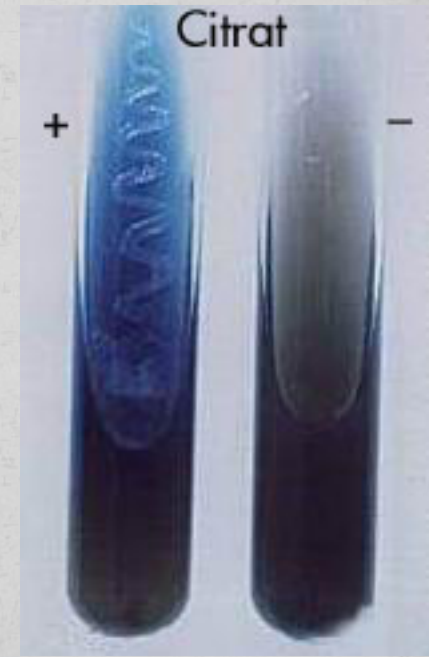
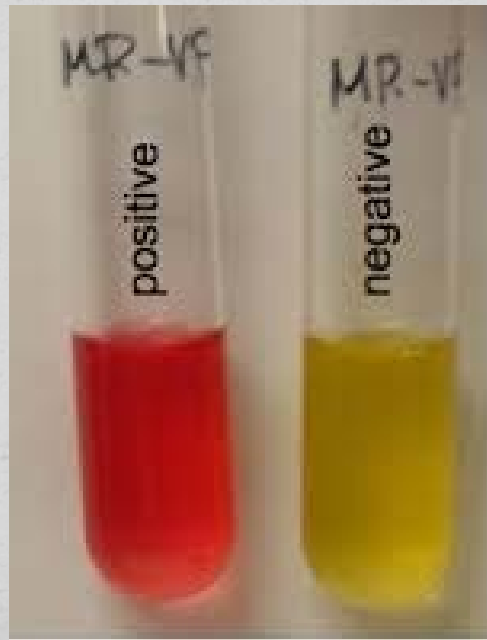
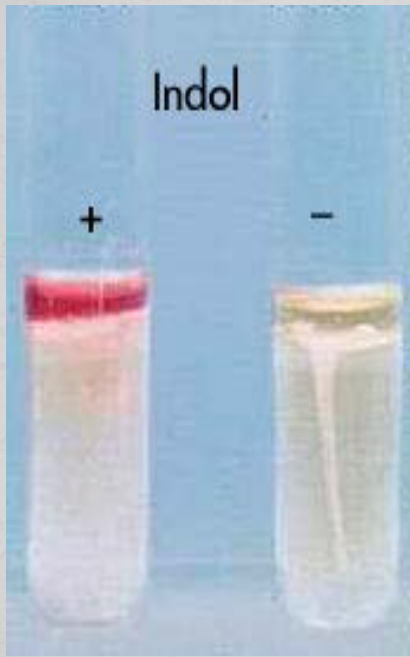


- **Precizna identifikacija enterobakterija se izvodi ispitivanjem biohemijskih karakteristika**
- Na osnovu sposobnosti fermentacije laktoze su podeljene enterobakterije se dele na **laktoza pozitivne i na laktoza negativne**



IMViC – kratak biohemijski niz

1. sposobnost stvaranja indola
2. reakcija sa metil crvenim
3. Voges Proskauer reakcija
4. rast na podlozi za citratom



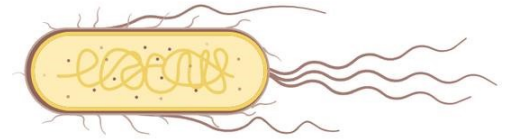
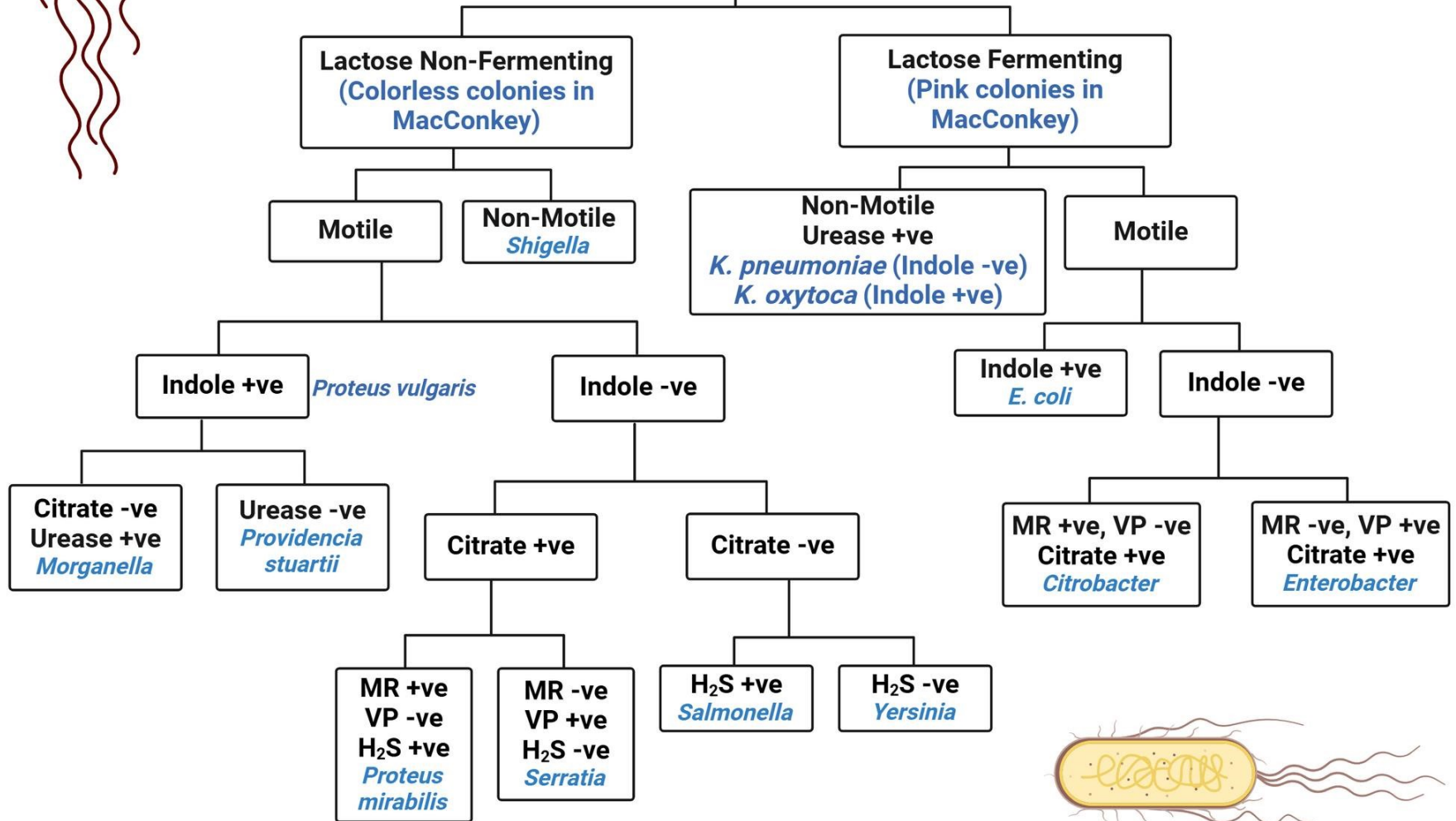
- Druge biohemijske reakcije - sposobnost razgradnje aminokiselina - lizin, fenilalanin ili aminokiselina sa sumporom (oslobađanje H_2S), otapanje želatina, prisustvo ureaze, fermentacija ugljenih hidrata, rast u podlozi sa KCN i pokretljivost
- TSI – Trostruki šećer sa gvožđem





Enterobacteriaceae

Gram -ve, Catalase +ve, Oxidase -ve,
Nitrate +ve, Ferment Glucose



Komercijalni biohemijski testovi – bioMérieux API

api 20E

20B

ONPG

ADH

LDC

ODC

[CIT]

H₂S

URE

TDA

IND

[VP]

[GEL]

GLU

MAN

INO

SOR

RHA

SAC

MEL

AMY

ARA

REF.: 20B

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelovo:

+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
ONPG	ADH	LDC	ODC	[CIT]	H ₂ S	URE	TDA	IND	[VP]	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OR				
1			2			1			5			7			7			3					

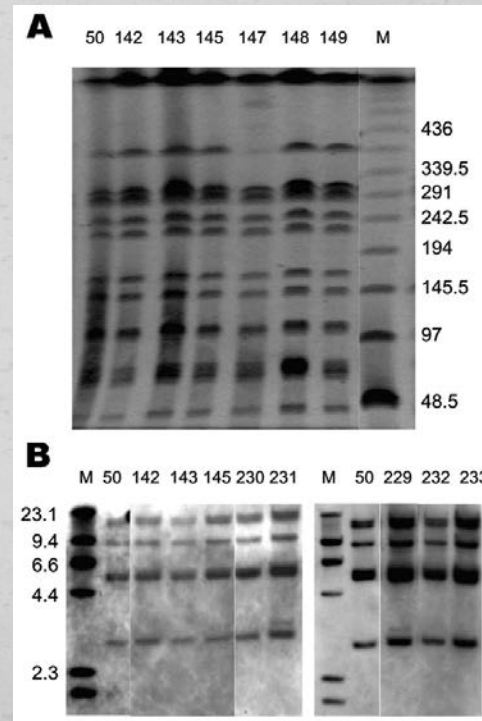
Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Outros tests:

Ident.:
Klebsiella pneumoniae pneumoniae

Implanted in France / Prodotto in Francia

Molekularne tehnike

- **PCR** – detekcija enterobakterija u kliničkom materijalu i hrani, precizna identifikacija izolata.
- **PFGE profil** - digestija restriktivnim enzimima i primena elektroforeze u pulsnom polju (pulsed field gel electrophoresis).



Na osnovu patogenosti podeljene su u tri grupe:

1. Saprofitske komensalne mikroorganizme
čija patogenost nije dokazana

2. Patogene bakterije

Escherichia coli

Salmonella spp

Yersinia spp

Shigella spp.

Klebsiella spp.



3. Oportunističke patogene koji u određenim okolnostima prouzokuju infekcije rodovi *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*

Escherichia coli

- *E. coli* je najbrojnija fakultativno anerobna bakterija u digestinalnom traktu između 10^6 - 10^8 u jednom mililitru i predstavlja dominantni izolat aerobne flore fecesa.
- **Predstavlja sastavni deo normalne mikroflore digestivnog trakta ali određeni sojevi mogu ispoljavati patogena svojstva**



➤ **Potencijalna patogenost *E. coli* zavisi**
od starosti i fiziološkog stanja jedinke
od faktora virulencije ove bakterije.

Predisponirajući faktori za pojavu *E. coli* infekcija su:

-novorođene jedinke zbog neadekvatnog nivoa
pasivnog imuniteta

- intezivni način držanja domaćih životinja zbog
brzog širenja patogenih sojeva

-loši zoohigijenski uslovi sredine

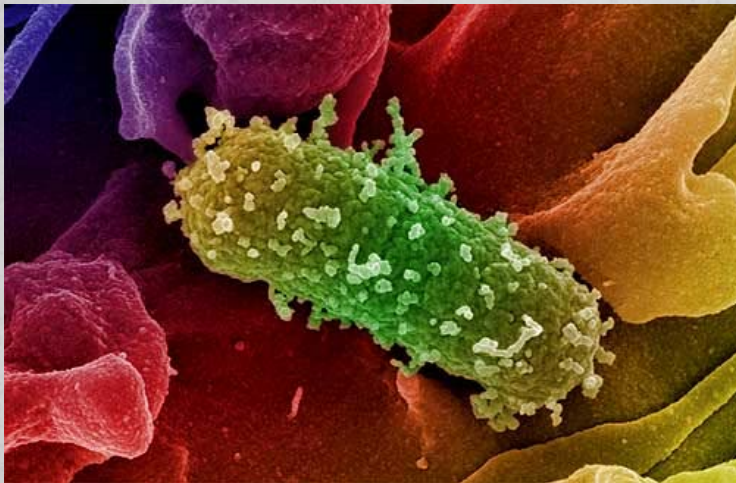


Mlađe životinje nedelju dana starosti su posebno podložne infekciji

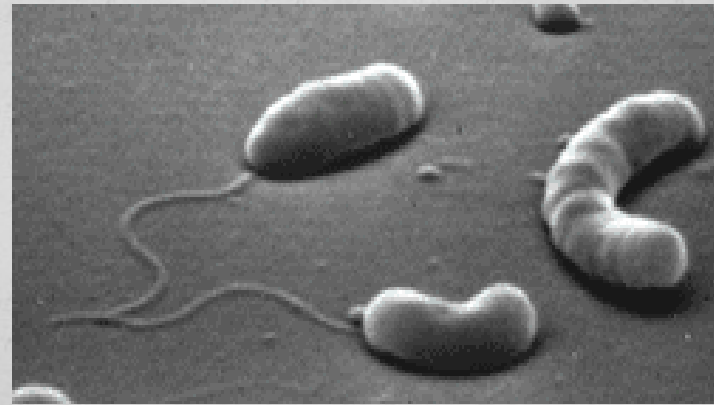
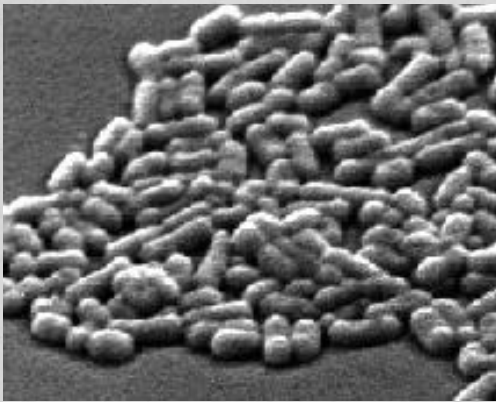
- nezreli imunološki sistem
- neuravnotežena normalna crevna flora
- prisustvo receptora za adhezine *E. coli* na primer za 987P (F6) adhezin prve tri nedelje života prasadi
- genetski ispoljeni receptori za K88



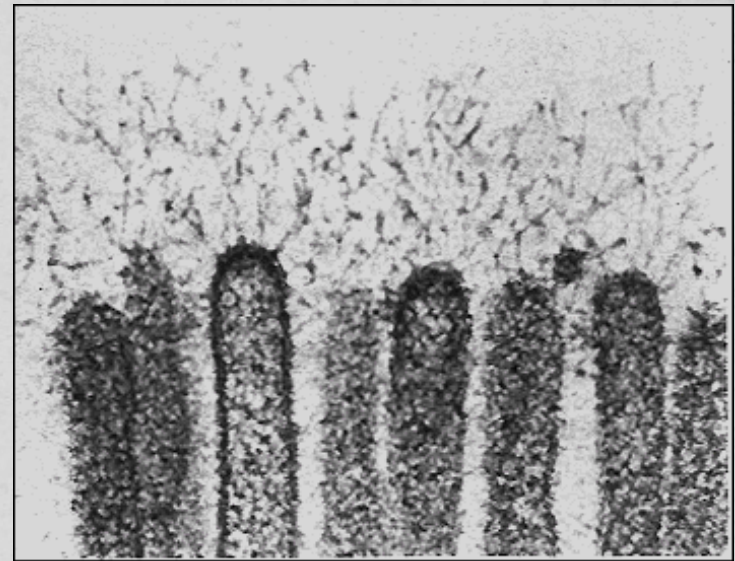
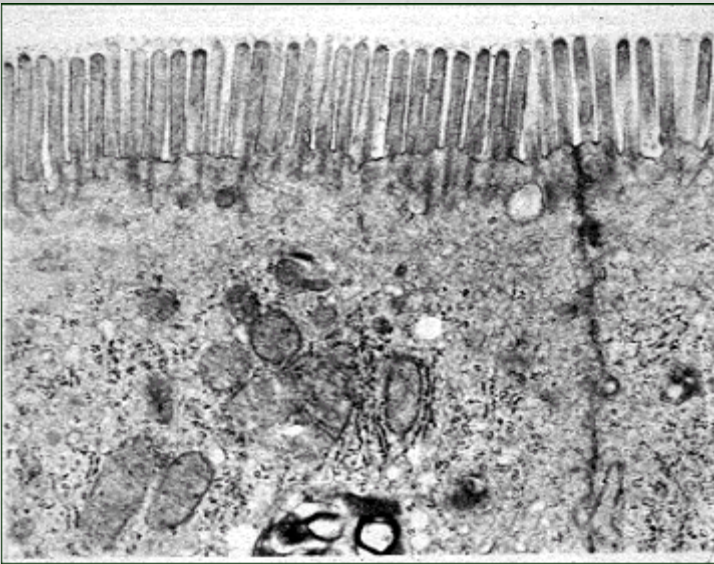
- Za dalji život novorođenčadi od posebnog značaja je **pasivan imunitet dobijen od majki**
- Zbog odsustva transplacentarnog prenošenja imunoglobulina novorođenčad isključivo **dobijaju antitela putem kolostruma i mleka**



- Površinu epitela crevnih resica kolonizuju saprofitski mikroorganizmi, i kao normalna flora u digestivnom traktu sprečavaju invaziju patogenim mikroorganizmima – **Efekat barijere**
- **Digestivni trakt novorođenih životinja je bez prisustva mikroorganizama, a za potpuno formiranje mikroflore neophodno je i više nedelja**



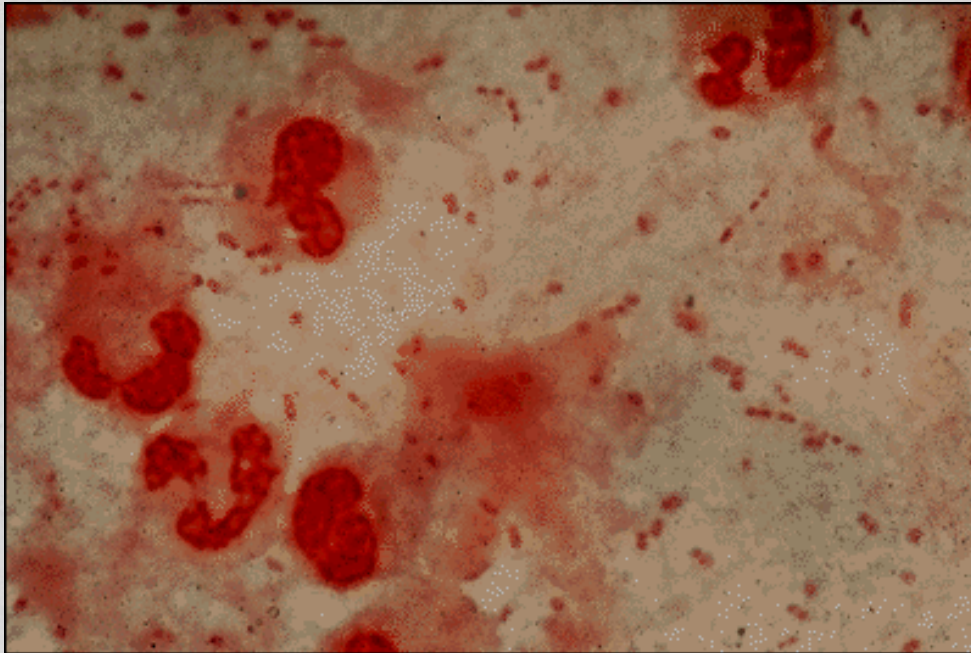
- Zbog odsustva saprofitske mikroflore ostaju slobodni receptori na površini epitelnih ćelija, a time je olakšana kolonizacija patogenim mikroorganizmima



- Odbijanje od sise, promena držanja i ishrane kao stresni faktori naročito kod svinja olakšavaju pojavu bolesti prouzrokovane ovom bakterijom.
- Prisutni receptori na površini enterocita kod starije prasadi za fimbrije *E. coli* F18
- Edemska bolest svinja javlja se kod odlučene prasadi usled promene ishrane i naglog prirasta u telesnoj težini.



- za karakterizaciju izolovanih sojeva *E. coli* i utvrđivanje njihove patogenosti primenjuje se veći broj metoda : **serotipizacija, biotipizacija, fagotipizacija i ispitivanje posedovanja faktora virulencije**



Sojevi *E. coli* u zavisnosti od faktora virulencije koje poseduju mogu dovesti do pojave jednog ili više različitih sindroma bolesti

Intestinalna - enterična oboljenja

Kolibaciloza – neonatalna dijareja telad, jagnjad, prasad

Dijareja posle odlučanja kod prasadi – **ETEC i EPEC**

Edemska bolest svinja – 1- 2 nedelje posle odlučanja

Ekstraintestinalna - neenterična oboljenja

Koliseptikemija – telad, jagnjad, živina

Urinarne infekcije, mastitis, piometra, metritis, omfalitis

**Intestinalna - enterična
oboljenja prouzrokovana
sojevima *E. coli***

**Enterotoksični
sojevi *E. coli* -
ETEC**

**Attaching/effacing
E. coli - AEEC**

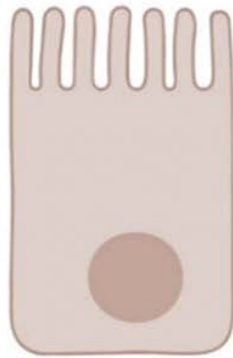
**Enteroagregativni
sojevi *E. coli* - EAggEC**

**Enteropatogeni
sojevi *E. coli* - EPEC**

**Shiga toksin
produkujući
sojevi *E. coli* -
STEC**

**Enterohemoragični
sojevi *E. coli* -
EHEC**

**Sojevi *E. coli*
edemske bolesi**



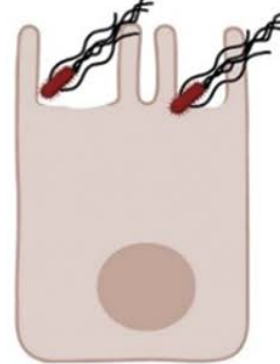
Nepatogena

ETEC

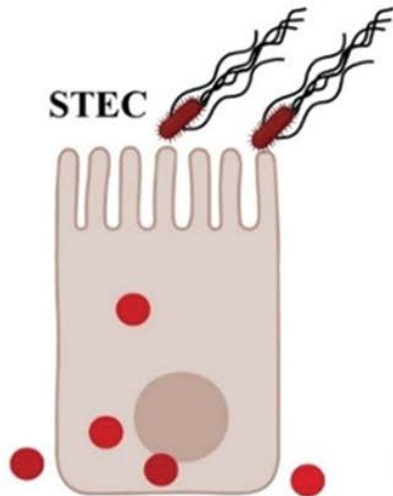


Fimbrije
Enterotoksini
Tanka creva

EPEC/AEEC

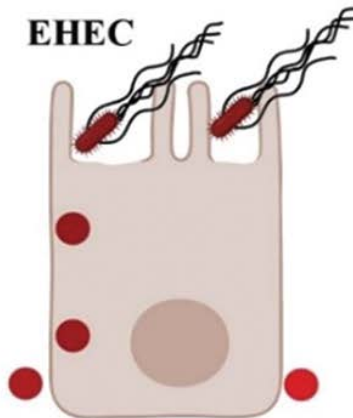


Intimin
Destrukcija crevnih resica
Tanka i debela creva



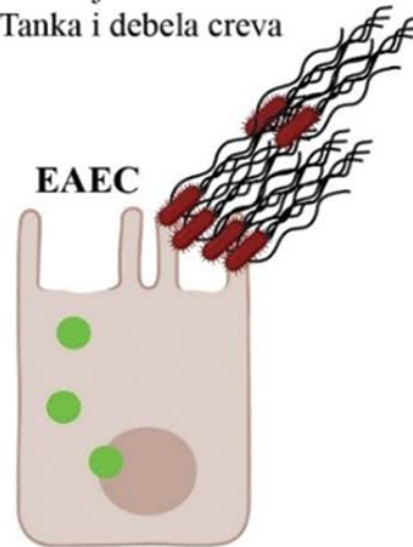
Produkuje toksine
(*Shiga-like toksin*)
Tanka i debela creva

EHEC



Kombinacija EPEC i STEC
Destrukcija crevnih resica
Shiga-like toksin
Tanka i debela creva

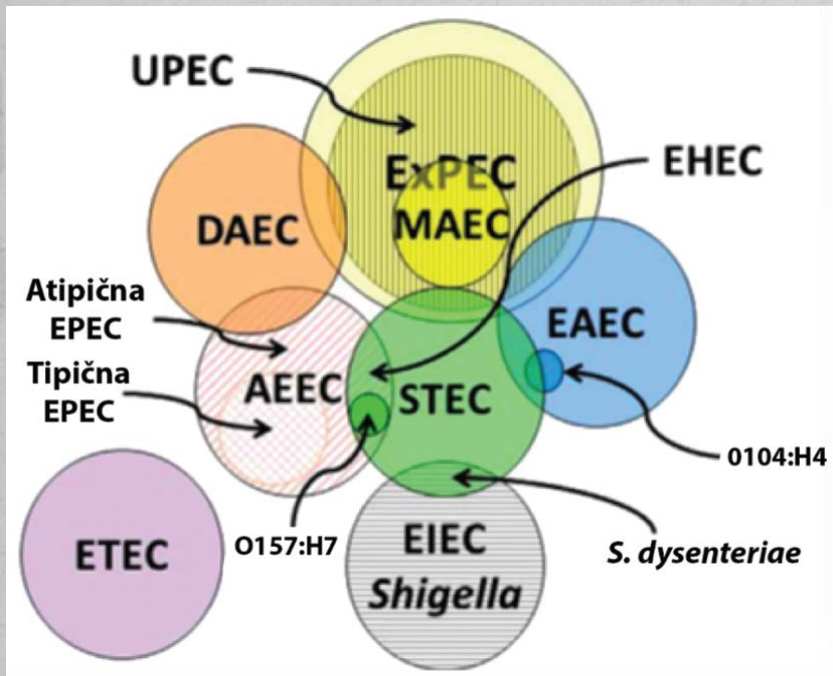
EAEC



Pretežno kolon
Formiranje mikrokolonija
Toksini slični enterotoksini

Ekstraintestinalna oboljenja prouzrokovana sojevima *E. coli* kod životinja

APEC	Sojevi <i>E. coli</i> patogeni za ptice - pile, polarna fimbrija, endotoksin, hemaglutinin, generalizovana bolest, često sekundarna bolest
SEPEC	Septikemični sojevi <i>E. coli</i> – fimbrije, receptor CS31a kod teladi, endotoksin, CNF, CDT, septikemija, pneumonija
UPEC	Uropatogeni sojevi <i>E. coli</i> – tip1, S i P fimbrije, a hemolizin i CNF1, urinarne infekcije i piometra psi
	Sojevi <i>E. coli</i> lokalne infekcije – oportunističke infekcije Mastitit, omfalitis, lokalne infekcije



