

Metode u dijagnostici bakterija koje se mogu koristiti kao bioterorističko oružje

Miljuš, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department for Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:204888>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI
FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD
METODE U DIJAGNOSTICI BAKTERIJA KOJE SE MOGU KORISTITI
KAO BIOTERORISTIČKO ORUŽJE

Ena Miljuš

Split, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI
FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD
METODE U DIJAGNOSTICI BAKTERIJA KOJE SE MOGU KORISTITI
KAO BIOTERORISTIČKO ORUŽJE

Mentor:

doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna

Ena Miljuš

481/2019

Split, srpanj 2021.

Diplomski rad je izrađen na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko – dalmatinske županije te na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti u Splitu, pod nadzorom mentorice doc. prim. dr. sc. Vanje Kaliterne, u vremenskom razdoblju od travnja do srpnja 2021. godine.

Datum predaje diplomskog rada: 29. lipnja 2021.

Datum prihvatanja diplomskog rada: 6. srpnja. 2021.

Datum usmenog polaganja: 13. srpnja. 2021.

Ispitno Povjerenstvo:

1. Dr. sc. Ivan Jerković
2. Doc. dr. sc. Snježana Štambuk
3. Doc. dr. sc. Vanja Kaliterna

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Bioterorizam.....	1
1.1.1. Biološko oružje.....	3
1.1.2. Biološki agensi.....	5
1.1.2.1. Klasifikacija bioloških agensa.....	6
2. CILJ RADA.....	9
3. BAKTERIJE KAO BIOLOŠKI AGENSI.....	10
3.1. <i>Bacillus anthracis</i>	13
3.2. <i>Francisella tularensis</i>	17
3.3. <i>Yersinia pestis</i>	19
3.4. <i>Brucella</i> species.....	23
3.5. <i>Clostridium botulinum</i>	26
3.6. <i>Clostridium perfringens</i>	28
3.7. <i>Chlamydia psittaci</i>	30
3.8. <i>Coxiella burnetii</i>	32
3.9. <i>Burkholderia mallei</i>	35
3.10. <i>Burkholderia pseudomallei</i>	36
3.11. <i>Rickettsia prowazekii</i>	38
3.12. <i>Vibrio cholerae</i>	40
3.13. <i>Salmonella</i>	43
3.14. <i>Escherichia coli</i>	45
3.15. <i>Shigella</i>	47
4. DIJAGNOSTIČKE METODE ZA DETEKCIJU BAKTERIJA.....	49
4.1. Izravne metode.....	50
4.1.1. Mikroskopiranje.....	50
4.1.2. Kultivacija.....	53
4.1.3. Antimikrobna osjetljivost.....	59
4.1.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	62
4.2. Neizravne metode.....	65
4.2.1. Aglutinacijski testovi.....	66

4.2.2. ELISA (Imunoenzimski test).....	68
4.2.3. IFA (Indirektni imunofluorescentni test).....	69
5. ZAKLJUČCI.....	70
6. LITERATURA.....	72
7. SAŽETAK.....	77
8. SUMMARY.....	78
9. ŽIVOTOPIŠ.....	79
10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI.....	80

1. UVOD

1.1. Bioterorizam

Bioterorizam je namjerna ili prijeteca uporaba bakterija, virusa, gljiva ili toksina u svrhu izazivanja smrti ili bolesti ljudi, životinja i biljaka. Namjera je zastrašivanje država i ljudi sa svrhom postizanja političkih i/ili ekonomskih ciljeva. Šira definicija bioterorizma može uključivati biološke, kemijske i nuklearne agense, ovdje je fokus na korištenju bioloških (1).

Bioterorizam, kao potajna, namjerna i planirana zlouporaba bioloških agensa stara je koliko i civilizacija.

Prvo zabilježeno biološko oružje je u Mezopotamiji u gradu Assyria. Assyrianci su koristili strijele kontaminirane s raženom glavicom (engl. *rye ergot*; lat. *Claviceps purpurea*). To je nametnička gljiva koja raste na travama i raznim žitaricama, a sadrži otrovne alkaloidne koji uzrokuju brojne fiziološke poremećaje. Zabilježeno je da su Skiti (iranska nomadska plemena) u 4.st.p.n.e. koristili strelice natopljene krvlju oboljelih i umrlih od zaraznih bolesti (2).

U srednjem vijeku su se u utvrđene gradove katapultom ubacivali leševi ljudi i životinja umrlih od zaraznih bolesti. Tako su u 14 st. Mongoli, na svom pohodu u Europu, kod opsade grada Caffa, luke na Crnom moru, kad je u njihovim redovima izbila epidemija kuge, mrtva tijela svojih vojnika katapultirali unutar zidina grada. Tako se kuga proširila cijelom Europom.

U Sjevernoj Americi 50-tih i 60-tih godina 18. stoljeća, britanske su snage, tijekom francusko-britanskog rata, kako bi smanjile indijansku populaciju (koja je podupirala Francuze), koristile zarazne bolesti. Naime, Indijancima su poklanjali plahte iz bolnica zaražene velikim boginjama, zbog čega je više od 50% Indijanaca zaraženo, s velikim brojem smrtnih slučajevima što je po mišljenju nekih povjesničara utjecalo na ishod rata (3).

U periodu između dva svjetska rata SAD, Velika Britanija, Francuska, SSSR i Japan počinju ozbiljnije eksperimentiranje sa biološkim zaraznim sredstvima u laboratorijima. Nakon 2. svjetskog rata znatno je napredovala tehnologija pa se povećao i broj znanstvenih istraživanja o korištenju i proizvodnji bioloških agensa kao biološkog oružja (3).

Uporaba patogena kao načina ratovanja, prvi je put zabranjena Ženevskim protokolom iz 1925. godine. Konvencija o zabrani usavršavanja, proizvodnje i skladištenja biološkog i toksinskog oružja te njihovog uništenja donesena je 1972. a stupila na snagu 1975. godine (3).

U novijoj povjesti, povremeni bioteroristički napadi ukazuju na stalnu prijetecu opasnost. Napredak informacijskih tehnologija učinio je saznanja o tehnologijama proizvodnje biološkog oružja dostupnijim pa je time i mogućnost zlouporabe veća. Također, genetičkim inženjeringom, kojim se mijenja genska struktura organizama tako da se geni, ili dijelovi gena iz DNK jednog organizama umeću u DNK drugog organizma, dobivaju se nova željena svojstva. Time se ostvario napredak u medicini i proizvodnji cjepiva, ali se i otvorio prostor za zlouporabu u smislu korištenja genetičkog inženjeringa za dobivanje patogena s povećanom rezistencijom na antibiotike, veće virulentnosti i otežane identifikacije (4).



Slika 1. Simbol za biološku opasnost

Preuzeto s: <https://media.istockphoto.com/vectors/warning-sign-biological-hazard-fenced-danger-zone-a-pillar-with-a-vector->

1.1.1. Biološko oružje

Biološko oružje predstavlja skup posebnih borbenih sredstava opremljenih biološkim agensima radi izazivanja masovnih infektivnih bolesti ljudi, životinja i biljaka u epidemijskim razmjerima, s ciljem slabljenja ratnih potencijala protivnika ili zaplašivanja vlada ili društva u cjelini zbog postizanja ideoloških ili političkih ciljeva (3).

Prema konvenciji o zabrani biološkog i toksinskog oružja iz 1972. godine „Biološko i toksinsko oružje su mikrobijalne i druge tvari koje sadržavaju biološke agense ili toksine bez obzira na njihovo podrijetlo ili metodu proizvodnje, vrstu i količine a koje nemaju pravno opravdanje za profilaktičke, zaštitne i druge miroljubive svrhe“ (4).

Biološko oružje ima visoku borbenu učinkovitost, jer relativno male količine biološkog agensa izazivaju veliku štetu u smislu izazivanja masovnih infektivnih bolesti kod ljudi, životinja i biljaka, ljudske žrtve, ugroženost životne sredine, uništenje biljnih i životinjskih vrsta. Osim ovih direktno ugrožavajućih čimbenika postoji i nematerijalna šteta u obliku straha, panike i stresa, kao i ekonomska dimenzija štete zbog saniranja nastalih posljedica.

Biološko oružje može se, za razliku od drugih koristiti prikriveno, pa to odgađa vrijeme reakcije za sanaciju štete (rano otkrivanje omogućuje učinkovitu profilaksu i rani tretman izloženih i oboljelih), najčešće je nemoguće otkriti vremensku i prostornu ekspoziciju biološkog oružja. Također moguće ga je koristiti s uzročnicima bolesti koji se inače javljaju na nekom prostoru, što će odgoditi vrijeme reakcije na prijetnju te poprimiti razmjere epidemije (4)

Načini prijenosa su raznovrsni, svi prirodni putevi prijenosa zaraznih bolesti mogu se koristiti i u primjeni biološkog oružja. Najbrži put prijenosa je putem aerosola, jer se tako može zaraziti najveći broj ljudi i životinja u kratkom vremenu. Pri tome se mogu koristiti različita sredstva; avioni, rakete, sprejevi za stvaranje aerosola, klimatizacijski sustavi u velikim objektima. Voda, kao prijenosnik, također predstavlja efikasno sredstvo. Sa nešto manje učinkovitosti može se koristiti i hrana, najčešće za diseminaciju crijevnih zaraznih bolesti. Mogućnost prijenosa putem bioloških vektora (buhe, komarci, krpelji) je moguć, ali teško je kontrolirati učinke i ishode. Pojedine vrste uzročnika bolesti mogu se naknadno prenositi interhumanim načinom, što također

doprinosi masovnijoj pojavi bolesti. Noviji način prijenosa je putem poštanskih pošiljki, kako je to prvi put napravljeno u SAD 2001. godine sa sporama antraksa.

Agroterorizam, kao grana bioterorizma tj. namjerno izazivanje bolesti biljaka i životinja također ima ogromne i dalekosežne posljedice na ekosustav, a time i na život ljudi. Poseban problem je otkrivanje biološkog oružja koji sadrži agense nastale genetičkim inženjeringom sa izmijenjenim značajkama.

Za zaštitu od napada biološkim oružjem ključna su četiri faktora :

1. prepoznavanje biološkog napada i postavljanje dijagnoze:

- nagla i neočekivana pojava velikog broja oboljelih ljudi ili životinja
- visoka učestalost obolijevanja i/ili umiranja u kratkom periodu
- istovremena infekcija oboljelih sa dva ili više uzročnika
- neuobičajena zemljopisna pojava neke zaraze
- pojava sezonskih oboljenja u vrijeme kada se ne inače ne registriraju
- neuobičajen put prijenosa
- učestalo obolijevanje i uginuće životinja
- postojanje dokaza o kontaminaciji zraka, vode, hrane

2. detekcija i identifikacija biološkog agensa

3. zbrinjavanje eksponiranih - oboljelih i zdravih

4. biološka dekontaminacija

1.1.2. Biološki agensi

Temelj štetnog učinka biološkog oružja su biološki agensi (lat. *agens*: koji radi, djelotvorni, radni princip, ono što je uzrok nečemu, snaga, pokretna sila).

Prema definiciji NATO-a „Biološki i toksinski ratni agensi su mikroorganizmi i toksini dobiveni od njih, koji uzrokuju bolest ljudi, životinja i biljaka ili koji uzrokuju razgradnju tvari“ (4).

Biološke agense možemo definirati kao skup patogenih mikroorganizama kao što su virusi, rikecije, bakterije, gljive i protoze, prirodne, sintetizirane ili izmijenjene (genetičkim inženjeringom ili drugim biotehnološkim postupcima) i njihove toksine, ako su namijenjeni za nemiroljubive svrhe (4).

Bakterije su jednostanični organizmi s prokariotskom građom stanice. Posjeduju dvolančanu DNK poput zatvorene kružne omče koja nije obavijena jezgrinom opnom. Prosječni je promjer bakterijskih stanica oko 1 µm. Razmnožavaju se jednostavnim diobom. Osjetljive su na izlaganje izravnoj sunčevoj svjetlosti, dezinficijensima i visokim temperaturama, a dobro podnose niske temperature, pa čak i smrzavanje. Da bi preživjele u nepovoljnim uvjetima, neke vrste bakterija mogu se prekriti zaštitnom kapsulom ili pretvoriti u spore koje su vrlo otporne na čimbenike okoline i mogu preživjeti desetke i više godina (5).

Gljive su mikroorganizmi koji se od bakterija razlikuju po složenijoj strukturi i načinima razmnožavanja. Spore gljiva vrlo su otporne na sušenje, izlaganje sunčevoj svjetlosti i dezinficijense. Bolesti uzrokovane patogenim gljivama karakteriziraju oštećenja unutarnjih organa s teškim i produljenim tijekom.

Virusi su najmanji organizmi, a za razliku od bakterija razmnožavaju se samo u živim tkivima. Mnogi od njih mogu podnijeti sušenje i temperaturu iznad 100 °C.

Mikrobiološki toksini su otpadni proizvodi nekih vrsta bakterija s visokom otrovnošću. Kada se progutaju hranom i/ili vodom ovi proizvodi uzrokuju teško, često smrtonosno trovanje. Toksini, posebno u sušenom obliku, prilično su otporni na smrzavanje, kolebanje relativne vlažnosti zraka

i ne gube svoja štetna svojstva u zraku do 12 sati. Toksini se uništavaju duljim ključanjem i izlaganjem dezinficijensima.

Rikecije su po svom obliku i veličini bakterije, ali za razliku od ostalih bakterija žive i razmnožavaju se samo unutar tkiva / organa u kojima se nalaze.

1.1.2.1. Klasifikacija bioloških agensa

Klasifikacija bioloških agensa važna je zbog identifikacije, profilakse i liječenja. Njihova detekcija i identifikacija vrši se u laboratorijima koji također imaju različite klasifikacije ovisno o stupnju opremljenosti i nivou sigurnosti (2).

Najčešće prihvaćena klasifikacija bioloških agensa je ona po CDC-u – Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*), Atlanta, Georgia, SAD, po kojoj se agensi svrstavaju u tri kategorije (4):

1. **kategorija A:** Čine je agensi koje karakterizira laka i efikasna diseminacija, mogućnost lakog interhumanog prijenosa, visoki stupanj pobola i smrtnosti te snažan učinak na nepripremljeno javno zdravstvo. Postoji mogućnost i od izazivanja masovne panike, tim više što je potrebna posebna pripremljenost javnozdravstvenih kapaciteta (Tablica 1).

2. **kategorija B:** Čine je agensi koji imaju osrednju mogućnost prijenosa, uzrokuju osrednji pobol i niži stupanj smrtnosti, te zahtijevaju specifičnu pripremljenost dijagnostičkih kapaciteta i zdravstvenog zbrinjavanja (Tablica 2).

3. **kategorija C:** Uključuje nove, kao i već poznate patogene koji bi se u budućnosti mogli koristiti kao biološko oružje zbog svojih karakteristika kao što su laka dostupnost, jednostavna proizvodnja, jednostavna diseminacija, visok stupanj pobola i smrtnosti te shodno tome snažan učinak na nepripremljeno javno zdravstvo (Tablica 3).

Tablica 1. Biološki agensi kategorije A i bolesti koje izazivaju, prema (4)

Biološki agens	Vrsta	Bolest koju izaziva
<i>Bacillus anthracis</i>	bakterija	Antraks
<i>Yersinia pestis</i>	bakterija	Kuga
Botulin toksin	bakterijski toksin	Botulizam
<i>Francisella tularensis</i>	bakterija	Tularemija
Virus velikih boginja	virus	Variola vera
Ebola virus	virus	Ebola groznica
Marburg virus	virus	Marburška groznica
Lassa virus	virus	Lasinska groznica
Junin virus	virus	Argentinska hemoragijska groznica

Tablica 2. Biološki agensi kategorije B, prema (4)

Biološki agens	vrsta	Bolest
<i>Coxiella burnetti</i>	bakterija	Q groznica
<i>Brucella species</i>	bakterija	Bruceloza
<i>Burkholderia mallei</i>	bakterija	Maleus
Virus venecuelskog konjskog encefalitisa	virus	Venecuelski konjski encefalomijelitis
Virus istočnog i zapadnog konjskog encefalitisa	virus	Istočni i zapadni konjski encefalitis
ricin	proteinski otrov iz zrna biljke ricinus communis	
<i>Clostridium perfringens</i> toksin	bakterijski toksin	Enterotoksemija
Stafilokokni enterotoksin B	bakterijski toksin	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	rikecija	Epidemijski tifus

Prijenos hranom i vodom: <i>Salmonella sp.</i>	bakterija	Trbušni tifus
<i>Shyella dysenteriae</i>	bakterija	Dizenterija
<i>Escherichia coli</i>	bakterija	Enterokolitis
<i>Vibrio cholerae</i>	bakterija	Kolera

Tablica 3. Biološki agensi kategorije C, prema (4)

Biološki agens	vrsta	bolest
Nipah virus	virus	Nipah encefalitis
hantavirusi	virus	Hemoragijska groznica s bubrežnim sindromom
Virusi krpeljih hemoragijskih groznica	virus	Krim-kongo hemoragijska groznica Kjasanurska šumska bolest Omska hemoragijska groznica
Virus krpeljnog meningoencefalitisa	virus	Krpeljni meningoencefalitis
Virus žute groznice	virus	Žuta groznica
Na lijekove rezistentni uzročnici tuberkuloze	bakterije	Tuberkuloza

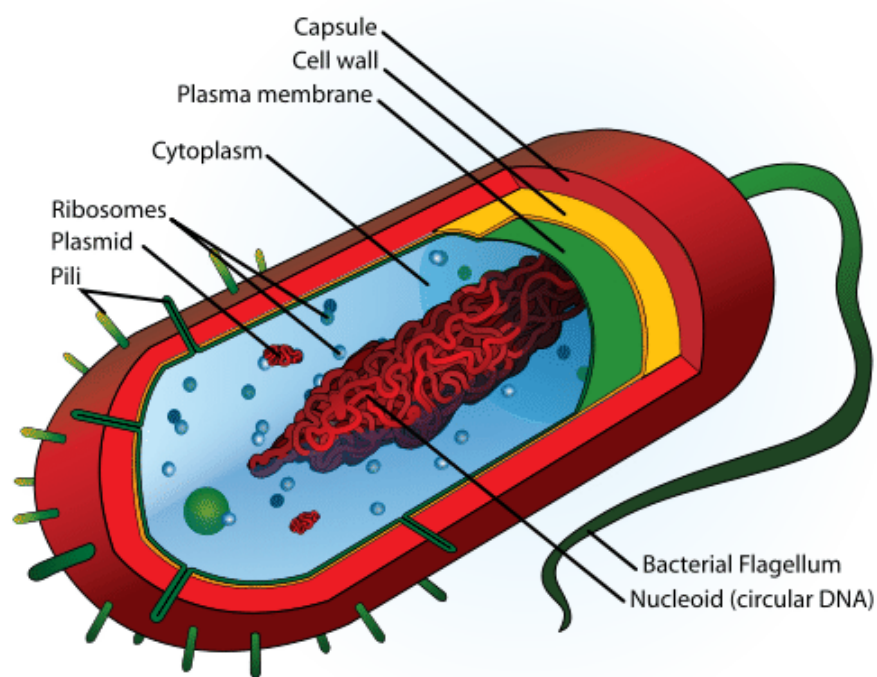
2. CILJ RADA

Ciljevi ovoga rada su:

- navesti i opisati bakterije koje se potencijalno mogu koristiti kao biološki agensi
- objasniti mogućnosti njihove detekcije i korištene dijagnostičke metode

3. BAKTERIJE KAO BIOLOŠKI AGENSI

Bakterije su prokariotski (jednostanični) mikroorganizmi veličine nekoliko μm . Pojavile su se na Zemlji prije otprilike 4 milijarde godina kao prvi oblici života. Bakterije naseljavaju tlo, vodu, termalnu vodu, radioaktivni otpad, biosferu zemljine kore, tj. prisutne su u svim staništima i osnova su svakog hranidbenog lanca u prirodi.



