

LEKÁRSKA MIKROBIOLÓGIA

Nováková E., Porubská A., Kompaníková J., Neuschlová M.

Obsah

1 MIKROBIOLÓGIA A KLINICKÁ MIKROBIOLÓGIA.....	9
2 BAKTÉRIE.....	11
2.1 Bakteriálna bunka.....	11
2.2 Identifikácia baktérií.....	12
2.3 Štruktúra bakteriálnej bunky.....	17
2.3.1 Obal.....	18
2.3.1.1 <i>Plazmatická membrána (cytoplazmatická membrána, bunková membrána, plazmatická membrána).....</i>	<i>18</i>
2.3.1.2 <i>Bunková stena.....</i>	<i>21</i>
2.3.2 Intracelulárne štruktúry.....	25
2.3.2.1 <i>Jadrová hmota – nukleoid.....</i>	<i>25</i>
2.3.2.2 <i>Plazmidy, transpozóny.....</i>	<i>26</i>
2.3.2.3 <i>Ribozómy.....</i>	<i>26</i>
2.3.2.4 <i>Zásobné látky, granuly.....</i>	<i>27</i>
2.3.2.5 <i>Endospóry.....</i>	<i>27</i>
2.3.3 Vonkajšie štruktúry.....	29
2.3.3.1 <i>Púzdro (glycocalyx, S vrstva).....</i>	<i>29</i>
2.3.3.2 <i>Bičík.....</i>	<i>31</i>
2.3.3.3 <i>Fimbrie a pili.....</i>	<i>32</i>
3 PATOGENITA A VIRULENCIA MIKROORGANIZMOV.....	33
3.1 Mechanizmus vzniku ochorenia.....	34
3.1.1 Proces šírenia nákazy.....	35
3.1.2 Typy infekcií.....	36
3.1.3 Fázy vzniku ochorenia.....	36
3.1.3.1 <i>Kolonizácia a prežívanie.....</i>	<i>37</i>
3.1.3.2 <i>Poškodenie hostiteľa.....</i>	<i>39</i>

4 BAKTERIÁLNA GENETIKA.....	43
4.1 Makromolekula DNA.....	43
4.2 Proteosyntéza.....	44
4.3 Zmena genetickej informácie.....	46
4.3.1 Mutácie.....	46
4.3.2 Rekombinácie.....	46
4.3.3 Životný cyklus bakteriofága.....	48
4.3.4 Transpozóny.....	49
 5 FYZIOLOGIA MIKROORGANIZMOV.....	 50
5.1 Metabolizmus baktérií.....	50
5.1.1 Baktérie podľa náročnosti na prítomnosť kyslíka.....	50
5.1.2 Zdroje energie a uhlíka pre bakteriálnu bunku.....	51
5.1.3 Katabolické procesy baktérií.....	52
5.1.4 Biosyntéza – anabolizmus.....	52
5.2 Rast a rozmnožovanie baktérií.....	53
5.3 Kultivácia.....	54
5.3.1 Statická kultivácia.....	54
5.3.2 Hĺbková (submerzná) kultivácia.....	56
5.3.3 Kontinuálna kultivácia.....	56
5.3.4 Kultivácia baktérií z biologického materiálu.....	57
5.3.5 Kolónie.....	59
5.3.6 Kultivácia anaeróbných baktérií.....	60
5.3.7 Dôkaz pohyblivosti mikroorganizmov.....	61
 6 FYZIOLOGICKÁ MIKROFLÓRA.....	 61
6.1 Význam fyziologickej flóry.....	62
6.2 Zloženie fyziologickej flóry.....	62
6.2.1 Orgány za fyziologických podmienok sterilné a zodpovedajúci biologický materiál.....	63
6.2.2 Zloženie a význam fyziologickej bakteriálnej flóry.....	63
6.2.3 Infekcie spôsobené predstaviteľmi fyziologickej flóry.....	65

7 NOZOKOMIÁLNE NÁKAZY.....	66
7.1 Riziká vzniku NN.....	66
7.2 Najrizikovejšie oddelenia.....	66
7.3 Nozokomiálne nákazy podľa vzniku.....	67
7.4 Prenos nozokomiálnej infekcie.....	67
7.5 Najčastejší vyvolávatelia nozokomiálnych nákaz.....	67
7.6 Boj proti nozokomiálnym nákazam.....	68
 8 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA A ŠPECIFICKÉ VLASTNOSTI VÍRUSOV, PARAZITOV A HÚB.....	 69
8.1 Všeobecná virológia.....	69
8.1.1 Všeobecná charakteristika.....	69
8.1.2 Replikácia vírusu.....	70
<i>8.1.2.1 RNA +ss.....</i>	<i>70</i>
<i>8.1.2.2 RNA –ss.....</i>	<i>71</i>
<i>8.1.2.3 DNA.....</i>	<i>71</i>
<i>8.1.2.4 Retrovírusy.....</i>	<i>71</i>
8.1.3 Patogenéza vírusových ochorení a obranné mechanizmy.....	71
8.1.4 Princípy identifikácie vírusovej infekcie.....	72
8.2 Všeobecná parazitológia.....	73
8.3 Všeobecná mykológia.....	75
8.3.1 Huby (plesne a kvasinky).....	75
<i>8.3.1.1 Charakteristika.....</i>	<i>75</i>
<i>8.3.1.2 Morfológia.....</i>	<i>76</i>
<i>8.3.1.3 Rozmnožovanie húb</i>	<i>77</i>
<i>8.3.1.4 Mykózy podľa primárnej lokalizácie infekčného procesu.....</i>	<i>78</i>
<i>8.3.1.5 Typy postihnutia hubami.....</i>	<i>79</i>
 9 MOŽNOSTI OVPLYVNENIA POTENCIÁLU MIKROORGANIZMOV SPÔSOBIŤ OCHORENIE.....	 80

9.1 Antimikrobiálna terapia.....	80
9.2 Antibiotiká.....	81
9.2.1 Účinok antibiotík na cieľovú bunku.....	81
9.2.2 Kombinovanie antibiotík.....	81
9.2.3 Spektrum účinnosti.....	82
9.3 Miesto pôsobenia alebo mechanizmus účinku v cieľovej bunke.....	82
9.4 Rezistencia.....	83
9.4.1 Mechanizmy vzniku rezistencie	84
9.4.1.1 Betalaktamázy.....	85
9.5 Nežiadúce a toxické účinky.....	86
9.5.1 Nežiadúce účinky.....	86
9.5.2 Toxické účinky.....	86
9.6 Racionálna antibiotická terapia.....	87
9.6.1 Stanovenie citlivosti mikroorganizmov na antibiotiká	88
9.6.1.1 Difúzny diskový test.....	89
9.6.1.2 Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie.....	89
9.6.1.3 Minimálna baktericídna koncentrácia.....	89
9.6.1.4 E-test.....	90
9.6.1.5 Testovanie mechanizmov rezistencie	90
9.6.1.6 Súčasné pôsobenie viacerých antibiotík.....	90
9.7 Pôsobenie antibiotík podľa miesta účinku.....	91
9.7.1 Inhibícia syntézy bunkovej steny.....	91
9.7.1.1 Betalaktámové antibiotiká.....	91
9.7.1.2 Ostatné ATB pôsobiace na úrovni bunkovej steny.....	93
9.7.2 Poškodenie plazmatickej membrány.....	93
9.7.3 Inhibícia syntézy proteínov.....	94
9.7.4 Inhibícia syntézy NK.....	97
9.7.6 Antimykobakteriálne prípravky.....	98
9.7.7 Antimykotiká.....	98
9.7.8 Antiparazitiká.....	99
9.7.9 Antivírusová terapia.....	102
9.7.9.1 Princípy terapie.....	102

9.7.9.2 <i>Priklady účinku antivírusových preparátov na skupiny vírusov</i>	103
10 DEKONTAMINÁCIA	105
10.1 Základné pojmy	105
POUŽITÁ LITERATÚRA	
ZOZNAM OBRÁZKOV	

Zoznam skratiek a symbolov

ABC – ATP binding cassette

ADP – adenožindifosfát

AIDS (acquired imuno-deficiency syndrome)– syndróm získanej imunodeficiencie

APC (adenomatous polyposis coli) – adenomatózna polypóza

ARO – anesteziolo-resuscitačné oddelenie

ATB – antibiotikum

ATP – adenožintrifosfát

CFU (colony forming unite) – kolóniu tvoriaca jednotka

CMV – cytomegalovírus

CO₂ – oxid uhličitý

DIC – diseminovaná intravaskulárna koagulácia

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzymoimunoanalýza

ESBL (expanded spectrum beta lactamase) – betalaktamázy s rozšíreným spektrom

Fc – špecifické väzbové miesto pre Fc-časti molekúl imunoglobulínov

g – generačná doba

H₂ – vodík

HIV (human imunodeficiency virus)– vírus ľudskej imunodeficiencie

HSV –herpes simplex vírus

IgA – imunoglobulín A

IgG – imunoglobulín G

IgM – imunoglobulín M

IL – interleukín

IM – infekčná mononukleóza

KAZ – kvartérne amóniové zásady

log – logaritmus

LPS – lipopolysacharidy

MBC – minimálna baktericídna koncentrácia

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia

mRNA – mediátorová RNA

MZ SR – Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky

N – počet buniek v objeme

N₂ – dusík

Na⁺ – sodíkový kation

NAD – nikotínamidadeníndinukleotid

Na₂CO₃ – uhličitan sodný

NK – nukleová kyselina

NN – nozokomiálna nákaza

OKM – Oddelenie klinickej mikrobiológie

PABA – para-aminobenzoová kyselina

PAF (platelet-activating factor) – faktor aktivujúci trombocyty

PAMP – pathogen associated molecular patterns

PAS (periodic acid Schiff) – farbenie na histologické účely

PBP – penicillin binding protein

PCR – polymerázová reťazová reakcia

PNC – penicilín

RIA – rádioimunoanalýza

RNA – ribonukleová kyselina

R-plazmid – plazmid rezistencie

rRNA – ribozomálna RNA

RSV – respiračný syncytiálny vírus

RT – reverzná transkriptáza

S - Svedbergova jednotka jednotka hustoty, sedimentačná konštanta

SAL (sterility assurance level) – udáva pravdepodobnosť prežitia mikroorganizmu

Spe – streptokokový pyrogénny exotoxín

SVLZ – spoločné vyšetровacie a liečebné zložky

T_{H1} – pomocné (helper) T-lymfocyty prvej triedy

T_{H2} – pomocné (helper) T-lymfocyty druhej triedy

TNF – tumor nekrotizujúci faktor

tRNA – transferová RNA

TSLs – toxic shock like syndrome

TSST-1 – toxic shock syndrome toxin 1

v – rýchlosť množenia

VHA – vírus hepatitídy A

VHB – vírus hepatitídy B

VHC – vírus hepatitídy C

VZV – vírus varicella zoster

1 MIKROBIOLÓGIA A KLINICKÁ MIKROBIOLÓGIA

Mikrobiológia je samostatný vedný odbor, ktorý skúma javy a ich príčinné súvislosti prebiehajúce na úrovni mikrosвета živých systémov (voľným okom neviditeľné živé organizmy).

Lekárska mikrobiológia je samostatný medicínsky odbor, ktorý vo svojej činnosti vychádza z vedeckých poznatkov mikrobiológie a študuje štruktúru, metabolizmus, biochemické procesy, patogenézu, nástroje patogenity a virulencie, citlivosť na antibiotiká a mechanizmy rezistencie medicínsky významných mikroorganizmov ako aj procesy obranných reakcií organizmu voči nim.

Základné skupiny medicínsky významných mikroorganizmov sú:

- baktérie
- huby: pliesne a kvasinky
- prvoky
- vírusy
- prióny

V mikrobiológiii, predovšetkým v parazitológii, sa používajú mikrobiologické metódy výskumu a diagnostiky aj na štúdium štruktúry, životných prejavov a významu niektorých makroorganizmov pre prenos a vznik infekčných ochorení (červy, článkonožce).

Klinická mikrobiológia využíva tieto poznatky na

- diagnostiku (identifikácia mikroorganizmov)
- terapiu (stanovenie citlivosti na antimikrobne látky)
- prevenciu (stanovenie nástrojov patogenity, patogénneho potenciálu a obranných reakcií organizmu voči nim) ochorení mikrobiálnej etiológie.

V rámci liečebno preventívnej starostlivosti tvorí klinická mikrobiológia samostatné laboratórne oddelenie spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek (SVLZ). Základným pracoviskom klinickej mikrobiológie je „Oddelenie klinickej mikrobiológie“ (OKM). Podľa rozsahu a druhu vykonávanej činnosti môže byť oddelenie rozdelené na úseky, resp. laboratória Pracovisko klinickej mikrobiológie špecializované na určitú činnosť, môže byť výnimočne súčasťou iného organizačného útvaru.

Podľa činnosti je možné mikrobiológiu rozdeliť na niekoľko pododborov:

- bakteriológia
- virológia
- antiinfekčná imunológia

- sérológia
- mykológia
- parazitológia
 - protozoológia
 - helmintológia
 - entomológia

Dnes sa stáva samostatným pododborom príprava kultivačných médií a roztokov a kontrola ich kvality. Nadstavbovú diagnostickú činnosť, kontrolu kvality práce laboratórií a expertíznu činnosť v oblasti klinickej mikrobiológie zabezpečujú **referenčné** laboratória. Pre potreby objektivizácie faktorov vonkajšieho prostredia sa vyčlenil samostatný odbor vrámci verejného zdravotníctva – mikrobiológia vonkajšieho prostredia.