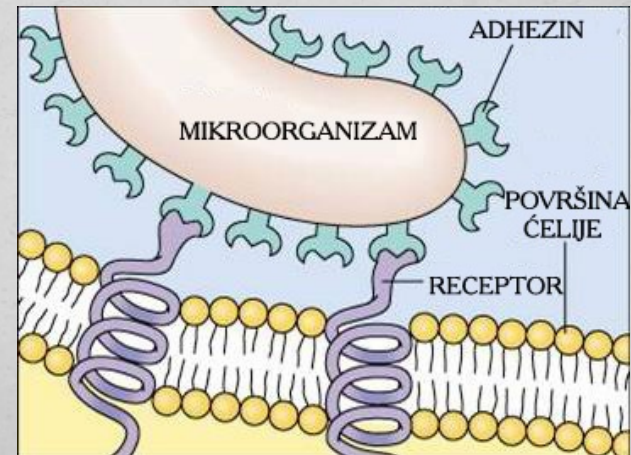
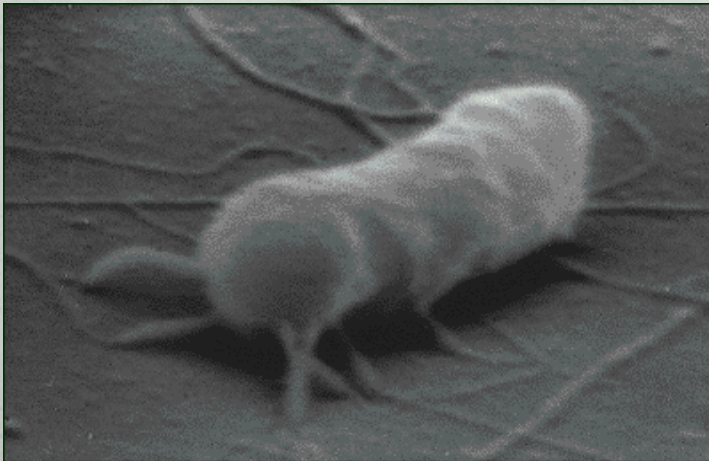
1. Intestinalni patotipovi *E. coli*

- enterotoksični patotip ETEC
- enteropatogeni patotip AEEC – EPEC
- Shiga toksin patotip STEC
- enteroagregatni patotip EAEC
- enteroinvazivni patotip *E. coli* EIEC
- difuzno adherentni patotip *E. coli* DAEC
- patogeni sojevi koji sadrže faktore virulencije svojstvene za više patotipova – enterohemoragični patotip *E. coli* EHEC

2. Ektraintestinalni patotip *E. coli* ExPEC

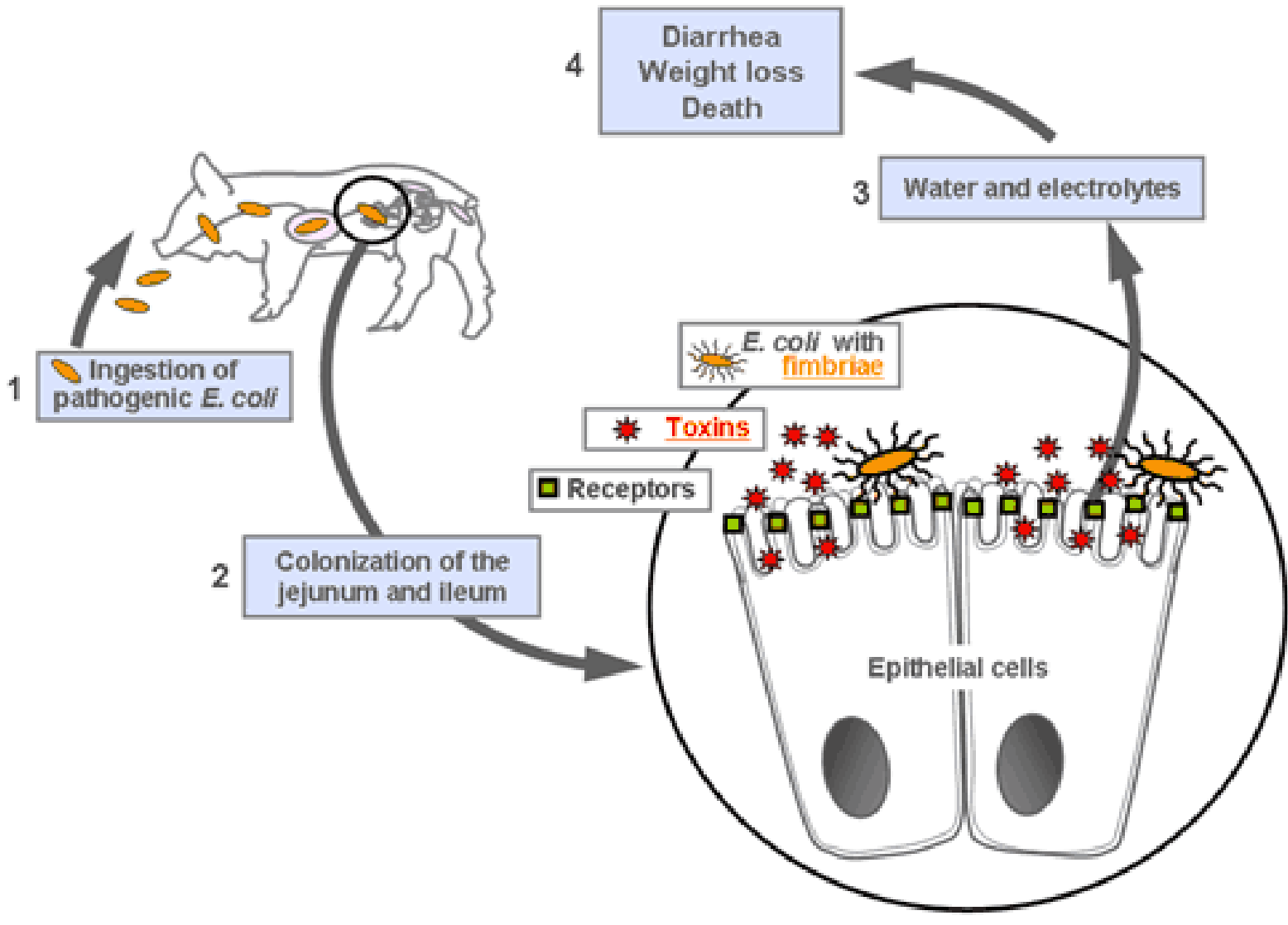
- patotip povezan sa meningitisom MAEC
- uropatogeni patotip *E. coli* UPEC
- određeni sojevi UPEC patotipa poseduju faktore virulencije svojstvene STEC, EAEC i DAEC patotipova.

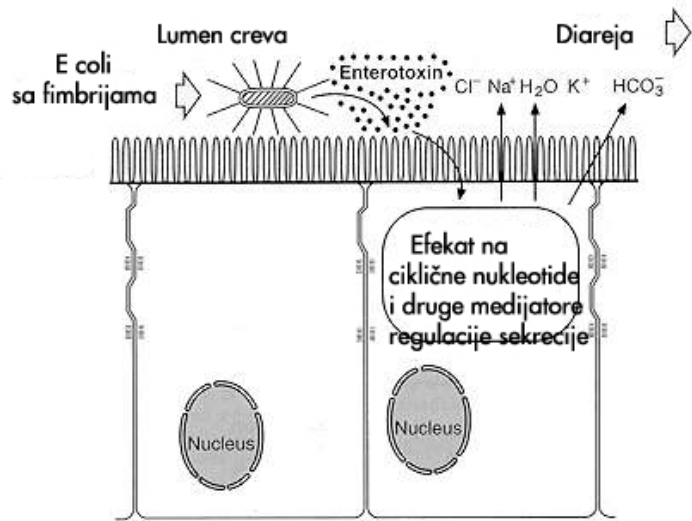
- U cilju determinacije patogenosti izolovanih sojeva *E.coli* primenjuju se brojni testovi za utvrđivanje sposobnosti kako kolonizacije creva tako i stvaranja određenih toksičnih produkata.
- **Adhezivne pile ili fimbrije** predstavljaju važne faktore kolonizacije jer omogućuju vezivanje bakterija za glikokaliks na površini epitelnih ćelija jejunuma i ileuma. Najvažnije adhezivne fimbrije kod sojeva *E. coli* su – **K88 (F4), K99 (F5), 987P(6), F18 i F41.**



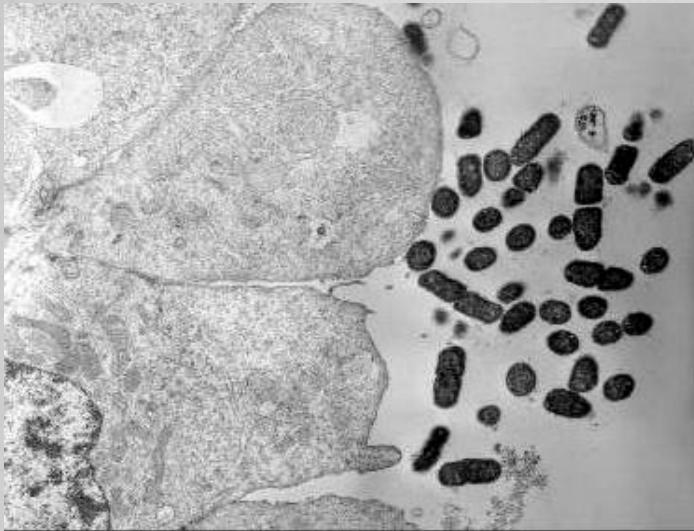
Enterotoksični patotip *E. coli* - ETEC

- Enterotoksični sojevi *E. coli* stvaraju termolabilni (LT) i termostabilni (ST) enterotoksin, a ova njihova sposobnost često je udružena sa prisustvom K88, K99 ili nekih drugih antigena kolonizacije.
- **Termolabilni enterotoksin** je antigenski srodan toksinu *Vibrio cholerae* i delovanjem na **sistem adenil ciklaze** dovodi do dijareje, a posledično i do hipovolemije, metaboličke acidoze i hiperkalemije
- Neonatalne dijareja teladi, jagnjadi, prasadi, štenci, proliv posle odlučanja prasadi

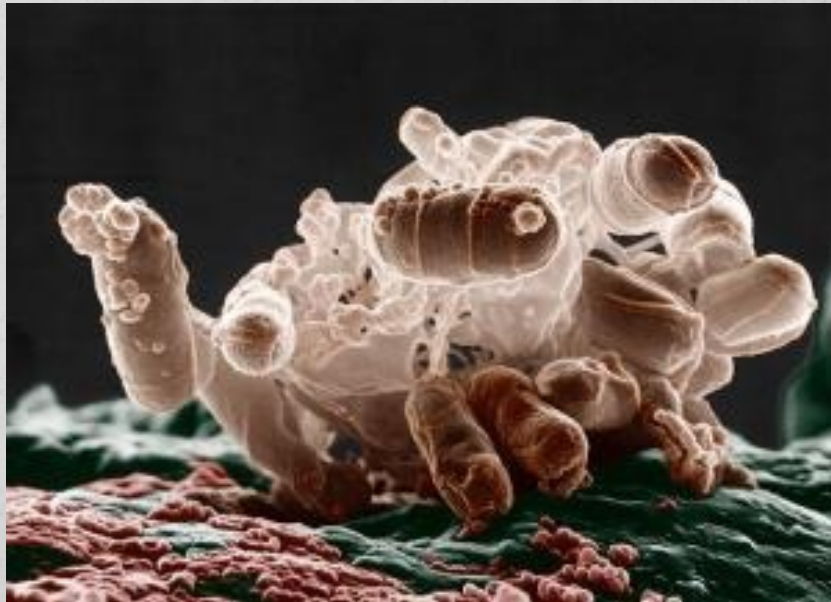
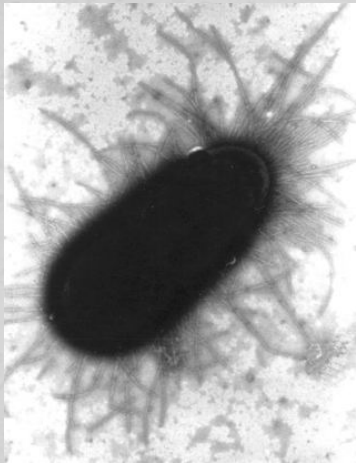




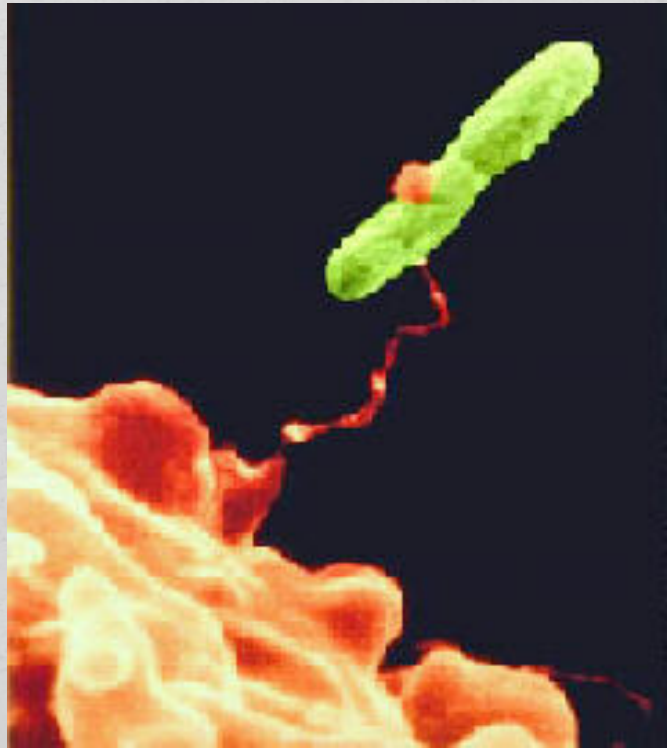
- **Dva tipa termostabilnog enterotoksina** od kojih je STa kodiran plazmidom deluje na **sistem guanilat ciklaze** dovodeći do akumulacije sadržaja i tečnosti u lumenu creva prasadi i bebi miševa.



- **Faktori adhezencije patogenih sojeva *E. coli* kod svinja su K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6) i F41, a kod teladi K99 (F5) i F41.**
- **Prisustvo receptora na epitelnim ćelijama tankih creva za adhezivne faktore zavisi od uzrasta životinja- kod teladi tokom prve nedelje života, a kod prasadi najmanje mesec i po dana starosti**



- Receptori se kod svinja za K88 nasleđuju kao dominantna osobina
- **Poseban faktor adherencije - "curli"** koji ima afinitet za ekstracelularne proteine u epitelu creva

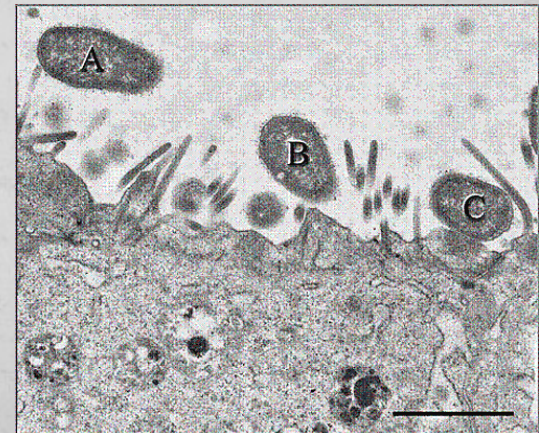


Vaccine



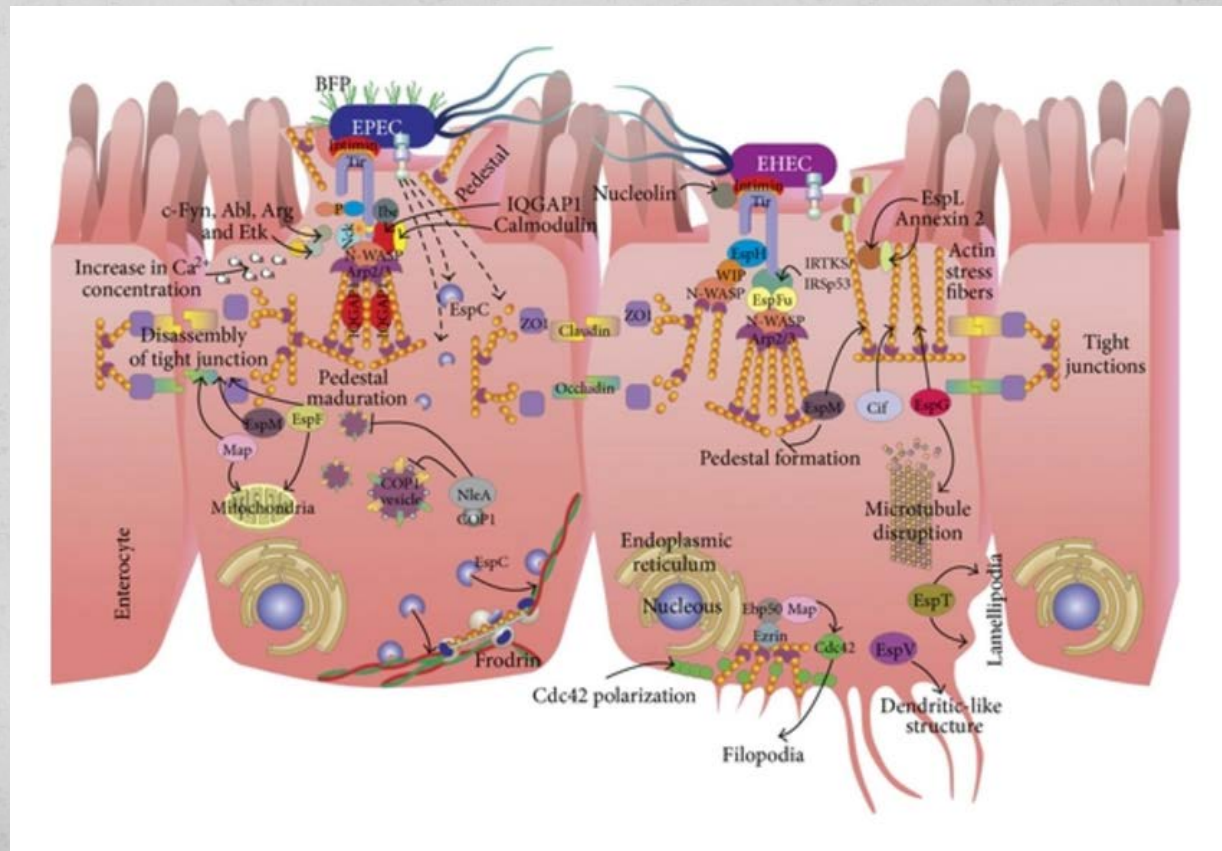
Attaching/effacing patotip *E. coli* – AEEC

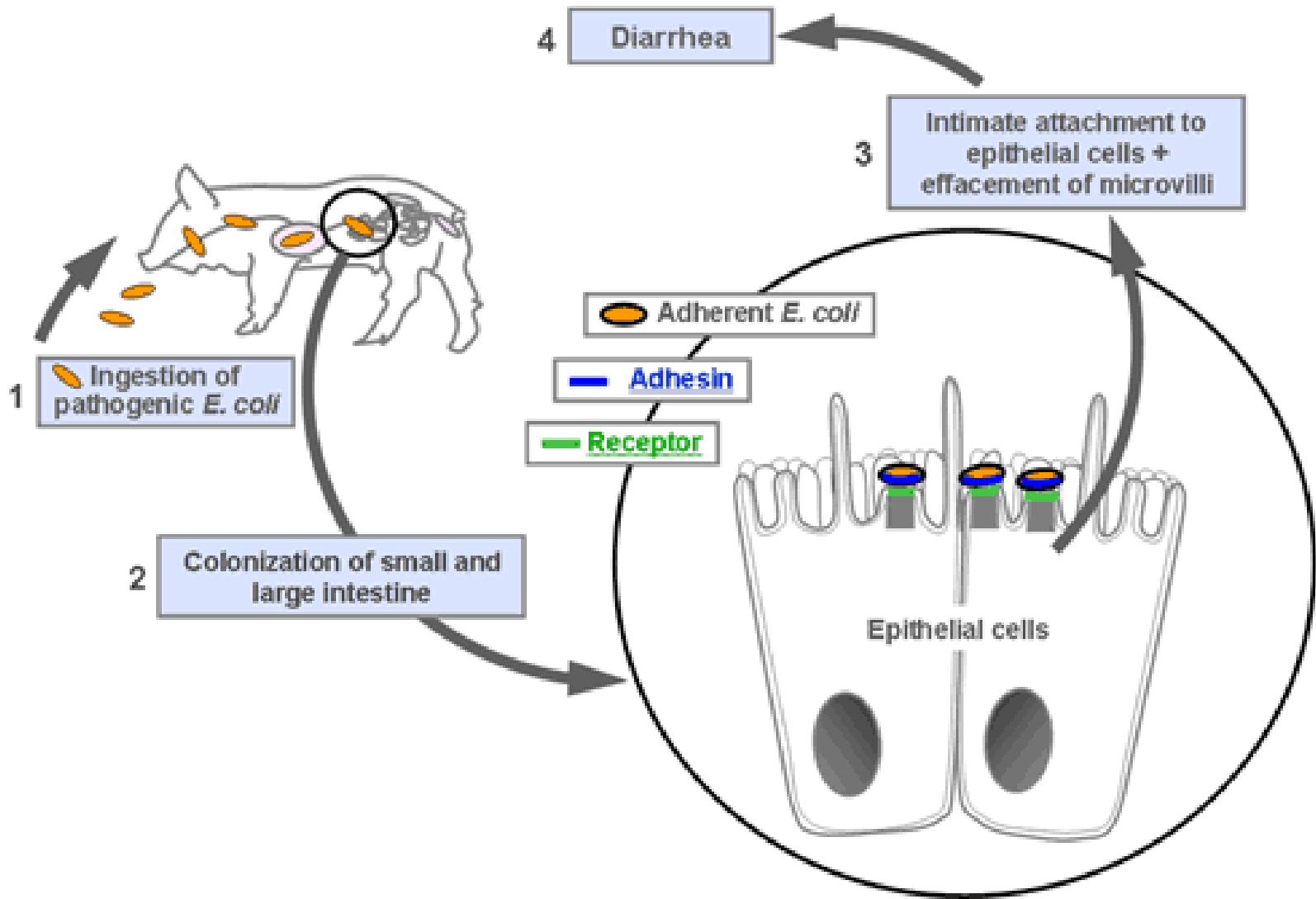
- Spadaju enteropatogeni EPEC i Shiga like toksin produkujući sojevi STEC
- Kolonizacija tankih i debelih creva
- **Priljubljanje za površinu enterocita i prouzrokovanje skraćivanje mikrovila**
- Degeneracija epitelnih ćelija i infiltracija neutrofilnih granulocita u lamina propria
- Pojava dijareje



Attaching/effacing patotip *E.coli* - AEEC

- **Enteropatogeni sojevi *E. coli* EPEC**
 - **Intimin** vezuje se za tir receptore, uništavanje – brisanje mikroresica odnosno formiranje pijedestala – ravne površine
 - Kunići, telad, svinje, psi



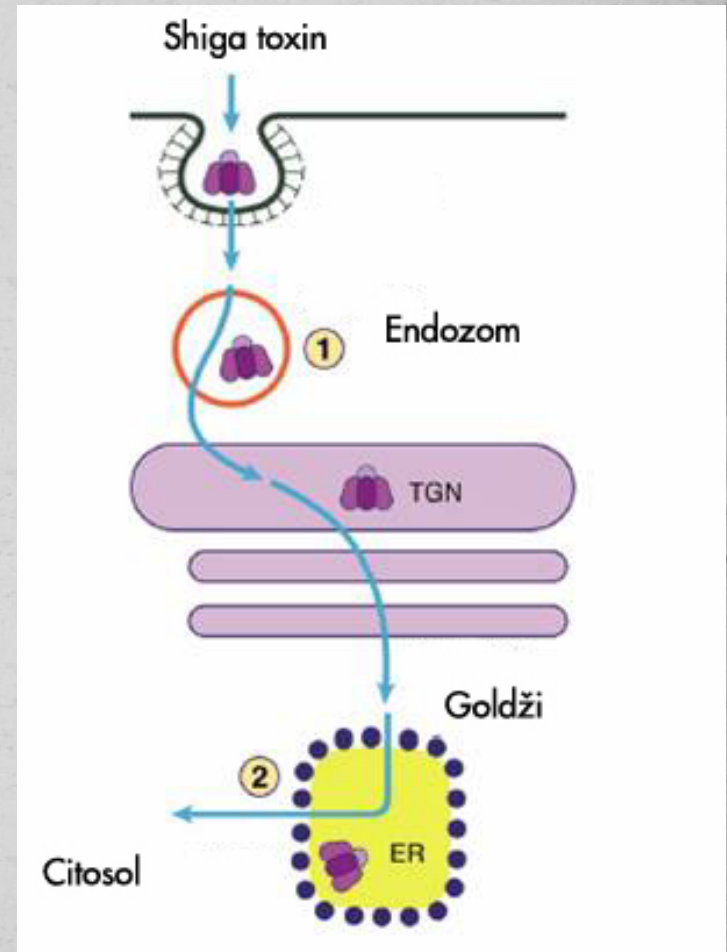


Attaching/effacing patotip *E.coli* – AEEEC

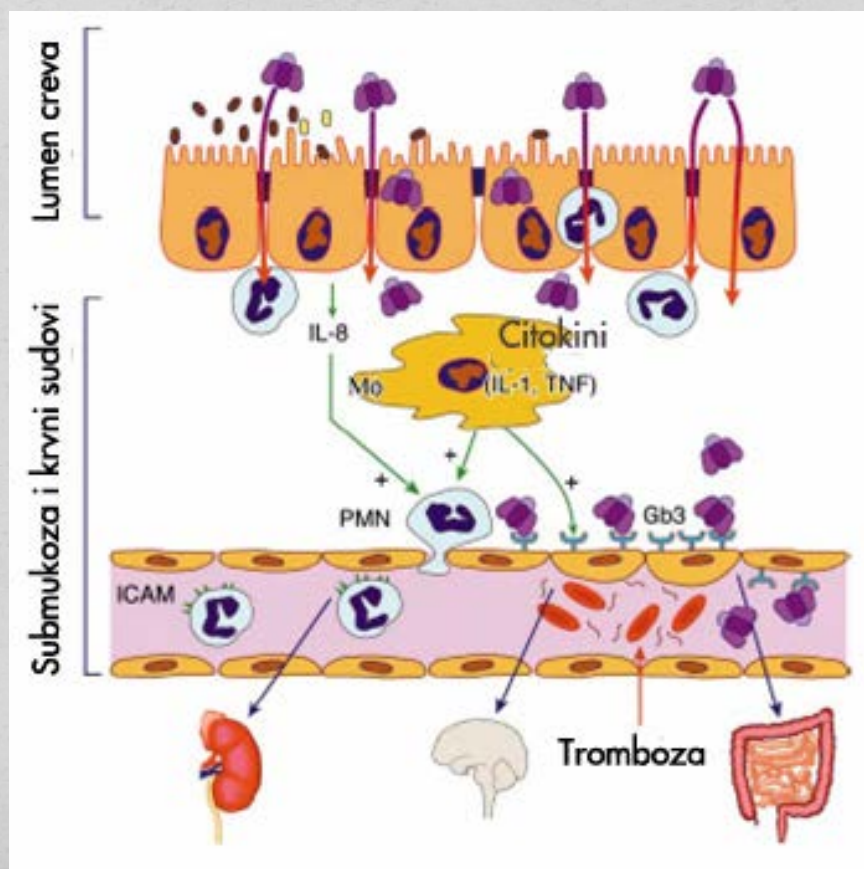
- **Sojevi *E. coli* koji stvaraju Shiga toksin STEC**
 - **Enterohemoragični sojevi *E.coli* EHEC**
 - Intimin, STx toksin, uništavanje mikroresica, retko se javlja kod teladi
 - **Sojevi *E. coli* edemske bolesti**
 - **F 18 fimbrije, STX2e toksin, α hemolizin, oštećenje endotela krvnih sudova, edemska bolest svinja nakon odlučnja**