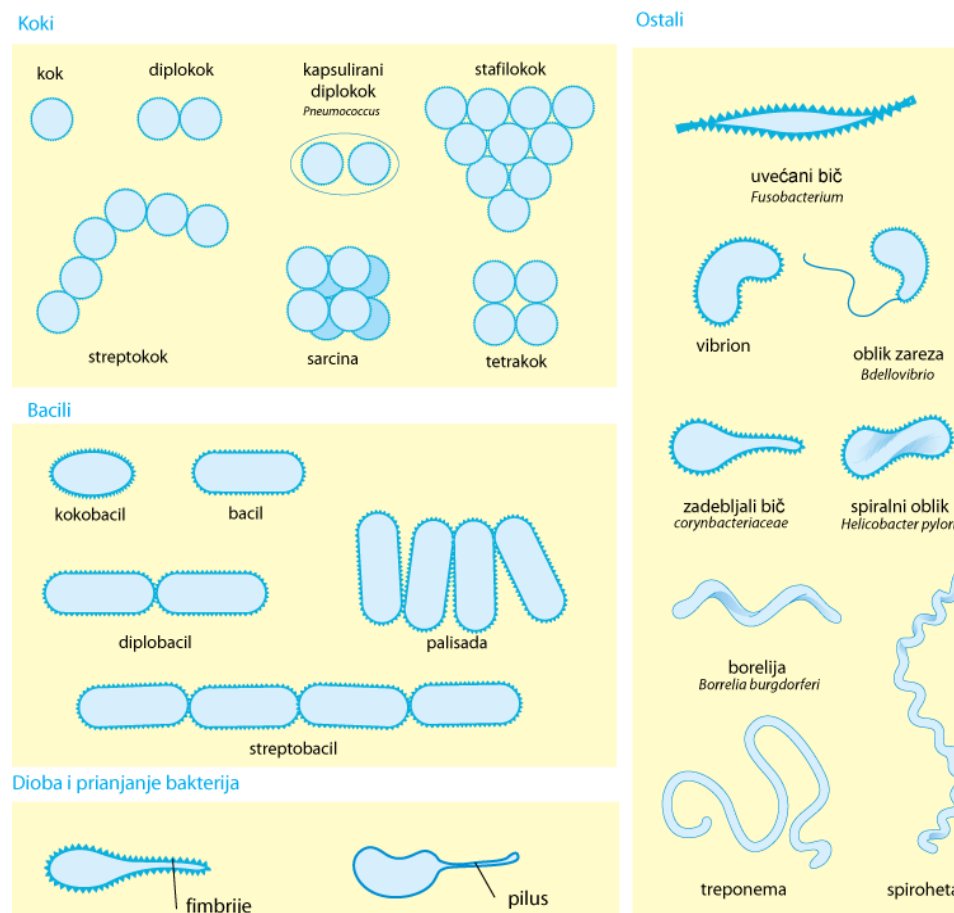
Slika 2. Građa bakterije

Preuzeto s: <https://www.ck12.org/biology/bacteria-characteristics/lesson/Bacteria-Characteristics-MS-LS/>

- Citoplazma čini najveći dio bakterijske stanice. To je polutekuća tvar u kojoj se zbiva većina metaboličkih procesa jer sadrži organske i neorganske tvari te organele (Slika 2)(6).
- Nukleoid ili jezgrina tvar je ekvivalent jezgre. Slobodno je rasprostranjen u središnjem dijelu citoplazme. Pretežno sadrži nukleinske kiseline, što je čini nositeljem nasljednih uputa (6).
- Plazmidi imaju funkciju nasljednog aparata koji je neovisan o nukleoidu. Kružnog su oblika i u njima se nalaze geni (6).
- Ribosomi su kuglastoga oblika, uglavnom sastavljeni od RNA. To su mjesta gdje se zbiva sinteza bjelančevina. Mogu biti vezani za citoplazmatsku membranu ili slobodni (6).
- Membrana se sastoji se od slojeva fosfolipida i bjelančevina. Obavlja funkcije važne za život bakterijske stanice: regulira ulazak i izlazak tvari te osmotsku ravnotežu (6).
- Stanična stijenka je čvrsta i elastična tvorevina građena od peptidoglikana (mureina). Gotovo sve vrste bakterija posjeduju staničnu stijenkiju koja okružuje i štiti unutrašnjost bakterijske stanice od mehaničkih oštećenja i promjene tlaka (6).
- Kapsula ili glikokaliks su sluzave tvorbe na površini stanica nekih vrsta bakterija (*kapsulogene* bakterije). Stvaraju ih enzimi na membrani stanice, a izlučuju se na površini stanične stijenke. Štite bakteriju od djelovanja fagocita, infekcije bakteriofaga i od nepovoljnih utjecaja okoliša (6).
- Bičevi ili flagele (lat. *flagellum* – bič) omogućavaju pokretanje nekim bakterijama. Izbijaju iz bazalnih tjelešaca smještenih dijelom na unutarnjoj strani citoplazmatske membrane, a dijelom na staničnoj stijenci. Građeni su od bjelančevina *flagelina* (6).
- Fimbrije (lat. *fimbria* – vlakno) i pili (lat. *pilius* – dlaka) su uglavnom ravne i čvrste tvorevine koje se nalaze na površini stanica gram-negativnih bakterija. U odnosu na bičeve su brojnije i mnogo manje, građene od bjelančevine *fibrilina* odnosno *pilina*. Njima bakterije prijanjaju na stanice makroorganizama te se koloniziraju (6).

Razmnožavanje se događa binarnim cijepanjem, a to je cijepanje bakterijske stanice nakon što dosegne određenu veličinu. Bakterije se razmnožavaju nespolno, pa dvije stanice kćeri koje

nastaju binarnim cijepanjem imaju identičnu DNK kao i matična stanica. Međutim, neke bakterije mogu međusobno razmjenjivati genetski materijal u procesu poznatom kao vodoravni prijenos gena. Ova metoda uključuje dvije već postojeće bakterije; nije oblik prenošenja s roditelja na dijete (5).



Slika 3. Morfologija bakterija

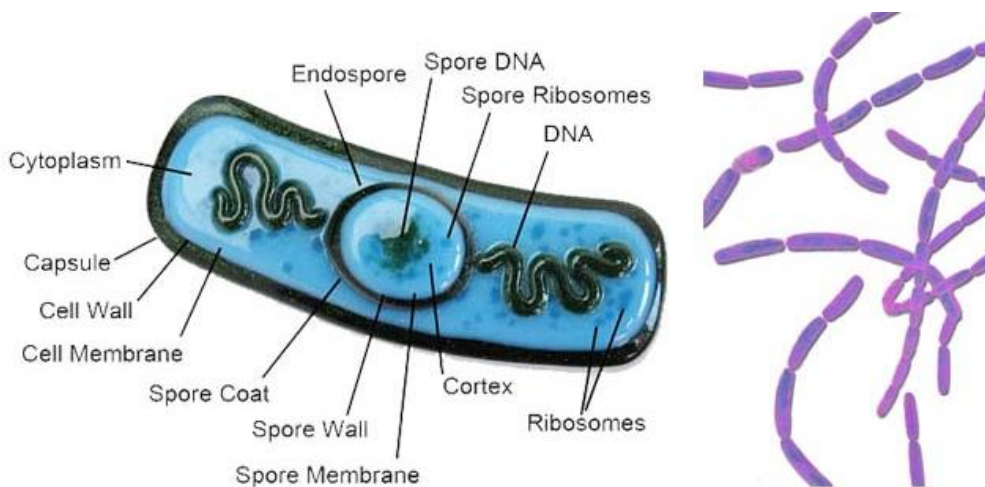
Preuzeto s: <https://www.wikiwand.com/sh/Bakterija>

- Kuglaste bakterije ili koki (grč. *coccus* – zrno) imaju oblik kugle. Kada nakon diobe stanice ostanu zajedno, tada nastaju diplokokci (dvije jedinke), streptokoki (lanac), stafilokoki (grozd), tetrakoki (dva para) ili sarcine (osam jedinke) (6).

- Štapićaste bakterije ili bacili (lat. *bacillus* – štapić) mogu biti različite duljine i promjera. Ako se nakon diobe štapići ne razdvajaju, zovu se diplobacili (u paru), streptobacili (lanac) ili palisade (poredani usporedno)(6).
- Zavojite bakterije ili spirili su u osnovi štapićaste bakterije jedanput ili više puta zavijene oko svoje zamišljene osi. Mogu biti vibrioni (u obliku zareza) ili spirohete (više zavoja) (Slika 3)(6).

3.1. *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis je gram-pozitivna, štapićasta, sporogena, aerobna bakterija, veličine 1-9µm, inkapsulirana, fakultativni anaerob.



Slika 4. Struktura bakterije *Bacillus anthracis*

Preuzeto s: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/04/Biochemical-Test-of-Bacillus-anthraxis.jpg>

Spore bakterije *Bacillus anthracis* vrlo su otporne na dezinficijense, osim na one oksidirajućeg djelovanja. Zbog izuzetne otpornosti na fizikalno-kemijske utjecaje iz okoliša, desetljećima mogu preživjeti u zemlji i životinjskoj dlaci. Kad dospiju u povoljni okoliš bogat aminokiselinama i glukozom reaktiviraju se u vegetativni oblik. Za razliku od spora, vegetativni oblici vrlo su osjetljivi na dezinficijense (8). Slika 4 prikazuje strukturu ove bakterije s njenim sporama.

Bacillus anthracis uzrokuje antraks – akutnu, septikemijsku, nekontagioznu bolest različitih životinjskih vrsta. Na infekciju su najpodložnije koze i ovce, potom goveda i konji, relativno su otporne svinje, a perad je potpuno otporna na infekciju. Pojavljuje se i u divljih životinja, poput vodenih konja, slonova i bizona. Antraks je zoonoza, jer se prenosi sa životinja na ljude. Ljudi se najčešće zaraze doticajem sa životinjama ili životinjskim proizvodima. Primarni izvori zaraze su izlučevine bolesnih životinja, sirovine životinjskog podrijetla te tlo zagađeno sporama *Bacillus anthracis*. Incidencija infekcije nastale prirodnim putem se uvelike smanjila u razvijenim zemljama, dok je u nekim zemljama (tropski predjeli Afrike, Azije, južne i sjeverne Amerike, Indonezija, Kina) zbog lošijih ekonomskih uvjeta kao i zbog određenih tradicionalnih postupanja s mesom i proizvodima od životinja, bolest još dosta prisutna (9).

Kod ljudi je najčešći **kožni oblik** zaraze. Očituje se kao crveno-smeđa kvržica, potom crvenilo i otekline da bi sve rezultiralo otvorenim čirom, odnosno stvaranjem crne kraste (odlatle i naziv crni prišt) (grč. *antraks* – ugljen).

Crijevni ili gastrointestinalni oblik nastaje nakon konzumacije mesa zaraženog endosporama i rezultira ulceroznim tvorevinama u jednjaku, mučninama, povraćanjem a može dovesti i do sepse ukoliko se ne otkrije na vrijeme.

Plućni ili inhalacijski oblik antraksa je najsmrtonosniji. Nekoliko dana nakon zaraze javljaju se simptomi slični gripi, koji se pogoršavaju i dovode do problema s disanjem, plućne embolije, šoka, gubitka svijesti i smrti.

Liječenje se provodi antibioticima penicilinske skupine; kombinacija penicilina i streptomicina; ciprofloksacinom ili doksiciklinom.

Patogeneza bolesti proučena je na modelu pokusno izazvanog plućnog oblika antraksa. Udahnute, ali i progutane, spore *Bacillus anthracis* fagocitiraju plućni makrofagi koji ih prenose do traheobronhalnih limfnih čvorova. Tamo spore potom prelaze u vegetativni oblik, te limfnim sustavom dopijevaju u krv i dalje kroz organizam, a osobito se zadržavaju u slezeni, tvoreći na taj način sekundarne centre infekcije i proliferacije. Vegetativni oblici *Bacillus anthracis* proizvode niz toksina koji potiču tvorbu antitoksičnih protutijela, koja su ujedno odgovorna za imunitet prema plućnom antraksu. Do danas nepotpuno su opisane tri komponente jednog od toksina (8):

1. edemski toksin,
2. protektivni antigen (imunogeni faktor potiče tvorbu zaštitnih antitoksičnih antitijela) i
3. letalni toksin.

Zaštitna antitijela vežu se za ciljne stanice i olakšavaju ulazak edemskog i letalnog toksina. Samo sinergističko djelovanje ova tri faktora ima toksičan učinak na makroorganizam. Spomenute komponente toksina oštećuju fagocite koji propadaju te uzrokuju povećanu propustljivost kapilarnog sustava i oštećenje sustava zgrušavanja krvi što rezultira kapilarnom trombozom, padom krvnoga tlaka te kolapsom, otkazivanjem bubrega i terminalnom anoksijom (8).

S obzirom da je inhalacijski oblik za čovjeka u pravilu smrtonosan i da se ne prenosi s čovjeka na čovjeka, ovaj patogen ima visoki potencijal kao biološko oružje i nalazi se u kategoriji A bioloških agensa (tablica 1). Uzgajanje veće količine spora ovog patogena smatra se kompliciranim, ali ne i nemogućim. Jednom napravljene spore mogu se uskladištiti na određeni vremenski period. Najveći negativni efekt na ljude postigao bi se sporama u obliku aerosola koji bi šireći se zrakom izazvao plućni antraks. Devet od deset pacijenata umire kada spore *Bacillus anthracis* dospiju u pluća i izazovu infekciju. Uzimanje antibiotika u ranijoj fazi spriječilo bi smrt samo u jednom od deset slučajeva (10).

Biološki incident koji se dogodio 1979. u Sverdlovsku (tadašnji SSSR), kad je slučajno ispušten *Bacillus anthracis* u obliku spora rezultirao je smrću 78 ljudi, brojnom uginulom i oboljelom stokom i kontaminacijom okoliša u promjeru oko 10 km. 2001. godine spore *Bacillus anthracis* puštene su putem pisama u američki poštanski sustav; umrlo je 5 osoba (7).

Svjetska zdravstvena organizacija utvrdila je da oslobađanje 100 kilograma spora iznad Washingtona moglo izazvati smrt između 130.000 i tri milijuna ljudi.

Za osobe s velikim rizikom (vojno osoblje, veterinari, laboratorijski tehničari, zaposlenici u tvornicama tekstila koji prerađuju kozju dlaku) postoji cjepivo protiv antraksa, koje se sastoji od acelularnog filtrata kulture. Postoji i posebno cjepivo za životinje. Za sigurnu zaštitu potrebno je stalno docijepljivanje. CDC preporučuje da se bolesnicima izloženim sporama antraksa da cjepivo protiv antraksa zajedno s antibiotskom profilaksom (9).

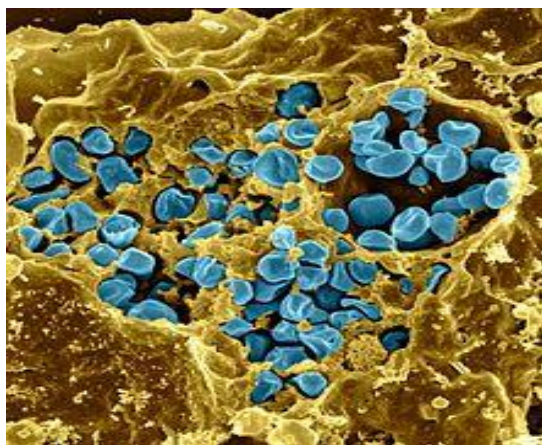
Zanimljivost: Spore *Bacillus anthracis* preživljavaju desetljećima u okolišu.

U ruskoj tundri antraks je endemična bolest zbog specifičnih životnih uvjeta i postupanja sa životinjama, naročito sobovima (konzumiranje svježeg mesa i krvi sobova), kao i zbog ogromnih nepristupačnih prostranstava koja otežavaju kontrolu životinja. U ljeto 2016. godine dogodila se epidemija antraksa u Rusiji na sibirskom polutoku Yamal Peninsula koja nije zabilježena od 1941. godine. Neuobičajeno visoka temperatura, kasna identifikacija infekcije te niz drugih čimbenika pogodovalo je epidemiji, ali se između ostalog utvrdilo da su spore antraksa sposobne preživjeti 75 godina u permafrostu i ponovo se aktivirati u povoljnim uvjetima, pa se onda s razlogom javlja bojazan da bi globalno zagrijavanje moglo osloboditi antraks i slične sporogene patogene iz permafrosta (10).

3.2. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je gram negativna, štapičasta, polimorfna, nepokretna, asporogena, fakultativna unutarstanična bakterija, koja kod ljudi i životinja uzrokuje smrtonosnu bolest tularemiju.

Tularemija, nazvana još i zečja groznica, je febrilna bolest slična tifusu. Simptomi su primarni lokalizirani ulkus, regionalna limfadenopatija, teški sistemski simptomi i ponekad, atipična pneumonija. Dijagnoza se postavlja ponajprije na osnovi epidemioloških podataka i kliničke slike. Liječi se streptomycinom, gentamicinom, kloramfenikolom ili doksiciklinom (11).



Slika 5. *Francisella tularensis* (obojena plavo) inficira makrofag (obojen žuto)

Preuzeto s: https://en.wikipedia.org/wiki/Francisella_tularensis

Prvi slučaj tularemije u svijetu zabilježen je 1914. god u SAD-u, a američki bakteriolog Edward Francis koji se bavio tularemijom, prvi je otkrio ovu bakteriju 1922. godine i nazvana je njemu u čast Francisella.



Slika 6. Kolonije *F. tularensis* na čokoladnom agaru

Preuzeto s: https://en.wikipedia.org/wiki/Chocolate_agar

Francisella tularensis je veoma infektivna bakterija. Već 10-15 intradermalno apliciranih ili inhaliranih bakterija dovodi do bolesti (Slika 5). Sposobna je inficirati veliki broj staničnih tipova i moguće je da su ostale stanice, uključujući i makrofage bitni rezervoari za razmnožavanje *in vivo*. Bakterija, nakon infekcije, najkasnije 1 sat izlazi iz fagosoma i razmnožava se u citoplazmi. Primarni rezervar tularemije su zečevi i glodavci, a vektori bolesti su muhe i komarci i krpelji ovisno o podneblju. Ljudi se zaraze preko hrane, inokulacijom, inhalacijom ili kontaminacijom. Može prodrijeti kroz naizgled neoštećenu kožu, dok zapravo ulazi kroz mikroskopske promjene. Za ljude virulentniji serotip, tip A se nalazi u zečeva i glodavaca (otud i naziv zečja groznica). *F. tularensis*, temeljem biokemijskih razlika, razlika u virulenciji, epidemioloških i razlika u genomu dijeli se na tri podvrste. Tip A – *F.tularensis subsp. tularensis* nalazimo u Sjevernoj Americi i najvirulentnija je podvrsta koja uzrokuje najveću smrtnost, tip B – *F.tularensis subsp. holarctica* nalazimo u Europi, Aziji i Sjevernoj Americi, a uzrokuje blaže oblike bolesti. Podvrstu *F.tularensis subsp. mediasiatica* nalazimo u središnjoj Aziji i dijelovima bivšeg SSSR-a, a smatra se još slabijim patogenom od tipa B. *F.tularensis* može zaraziti 190 vrsta sisavaca, 88 vrsta beskralježnjaka i 23 vrste ptica i 3 vrste vodozemaca, a istraživanja pokazuju da je otporna u vodi, hrani i na različitim temperaturama (11).

Bolest u kliničkoj slici može biti jako različita ovisno o načinu i mjestu ulaska uzročnika u organizam. Vanjski oblici su: **ulceroglandularni** (kontakt sa životinjom, ugriz), **glandularni**, **okuloglandularni** (umivanje zagađenom vodom) te **anginoizni**.

Unutarnji oblici bolesti su **plućni** (udisanje), **abdominalni** (hrana, voda), **tifoidni** (septički), može nastati od bilo kojeg načina infekcije. Inkubacija bolesti je 3-10 dana, a počinje naglo s groznicom, visokom temperaturom i općim simptomima infekcije (11).

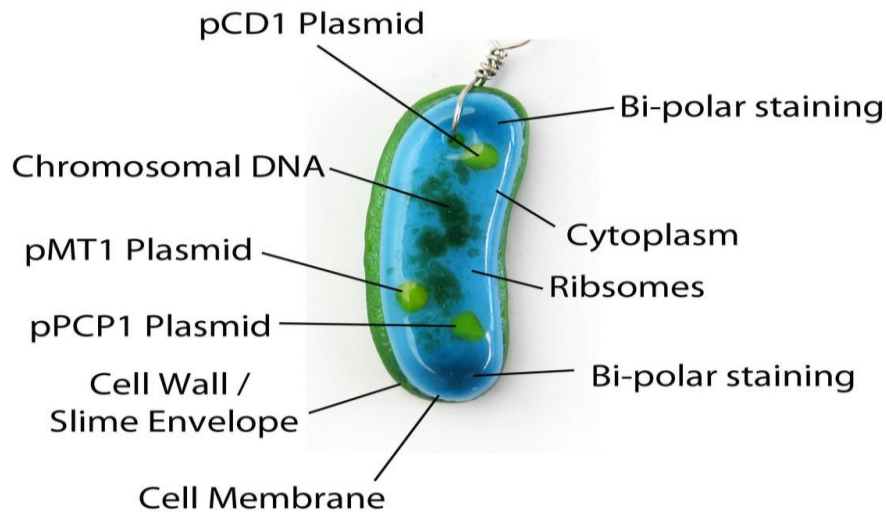
Francisella tularensis pogodan je patogen za biološko oružje jer se može lako raspršiti putem aerosola, vrlo je infektivan, nije perzistentan (tj. dekontaminacija je jednostavna), te učinkovito onesposobljava zaražene pojedince, posebice zbog različite kliničke slike i nespecifičnih simptoma koji mogu nalikovati drugim infekcijama dišnih sustava. Smrtnost za neliječene inhalacijske oblike je 30-60%.

1969. godine Svjetska zdravstvena organizacija napravila je model predviđanja napada ovom bakterijom. Izračunato je da bi bacanje 50 kg bakterije u obliku aerosola na grad od 5 milijuna stanovnika dovelo do onesposobljavanja 250 000 ljudi i 19 000 smrtnih slučajeva. Ovaj model korišten je od strane CDC-a pri procjeni troškova napada s ovim oružjem i zaključeno je da velika infektivnost i visoki troškovi opravdavaju stavljanje ove bakterije u A kategoriju biološkog oružja.

3.3. *Yersinia pestis*

Yersinia pestis je gram-negativna štapičasta bakterija, pleomorfna, fakultativni anaerobni kokobacil, asporogena.

Izlučuje niz enzima i egzotoksina, a u staničnom zidu sadrži endotoksin. Otporna je na hladnoću, a u organskom materijalu (gnoj, ispljuvak, leš) može dugo opstati. Osjetljiva je na dezinfekcijska sredstva i antibiotike. Kad se oboji Giemsa-om ili metilen plavom bojom, pokazuje bipolarno bojanje s dva gusto obojana kraja i središnjim bistrim područjem.



Slika 7. Struktura bakterijske stanice *Yersinie pestis*

Preuzeto s: <https://www.deviantart.com/trilobiteglassworks/art/Yersinia-Pestis-2-Fused-Glass-Earrings-795085971>

Bakterija *Yersinia pestis* nije pokretna i ne može se kretati kroz svoje okruženje. Za razmnožavanje potrebna joj je životinja domaćin, dakle, obvezni je parazit. Ove je bakterije prvi put otkrio kao uzrok kuge 1894. godine Alexandre Yersin s Pasterovog instituta u Parizu.

Yersinia pestis je jedini član obitelji enterobakterija koji se prenosi putem vektora buha. Raste u cijelom retikuloendotelnom sustavu (RES). RES pokriva širok raspon tkiva - krv, limfne čvorove, opće vezivno tkivo, jetru, pluća, slezenu i koštanu srž, čija je funkcija odstranjivanje otpadnih i stranih tvari te mikroorganizama putem fagocitoze (12).