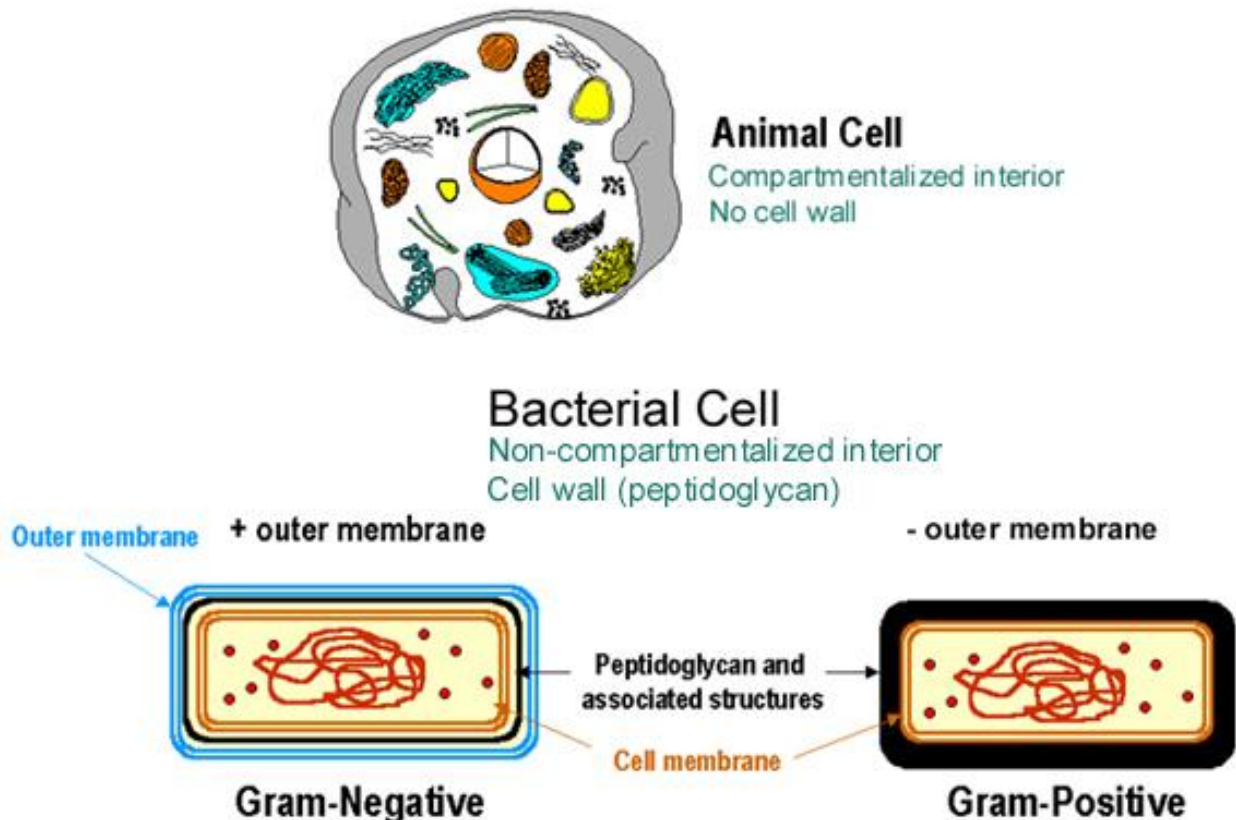
Hlavnou náplňou odboru klinickej mikrobiológie je poskytovanie komplexnej mikrobiologickej diagnostiky na stanovenie etiológie mikrobiálnych ochorení a stanovenie kauzálnej antiinfekčnej, prípadne imunomodulačnej terapie chorých. Klinická mikrobiológia sa zaoberá diagnostikou ochorení spôsobených patogénnymi baktériami, vírusmi, mikroskopickými hubami a parazitmi ako aj oportúnne patogénnymi mikroorganizmami, ktoré sa môžu uplatniť v patogenéze ochorení u pacientov s poruchami imunity. Dokazuje prítomnosť fyziologickej mikrobiálnej flóry na koži a slizniciach človeka a prispieva k objektivizácii posúdenia jeho zdravotného stavu. Vo svojej diagnostickej činnosti využíva možnosti priameho dôkazu etiologického agens v materiále na základe mikroskopického vyšetrenia, dôkazu voľných antigénov, nukleových kyselín a iných štruktúr vrátane toxínov, izolácie na médiách a ďalšej identifikácie pôvodcu ochorenia. Súčasťou vyšetrenia pri bakteriálnych a mykotických ochoreniach je zisťovanie citlivosti na antimikrobiálne liečivá. Pre nepriamu diagnostiku mikrobiálnych ochorení sa využívajú sérologické metódy dôkazu protilátok proti antigénom mikroorganizmov ako aj určovanie ukazovateľov zápalovej reakcie a stavu imunity.

2 BAKTÉRIE

2.1 Bakteriálna bunka

Bunka je základná stavebná jednotka každého živého organizmu. Podľa stupňa vývoja a organizácie jadrovej hmoty je možné bunky rozdeliť do 2 základných skupín:

- bunky prokaryotické (tvoria archebaktérie a eubaktérie)
- bunky eukaryotické (vytvárajú organizmy živočíchov, rastlín, rias, húb)



Obr.1. Zaradenie bakteriálnej bunky. <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/prototype.htm>

Prokaryotické bunky:

- Archaeobaktérie - vyskytujú sa v extrémnych podmienkach: halofilné, termofilné, metanofilné baktérie. Ich bunková stena neobsahuje peptidoglykan, majú špecifickú rRNA, obsahujú glycerol.
- Eubaktérie – do tejto skupiny patria vďaka medicínsky významné baktérie. V bunkovej stene obsahujú peptidoglykan a murein.

Eukaryotické bunky

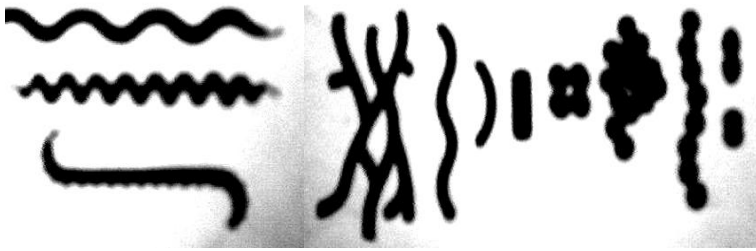
- s bunkovou stenou obsahujúcou chloroplast vytvárajú pletivá. Živiny získavajú absorpciou a energiu fotosyntézou a vytvárajú organizmy ríše rastlinnej - machy, lišajníky, ihličnaté a kvitnúce rastliny.
- bez bunkovej steny sú organizované do tkanív, orgánov a systémov. Živiny získavajú ingesciou a energiu katabolickými pochodmi a vytvárajú organizmy živočíšnej ríše - hmyz, červy, stavovce.
- obsahujúce chitín nevytvárajú tkanivá ani pletivá. Sú schopné fotosyntézy. Živiny získavajú absorpciou. Takýmito bunkami sú tvorené huby vreckaté, výtrusné, kvasinky a pliesne.
- Vytvárajú tiež jednoduché obvykle jednobunkové organizmy ríše protista - euglény, riasy, prvoky

V roku 1968 boli baktérie vyňaté (spolu s modrozelenými riasami) z ríše rastlinnej a do systematizácie bola zaradená ríša Procaryotae (bunky s primitívnym jadrom). Organizmy tejto ríše neobsahujú typické jadro. Ich cirkulárna DNA nie je ohraničená biologickou membránou. Baktérie, ktoré sú jej predstaviteľmi, sú jednobunkové organizmy, reprodukujúce sa binárnym delením – zaškrtením s amitotickým delením chromozómu. Na rozdiel od eukaryotických buniek ich ribozómy sú tvorené z podjednotiek inej veľkosti, neobsahujú organely akými sú jadro, lyzozómy, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát ani biologické membrány

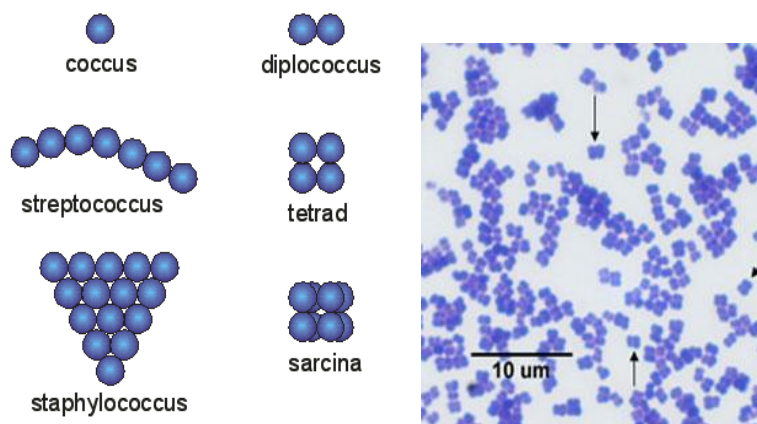
V písanom texte sa na na zapísanie latinského pomenovania obvykle používa typ písma *kurzíva*, u baktérií vo forme binominálnej terminológie (rod a druh, genus a species). Rodový názov sa píše veľkým písmenom a v prípade odborných textov sa môže skracovať pri opakovanom použití názvu formou veľkého začiatočného písmena. Druhový názov sa píše malým písmenom (*Staphylococcus aureus* = *S. aureus*).

2.2. Identifikácia baktérií

Základnými tvarmi baktérií sú koky, paličky a zahnuté alebo špirálovité útvary. Koky sa vyskytujú samostatne alebo v pároch (diplokoky – pripomínajúce kávové zrná, alebo plameň a sviečku) v retiazkach (streptokoky) alebo nepravidelných zhlukoch (stafylokoky). Tvar kokov môže byť guľatý, na jednej strane sploštlý, alebo sú takmer štvorcové. Paličky môžu vytvárať rôzne útvary podľa radenia (palisádovité, čínske písmo). Odlišujú sa pomerom dĺžky a hrúbky, prípadne rozšírením niektorej časti. Špirály sa odlišujú počtom závitov, ich hustotou, zakončením a nasmerovaním koncov (*Leptospira interrogans*).

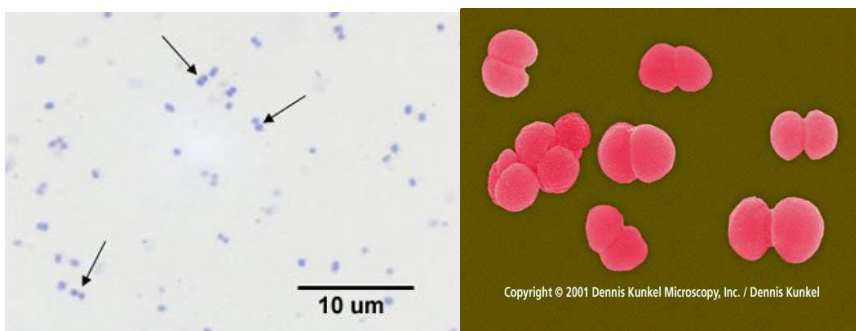


Obr.2 Rôzne usporiadanie špirál, paličiek a kokov.



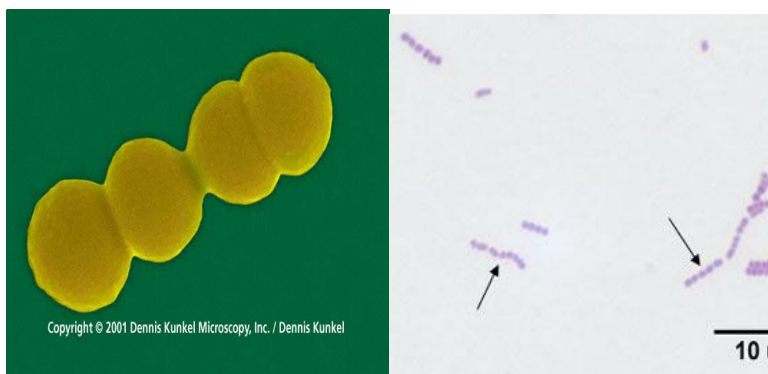
Obr. 3. Štvorice kokov (tetrády).

<http://beta.globalspec.com/reference/54399/203279/exercise-2>

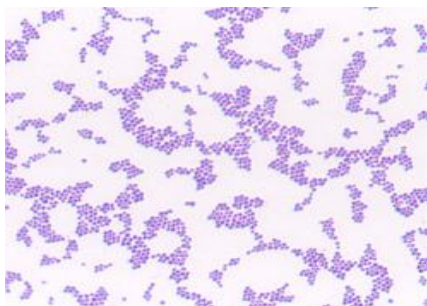


Obr. 4. Dvojice kokov (diplokoky)

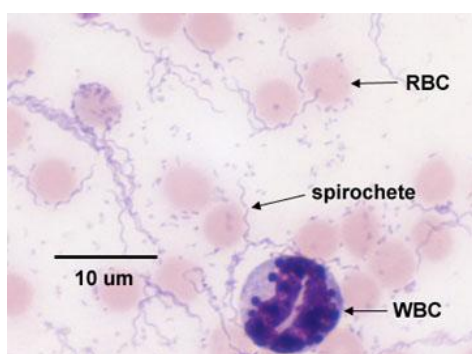
<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/dkngon.html>



Obr. 5. Koky v retiazkach (streptokoky). <http://faculty.ccbcmd.edu>



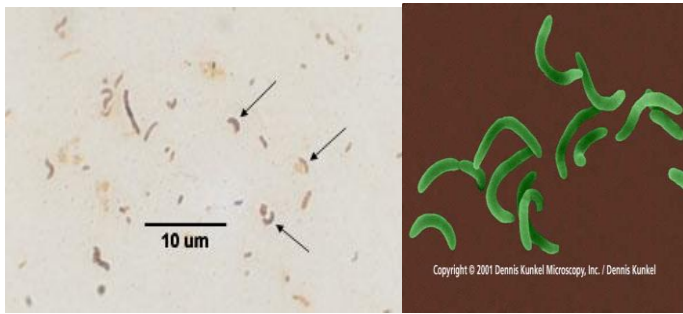
Obr. 6. Koky v zhlukoch (stafylokoky)



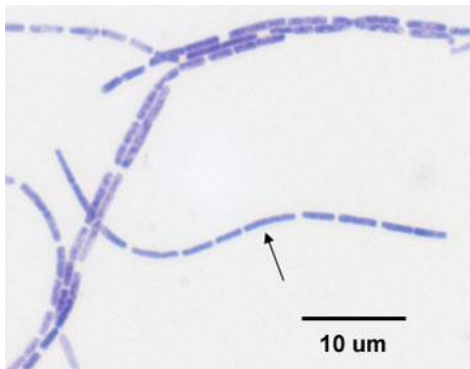
Obr. 7. Baktérie v tvare špirál. <http://faculty.ccbcmd.edu>



Obr. 8. Paličky s rozšíreným koncom (terminálne uložené spóry).

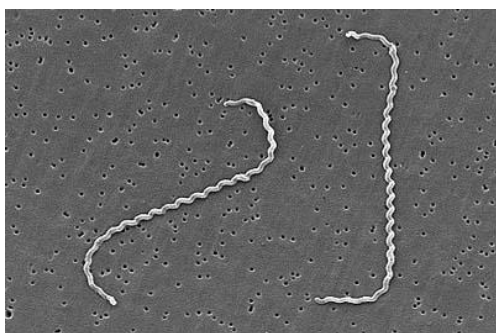


Obr. 9 Rožtekovito zahnuté paličky (vibrio). <http://faculty.ccbcmd.edu>

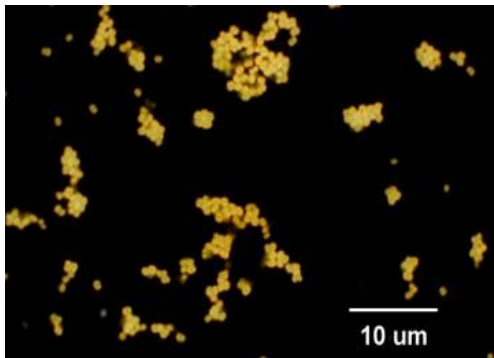


Obr.10. Paličky v retiazkach (streptobacily). <http://home.cogeco.ca>

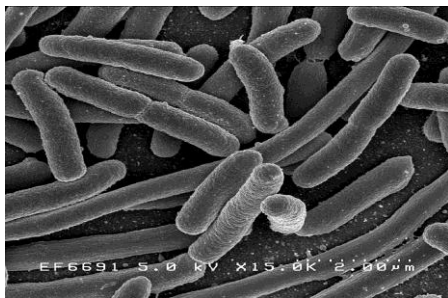
Baktérie môžeme pozorovať vo svetelnom mikroskope natívne alebo po zafarbení, v mikroskope s fázovým posunom, v tmavom poli a interferenčnom mikroskope. Pre zvýšenie citlivosti je možné použiť preparáciu fluoresceínom a pozorovanie vo fluorescenčnom mikroskope. Na vizualizáciu subcelulárnych štruktúr je možné použiť elektrónový mikroskop, pre didaktické účely sa používajú rastrovacie elektrónové mikroskopické postupy.