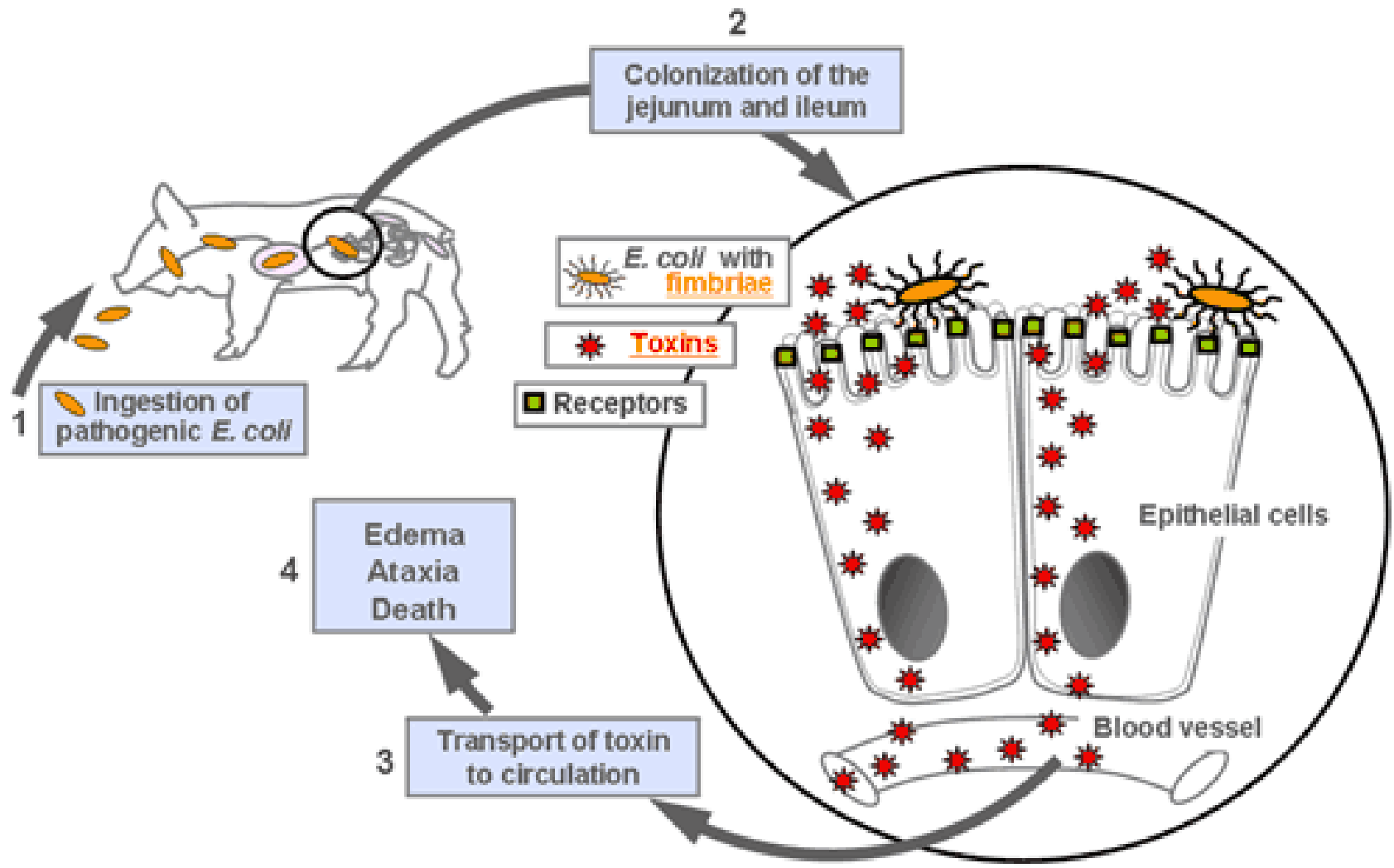
Shiga toksični patotip *E. coli*

- **Određeni sojevi *E. coli* deluju citotoksično na Vero ćelije sa dva toksina sličnih toksinu *Shigella* (Shiga like toxin-SLT).**
- **Oba toksina dovode do inhibicije sinteze proteina u ćelijama domaćina vezivanjem za 60S ribozomsku subjedinicu.**





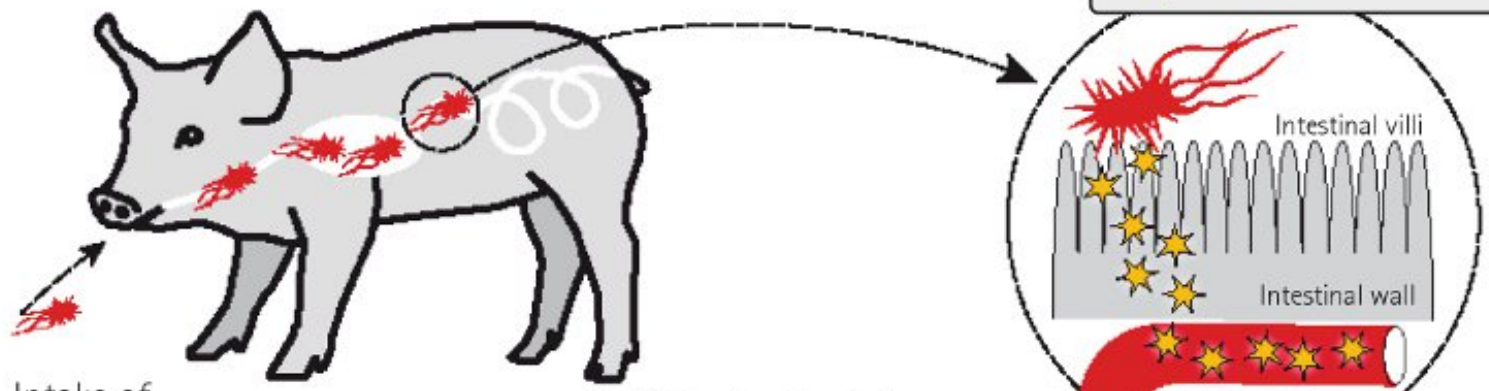
- **Hemoragični colitis** kod ljudi izaziva SLT-2, a prema novijim radovima prisutan je i kod **edemske bolesti svinja**, kao i kod sojeva O26 i O 111 kod novorođene teladi i prasadi.





2. Adherence and proliferation in intestine

 E.coli and fimbriae F18
 Shiga toxin Stx2e

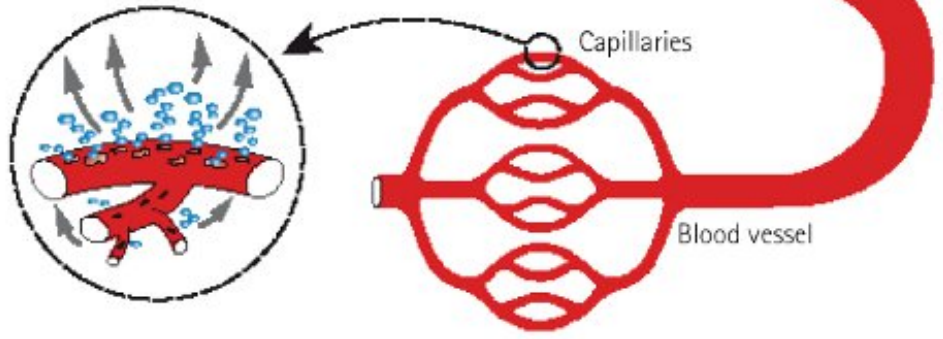






1. Intake of pathogenic E.coli

3. Shiga toxin destroys blood capillaries, fluid loss

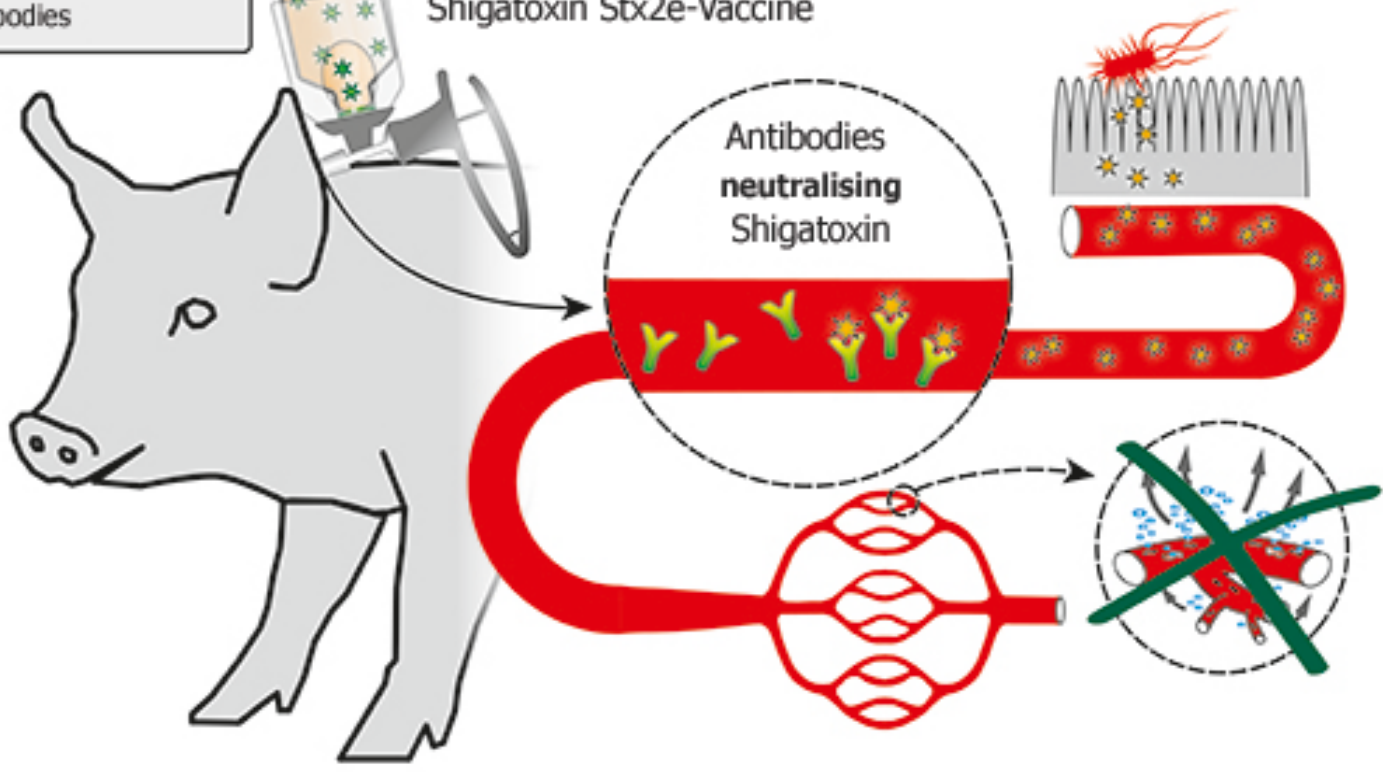
4. Clinical picture:

- Oedema
- Lying on the side
- Paddling
- High losses



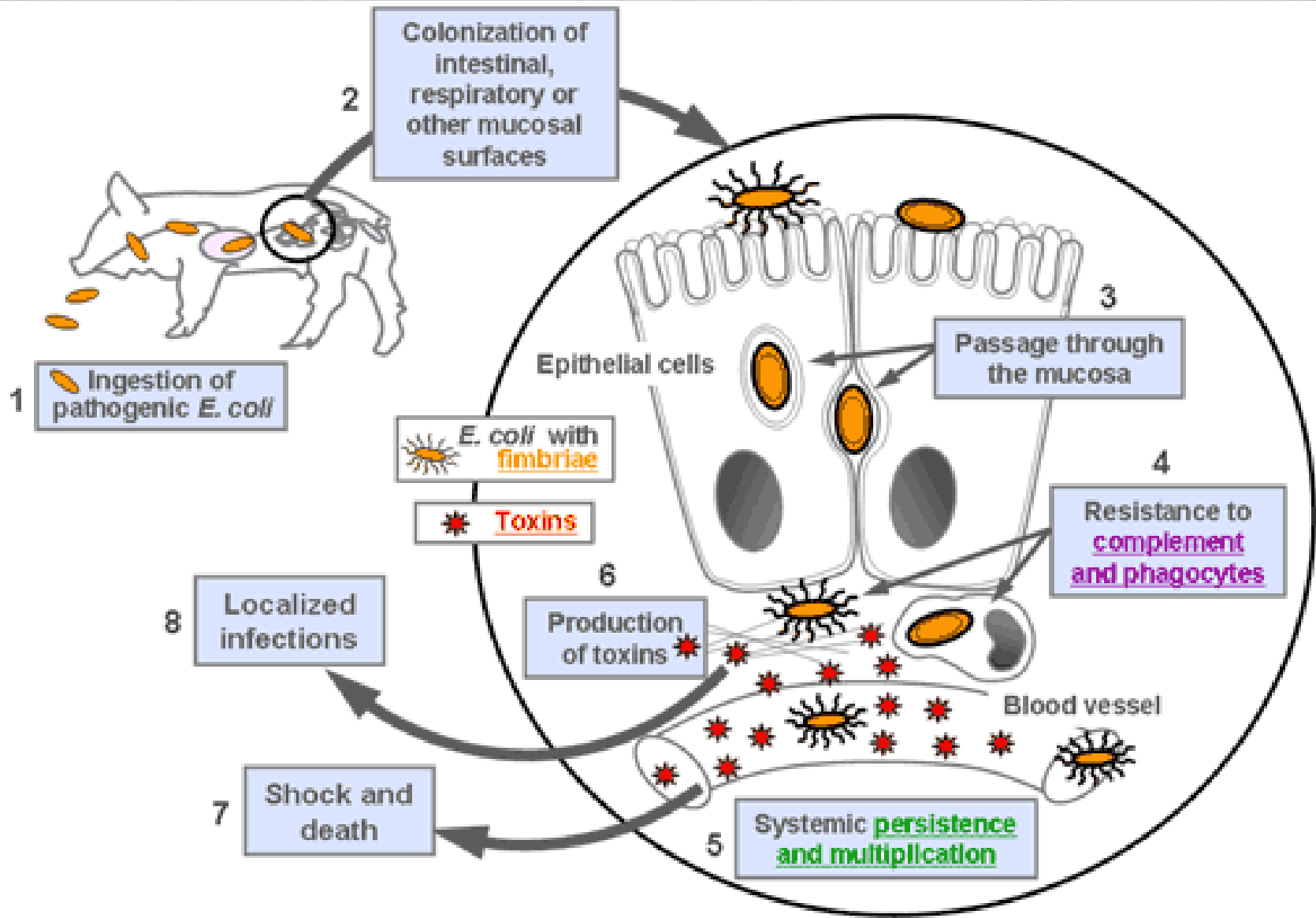
-  E.coli with F18-Fimbrien
-  Stx2e
-  Shigatoxin Stx2e-Vaccine
-  Antibodies

One Shot
Shigatoxin Stx2e-Vaccine

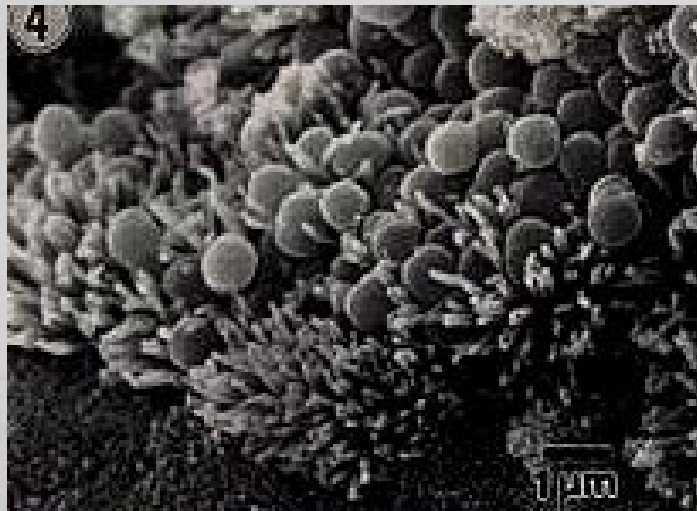
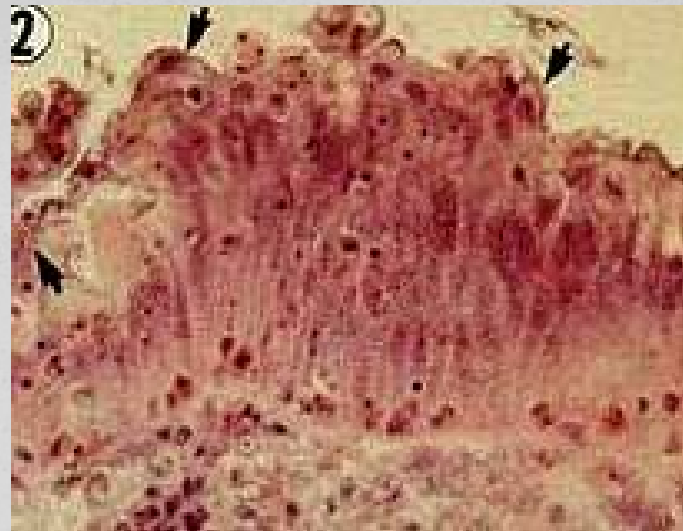


Ekstraintestinalni patotip *E. coli*

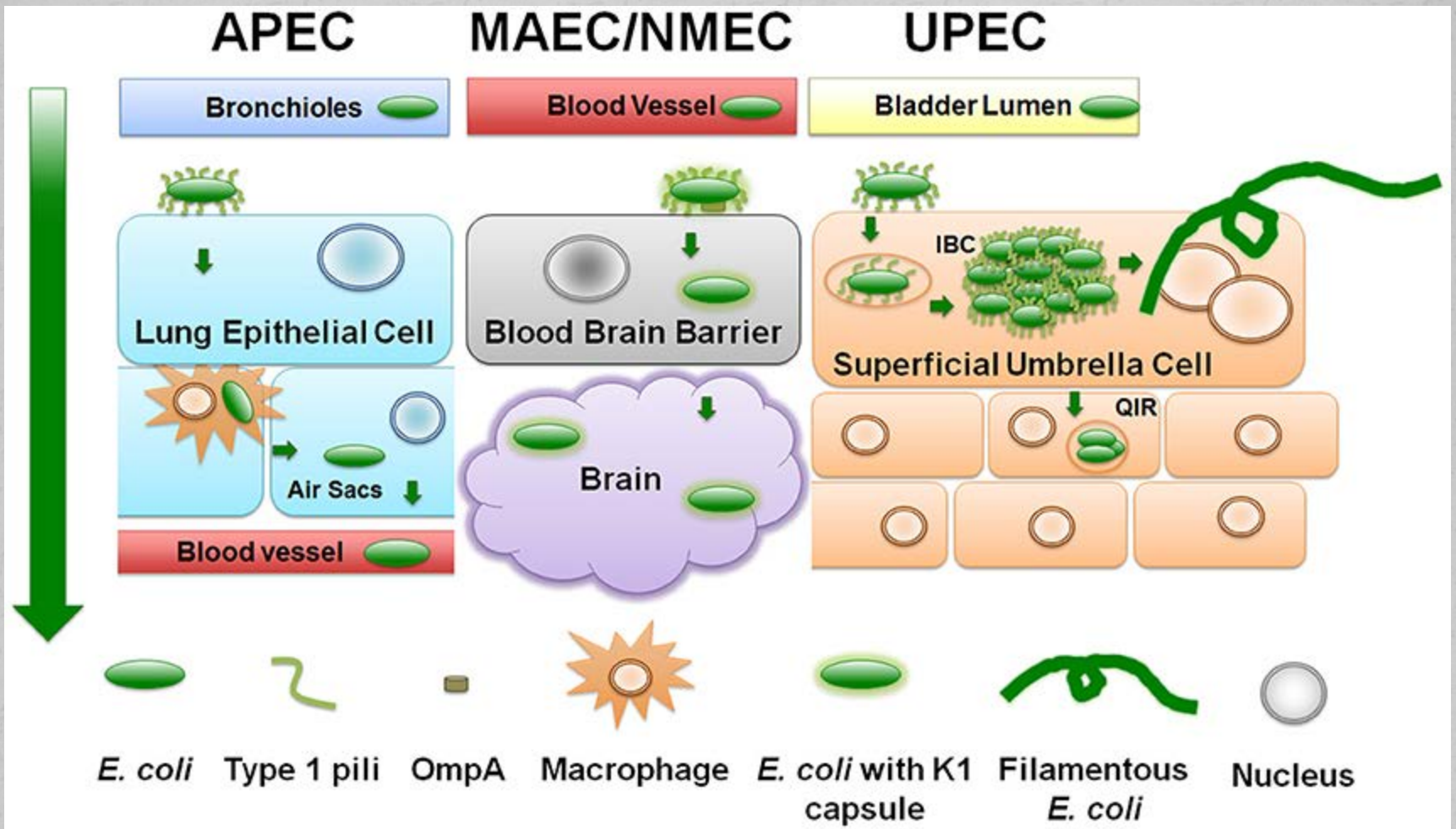
- **Infekcije enteroinvazivnim sojevima *E.coli*** vezivanje za target ćelije u distalnom delu tankih creva pomoću adhezina CS31A i F17
- Pomoću citotoksičnih nekrotičnih faktora **CNF1 i CNF2** bakterije preko enterocita prodiru do limfotoka a zatim se krvotokom šire po organizmu
- Prisustvo kapsule, RTX hemolizina i rezistencije prema sistemu komplementa omogućava preživljavanje enteroinvazivnih *E. coli*