Y. pestis može zaraziti sve sisavce, a primarno je bolest glodavaca. Bolest se prenosi na čovjeka ugrizom buhe koje su se hranile na zaraženim glodavcima, izravnim kontaktom sa zaraženom ili uginulom životinjom i interhumanim prijenosom kapljičnim putem. Nakon inkubacije od 1 do 7 dana kuga se javlja u tri najčešća oblika: bubonska kuga, septikemijska i plućna kuga, a rijetko kao kožni ili gastrointestinalni oblik. Najčešći oblik kuge je **bubonska** kuga. Kada zaražena buha ugrize čovjeka ili životinju, bakterija ulazi u krvotok i dolazi do limfnih čvorova gdje se replicira. Simptomi započinju naglo s povišenom temperaturom i glavoboljom. Infekcija uzrokuje otok i bol

u limfnim čvorovima smještenim najbliže ugrizu. Natečeni i bolni limfni čvor naziva se bubon - otuda i naziv bubonska kuga. Na kraju se limfni čvorovi pune gnojem jer imunološki sustav šalje bijele krvne stanice i stvara antitijela za ubijanje stranih bakterija. Ako zaraza zavlada, može se preseliti u pluća i uzrokovati pneumoničnu kugu. Kad *Yersinia pestis* uđe u krvotok i razmnoži se, rezultat je septikemijska kuga. Ova se infekcija velikom brzinom širi cijelim tijelom. Bubozi nisu uvijek prisutni, ali infekcija ove vrste također može uzrokovati i bubonsku i pneumoničnu vrstu kuge, jer protok krvi dovodi bakterije u limfne čvorove i pluća. Znakovi nekroze često su prisutni na koži, nožnim prstima, nosu i prstima (12).

Najvirulentniji oblik kuge je **plućna** kuga. Zaražene kapljice koje putuju putem kašlja i kihanja zaraženih domaćina ulaze u pluća zdravih žrtava. Vrijeme inkubacije mnogo je kraće od vremena bubonske kuge, a simptomi mogu započeti već 24 sata nakon kontakta. Plućna kuga jedina je vrsta kuge koja se može prenijeti od osobe do osobe. Simptomi su slični simptomima bubonske kuge s vrućicom i glavoboljom, ali su popraćeni i respiratornim simptomima poput bolova u prsima, kašlja i otežanog disanja. Infekcija se liječi antibioticima. Najučinkovitiji antibiotik za pneumoničnu kugu je streptomycin, bubonski i septikemijski oblici liječe se kloramfenikolom, a manje teški oblici tetraciklinskim antibioticima (12).

Yersinia pestis je navedena kao biološko oružje kategorije A (Tablica 1) od strane Centra za kontrolu i prevenciju bolesti. Aerosolni oblici plućne kuge mogli bi uzrokovati međunarodne pandemije s visokom stopom smrtnosti. Vrijeme od 1 do 6 dana potrebno da se razviju simptomi uvelike pogoduje brzini širenja ove bolesti kao i nemogućnosti održavanja epidemije pod kontrolom. S obzirom da se bakterija pojavljuje u prirodi, može se izolirati i uzgojiti u većoj količini u laboratoriju, iako bi za proizvodnju učinkovitog oružja pomoću *Yersinia pestis* bilo potrebno napredno znanje i tehnologija.

Zabrinjavajuća je pojava novih sojeva rezistentnih na antibiotike. Naime, kako se plazmidi mogu prenijeti između različitih bakterija ili razviti vlastite gene koji se razlikuju od genetskih sekvenci bakterijskog kromosoma, znanstvenici su potvrdili slučaj da je *Yersinia pestis*, od neke druge bakterije, koja je razvila otpornost prema određenom antibiotiku, jednostavno "kopirala" njezinu otpornost (13).

Na Madagaskaru, na kojemu je kuga endemska bolest, 1995. godine izoliran je uzročnik kuge za koji se ustanovilo da je otporan na čak osam antibiotika kojima je bio tretiran. Znanstvenici s

Instituta Pasteur u Parizu analizirali su genski materijal uzročnika i ubrzo kao nositelja rezistencije identificirali plazmid, prstenastu DNK strukturu sposobnu za izmjenu među bakterijama, kojeg su nazvali pIP 1202. Otkriće je 1997. objavljeno u "*New England Journal of Medicine*", a istraživački tim francuskih i američkih znanstvenika je ustanovio da određeni tip salmonele, koji je također pokazao otpornost na neke antibiotike, u sebi nosi plazmid izrazito nalik na onaj pIP 1202 koji je pronađen u uzročniku epidemije kuge na Madagaskaru 1995. Njihov je zaključak bio da i jedan i drugi plazmid imaju zajednički izvor te da se lako prenose s jednog uzročnika bolesti na drugi (14).

U siromašnim zemljama s nedovoljnim higijenskim uvjetima, štakori imaju najveću ulogu u prijenosu zaraženih buha u ljudska naselja. I danas, osobito u Aziji, Africi ali i u Sjevernoj Americi, postoje ponovljeni slučajevi kuge. Prema WHO-u, svake se godine registrira između 1000 i 2000 slučajeva bolesti, a broj neprijavljenih slučajeva je visok.

Godine 2017. izbila je epidemija kuge na Madagaskaru. Iako je kuga endemski prisutna na djelovima Madagaskara (otprilike 400 slučajeva godišnje) u epidemiji je prijavljeno oko 2000 slučajeva, od toga najveći broj plućne kuge i skoro 10 % umrlih, te se bolest proširila i na neendemska područja Madagaskara.

Zbog svog kobnog tijeka bez modernog liječenja, zbog brzog i lakog širenja te zbog razvijanja otpornosti na antibiotike i činjenice da Svjetska zdravstvena organizacija vidi kugu kao bolest koja se ponovno pojavljuje, CDC stvrstava ovaj patogen na A listu potencijalnih bioloških agensa.

Trenutno se proučavaju cjepiva protiv bakterije *Yersinia pestis* koja ne zahtijevaju upotrebu živog cjepiva. Korištenje flagellina – strukturnog proteina koji također djeluje kao sredstvo za poticanje imunološkog odgovora u kombinaciji s antigenima *Yersinia pestis* pokazuje obećavajuće rezultate (13).

3.4. *Brucella* species

Brucella species je gram-negativni, nepokretni, asporogeni, aerobni kokobacil.

Brucele su podijeljene u šest vrsta, uglavnom na temelju preferencija domaćina, patogenosti i razlika u biokemijskim svojstvima. Međutim, DNK-DNK hibridizacijske studije otkrile su da su vrste izuzetno homogene pa je od strane NCBI – Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information*) predloženo da se sve vrste smatraju biovarima jedne vrste i nazivaju se *Brucella melitensis* (Slika 8). Taj naziv vrste obuhvaća *Brucella melitensis* i 5 ostalih biovarova *Abortus*, *Canis*, *Neotomae*, *Ovis* i *Suis*. Naknadno su prepoznate jos dvije vrste (Tablica 4).

Tablica 4. Vrste brucella i preferirani domaćini kao rezervoar infekcije

	Vrsta <i>Brucella</i>	domaćini
1.	<i>Brucella abortus</i>	goveda
2.	<i>Brucella melitensis</i>	koze, ovce
3.	<i>Brucella suis</i>	svinje
4.	<i>Brucella neotomae</i>	ovce
5.	<i>Brucella ovis</i>	
6.	<i>Brucella canis</i>	psi
7.	<i>Brucella ceti</i>	morski sisavci
8.	<i>Brucella pinnipedialis</i>	morski sisavci

Genom *Brucella* sastoji se od dva kružna kromosoma, osim *Brucella suis*, koji ima jedan kromosom. Sve vrste brucele obvezni su paraziti i svaka vrsta ima poželjnog prirodnog domaćina

koji služi kao rezervoar infekcije. Brucele imaju sklonost prema kopitarima, fetalnim tekućinama i testisima bikova, ovnova, nerasta i pasa. *Brucella abortus* izlučuje se u goveđe mlijeko i može ostati održiva u mlijeku, vodi i vlažnom tlu do četiri mjeseca (15).

Bakterije uzrokuju bolest koja se naziva **bruceloza**. Bruceloza je izvorno zoonoza, a čovjek se može zaraziti konzumacijom mesa ili mlijeka zaraženih životinja, izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom, ili udisanjem aerosola. Prijenos sa čovjeka na čovjeka je vrlo rijedak (15).



Slika 8. Kolonije *Brucelle melitensis*

Preuzeto s: https://hr.wikipedia.org/wiki/Brucella_melitensis

Bruceloze su rasprostranjene po cijelom svijetu i samo su u nekoliko zemalja iskorijenjene. U nerazvijenim zemljama brucele su raširene zbog niske razine osobne higijene, načina obrade mliječnih proizvoda, higijene okoliša te tradicionalnih načina uzgoja stoke. Bolest se pojavljuje sporadično i endemski. Endemska bruceloza nalazi se u područjima gdje je uzgoj životinja u uskoj vezi s prebivalištem ljudi. Izvor zaraze su domaće životinje (goveda, svinje, koze), s kojih se uzročnici prenose na čovjeka. Putevi prijenosa zaraze su: izravni kontakt sa zaraženom

životinjom, inhalacija zaraženog aerosola te konzumiranje mlijeka, mliječnih proizvoda i mesa zaraženih životinja. Ulazna vrata zaraze kod čovjeka su: sluznica probavnog trakta, male ogrebotine, a ponekad i sluznica respiratornih puteva. Bruceloza se uglavnom javlja kao profesionalna bolest mesara, ratara, stočara, veterinara, laboratorijskih radnika, uzgajivača domaćih životinja, kuhinjskog osoblja, te radnika zaposlenih oko pakiranja mesa i životinjskih produkata. Inkubacija kod bruceloze jako varira i u prosjeku traje 5 do 21 dan, ali period latencije između ulaska uzročnika u organizam i pojave simptoma bolesti može trajati i 6 do 9 mjeseci (16).

U kliničkoj slici razlikuju se tri stadija bolesti. Prvi stadij se razvija na mjestu ulaska uzročnika na koži ili sluznici, uz upalu i otok okolnih limfnih čvorova. Drugi stadij bolesti je generalizacija infekta, koja nastaje prodiranjem uzročnika u krv i retikuloendotelna tkiva s pojavom općih infektivnih simptoma. Iz krvotoka brucele prelaze u organe (bubreg, kost, srce, sjemenik, moždane ovojnice, itd.). Treći stadij predstavlja kroničnu fazu bolesti, i tada obično dolazi do promjena u jednome od netom navedenih organa (16).

Među najčešćim simptomima bruceloze u kasnijoj fazi bolesti je tumor slezene i povećani limfni čvorovi, bronhopneumonija, miokarditis, endokarditis. Bruceloza je u većini slučajeva subakutno-kronična bolest, a uzrokuje privremenu ili trajnu nesposobnost za rad (15).

Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike bolesti, mikrobioloških i laboratorijskih pretraga, epidemiološkog izvida i ankete, te seroloških pretraga. Terapija se provodi tetraciklinima i aminoglikozidima (17).

Profilaksa se sastoji u iskorjenjivanju bolesti kod životinja, te prekidanje puteva zaraze od životinja do čovjeka i sprječavanje infekcije ljudi, što obuhvaća pasterizaciju i sterilizaciju i termičku obradu mlijeka i životinjskih proizvoda. U SAD-u i nekolicini drugih zemalja postoje programi kojima se nalaže otkrivanje bolesti u životinja, uništavanje oboljelih životinja i cijepljenje mlade seronegativne stoke i svinja. Otpornost nakon infekcije je u ljudi kratkotrajna, obično oko dvije godine (16).

Prvi klinički opis bolesti dao je kirurg Marston za vrijeme krimskog rata. Godine 1886. David Bruce je izolirao *Brucellu* iz slezene ljudi umrlih od malteške groznice.

Bakterija je vrlo zarazna i procjenjuje se da bi 10-100 bilo dovoljno da stvori infektivni aerosol. Iako je smrtnost od bruceloze niska, otpornost bakterije koja u okolišu može preživjeti i dvije

godine, duga inkubacija i teško postavljanje dijagnoze te moguće ostavljanje trajnih posljedica za zdravlje i život ljudi svrstavaju brucelu u A kategoriju potencijalnog biološkog oružja (17).

3.5. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum je gram-pozitivna, štapičasta bakterija, obligatno anaerobna, sporogena, pokretna, sa sposobnošću stvaranja neurotoksina botulina. To je strogi anaerobni organizam za koji su najbolji uvjeti za rast temperatura od 26-28 °C i alkalni pH (8-8,4). Te bakterije stvaraju spore koje djeluju poput zaštitnih obloga tj. omogućavaju bakterijama da prežive u okolišu, čak i u ekstremnim uvjetima. Spore su termostabilne i mogu preživjeti u hrani koja nije dostatno termički obrađena (temp. od 100°C i tlak od 1atm mogu tolerirati i do nekoliko sati). Većina toksina oslobodi se iz bakterije tijekom razmnožavanja u obliku protoksina.

Spore *Clostridium botulinum* česte su u okolišu, pronađene su širom svijeta u različitim uzorcima tla i morskim sedimentima, pa mnogi slučajevi bolesti mogu biti uzrokovani gutanjem ili udisanjem malih količina prašine ili zemlje, kao i apsorpcijom preko očiju ili oštećene kože. Spore su otporne na antiseptike: potrebno je 24 sata da se unište s 20% formalina, također su prilično otporne na klasična baktericidna sredstva poput UV zraka, hipoklorita, alkohola i kvarternih amonijevih spojeva. Spore mogu ostati neaktivne mnogo godina, ali u povoljnom okruženju (anaerobno i alkalno okruženje, niska koncentracija soli i šećera) spore prelaze u vegetativni oblik koji onda izlučuje jedan od najsmrtonosnijih poznatih toksina (18).

Proizvodnja toksina u hrani traje neko vrijeme, u prosjeku osam dana na 26 °C.

Clostridium botulinum stvara sedam antigenski različitih tipova neurotoksina, od kojih su četiri patogena za ljude - tipovi A, B, E, te rjeđe tip F. Tipovi A i B su vrlo toksični proteini, otporni na razgradnju gastrointestinalnim enzimima.

Botulizam je rijetka, ali po život opasna intoksikacija uzrokovana spomenutim neurotoksinima bakterije *Clostridium botulinum*. Karakteriziran je ekstremnom slabošću i brzim zamorom poprečnoprugaste i glatke muskulature. Toksini *Clostridium botulinum* teško oštećuju živce i mišiće te već vrlo male količine toksina mogu biti smrtonosne. Klinički oblici botulizma uključuju botulizam prenesen hranom, botulizam rane, dojenački botulizam i botulizam nepoznate etiologije. Alimentarni botulizam nastaje nakon konzumacije kontaminirane hrane u kojoj je proizveden toksin, dok kod druga dva oblika *C. botulinum* stvara neurotoksin *in vivo*, u inficiranom tkivu, odnosno u debelom crijevu. Nakon apsorpcije, toksin ometa oslobađanje acetilkolina na završecima perifernih živaca što dovodi do paralize motoričkih živaca i disfunkcije autonomnog živčanog sustava (19).

Najveću opasnost po život predstavlja respiratorna insuficijencija i njene komplikacije. Respiratorni poremećaj zahtijeva liječenje u jedinici intenzivne skrbi, uz mehaničku ventilaciju. Pravilnom i pravovremenom dijagnozom i liječenjem, manje od 5 od svakih 100 osoba s botulizmom umire.

Riječ botulizam potječe od latinske riječi *botulus*, što znači kobasica, jer se početak trovanja pojavio u Europi u 19. stoljeću, a povezan je s kobasicama i drugom gotovom hranom.

Emile van Ermengem, belgijski bakteriolog, 1895. godine prvi je put izolirao ovu bakteriju iz komada šunke od koje su se otrovale 34 osobe (18).

Najčešći izvor trovanja je hrana konzervirana u domaćinstvu, rjeđe i industrijski pripremljena hrana. Povrće, riba, voće i začini najčešći su prijenosnici, ali to mogu biti i govedina, mliječni proizvodi, svinjetina, perad i druge vrste hrane. Liječenje se provodi trovalentnim konjskim serumom koji sadrži antitoksine (A, B, E). Antitoksin ne inaktivira toksin koji se već vezao za neuromuskularnu vezu pa se zbog toga već nastali neurološki simptomi ne mogu brzo popraviti. Potpuni oporavak ovisi o regeneraciji živčanih završetaka, što može potrajati tjednima ili mjesecima. Antitoksin ipak može usporiti ili zaustaviti dalje napredovanje bolesti. Veoma je mala vjerojatnost da će antitoksin biti djelotvoran ako se primjeni nakon 72 h od pojave simptoma (19).

Budući da i vrlo male količine *C. botulinum* toksina mogu izazvati tešku bolest, valja oprezno rukovati s materijalima za koje se sumnja da sadrže toksin. Njegova iznimna snaga, dostupnost i

ograničenja u liječenju učinili su botulin toksin jednim od potencijalno najopasnijih bioloških agensa (kategorija A). Potencijalno ga je moguće u obliku spora raspršiti putem aerosola ili hrane. Godine 1990. pripadnici japanske sekte Aum Shinrikyo raspršili su toksin u znak protesta zbog nekih političkih odluka, ali nisu uspjeli izazvati masovnu smrt koju su očekivali.

Zanimljivost: U 16. stoljeću, švicarski liječnik i alkemičar, Paracelsus, rekao je: "Sve je otrov, ništa nije bez otrova, samo doza čini otrov neprimjetnim". U malim dozama, botulinum toksin (pod nazivom *Botox*) koristi se u medicini i kao učinkovit i popularan tretman za bore. Svake godine oko gram čistog botulinum toksina potroši se na medicinske i kozmetičke svrhe širom svijeta (18).

3.6. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je gram pozitivna, anaerobna i sporulativna bakterija u obliku štapića. Prebiva u tlu, vodi, kao i u gastrointestinalnom traktu različitih sisavaca, uključujući i ljude. Ova sveprisutna bakterija proizvodi više od 15 različitih proteinskih toksina/enzima s različitim načinima djelovanja.

Patogene vrste roda *Clostridium* sintetiziraju neke od najmoćnijih toksina koji uključuju tetanus i botulinum neurotoksine, a koje proizvode *Clostridium tetani* i *Clostridium botulinum*. Te se bakterije nalaze u sličnim okruženjima (najčešće tlu) kao dugotrajne, mirne spore koje čekaju domaćina sisavca i priliku za infekciju (20).

Četiri glavna toksina koja proizvodi *C. perfringens* utječu ili izravno na stanične membrane povećavajući propusnost i uzrokujući ionsku neravnotežu (alfa, beta i epsilon toksini), ili uništavaju aktinski citoskelet (jota toksin). Epsilon toksin je najmoćniji toksin. Od pet poznatih vrsta *C. perfringens* (A-E), dvije vrste, B i D proizvode ovaj toksin. Ti sojevi izolirani su uglavnom od ovaca, koje su najčešće pogođene ovim toksinom, povremeno od koza i goveda, a o djelovanju na ljude ima vrlo malo podataka. Epsilon toksin odgovoran je za stvaranje vrlo teškog i često fatalnog oblika enterotoksemije. Velika doza toksina uzrokuje povećanu crijevnu propusnost

olakšavajući ulazak toksina u krv. Toksin se akumulira u mozgu i u manjoj mjeri u bubrezima, remeti vaskularni endotel, te uzrokuje nekrotične lezije.

Epsilon toksin je sposoban proći kroz krvno-moždanu barijeru i potaknuti oslobađanje glutamata (neurotransmitter), što objašnjava simptome živčane pobude uočene kod enterotoksemije životinja. Infekcija *C. perfringens* navodno je povezana s multiplom sklerozom (MS), međutim interakcije između bakterija i bolesti trenutno nisu dobro razumljive. Neke studije u Velikoj Britaniji pokazale su da polovica ljudi od ispitanih s multiplom sklerozom ima antitijela na epsilon toksin (21).

Kod ljudi, moguć način prijenosa epsilon toksina je aerosolom, preko kontaminirane hrane i vode. Epsilontoksin se apsorbira i djeluje lokalno u crijevima, a zatim se veže i uzrokuje lezije u drugim organima, uključujući bubrege, pluća i mozak. S obzirom da ima sposobnost stvaranja pora u stanicama uzrokuje gubitak kalija i tekućine, te je moguća pojava neuroloških simptoma i plućnog edema.

Za liječenje od koristi može biti hiperimuni serum ako se primjeni brzo nakon ekspozicije.

Zbog svoje velike toksične potencije, epsilon toksin se smatra potencijalnim agensom za bioterorizam, a Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) klasificirao ga je kao biološko sredstvo kategorije B (22).

3.7. *Chlamydia psittaci*

Chlamydia psittaci je nepokretna, unutarstanična, gram negativna bakterija. Ima 7 poznatih genotipova i svi se mogu prenjeti na ljude i uzrokovati psikatozu ili papagajsku groznicu.

Prvi put izolirana je u Švicarskoj 1879. godine i u ovo doba nazvana *Pseudotypus*. Ime *Chlamydia psittaci* usvojio je 1890. godine francuski znanstvenik Morange, koji je istu bakteriju izolirao u papigama, kao uzročnika psikatoze.