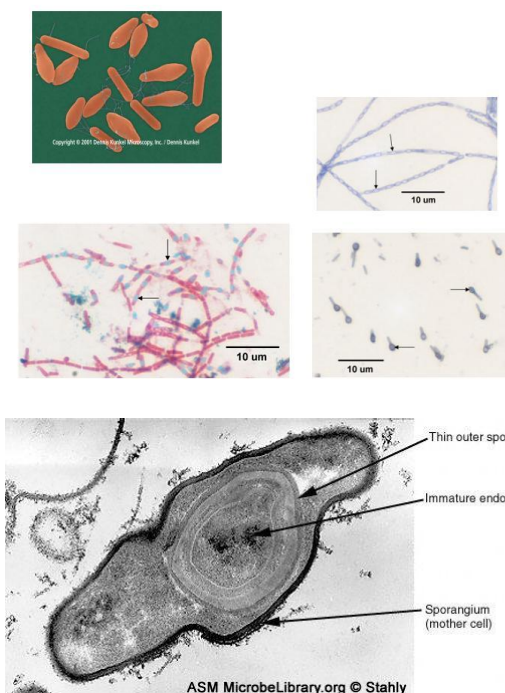
Obr. 11. Špirálovité baktérie. <http://visualphotos.com>



Obr.12. Negatívne farbenie



Obr. 13. Rastrovaný elektronmikroskopický obraz <http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie>



Obr. 14. Rôzne spôsoby znázornenia spór v mikroskope –rastrovaný elektronmikroskopický snímok, Gramovo farbenie, diagnostické farbenie Wirtz-Conklin, Gramovo farbenie, elektrónová mikroskopia. <http://faculty.ccbcmd.edu>
<http://archives.microbeworld.org/know/spore.aspx>

Identifikácia medicínsky významných baktérií v laboratóriách klinickej mikrobiológie pre potreby klinických pracovníkov sa uskutočňuje kultiváciou, izoláciou a identifikáciou baktérií ako vyvolávateľov infekčných ochorení. Tieto postupy sú založené na algoritmoch štandardných postupov pozostávajúcich z rôznych kombinácii testov a metód, ktoré majú za cieľ identifikovať baktériu prípadne jej fyziologické vlastnosti a nástroje patogenity:

v deň odberu od 30 minút - do 8 hodín

- dôkaz baktérie v biologickom materiále - mikroskopia
- dôkaz antigénov v biologickom materiále – aglutinácia, latex aglutinácia, ELISA
- dôkaz NK v biologickom materiále – genetické sondy, PCR

do 24 hodín po odbere

- izoláciu agens v čistej kultúre
- určenie morfologických znakov kolónie a zmien okolia a kultivačných médií
- znázornenie tinkčných vlastností

do 36 hodín – 48 hodín

- určenie biochemických vlastností
- stanovenie antigénnej štruktúry – sklíčková aglutinácia
- stanovenie niektorých nástrojov patogenity a virulencie (plazmakoaguláza, kataláza, oxidáza)

do 72 hodín po odbere

- určenie faktorov patogenity a virulencie (plazmakoaguláza, lyzozým, penicilináza, toxíny)
- určenie citlivosť na antibiotiká

4.deň a viac

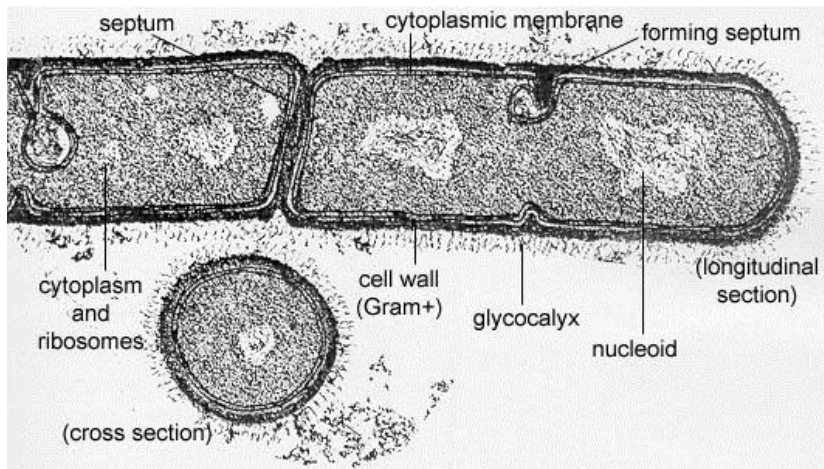
- citlivosť na lýzu bakteriofágom
- sérotypizácia, potvrdenie v referenčnom laboratóriu

2.3 Štruktúra bakteriálnej bunky

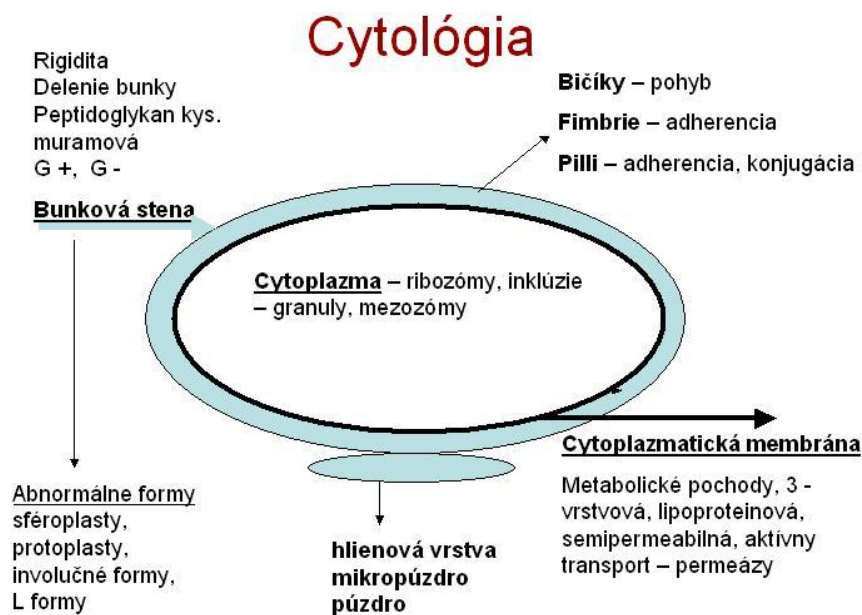
Bakteriálna bunka pozostáva z:

- cytoplazmatickej membrány (sídlo transportných, energetických a biosyntetických procesov), ktorá je obkolesená u väčšiny baktérií, s výnimkou mykoplaziem a L foriem bunkovou stenou
- tekutej cytoplazmy - koloidnej hmoty obsahujúcej jadrovú hmotu tvorenú jediným cirkulárnym chromozómom pozostávajúcim s dvojvláknovej deoxyribonukleovej kyseliny DNA, ribozómy tvorené podjednotkami veľkosti 70S a 40S, zásobné granuly.

- vonkajších štruktúr akými sú glykokalyx, púzdro, bičíky, pilli, fimbrie



Obr. 15. Elektrónová mikroskopia štruktúry bakteriálnej bunky



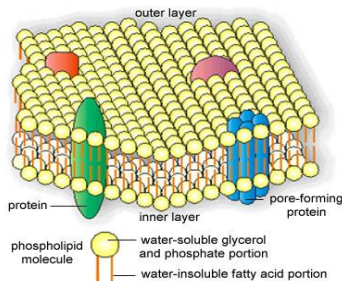
Obr. 16. Stavba bakteriálnej bunky

2.3.1. Obal

2.3.1.1. Plazmatická membrána, cytoplazmatická membrána, bunková membrána, plazmatická membrána).

Plazmatická membrána oddeľuje cytoplazmu baktérie od externe naliehajúcej bunkovej steny alebo vonkajšieho prostredia. Pozostáva z fosfolipidovej dvojvrstvy, v ktorej sú uložené proteinové molekuly. S výnimkou mykoplazmiem, ktoré nemajú bunkovú stenu, prokaryotická

plazmatická membrána neobsahuje steroly. Niektoré baktérie obsahujú sterolom podobné molekuly, ktoré stabilizujú bakteriálnu cytoplazmatickú membránu. Fosfolipidová dvojvrstva je usporiadaná tak, že fosfátové a glycerolové vo vode rozpustné súčasti sú orientované na jej okrajoch, zatiaľčo nepolárne vo vode nerozpustné masné kyseliny vytvárajú vnútornú časť membrány.

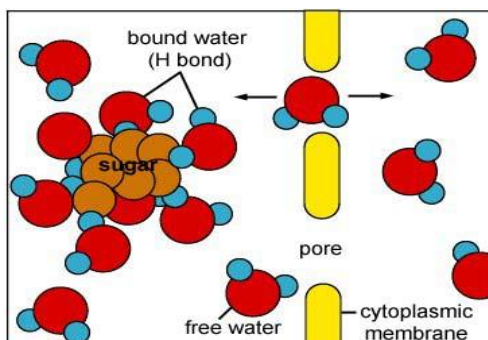


Obr. 17. Cytoplazmatická membrána

<http://faculty.cbcemd.edu/courses/bio141/lecguid/unit1/proeu/u1fig4.html>

Hlavnou funkciou cytoplazmatickej membrány je **selektívna permeabilita**, ktorá určuje smer a zloženie cez ňu prechádzajúcich molekúl. Voda, v nej rozpustené plyny a v tukoch rozpustné molekuly prechádzajú cez fosfolipidovú membránu difúziou. Vo vode rozpustné ióny obvykle prechádzajú cez malé póry v plazmatickej membráne. Všetky ostatné molekuly vyžadujú molekuly nosiča, ktorý ich transportuje cez membránu. Základnými mechanizmami prechodu látok cez cytoplazmatickú membránu sú:

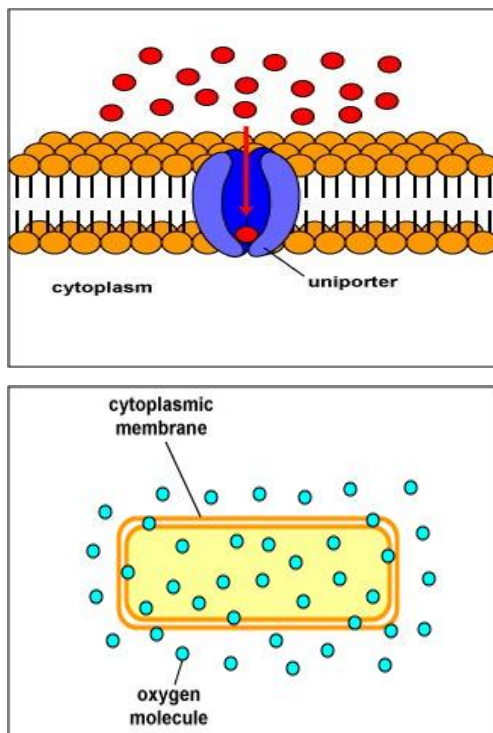
- pasívna difúzia (na presun malých molekúl látky sa využíva potenciálna energia koncentračného gradientu z miesta s vyššou koncentráciou do miesta s nižšou koncentráciou tejto látky)



Obr. 18. Osmóza - presun voľnej vody proti koncentračnému gradientu rozpustenej látky.

<http://faculty.cbcemd.edu/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/u1fig4c.html>

- Bunka sa môže vyskytovať v troch typoch prostredia
 - hypotonickom
 - hypertonickom
 - izotonickom
- prenos prostredníctvom transportných proteínov. Koncentrácia nutričných faktorov je obvykle v prirodzenom prostredí veľmi nízka, preto bunky využívajú špecifické transportné proteíny na akumuláciu živín z vonkajšieho prostredia.. Tento transport môže prebiehať ako
 - uľahčená difúzia cez kanálové proteíny (aquaporíny – pre vodu) alebo transportné proteíny (uniporter, symporter) v smere koncentračného gradientu
 - aktívny transport proti koncentračnému gradientu za využitia energie a transportných bielkovín (antiporter, ATP binding cassette - ABC)



Obr.19. Možnosti prenosu cez cytoplazmatickú membránu <http://moodle.ito.lacoe.edu>

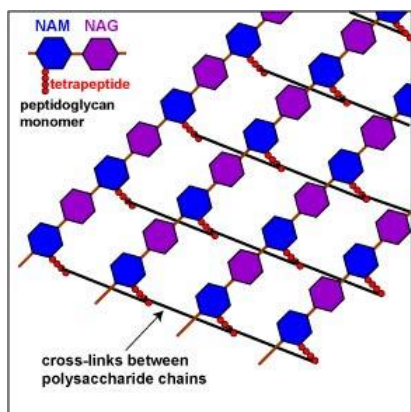
Pri sledovaní cytoplazmatickej membrány v elektrónovom mikroskope je možné pozorovať vezikulárne alebo tubulárne štruktúry, ktoré sú vlastne jej tenkými záhybmi – mezozómy. Považovali sa za ekvivalent mitochondrií. O ich existencii sa dnes pochybuje a považujú sa za artefakty vytvorené pri príprave vzorky na elektrónovú mikroskopiu. Štruktúru plazmatickej membrány poškodzujú niektoré antibiotiká (polymyxíny) a mnohé dezinfekčné látky a antiseptiká (chlorhexidin, hexachlorofén, alkohol, ortofenylfenol).

Funkcie cytoplazmatickej membrány sú:

- selektívna permeabilita
- produkcia energie (sídlo transportného systému elektrónov, enzýmov fosforylácie a fotosyntézy)
- syntéza peptidoglykanu (u rastúcich a deliacich sa buniek)
- spoluúčasť pri amitotickom delení nukleoidu, replikácii a separácii DNA pri delení bunky (existencia aparátu bunkového delenia – divizómu – predpokladá sa, že syntetizuje peptidoglykan a materiál novej membrány, ktorá rozdelí bunku na dve dcérske a následne umožní ich rast)
- syntéza fosfolipidov a proteínov a sekrécia bakteriálnych produktov (enzýmy, súčasti púzdra)
- odstraňovanie splodín
- tvorba endospór

2.3.1.2. Bunková stena

Bunková stena väčšiny medicínsky významných baktérií – eubaktérií s výnimkou lamýdií pozostáva zo spleti molekulárneho komplexu – peptidoglykanu (mureínu). Peptidoglykan je tvorený navzájom pospájanými monomérmi N acetylglukozamínu a kyseliny N acetyl murámovej. Syntéza monomérov peptidoglykanu prebieha v cytoplazme. Tieto sú prostredníctvom transportnej bielkoviny prichytené na protoplazmatickú membránu a transportované cez ňu. Za spolupôsobenia enzýmov sú inkorporované do existujúcich štruktúr bunkovej steny, kde sa monoméry navzájom viažu glykozidickými väzbami a vytvárajú reťazce. Jednotlivé reťazce sa spájajú prostredníctvom voľných tetrapeptidov N acetyl murámovej kyseliny. Väzby medzi reťazcami vytvoria rady, väzby medzi radmi vedľa seba a nad sebou vytvoria vrstvy. Toto vzájomné priestorové previazanie je základom veľkej pevnosti bunkovej steny a osmotickej stability. Pred inkorporáciou nových monomérov do existujúcej štruktúry peptidoglykanu pri raste a delení musia byť najprv prerušené glykozidické väzby medzi monomérmi a peptidové mostíky, ktoré spájajú rady medzi sebou. Iné enzýmy potom vsunú nový monomér do prerušenia peptidoglykánú a transpeptidáza uzavrie nové spojenia medzi vrstvami a radmi peptidoglykánú.



Obr. 20. Schéma štruktúry peptidoglykánu <http://faculty.ccbcmd.edu>

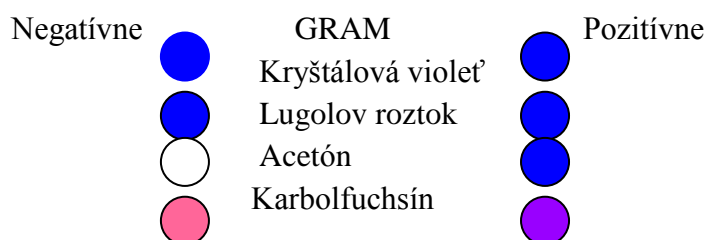
Mnohé antibiotiká účinkujú inhibíciou na úrovni syntézy peptidoglyknu, čím vystavujú baktériu osmotickej lýze. Penicilínové preparáty sa viažu na transpeptidázy, tzv. PBP – penicilin binding protein. Sú to enzýmy, ktoré uzatvárajú peptidové väzby medzi vrstvami peptidoglykanu. Touto vôzbou PNC blokujú ich funkciu pri spájaní reťazcov monomérov. Následkom toho vzniká málo rigidná bunková stena podliehajúca osmotickej lýze.