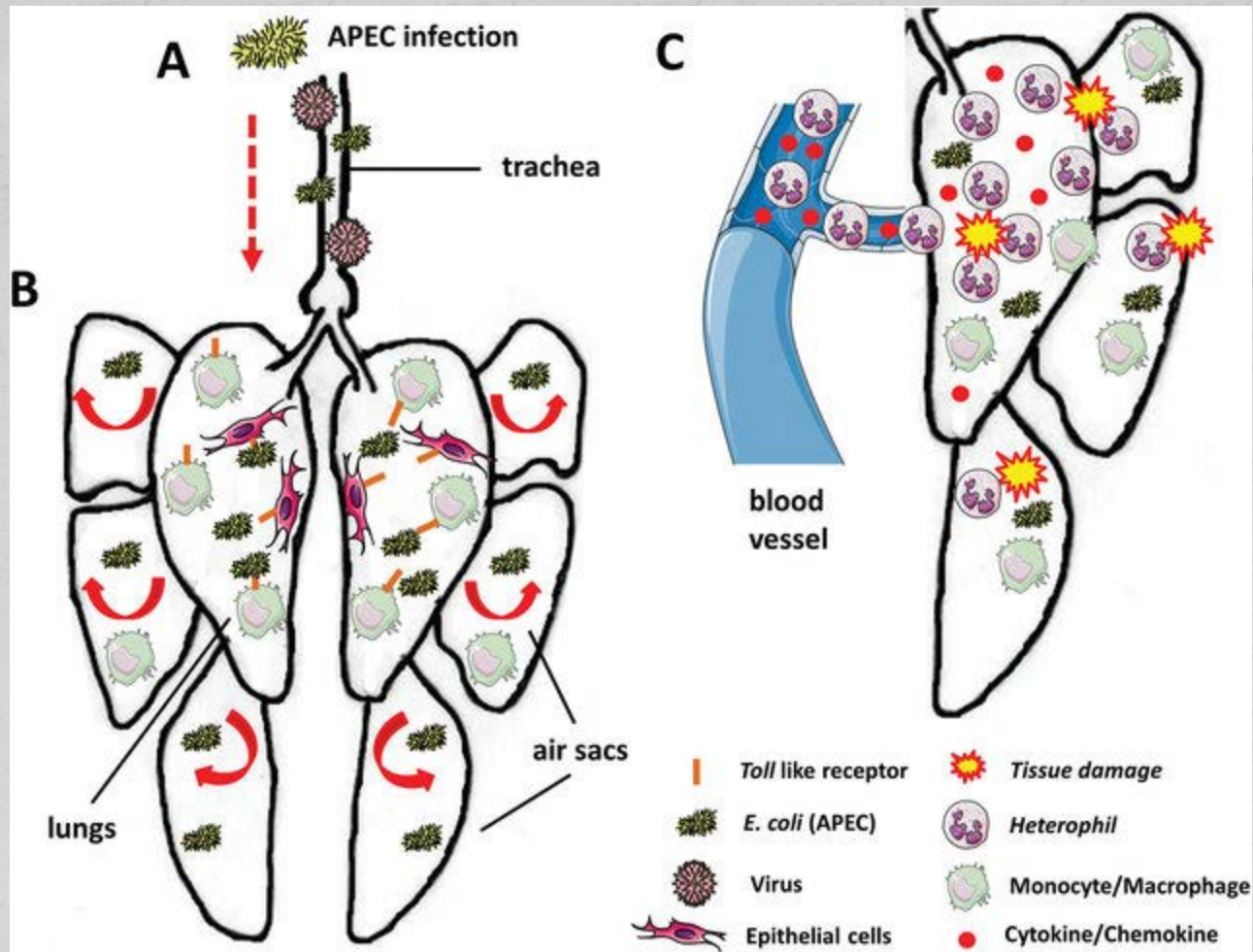
Sistemske (enteroinvazivne) septikemije



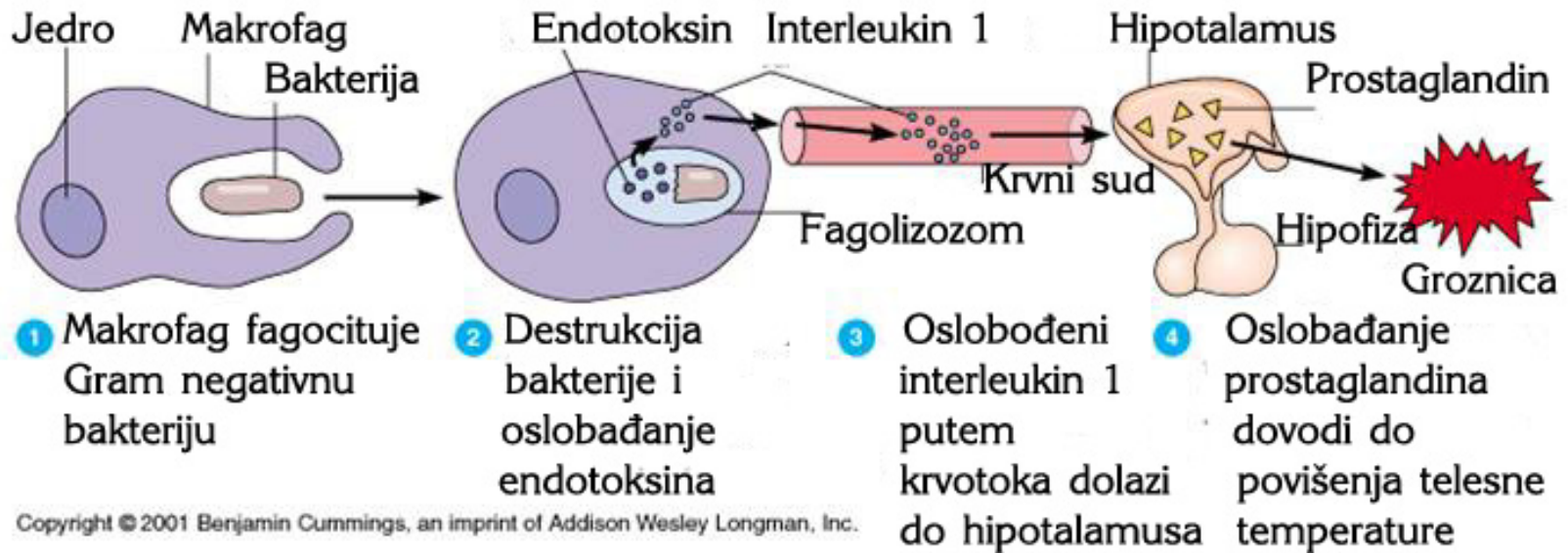
Sistemske (enteroinvazivne) septikemije



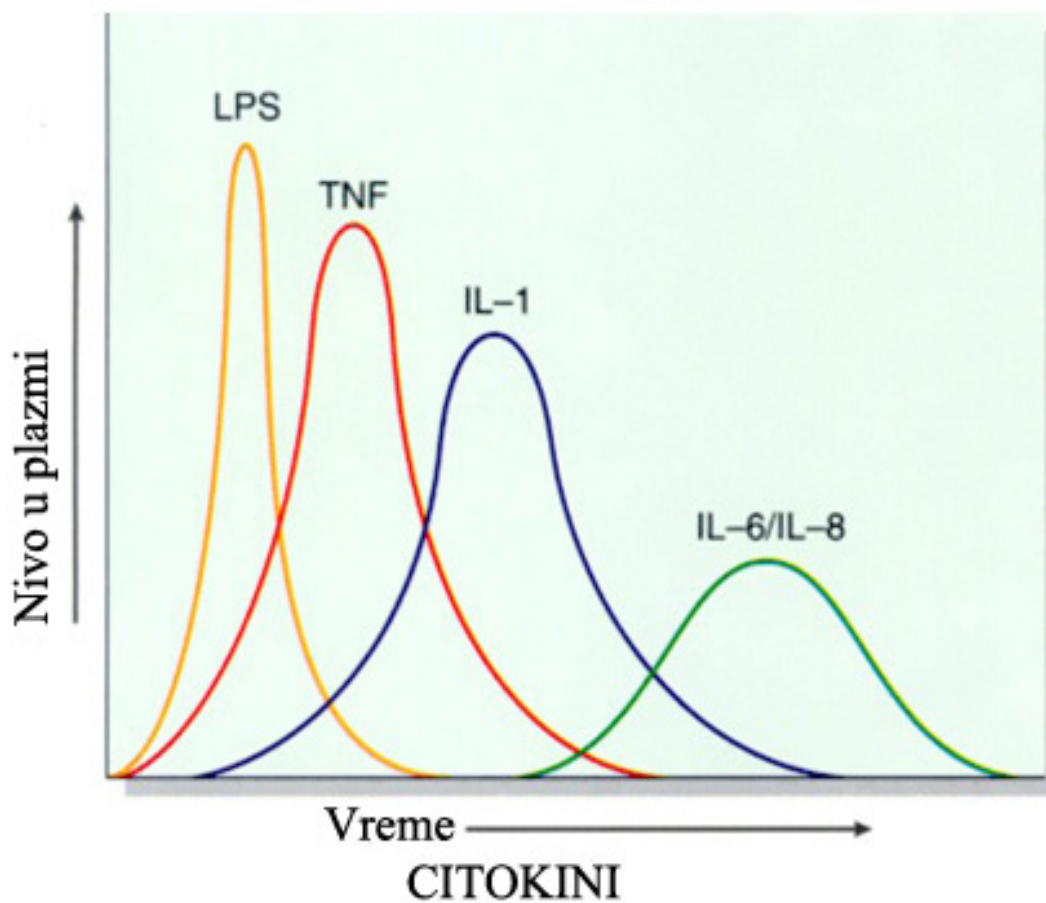
APEC - Sojevi E. coli patogeni za ptice



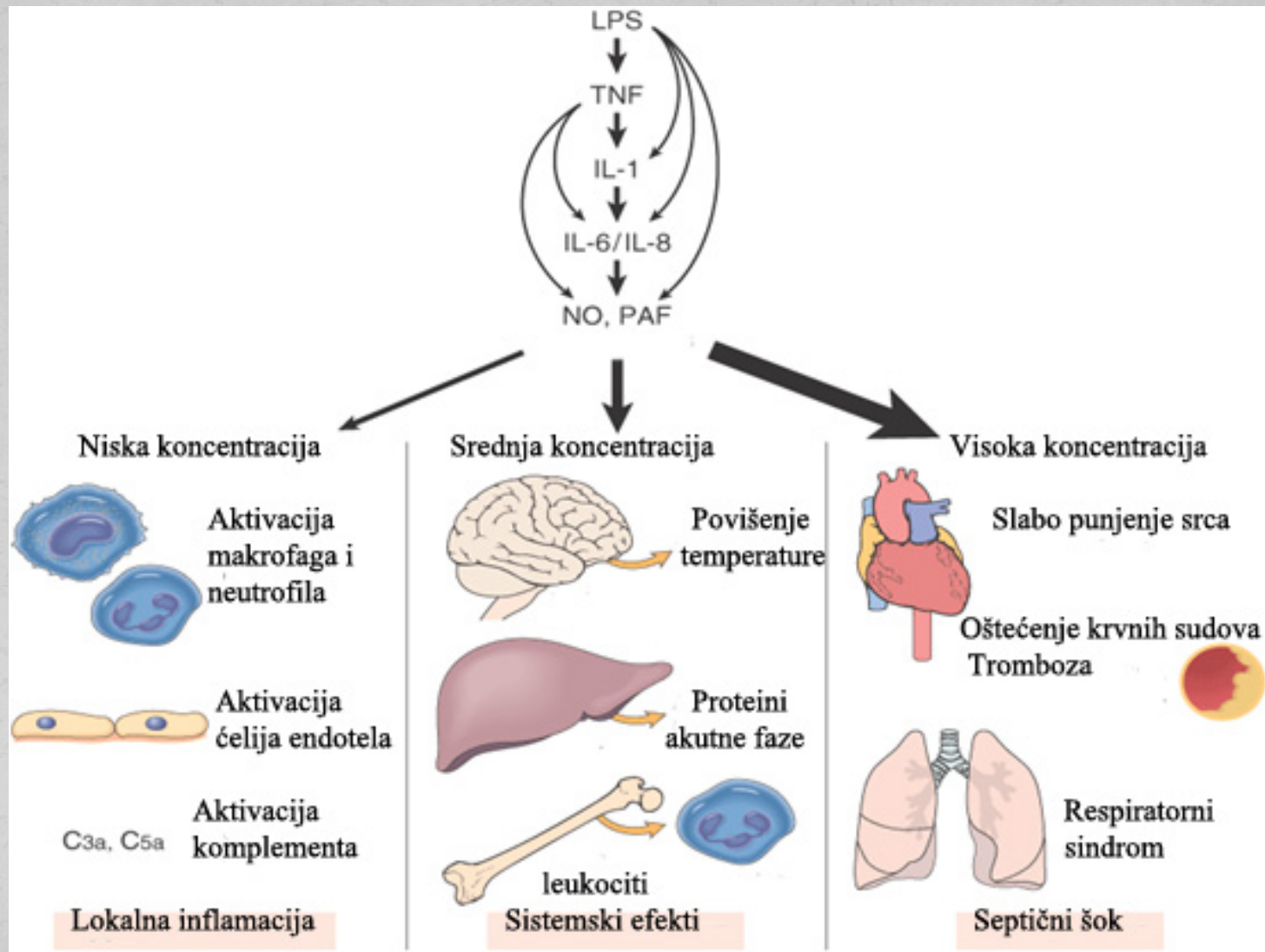
Endotoksin



LPS i oslobađanje citokina



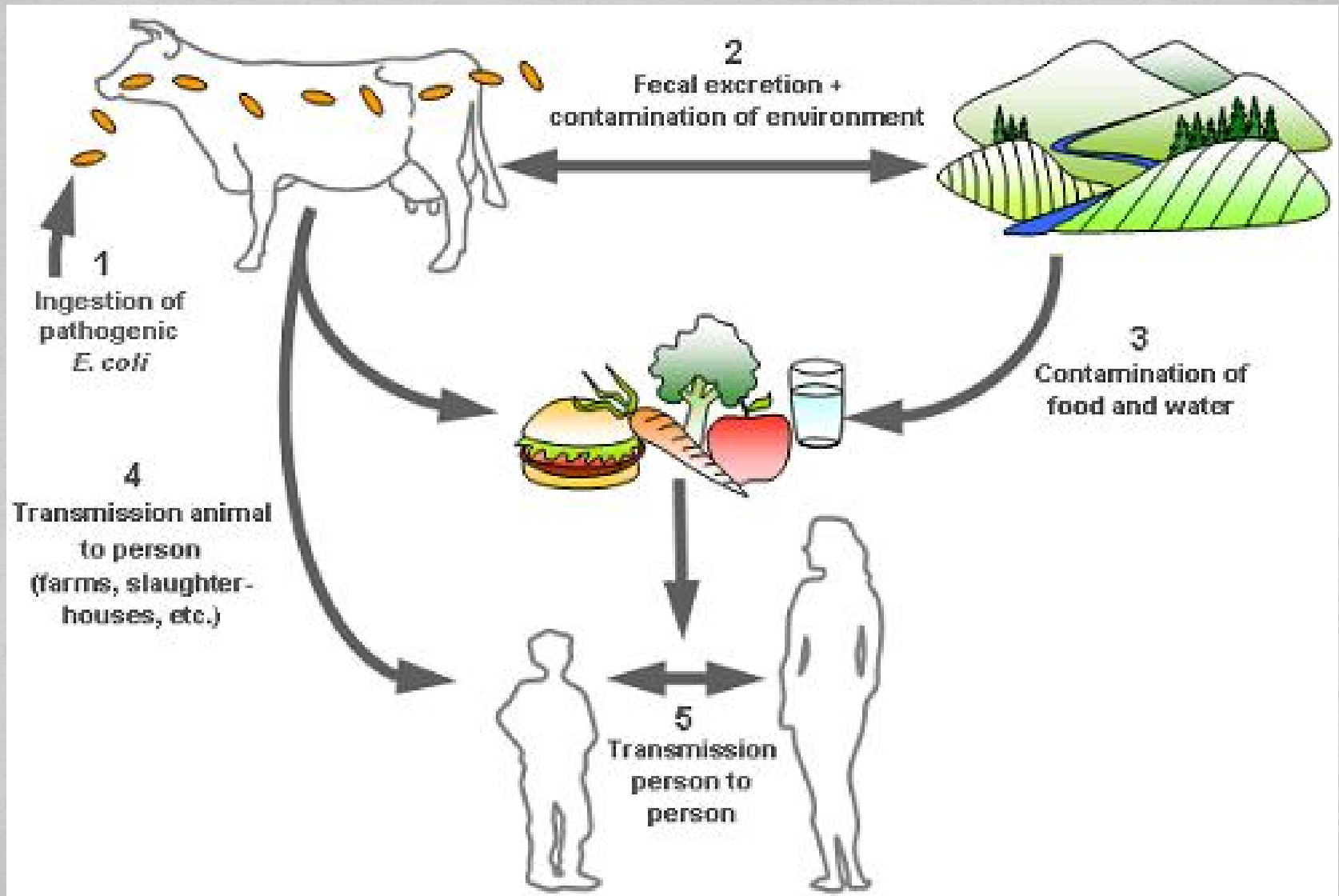
LPS i septični šok



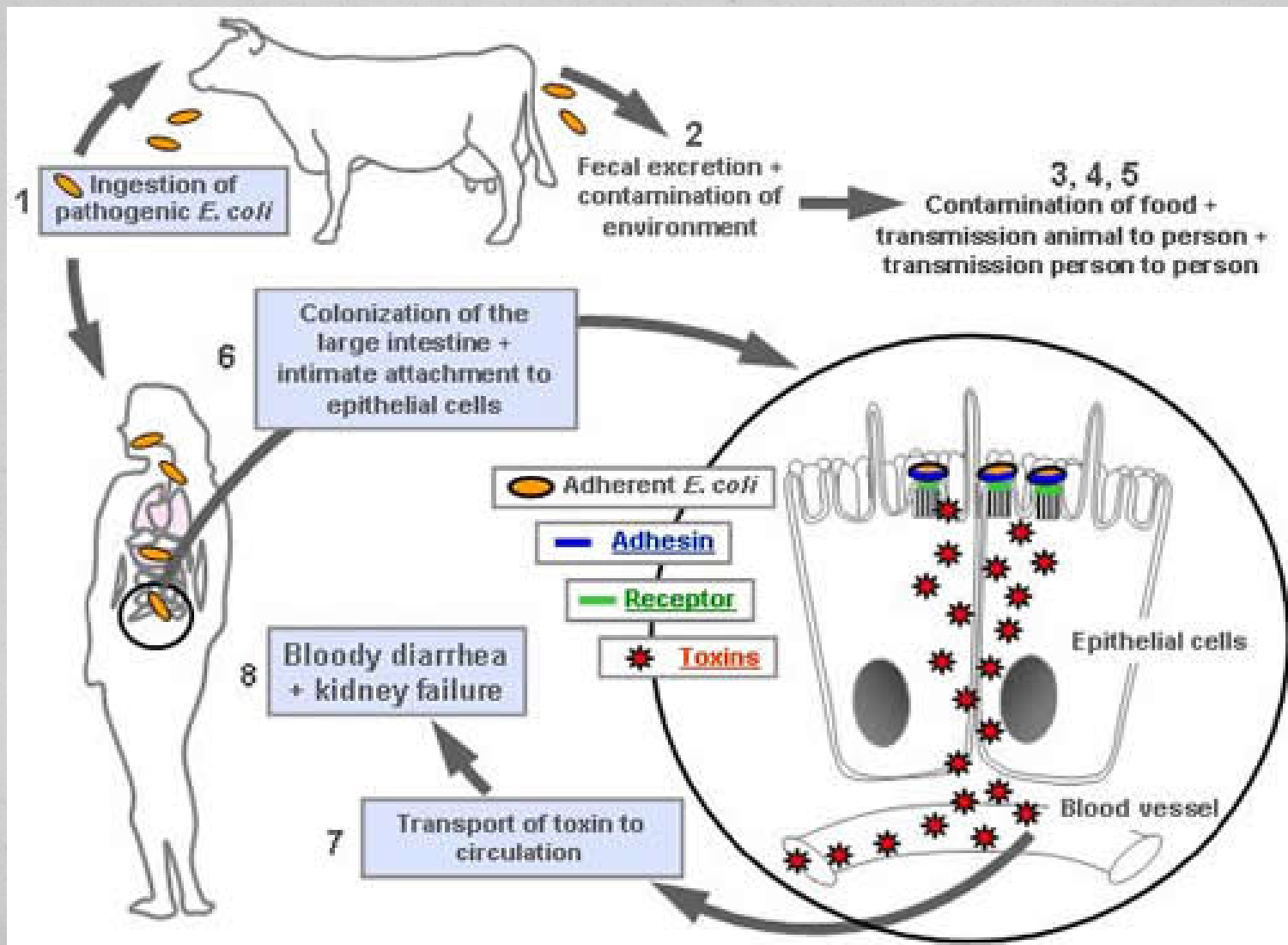
E. coli O157 H7

- Potencijalno patogeni soj *E. coli* O157 H7 može biti prisutan u digestivnom traktu goveda bez kliničke manifestacije.
- Putem fecesa može kontamirati okolnu sredinu – vodu, voće, povrće, a u klanici može doći do kontaminacije polutki – mesa, mlevenog mesa.
- Oboljenje otkriveno 1982 godine. Kod ljudi kolonizacija debelih creva i dolazi do sličnih lezija kao kod **attaching/effacing patotipa *E. coli***.
- Stvara se i **Shiga toxin** koji ulazi u cirkulaciju, oštećuje krvne sudovi - pojava krvave diareje a kod dece i hemolitičnog uremičnog sindroma i akutnog oštećenja bubrega.

E. coli O157 H7



E. coli O157 H7



Jack in the Box epidemija 1993 godine

- Fast food lanac restorana - 2200 objekata u SAD
- 600 obolelih
- 4 dece umrlo
- Washington state zakon unutrašnja temperatura mora biti najmanje 155 °F (68 °C)
- FDA zahtev u to vreme 140 °F (60 °C)



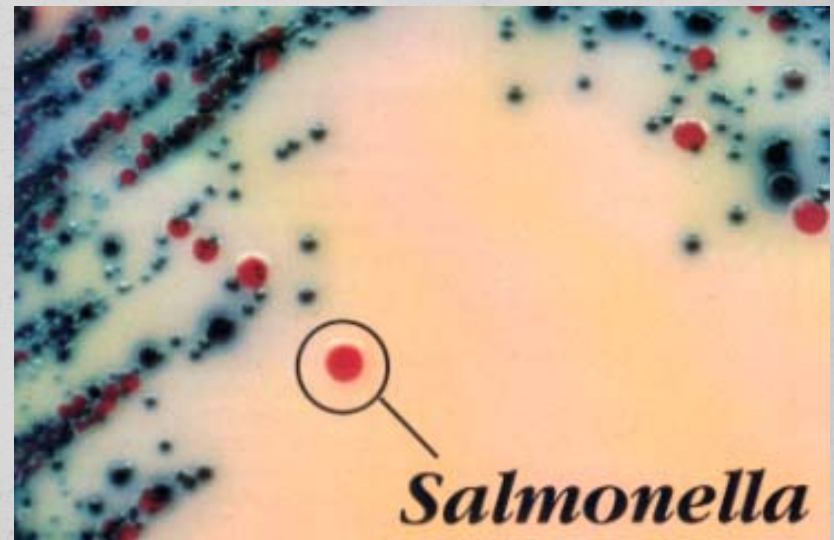
Posledice Jack in the Box epidemije 1993 godine



Salmonella spp.

- *Salmonella* spp. izazivaju infektivna oboljenja ljudi i životinja salmonelozu
- Mogu da obole sve vrste domaćih životinja, a posebno su prijemčive mlade i gravidne životinje

- **Tri glavne forme**
enteritis
septikemija
abortus



Do skoro rod salmonella sačinjavale su dve vrste
S. enterica* i *S. bongori.

Vrsta *S. enterica* je podeljena u 6 podvrsta:

Subspecies I = subspecies *enterica*

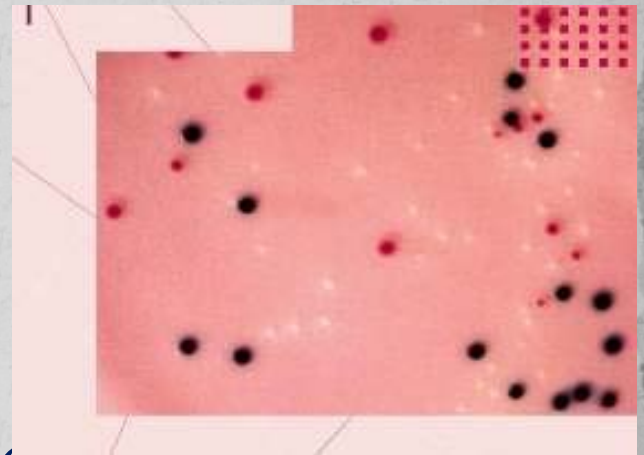
Subspecies II = subspecies *salamae*

Subspecies IIIa = subspecies *arizonae*

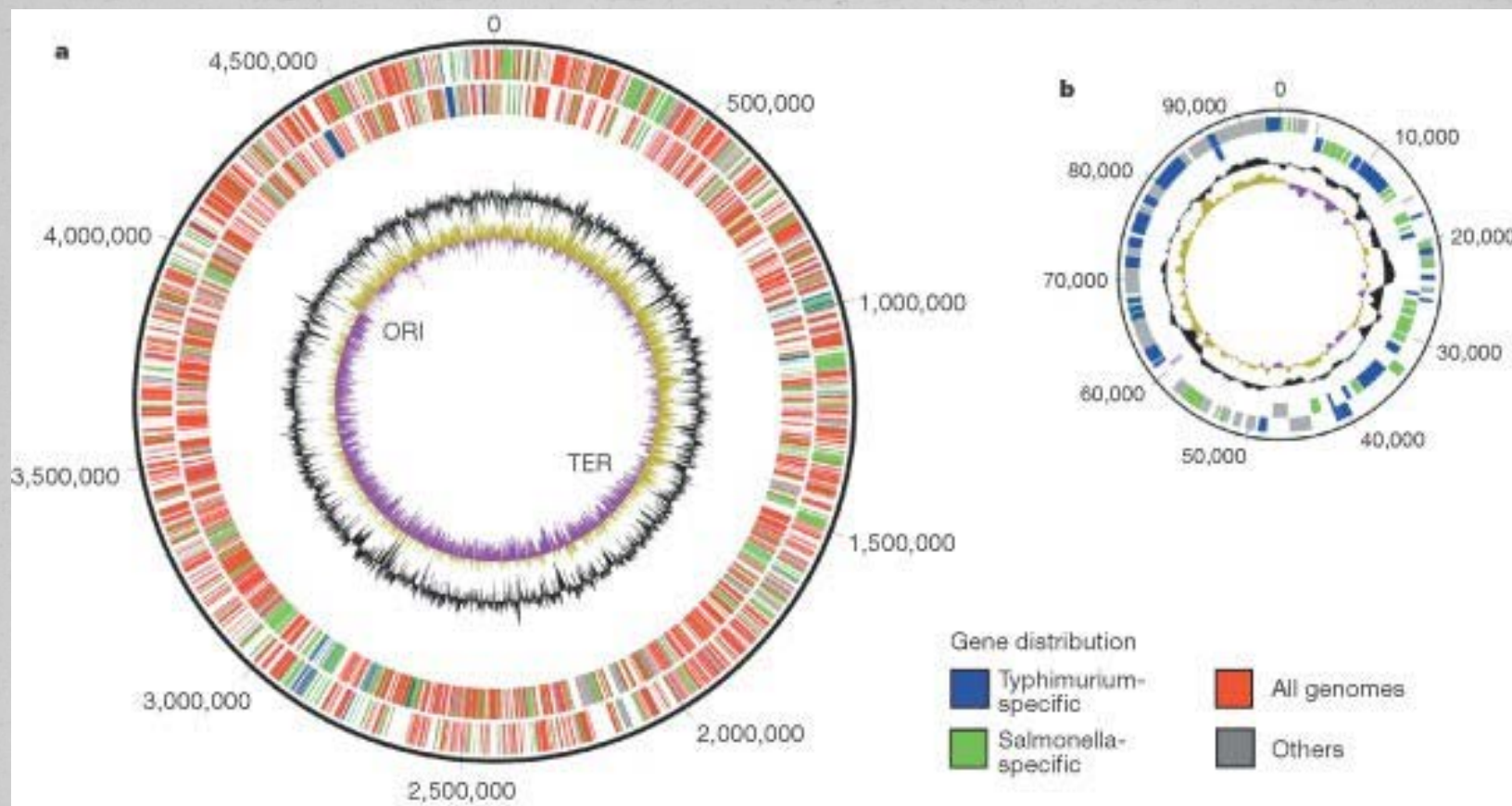
Subspecies IIIb = subspecies *diarizonae*