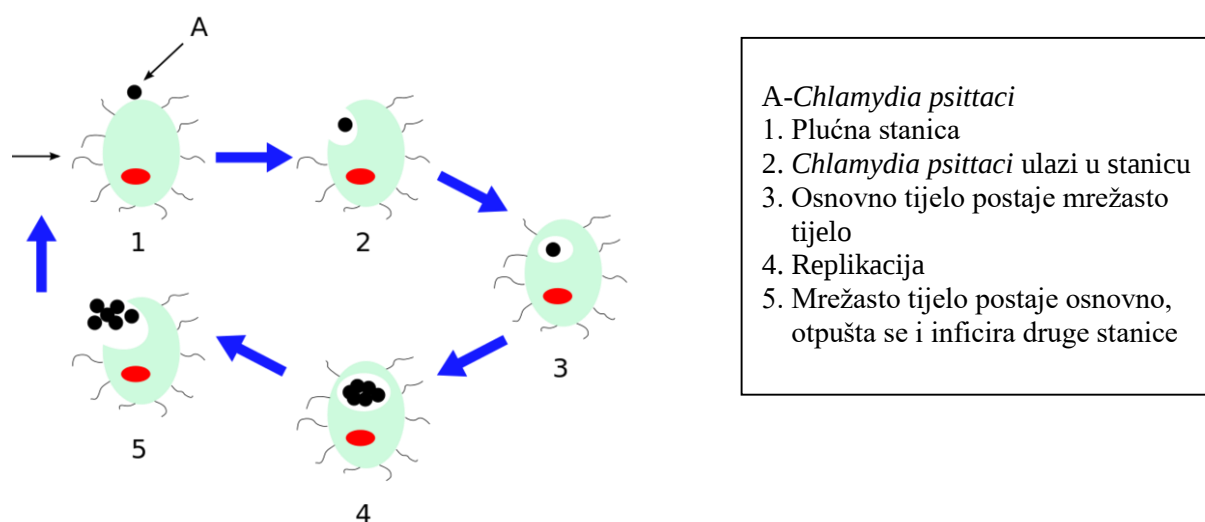
Slika 9. Papige – prenosioci psitakoze

Preuzeto s: <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/images/header-psittacosis.jpg>

Psitakoza (papagajska groznica) je rijetka pneumonija uzrokovana bakterijom *Chlamydia psittaci* koja se nalazi uglavnom u pticama kao što su papagaji, male papige i vrste patuljastih papiga (Slika 9). Nalazi se i u ostalim pticama kao što su golubovi, zebe, pilići i purani. Ljudi se obično inficiraju udisanjem kontaminiranog zraka ili kontaktom s zaraženim pticama ili njihovim izmetom koji može ostati zarazan i nekoliko mjeseci. Interhumani prijenos je vrlo rijedak. Psitakoza je pretežno profesionalna bolest ljudi koji rade u dućanima za kućne ljubimce ili na farmama peradi. Vrijeme inkubacije je 5 – 14 dana. Ozbiljnost simptoma može varirati od laganih do sistemskih bolesti

praćenih teškom upalom pluća. Specifičniji simptomi uključuju vrućicu, zimicu, glavobolju i mialgiju. Suvremenom medicinom smrtnost je ograničena na manje od 1% svih prijavljenih slučajeva i lako se liječi antibioticima kao što je tetraciklin (ili njegovi derivati doksiciklin ili vibramicin). Tetraciklin djeluje vežući se za ribosom bakterije, čime inhibira sintezu proteina. To zaustavlja razmnožavanje bakterija i omogućava imunološkom sustavu da očisti postojeću infekciju. Vibramicin je danas najčešće korišten antibiotik za liječenje psitakoze. Ako se liječenje provodi u ranim fazama infekcije, psitakoza je rijetko ikada kobna iako oporavak može potrajati duže, naročito u težim slučajevima.

Krvni testovi na protutijela su najpouzdanija metode potvrđivanja dijagnoze (23).



Slika 10. Način ulaska *Chlamydia psittaci* u stanicu

Kad se udahnu čestice koje sadrže *C. psittaci*, bakterija će započeti napadom na respiratorni trakt domaćina. Stanice imunološkog sustava reagiraju na prisutnost bakterije fagocitozom i stvaranjem fagosoma koji su pak odgovorni za dovođenje bakterije u lizosome, kiseli dio u stanici, koji ima razne enzime koji pomažu uništavanju bakterije. Spajanjem fagosoma i lizosoma formira se fagolizom koji onda ubija bakteriju. Međutim, ovaj uobičajeni mehanizam ne vrijedi za *Chlamydia psittaci* (24).

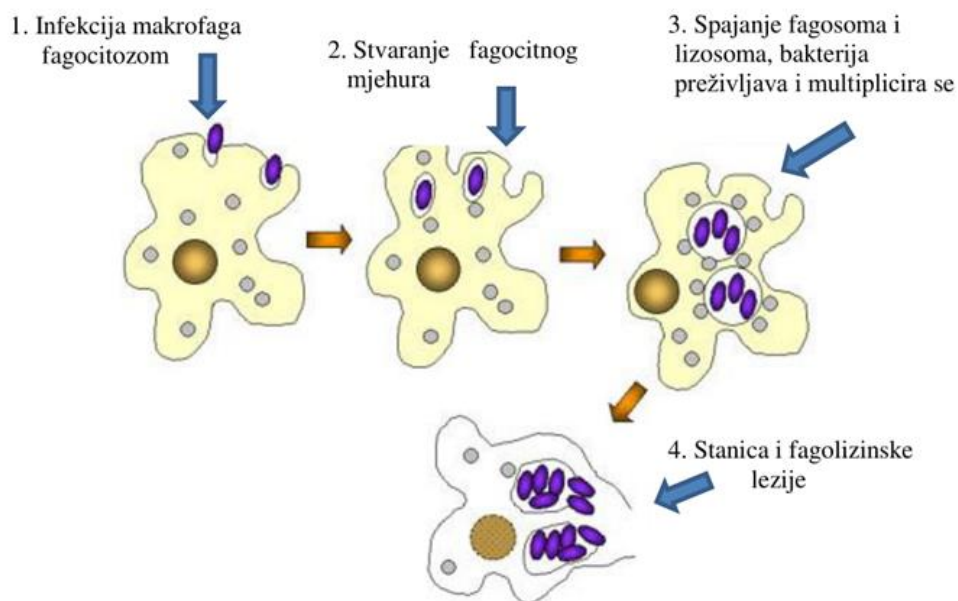
U njenom slučaju osnovno tijelo se ne ubija kada se stapaju fagosom i lizosom nego se pretvara u mrežasto tijelo. Mrežasto tijelo je bakterija koja se sada može replicirati. Nakon replikacije bakterija izazi iz stanice domaćina liziranjem ili pucanjem stanice, što će rezultirati smrću stanice domaćina. Tada će osnovno tijelo nastaviti putovanje i ponoviti proces zaraze i širenja u tkivima kroz cijelo tijelo domaćina (Slika 10).

3.8. *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii je mala gram-negativna unutarstanična bakterija, poznata po tome što uzrokuje **Q groznicu** (engl. *Q fever*). *Coxiella* je acidofilna bakterija pa joj je za rast potreban pH 4,5-5. To je sporogena bakterija, čije spore mogu dugo preživjeti u okolišu. Rod *Coxiella* je morfološki sličan rodu *Rickettsia*, ali s različitim genetskim i fiziološkim osobinama. Bakterija može preživjeti standardne dezinficijense.

Ovaj zoonotski patogen prvi je put proučavan krajem 1930-ih nakon što je bolest zahvatila radnike klaonice u Brisbaneu u Australiji. S obzirom da se nije znao uzrok, bolest je nazvana Q groznica (Q engl. *question* – pitanje). Ovaj patogen obično proizvodi simptome slične simptomima gripe, no također može dovesti do upale pluća ili hepatitisa. Bolest napada najčešće goveda, ovce i koze, a ljudi se mogu zaraziti udisanjem prašine onečišćene tjelesnim tekućinama zaraženih životinja. Spore *Coxiella burnetii* mogu dugo preživjeti u okolišu i vjetar ih može prenositi na velike udaljenosti (25).

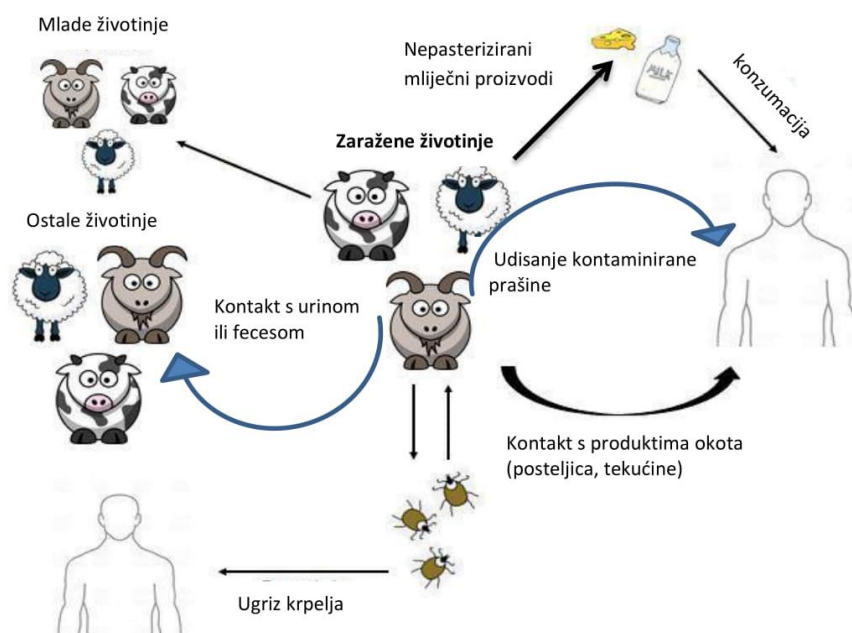
Ljudska infekcija obično slijedi nakon udisanja aerosola koji sadrže bakteriju *Coxiella burnetii*. Ulazak u pluća rezultira infekcijom alveolarnih makrofaga (Slika 11). Procjenjuje se da je za izazivanje infekcije potrebno samo između 1 i 10 bakterija. Bakterija može ući u tijelo i putem sluznica, preko ozlijeđene kože, a konzumiranjem mlijeka zaraženih životinja ulazi i u gastrointestinalni trakt. Infekcija se, iako rijetko, može prenjeti i ugrizom krpelja. *C. burnetii* postoji u dva antigena oblika koja se nazivaju faza I i faza II. Faza I je virulentni oblik koji se nalazi u ljudi s Q groznicom i kod zaraženih životinja, i to je zarazni oblik, dok je faza II avirulentni oblik (25).



Slika 11. Ciklus infekcije *Coxiella burnetii*

Preuzeto s: <https://microbewiki.kenyon.edu/images/a/af/Rick2.jpg>

Infekcija *C. burnetii* može biti akutna ili kronična sa simptomima sličnim simptomima gripe. Otprilike polovica ljudi koja je izložena bakterijama ne razvije bolest. Oni koji razviju teški slučaj obično dobiju upalu pluća ili hepatitis, a najčešće su to ljudi s oslabljenim imunitetom ili oni s kardiovaskularnim stanjima. Kronična infekcija može biti fatalna ako se ne liječi (26).



Slika 12. Načini (mogućnosti) prijenosa infekcije *Coxiella burnetii*

Preuzeto s: <https://mechpath.files.wordpress.com/2017/12/figure-2.jpg>

Sposobnost *C. burnetii* da zarazi domaćina u obliku aerosola vjerojatno je razlog što je toliko zarazna. S obzirom da je to bakterija koja za preživljavanje izvan domaćina koristi spore, čestice prašine lako ih pakupe i raznesu u grlo i pluća. Infekcija udisanjem *C. burnetii* cilja na alveolarne makrofage u plućima. Infekcija putem krvotoka ili probavnog trakta cilja Kupfferove stanice jetre. Nakon što bakterija uđe u domaćina, makrofag zahvaća bakteriju fagocitozom. Krajnji cilj, stvaranje fagolizoma od fagosoma i lizosoma u cilju uništavanja bakterije, u slučaju *C. burnetii* ne daje rezultat jer je njen rast povećan u kiselim uvjetima (26).

Ovisno o težini infekcije propisuju se različiti antibiotici. Pacijenti s akutnom Q groznicom mogu se oporaviti bez liječenja ili s antibiotikom kao što je doksiciklin. Pacijenti s kroničnom Q groznicom obično zahtijevaju višemjesečno liječenje kombinacijom antibiotika kao što su

doksiciklin i hidroksiklorokin koji su posebno učinkoviti jer hidroksiklorokin uzrokuje alkalizaciju fagolizosoma, omogućavajući doksiciklinu veću učinkovitost u uništavanju bakterija.

U Australiji je dostupno i cjepivo protiv Q groznice poznato pod nazivom Q-Vax. Međutim, dostupnost je ograničena i uzrokuje nuspojave kod onih koji su prethodno zaraženi *C. burnetii* (25).

Coxiella burnetii je zbog svojih karakteristika kao što su otpornost na toplinu i uobičajena sredstva za dezinfekciju, velika virulentnost (manje od 10 bakterija potrebno za infekciju), te lako prenošenje na ljude kontaminiranom prašinom, klasificirana po CDC-u kao potencijalni agens za bioterorizam, kategorije B (26).

3.9. *Burkholderia mallei*

Burkholderia mallei je aerobna, gram-negativna, nesporelirajuća, nepokretna štapičasta bakterija. U kulturama se nalazi u vidu dugih lanaca. Bakterije u vlažnoj sredini mogu opstati do 30 dana, a u sasušenom materijalu do 70 dana. Bakterija izaziva bolest pod nazivom **maleus** ili **sakagija**. To je kontagiozna bolest prvenstveno konja i magaraca, iako se i drugi sisavci mogu razboljeti. Bolest se manifestira stvaranjem specifičnih čvorića na koži i plućima. Bakterija se u dodiru sa tkivima ili tjelesnim tekućinama zaraženih životinja, kroz ogrebotine na koži i kroz sluznice, kao i udisanjem zaraženog aerosola može prenjeti i na ljude. Sakagija je vrlo rijetka bolest kod ljudi ali je najčešće sa smrtnim ishodom (27).

Zbog učinkovitosti aerosolnog širenja i smrtonosne prirode bolesti, postoji bojazan od potencijalne upotrebe ovog patogena kao biološkog agensa, te je ovaj patogen svrstan u B kategoriju bioloških agensa (CDC). Također, navodno su ovu bakteriju u 1. svjetskom ratu Nijemci koristili kako bi zarazili što veći broj konja i mazgi na ruskoj fronti.

Za rad sa ovom bakterijom potrebni su posebno opremljeni laboratoriji sa određenim nivoima biosigurnosti. Za liječenje ove bolesti načelno bi se mogli koristiti cefalosporini III. generacije, penicilin, kloramfenikol (27).

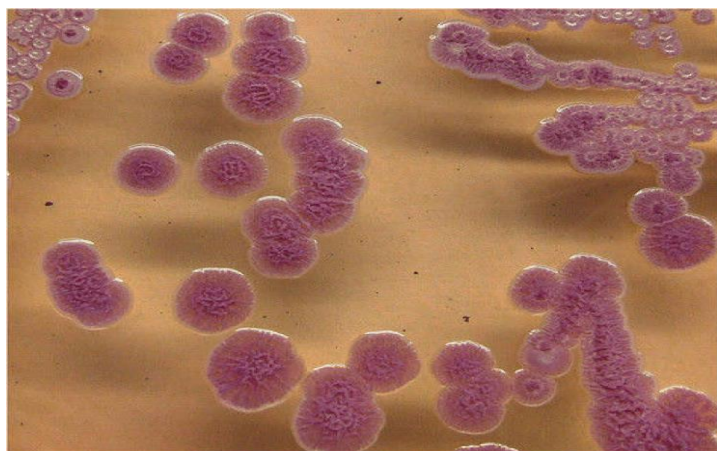
3.10. *Burkholderia pseudomallei*

Burkholderia pseudomallei također poznata i kao *Pseudomonas pseudomallei* je gram-negativna, aerobna, pokretna bakterija, saprofit, koja je prisutna u vlažnom tlu i rižinim poljima (Slika 13). Bakterija je endemična u tropskim i suptropskim regijama širom svijeta, posebno na Tajlandu i sjevernoj Australiji. Uzrokuje **Melioidozu** ili **Whitemoreovu bolest**. Na sjeveroistoku Tajlanda meliidoza čini 20% svih septikemija. Bolest se javlja kontaminacijom oštećene kože, a plućni oblik bolesti nastaje udisanjem prašine ili kapljica, a vrlo rijetko gutanjem vode. Izravni prijenos sa životinje na čovjeka ili s čovjeka na čovjeka vrlo je rijedak no može se dogoditi nakon kontakta krvi ili izlučevina zaraženih bakterijom.

Veliki potencijal izazivanja bolesti nakon udisanja, ovu je bakteriju svrstao na popis potencijalnih bioloških agensa B kategorije po klasifikaciji CDC-a (Tablica 2).

Početna infekcija događa se na sloju epitelnih stanica ranjene kože ili površine sluznice. Vezivanju na ove stanice posreduje tanki polisaharidni sloj oko bakterija tj. kapsula. Kapsula također može pomoći bakteriji da izbjegne imunološki sustav domaćina odupirući se fagocitozi. U fagocitnim stanicama bakterija je u stanju neutralizirati reaktivne vrste kisika i proteaze (enzime koji razgrađuju proteine) koji normalno uništavaju patogene. Uz to, patogen također može proizvesti hemolizine (koji uništavaju crvene krvne stanice), lipaze (enzime koji uništavaju lipide) i siderofore (komplekse koji imaju sposobnost izdvajanja željeza iz stanica domaćina). Ovi izlučeni čimbenici imaju citotoksične učinke na eukariotske stanice i uzrokuju daljnja oštećenja tkiva domaćina. Najčešća klinička slika je septikemijska bolest povezana sa širenjem bakterije na udaljena mjesta, te izazivanje metastaskih upala pluća i apscesa jetre i slezene (28).

Jedan od zabrinjavajućih čimbenika ponašanja ove bakterije je to što je bakterija u stanju postojati u tijelu i aktivirati se godinama kasnije. Najbolji primjer za to su američki veterani iz Vijetnamskog rata koji su godinama nakon povratka u SAD razvili bolest, u jednom slučaju čak 26 godina poslije.



Slika 13. Kolonije *Burhodelia pseudomallei* na Ashdown agaru; ružičaste naborane kolonije nakon 72 sata na temperturi od 37 °C

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Colonies-of-B-pseudomallei-isolate-VB976100-on-Ashdown-agar-showing-the-typical-pink_fig2_268876894

Zbog svog unutarstaničnog kapaciteta, ova je bakterija otporna na penicilin, ampicilin, prve i druge generacije cefalosporina, gentamicina, tobramicina i streptomycina. Faza intenzivnog liječenja uključuje intravensku primjenu ceftazidima tijekom 10-14 dana ili duže. Ovaj antibiotik ima baktericidno djelovanje koje inhibira enzime odgovorne za sintezu staničnih stijenki u gram-negativnim bakterijama.

Cjepivo je u fazi izrade, ali ekonomska ograničenja mogu učiniti cijepljenje nerealnom opcijom za mnoge regije u kojima je problem Melioidoza (29).

3.11. *Rickettsia prowazekii*

Rickettsia prowazekii je obvezni unutarstanični, gram-negativni kokobacil koji pripada rodu *Rickettsia*. Rikecije, ovisno o vrsti, mogu biti štapićastog, kokobacilnog ili končastog oblika. Rikecije se prenose vektorima člankonožaca putem njihove slinje ili fecesa, a u tijelo čovjeka dospijevaju preko ozlijeđene kože. Kada uđu u organizam razmnožavaju se u endotelnim stanicama krvnih žila. Prvu rikeciju otkrio je američki patolog Howard Taylor Ricketts 1910. godine prilikom istraživanja američkog pjegavog tifusa. Uspio ju je izolirati iz krpelja, no nije mogao definirati o kakvom je točno patogenu riječ. Nekoliko dana nakon izolacije mikroorganizma, Ricketts je obolio i umro od pjegavog tifusa. Nakon njega, bakteriju iz roda rikecija uspio je 1913. izolirati češki zoolog i parazitolog Stanislav Prowazek koji se također zarazio tifusom i umro. Njegov suradnik, brazilski liječnik Henrique da Rocha Lima, 1915. godine dao je prvi detaljan opis i naziv vrsti *Rickettsia prowazekii*, u čast svojim kolegama (30)(31).

Budući da su obvezni unutarstanični paraziti, rikecije se ne mogu kultivirati bez živih stanica. Optimalna temperatura za rast rikecija je 33-35 °C.

Na osnovi razlike u antigenima i biološkim svojstvima, vrste u rodu rikecija svrstane su u dva različita tipa: biotip pjegavih tifusa – PT (*R. prowazekii* i *R. typhi*) i biotip pjegavih groznica – PG (*R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. conorii*, *R. akari*, *R. australis*, *R. africae*, *R. japonica*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. felis*, i mnoge druge rikecije za koje nije dokazano da izazivaju bolest kod čovjeka) (32).

Rikecije su osjetljive na uobičajene dezinficijense poput natrijevog hipoklorita, 5% vodikovog peroksida, 8% formaldehida, 1% fenola, 70% etanola i UV zrake. Pri temperaturi od 56 °C rikecije ugibaju za 30 minuta. Ipak, u sasušenom fecesu zaraženih uši vrsta *R. prowazekii* može ostati infektivna i više mjeseci, ako su vlažnost i temperatura okoliša niski.

Nakon uboda zaraženog člankonošca rikecije difundiraju u endotelne stanice kapilara i u njima se razmnožavaju. Inficirane endotelne stanice nabreknu i nekrotiziraju, nastaje tromboza, pa to dovodi do začepjenja, nekroze i razdora kapilara. Iz raspuklih endotelnih stanica oslobađaju se rikecije te se krvlju prenose po cijelom organizmu. Oštećenje malih krvnih žila najizraženije je u koži,

miokardu i mozgu, ali i u drugim organima te je odgovorno za većinu kliničkih znakova, uključujući osip. Epidemični tifus, pjegava groznica Stjenovitog gorja i šikarski tifus spadaju među najteže poznate zarazne bolesti s visokom smrtnosti (31).

Rickettsia prowazekii uzrokuje **epidemični pjegavi tifus** (*typhus exanthematicus*). To je bolest prisutna u siromašnim područjima gdje nehigijenski uvjeti omogućavaju održavanje ciklusa prijenosa između čovjeka i prtene uši (*Pediculus humanus var. corporis*). Uš se zarazi hranjenjem na bolesniku, a nakon što joj se rikecije umnože u stanicama crijeva, izlučuje *R. prowazekii* fecesom. Čovjek se zarazi utrljavanjem rikecija u kožu ozlijeđenu ubodom ili aerosolom preko sluznice oka i respiratornog sustava. Bolest počinje naglo nakon inkubacije od 9 do 12 dana s povišenom temperaturom, glavoboljom, bolovima u mišićima. Oko petog dana bolesti javlja se osip na trupu koji se širi centrifugalno i obično ne zahvaća lice, dlanove i stopala. Mogu se javiti i neurološke promjene, delirij, ali i miokarditis, hipotenzija i gangrene na ekstremitetima. Nakon 2-3 tjedna od pojave simptoma, bolesnik može ili ozdraviti ili umrijeti. Smrtnost je niska u dječjoj dobi, ali može biti i do 50 % u osoba starijih od 50 godina. Imunitet je dugotrajan, a rikecije ostaju u retikuloendotelnim stanicama, a da pri tome čovjek nema nikakvih simptoma bolesti (32).