Väčšina baktérií môže byť zaradená do jednej z 3 skupín na základe tinkčných vlastností – schopnosti prijímať farbivo a odfarbovať sa.:

Gram pozitívne baktérie – schopné prijímať farbivo pri Gramovom farbení, následne sa neodfarbujú

Gram negatívne baktérie – schopné odfarbiť sa pri gramovom farbení a prijímať farbivo pri dofarbovaní

Acidorezistentné baktérie – odolávajúce odfarbeniu roztokom alkoholu a kyseliny.

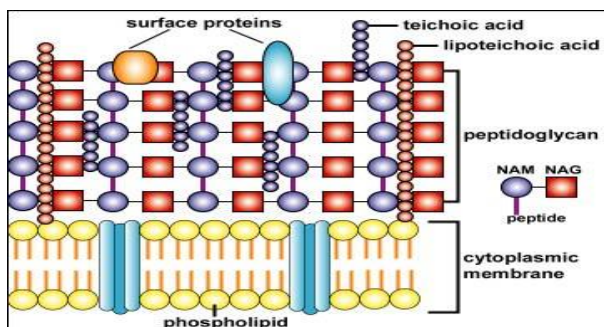


Obr. 21. Schéma farbenia podľa Grama.

Bunková stena G⁺ baktérií:

Bunková stena Gram pozitívnych baktérií je hrubá vrstva navzájom pospájaných molekúl a reťazcov peptidoglykanu, do ktorej sú inkorporované do priestoru vystupujúce molekuly

kyseliny teichoovej. Jej súčasťou sú polyméry glycerolu, fosfátov a ribitolu, prípadne lipidy (lipoteichoová kyselina). Peptidoglykan zabraňuje osmotickej lýze a teichoová kyselina spevňuje bunkovú stenu. Obidve slúžia ako tzv. PAMP – pathogen associated molecular patterns – molekuly súvisiace s patogénmi. Sú to molekuly rozpoznávané rôznymi bunkami imunitného systému a aktivizujúce vrodené nešpecifické imunitné mechanizmy. Aktivujú alternatívnu cestu komplementu. Viazu sa na makrofágy a podporujú uvoľnenie obranných regulačných cytokínov (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, PAF) a vznik zápalovej reakcie. Povrchové proteíny v peptidoglykáne bunkovej steny môžu fungovať ako nástroje patogenity baktérie (enzýmy, adhezíny, invazíny)



Obr. 22. Zloženie bunkovej steny G+ baktérií.

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/diseases/blood/u1fig9b.html>

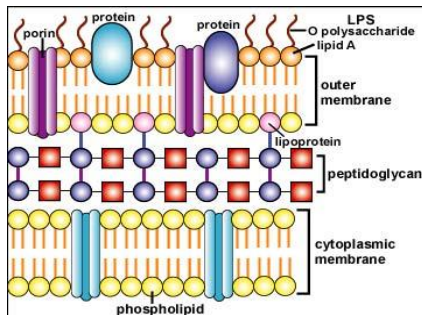
Bunková stena G - baktérií.

Je tvorená :

- z tenkej vrstvy peptidoglykán (2-3 rady) – vnútorná sena a
- z vonkajšej membrány, ktorá je tvorená lipidovou dvojvrstvou zloženou z
 - fosfolipidov lokalizovaných hlavne vo vnútornej vrstve tejto vonkajšej membrány
 - lipoproteínov, ktoré spájajú vonkajšiu membránu s vrstvou peptidoglykanov
 - lipopolysacharidov (LPS) lokalizovaných na vonkajšej vrstve vnútornej membrány a pozostávajúcich z 3 častí (lipid A, corová časť a polysacharidový O antigén)
 - proteínov, ktoré sú rodovo a druhovo špecifické a účinkujú ako enzýmy, adhezíny, invazíny a odolávajú fagocytóze.

Vonkajšia membrána je podobne ako cytoplazmatická membrána semipermeabilná, priestupná pre malé molekuly prostredníctvom pórov, ktoré sú zložené z proteínov (porínov). Bráni úniku niektorých enzýmov a vstupu niektorým toxickým látkam (PNC, lyzozým). LPS dodáva pevnosť vonkajšej membráne a účinkuje ako PAMP stimuláciou vrodených imunitných mechanizmov, ktoré sa prejavajú ako zápal, zvýšená teplota, fagocytóza. Tiež aktivuje alternatívnu cestu komplementu. Biologicky sa prejaví endotoxínovou aktivitou.

- periplazmatický priestor – je želatinový materiál medzi vonkajšou membránou, peptidoglykanom a cytoplazmatickou membránou. Obsahuje enzýmy a väzobné proteíny, ktoré umožňujú rozloženie extracelulárnych živín na menšie molekuly a ich transport cez cytoplazmatickú membránu

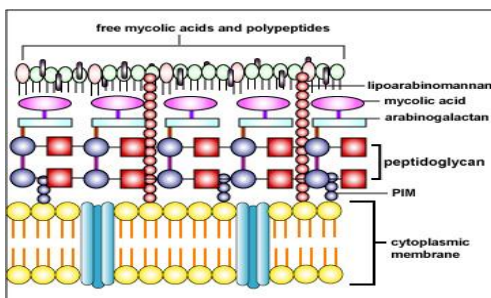


Obr. 23. Zloženie bunkovej steny G- baktérií.

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/diseases/helicobacter/u1fig10b.html>

Bunková stena acidorezistentných baktérií.

Názov odzrkadľuje charakteristickú vlastnosť bunkovej steny niektorých mikroorganizmov odolávať odfarbeniu silnými odfarbovadlami (zmes kyseliny a alkoholu). Bunková stena acidorezistentných baktérií je zložená len z veľmi malého množstva peptidoglykanu a veľkého množstva chemických štruktúr obsahujúcich zlúčeniny lipidov (glykolipidy, kyselina mykolová, arabinogalaktanový lipidový komplex, lipoarabinoman, vosky), ktoré ju robia relatívne nepriepustnou. Zabraňujú vstupu chemických látok do organizmu, čím spomaľujú rast a robia ju rezistentnou na vôčšinu antibakteriálnych preparátov, chemoterapeutiká a dezinfekčné prostriedky, ale napr aj na lyzozým fagocytov. Lýza patogénnych mykobaktérií uvoľňuje kyselinu mykolovú, ktorá sa viaže na receptory makrofágov a stimuluje ich k uvoľneniu cytokínov (TNF), ktoré spôsobujú spolu s lyzozomálnymi látkami makrofágov snažiacimi sa zneškodniť baktériu tkanivové poškodenie (imunopatologické následky zápalu).



Obr. 24. Zloženie bunkovej steny acidorezistentných baktérií.

<http://student.ccbcmd.edu/~gkaiser/innate/u1fig11.html>

Baktérie, ktoré nemajú bunkovú stenu.

Existujú 2 skupiny – Mykoplazmy a L formy. Mykoplazmy sú jedinými baktériami, ktoré prirodzene nemajú bunkovú stenu. Svoj tvar a vyrovnaný tlak medzi vonkajším prostredím a cytoplazmou si zachovávajú aktívnym transportom Na⁺. Ich cytoplazmatická membrána obsahuje steroly, ktoré poskytujú pevnosť. Príležitostne, keď sú baktérie (G⁺ aj G⁻) opakovane kultivované v definovanom prostredí môžu vytvárať mutanty bez bunkovej steny tzv. L formy. Názov dostali podľa Listerovho inštitútu v Londýne, kde ich objavili a popísali. Sú odvodené od množstva patogénov, sú rezistentné na PNC a môžu vznikať aj v priebehu infekcie. Ich etiologická úloha nie je jednoznačne stanovená. Ak sú G⁺ baktérie vystavené lyzozýmu v osmoticky stabilnom prostredí (napr. za prítomnosti sacharóza), lyzozým rozloží glykozidickú väzbu medzi N acetyl muramovou kyselinou a N acetyl glukozaminom peptidoglykanu, čím sa rozruší bunková stena a vznikne protoplast, ktorý môže vo vhodnom prostredí rásť. Podobne G⁻ baktérie vytvárajú sféroplasty, ktoré obsahujú väčšinu štruktúr vonkajšej membrány. Bez peptidoglykanu si neudržia svoj tvar a nadobúdajú sférický tvar.

2.3.2 Intracelulárne štruktúry

Cytoplazma predstavuje základnú vnútornú hmotu bakteriálnej bunky uzavretú plazmatickou membránou. Je to koloidný roztok obsahujúci vodu, obidva typy nukleových kyselín - DNK aj RNK, enzýmy, aminokyseliny, organické a anorganické látky, zlúčeniny, ióny. Cytoplazma je miestom bakteriálneho metabolizmu. Živiny, ktoré sa dostali do cytoplazmy cez obal baktérie po ich rozložení na malé molekuly exoenzymami produkovanými baktériou, sú v cytoplazme metabolizované (katabolizmus) na základné stavebné molekuly, a tie sú následne v syntetických dejoch (anabolizmus) chemicky upravené na vlastné makromolekuly. Tieto reakcie prebiehajúce v cytoplazme sa uskutočňujú za použitia endoenzymov. V cytoplazme sú umiestnené bunkové štruktúry: jadrová hmota – nukleoid, ribozómy, u niektorých plazmidy, endospóry, inklúzne telieska, aktínové fibrily.

2.3.2.1 Jadrová hmota – nukleoid

Na rozdiel od eukaryotických buniek genetický materiál (genóm) baktérií je reprezentovaný cirkulárnou DNA, ktorá vytvára nukleoid, jadrovú hmotu. Jadrová hmota nie je obkolesená jadrovou membránou a nevytvára zreteľné jadro. Nukleoid je tvorený jednou molekulou dvojvláknovej DNA, ktorej dva konce sa kovalentne viažu a vytvárajú cirkulárnu molekulu. Gény lokalizované na DNA sú pri transkripcii prepísané do RNK (mRNK). A tie sú translačným mechanizmom preložené do tripletov aminokyselín a umožnia syntézu proteínov

za účasti ribozómov. DNA teda determinuje aké proteíny a enzýmy a kedy môže bunka syntetizovať, čiže aké chemické reakcie je schopná uskutočňovať. Všetky tieto deje sa uskutočňujú prostredníctvom enzýmov, ktoré sú schopné rozplieť, replikovať a opäť spojiť cirkulárnu bakteriálnu DNA (DNA gyráza, DNA topoizomeráza). Bakteriálny (ale aj vírusový) genóm predstavuje chemickú štruktúru, ktorá je cudzia pre organizmus človeka, a preto stimuluje vrodenú nešpecifickú imunitu. Niektoré antibakteriálne látky (chemoterapeutiká) účinkujú na úrovni inhibície replikácie nukleovej kyseliny. Fluorochinolóny inhibujú enzýmy (topoizomerázy) potrebné pri syntéze NK, sulfonamidy blokujú syntézu kyseliny tetrahydrofolovej, kofaktoru potrebného na syntézu purínových a pyrimidínových nukleotidových báz.

2.3.2.2 Plazmidy, transpozóny

Bakteriálne bunky môžu obsahovať molekuly DNA, ktoré nie sú viazané na jadrovú hmotu, nechromozomálne DNA molekuly – plazmidy. Nie sú nevyhnutné pre rast a prežívanie baktérií za normálnych podmienok, ale obvykle kódujú informácie, ktoré poskytnú za určitých podmienok pre baktériu výhodu. Kódujú syntézu niektorých proteínov, ktoré nukleoid nekóduje. Napr. prirodzene sa baktéria nenachádza v prostredí s ATB a nevyužíva plazmid s genetickou informáciou kódujúcou syntézu enzýmu rozkladajúceho ATB. Rastie za rovnakých podmienok ako baktérie neobsahujúce tento plazmid. Ak sa ale nachádza takáto baktéria v prostredí ATB, enzým jej poskytuje výhodu, tým, že ATB rozloží, inaktivuje a baktéria prežije, na rozdiel od iných, ktoré konkrétny plazmid neobsahujú.

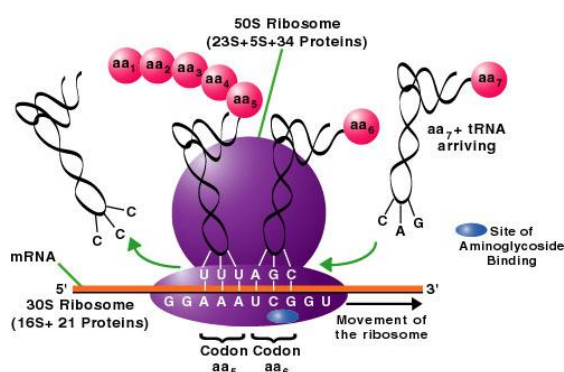
R plazmid: G-baktérie často obsahujú plazmid (R plazmid – plazmid rezistencie) obsahujúci gény kódujúce syntézu nástroja prenosu genetickej informácie z jednej bakteriálnej bunky na druhú - konjugačného pilusu aj nástroja rezistencie na ATB. Konjugačný pilus je schopný uskutočniť konjugáciu a preniesť existujúcu genetickú informáciu o rezistencii na ATB a o produkcii pilusu na ďalšie baktérie, čím dochádza k šíreniu rezistencie na ATB.

Transpozóny: úseky DNA, ktoré sú schopné premiestniť sa z jednej lokalizácie na inú na nukleotide alebo plazmide, sa nazývajú transpozóny. Na svojich koncoch kódujú enzýmy schopné vyštieknúť tento úsek - samých seba – z nukleoidu alebo plazmidu a opäť sa inkorporovať na inom mieste.

2.3.2.3 Ribozómy

Ribozómy bakteriálnej bunky sú zložené z rRNK a proteínov. Štrukturálne vytvárajú 2 podjednotky so sedimentačnou konštantou alebo jednotkou hustoty S (Svedbergova jednotka)

50S a 30S. Pri proteosyntéze sa vyskytujú spolu a tvoria ribozóm s hustotou 70S. Baktéria obsahuje približne 15 000 ribozómov. Zúčastňujú sa na proteosyntéze tým, že preberajú informáciu o type proteosyntézy a preložia ju do formy proteínov. mRNA sa prichytáva na 30S podjednotku a tRNA nesúca aminokyselinový kód na 50S. Mnohé antibiotiká účinkujú na úrovni poškodenia bakteriálnych ribozómov čím spôsobia syntézu nevhodných proteínov. Rozdielne sedimentačné konštanty u bakteriálnych ribozómov a ribozómov eukaryotických buniek poskytujú možnosť selektívneho pôsobenia antibiotík. Napr. tetracyklín sa reverzibilne viaže na 30S, makrolidy sa reverzibilne viažu na 50S a bránia predlžovaniu proteinového reťazca



Obr. 25. Bakteriálny ribozóm.

<http://labs.genomics.sinica.edu.tw/chwong/RNA%20as%20a%20Drug%20Target.htm>

2.3.2.4 Zásobné látky, granuly

Cytoplazmatické zásobné granuly (glykogénu, škrobu), volutínové granuly – metachromatické granuly (fosfátové granuly), sírové granuly (napr. u *Nocardie* alebo *Actinomyces izraeli*) Okrem významu v metabolizme baktérie majú význam diagnostický. Metachromatické granuly (napr. u *Corynebacterium diptheriae*) majú svoje meno podľa toho, že pri farbení je výsledná farba granúl odlišná od farby použitého farbiva a obvykle aj od okolia. Je to spôsobené chemickými reakciami fosfátových molekúl a použitých farbív (farbenie podľa Alberta).