Subspecies IV = subspecies *houtenae*

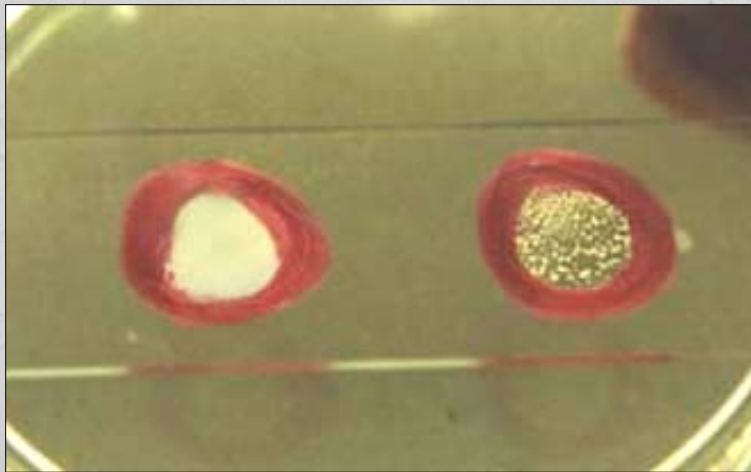
Subspecies VI = subspecies *indica*



Salmonella subterranea – treća vrsta nedavno priznata

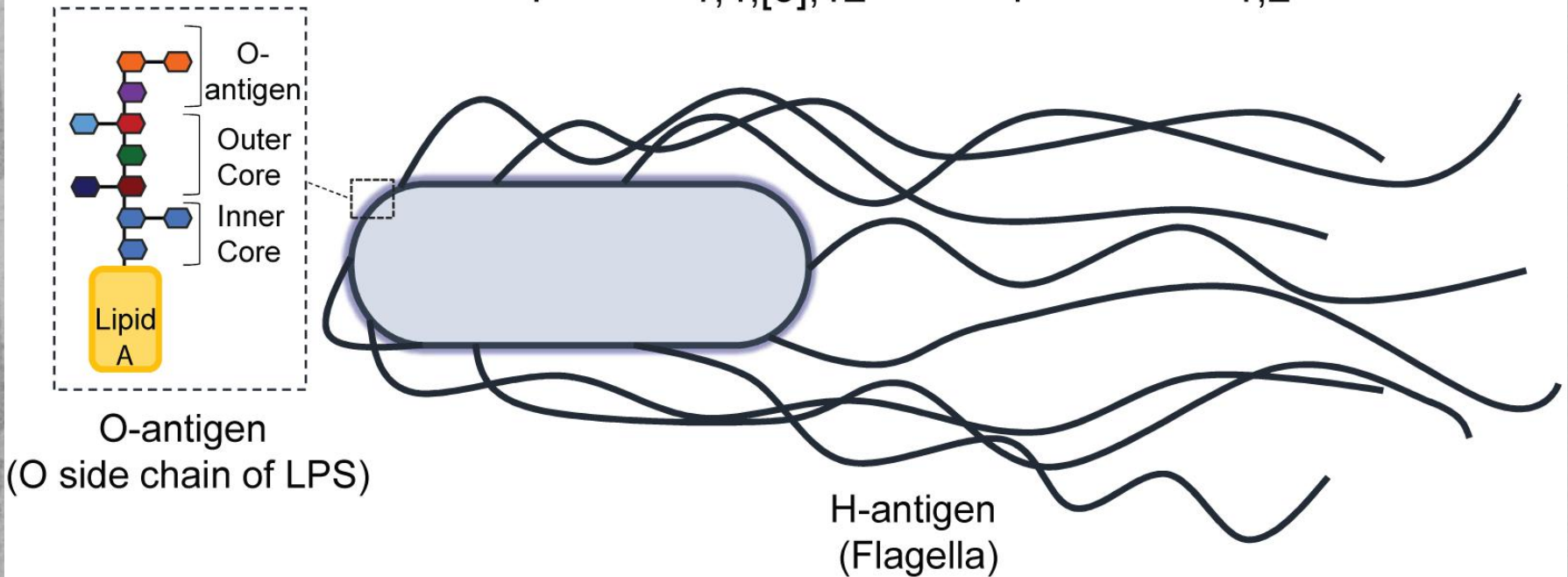


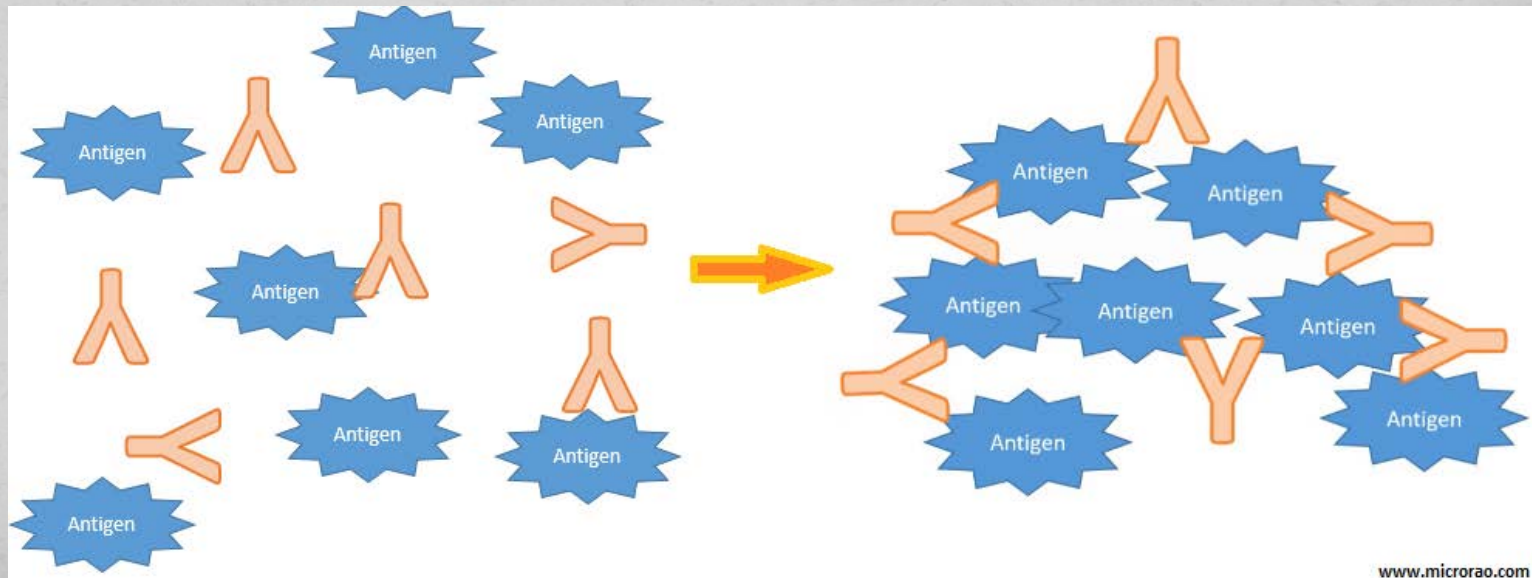
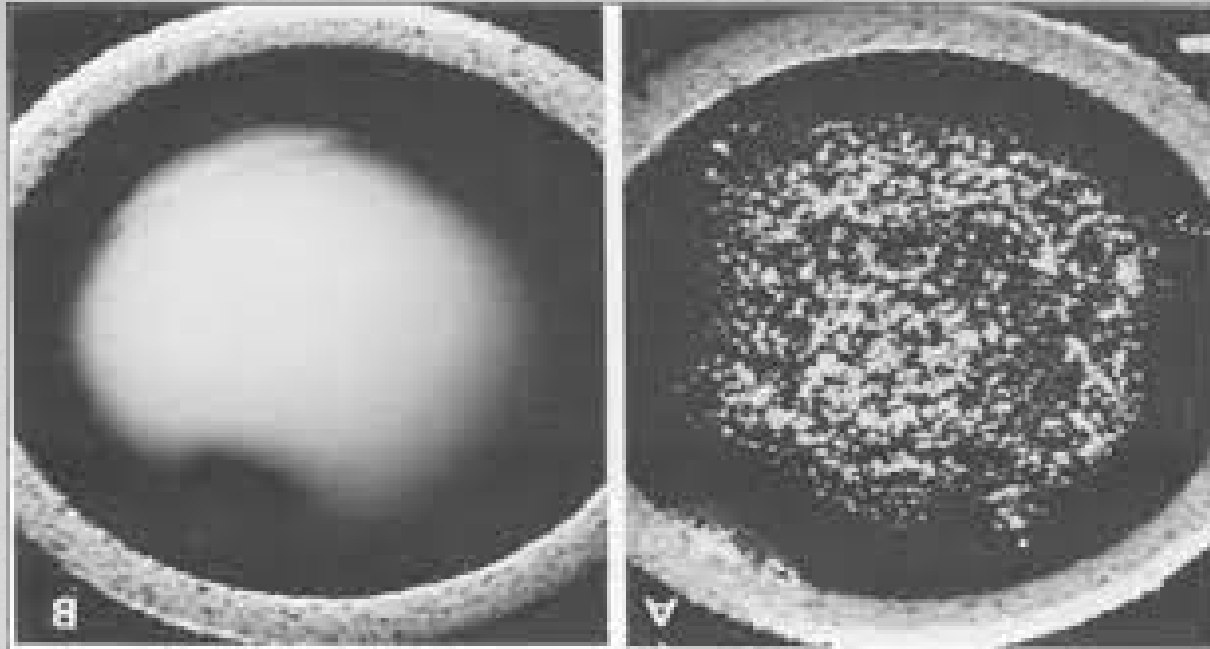
- Na osnovu građe O somatskog, H flagelarnog i Vi kapsularnog antigena *Salmonella* spp. su klasifikovane u serovarijetete (serotipove)
- Prema Kauffmann-White shemi do sada je otkriveno oko **2600 različitih serovarijeteta**, a taj broj se svakog dana povećava



Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Heidelberg

<u>Subsp.</u>	<u>O-antigen</u>	<u>Phase 1</u>	<u>Phase 2</u>
I	1,4,[5],12	r	1,2





Najvažniji serovarijeteti *Salmonella* spp.

Grupa <i>Salmonella</i>	Naziv serovarijeteta	O antigen	H-1 antigen	H-2 antigen
A	<i>S. Paratyphi</i> A	1,2,12	a	-
B	<i>S. Paratyphi</i> B	1,4,5,12	b	1,2
B	<i>S. Typhimurium</i>	1,4, [5], 12	i	1,2
C1	<i>S. Choleraesuis</i>	6,7	c	1,5
C1	<i>S. Choleraesuis</i> biotip Kunzendorf	6,7	[c]	1,5
D1	<i>S. Enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	[1,7]
D1	<i>S. Dublin</i>	1,9, 12, [Vi]	g, p	-
D1	<i>S. Gallinarum</i>	1, 9, 12	-	-
D1	<i>S. Pullorum</i>	9, 12	-	-
E1	<i>S. Anatum</i>	3,10	e, h	1,6

- Na osnovu adaptiranosti prema domaćinu serovarijeteti *Salmonella* su podeljeni u tri grupe:
- Serovarijeteti kojima su ljudi specifični domaćini uključujući *S. Typhi* i *S. Paratyphi* uzročnike tifusa i paratifusa ljudi
- Serovarijeteti kojima su određene vrste životinje specifični domaćini uključujući:

S. Dublin -goveda

S. Cholerasuis, *S. Typhisuis* –svinje

S. Pullorum, S. Gallinarum -živina

S. Abortusovis –ovce

S. Abortusequi -konji

- **Neadaptirani serovarijateći koji mogu izazvati infekcije i ljudi i životinja**

S. Typhimurium

S. Enteritidis



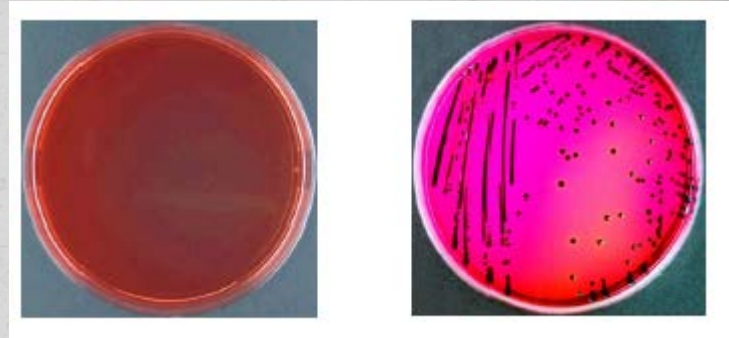
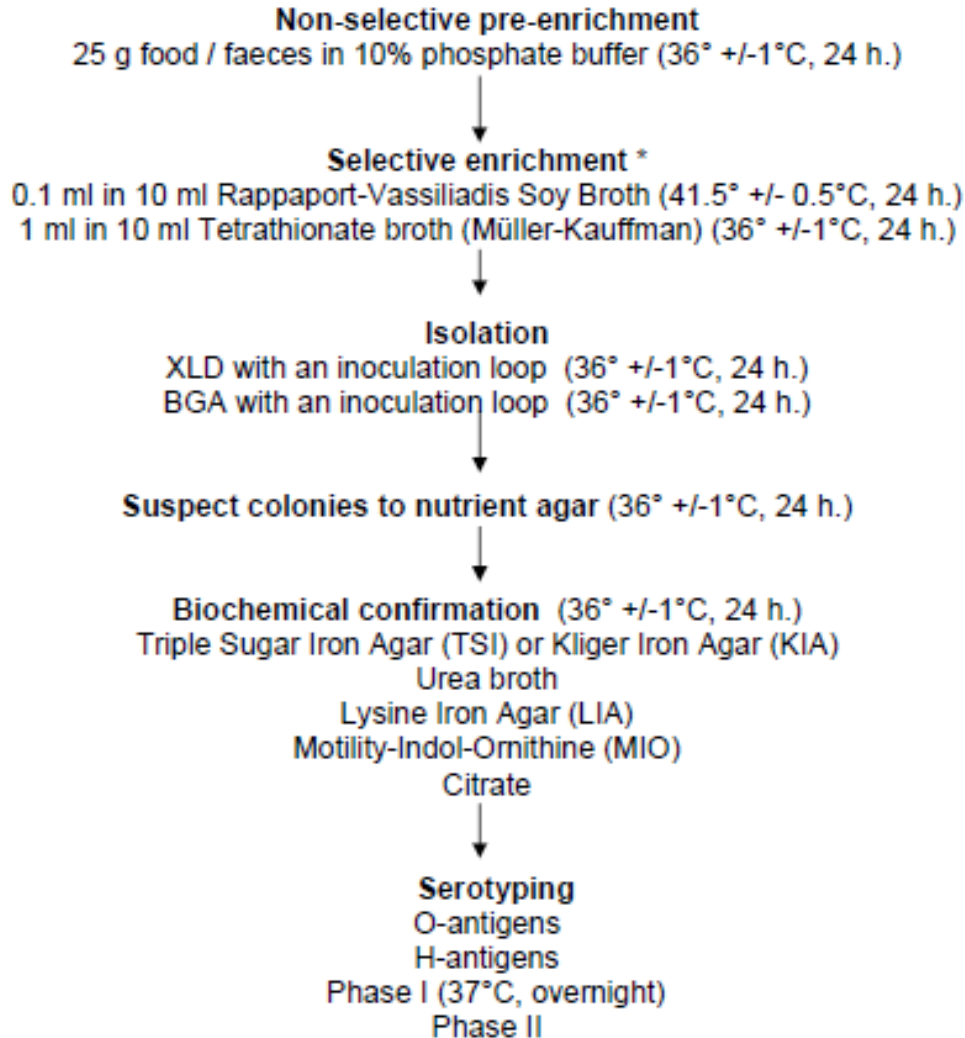
SRPS EN ISO 6579-1:2017 Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* — Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp.

SRPS CEN ISO/TS 6579-2:2014 Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju *Salmonella* — Deo 2: Određivanje broja primenom redukovane tehnike najverovatnijeg broja

SRPS CEN ISO/TR 6579-3:2014 Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju *Salmonella* — Deo 3: Uputstvo za tipizaciju *Salmonella* spp

SRPS CEN ISO/TS 6579-4:2020 Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* — Deo 4: Identifikacija monofazne *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) pomoću lančane reakcije polimerazi (PCR)

Flow diagram for isolation/identification of *Salmonella* from Food / Animal Faeces



**Ksiloza lizin
dezoksiholatni agar
(XLD)**

- U ispitivanom materijalu broj *Salmonella* i *Shigella* može biti mali ispod 1000 u gramu zbog čega se koriste podloge za obogaćivanje koje favorizuju rast određenih vrsta a inhibišu rast drugih.
- **Neselektivne podloge za predobogaćivanje-**
puferizovana peptonska voda



- **Podloge za obogaćivanje-** Rappaport- Vassiliadis
bujon, tetracionat Muller Kauffman bujon

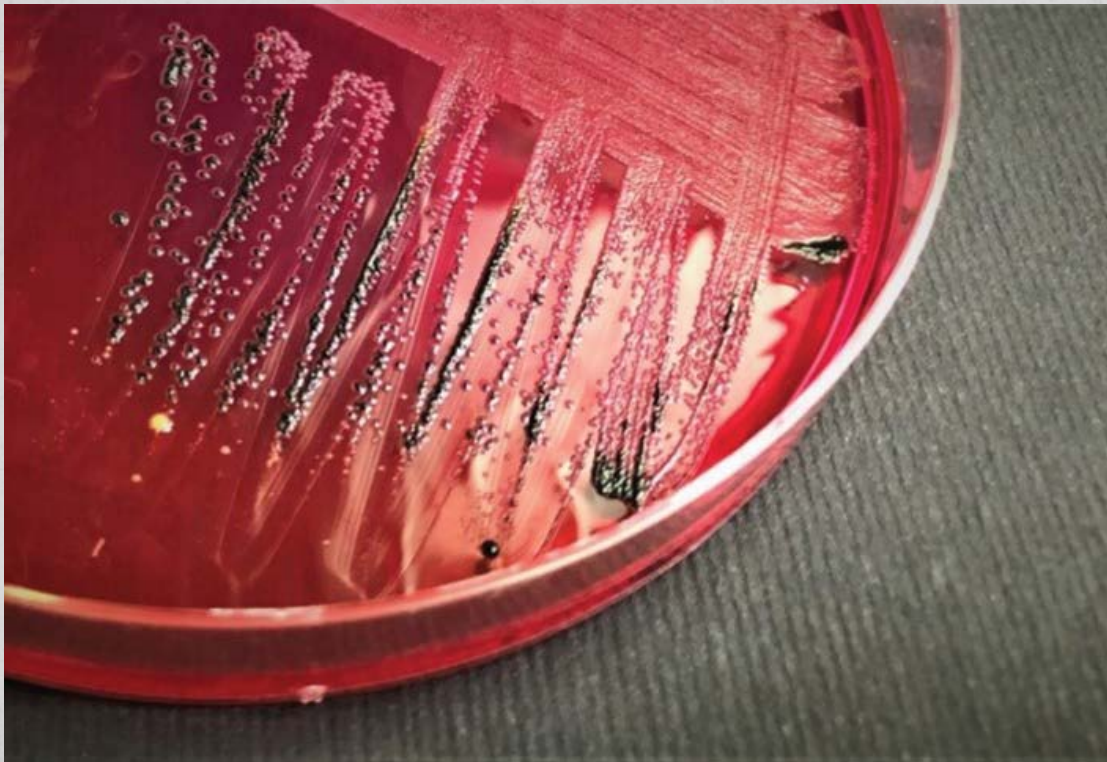


Ksiloza lizin dezoksiholatni agar (XLD)

Na-dezoksiholat – inhibicija Gram pozitivnih bakterija

Laktoza, sukroza, ksiloza, lizin

Indikator - fenol crveno



Ksiloza lizin dezoksiholatni agar (XLD)

Salmonella H₂S pozitivne – crvene kolonije sa crnim centrom

Shigella spp. and *Salmonella* H₂S negativne – crvene kolonije

E. coli – velike ravne kolonije žute boje

Proteus spp. - crvene ili žute kolonije

Enterobacter / *Klebsiella* - mukozne žute kolonije

Ksiloza lizin dezoksiholatni agar (XLD)
***Salmonella* spp.**



Ksiloza lizin dezoksiholatni agar (XLD)

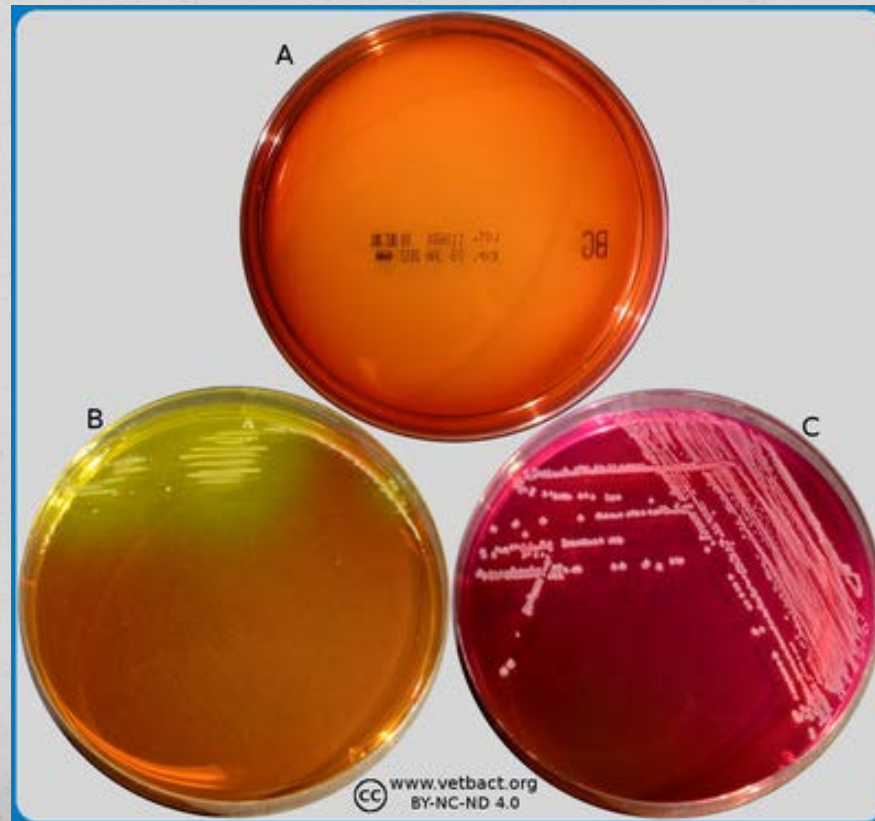
E. coli



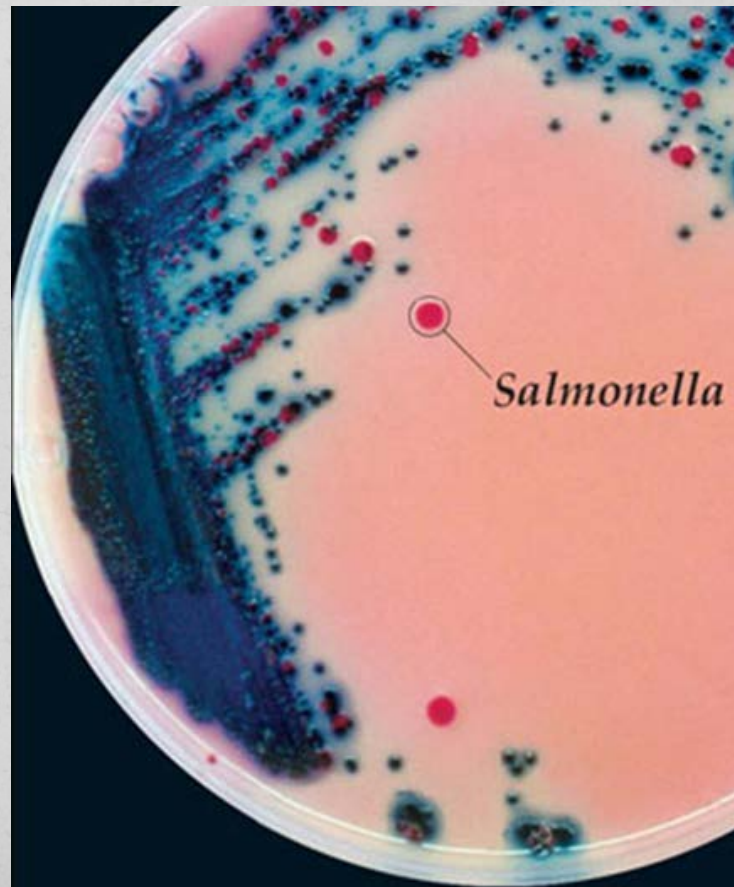
- **Agar sa brilijant zelenim** – laktoza, indikator fenol crveno