Brill-Zinsserova bolest je recidiv epidemičnog tifusa koji se javlja godinama nakon primarne infekcije (najvjerojatnije uzrokovan slabljenjem imuniteta za rikecije koje su ostale skrivene u retikuloendotelnom sustavu). Bolest ima blaže simptome i rijetko je smrtonosna. Suzbijanje epidemičnog tifusa može se postići prekidom lanca prijenosa i infekcije, uništavanjem vektora ili imunizacijom (30).

Cjepivo pripremljeno iz inficiranih žumanjčanih vrećica sadrži ubijene uzročnike i služi kao djelomična zaštita od bolesti. Tetraciklini i kloramfenikol su djelotvorni u liječenju i primarnog epidemičnog tifusa i BrillZinsserove bolesti. Sulfonamidi pojačavaju rast rikecija, pa su kontraindicirani u liječenju rikecije. Ukupno trajanje liječenja obično je između sedam i deset dana. Kritično bolesni pacijenti mogu imati izraženu kapilarnu propusnost i lako mogu podleći plućnom i cerebralnom edemu (31).

Iako je epidemija tifusa bila odgovorna za milijune smrtnih slučajeva u prijašnjim stoljećima, danas se smatra rijetkom bolešću. U SAD-u mogu se dogoditi rijetki slučajevi epidemijskog tifusa, nazvanog silvatični tifus. Ti se slučajevi događaju kada su ljudi izloženi letećim vjevericama i njihovim gnijezdima.

R. prowazekii klasificirana je kao sredstvo za biološki terorizam (kategorija B) zbog svoje male veličine, male zarazne doze i visokog morbiditeta.

3.12. *Vibrio cholerae*

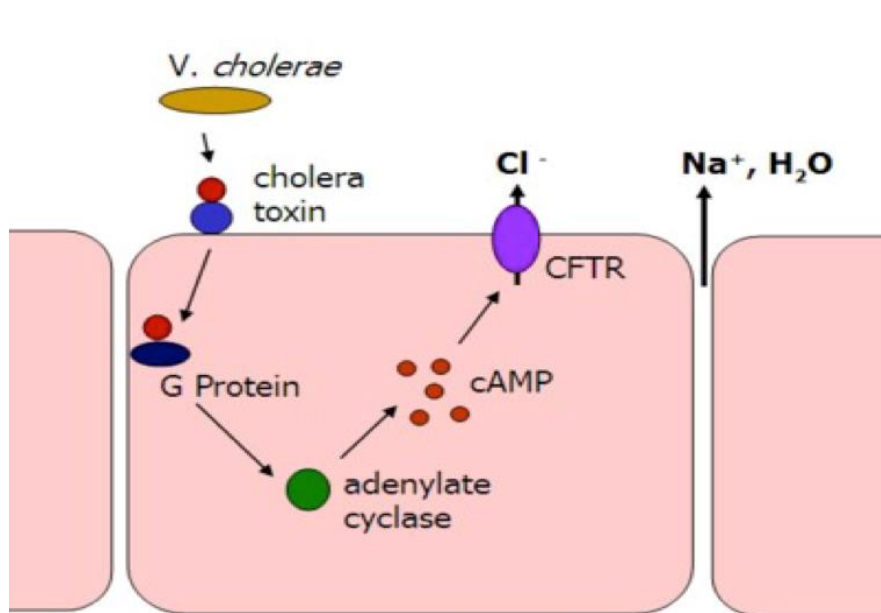
Vibrio cholerae član je obitelji *Vibrionaceae* i postoji kao fakultativno anaerobna, gram-negativna bakterija, u obliku zareza. Prirodno joj je stanište slana ili boćata voda gdje se lako veže za ljuske rakova, škampa i drugih školjaka koji sadrže hitin. Hitin je linearni polisaharid. Struktura hitina slična je celulozi, od koje se razlikuje jedino po tome što je hidroksilna skupina (-OH) na drugom ugljikovu atomu glukoze zamijenjena acetiliranom amino skupinom (-NH-CO-CH₃). Hitin je glavni sastojak čvrstog vanjskog oklopa, kukaca, rakova i pauka. Također se može naći i u staničnim stijenkama nekih gljiva i algi. Nakon celuloze, hitin je drugi najčešći biopolimer u prirodi. Netopljiv je u vodi, organskim otapalima, slabim kiselinama i lužinama.

Vibrio cholerae izaziva **koleru**, zaraznu bolest tankoga crijeva.

Vibrio cholerae proizvodi toksin koji uzrokuje da tanko crijevo luči ogromne količine tekućine bogate solima i mineralima. Budući da su bakterije osjetljive na želučanu kiselinu, kiselost je sjajan zaštitni mehanizam i gotovo u potpunosti uništava *V. cholerae*. Međutim, mala količina bakterija ipak dolazi do tankog crijeva. Jednom kada se bakterija utvrdi u crijevu, da bi došla do epitelnog sloja mora prodrijeti kroz sluznicu a za prolazak kroz ovaj debeli sloj služi joj dugačak „rep“. Bakterija također proizvodi enzime koji narušavaju integritet sluznice. Nadalje, način na koji bakterija inducira prekomjerno istjecanje tekućine iz stanica opisan je u sljedećem mehanizmu virulencije (33).

Bakterija izlučuje proteinski polimer poznat kao toksin kolere koji se veže na epitelne stanice tj. dio polimera se veže na glikolipide na vanjskoj strani stanice a dio prodire u stanicu narušavajući normalne biokemijske procese, što rezultira višom razinom cAMP (ciklin adenozin monofosfat), a što pak rezultira izlučivanjem klorida, bikarbonata i vode (Slika 14).

Veliki višak tekućine tijelo mora izbaciti, najčešće proljevom. U 1 ml proljeva nalazi se čak 108 živih bakterija, što im omogućuje da se učinkovito šire, ukoliko nisu zadovoljeni visoki higijenski standardi.



Slika 14. Prikaz događaja nakon vezivanja toksina kolere na epitelne stanice crijeva

Preuzeto s: http://www.sharinginhealth.ca/pathogens/bacteria/vibrio_cholerae.html

Ako se zaraza ne liječi, posljedična teška neravnoteža između volumena krvi i koncentracije soli može dovesti do zatajenja bubrega (tubularne nekroze), šoka i kome. Najbitnije je brzo nadomjestiti izgubljene tjelesne tekućine te soli i minerale. Rano liječenje tetraciklinom i drugim antibiotikom ubija bakterije i obično zaustavlja proljev za 48 sati (34).

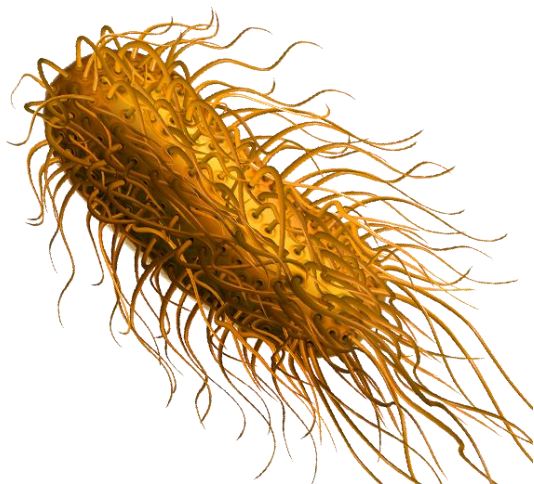
Više od 50 % neliječenih ljudi s teškom kolerom umire. Od onih koji brzo prime odgovarajuću količinu izgubljene tekućine i terapiju, umre manje od 1 %.

Kolera se širi pijenjem kontaminirane vode, konzumiranjem morskih rakova, školjki i riba te druge hrane zagađene izlučevinama zaraženih ljudi. Pojavljuje se u dijelovima Azije, Afrike i Latinske

Amerike. U tim područjima epidemije su česte u toplim mjesecima, a incidencija je najviša među djecom. U drugim područjima epidemije se mogu javiti u bilo koje godišnje doba te su ljudi svih dobi podjednako osjetljivi. Za sprječavanje kolere bitno je pročišćavanje vodoopskrbnih objekata i ispravno uklanjanje otpadnih voda. Ostale mjere opreza uključuju uporabu prokuhane vode i izbjegavanje nekuhanog povrća ili nedovoljno kuhane ribe ili školjki. Cjepivo protiv kolere osigurava samo djelomičnu zaštitu i zato se općenito ne preporučuje (34). Tijekom posljednjih godina bilo je mnogo epidemija kolere, a najčešći slučajevi javljaju se u tropskim i suptropskim regijama. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procijenila je da se 3-5 milijuna slučajeva kolere javlja uglavnom u Aziji i Africi. Većina slučajeva kolere javlja se u djece mlađe od 5 godina i trudnica. Epidemije u endemskim područjima obično se javljaju tijekom vruće sezone (33).

Epidemija kolere na Haitiju 2011. godine najgora je epidemija u novijoj povijesti. Usmrtila je skoro 10 000 ljudi i hospitalizirala stotine tisuća a proširila se i na susjedne zemlje. Epidemija je izbila 10-tak mjeseci nakon katastrofalnog potresa koji je pogodio Haiti (33).

3.13. *Salmonella*



Slika 15. Ilustracija vektora bakterije *Salmonella*

Preuzeto s: https://st4.depositphotos.com/1001335/25058/v/1600/depositphotos_250581454-stock-illustration-pink-bacteria-salmonella-vector-illustration.jpg

Salmonele su gram-negativne, asporogene, pokretne, štapičaste bakterije, fakultativni anaerobi (Slika 15). Energiju dobivaju reakcijama oksidacije i redukcije organskih spojeva. Većina proizvodi sumporovodik zbog čega se lako otkrivaju na podlogama koje sadrže željezo (II) sulfat.

Postoje dvije glavne vrste salmonele: *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*.

Salmonella enterica vrsta je vrste i dalje je podijeljena u šest podvrsta koje uključuju preko 2600 serotipova od kojih su najpoznatiji serotipovi *Enteritidis*, *Typhi*, *Paratyphi*, *Typhimurium*.

Salmonella je dobila ime po Danielu Elmeru Salmonu (1850.–1914.), američkom veterinaru.

Salmonele se mogu pronaći u mnogim životinjama i ljudima. Pojedine salmonele najčešće kod ljudi izazivaju bolesti koje se nazivaju **salmoneloze**, dok su teži oblici bolesti kao što su trbušni tifus i paratifusni sindrom rjeđi (35).

Najčešći put zaraze salmonelama jest konzumacija kontaminirane hrane. Namirnice koje nose najviše rizika su sirovo meso (poglavito perad), jaja i mliječni proizvodi, no zabilježene su i epidemije salmoneloza podrijetlom iz voća, povrća i pekarskih proizvoda.

Većina ljudi s infekcijom bakterijom *Salmonella*, salmonezolom, ima proljev, vrućicu i grčeve u želucu.

Simptomi obično započinju šest sati do šest dana nakon infekcije i traju četiri do sedam dana. Međutim, neki ljudi ne razvijaju simptome nekoliko tjedana nakon infekcije, a drugi imaju simptome nekoliko tjedana. Većina se ljudi oporavi za 4 do 7 dana bez antibiotika. Da bi se spriječila rastuća rezistencija na antibiotike, isti bi se trebali koristiti samo za teške infekcije i za medicinski ugrožene skupine. CDC procjenjuje da *Salmonella* svake godine u Sjedinjenim Državama uzrokuje oko 1,35 milijuna bolesti, 26.500 hospitalizacija i 420 smrtnih slučajeva (35). Netifoidni serotipovi mogu se prenijeti sa životinje na čovjeka, ali i s čovjeka na čovjeka. Obično napadaju samo gastrointestinalni trakt i uzrokuju salmonelozu čiji se simptomi mogu riješiti bez antibiotika (35).

Međutim, u subsaharskoj Africi netifusna salmonela može biti invazivna i uzrokovati paratifusnu groznicu, što zahtijeva hitno liječenje antibioticima.

Tifusni serotipovi mogu se prenijeti samo s čovjeka na čovjeka i mogu izazvati **trbušni tifus** i **paratifusnu groznicu**. To su teški oblici bolesti koji mogu dovesti do septičkog šoka i zahtijevaju tretiranje antibioticima.

Bakterije se ne uništavaju smrzavanjem, ali UV svjetlost i toplina ubrzavaju njihovo uništavanje. Oni propadaju nakon zagrijavanja na 55 °C tijekom 90 minuta ili na 60 °C tijekom 12 minuta. Ako su bakterije inokulirane u visoko masne tvari poput maslaca od kikirikija, mogu preživjeti do 90 °C tijekom 30 minuta. Da bi se zaštitila od infekcije salmonelom, preporučuje se zagrijavanje hrane na temperaturu od 75 °C.

Velika većina salmonela parazitira u životinjskim crijevima, a najčešći nositelji ove bakterije su domaća perad, svinje, goveda i miševi. Zanimljivo je da je 5 posto svih salmoneloza u čovjeka povezano s izloženošću egzotičnim kućnim ljubimcima, i to u prvom redu reptilima (36).

Ove bakterije široko su rasprostranjenije u životinjama i hrani koja se redovito konzumira u velikim količinama, pa to predstavlja pogodan potencijal za korištenje kao biološki agens (36).

3.14. *Escherichia coli*

Escherichia coli su aerobne, fakultativno anaerobne, nesporogene, gram-negativne, štapičaste bakterije. Otkrio ih je pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich, a jedne su od glavnih vrsta bakterija koje žive u donjem dijelu probavnog trakta sisavaca. Nužne su za pravilnu probavu hrane te sudjeluju u radu crijevne flore. To je je dominantna bakterijska vrsta u crijevima i fecesu. U organizmu čovjeka sprječava razmnožavanje patogenih bakterija u crijevu i sintetizira pojedine vitamine (npr. vitamin K2) bitne za organizam čovjeka.

Samo manji broj sojeva *Echerichia coli* može uzrokovati bolesti u čovjeka zbog posjedovanja nekih mehanizama virulencije. Jedan od njih, *Escherichia coli* O157:H7 tvori velike količine toksina koji uzrokuje ozbiljna oštećenja sluznice crijeva (Slika 16). Taj toksin se naziva verotoksin i vrlo je sličan toksinu bakterije *Shigella dysenteriae*, zbog čega se još naziva i Shiga-like toksin.

Bolest izazvan serovarom *E. coli* O157:H7 naziva se **hemoragijski kolitis**. Bolest se očituje snažnim bolovima u trbuhu i proljevom koji je isprva vodenast, a kasnije sadrži velike količine krvi. Bolest obično traje oko osam dana. Hemoragijski kolitis nije česta bolest, ali u nekim dijelovima SAD-a intoksikacija s *E. coli* O157:H7 je druga alimentarna infekcija po učestalosti, odmah iza salmonela. U Hrvatskoj do sada nije pronađena. Oboljeli ljudi, poglavito djeca i stariji ljudi, mogu razviti hemolitičko – uremični sindrom kojeg karakteriziraju hemolitička anemija i zatajenje bubrega, te u ovim ugroženim skupinama smrtnost može biti i 50%. Ova je bolest često povezana s nepasteriziranim voćnim sokovima, dimljenim sušenim salamama, zelenom salatam, mesom divljači i sirovim mlijekom i mliječnim proizvodima. Za razliku od ostalih *E. coli*, serovar O157:H7 ne fermentira sorbitol, pa se to svojstvo koristi za selektivno izdvajanje uzročnika pomoću sorbitol MacConkeyeva agara. Na SMAC agaru kolonije O157: H7 izgledaju bistre zbog nemogućnosti fermentacije sorbitola, dok kolonije uobičajenih serotipova *E. coli* koji fermentiraju sorbitol izgledaju crveno (37).

Infekcija *E. coli* O157: H7 može nastati gutanjem kontaminirane hrane ili vode ili oralnim kontaktom s kontaminiranim površinama. Primjeri toga mogu biti nedovoljno kuhana mljevena govedina, ali i lisnato povrće i sirovo mlijeko. Polja se često kontaminiraju bakterijom kroz

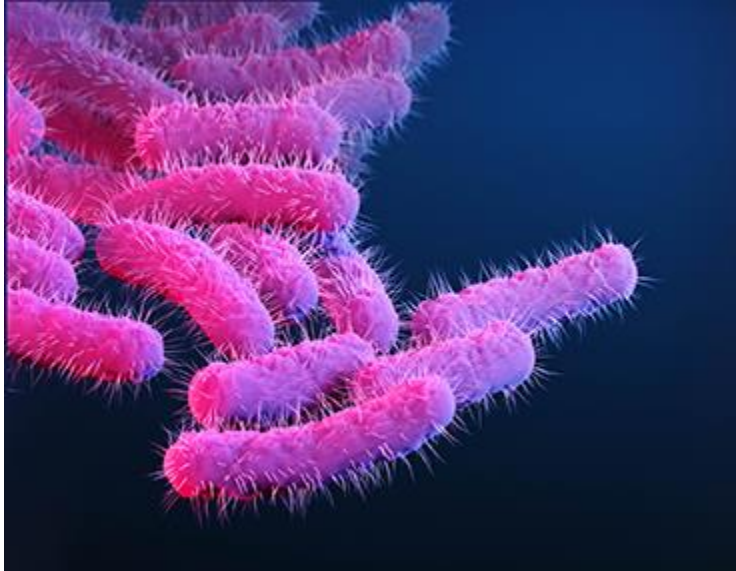
postupke navodnjavanja ili onečišćene vode koja prirodno ulazi u tlo. *E. coli* O157: H7 ima sposobnost preživljavanja na niskim temperaturama i u kiselim uvjetima. S aspekta potencijalnog biološkog agensa važna je njena osobina vrlo velike virulentnosti s malom zaraznom dozom. Primjerice, od 10 do 100 CFU *E. coli* O157: H7 dovoljno je da izazove infekciju, u usporedbi s preko jednog milijuna CFU za druge patogene sojeve *E. coli*. CFU broj kolonija odgovara broju bakterijskih stanica u uzorku samo ako se svaka kolonija razvila od jedne bakterijske stanice; zbog toga se broj kolonija označava kao broj jedinica koje tvore kolonije ili CFU (engl. *colony forming units*) (37).



Slika 16. *E. coli* O157:H7

Preuzeto s: <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8551>

3.15. *Shigella*



Slika 17. *Shigella*

Preuzeto s: <https://www.cdc.gov/shigella/general-information.html>

Rod *Shigella* (Slika 17) su gram negativne, nepokretne, fakultativno anaerobne, štapićaste, asporogene bakterije. Razlikuju se od usko srodnih *Escherichia coli* na temelju patogenosti, fiziologije (neuspjeh fermentacije laktoze ili dekarboksilata lizina) i serologije.

Rod je podijeljen u četiri serogrupe s više serotipova: A (*S. dysenteriae*, 12 serotipova); B (*S. flexneri*, 6 serotipova); C (*S. boydii*, 18 serotipova); i D (*S. sonnei*, 1 serotip) (38).

Infekcija započinje gutanjem šigela (obično fekalno-oralnom kontaminacijom). Rani simptom, proljev (koji mogu izazvati enterotoksini i / ili citotoksin), može se javiti dok bakterije prolaze kroz tanko crijevo. Obilježja bolesti su bakterijska invazija epitela debelog crijeva i upalni kolitis. To su međusobno ovisni procesi pojačani lokalnim oslobađanjem citokina i infiltracijom upalnih elemenata.

Bacilarna dizenterija se kod većine bolesnika može ispravno dijagnosticirati na temelju svježe krvi u stolici. Neutrofili u fekalnim razmazima također su izrazito sugestivan znak. Teška dizenterija liječi se ampicilinom.

Patogeni mehanizam bolesti je složen, uključuje mogući enterotoksični i / ili citotoksični dijarejni prodrom, upalu debelog crijeva posredovanu citokinima i nekrozu epitela debelog crijeva. Rezultirajući kolitis i ulceracija sluznice rezultiraju krvavom, mukoidnom stolicom i / ili febrilnim proljevom. Moguće komplikacije šigeloze uključuju bakterijemiju, konvulzije i druge neurološke komplikacije, reaktivni artritis i hemolitičko-uremički sindrom (39).

Potreban je samo mali broj bakterija da bi se netko razbolio. Osobe inficirane bakterijom *Shigella* mogu prenijeti infekciju na druge nekoliko tjedana nakon što njihov proljev završi. Ove dvije značajke svrstavaju bakteriju *Shigella* u kategoriju B bioloških agensa.

4. DIJAGNOSTIČKE METODE ZA DETEKCIJU BAKTERIJA

Klinički prikaz zarazne bolesti odražava interakciju između domaćina i mikroorganizma. Na ovu interakciju utječu imunološki status domaćina i čimbenici mikrobiološke virulencije. Znakovi i simptomi variraju ovisno o mjestu i težini infekcije. Dijagnostički proces počinje kompletnom kliničkom evaluacijom pacijenta, fizikalnim pregledom i analizom povijesti bolesti, što je praćeno laboratorijskim pretragama i analizama.

Uzorci se odabiru na temelju znakova i simptoma, trebali bi biti reprezentativni za proces bolesti i trebali bi se prikupiti prije primjene antimikrobnih sredstava. Količina uzorka i brzina transporta do laboratorija znatno utječu na rezultate ispitivanja. Brzina i točnost dijagnostičke metode jako su bitni, osobito kod sumnje na korištenje bioloških agensa, jer naravno cilj je dokazati prisutnost bakterije u organizmu što prije da bi se bolest mogla uspješno liječiti te da bi se moglo sprječiti njeno širenje (40).

Metode i tehnike za detekciju prisutnost bakterija i dijagnostiku infekcije su različite.

Bakteriološke pretrage dijele se prvenstveno na izravne i neizravne. Kod metoda izravne bakteriološke dijagnostike u uzorku se dokazuje prisutnost uzročnika ili pak njegovih antigena. Kod neizravnih metoda traži se specifični imunosni odgovor organizma na prisutnost patogena - dokaz protutijela na bakterijske antigene (41).

4.1. Izravne metode

4.1.1. Mikroskopiranje

Iako ova metoda sama nije dovoljno specifična i osjetljiva za dijagnostiku bakterija i bakterijskih infekcija, koristi se za prvu fazu njihove identifikacije provjerom stanične morfologije.