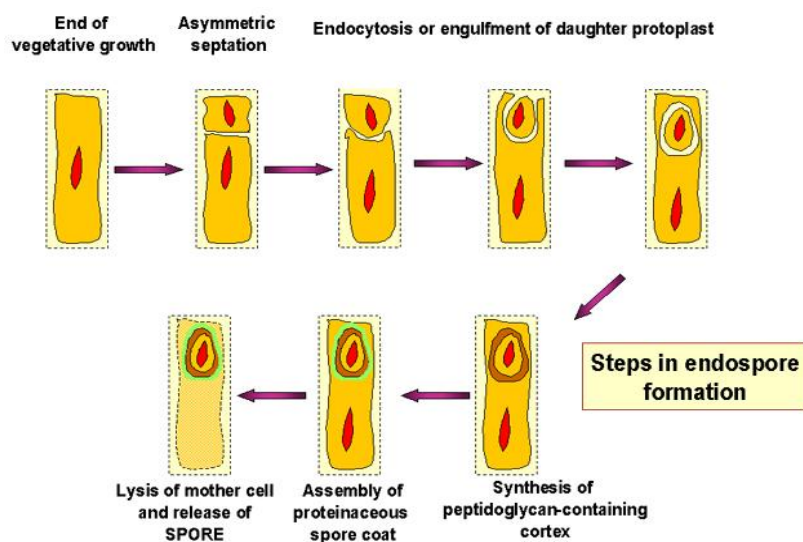
2.3.2.5. Endospóry

Predstavujú dormantné (kludové, spiace) formy života niektorých bakteriálnych druhov. Z medicínsky významných sú to niektoré G⁺ baktérie z rodu *Bacillus* a z rodu *Clostridium*. Predstavujú rezistentné formy života baktérie odolávajúce vysokým teplotám, vyschnutiu, dezinfekčným prostriedkom, vysušeniu. Ich rezistencia voči chemikáliám je podmienená

nepriepustnosťou obalov (cortex, kabát). Odolnosť voči vysokým teplotám je spôsobená obsahom dipikolinátov a osmotickou aktivitou kôry, ktorá spôsobuje dehydratáciu endospóry a tým jej rezistenciu voči vysokým teplotám a radiácii. Rezistencia spór voči fyzikálnym a chemickým podmienkam sa používa na kontrolu sterility nástrojov a kontrolu účinnosti nástrojov dekontaminácie.

Sporulácia je proces tvorby spóry z vegetatívnej bunky. Trvá približne 15 hodín. Je obvykle podmienená nedostatkami v optimálnom zložení prostredia, predovšetkým chýbaním uhlíka a dusíka. Pri premene dochádza k príjmu vápnika a syntéze kyseliny dipikolinovej.

- replikácia DNA
- vytvorenie membránového septa
- vytvorenie druhej vrstvy cytoplazmatickej membrány okolo jednej z DNA molekúl, ktorá bude súčasťou endospóry
- obidve cytoplazmatické membrány syntetizujú peptidoglykan do priestoru medzi nimi a vytvoria kortex.
- vápenaté soli kyseliny dipikolinovej sa inkorporujú do obalu spóry
- kortex je obkolesený proteínom podobným keratínu
- niekedy sa vytvorí exospórium – vonkajšia membrána zložená z lipidov a proteínov
- zvyšok vegetatívnej bunky sa rozpadne a endospóra sa uvoľní do prostredia



Obr. 26. Schéma sporulácie. http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell_envelope.htm

Germinácia spór

Spóry môžu prežívať celé éry až do doby, keď ich zmena vonkajších podmienok stimuluje ku premene na jedinú vegetatívnu bunku baktérie. Spóry samotné sú neškodné, pokiaľ nedôjde ku germinácii. Germinácia spór alebo ich transformácia na vegetatívnu bunku môže byť

podmienená napr. miernou teplotou alebo prítomnosťou alanínu. Po započatí germinácie spóra prijíma vodu, napučiava, stráca obaly a mení sa na vegetatívnu bunku identickú s tou, z ktorej vznikla. Význam spór spočíva v tom, že sa podieľajú na prenose niektorých vážnych ochorení:

- antrax - *Bacillus anthracis*
- tetanus - *Clostridium tetani*
- botulizmu - *Clostridium botulinum*
- splynová gangréna - *Clostridium perfringens*

Umiestnenie endospór vo vegetatívnej bunke má diagnostický význam. Pri Gramovom farbení sa nezafarbia (negatívne farbenie). Na znázornenie endospór v cytoplazme vegetatívnych buniek sa používa Wirtz Conklinovo farbenie.

Niektoré bakteriálne druhy vytvárajú spóram podobné štruktúry odlišné od endospór svojim vznikom, zložením, funkciou a významom. Exospóry – sú termostabilné spóry vznikajúce pučaním niektorých medicínsky nevýznamných bakteriálnych druhov. Cysty – sú na vyschnutie odolné, vytvárajú sa a existujú len vo vnútri vegetatívnych buniek niektorých nesporelujúcich baktérií. Conidiá – sú termolabilné asexuálne reprodukčné orgány vetviacich sa baktérií zo skupiny Actinomycetes.

2.3.3 Vonkajšie štruktúry

Niektoré baktérie môžu obsahovať štruktúry, ktoré sa nachádzajú externe od bakteriálnej steny, ale sú súčasťou baktérie a môžu byť nástrojom jej patogenity alebo virulencie.

2.3.3.1 Púzdro (glycocalyx, S vrstva)

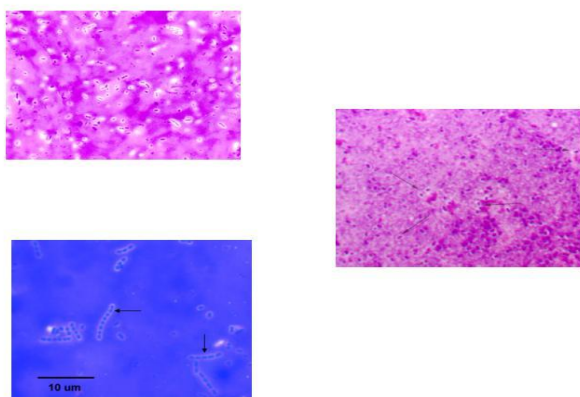
Takmer všetky baktérie produkujú v nadbytku extracelulárnu hmotu. Ak táto hmota pevne súvisí s povrchom bunkovej steny nazýva sa púzdro. Ak je len adherujúca, polymorfná, rôznej hrúbky alebo hustoty nazýva sa S vrstva. S výnikou *Bacillus anthracis*, ktorý vytvára peptidové púzdro, všetky ostatné baktérie produkujú polysacharidové púzdro alebo S vrstvu.. Jeden bakteriálny druh môže vytvárať niekoľko typov polysacharidových púzdier, ktoré sú potom základom pre rôzne antigénne typy bakteriálneho druhu (napr. *Streptococcus pneumoniae* sa vyskytuje až v 90 antigénnych typoch na základe rôznej chemickej štruktúry produkovaného púzdra). Polysacharidové púzdro je komplex opakujúcich sa relatívne chemicky jednoduchých štruktúr, ktoré majú antigénne vlastnosti. Polysacharidové púzdra sú tzv. na T bunkách nezávislé antigény, ktoré sú schopné stimulovať imunitnú reakciu organizmu priamo, bez účasti T lymfocytou, čo má svoje následky. Takáto odpoveď je krátkodobá a menej protektívna. Deti do 3. roku života vzhľadom na nezrelý imunitný systém nie sú schopné protektívnej imunitnej odpovedi a sú ohrozené opúzdrenými mikroorganizmami.

Povrchová extracelulárna vrstva nie je nevyhnutná pre rast in vitro a po niekoľkých generáciách sa schopnosť produkcie stráca. In vivo je baktéria schopná produkovať alebo nie extracelulárnu hmotu podľa toho, čo je výhodné pre jej prežívanie.

Úlohou väčšiny púzdiar a S vrstiev je, že sú nástrojom virulencie.

- Majú antifagocytárne vlastnosti – hydrofóbne skupiny . púzdra sa navzájom odpudzujú s hydrofilnými skupinami povrchu makrofágov. U zmiešaných infekcií, môžu opúzdrené kmene chrániť neopúzdrené pred fagocytózou. Hrubá vrstva extracelulárneho materiálu môže brániť vstupu antibiotika do baktérie a je potrebná vyššia koncentrácia antibiotika (napr. pri infekcii pľúc baktériou *Pseudomonas aeruginosa* u pacienta s cystickou fibrózou)
- Niektoré môžu byť nástrojom adherencie, slúžia ako adhezíny. (*Streptococcus mutans* – prichytenie sa na zubnú sklovinu a spôsobenie zubného kazu).
- Interakcia biofilmu, ktorý sa vytvára na umelohmotných alebo cudzích náhradných materiáloch (katetre, kĺbne a chlopňové náhrady) a ako adhezín pôsobiach extracelulárnych vrstiev (*Staphylococcus epidermidis*) môže spôsobiť kolonizáciu týchto materiálov podmienene patogénnymi mikroorganizmami.

Klinicky významné opúzdrené baktérie: *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*. Odlíšenie opúzdrených kmeňov bakteriálneho druhu od neopúzdrených je možné na základe mikroskopického preparátu podľa Burriho, dôkazom bobtnania púzdiar špecifickou protilátkou – Quellung reakcia, alebo aglutináciou pomocou špecifický antisér alebo latexovou aglutináciou. Opúzdrené kmene obvykle rastú v mukózných hlienovitých kolóniách.

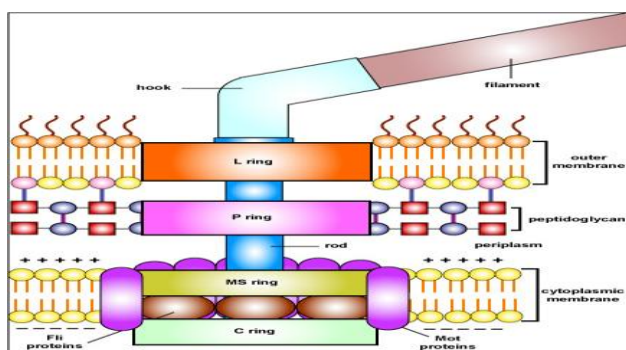


Obr.27. Burriho negatívne farbenie púzdiar – *E.coli*, *H. influenzae b*, *Streptococcus pyogenes*

<http://jeannette.tremele.nl/capsule-stain-results>

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab6/capstreplac.html>

2.3.3.2 Bičiky



Obr.28. Štruktúra bičika.

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig18.html>

Bičiky sú nástrojmi pohybu baktérií. Asi polovica známych bakteriálnych kmeňov je pohyblivá. Podstatou pohybu je rotácia bičika na základe protónového gradientu. Bičik môže rotovať v smere hodinových učičiek alebo proti smeru ručičiek, čo je spôsobené zmenami proteínu v bazálnom telese. Pohyb slúžiaci baktérii na premiestnenie sa do najvýhodnejšieho prostredia ako odovet' na stimul z prostredia sa nazýva taxis. Baktéria môže reagovať na podnety chmické – chemotaxis, svetelné – fototaxis, zmeny osmotického tlaku – osmotaxis, na vzduch – aerotaxis, na teplotu – termotaxis.

Štruktúra bičikov:

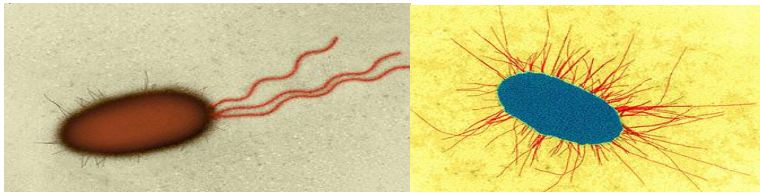
- vlákno – pevná helikálna štruktúra, ktorá vyčnieva z povrchu bunky. Je zložená z proteínu flagelín, ktorý vytvára helikálne reťazce a kôru. Obvykle táto kôra nie je obalená púzdom (s výnimkou *Vibrio cholerae* a *Bdellovibrio*). Proteín flagelín je podstatou bičikových H antigénov
- hák – je flexibilné spojenie medzi vláknom a bazálnym telesom
- bazálne teleso pozostáva z tyčinky a niekoľkých prstencov, ktoré upevňujú bičik do bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány.

Bičik baktérií nemá vnútorné fibrily (ako je tomu u eukaryotických buniek). Bazálne teleso funguje ako molekulárny motor, ktorý umožňuje rotáciu bička a jej pohyb

Usporiadanie bičikov na bakteriálnej bunke:

- monotrichálne – jediný bičik na jednom póle
- amfitrichálne – jeden bičik na každom póle
- lofotrichálne – viac bičikov na jednom alebo oboch pólach
- peritrichálne – bičiky na celom povrchu bunky

- axiálne vlákna – vnútorné bičíky – prítomné len u spirochét, pozostávajú z 2 až 100 axiálnych vlákien, ktoré sa šíria z obidvoch koncov baktérie



Obr. 29. Lofotrichálne bičíky a fimbrie.

<http://jpkc.njau.edu.cn/spwswx/cankao/ShowArticle.asp?ArticleID=314>

Prítomnosť bičikov a schopnosť pohybu môžeme dokázať kultiváciou v U rúrke, naočkovaním vpichom do agaru v skúmavke, u *Proteus mirabilis* znázornením Raussovho fenoménu plazivého rastu

2.3.3.3 *Fimbrie a pilli.*

Fimbrie sú mnohopočetné vlasovité útvary na povrchu bakteriálnej bunky. Názov fimbrie sa používa na akékoľvek nebičíkové vlasovité útvary. Názov pilli sa používa pre útvary G-baktérií spájajúce bakteriálne páry pri prenose genetickej informácie konjugáciu. Sú dlhšie a obvykle ich je len niekoľko na jednej bunke. Fimbrie sú menšie ako bičíky. Na povrchu bunky je obvykle niekoľko stoviek fimbrií peritrichálne umiestnených. Funkciou fimbrií je adhérenca bakteriálnej bunky k inej bunke (bakteriálnej, ľudskej alebo na povrch neživých materiálov). Adhérenca je špecifická a jej podstatou je interakcia len niektorých glukózových molekúl. Fimbrie na povrchu bunky sa môžu strácať a vytvárať v priebehu rastu a môžu meniť chemickú štruktúru adhezívnych molekúl a byť schopný adherovať na rôzne povrchy.. Fimbrie sú nástrojom virulencie u niektorých baktérií. Prítomnosť fimbrií u *E. coli* je nevyhnutná pre jej kolonizáciu močových ciest a odolávanie odplaveniu prúdom moču. Kmeny *Neisseria gonorrhoeae* bez fimbrií sú avirulnetné.



Obr. 30. Pillus. <http://jpkc.njau.edu.cn/spwswx/cankao/ShowArticle.asp?ArticleID=314>

Otázky ku skúške

Základná charakteristika mikroorganizmov, zaradenie do systému, rozdiel medzi eukaryotickou a prokaryotickou bunkou,

Štruktúra bakteriálnej bunky – obal (bunková stena, cytoplazmatická membrána)

Štruktúra bakteriálnej bunky – intracelulárne organely (nukleoid, ribozómy)

Štruktúra bakteriálnej bunky – povrchové štruktúry (bičíky, fimbrie, pilli)

Štruktúra bakteriálnej bunky – púzdro (štruktúra, význam, dôkaz)

Štruktúra bakteriálnej bunky – spóry (sporulácia, germinácia, dôkaz)

Význam znalosti štruktúry pre diagnostiku a odhad vlastností.

3 PATOGENITA A VIRULENCIA MIKROORGANIZMOV

Mikroorganizmy sa nachádzajú takmer v každom prostredí, ale len relatívne málo ich môže spôsobiť ochorenie človeka. Mnohé sú užitočné pri likvidácii odpadov, využití v priemysle, pri výrobe liekov a potravín. Predmetom lekárskej mikrobiológie sú mikroorganizmy, ktoré môžu vyvolať ochorenie človeka. Poznanie nástrojov mikroorganizmov, ktoré sú za to zodpovedné je prvým krokom k pochopeniu patogenézy ochorenia, k účinnej diagnostike a liečbe. Patogenita a virulencia sú pojmy, ktoré sa týkajú schopnosti mikroorganizmu vyvolať ochorenie.