- *Salmonella* spp. - ružičaste ili crvene boje - C

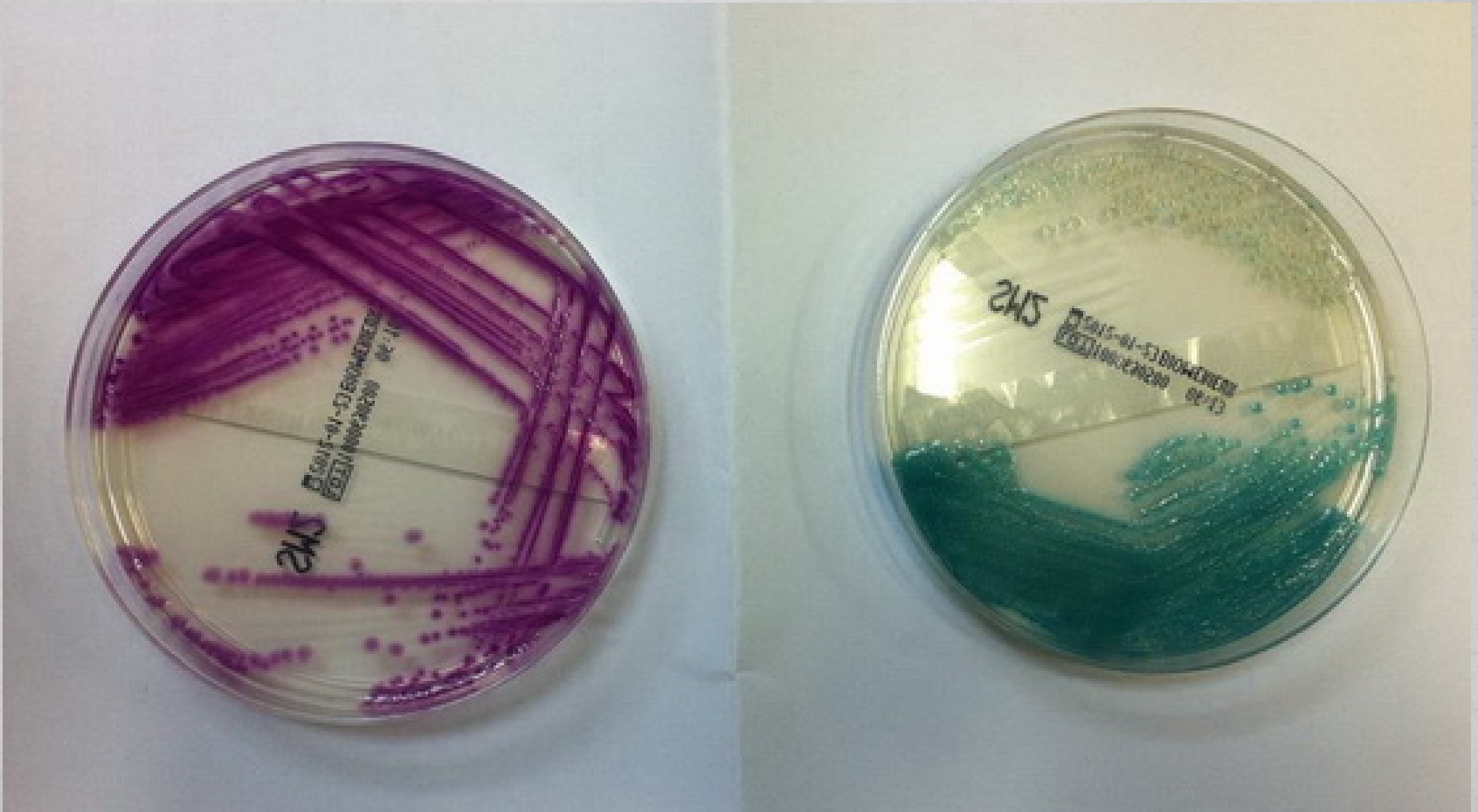
- *E.coli* - žute boje - B



Podloge sa obojenim supstratom
inkorporisana jedinjenja konjugovana sa
hromogenima ili fluoresentnom bojom



chromID™ Salmonella Agar

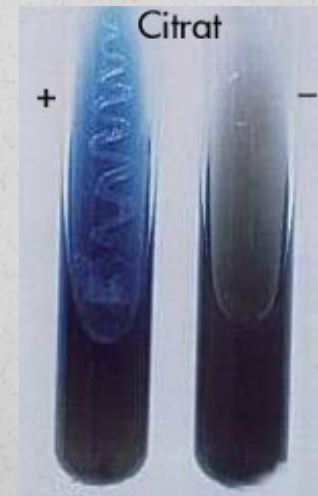
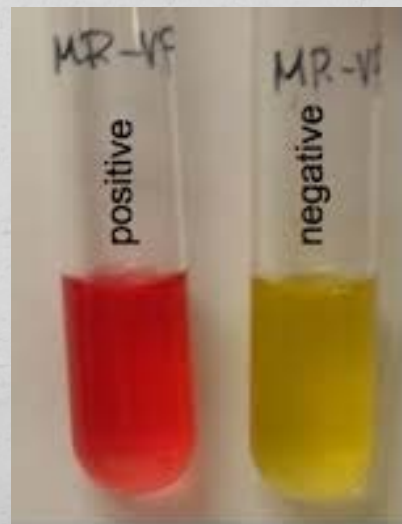
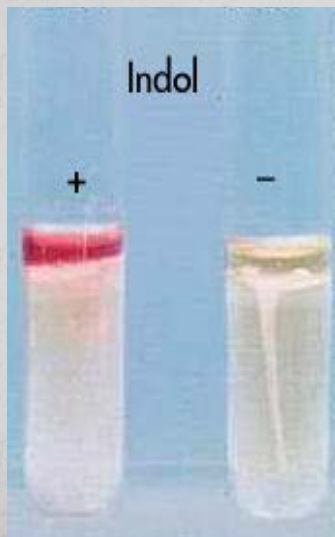


IMViC – kratak biohemijski niz

1. sposobnost stvaranja indola
2. reakcija sa metil crvenim
3. Voges Proskauer reakcija
4. rast na podlozi za citratom

Salmonella - + - +

E. coli + + - -



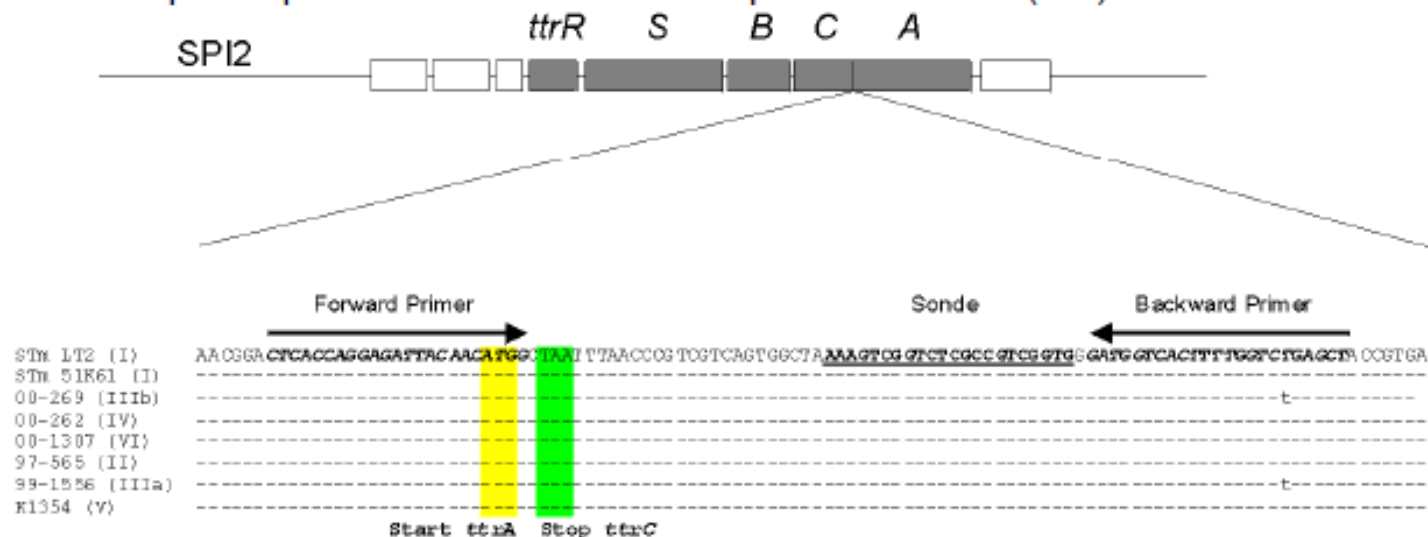
- Druge biohemijske reakcije - sposobnost razgradnje aminokiselina - lizin, fenilalanin ili aminokiselina sa sumporom (oslobađanje H_2S), otapanje želatina, prisustvo ureaze, fermentacija ugljenih hidrata, rast u podlozi sa KCN i pokretljivost
- TSI – Trostruki šećer sa gvožđem



1. Neinkulisana podloga
2. *S. Typhi*
3. *S. Enteritidis*
4. *Shigella flexeri*
5. *E. coli*
6. *Pseudomonas spp.*

Real-time PCR for the detection of *Salmonella* in feed (§ 64 LFGB, L-00.00-98)

- target gene: *ttrRSBCA* Operone (Tetrathionate Respiration)
- 95 bp PCR-product/ use of an Internal Amplification Control (IAC)



Malorny et al. 2004: Diagnostic real-time PCR for Detection of *Salmonella* in Food.
Appl. Environment. Microbiol. 70:7046-7052.

(source: NRL-Salm/ BfR)



Pre-enrichment of 25 g food sample in
225 ml BPW (18-20 h at 37°C)

Selective enrichment
(RVS, nMKTT)

Isolation on selective media
(XLD, BPLS)

Biochemical and
serological confirmation

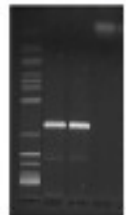
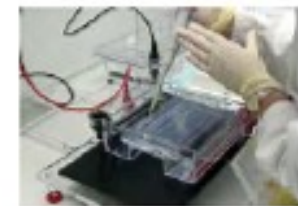
ISO 6579:2002 „gold standard“
(takes 4-5 days)



Microbial DNA extraction

Salmonella specific PCR
(Amplification and detection)

PCR-method
(takes 1 day)



(source: NRL-Salm/ BfR)

Kliconoštvo - nema kliničkih znaka infekcije – inaparentne infekcije

Izlučivanje mesecima ili godinama salmonela

- prebolele akutne infekciju izlučivanje iz organizma salmonela i preko 10^5 u gramu fecesa
- perzistentna ekskrecija prisutna i pored visokog titra antitela prema O i H antigenima salmonella
- kliconoštvo kod goveda - *S. Dublin* i *S. Saint-paul*

Tifusarka Mary Mallon (1869-1938) - S. Typhi

1990 - 1915 inficirala preko 100 ljudi od kojih je zvanično troje preminulo (nezvanično blizu 50 ljudi)



"TYPHOID MARY"

The Extraordinary Predicament of Mary Mallon, a Prisoner on New York's Quarantine Hospital

By Dr. Wm. H. Park, New York Board of Health.

It is probable that Mary Mallon is a prisoner for life, and yet she has committed no crime, has never been accused of an immoral or wicked act, and has never been a prisoner in any court, nor has she been sentenced to imprisonment by any judge.

Mary Mallon is a cook by profession. She has served in the kitchens of many New York millionaires with entire satisfaction for many years.

Mary Mallon for more than two years has been a prisoner on New York's quarantine island, along with the unfortunate who are from time to time removed to this isolated spot because they are suffering from contagious fever or other contagious diseases.

But while Mary sees these unfortunate victims of various diseases come on the hospital boat and, in due time, return to their homes and friends—many away on foreign shores—she is probably in the whole wide world the only prisoner that can furnish a parallel to the extreme misfortune which has brought Mary Mallon to North Brother Island.

Though an English girl, Mary Mallon is a native, working headscarf of typhoid fever germ. Every day for two years the officials of the New York Board of Health have examined Mary, and they have been discouraged to find a beautiful supply of new typhoid fever bacilli freshly made each twenty-four hours by Mary Mallon, in the few spare hours that authorities get their hands on her, not to mention the many cases of typhoid fever which she has caused in others. So far as is known, the woman has had the disease, and is not now sick with it.

But somewhere in her anatomy, perhaps in the gall duct, there is a never-failing typhoid fever germ. To the profit of the Board of Health, Mary has been given a beautiful supply of new typhoid fever bacilli freely.

But to protect the public, North Brother Island, where she has been a prisoner for two years, within the past two years, in the case of typhoid fever, and other contagious diseases, a special health system, the case in the most remarkable way which we are acquainted with, because of the number of people to whom she has communicated the disease.

Our work of the new world is to believe that the typhoid fever germ, in the gall bladder, which she has communicated, from time to time, when she has been isolated through the body by the bile.

It has been spreading the contagion for many years, it is true, but she will be a prisoner on North Brother Island for a long time, perhaps August or October, 1915. The officials and the public generally will be well satisfied that for the century and a half we have known that the typhoid fever and other contagious diseases have been eliminated from her body.

Every effort has been made by the health authorities to cure the unfortunate woman, but so far without success. At present, it is the only case of typhoid fever in the world, and as a result of the various experiments we have tried, and as a result of the discovery of typhoid fever, it is the only case of typhoid fever in the world, and as a result of the various experiments we have tried, and as a result of the discovery of typhoid fever, it is the only case of typhoid fever in the world.

The essential facts concerning the investigation: The first person who was taken sick on August 11, 1900, was a woman named Mary Mallon, who was a cook in the kitchen of the New York Board of Health. She was taken sick with typhoid fever, and she was isolated on North Brother Island. She was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world, and she was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world.

The first person who was taken sick on August 11, 1900, was a woman named Mary Mallon, who was a cook in the kitchen of the New York Board of Health. She was taken sick with typhoid fever, and she was isolated on North Brother Island. She was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world, and she was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world.

The first person who was taken sick on August 11, 1900, was a woman named Mary Mallon, who was a cook in the kitchen of the New York Board of Health. She was taken sick with typhoid fever, and she was isolated on North Brother Island. She was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world, and she was the only person who was taken sick with typhoid fever in the world.



Pet ključnih stvari za bezbedniju ishranu



Održavajte čistoću

- ✓ Operite ruke pre nego što počnete da pripremate hranu i više puta tokom pripreme obroka
- ✓ Operite ruke posle upotrebe toaleta
- ✓ Operite i dezinficirajte sve površine i pribor koji ste koristili za pripremu hrane
- ✓ Zadržite kuhinju i hranu od insekata, garmadi i drugih životinja

Zašto?

Za razliku od većine mikroorganizama koji nisu uzročnici bolesti, opasni mikroorganizmi se nalaze u zemlji, vodi, životinjama i ljudima. Ovi mikroorganizmi se nalaze na rukama, hrpama za brisanje, priboru za jelo, naročito na staklana za sočenje, a najmanjim kontaktom mogu se preneti na hranu i tako izazvati bolesti koje se prenose hranom.



Odvojite sveže i kuvano

- ✓ Odvojite sveže meso, živinu i morske plodove od druge hrane
- ✓ Za pripremu svežih namirnica koristite različit pribor i opremu kao što su noževi i daske za sečenje
- ✓ Čuvajte hranu u zatvorenim posudama (da biste izbegli kontakt između sveže i spremljene hrane)

Zašto?

Sveže namirnice, a pogotovo meso, živina i morski plodovi, kao i njihovi sokovi, mogu da sadrže opasne mikroorganizme koji se mogu preneti na druge namirnice tokom pripremanja i čuvanja.

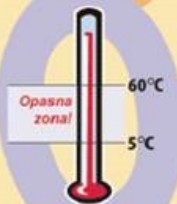


Kuvajte temeljno

- ✓ Kuvajte hranu temeljno, a pogotovo meso, živinu, jaja i morske plodove
- ✓ Pustite da supa i torbe riže da bude bili sigurni da je temperatura premašila 70°C. Uverite se da su sokovi iz termički obrađenog mesa i živine bistri, a nikako ružičaste boje. Idealno je da se koristi termometar
- ✓ Spremljenu hranu zagrejte temeljno

Zašto?

Pravilno kuvanje uništava gotovo sve opasne mikroorganizme. Studije su pokazale da kuvanje na temperaturi ispod 70°C čini hranu bezbednijom za upotrebu. Hrana koja zahteva posebnu pažnju obuhvata mleveno i rolavano meso, vešike kosti mesa i svu živinu.



Čuvajte hranu na bezbednim temperaturama

- ✓ Ne ostavljajte kuvanu hranu na sobnim temperaturama duže od 2 časa
- ✓ Čuvajte u frižideru svu kuvanu i hranu koja se brzo kvari (poželjno je do 5°C)
- ✓ Pre nego što servirate kuvanu hranu, pustite je da se ledi (iznad 60°C)
- ✓ Ne čuvajte hranu predugo, čak ni u frižideru
- ✓ Ne otapajte zamrznutu hranu na sobnoj temperaturi

Zašto?

Mikroorganizmi mogu da se razmnožavaju veoma brzo ako se hrana čuva na sobnoj temperaturi. Ukoliko se čuva na temperaturi između 5°C i ispod 60°C, razmnožavanje mikroorganizama je sporije i manje opasno. Neki opasni mikroorganizmi se ipak razmnožavaju na temperaturi ispod 5°C.



Koristite ispravnu vodu i sveže namirnice

- ✓ Koristite ispravnu vodu ili je filtrirajte da bi bila ispravna za piće
- ✓ Birajte sveže i hranjive namirnice
- ✓ Birajte namirnice, kao što je pasteurizovano mleko, koje su predviđene da duže traju
- ✓ Perite voće i povrće, pogotovo ako se jede sveže
- ✓ Ne koristite namirnice posle isteka roka

Zašto?

Sveže namirnice, uključujući vodu i led, mogu da budu zaražene opasnim mikroorganizmima i hemikalijama. Toksične hemikalije mogu da nastanu u oštećenju i prerađivanju hrane. Pažljivo odabiranje svežih namirnica i jednostavnih metoda, kao što su pranje i kuhanje, smanjuje rizik od zaraze.

Ljudi

S. Typhi - tifusna groznica

S. Paratyphi A – paratifus

S. Enteritidis, S. Typhimurium – do 2005.godine najčešća infekcija putem hrane sa preko 200.000 potvrđenih slučajeva godišnje u zemljama EU

Goveda

S. Dublin - supkliničke infekcije, enteritisi, septikemija, meningitisi, abortusi, osteomielitisi

S. Typhimurium, S. Bovismorbificans - enteritisi, septikemija

Svinje

***S. Cholerasuis*, *S. Cholerasuis* biotip Kunzendorf**

klinička slika poput svinjske kuge

S. Typhisuis enteritisi mlade svinje

S. Typhimurium

Ovce

***S. Abortusovis*, *S. Montevideo*, *S. Dublin*,**

S. Typhimurium*, *S. Anatum

Konji

S. Abortusequi*, *S. Typhimurium

Živina

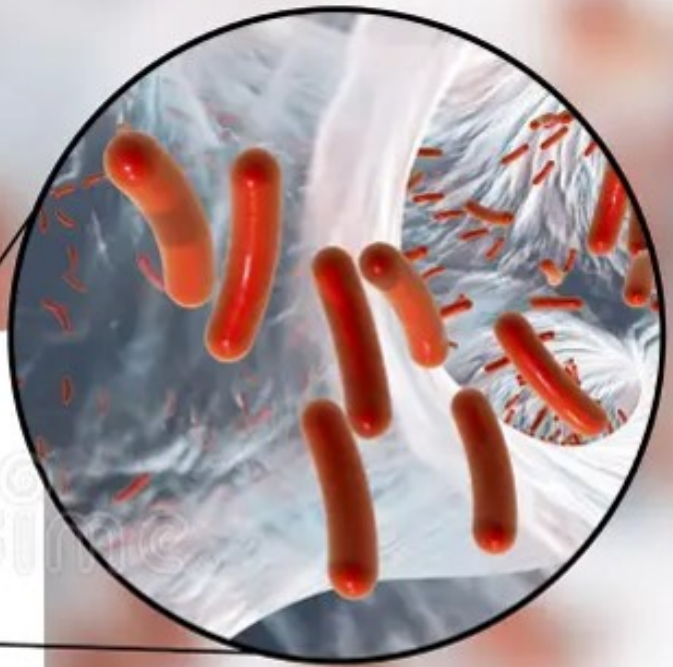
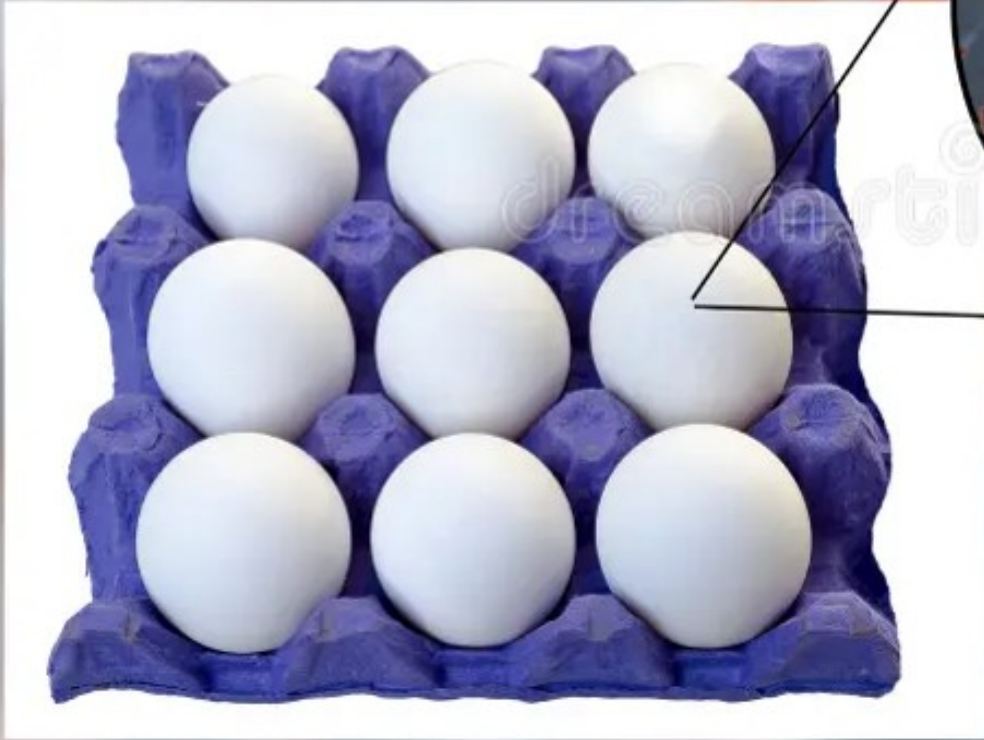
S. Pullorum - beli proliv pilića- transovarijalno prenošenje

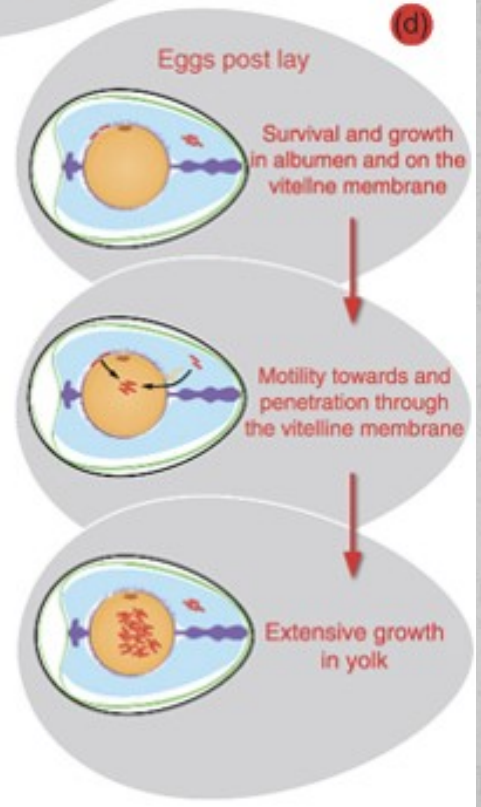
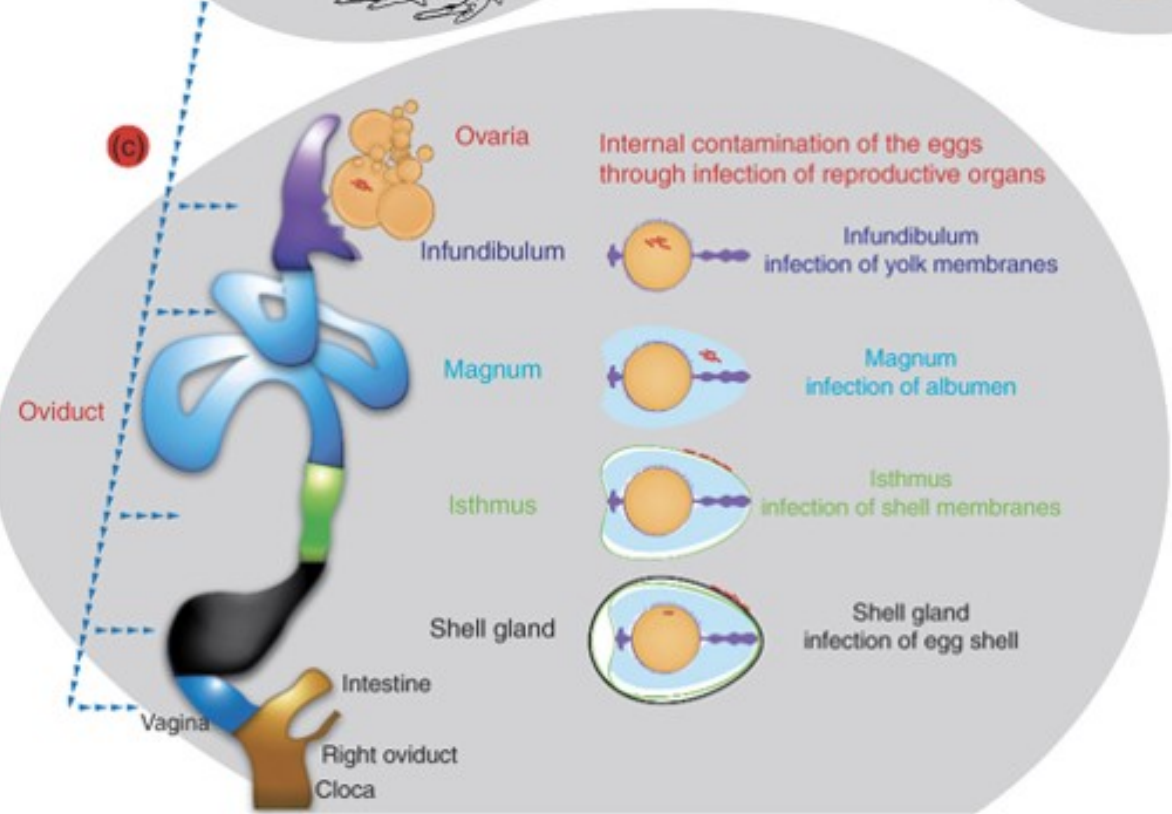
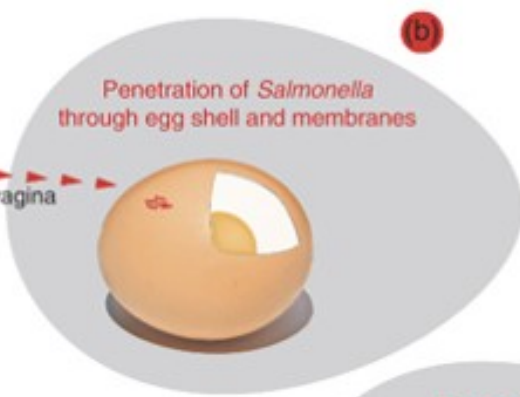
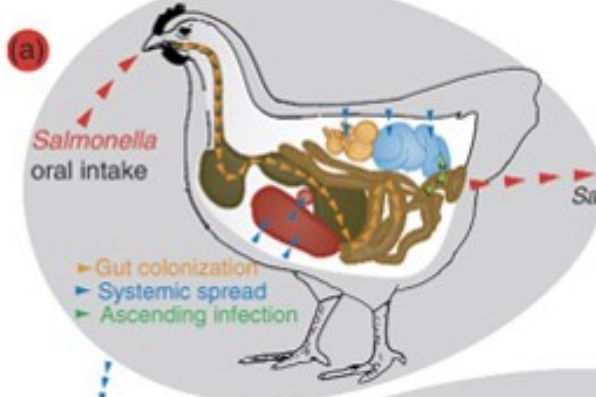
S. Gallinarum - tifus živine- prenosi se jajima