Najčešće korištena vrsta mikroskopa za ove svrhe, koji se koristi i na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije je svjetlosni mikroskop.

Osim korištenja jednostavnog svjetlosnog mikroskopa, sve se više koriste transmisijski i skenirajući elektronski mikroskop. Oni za dobivanje slike koriste snopove elektrona. Snop elektrona ima puno kraću valnu duljinu od svjetlosti te zbog toga elektronski mikroskopi imaju 400 puta veću moć razlučivanja od svjetlosnog mikroskopa. To im omogućuje otkrivanje i razlikovanje puno više detalja (42).

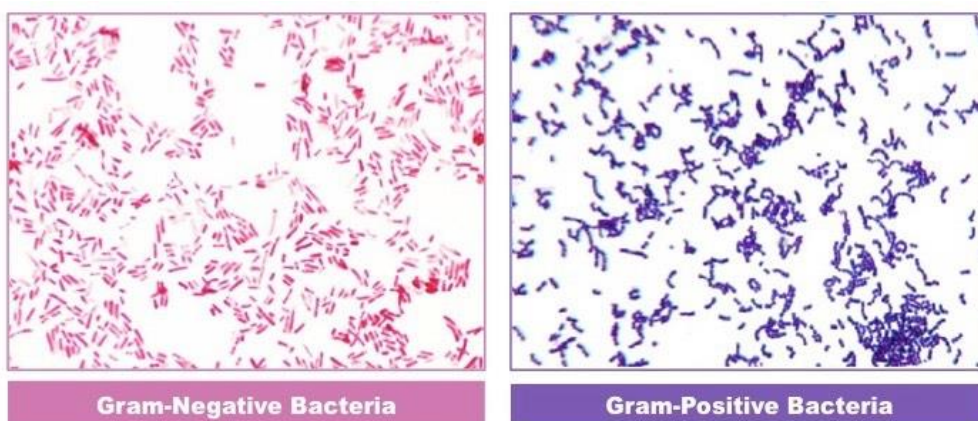
Nakon izuzimanja odgovarajućeg uzorka, izrađuju se preparati za mikroskopiranje. Postoje dvije vrste preparata koje se mogu pripremiti direktno iz uzorka bez prethodne kultivacije, nativni preparat i fiksirani preparat.

Nativni preparat se priprema jednostavnim dodavanjem izuzetog uzorka na stakalce te potom kapljice tekućine (najčešće vode ili fiziološke otopine), nakon čega se pokriva pokrovnim stakalcem. Kod tekućih uzoraka nije potrebno koristiti dodatnu tekućinu. Ovi preparati se rijetko koriste u bakteriološkoj dijagnostici i mikroskopiji, jer ne omogućavaju dobro razlikovanje sitnih struktura bakterijske stanice.

"Fiksiranje" uzorka odnosi se na postupak pričvršćivanja stanica na stakalce. Fiksiranje se često postiže zagrijavanjem ili kemijskom obradom uzorka. Uz pričvršćivanje uzorka na stakalce, fiksacija također ubija mikroorganizme u uzorku, zaustavljajući njihovo kretanje i metabolizam, istovremeno zadržavajući cjelovitost njihovih staničnih komponenata za promatranje. Da bi se uzorak fiksirao toplotom, tanki sloj uzorka raširi se na predmetno staklo (razmazom), a zatim se stakalce kratko zagrije na izvoru topline. Kemijski fiksatori često su bolji izbor fiksacije od grijanja za uzorke tkiva. Kemijska sredstva poput octene kiseline, etanola, metanola, formaldehida i glutaraldehida mogu denaturirati proteine, zaustaviti biokemijske reakcije i stabilizirati stanične strukture u uzorcima tkiva (43).

Uz fiksaciju, bojenje se gotovo uvijek primjenjuje za bojenje određenih značajki uzorka prije nego što se ispita pod svjetlosnim mikroskopom.

Jednostavno bojenje koristi jednu boju, bilo za izravno bojenje stanica ili pozadine koja okružuje stanice. Iz toga istraživač može prikupiti osnovne informacije o veličini stanice, morfologiji (obliku) i rasporedu stanica. Postoje i složenija bojenja, poznata kao diferencijalna bojenja, koje kombiniraju boje kako bi omogućile diferencijaciju organizama na temelju njihovih karakteristika. Najpoznatije i najkorištenije složeno bojenje je bojenje po Gramu (Slika 18). Prvi ga je opisao i upotrijebio danski liječnik Hans Christian Gram 1884. godine. To je metoda koja se temelji na podjeli bakterija u dvije skupine - gram-negativne i gram-pozitivne. Bojenje po Gramu razlikuje bakterije po kemijskim i fizičkim svojstvima njihovih staničnih stijenki. Gram-pozitivne bakterije imaju debeli sloj peptidoglikana u staničnoj stijenci koji zadržava primarnu boju, kristalviolet. Gram-negativne stanice imaju tanji sloj peptidoglikana koji omogućava ispiranje kristalvioleta dodatkom etanola. Oni su obojeni ružičastom ili crvenom bojom, obično safraninom ili fuksinom. Lugolova otopina joda uvijek se dodaje nakon dodavanja kristalvioleta da ojača veze boje sa staničnom membranom. Bojenje po Gramu gotovo je uvijek prvi korak u preliminarnoj identifikaciji bakterijskog organizma (44).



Slika 18. Bojenje po Gramu

Preuzeto s: <https://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b1-microbiology-organisms/gram-staining.html>

Od ostalih bojenja izdvojila bih bojenje po Zeihl-Neelsenu, koje se koristi kod bakterija koje imaju voštanu ovojnica te su otporne na alkohol i kiseline. Acidorezistentne bakterije oboje se u crvenu, a ostatak preparata u plavu boju. Ova metoda se koristi za bojenje bakterija koje se ne mogu obojiti po Gramu, posebno za *Mycobacterium tuberculosis*.

Bakterije koje posjeduju kapsulu, kao naprimjer *Clostridium perfringens* i *Bacillus anthracis*, zahtijevaju posebna bojenja. Budući da je prisutnost kapsule izravno povezana s virulencijom bakterije, sposobnost utvrđivanja imaju li stanice u uzorku kapsule važan je dijagnostički alat. Kapsule ne apsorbiraju većinu osnovnih boja; stoga se tehnika negativnog bojenja (bojanje oko stanica) obično koristi za bojenje kapsula. Boja boji pozadinu, ali ne prodire u kapsule koje se poput areole pojavljuju oko rubova stanice. Uzorak ne treba toplinski fiksirati prije negativnog bojenja.

Endospore su strukture proizvedene unutar određenih bakterijskih stanica koje im omogućuju preživljavanje u teškim uvjetima. Samo bojanje po Gramu ne može se koristiti za vizualizaciju endospora, koje se čine prozirnim kada se gledaju stanice obojene Gramovim bojenjem. Endosporno bojanje koristi dvije boje za razlikovanje endospora od ostatka stanice. Schaeffer-Fultonova metoda (najčešće korištena tehnika bojenja endospora) koristi toplinu za potiskivanje primarne boje (malahitno zeleno) u endosporu. Pranje vodom obezbojava stanicu, ali endospore zadržava zelenu mrlju. Stanica se zatim oboji ružičasto safraninom. Rezultirajuća slika otkriva oblik i mjesto endospora, ako su prisutne. Zelene endospore pojavit će se ili unutar ružičastih vegetativnih stanica ili odvojeno od ružičastih stanica. Ako nema endospora, tada će biti vidljive samo ružičaste vegetativne stanice. Tehnike bojanja endosporama važne su za identificiranje bakterija *Bacillus* i *Clostridium*, dva roda bakterija koje proizvode endospore i sadrže klinički značajne vrste. Između ostalih, *Bacillus anthracis* (koja uzrokuje antraks) je od posebnog interesa zbog zabrinutosti da bi se njene spore mogle koristiti kao sredstvo za bioterorizam, što je već i bio slučaj (45).

Priprema kvalitetnog, dobro fiksanog i obojenog preparata uvelike olakšava sam proces mikroskopiranja.

Poznavanje morfologije svih bakterija veoma je bitno za uspješnu identifikaciju određene bakterije mikroskopiranjem. Morfologija se odnosi na oblik, veličinu i raspored bakterijskih stanica. Također je bitno temeljito pretražiti cijeli preparat, jer gustoća uzorka i stanica varira.

4.1.2. Kultivacija

Kultivacija je metoda umnožavanja mikroorganizama dopuštajući im da se razmnožavaju u unaprijed određenom mediju u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Bakteriološke kulture koriste se za određivanje vrste bakterije, njene brojnosti u uzorku koji se ispituje ili oboje. Jedna je od primarnih dijagnostičkih metoda mikrobiologije i koristi se kao alat za utvrđivanje uzroka zarazne bolesti.

Kada se mikroorganizmi uzgajaju u laboratoriju, koristi se okruženje za rast koje se naziva medij. Medij može biti čisto kemijski (kemijski definiran medij) ili može sadržavati organske materijale ili se može sastojati od živih organizama poput oplođenih jajašaca. Mikroorganizmi koji rastu u ili na takvom mediju tvore kulturu. Kultura se smatra čistom kulturom ako je prisutna samo jedna vrsta organizma, a mješovitom ako su prisutne populacije različitih organizama. Bakterije se uglavnom kultiviraju u obliku čistih kultura da bi se što bolje mogla proučiti funkcija određene vrste. Kad se prvi put koristi, medij za kulturu trebao bi biti sterilan, što znači da prije inokulacije mikroorganizmom nije prisutan oblik života (46). Mediji za umjetnu kultivaciju moraju pružiti slično okruženje i prehrambene uvjete koji postoje u prirodnom staništu bakterija. Kultura sadrži vodu, izvor ugljika i energije, izvor dušika, mikroelemenata i nekih čimbenika rasta. Jedna bakterija, opskrbljena pravim hranjivim sastojcima, razmnožit će se na krutom mediju na ograničenom području da bi stvorila koloniju, koja je masa stanica koje potječu od izvorne stanice. Mediji za bakteriološku kultivaciju mogu se klasificirati na tri načina: prema konzistenciji, nutritivnoj komponenti i funkcionalnoj upotrebi i primjeni.

S obzirom na konzistenciju, razlikujemo tri vrste medija – tekući, čvrsti i polučvrsti.

Tekući mediji: dostupni su za upotrebu u epruvetama, bocama ili tikvicama. Tekući mediji ponekad se nazivaju „bujoni”. U tekućem mediju bakterije ravnomjerno rastu proizvodeći opću zamućenost, što se koristi za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije. Ne dodaje se agar. Uglavnom se koristi za pripremu inokuluma.

Čvrsti mediji: Agar ploča je Petrijeva zdjelica koja sadrži medij za rast (obično agar i hranjive tvari) koji se koristi za uzgoj mikroorganizama. Agar je najčešće korišteno sredstvo za skrutnjavanje. To je nerazgranati polisaharid dobiven iz staničnih membrana neke vrste crvenih

algi poput rodova *Gelidium*. Agar je sastavljen od dva duga lanca polisaharida (70% agaroze i 30% agarapektina). Topi se na 95 °C i skrućuje na 42 °C, ne pridonosi nikakvim hranjivim svojstvima, ne hidrolizira ga većina bakterija i obično ne sadrži tvari koje usporavaju ili pospješuju rast. Najčešće se koristi u koncentraciji od 2% i 4% da bi stvorio čvrsti medij. Iz kulture koje je dobivena kultivacijom na čvrstom mediju može se proučavati morfologija kolonije, pigmentacija i hemoliza.

Polučvrsti mediji: Smanjivanjem količine agara na 0,2-0,5% podloga postaje srednje polučvrsta. Takvi mediji su prilično mekani i korisni su u demonstriranju pokretljivosti bakterija. Primjer je Hugh & Leifsonov medij za oksidacijsku fermentaciju (47).

Prema nutritivnoj komponenti, bakteriološki mediji mogu se klasificirati kao jednostavni, složeni i sintetički.

Za one bakterije koje su sposobne rasti s minimalnim zahtjevima i u svim uvjetima govori se da su neizbirljive, a za one kojima su potrebne dodatne hranjive tvari nazivaju se izbirljiva. Jednostavni mediji mogu podržati rast većine neizbirljivih bakterija.

Mediji koji nisu bazalni nazivaju se složeni mediji. U sebi imaju posebne sastojke za rast bakterija. Točne komponente i koncentracije sastojaka ovih medija teško je procijeniti. Najpoznatija vrsta složenog medija je krvni agar.

Sintetički mediji su posebno, u istraživačke svrhe, pripremljeni mediji gdje je sastav svake komponente dobro poznati. Pripremaju se od čistih kemijskih tvari.

Najznačajnija podjela medija za bakteriološku kultivaciju je ona s obzirom na funkcionalnu upotrebu i primjenu (47).

Bazalni su mediji u osnovi jednostavni mediji koji podržavaju rast većinu neizbirljivih bakterija. Peptonska voda, hranjiva bujon i hranjivi agar smatraju se bazalnim medijima.

Obogaćeni mediji koriste se za uzgoj izbirljivih bakterija koje zahtijevaju hranjive sastojke za rast i razmnožavanje. Dodatak hranjivih sastojaka u obliku krvi, seruma, žumanjka itd. bazalnom mediju čini ga obogaćenim medijem. Krvni agar i čokoladni agar najpoznatiji su obogaćeni mediji. Krvni agar priprema se dodavanjem 5-10% (volumena krvi) bazalnom mediju kao što je hranjivi agar. Budući da se krv ne može sterilizirati, mora se aseptično prikupljati od životinje.

Životinjama se mora pustiti krv, koja se sakuplja u sterilne posude s antikoagulansima. Iako se daje prednost ovčjoj krvi, može se sakupljati i krv zeca, konja i vola. Mora se izbjegavati ljudska krv jer može sadržavati inhibitorne tvari, uključujući antibiotike. Nakon autoklaviranja baze krvnog agara, krv se dodaje mediju na temperaturi neposredno iznad točke stvrdnjavanja agara. Smjesa se zatim izlije na Petrijeve zdjelice i ostavi da se skrutne. Krvni agar koristan je u demonstriranju hemolitičkih svojstava određenih bakterija (47).

Čokoladni agar poznat je i kao zagrijani krvni agar ili lizirani krvni agar. Postupak je sličan postupku pripravljanja krvnog agara, osim što se krv dodaje dok je rastopljena baza krvnog agara još vruća. To lizira krvne stanice i njihov sadržaj oslobađa u medij.

Selektivni mediji namijenjeni su inhibiciji neželjenih zagađujućih bakterija i pomažu u obnavljanju patogena iz mješavine bakterija. Razni pristupi za stvaranje selektivnog medija uključuju dodavanje antibiotika, boja, kemikalija, promjenu pH ili njihovu kombinaciju. MacConkeyev agar koji se koristi za članove porodice *Enterobacteriaceae* sadrži žučnu sol koja inhibira većinu gram pozitivnih bakterija. Lowenstein Jensen selektivni medij koji se koristi za izolaciju *M. tuberculosis* napravljen je selektivnom inkorporacijom boje malahitnog zelenila. Wilson & Blair's agar za kultivaciju *S.typhi* postaje selektivan dodavanjem boje Briljant zelene. TCBS agar i Monsurov TTG agar koji se koriste za izolaciju *V. cholerae* iz uzoraka fekalija imaju povišeni pH (8,5-5,6), koji inhibira većinu drugih bakterija. Selenit F bujon i alkalna peptonska voda koriste se za izolaciju patogena iz uzoraka fekalija. Selenit F bujon se koristi za kultivaciju bakterija *Salmonella* i *Shigella*, a alkalna peptonska voda za kultivaciju *Vibrio cholerae*.

Diferencijalni i indikatorski mediji razlikuju jedan tip mikroorganizama od drugog koji raste na istom mediju. Ova vrsta medija koristi biokemijske karakteristike mikroorganizma koji raste u prisutnosti specifičnih hranjivih sastojaka ili indikatora (poput neutralne crvene, fenol crvene ili metilen plave) dodanih u medij kako bi vidljivo ukazala na definirajuća obilježja mikroorganizma. Kada se određeni supstrat (ugljikohidrat) ugradi u medij i na njega nacijepi smjesa bakterija, samo ona bakterija koja ima sposobnost fermentacije stvara kiselinu. Ova promjena pH otkriva se pomoću pH indikatora ugrađenog u medij i bakterija koja može fermentirati šećer pojavljuje se u drugoj boji. Ovaj se pristup koristi u MacConkeyevom agaru, CLED agaru, TCBS agaru, XLD agaru itd. Trostruki šećer (TSI) agar najčešće je korišten medij ove vrste, a služi za diferencijaciju enterobakterija s obzirom na njihovu sposobnost stvaranja sumporovodika i fermentacije prisutnih

šećera (Slika 19). Sastav je sličan Kliglerovom testu šećera (Slika 20), ali za razliku od njega, uz glukozu i laktozu sadrži i saharozu. Nesposobnost fermentacije glukoze bakterijsku vrstu odmah isključuje iz porodice *Enterobacteriaceae*. MacConkeyev agar je medij za uzgoj i identificiranje gram negativnih bacila (posebno članova *enterobacteriaceae*). Sadrži žučne soli (selektivno sredstvo), laktozu (šećer), pepton i neutralni crveni (pH indikator) agar i vodu. One bakterije koje mogu fermentirati laktozu stvaraju kolonije ružičaste boje gdje kolonije koje ne fermentiraju laktozu stvaraju bezbojne kolonije. Slično tome, *Vibrio cholerae* stvara kolonije žute boje na saharози koju sadrži TCBS medij. Proizvodnja H_2S od strane *Salmonelle typhi* rezultira nastankom kolonija crne boje na mediju Wilson & Blair.



Slika 19. TSI agar

Preuzeto s: <http://microbesinfo.com/2013/05/triple-sugar-iron-agar-tsi-test/>



Slika 20. Salmonella na Kliglerovom testu šećera

Klinički uzorci moraju se transportirati u laboratorij odmah nakon sakupljanja kako bi se spriječio prekomjerni rast zagađujućih organizama ili komenzala. To se može postići korištenjem transportnih medija. Takvi mediji sprječavaju isušivanje uzorka, održavaju sposobnost za život svih organizama u uzorku bez promjene njihove koncentracije. Dodatak ugljena služi za neutraliziranje inhibitornih čimbenika. Medij Cary Blair i medij Venkatraman Ramakrishnan koriste se za transport izmeta sumnjivih na koleru (47).

Anaerobne bakterije trebaju posebne medije za rast jer im je potreban nizak sadržaj kisika, smanjeni oksidacijsko-redukcijski potencijal i dodatne hranjive tvari. Prokuhavanje medija služi za izbacivanje otopljenog kisika. Tioglikolatni bujon koristi se za utvrđivanje potreba za kisikom kod bakterija. Obvezni anaerobi se skupljaju na dnu epruvete gdje je koncentracija kisika najniža, što je slučaj kod roda *Clostridium* (48).

Zasijavanje je postupak kojim se mikroorganizam (bakterija) dovodi u kontakt s medijem.

Najčešće korištena metoda je metoda zasijavanja potezom. Koristi se za izolaciju bakterija iz kliničkih uzoraka u čistoj kulturi. Sterilnom ezom sa omčom mala količina materijala se u nizu paralelnih linija zasije po površini agara. Najčešće se potez ne prekida preko cijele površine ploče. Nekada se kao što je prikazano na slici, okretanjem ploče, uzorak nanese u obliku kvadranta u 4 različita poteza.

Također poznata je i metoda prelijevanja, koja se najčešće koristi za kvantitativne kulture urina. Prvo se u Petrijevu zdjelicu doda određeno razrjeđenje uzorka, te se otopljenom hranjivom podlogom. Uzorak i podlogu potrebno je dobro izmiješati.

Metoda razmazivanja veoma je slična prethodnoj. Na površinu pripremljene i ohlađene hranjive podloge doda se 0.1-0.5 mL uzorka koji se potom sterilnom staklenom špatulom ravnomjerno razmaže po podlozi.

Zasijavanje ubodom koristi se pri zasijavanju čvrstih hranjivih podloga u epruvetama (TSI agar).

Zasijane Petrijeve zdjelice, nakon obilježavanja na poklopcu, se inkubiraju naopačke u termostatu. Najčešće vrijeme inkubacije kod bakterioloških kultura je 48 sati pri 37 °C. Bakterije se mogu čuvati mjesecima ili godinama ako se čuvaju na -80 °C i u velikom postotku glicerola.

Zadnji korak kultivacije bakterija je određivanje broja mikroorganizama. Određivanje broja mikroorganizama iz čiste kulture temelji se na brojanju poraslih kolonija ili na ocjenjivanju zamućenja podloge. Najkorištenija metoda je Kochova metoda – na ovaj se način utvrđuje broj živih aerobnih mikroorganizama. Broj kolonija odgovara broju bakterijskih stanica u uzorku u slučaju ako se svaka kolonija razvila od jedne bakterijske stanice, zbog toga se broj kolonija označava kao broj jedinica koje tvore kolonije ili CFU (engl. *colony forming units*). Krajnji rezultat CFU jednak je broju kolonija podijeljenom sa volumenom uzorka te pomnoženom sa

recipročnom vrijednošću decimalnog razrjeđenja. MPN (engl. *Most Probable Number*) metoda je koja služi za određivanje najvjerojatnijeg broja koliformnih bakterija. To je statistička metoda koja se temelji na teoriji vjerojatnosti. Zadnja metoda za određivanje broja bakterija iz kulture je turbidimetrijska metoda. U njoj se broj mikroorganizama određuje usporedbom izmjerene optičke gustoće bakterijske suspenzije sa standardnom krivuljom.

Metoda kultivacije se najčešće koristi za redovne bakteriološke pretrage te zbog dugog vremena inkubacije ne bi bila metoda izbora za detekciju i dijagnostiku bioloških agensa (47).

4.1.3. Antimikrobna osjetljivost

Testovi antimikrobne osjetljivosti koriste se kako bi se utvrdilo na koje je specifične antibiotike osjetljiva određena bakterija. To je bitan čimbenik u učinkovitom i brzom liječenju bakterijskih infekcija.