Patogenita charakterizuje rozdiely medzi mikrobiálnymi druhmi. Je to vlastnosť kvalitatívna. Mikroorganizmus je schopný vyvolať ochorenie (niekedy len za určitých podmienok alebo nie). Obvykle je to vlastnosť geneticky podmienená.

Virulencia odzrkadľuje rozdiely medzi kmeňmi toho istého druhu. Je to vlastnosť kvalitatívna a hovorí ako agresívne - veľmi, rýchlo je mikroorganizmus schopný vyvolať ochorenie. Je mierou patogenity a charakterizuje ju infekčná dávka.

Aby patogénny mikroorganizmus vyvolal ochorenie musí byť schopný:

- *sa množiť v rezervoári, v ktorom prežíva pred infikovaním a po infikovaní jedinca

- *opustiť rezervoár a prichytiť sa v novom prostredí

- *kolonizovať napadnuté tkanivo

- *vyvolať tkanivové poškodenie prípadne aj reakciu človeka

Táto schopnosť je podmienená štruktúrou a metabolickými produktami mikroorganizmu. To či po expozícii mikroorganizmu vznikne infekčné ochorenie závisí, na jeho množstve a kvalite vrodenných a získaných, nešpecifických a špecifických imunitných obranných mechanizmov. Prejavy niektorých infekcií (predovšetkým vírusových) sú následkom tkanivového poškodenia spôsobeného imunitnými mechanizmami. Je to ako vo vojne. Ak nechceme, aby naša krajina bola okupovaná nepriateľom, bojujeme proti agresorovi aj za cenu často nenahraditeľného zničenia miest a ľudských strát. Ak organizmus nechce byť zahltý nekontrolovateľne sa množiacimi mikroorganizmami a skončiť letálne, imunitný systém bojuje aj za cenu vzniknutých zrastov po zápale, granulómov, fibróz, abscesov, tkanivových defektov.

Podľa schopnosti vyvolať infekciu delíme mikroorganizmy na:

- *nepatogénne – obvykle na základe geneticky podmienených, často štrukturálnych vlastností nie sú schopné vyvolať ochorenie u človeka

- *patogénne – u človeka bez špecifickej imunity vyvolajú pri dostatočne veľkej infekčnej dávke ochorenie

- *podmienečne patogénne – vyvolajú ochorenie, pokiaľ sú splnené niektoré podmienky (zlyhávanie nešpecifických imunitných mechanizmov, imunodeficity, metabolické poruchy, poruchy cirkulácie, stáza, cudzie telesá a pod.)

Boj človeka s prírodou prebieha aj tomto poli. Mnohé patogénne mikroorganizmy dnes nie sú hrozbou, pretože sa podarilo navodiť špecifickú imunitu proti nim, prípadne nimi vyvolané ochorenia eliminovať (poliomyelitída), či eradikovať (variola). Naproti tomu vďaka úspechom medicíny prežíva stále viac ľudí s postihnutím niektorého systému, čím sa rozširuje počet ochorení vyvolaných podmienečne patogénnymi mikroorganizmami (plesňové ochorenia, infekcie PK negatívnymi stafylokokmi...).

3.1 Mechanizmus vzniku ochorenia

Mikroorganizmus po úspešnom vyvolaní ochorenia u jedného jedinca má tendenciu prejsť na iného (obzvlášť, ak u neho vyčerpal všetky zdroje pre rast a rozmnožovanie). Mikroorganizmy majú vypracované nástroje nato, aby opustili telo infikovaného a vyvolali ochorenie opäť u ďalšieho jedinca. K tomu prispievajú aj procesy infikovaného jedinca zbaviť sa cudzieho mikroorganizmu (hnačka, kýchanie, kašľanie...). Prenos infekcie z infikovaného

na ďalšieho jedinca sa nazýva proces šírenia nákazy alebo epidemický proces.

3.1.1 Proces šírenia nákazy

Procesom šírenia nákazy a jeho ovplyvnením na rôznych stupňoch sa zaoberá epidemiológia. Mikrobiológia študuje vlastnosti pôvodcu nákazy a reakcie organizmu na jeho vniknutie do tela. Hlavnými článkami procesu šírenia nákazy je:

1. Prameň pôvodcu nákazy
2. Cesta prenosu pôvodcu nákazy
3. Vnímový jedinec

Prameňom pôvodcu nákazy je objekt, v ktorom prežívajú, prípadne sa v ňom rozmnožujú pôvodcovia infekčných ochorení. Môže ním byť človek, zviera, prípadne iný rezervoár (pôda, hmyz, strava, voda, infikovaný nástroj...)

Cesta prenosu pôvodcu nákazy z prameňa k vnímavému jedincovi sa môže uskutočniť niekoľkými spôsobmi a je ovplyvnená niekoľkými faktormi:

- lokalizáciou pôvodcu v prameni nákazy,
- vlastnosťami pôvodcu (predovšetkým odolnosťou voči vonkajším vplyvom),
- vstupnou bránou infekcie.

Tieto faktory zodpovedajú trom fázam prenosu:

- o vylúčenie pôvodcu nákazy,
- o jeho prežívanie vo vonkajšom prostredí (vehikulum prenosu),
- o vstupnou bránou infekcie.

K prenosu pôvodcu nákazy z prameňa na vnímavého jedinca môže dochádzať:

- priamo,
- nepriamo.

Priamy prenos sa uskutočňuje kontaktom infikovanej kože alebo sliznice so zdravou kožou alebo sliznicou vnímavého jedinca. Takýto prenos je typický pre prenos pohlavných ochorení.

Nepriamy prenos sa uskutočňuje prostredníctvom rôznych faktorov prenosu:

- ingesciou (kontaminovanou potravou, vodou...),
- inhaláciou (infekčných častíc, prachu...),
- inokuláciou (kontaminovanými nástrojmi, ihlami, infikovaným hmyzom),
- kontamináciou kože a slizníc.

Vnímový jedinec je konečným článkom procesu šírenia nákazy. V prípade uplatnenia sa nástrojov patogenity a virulencie mikroorganizmu (pri dostatočnej infekčnej dávke), ktorým

nezabránili nešpecifické a špecifické obranné mechanizmy, dôjde ku vzniku infekcie a ochorenia, čím sa vnímavý jedinec stáva možným prameňom pôvodcu nákazy.

Prerušenie cyklu prameň pôvodcu nákazy, cesta prenosu a vnímavý jedinec v ktoromkoľvek mieste má za následok zastavenie procesu šírenia nákazy. Na úrovni prameňa pôvodcu nákazy je to možné terapiou, dekontamináciou, eradikáciou. Na úrovni cesty prenosu dekontamináciou, izoláciou, karanténou a organizačnými opatreniami. Na úrovni vnímavého jedinca preventívnym alebo profylaktickým očkovaním, podávaním špecifickej terapie, profylaktickým podaním špecifických imunopreparátov.

Spolupráca mikrobiológa a epidemiológa je v procese šírenia nákazy viac ako formálna. Mikrobiológ prispieva k prerušeniu procesu šírenia nákazy presnou a rýchlou diagnostikou a identifikáciou pôvodcu nákazy, určením jeho patogénneho potenciálu, citlivosti na antibiotiká. Tiež môže na základe vyšetrenia špecifickej imunity identifikovať vnímavého jedinca, prípadne ohrozenú populáciu.

3.1.2 Typy infekcií

S výnimkou inokulácie a intoxikácie sa všetky mikrobiálne ochorenia človeka začínajú infekciou kože alebo sliznice.

Podľa ďalšieho priebehu dochádza k procesu:

- neinvazívnemu – baktérie priľnú na povrch sliznice, kde sa pomnožia a vyvolajú miestnu reakciu alebo produkciu toxínou vyvolajú celkové ochorenie organizmu. Po priľnutí na povrch sliznice preniknú baktérie do buniek a pomnožia sa v nich, vyvolajú ich poškodenie a tým aj poškodenie sliznice
- invazívnemu – prenikajú do submukózy, množia sa v podslizničnom tkanive, pričom môžu produkovať toxín. Po pomnožení sa rozšíria do celého organizmu – diseminácia.

3.1.3 Fázy vzniku ochorenia

Skôr ako vznikne klinicky zjavné ochorenie prebieha proces infikovania postihnutého niekoľkými fázami. Podľa účinnosti imunitného systému napadnutého jedinca, patogénneho potenciálu a virulencie mikroorganizmu sa môže tento proces zastaviť na ktorejkoľvek úrovni.

- Kolonizácia – adhézia – upevnenie mikroorganizmu na bunky sliznice alebo kože.
- Invázia – prienik mikroorganizmu do buniek sliznice a submukózy a prežívanie v nich.
- Diseminácia – prienik zo slizničných buniek do submukózy a do krvného riečiska a krvnou cestou do celého organizmu.

Podmienkou pre uplatnenie sa patogenity mikroorganizmu je:

- 1) kolonizácia a prežívanie v hostiteľskom organizme
- 2) schopnosť vyvolať poškodenie hostiteľa a imunitnú reakciu

Ad 1): Pre úspešnú kolonizáciu a rozmnoženie sa mikroorganizmu v organizme človeka je nutný:

- kontakt so sliznicou
- adherencia na cieľovú bunku
- odolávanie mechanickému odstráneniu
- boj o železo a nutričné faktory a ich využitie
- rezistencia voči vrodenným nešpecifickým imunitným mechanizmom
- únik pred špecifickými obrannými mechanizmami
- invázia hostiteľskej bunky a tkanív.

Ad 2): Poškodenie hostiteľa spôsobuje mikroorganizmus súčasťami svojej štruktúry, produktmi metabolizmu, a to buď priamo štruktúrami bakteriálnej bunky, toxínmi alebo vyvolaním obrannej reakcie so schopnosťou vyvolať imunopatologické alebo autoimunitné reakcie.

3.1.3.1 Kolonizácia a prežívanie

- Kontakt mikroorganizmu so sliznicou alebo kožou – mikroorganizmy majú nástroje, ktoré im umožňujú dostať sa do kontaktu s cieľovou bunkou. Je to napr. pohyb, ktorým pohyblivé baktérie môžu aktívne alebo chemotakticky postupovať smerom k slizničným bunkám, kde majú možnosť kontaktu. Iné mikroorganizmy môžu vďaka svojim enzýmom prejsť cez vrstvu hlienu, ktorá ich chráni pred pôsobením nepriaznivého prostredia. Veľmi tenké a pohyblivé baktérie (spirochéty) sa svojim šroubovicovitým pohybom zavrtávajú do kožných abrázií alebo do sliznice a prenikajú hlbšie do tkaniva.
- Adherencia a rezistencia voči mechanickému odstráneniu z povrchu kože je podmienkou prekonania niektorých nástrojov nešpecifickej imunity. Povrchové štruktúry mikroorganizmov, fimbrie, adhezíny a špecifické antigény mikroorganizmov sa spájajú so špecifickými receptormi cieľových buniek infikovaného tkaniva, čo je podstatou tkanivového tropizmu mikroorganizmov. Vytvára sa chemická väzba, ktorá odolá mechanickému odstraňovaniu cudzích mikroorganizmov (pohybu riasiniek, prúdu moču, peristaltike, slzeniu, kašľu). Príkladmi takýchto nástrojov adherencie sú proteín F *Str.pyogenes*, vlákniť hemaglutinín *Bordetella pertussis*, ktorý sa viaže na špecifický receptor riasiniek, adhezín fimbrií PII *Neisseria gonorrhoeae*, cholín viažuci proteín *Str.pneumoniae*. Schopnosť tvoriť

glykokalyx, osídľovať biofilm a rôzne chemické štruktúry uľahčuje adhérenciu mikroorganizmov (napr. štiepenie sacharózy na glukózu a tvorba dextranu umožňuje adhérenciu *Str. mutans* na zubnú sklovinu).

- Boj o železo a nutričné faktory podmieňuje schopnosť baktérií prežiť v organizme. Je priamo podmienená ich schopnosťou úspešne súťažiť o nutričné faktory a železo s fyziologickou flórou alebo makroorganizmom. Generačný čas baktérii *in vivo* je kratší ako *in vitro*, lebo *in vivo* musia bojovať o nutričné faktory, ktoré sú limitované. Mikroorganizmy o ne súťažia prostredníctvom transportných systémov alebo súčastí bunkovej steny, schopných viazať substráty a prenášať ich do bakteriálnej bunky. Príkladom je železo, ktoré je nevyhnutné pre rast baktérie aj ľudskej bunky. Baktérie využívajú siderofóry iných baktérií, alebo majú vlastné siderofóry, alebo sú schopné viazať transportné molekuly ľudského organizmu transferín, hemín, feritín (*Haemophilus influenzae*), ktoré potom nie sú k dispozícii makroorganizmu.

- Rezistencia mikroorganizmu voči nešpecifickým imunitným mechanizmom sa prejavuje predovšetkým ako zábrana fagocytózy, a to ako zábrana ingescie (pohltenie mikroorganizmu), a ako zábrana deštrukcie (lýzy) pohlteného mikroorganizmu. Napríklad, polysacharidové púzdro bráni pohlteniu baktérie, interferuje s tvorbou aktivujúcich enzýmov (napr. C3 konvertázy), mechanicky bráni opsonizácii protilátkami proti somatickým antigénom. Baktérie produkujú proteázy degradujúce komplexy komplementovej kaskády (C3b). Pred deštrukciou sa baktérie bránia umiestnením v endoplazmatických vakuolách, pred vytvorením fagolyzozómu únikom z fagozómu do cytoplazmy.

- Únik pred špecifickými imunitnými mechanizmami je sprostredkovaný produkciou enzýmov a zmenou antigénnej štruktúry mikroorganizmov (antikapsulárne IgG protilátky môžu pôsobiť ako opsoníny a naviazaním sa na štruktúry mikroorganizmu, napr. púzdra, zlepšovať účinnosť fagocytózy). IgG, IgA aj IgM sa viažu na adhezíny a fimbrie a blokujú ich prichytenie sa na hostiteľské bunky. IgM a IgG aktivujú komplementovú kaskádu. Produkcia IgA proteáz mikroorganizmom môže likvidovať účinnosť špecifickej imunity.

*IgA proteáza *H. influenzae* zabráni účinku špecifických slizničných IgA protilátok.

*Baktérie môžu unikať účinku protilátok zmenou antigénnej štruktúry a povrchových proteínov (*Neisseria gonorrhoeae*).

*Pri podobnosti antigénnej štruktúry mikroorganizmu s niektorými antigénmi ľudského tela nemusí byť baktéria rozpoznaná ako antigénna (cudzí) – (púzdra *Str. pneumoniae*).

*Antigény môžu byť prekryté hostiteľskými proteínmi (lactoferrin, fibronectin – *Str. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*) a imunitný systém ich nerozpozna ako cudzie.

*Baktérie majú na svojom povrchu proteíny viažuce Fc fragment protilátok, čím sa mikroorganizmus pokryje protilátkami, ale prostredníctvom Fc fragmentu, čím je zablokovávaná časť imunoglobulínu zodpovedná za naviazanie sa na imunokompetentné bunky, ktoré by mali zlikvidovať mikroorganizmus t.j. IgG už neplnia úlohu opsonínov (*Staphylococcus aureus*).

- Invázia buniek a tkanív je u niektorých mikroorganizmov sprostredkovaná molekulami adhezínov (invazíny), ktoré umožňujú endocytózu adherovaných baktérií (vstup *Haemophilus influenzae* cez hematoencefalickú bariéru) tvorbou pseudopódií bunky. Tú umožňuje polymerizácia a depolymerizácia aktínových vlákien slizničných buniek a vytvorením endocytických vakuol. Tým sú baktérie vnesené do prostredia s dostatkom nutričných faktorov.