S. Arizonae - enteritis i septikemija

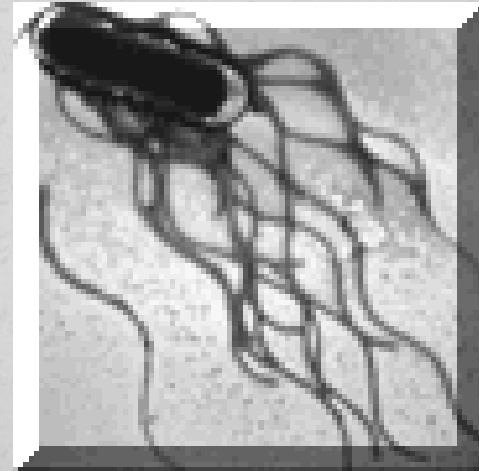
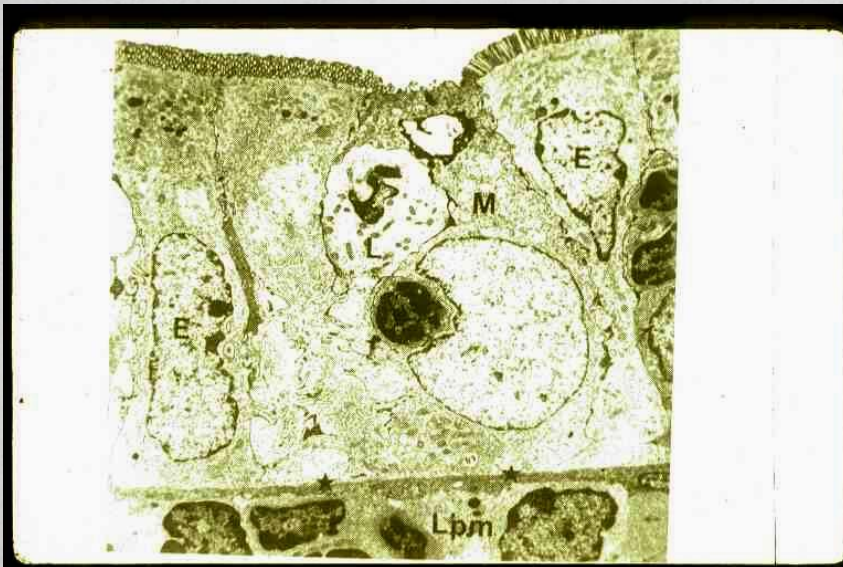
S. Enteritidis - paratifus živine, prenosi se jajima

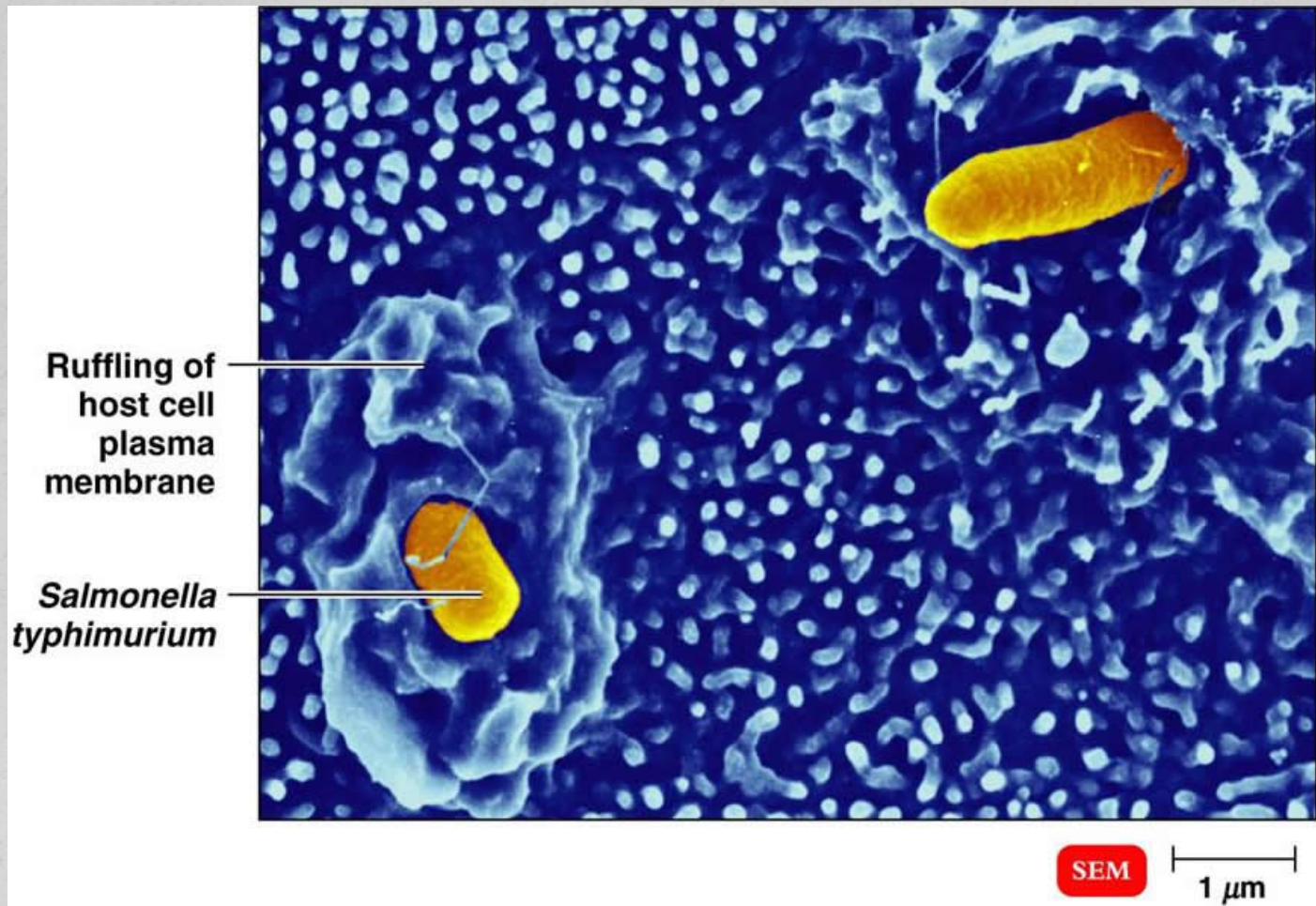


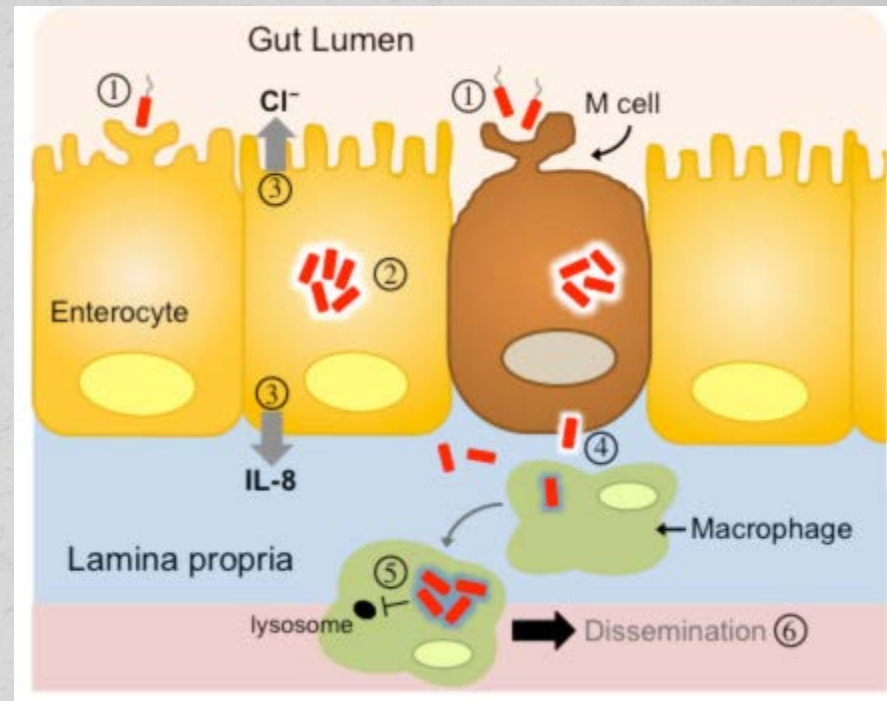
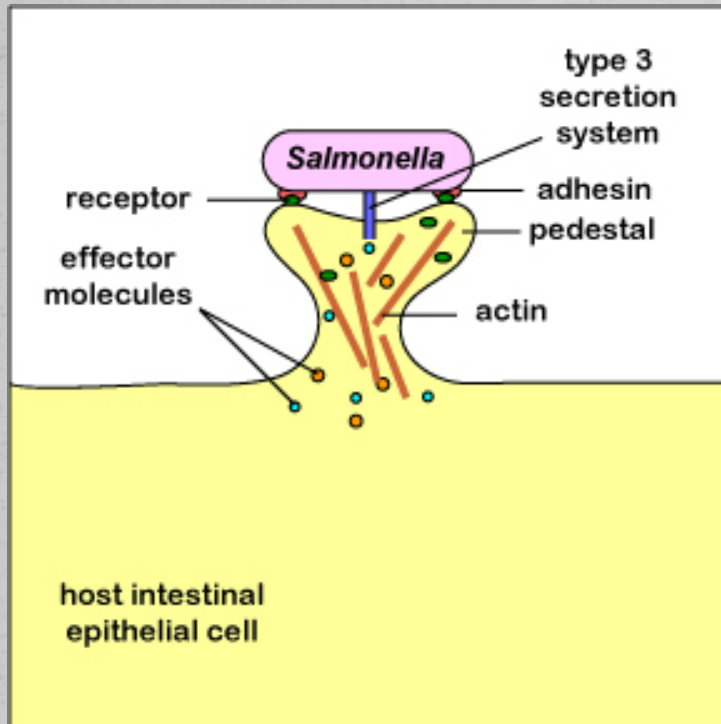




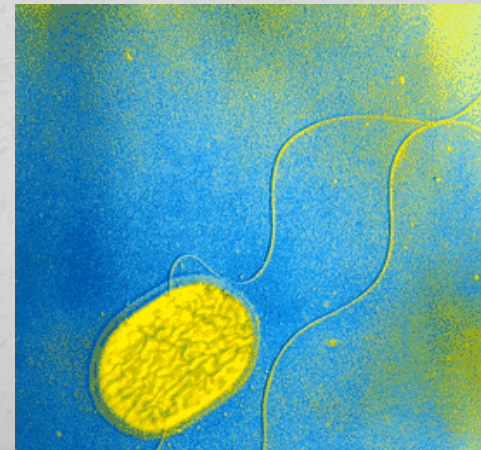
- Posle peroralnog unošenja salmonela u organizam nakon njihovog preživljavanja u želudcu, dolazi do **kolonizacije ileuma, cekuma i colona, a zatim invazije bakterija u enterocite ili M ćelije epitela Pajerovih ploča**
- Adherencije salmonela za target ćelije creva pomoću **tri tipa fimbrija (tip 1 fimbrija i dugačke fimbrije na polu bakterija)**

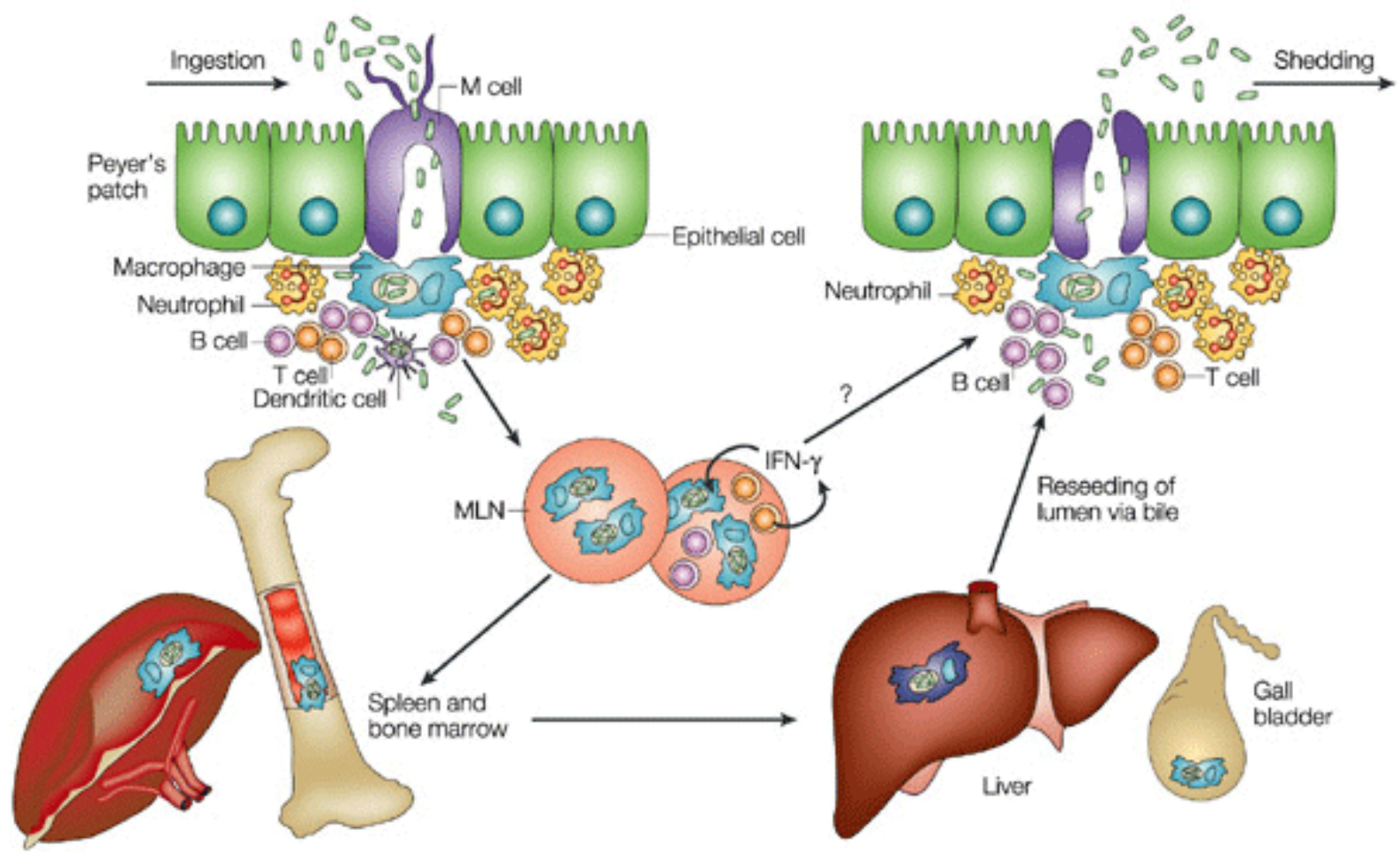






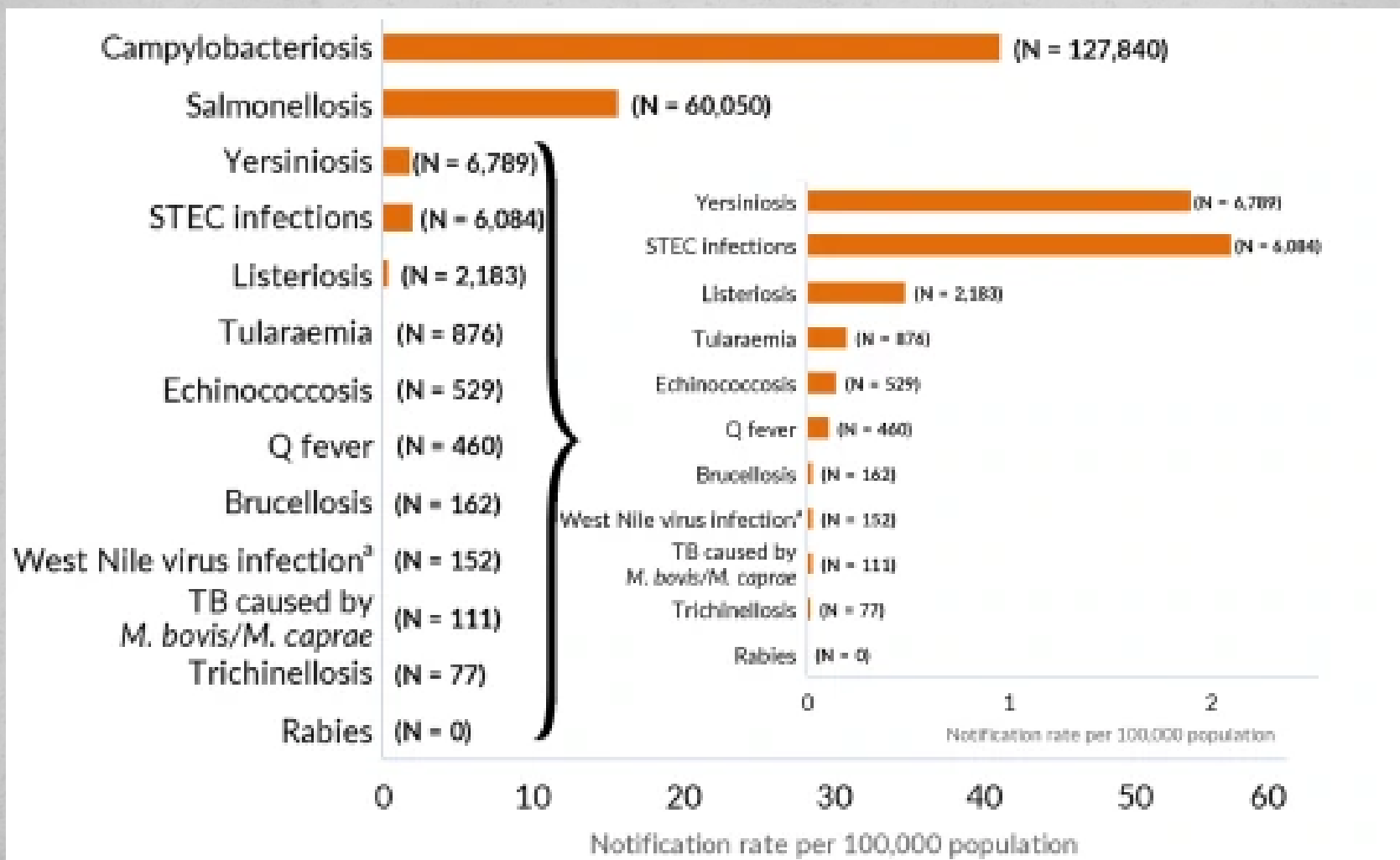
- **Tip III sekrecije sistem – TTSS** pored prodora salmonela u ćelije mukoze creva dovodi do poremećaja resorpcije tečnosti i elektrolita, aktivacije neutrofilnih granulocita i inflamacije sa pojavom dijareje
- Sama zapaljenska reakcija doprinosi daljoj destrukciji epitela pa se u fecesu nalaze krv, ostaci enterocita i ćelije inflamacije
- **SPI-2** obezbeđuje preživljavanje fagocitoze, otpornost prema komplementu i dovodi do sistemske infekcije – endotoksin.





- **Direktiva 2003/99/EZ Evropskog Parlamenta i Saveta od 17. novembra 2003. o praćenju zoonoza i uzročnika zoonoza**
- **Prioritet: bruceloza, kampilobakterioza, ehinokokoza, listerioza, salmoneloza, trihinelozna, tuberkuloza uzrokovana *Mycobacterium bovis*, verotoksične *Escherichia coli***
- Nacionalni programi monitoringa.
- Države članice su dužne da osiguraju da će programom monitoringa zoonoza dobiti odgovarajući podaci barem u pogledu reprezentativnog broja izolata *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* goveda, svinja i živine, kao i iz hrane životinjskog podrijetla dobivene od tih vrsta.

Broj potvrđenih slučajeva zoonoza kod ljudi u EU u 2021. godini



- **2011 ukupno 95.548 potvrđenih slučajeva salmoneloze kod ljudi u EU.** Smanjenje za 5.4% u odnosu na 2010 odnosno 37.9% u odnosu na 2007 godinu ili 58.304 slučaja manje. 20.7 slučajeva salmoneloze na 100.000 ljudi.
- **2011 Najzastupljeniji serovarijeteti S.Enteritidis 44.4%, S.Typhimurium 24.9, monofazni S.Typhimurium 1, 4, (5), 12 - 4.7%, S.Infantis**
- **2012 ukupno 91.034 prijavljena slučajeva salmoneloze ljudi u zemljama EU.**
- **Uspešni programi redukcije salmoneloze kod živine dosprineli smanjenju broja slučajeva kod ljudi.**

- 2011 prisustvo salmonela u hrani u EU
 - **sveže meso živine 5.9%, sveže meso svinja 0.7%, jaja 0,1%**
- 2011 prisustvo salmonela kod domaćih životinja
 - 20 zemalja članica je ispunilo željeni nivo redukcije salmoneloze u roditeljskim jatima od manje od 1%
- **S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Hadar, S. Infantis, S. Virchow**
 - **Koke nosilje 4.2%, 2010 5.9%**
 - **Brojleri 3.2%, 2010 4.1%**
- Serovarijete prisutni kod životinja i u hrani
 - **S. Infantis i S. Enteritidis kod živine**
 - **S. Typhimurium kod svinja**
 - **S. Typhimurium i S. Dublin kod goveda**
- Hrana za životinje – 4%

- Kod ljudi između 60% i 80% infekcija *Salmonella* spp. protekne bez postavljanja dijagnoze.
- Incidencija mart 2010. godine 1140 slučajeva na 100.000 ljudi godišnje.
- Nemačka 1990. godine 200.000 slučajeva kod ljudi
2016. godine 13.000 slučajeva kod ljudi

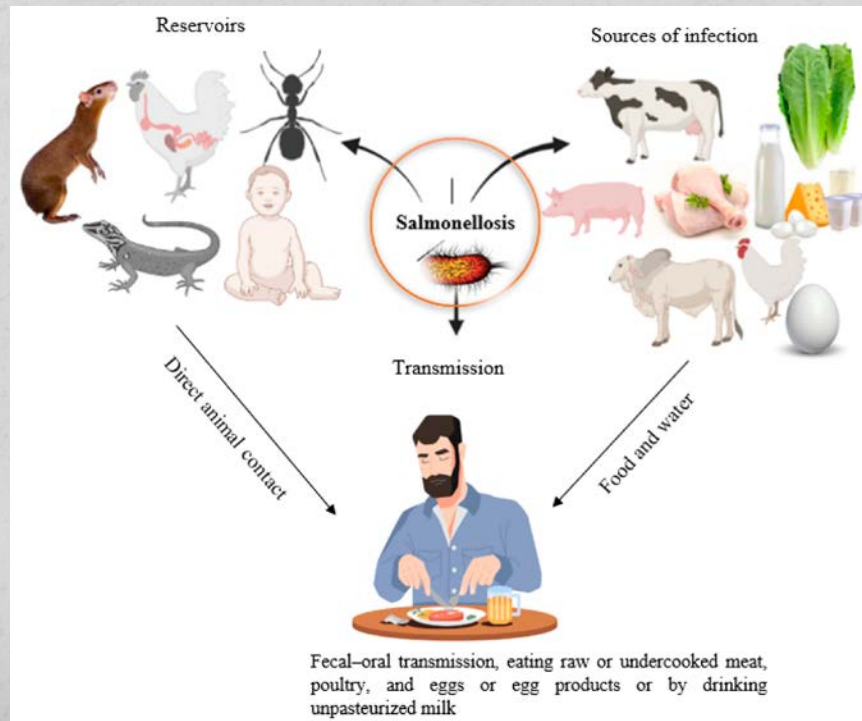
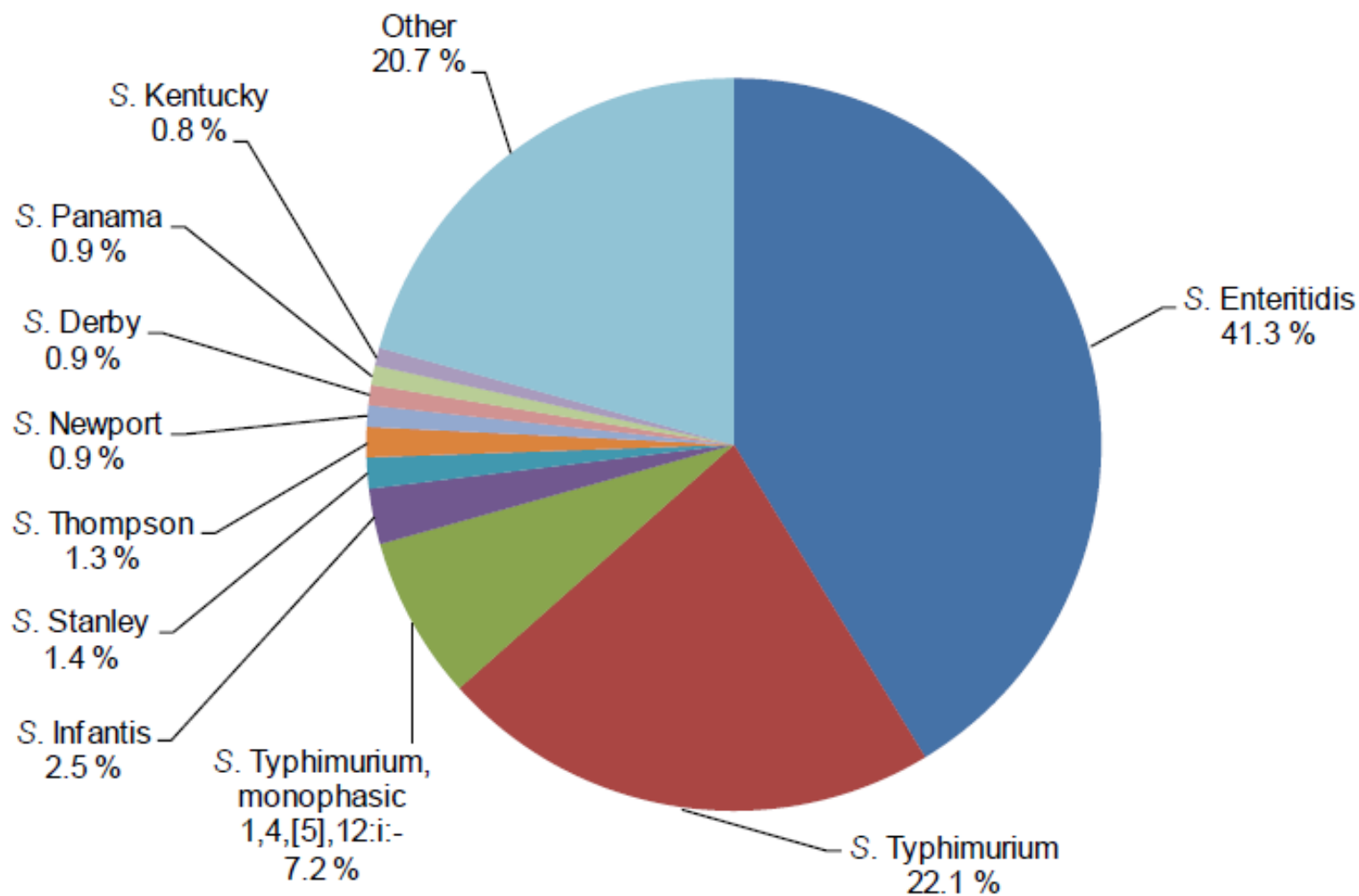
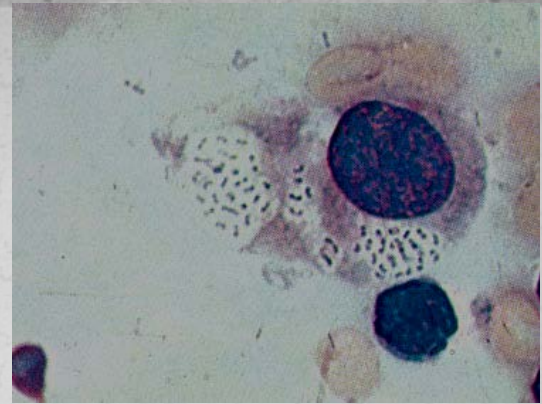


Figure SA3. Distribution of the 10 most common Salmonella serovars in humans in the EU, 2012 (N = 82,409)



Familija Enterobacteriaceae



Klebsiella spp.