Provođenje antimikrobne osjetljivosti u kliničkom laboratoriju za mikrobiologiju važno je za potvrđivanje osjetljivosti na odabrana empirijska antimikrobna sredstva ili za otkrivanje rezistencije u pojedinim bakterijskim izolatima. Ispitivanje osjetljivosti pojedinih izolata važno je kod vrsta koje mogu posjedovati stečene mehanizme rezistencije, npr. pripadnici *Enterobacteriaceae* (49).

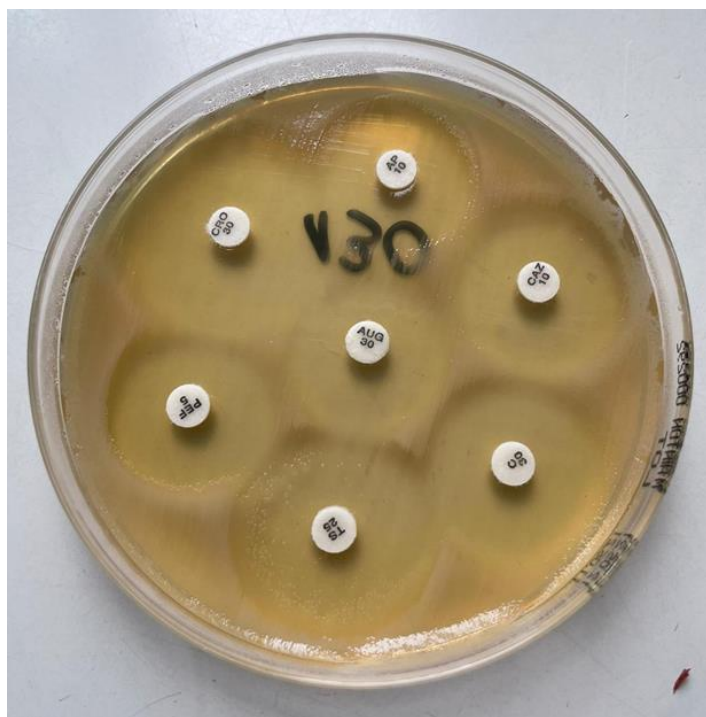
Test koji se radi u svrhu otkrivanja antimikrobne osjetljivosti naziva se antibiogram. Antibiogram je sveukupni profil rezultata ispitivanja osjetljivosti antimikrobnih sredstava određene bakterije na razne vrste antibiotika. Antibioگرامи pomažu liječniku pri odabiru najboljeg empirijskog antimikrobnog liječenja u slučaju da čekaju mikrobiološku kulturu i rezultate osjetljivosti. Oni su također korisni alati za otkrivanje i praćenje antimikrobne rezistencije u određenoj populaciji.

Stupanj osjetljivosti bakterija prema antibakterijskom lijeku može se odrediti dvjema metodama: dilucijskom i difuzijskom.

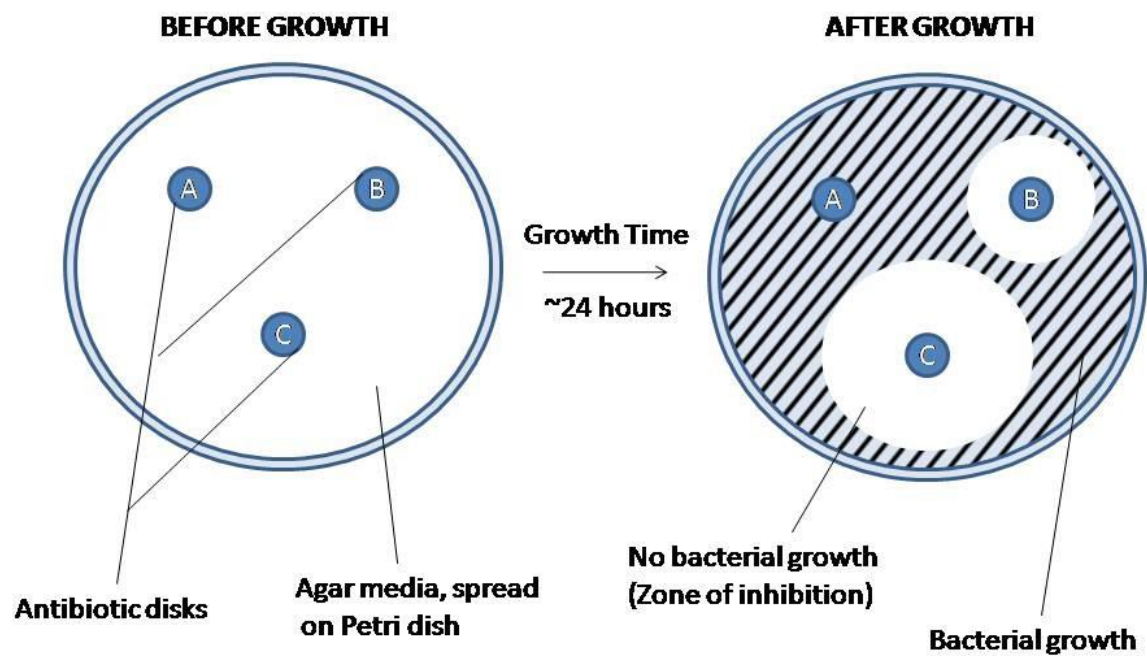
Cilj **dilucijske metode** je odrediti najnižu koncentraciju ispitivanog antimikrobnog sredstva (minimalna inhibitorna koncentracija, MIK) koja pod definiranim uvjetima ispitivanja inhibira

vidljivi rast bakterije koja se istražuje. Vrijednosti MIK koriste se za određivanje osjetljivosti bakterija na lijekove te za procjenu učinkovitosti novih antimikrobnih sredstava. Izvodi se tako da se u nizu epruveta s tekućom hranjivom podlogom razrjeđuje antibakterijski lijek. U svaku epruvetu se ucijepi stalan broj bakterijskih stanica. Nakon inkubacije (18-24 h) pri 37 °C očitava se zamućenje nastalo zbog razmnožavanja bakterija. Epruveta u kojoj je najveće razrjeđenje antibakterijskog lijeka i u kojoj istovremeno nema zamućenja označava se kao MIK – najmanja količina lijeka koja je dovoljna da se inhibira razmnožavanje bakterija (50).

Metodom difuzije može se istodobno odrediti osjetljivost bakterije na više različitih antibiotika (Slike 21 i 22). Ova se metoda temelji na principu da disk impregniran antibiotikom, postavljen na agar prethodno inokuliran bakterijom, skuplja vlagu te antibiotik difuzno difundira prema van kroz agar medij, stvarajući gradijent koncentracije antibiotika. Rast bakterija oko diska ovisit će o njegovoj osjetljivosti na antibakterijsko sredstvo. Ako antibiotik zaustavi rast bakterije, oko diska će biti područje na kojem bakterije nisu porasle dovoljno da budu vidljive. To se naziva zona inhibicije. Na temelju promjera područja inhibicije (u mm) određuju se tri kategorije osjetljivosti: osjetljiv, umjereno osjetljiv, otporan (rezistentan). Na ovaj je način moguće identificirati najdjelotvorniji antibiotik za liječenje bakterijske infekcije (51).



Slika 21. Antibiogram bakterije Salmonella



Slika 22. Metoda difuzije

Preuzeto s: https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test

4.1.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Ponekad nazvana "molekularno fotokopiranje", lančana reakcija polimerazom (PCR) brza je i jeftina tehnika koja se koristi za umnažanje malih segmenata DNK *in vitro*.

Ova metoda se široko koristi za brzo stvaranje milijuna do milijardi kopija (cjelovitih ili djelomičnih) određenog segmenta DNK iz veoma malih uzoraka. Često opisivan kao jedno od najvažnijih znanstvenih dostignuća u molekularnoj biologiji, PCR je revolucionirao istraživanje DNK do te mjere da je njegov tvorac, Kary B. Mullis, 1993. dobio Nobelovu nagradu za kemiju (52). Osnovne komponente PCR-a su DNK predložak, početnice i DNK polimeraza.

DNK predložak – ciljani dio molekule koju želimo umnožiti određuje se početnicama (kratke oligonukleotidne sekvence), koje su komplementarne krajevima dijela DNK koju želimo umnožiti. Pomoću enzima DNK polimeraze, početnice pokreću serijsku reakciju sinteze novog komplementarnog lanca. DNK polimeraza počinje sintetiziranje novog lanca s kraja početnice, a dužina sintetiziranog dijela DNK molekule omeđena je izabranim početnicama (53).

Lančana reakcija polimerazom izvodi se ponavljanjem 30-40 istovjetnih ciklusa, od kojih se svaki sastoji od tri osnovne faze (Slika 23):

1. Razdvajanje lanaca DNK (engl. *denaturation*)

U ovoj fazi dolazi do razdvajanja sparenih lanaca dvolančane DNK, koji kasnije služe kao kalupi za amplifikaciju. Inicijalno denaturiranje DNK odvija se pri 94 °C tijekom jedne minute.

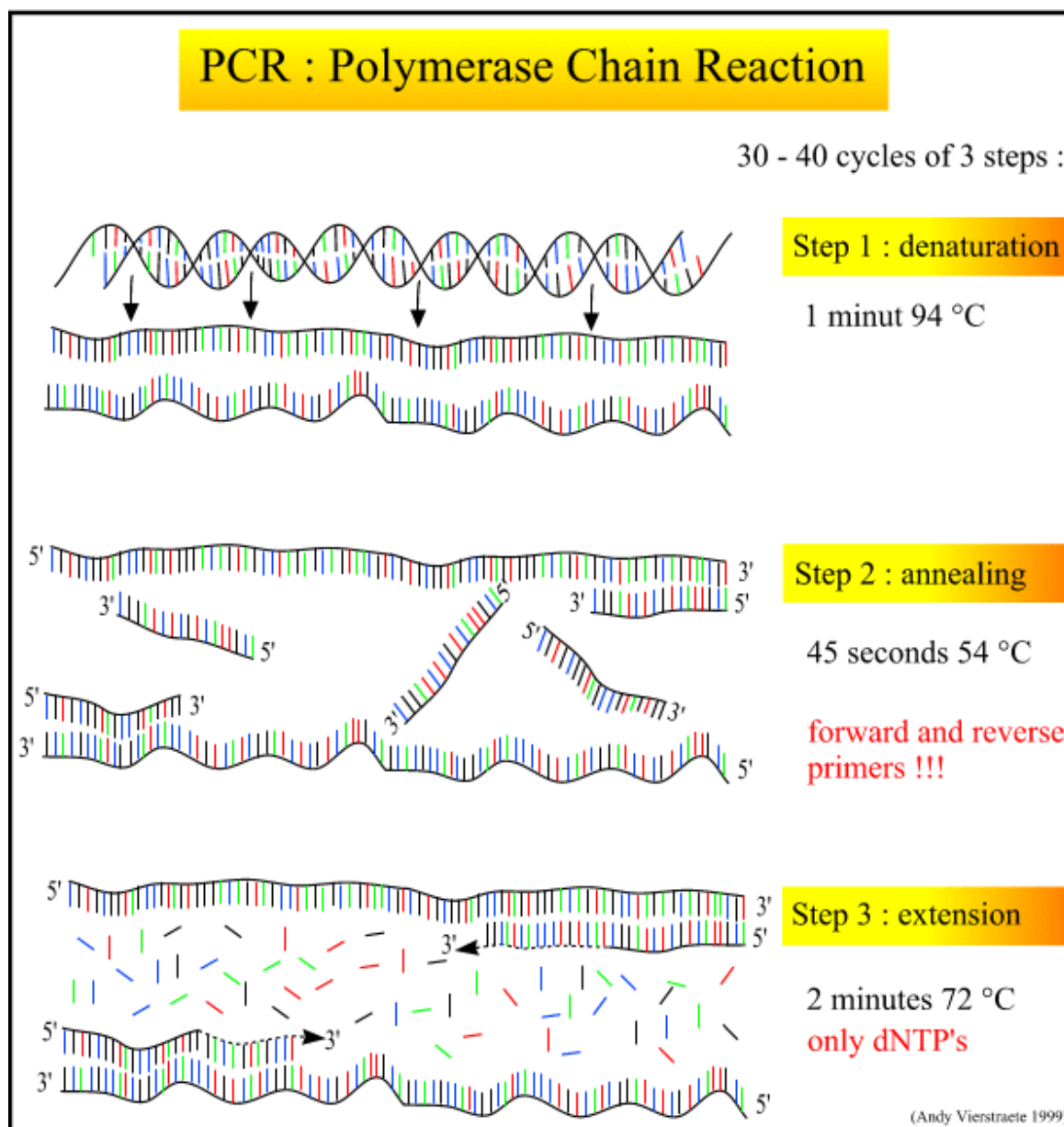
2. Sparivanje početnica s komplementarnim dijelovima DNK (engl. *annealing*)

Ovu fazu karakterizira hibridizacija početnica na komplementarne dijelove DNK. Kratke oligonukleotidne sekvence vežu se za komplementarne razdvojene DNK lance. Temperatura pada na 55 °C, a trajanje ove faze je otprilike 45 sekundi, u ovisnosti od dužine početnica

3. Produljenje lanca (engl. *extension*)

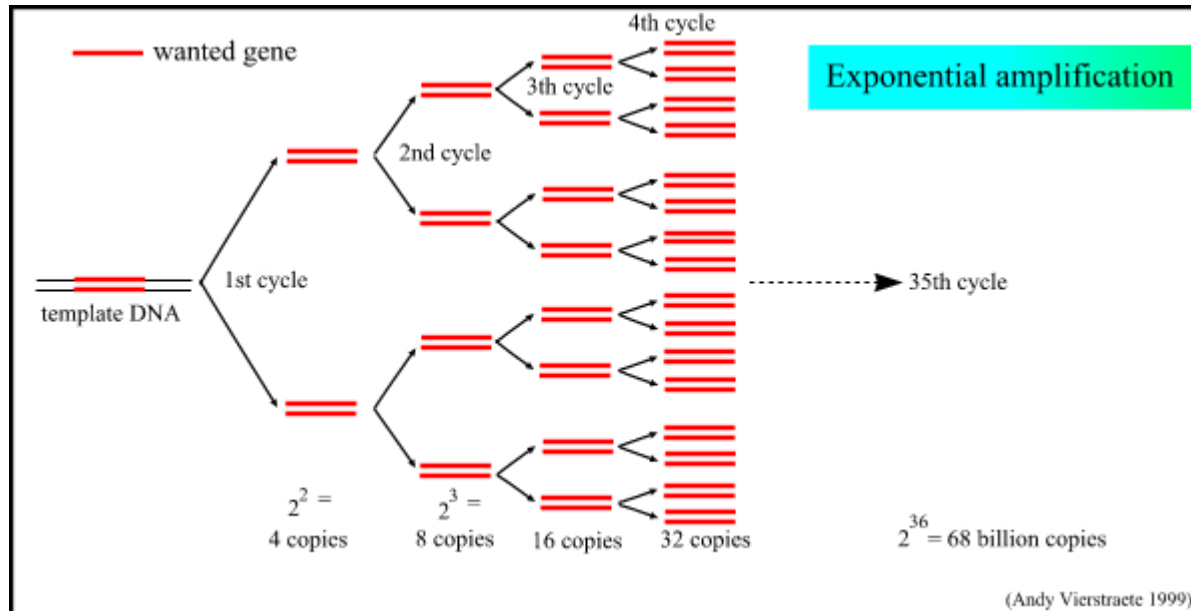
U zadnjoj fazi dolazi do sinteze komplementarnog lanca. Pri temperaturi od 72 °C DNK polimeraza počinje sintetiziranje novog lanca s kraja početnice i dostiže maksimum aktivnosti. Ova faza traje 1 – 2 minute, a trajanje ovisi o dužini fragmenta koji se želi umnožiti.

S obzirom na to da se na oba lanca sinteza odvija istovremeno, u jednom ciklusu amplifikacije broj molekula DNK će se udvostručiti. Postoji eksponencijalni porast broja kopija gena sa svakim ciklusom. Nakon završetka posljednjeg ciklusa, reakcija će biti ohlađena na 4 °C (Slika 24) (53).



Slika 23. Shematski prikaz PCR metode

Preuzeto s: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>



Slika 24. Prikaz eksponencijalnog rasta broja kopija u PCR metodi

Preuzeto s: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Osnovni proces lančane reakcije polimerazom uvijek je isti, a početnice se biraju u ovisnosti od toga na koji mikroorganizam se sumnja. Ukupno trajanje PCR-a je u prosjeku 2-4 sata. Kao što sam već spomenula, kod sumnje na zloupotrebu biološkog oružja najbitnije je uspješno detektirati biološki agens u uzorku u što kraćem roku. PCR metoda je, od izravnih metoda, metoda izbora u ovakvim slučajevima, jer brzo i s velikom točnošću i preciznošću daje specifičan rezultat (54).

4.2. Neizravne metode

Neizravne metode se temelje prvenstveno na postojanju specifičnog imunosnog odgovora organizma na prisutnost patogena. Antigen je svaka molekula koju imunosni sustav prepoznaje. Nespecifični (prirođeni) imunitet za aktivaciju ne zahtijeva prethodni kontakt s antigenom. Osnovne komponente prirođenog imuniteta su fagocitne stanice, antigen-prezentirajuće stanice, prirodoubilačke (engl. *natural killer*) stanice, polimorfonuklearni leukociti te neke tumorske stanice. Specifični (stečeni) imunitet specifičan je za antigen te pamti prethodno izlaganje istom. Komponente ovog imunosnog odgovora su protutijela, T limfociti (stanična imunost) te B limfociti (humoralna imunost). Specifični i nespecifični imunitet djeluju uzajamno (55).

Sve neizravne metode za bakteriološku dijagnostiku su serološke – rade se iz krvnog seruma. Uzorak se dobiva venepunkcijom u volumenu od približno 5 mL. Nakon formiranja ugruška i centrifugiranja, serum se odvaja u sterilnu epruvetu koja se pohranjuje u hladnjak na 2-8 °C do testiranja (56).

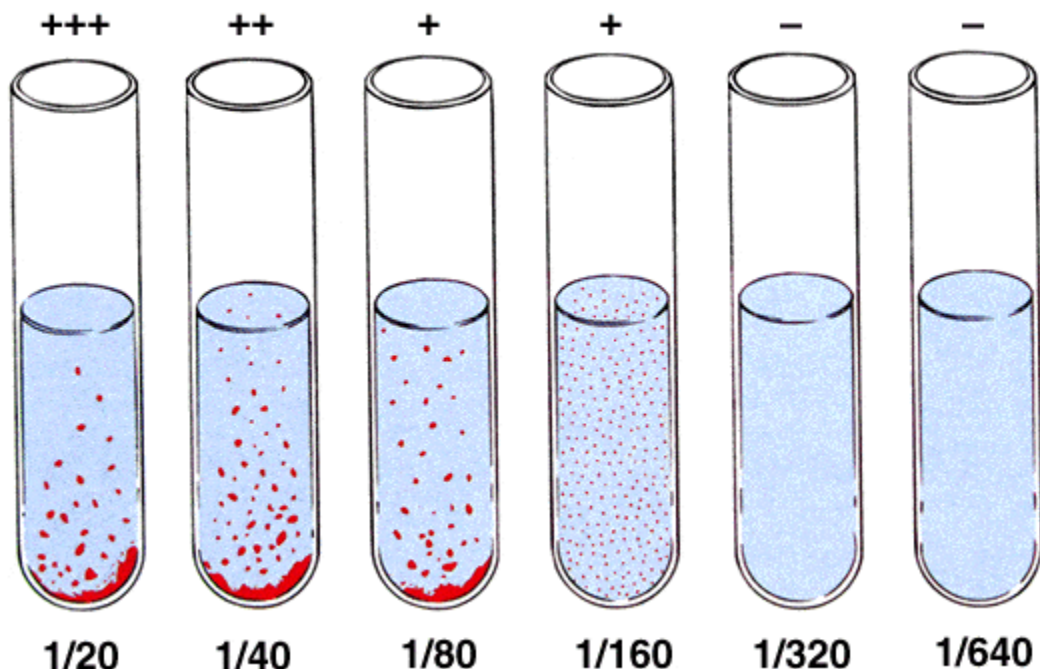
Iako serološke metode imaju veću ulogu u dijagnostici parazitarne i virusne infekcije, u bakteriološkoj dijagnostici se koriste najčešće kod rickettsije i brucella koje se teže izoliraju. Serološke metode navedene i opisane u nastavku su one najčešće i najuspješnije korištene za dijagnostiku bakterijskih infekcija te bi tako mogle biti i metode za detekciju bioloških agenasa.

4.2.1. Aglutinacijski testovi

Testovi aglutinacije otkrivaju antitijelo ili antigen i uključuju aglutinaciju bakterija, crvenih stanica ili čestica lateksa obloženih antigenom ili antitijelima. Oslanjaju se na dvovalentnu prirodu antitijela koja mogu umrežiti antigene čestica. Serijska razrjeđenja seruma testiraju se na njihovu sposobnost da uzrokuju ili inhibiraju aglutinaciju, a najveće razrjeđenje koje uzrokuje ili inhibira aglutinaciju navodi se kao titar antitijela ili antigena. IgM uzrokuje aglutinaciju učinkovitije od IgG. Ako je prisutan višak protutijela, čestice se mogu toliko obložiti protutijelima da je aglutinacija zapravo inhibirana. To se naziva prozonskim učinkom i može rezultirati lažno negativnim rezultatima testa ako se serum ne razrijedi na odgovarajući način.

Lateks aglutinacijski test se koristi klinički u identifikaciji i tipizaciji mnogih važnih mikroorganizama. Kod ovog testa kuglica lateksa se spaja s reagirajućim antigenom. Nastali kompleks se potom miješa s uzorkom pacijenta te ako u uzorku postoji ciljno protutijelo, dolazi do aglutinacije zrnaca. Aglutinacija zrnaca u bilo kojem od razrjeđenja smatra se pozitivnim rezultatom. Ova tehnika koristi se za otkrivanje protutijela koja nastaju kao odgovor na razne viruse i bakterije, kao i autoantitijela koja se stvaraju protiv vlastitog u autoimunim bolestima. Konkretno je ovaj test pokazao uspješne rezultate kod detekcije bakterija *Yersinia pestis*, *Shigella* te *Francisella tularensis*. Iako se u par minuta dobiva rezultat, što svakako ide u prilog brzog dijagnostici bioloških agensa, ova metoda sama nije dovoljno osjetljiva (57).