3.1.3.2 Poškodenie hostiteľa

Faktory patogenity a virulencie mikroorganizmu schopné poškodiť hostiteľskú bunku sú štruktúry a proteíny produkované mikroorganizmami pôsobiace priamo alebo prostredníctvom obrannej reakcie, ktorej účinky vyvolajú poškodenie hostiteľskej bunky (imunopatologické následky)

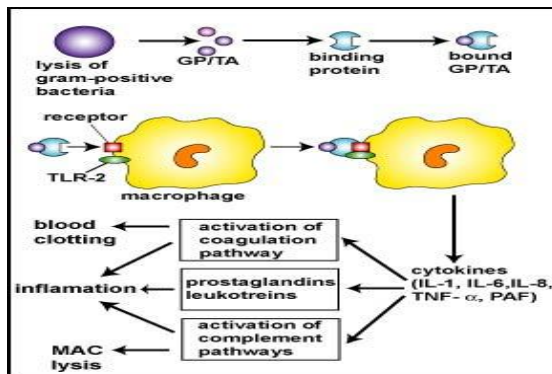
Sú to:

- súčasti bunkovej steny – LPS a endotoxín, kyseliny teichoová a fragmenty peptidoglykanu, kyselina mykolová. Pôsobia ako antigény, niektoré ako superantigény a PAMP. Vyvolávajú sekréciu cytokínov a spúšťajú brannú zápalovú reakciu s následným možným poškodením
- exotoxíny - AB toxíny, toxíny enzýmovej povahy. Ich pôsobenie je priame – deštruujú cieľové tkanivá

Endotoxín

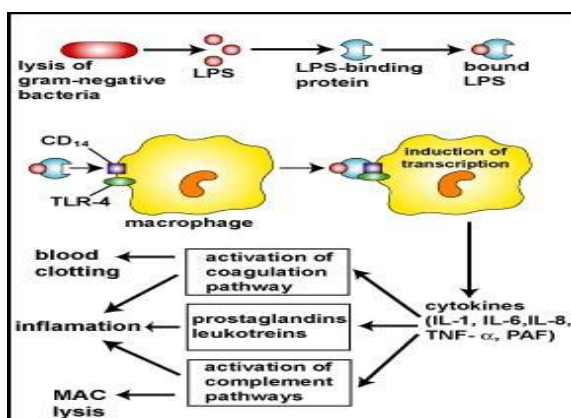
Gram negatívne baktérie uvoľňujú určité malé množstvo endotoxínu v priebehu svojho delenia. Veľké množstvá endotoxínu sú vyplavované v období bunkovej smrti a degradácie baktérie. Stupeň poškodenia súvisí s množstvom uvoľneného endotoxínu. LPS prítomný v krvi spôsobuje patofyziologické zmeny regulované cytotoxínmi. V priebehu infekcie G – baktériami uvoľnenie nízkych hladín endotoxínu vedie k zlepšeniu obranných mechanizmov stimuláciou zápalu, primeranej teploty a uvoľnením energetických zdrojov. Rozsiahle systémové infekcie však môžu viesť k nadmernému uvoľneniu endotoxínu (už pri nadmernej syntéze súčastí bakteriálnej steny a prítomnosti voľného endotoxínu v krvi – fulminantná forma infekcie *N. meningitidis*) s ťažkými klinickými príznakmi:

- teplota
- zápal
- tkanivové poškodenie
- respiračné zlyhávajúce
- poškodenie kapilár – vedúce k petéchiám, rašu, kapilárnemu presakovaniu, hypovolémii
- konsumpčná koagulopatia
- diseminovaná intravaskulárna koagulácia (DIC)
- hypotenzia
- zníženie kardiálneho výkonu
- ireverzibilný šok
- hnačka



Obr. 31. Mechanizmus poškodenia hostiteľskej bunky G⁺ baktériou.

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/diseases/staphaureus/gpta.html>

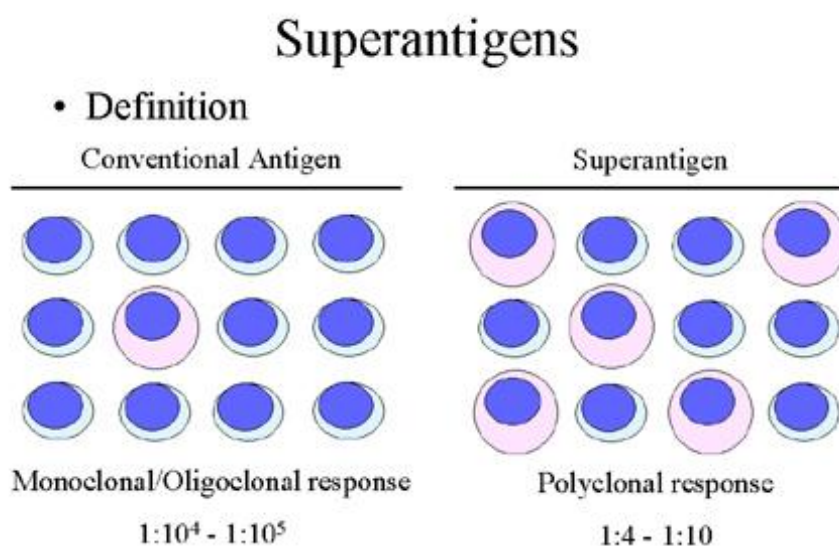


Obr. 32. Mechanizmus poškodenia hostiteľskej bunky G⁻ baktériou.

<http://student.ccbcmd.edu/~gkaiser/innate/lps.html>

Superantigény (toxín I typu)

Súčasťou bunkovej steny alebo produktov metabolizmu, ktoré reagujú s nadmerným počtom T4-lymfocytov. Bežné antigény sú pohltené APC bunkami, degradované na epitopy, ktoré sa potom v bunke viažu na MHC II molekuly a sú vynesené na povrch APC bunky, tu ich rozpoznávajú špecifické T4 lymfocyty svojimi TCR. Superantigény stimulujú priamo a nešpecificky T4 lymfocyty a aktivizujú tak nadmerné množstvo lymfocytov k produkcii cytokínov (IL-2, následne TNF alfa, IL 1, IL-8 a PAF). Klinicky sa produkcia IL-2 prejaví ako horúčka, nevoľa, zvracanie, hnačka, nevoľnosť. Vyplavenie ďalších cytokínov sa prejaví poškodením endoteliálnych buniek, akútnym respiračným zlyhávaním, DIC, šokom, mnohočetným zlyhávaním orgánov (podobne ako pri LPS šoku). Aktivácia autoreaktívnych T lymfocytov môže viesť k spusteniu autoimunitnej odpovede.



Obr. 33. Účinok superantigénu. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ag-6.jpg>

Príklady superantigénov sú

- toxic shock syndrom toxin 1 (TSST-1) *St. aureus*,
- streptokokový pyrogénny exotoxín (Spe) – produkovaný *St. pyogenes* bežne spôsobujúci šarlach, vyvolávajúci TSLS – toxic shock like syndrom., pravdepodobne zodpovedný za psoriázu
- stafyokokový enterotoxín
- niektoré antigény *M. tuberculosis*, rabies vírusu, HIV sú pravdepodobne tiež superantigénmi

Exotoxíny

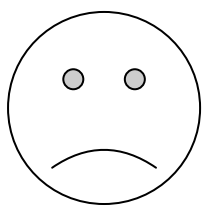
AB toxíny (toxín III typu) pozostávajú z dvoch častí. A časť (aktívna) a B (väzbová – binding). B časť viaže molekulu toxínu na receptorové miesto hostiteľskej bunky a určuje tkanivový tropizmus toxínu. Po tejto väzbe dochádza k vstupu aktívnej časti samotnej alebo celej molekuly toxínu do bunky. Časť A katalyzuje reakciu odštiepenia ADP ribosyl I skupiny od koenzýmu NAD a kovalentne ju viaže na proteín. To spôsobí porušenie normálnej funkcie proteínu a určuje typ poškodenia. Organizmus vytvorí neutralizujúce protilátky (antitoxín). Keď sa protilátka naviaže na toxín, tento nie je schopný sa naviazať na receptorové miesto špecifickej bunky. Antitoxín neutralizuje len voľné nenaviazané molekuly toxínu. Príklady AB toxínov sú:

- difterický exotoxín
- choleroxín
- enterotoxín A *Cl. perfringens*, *Bacillus cereus*,
- pertusický exotoxín
- exotoxín *Ps. Aeruginosa*
- shiga toxín
- toxín *B. antracis*
- botulotoxín
- tetanický toxín
- toxín *Helicobacter pylori*

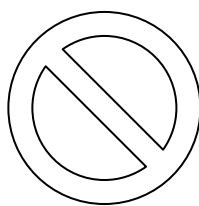
Účinky tohoto typu toxínov spôsobujú klinické syndrómy po dosiahnutí hraničnej hodnoty. Detailne sa o jednotlivých toxínoch dozviete v kapitolách zo špeciálnej bakteriológie. Tieto toxíny sú imunogénne, denaturovateľné a neutralizovateľné. Voči mnohým sa úspešne očkuje používaním anatoxínov (toxoidov). Pôsobením fyzikálnych a chemických účinkov môže dôjsť k denaturácii toxínov, čím stratia svoje toxické vlastnosti, ale zachovávajú si antigénne vlastnosti. Takýto postup má využitie pri výrobe očkovacích látok.

Anatoxín, toxoid - látka podobná toxínu, ktorá má zachované antigénne vlastnosti ale stratila toxické vlastnosti. Po aplikácii do organizmu vyvolá tvorbu protilátok, ktoré chránia proti toxínu, zabraňujú toxickému účinku – neutralizujú pôsobenie toxínu.

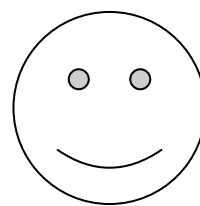
Antitoxín – protilátka proti toxínu.



toxín



antitoxín



anatoxín

Toxíny enzýmovej povahy (toxín II typu) – sú enzýmy, ktoré poškadzujú bunkové membrány hostiteľských buniek. Ich účinok sa prejaví poškodením buniek určitého tkaniva a je priamo úmerný množstvu uvoľneného toxínu produkovaného v priebehu bakteriálneho metabolizmu. Príklady toxínov II. typu:

- exotoxíny A *Cl. perfringens* – kolagenáza, lecitináza, hyaluronidáza
- leukocidín – *St. aureus*, *Str. pyogenes*
- exotoxín B *Str. pyogenes* – proteáza spôsobujúca nekrotizujúcu fasciitídu
- elastáza *Ps. aeruginosa*
- hemolyzín, proteáza, DNáza, streptokináza produkované *Str. pyogenes* deštruujú zodpovedajúce tkanivá a spôsobujú zápal
- pneumolyzín *Str. pneumoniae* poškodzuje riasinkový epitel.

Niektoré mikrobiálne antigény svojou podobnosťou s antigénmi hostiteľskej bunky môžu spôsobiť autoimunitné ochorenia. Nimi vyvolané protilátky skrížene reagujú s antigénmi ľudského tela, viažu sa s ich epitopmi a vyvolajú zápalovú reakciu proti vlastnému tkanivu alebo aktivizujú CTL autoreagujúce cytotoxické T lymfocyty s podobným následkom. Táto problematika je súčasťou kapitoly všeobecnej a špeciálnej imunológie.

4 BAKTERIÁLNA GENETIKA

Pre baktérie patriace medzi prokaryotické organizmy je charakteristické, že ich DNA predstavuje genetický materiál (genofond)

4.1 Makromolekula DNA

Je dvojvláknová, uzaviera sa do kruhu, je zložená asi z $4 \cdot 10^6$ nukleotidových párov a dlhá približne 1,4 mm, čo je asi 1000 krát viac, ako je dĺžka vlastnej bunky. Z toho dôvodu vytvára molekula DNA viac ako 50 slučiek. Tvoria ju dva komplementárne reťazce. Najmenej

v dvoch bodoch sa pripája k plazmatickej membráne. Z genetického hľadiska vytvára 1 bakteriálny chromozóm a asi o 1000 krát menšie plazmidy. Plazmidy sa replikujú nezávisle od chromozómu a nesú gény, ktoré nie sú pre bunku nevyhnutné, len doplnkové. Molekula DNA nie je od cytoplazmy oddelená jadrovou membránou a neviažu sa na ňu históny. Bakteriálna bunka je haploidná, ale pri prenosoch genetického materiálu z donorovej na recipientnú bunku môže byť i čiastočne dočasne diploidná. Základnou stavebnou jednotkou všetkých nukleových kyselín je **nukleotid**.

Nukleotid je zložený z jednej dusíkatej bázy (purínovej alebo pirimidínovej), z jedného monosacharidu – pentózy (ribózy alebo deoxyribózy) a zvyšku kyseliny fosforečnej. Pomocou špecifických enzýmov sa navzájom viažu nukleotidy do polyribonukleotidového alebo polydeoxyribonukleotidového reťazca. Fosfodiesterickou väzbou sa spojí pentóza jedného nukleotidu s fosfátovou skupinou druhého nukleotidu.

Nositeľom genetickej informácie o dedičných znakoch a vlastnostiach prokaryotických organizmov je DNA. V nej zapísaná informácia sa odovzdáva z materskej bunky do bunky dcérskej. Aby nedochádzalo v priebehu amitózy k postupnej strate informácií, každá molekula DNA sa musí pred bunkovým delením zdvojiť – replikovať.

Replikácia DNA prebieha z jedného miesta cirkulárneho chromozómu a šíri sa oboma smermi, kruh ostáva uzavretý. Pri tomto procese sa uplatňuje DNA polymeráza, ktorá viaže nové komplementárne pripojené nukleotidy a vytvorí nový reťazec DNA. Replikáciou vznikajú z jednej molekuly DNA dve dvojvláknové molekuly DNA. Každá z týchto dvoch molekúl DNA obsahuje jeden pôvodný a jeden novosyntetizovaný polynukleotidový reťazec.

4.2 Proteosyntéza

Na všetkých miestach v bunke, kde sa nachádza DNA (bakteriálny chromozóm a extrachromozómový plazmid) prebieha transkripcia – prepis genetickej informácie, následne jej translácia – preklad na ribozómoch v cytoplazme a syntéza bielkovín. Transkripciou (prepisom z DNA) vznikajú všetky typy RNA. Pri transkripcii sa uplatňuje RNA polymeráza, ktorá viaže RNA nukleotidy do polynukleotidového reťazca. Transkripciou štrukturálnych génov DNA vzniká polygénna - **mRNA** a následne bielkoviny. Transkripciou génov pre RNA vzniká **tRNA** a **rRNA**.

Ribonukleové kyseliny u prokaryotických organizmov sú vždy jednovláknové. Nukleová mRNA sa v cytoplazme na ribozómoch (rRNA a bielkovina) translatuje do poradia aminokyselín. Po translácii sa rozpadá. Transkripciou štrukturálnych génov DNA sa znovu

tvoria nové molekuly mRNA. Translácia prebieha na zreľých ribozónoch v cytoplazme, na ktorých je prítomná mRNA. Ku kodónu mRNA sa komplementárne viaže antikodón tRNA, ktorá naviazala na seba príslušnú aminokyselinu. Aminokyseliny sa zaraďujú do reťazca za sebou a vzájomne sa viažu peptidickou väzbou. Transferová RNA po splnení svojej úlohy sa uvoľní, vráti sa späť do cytoplazmy, aby znovu vyhľadala takú istú aminokyselinu a opäť ju transportovala k miestu proteosyntézy bielkovín. Počet tRNA zodpovedá počtu aminokyselín v cytoplazme, ktoré sa zúčastňujú na proteosyntéze.