- mastitis- krave

K. pneumoniae

- infekcije uterusa - kobile

- urinarne infekcije - psi

- pneumonije- ždrebadi

Enterobacter spp.

- mastitisi- krave

E. aerogenes

- uterine infekcije – kobile

- MMA sindrom- krmače

Familija Enterobacteriaceae

Shigella spp - izaziva bolest kod primata, ali ne i kod drugih sisara. Izaziva dizenteriju i vodeći je uzročnik bakterijske dijareje širom sveta, sa 80-165 miliona godišnjih slučajeva i 74.000 do 600.000 smrtnih slučajeva.

Serogroup A: *S. dysenteriae* (15 serotipova)

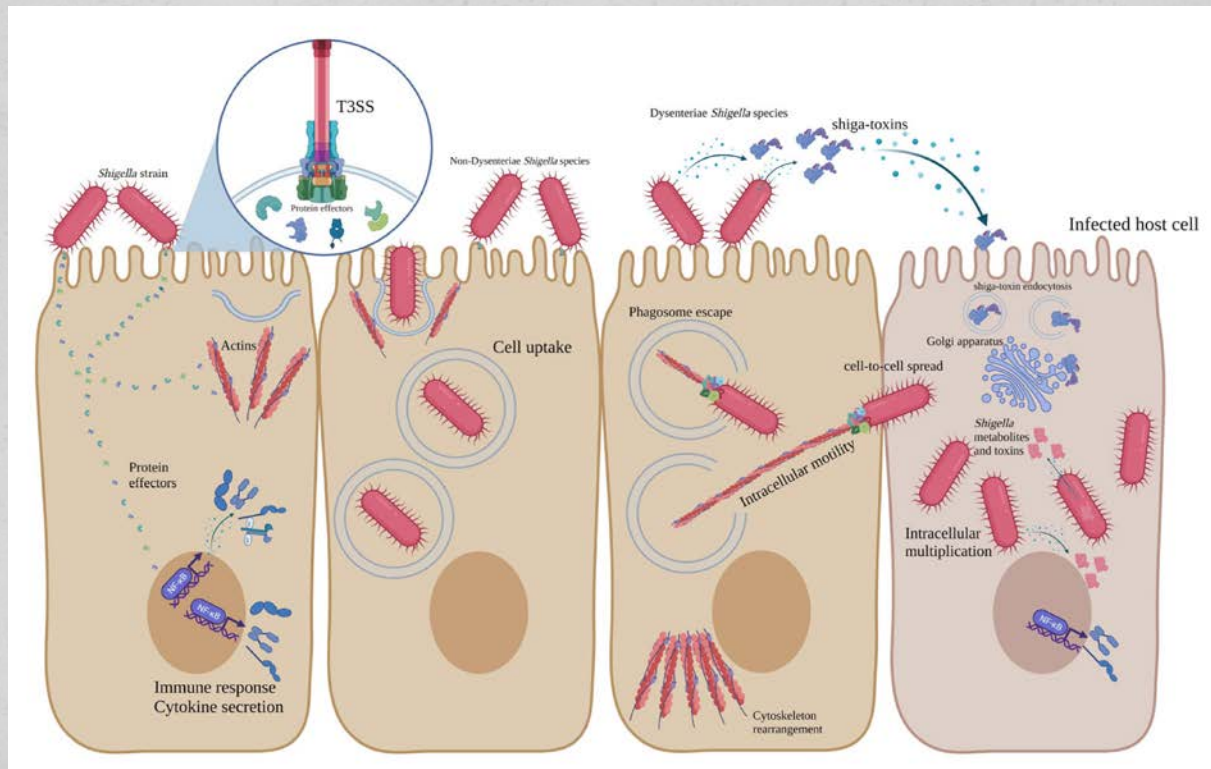
Serogroup B: *S. flexneri* (9 serotipova)

Serogroup C: *S. boydii* (19 serotipova)

Serogroup D: *S. sonnei* (jedan serotip)

Familija Enterobacteriaceae

Shigella spp – proizvodi Shiga toksin sličan Verotoksinu *E. coli*.

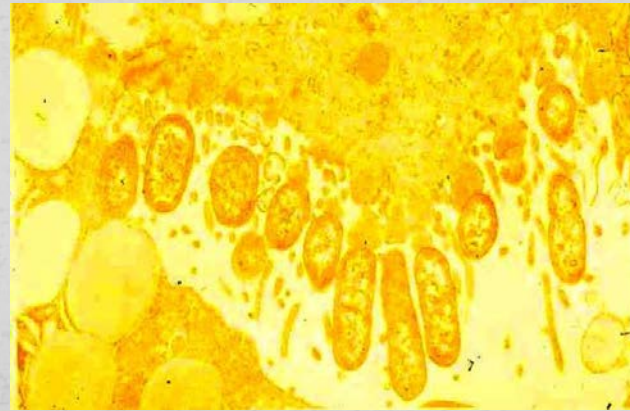
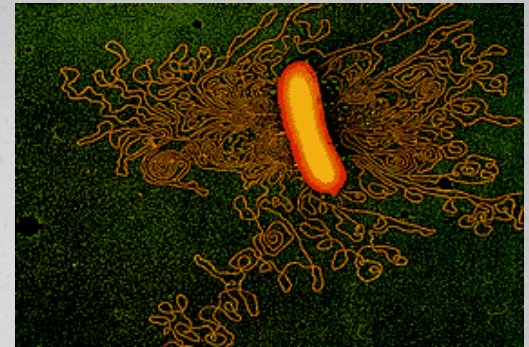


Familija Enterobacteriaceae

Citrobacter spp - mastitis krave

C. diversus

Shigella spp - retko prolivi i dizenterija psi



Familija Hafniaceae

Edwardsiella spp. - proliv -svinje , psi i telad

E. tarda (*E.septicemia*) – ribe - som, jegulje...



Familija Yersiniaceae

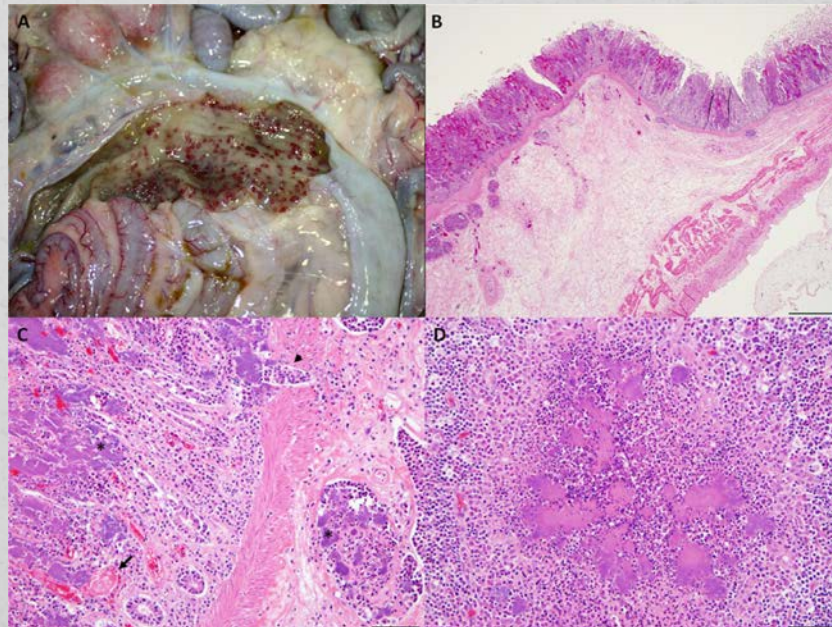
Gram negativne bakterije, katalaza pozitivne, H₂S negativne

Ukupno osam rodova - *Yersinia*, *Serratia*, *Ewingella*...

Serratia spp - mastitis krave

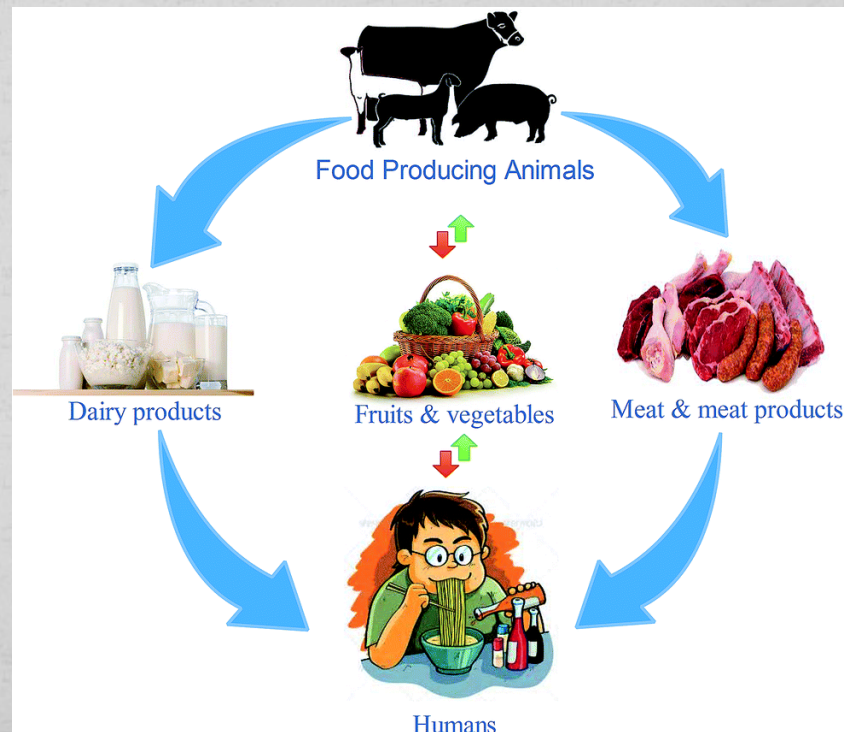
S. marcescens - septikemija pilići

- *Yersinia pseudotuberculosis* – pseudotuberkuloza
mezenterijalni limfadenitis, enteritis ovce, koze, goveda,
ljudi, ptice, laboratorijske životinje – morsko prase, glodari
- zoonoza - enterokolitis ili limfadenitis mezenterijalnih
limfnih žlezda



-Yersinia enterocolitica – retko kod životinja enteritis, abortus, ljudi - enteritis, mezenterijalni limfadenitis, a poseban značaj imaju serotipovi 03, 08 i 09.

- akutno infektivno oboljenje koje se odlikuje febrilnim stanjem i pojavom gastroenterokolitisa sa krvavim dijarejama (proliv)

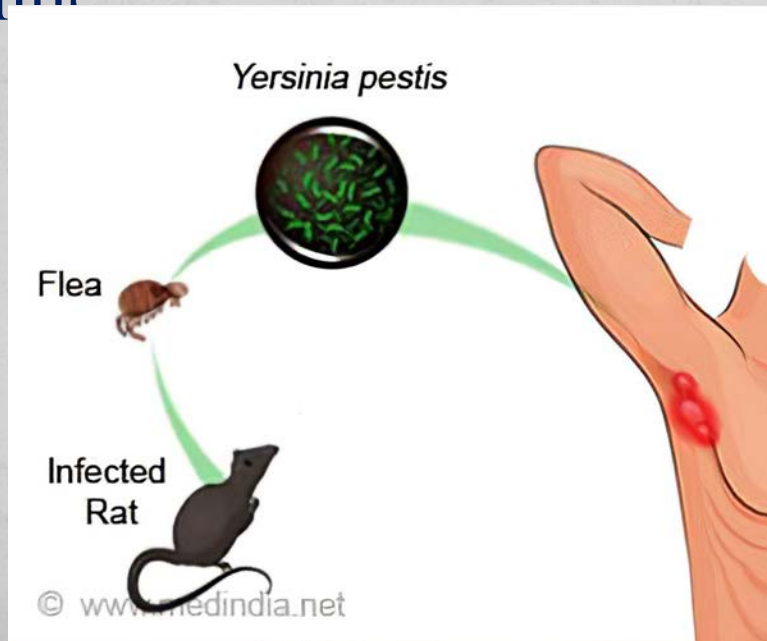


Yersinia pestis – Kuga ljudi

prisutna i danas 1-3 hiljade slučajeva u svetu godišnje

- preživljavaju fagocitozu, nekrotične lezije u limfnim čvorovima, infiltracija neutrofila

- glodari i mačke mogu da obole, kao i živina, svinje i kamile



-Yersinia pestis – Kuga ljudi

- 1346-1353. godine – 50 miliona ljudi umrlo – 50% populacije u Evropi

- London 1655. godine – 100.000 ljudi 20% populacije preminulo

- 19 vek - Kina i Indija – 12 miliona ljudi

- prisutna - Kongo, Madagaskar, Peru, SAD (Novi Meksiko, Arizona, Kalifornija i Kolorado – crnorepo prerijsko kuće)



THE SPREAD OF THE PLAGUE IN EUROPE, 1346 - 1353

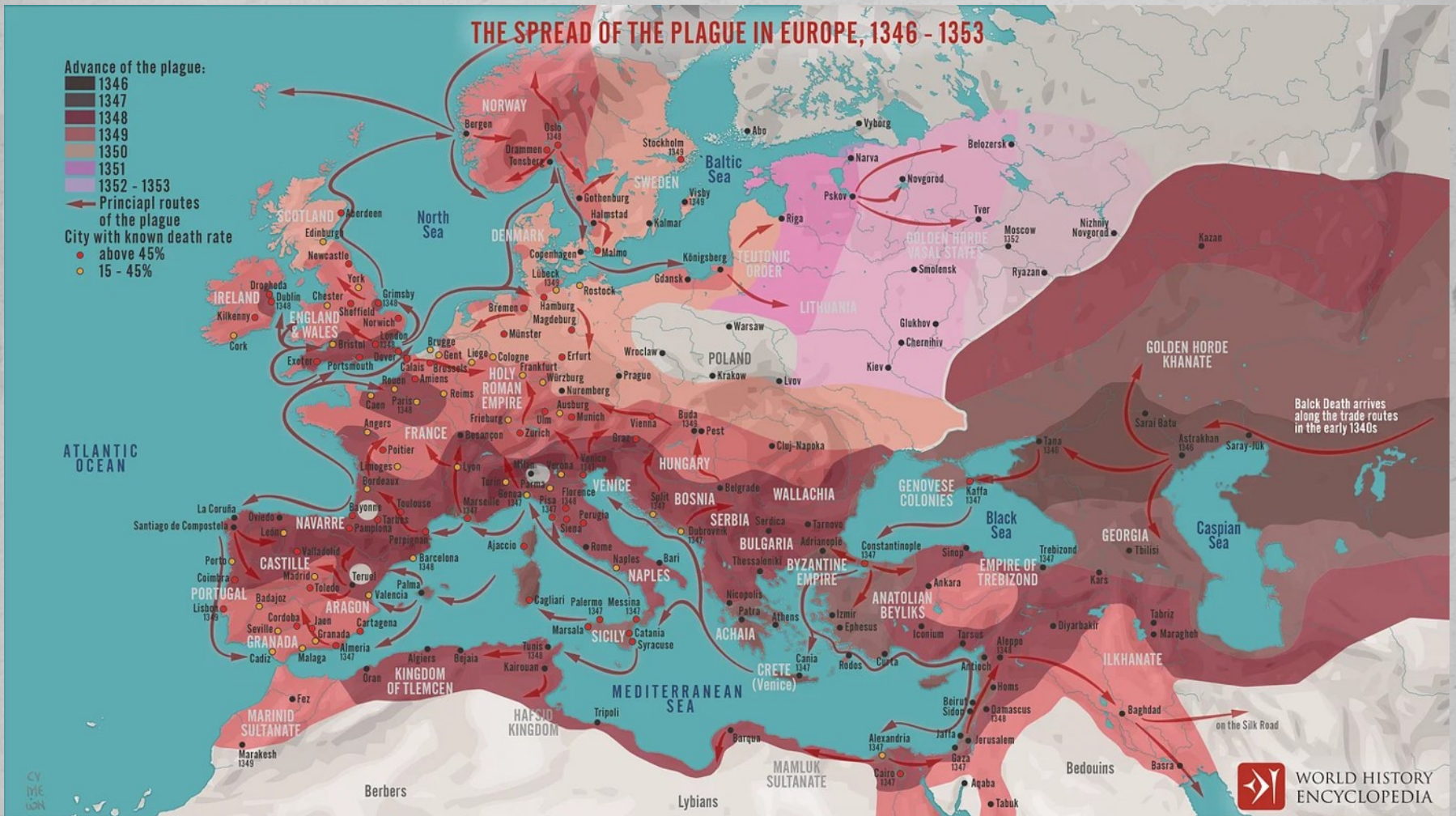
Advance of the plague:

- 1346
- 1347
- 1348
- 1349
- 1350
- 1351
- 1352 - 1353

Principi routes of the plague

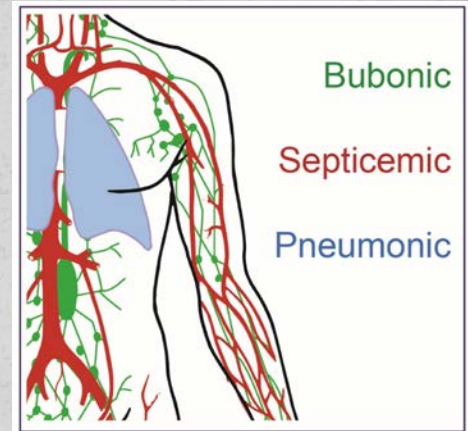
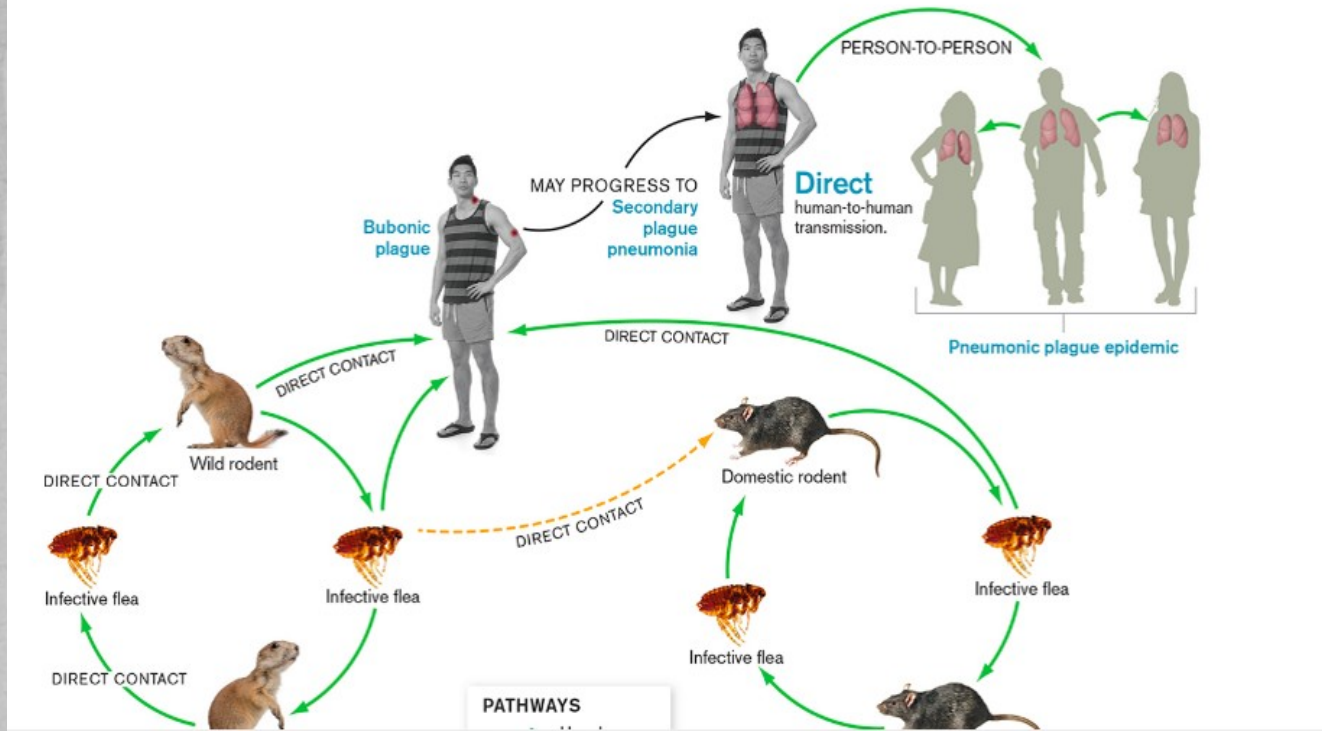
City with known death rate

- above 45%
- 15 - 45%

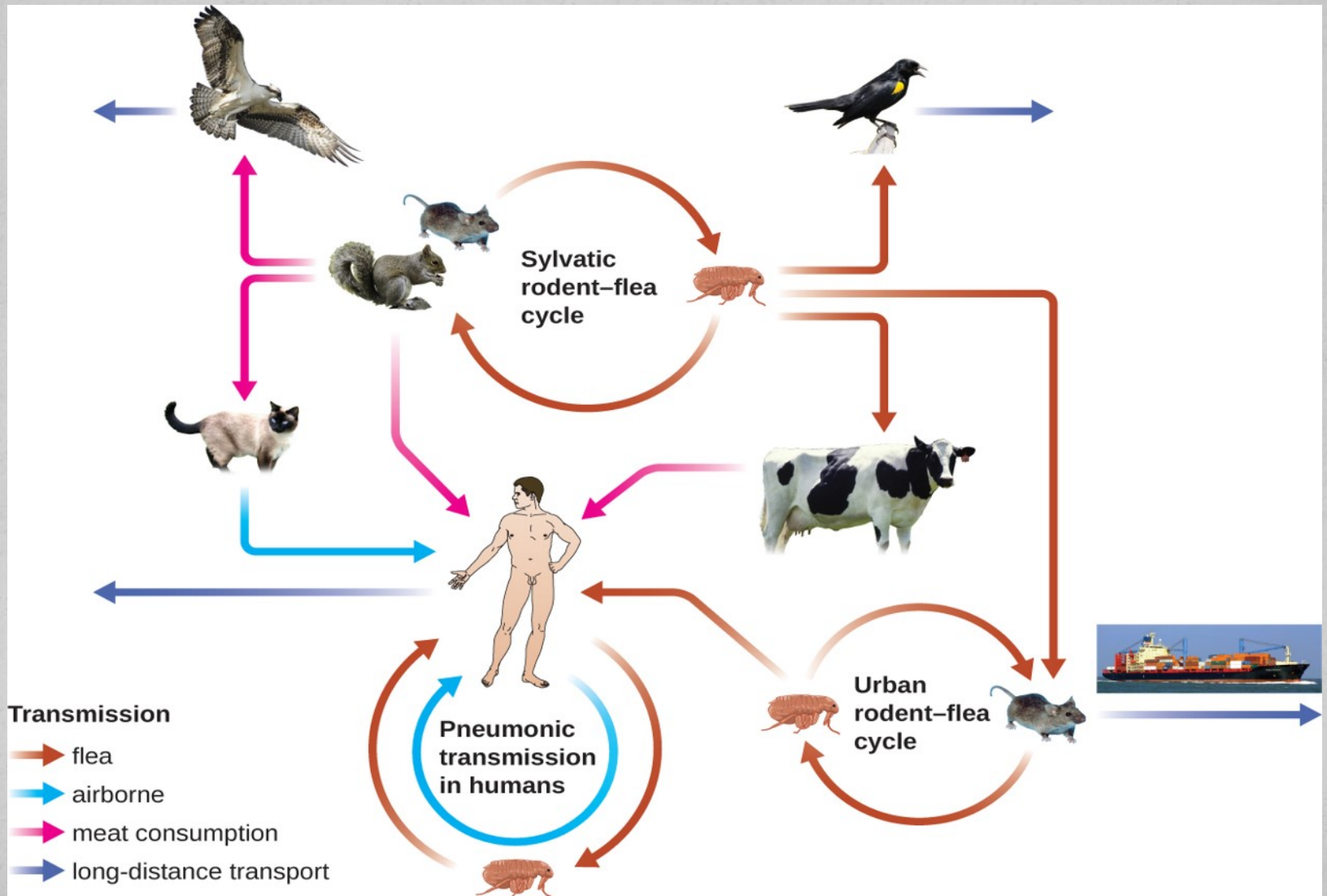


-*Yersinia pestis* – Kuga Ijudi

What do bubonic and pneumonic plague have in common?
The cycles of plague.



-Yersinia pestis – Kuga ljudi



-Yersinia pestis – Kuga ljudi



Familija Morganellaceae

Gram negativne bakterije, arginin dekarboksilaza i VP negativne

Ukupno osam rodova - *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*...



Proteus spp

P. mirabilis

P. vulgaris

- urinarne infekcije- psi i konji
- otitis ext.- psi i mačke
- respiratorne infekcije
- mlade životinje

Morganella spp.

M. morganii

- otitis i urinarne infekcije
psi i mačke

Providencia stuartii - infekcije ljudi