Za detekciju bakterije *Salmonella*, najčešće se koristi aglutinacija po Widalu (Slika 25). To je aglutinacijski test kojim se u serumu dokazuje prisutnost protutijela protiv *Salmonella* koja uzrokuje trbušni tifus. Njime se mjere antitijela protiv flagelarnih (H) i somatskih (O) antigena uzročnog organizma. U akutnoj infekciji prvo se pojavljuje O antitijelo koje se postupno povećava, kasnije pada i često nestaje u roku od nekoliko mjeseci. H antitijelo se pojavljuje nešto kasnije, ali traje duže. Povećani ili visoki titar O protutijela općenito ukazuje na akutnu infekciju, dok povišena H protutijela pomažu prepoznati vrstu crijevne groznice. Međutim, Widalov test ima mnoga ograničenja. Povišena antitijela možda su rezultat prethodne imunizacije protiv tifusa ili ranijih infekcija *Salmonelama* koje dijele uobičajene O antigene sa *S. typhi* ili *S. paratyphi*. U endemskim zemljama populacija ima veći titar H antitijela (58).



Slika 25. Aglutinacija po Widalu

Preuzeto s: <https://microbiologyinfo.com/widal-test-introduction-principle-procedure-interpretation-and-limitation/>

Aglutinacija po Wrightu omogućuje serološku dijagnozu akutne bruceloze. Ovaj kvantitativni test postaje pozitivan rano, od 10. ili 12. dana, tijekom akutne bruceloze, ali brzo postaje negativan jer otkriva IgM. Ponekad je negativan kod nekih bolesnika s subakutnom brucelozom i kod većine bolesnika s kroničnom brucelozom. Slijedom toga, nije preporučeni alat za probir niti za epidemiološke studije. Test se temelji na aglutinaciji suspenzije brucele ubijene izlaganjem formaldehidu i visokoj temperaturi (59).

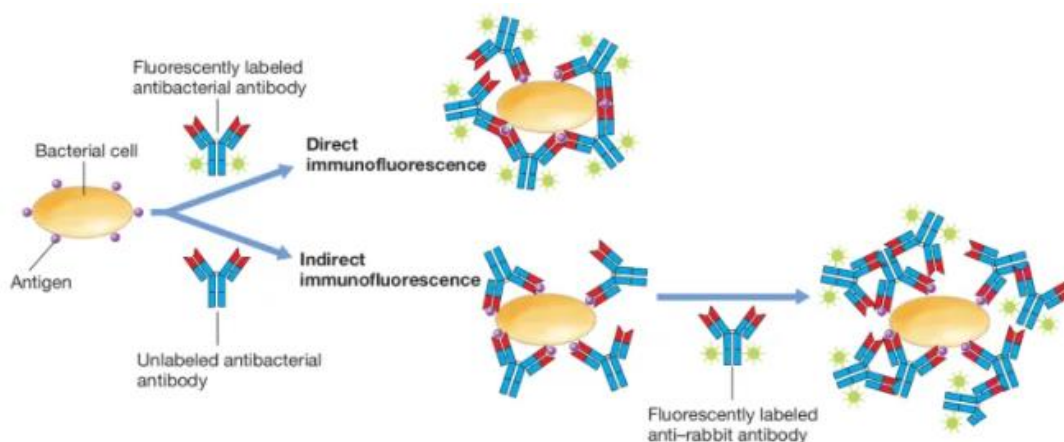
4.2.2. ELISA (Imunoenzimski test)

Imunoenzimski test koristi enzimski imunološki test u čvrstoj fazi (EIA) za otkrivanje prisutnosti liganda (obično proteina) u tekućem uzorku pomoću antitijela usmjerenih na protein koji se mjeri. U najjednostavnijem obliku ELISA-e, antigeni iz ispitivanog uzorka pričvršćeni su na površinu. Zatim se na površinu nanosi odgovarajuće antitijelo kako bi moglo vezati antigen. Ovo se antitijelo veže za enzim, te se potom uklanjaju sva nevezana antitijela. U posljednjem koraku dodaje se supstanca koja sadrži supstrat enzima. Ukoliko je došlo do vezivanja, naknadna reakcija proizvodi signal, a to je najčešće promjena boje. Izvođenje ELISA-e mora uključivati barem jedno antitijelo specifično za određeni antigen. Uzorak s nepoznatom količinom antigena imobilizira se na čvrstom nosaču (obično polistirenska mikrotitarska ploča), nespecifično (adsorpcijom na površinu) ili specifično (hvatanjem drugog antitijela specifičnog za isti antigen, u "sendviču"). Nakon što se antigen imobilizira, dodaje se protutijelo za detekciju koje tvori kompleks s antigenom (60). Detekcijsko antitijelo može se kovalentno povezati s enzimom ili ga samo može detektirati sekundarno antitijelo koje je biokonjugacijom povezano s enzimom. Između svakog koraka, ploča se obično opere blagom otopinom deterdženta kako bi se uklonili svi proteini ili antitijela koji nisu specifično vezani. Nakon završnog koraka pranja, boja se razvija dodavanjem enzimskog supstrata kako bi se dobio vidljivi signal, koji ukazuje na količinu antigena u uzorku (61). Široka paleta specifičnih ELISA kompleta izrađena je posebno za bakteriološku dijagnostiku. Ovi kompleti uglavnom sadrže sve reagense potrebne za učinkovito i pouzdano provođenje pokusa imunodetekcije. Komponente kompleta obično uključuju prethodno presvučenu pločicu s više jažica, otopinu razrjeđivača, konjugirana antitijela za detekciju, supstrat i kontrolu. Nedavno je pokazano da se antitijela mogu zamijeniti bakteriofagima u ELISA testovima za detekciju i dijagnostiku bakterija. Ti specifični bakterijski virusi nude brojne prednosti u odnosu na standardna antitijela u postupcima detekcije, naime, proteini faga koji sudjeluju u prepoznavanju domaćina izuzetno su stabilni, fage je lako izolirati i razmnožavati i mogu se relativno dugo čuvati. Te značajke čine bakteriofage jeftinim i potpuno funkcionalnim alatom koji može zamijeniti primarna antitijela u postupcima imunološke detekcije bakterija. Stoga se i ELISA može smatrati primjerenom metodom za detekciju bakterija kao bioloških agenasa (62).

4.2.3. IFA (Indirektni Imunofluorescentni test)

Brza vizualizacija bakterija iz kliničkog uzorka može se postići tehnikama fluorescentnih antitijela (FA). Njima se na konstantno područje antitijela veže fluorescentni marker (fluorogen), što rezultira molekulom reportera čija je uporaba brza, lako se mogu vidjeti ili izmjeriti i mogu se vezati za ciljane markere s visokom specifičnošću. FA metode mogu biti izravne, u kojima označeno antitijelo veže antigen, ili neizravne, u kojima sekundarna poliklonska antitijela vežu antitijela pacijenta koja reagiraju na pripremljeni antigen (Slika 26).

Indirektni imunofluorescentni test koristi se za traženje antitijela u serumu pacijenta. Njegova je upotreba najznačajnija kod brze i efikasne detekcije bakterija *Coxiella burnetii* i *Rickettsia prowazekii* (64). Poznati antigen je imobiliziran na staklenom staklu (stakalca presvučena stanicama koje nose poznate antigene komercijalno su dostupna). Preko razmaza dodaje se uzorak (serum pacijenta). Ako su specifična antitijela prisutna u serumu, nastaje kompleks antigen-antitijelo. Serum se ispere i doda se sekundarni antihumani imunoglobulin konjugiran s fluorokromom. Bakterije će biti vidljive samo ako su ih vezala antitijela iz seruma pacijenta (63).



Slika 26. Direktni i indirektni imunofluorescentni test

Preuzeto s: <https://microbeonline.com/indirect-fluorescent-antibody-ifa-test/>

5. ZAKLJUČCI

1. Bioterrorizam je potencijalna prijetnja globalnih razmjera, za život i zdravlje ljudi, životinja i biljaka s mogućim dalekosežnim posljedicama.

2. Razni mikroorganizmi prirodno posjeduju biološko fizikalne karakteristike koji ih čine pogodnim biološkim agensima, a dodatnu prijetnju predstavljaju genetski modificirani patogeni.

3. Svojstva bakterija koja ih čine pogodnim patogenom za biološko oružje su mogućnost stvaranja spora, čime mogu desetljećima preživjeti u okolišu, velika virulentnost, rezistencija na antibiotike te proizvodnja bakterijskih toksina.

4. Posebnu opasnost za uporabu kao biološki agens predstavljaju bakterije kategorije A (po CDC-u):

- *Bacillus anthracis*: spore vrlo otporne na djelovanje okoliša; aerosol najopasniji oblik prijenosa

- *Clostridium botulinum*: spore, kontaminacija hrane i vode, visoka smrtnost

- *Yersinia pestis*: interhumani prijenos, visoka smrtnost, mogućnost pandemijskih razmjera, rezistencija na neke antibiotike

- *Francisella tularensis*: iznimno niska infektivna doza (10-15 bakterija)

5. Zajedničko je ovim patogenima jako visoka smrtnost ukoliko se ne počne rano s liječenjem, pa je u tom smislu, dijagnostika prva linija obrane.

6. Bakterije kategorije B izazivaju bolesti koje odlikuje relativno nizak mortalitet i veliki učinak onesposobljavanja ljudi kao i kroničnih stanja:

- *Brucella species*: nespecifični simptomi, teške kronične bolesti

- *Clostridium perfringens*: mogući teški neurološki poremećaji, vrlo malo podataka o djelovanju ovog toksina na ljude

- *Burkholderia mallei*: potencijalna visoka smrtnost ljudi, nedovoljno istraženo kod ljudi

- *Burkholderia pseudomallei*: inkubacija od 2 dana do više godina, kronična bolest

- *Chlamydia psittaci*: psitakoza – bolest ptica, lako prenosiva na ljude
- *Coxiella burnetii*: Q vrućica, kontaminirana hrana i aerosol, moguć kronični oblik bolesti s niz ozbiljnih komplikacija
- *Rickettsia prowazekii*: tifus, laki prijenos, do 40 % smrtnosti neliječenih, kronični oblik bolesti
- *Vibrio cholerae*: kolera, prijenos vodom, niski higijenski standardi
- *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*: prijenos kontaminiranom hranom (bez promijenjenih organoleptičkih svojstava), mogući teški oblici trbušnog tifusa

7. Metoda izbora za dijagnostiku gotovo svih bakterija kao potencijalnih bioloških agensa je lančana reakcija polimerazom (PCR), koja točno, precizno i specifično u kratkom roku otkriva o kojoj je bakteriji riječ.

6. LITERATURA

1. Phillips M. Bioterrorism: A Brief History. *Northeast Florida Medicine*. 2005; 56(1):32-5
2. Ristanović E. Medicinski i bezbednosni izazovi 21. veka - bioterorizam. *ABC - časopis urgentne medicine*. 2016; 16(1):8-19
3. Vitanovski, Sovilj: Biološki agensi; *Polic.sigur.*(Zagreb). 2017; 26(4):375-385
4. Bokan.S. Biological and toxin weapons-bioterrorism, *Arh Hig Rada Toksikol* 2003; 54:29-43
5. Biologydictionary.net Editors. (2017, March 19). Bacteria. Retrieved from <https://biologydictionary.net/bacteria/> (3.4.2021.)
6. hr.wikipedia.org/wiki/Bakterije (4.7.2021)
7. Vučemić A. Toksikološke posljedice oružja za masovno uništavanje i noksa u suvremenom ratovanju i terorizmu. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61(2):247-255.
8. [hr.wikipedia.org/wiki/Antraks_\(bolest\)](https://hr.wikipedia.org/wiki/Antraks_(bolest)) (4.7.2021.)
9. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/infektologija/gram-pozitivni-bacili/antraks> (3.4.2021.)
10. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One*. 2019 May 22;14(5)
11. V.Semić, m.brezovac, I.Lazarić, M.Šantić: Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*; *medicina* 2009; 45(2):154-159
12. Galimand M, Carniel E, Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3233-6
13. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes Immun*. 2019 May;20(5):357-370
14. <https://express.24sata.hr/znanost/lijecnici-u-soku-vratila-se-kuga-strepe-od-epidemije-11255> (4.7.2021.)
15. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/infektologija/gram-negativni-bacili/bruceloza> (6.4.2021.)
16. [www.zzjzdnz.hr/download/Vjesnik br 9.pdf](http://www.zzjzdnz.hr/download/Vjesnik%20br%209.pdf) (4.7.2021.)

17. Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol.* 2016 Dec 21;7:2049
18. Dhaked RK, Singh MK, Singh P, Gupta P. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. *Indian J Med Res.* 2010 Nov;132(5):489-503
19. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/anaerobne-bakterije/botulizam> (7.4.2021.)
20. Stiles BG, Barth G, Barth H, Popoff MR. Clostridium perfringens epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? *Toxins* (Basel). 2013 Nov 12;5(11):2138-60
21. Wagley S, Bokori-Brown M, Morcrette H, Malaspina A, D'Arcy C, Gnanapavan S et al. Evidence of Clostridium perfringens epsilon toxin associated with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2019 Apr;25(5):653-660
22. Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, Lobato FC. Clostridium perfringens epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe.* 2014 Dec;30:102-7
23. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-pluca-i-disnih-putova/pneumonija/psitakoza> (13.4.2021.)
24. Compendium of measures to control Chlamydia psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2000. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 2000 Jul 14;49(RR-8):3-17
25. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):518-53
26. <https://www.cdc.gov/qfever/> (18.4.2021.)
27. Špičić S, Laroucau K, Zdelar-Tuk M, Duvnjak S, Pavlinec Ž, Reil I i sur. Maleus (sakagija) - gotovo zaboravljena zoonoza . *Veterinarska stanica.* 2018;49(1):31-36
28. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, Burkholderia pseudomallei. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14240-5
29. <http://www.nj.gov/agriculture/divisions/ah/diseases/melioidosis.html> (19.4.2021.)
30. https://bib.irb.hr/datoteka/871606.SKRIPTA_MP_2017.pdf (4.7.2021.)

31. Akram SM, Ladd M, King KC. *Rickettsia prowazekii*. [Updated 2021 Jan 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-
32. <https://www.cdc.gov/typhus/epidemic/index.html> (3.5.2021.)
33. Conner JG, Teschler JK, Jones CJ, Yildiz FH. Staying Alive: *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. *Microbiol Spectr*. 2016 Apr;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015
34. <http://msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/infekcije-i-zarazne-bolesti/zarazne-bolesti-uzrokovane-bacilima/kolera> (4.7.2021.)
35. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html> (8.5.2021.)
36. Michael P. Ryan, Jean O'Dwyer, Catherine C. Adley, "Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*", *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 3782182, 6 pages, 2017
37. Pawelzik M. Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and their detection. *Acta Microbiol Hung*. 1991;38(3-4):315-20
38. Hale TL, Keusch GT. *Shigella*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 22
39. <https://www.cdc.gov/shigella/general-information.html> (8.5.2021.)
40. Washington JA. Principles of Diagnosis. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
41. Boyles T H, Wasserman S. Diagnosis of bacterial infection. *SAMJ, S. Afr. med. j.* [Internet]. 2015 May; 105(5): 419-419
42. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J*. 2005 Nov;38(11):775-88
43. <https://open.oregonstate.education/generalmicrobiology/chapter/microscopes/> (12.5.2021.)
44. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. 2021 Feb 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–

45. [https://bio.libretexts.org/Courses/Manchester Community College \(MCC\)/Remix of Openstax%3AMicrobiology by Parker Schneegurt et al/03%3A Microscope and the Cell/3.02%3A Staining Microscopic Specimens](https://bio.libretexts.org/Courses/Manchester_Community_College_(MCC)/Remix_of_Openstax%3AMicrobiology_by_Parker_Schneegurt_et_al/03%3A_Microscope_and_the_Cell/3.02%3A_Staining_Microscopic_Specimens) (12.5.2021.)
46. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):208-36
47. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/microbial-culture-methods/> (13.5.2021.)
48. <https://microbenotes.com/thioglycollate-broth/> (13.5.2021.)
49. L. Barth Reller, Melvin Weinstein, James H. Jorgensen, Mary Jane Ferraro, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 11, 1 December 2009, Pages 1749–1755
50. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163-75
51. Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, Zarazaga M. Antibioqramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. *Comput Methods Programs Biomed.* 2017 May;143:159-169
52. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet> (20.5.2021.)
53. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):1-4.
54. Song L, Ahn S, Walt DR. Detecting biological warfare agents. *Emerg Infect Dis.* 2005 Oct;11(10)
55. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
56. <https://www.nzjz-split.hr/index.php/seroloska-dijagnostika> (22.5.2021.)
57. Nakamizo Y, Takahashi R. Latex-agglutination test in shigellosis and salmonellosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1965 Sep;14(5):783-6
58. Chart H, Cheesbrough JS, Waghorn DJ. The serodiagnosis of infection with *Salmonella typhi*. *J Clin Pathol.* 2000 Nov;53(11):851-3.

59. Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Yilmaz M, Kurt C et al. The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Aug;46(4):241-3.
60. hr.fondationekopedia.org/112917-elisa-YCTZYA (4.7.2021.)
61. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay> (22.5.2021.)
62. Galikowska E, Kunikowska D, Tokarska-Pietrzak E, Dziadziuszko H, Loś JM, Golec P et al. Specific detection of Salmonella enterica and Escherichia coli strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Sep;30(9):1067-73.
63. <https://microbeonline.com/indirect-fluorescent-antibody-ifa-test/> (22.5.2021.)
64. Wood C, Muleme M, Tan T, Bosward K, Gibson J, Alawneh J et al. Validation of an indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of IgG antibodies against Coxiella burnetii in bovine serum. *Prev Vet Med*. 2019 Aug 1;169:104698.

7. SAŽETAK

Metode u dijagnostici bakterija koje se mogu koristiti kao bioterorističko oružje

Biološko oružje staro je koliko i civilizacija. Latentna opasnost od napada ovim oružjem i danas predstavlja prijetnju, tim više što se tehnološkim napretkom, osim već postojećih patogena, mogu zloupotrijebiti i „novi“ patogeni izmijenjenih svojstava, nastali genetičkim inženjeringom.

Zbog svoje izrazite patogenosti i lakoće širenja te otpornosti na fizikalno-kemijske utjecaje iz okoliša, bakterije poput *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* i druge, opravdano su klasificirane kao potencijalni biološki agensi od strane CDC-a.

Obrana od većine bioloških agensa, pa tako i bakterija, relativno je slaba i ograničena jer su uskladištene količine cjepiva, seruma, antibiotika i antidotova protiv toksina relativno male, a svakako nedostatne za nagle masovne pojave oboljenja. Dodatan problem predstavlja prirodna ili umjetno stvorena rezistencija bakterija na antibiotike.

Jedna od važnijih metoda u borbi protiv napada biološkim agensom je što brža dijagnostika patogena kako bi se brzo poduzele potrebne mjere te zaustavili ili smanjili razmjeri širenja, obolijevanja i mortaliteta. Širok spektar dijagnostičkih metoda i testova, bilo izravnih (dokazivanje prisutnosti uzročnika), ili neizravnih (dokazivanje protutijela na bakterijske antigene), uvelike ubrzava i olakšava uspješnu i brzu detekciju potencijalnih bioloških agensa. PCR metoda je, od izravnih metoda, metoda izbora u slučajevima detekcije potencijalnih bioloških agensa, jer brzo te s velikom preciznošću i točnošću daje rezultat.

Ključne riječi: bakterija, bioterorizam, biološki agensi, dijagnostičke metode

8. SUMMARY

Diagnostic methods for detection bacteria that can be used as biological agents

Biological weapons are as old as civilization. The latent danger of being attacked with these weapons is still a threat, especially since technological advances, in addition to existing pathogens, can also abuse "new" pathogens with altered properties, created by genetic engineering.

Due to their pronounced pathogenicity and ease of spread and resistance to physicochemical influences from the environment, bacteria such as *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* and others have been justifiably classified as potential biological agents by the CDC.

Defense against most biological agents, including bacteria, is relatively weak and limited because the stored amounts of vaccines, serums, antibiotics and antidotes against toxins are relatively small, and certainly insufficient for sudden mass outbreaks of the disease. An additional problem is the natural or artificially created resistance of bacteria to antibiotics.

One of the most important methods in combating biological agent attacks is to diagnose pathogens as soon as possible in order to take the necessary measures quick and to stop or reduce the spread, morbidity and mortality. A wide range of diagnostic methods and tests, either direct (proving the presence of the causative agent) or indirect (proving antibodies to bacterial antigens), greatly accelerates and facilitates the successful and rapid detection of potential biological agents. The PCR method is, within the direct methods, the method of choice in cases of detection of potential biological agents, because it gives the result quickly and with great precision and accuracy.

Key words: bacteria, bioterrorism, biological agents, diagnostic methods

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Ena Miljuš

Datum i mjesto rođenja: 2. veljače 1998. godine, Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Osječka 10, 21000 Split, Republika Hrvatska

Telefon: +385992059469

E-mail: enamiljus22@gmail.com

OBRAZOVANJE

Fakultet 2019. – 2021. Sveučilišni odjel za forenzične znanosti – Split

Diplomski studij: Forenzična kemija i molekularna biologija

2016. – 2019. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija – Split

Preddiplomski studij: Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Srednja škola 2012. – 2016. V. Gimnazija „Vladimir Nazor“ – Split

Osnovna škola 2004. – 2012. Osnovna škola Lučac - Split

OSOBNİ VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinski jezik: hrvatski

Drugi jezici: engleski, talijanski

Računalne vještine i kompetencije: Microsoft Office paket, Internet

Vozačka dozvola: B kategorija

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

(PRILOG 3)

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **Ena Miljuš**, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom **Metode u dijagnostici bakterija koje se mogu koristiti kao bioterorističko oružje** rezultat mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mogega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, 28.6.2021.

Potpis studenta/studentice: _____