Regulácia proteosyntézy

Jeden z najznámejších spôsobov regulácie proteosyntézy je riadenie transkripcie indukciou a represiou. Niekoľko štrukturálnych génov, ktoré funkčne spolu súvisia sa často spájajú do funkčných úsekov, ktoré nazývame operóny (enzýmy jednej metabolickej dráhy). Aktivita všetkých štrukturálnych génov operónu je podľa potreby bunky riadená len jedným regulačným génom. Operón má niekoľko častí. Začiatok transkripcie, kde sa viaže RNA polymeráza sa označuje ako promotor. Nasleduje operátor, na ktorý sa môže naviazať represor (bielkovina), ktorý sa tvorí podľa regulačného génu. (na inom mieste DNA). Operón tvorí ďalej niekoľko štrukturálnych génov a ukončenie transkripcie (odpojenie RNA – polymerázy) zabezpečuje terminátor. Skupina štrukturálnych génov operónu sa transkribuje do jednej molekuly mRNA, ktorá sa enzymaticky strihá na časti, ktoré zodpovedajú jednotlivým génom operónu. Tak z jednej molekuly mRNA po translácii vznikajú viaceré proteíny.

NEGATÍVNA REGULÁCIA:

gén je zablokovaný represorom, ktorý sa naviazal na operátor a znemožňuje transkripciu štrukturálnych génov = represia. Uvoľnenie operátora je možné pôsobením induktora (napr. substrát metabolizmu) na represor = indukcia alebo derepresia.

POZITÍVNA REGULÁCIA:

gén je stále aktívny.

4.3 Zmena genetickej informácie

Ak by bola replikácia DNA vždy bezchybná, nebolo by možných zmien v DNA a v dôsledku toho by nenastali zmeny dedičných vlastností, nemohla by vzniknúť genetická variabilita a v konečnom dôsledku ani biologická evolúcia. Gény v DNA sú usporiadané lineárne – za sebou (*Escherichia coli* asi 4500 génov). Súbor génov v bunke sa nazýva genóm a je u prokaryotických organizmov synonymom genotypu eukaryotických organizmov. Genóm bakteriálnej bunky nie je stály, môže sa zmeniť. Dve základné možnosti zmeny genetickej informácie sú mutácie a rekombinácie.

4.3.1 Mutácie

Dedičné zmeny, ktoré vznikajú v DNA vplyvom mutagénnych faktorov sa nazývajú mutácie.

Spontánne mutácie –

náhodne vznikajú bez zámerného zásahu človeka. Ich početnosť je pomerne nízka, ale vplyvom zhoršujúceho životného prostredia vzrastá. Pravdepodobnosť ich vzniku priamo závisí od rozsahu genómu a trvania bunkového cyklu (vysoká u mikroorganizmov).

Indukované mutácie -

zámerne vyvolané človekom. Dnes sa cieľené zmeny genetickej informácie robia v rámci génového inžinierstva a k ovplyvneniu genetického materiálu dochádza vnášaním cudzorodých DNA pomocou plazmidov alebo lipozómov.

Génové (bodové) mutácie -

prebiehajú na molekulárnej úrovni DNA. Mení sa pri nich kvalita génov. K tejto zmene kvality génov dochádza počas replikácie alebo opravného mechanizmu, pričom sa do niektorého kodónu (trojica za sebou nasledujúcich nukleotidov) inkorporuje nesprávny nukleotid. Takýto kodón väčšinou (nie vždy) kóduje inú aminokyselinu, ktorá sa inkorporuje do bielkoviny a podľa toho v akej je pozícii môže viesť až k jej nefunkčnosti.

4.3.2 Rekombinácie

Mechanizmy prenosu genetických informácií - bakteriálna bunka môže v bakteriálnej populácii získavať gény od iných buniek rekombináciou pomocou troch mechanizmov (transformácia, konjugácia a transdukcia). Výsledkom týchto mechanizmov je získanie genetickej rozmanitosti v genofonde populácií.

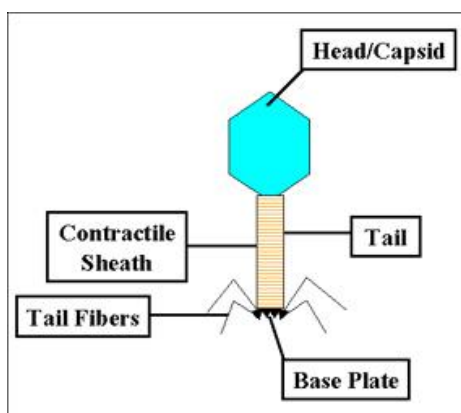
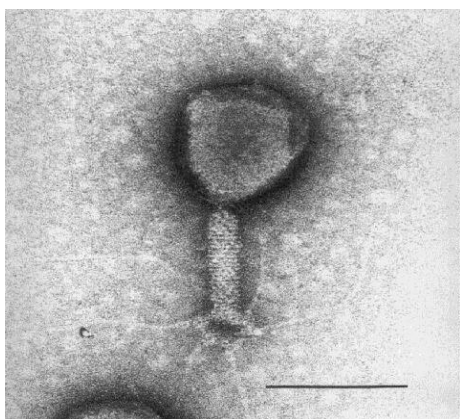
Transformácia – je najznámejším a najstarším mechanizmom genetického prenosu. Pri transformácii vstupuje do bunky krátky úsek DNA. Úsek DNA sa môže izolovať za

laboratórnych podmienok (chemickou extrakciou) alebo prirodzeným rozpadom bunky. Transformovaná bunka a jej potomstvo majú novú informáciu, ktorá sa prejavuje novými vlastnosťami. Angličan Griffiths sa v roku 1928 svojim experimentom najbližšie priblížil k vysvetleniu jej podstaty. O baktérii *Streptococcus pneumoniae* vieme, že v disociačnej fáze M tvorí polysacharidové púzdro a je virulentný. Vo fáze S púzdro netvorí a je avirulentný. Pripravením suspenzie zo *Streptococcus pneumoniae* vo fáze M (virulentný – usmrtený) a fáze S (avirulentný – živý) a jej podaním bielym myškám - biele myšky uhynuli. Prečo biele myšky uhynuli, keď bol virulentný kmeň podaný usmrteným. Prečo po naočkovaní infekčného materiálu odobratého z uhynutých myšiek vyrástli na kultivačných pôdach virulentné aj avirulentné kmene *Streptococcus pneumoniae*? Griffiths sa najbližšie k súčasnému vysvetleniu transformácie dostal v tom bode, keď uvažoval, že zmenu avirulentného kmeňa na virulentný nespôsobuje polysacharidové púzdro, ale špecifický proteín virulentného kmeňa. Dnes vieme, že je to DNA. Schopnosť bunky, reagovať na cudziu DNA a prijať ju nie je jej stálou vlastnosťou. Môže ju prijať v čase exponenciálneho rastu (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*).

Konjugácia – pri konjugácii sa prenáša genetická informácia z jednej bunky do druhej prostredníctvom plazmidu. Tzv konjugatívny plazmid sa preniesie do bunky pomocou špeciálneho pillusu. Pillusy sú to útvary na povrchu bakteriálnej bunky. Spájajú baktérii do párov a podieľajú sa na prenose genetickej informácie konjugáciou. Ich tvorba je často kódovaná v génoch plazmidov spolu s vlastnosťou, ktorá sa prenáša. Táto medzibunková interakcia predstavuje jednosmerný prenos z donorovej bunky na recipientnú. U enterobaktérií sa plazmidy nazývajú R faktory (Resistance Transfer Factor). Ak sa napr. v črevnom trakte nachádza *Escherichia coli* s R faktorom, ktorý determinuje rezistenciu na jeden alebo viac antibiotík, stávajú sa rezistentnými i iné mikroorganizmy z čeľade Enterobacteriaceae prítomné v črevnom trakte a tie môžu rezistenciu odovzdávať ďalej. Bunky, ktoré nesú plazmidy sa označujú ako F^+ a tie, ktoré ho prijímajú ako F^- . V praxi sa izolované a rezistentné kmene na antibiotiká vyšetrujú na výskyt R – faktora, prípadne na frekvenciu prenosu a jeho štruktúru. Problematika R-faktorov sa stáva závažným medicínskym problémom a boli už popísané epidémie spôsobené multirezistentnými kmeňmi na antibiotiká, pričom rezistencia bola získaná plazmidmi. Dnes táto problematika získava na význame v súvislosti s výskytom multirezistentných nozokomiálnych kmeňov a prenosom rezistenice medzi rodovo (Enterokoky a stafylokoky)

Transdukcia – pri transdukcii krátky úsek DNA vstupuje do bunky prostredníctvom vírusu (u baktérií prostredníctvom bakteriofága). Časť DNA, ktorú vírus (bakteriofág) zabudoval do

svojej štruktúry omylom pri infekcii inej bakteriálnej bunky môže byť prenesená do inej bakteriálnej bunky, ak ju infikuje. Prostredníctvom tohoto prenosu genetickej informácie získava napr. baktéria *Corynebacterium diptheriae*, pôvodca záškrtu (diftérie), schopnosť tvoriť difterický toxín. Len tie bunky *Corynebacterium diptheriae*, ktoré majú vo svojom vnútri fága – (sú infikované bakteriofágom nesúcim gén pre produkciu difterického toxínu) sú schopné tvoriť difterický toxín.. Bakteriofág infikuje baktériu len nukleovou kyselinou, ktorá sa replikuje a môže dôjsť k rekombinácii medzi nukleovou kyselinou baktérie a nukleovou kyselinou fága.



Obr. 34. Elektrónový snímok a schéma bakteriofága.

<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage-1.jpg>

<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/bactphage-bw.jpg>

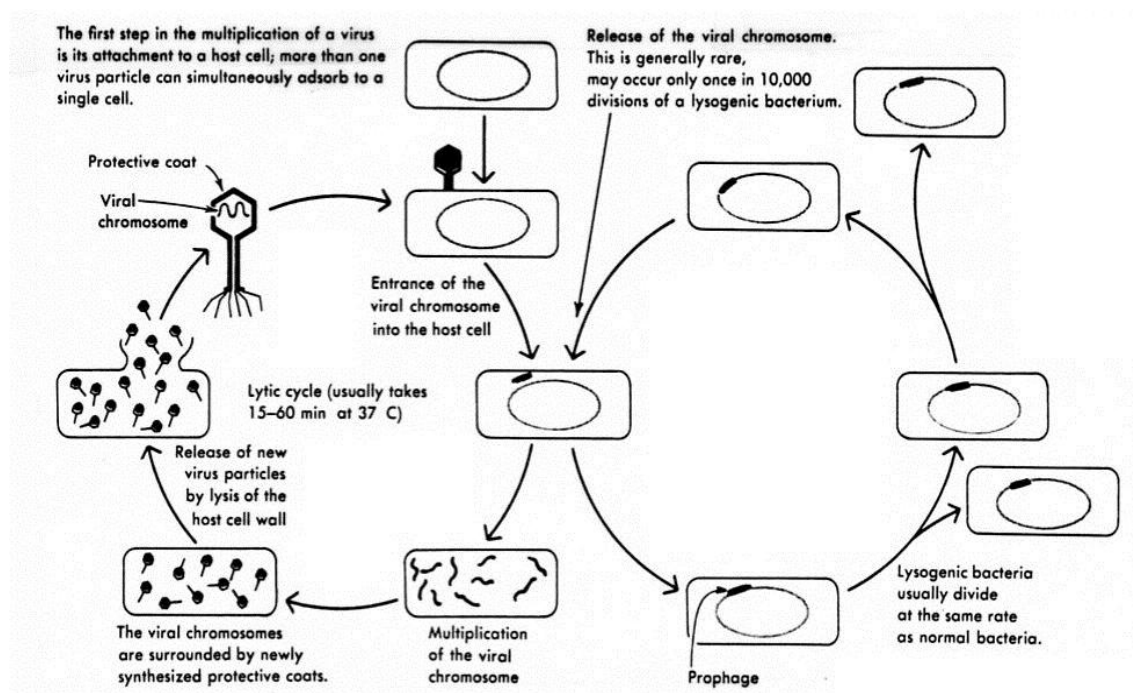
4.3.3 Životný cyklus bakteriofága

Bakteriofág je vírus bakteriálnej bunky, ktorý využíva energetický systém a syntézu proteínov bakteriálnej bunky. Je to intracelulárny parazit na genetickej úrovni.

Cyklus lytický – bakteriofág sa po napadnutí bakteriálnej bunky sa adsorbuje na jej bunkovú stenu koncom svojho bičíka. Cez kanálik bičíka prechádza jeho nukleová kyselina (DNA

alebo RNA) do baktérie. Bielkovinový obal ostáva na povrchu baktérie. Bakteriofág prechádza do vegetatívneho štádia. V tomto štádiu sa replikujú nukleové kyseliny podľa typu bakteriofága. Tvorbou bielkovinového obalu špecifického pre fága vzniká infekčný fág, ktorý po lýze bunky napáda ďalšie baktérie.

Cyklus lyzogénny - fágová DNA alebo RNA je integrovaná do nukleovej kyseliny baktérie a vznikne temperovaný fág. K lýze bunky nedochádza. Po viacerých generáciách dôjde ku konverzii a cyklus sa dokončí ko pri lytickej infekcii. Lyzogénia je stálym dedičným znakom kmeňa.



Obr. 35. Životný cyklus bakteriofága. http://textbookofbacteriology.net/phage_2.html

4.3.4 Transpozóny

Transpozóny sú transponovateľné úseky DNA, ktoré sa môžu v genóme hostiteľa premiestňovať z miesta na miesto (v nukleotide alebo v plazmide). Transpozóny na svojich koncoch kódujú enzýmy, ktoré sú schopné vystrihnúť úsek DNA z nukleotidu alebo plazmidu a opäť ho inkorporovať na iné miesto. V praxi to môže znamenať premiestnenie genetickej informácie, kódujúcej enzýmy určitej metabolickej dráhy (operón) na iné miesto v genóme a jeho expresiu v závislosti od vonkajších podmienok a zdrojov nutričných faktorov.

5 FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANIZMOV

Dôležitou súčasťou všeobecnej mikrobiológie je fyziológia mikroorganizmov. Študuje spôsoby výživy, získavanie energie, metabolizmus, rast a rozmnožovanie, pohyblivosť. Chemické zloženie mikroorganizmov nie je veľmi odlišné od chemického zloženia iných živých organizmov. Z toho vyplýva, že mikroorganizmy potrebujú na zachovanie svojej existencie tie isté látky ako iné živé organizmy, pričom zloženie bakteriálnej bunky závisí aj od prostredia, v ktorom sa nachádza (chemického zloženia kultivačných pôd a fyzikálno-chemických podmienok kultivácie). Mikroorganizmus sa líši od iných živých organizmov len tým, že všetky prejavy charakteristické a typické pre živé organizmy vykonáva len jedna bunka.

5.1 Metabolizmus baktérií

Premena látok a získavanie energie - metabolizmus – sa u mikroorganizmov uskutočňuje dvoma biochemickými procesmi. Metabolické procesy zahŕňajú súčasne pochody asimilačné – syntetické (anabolizmus), pri ktorých vznikajú jednotlivé zložky bakteriálnej bunky a pochody, pri ktorých tieto zložité látky sa štiepia na jednoduchšie – pochody disimilačné (katabolizmus). Energia uvoľnená pri katabolizme vo forme molekuly adenosíntrifosfátu (ATP) obsahuje dve makroergické väzby, ktoré sú okamžitým zdrojom pre pochody anabolizmu. Väčšina metabolických procesov je katalyzovaná enzýmami, ktoré k svojmu účinku často vyžadujú ďalšie molekuly – kofaktory. Kofaktorom môžu byť jednoduché ióny kovov (vápnika, horčíka ...) alebo zložité organické molekuly. Pri syntetických procesoch bunka rastie a rozmnožuje sa. Pri disimilačných, ak sú v prevahe, bunka sa znižuje až odumiera. Jedným z dôležitých faktorov pre tieto pochody je účasť kyslíka. Na rozdiel od živočíšnej bunky, nie všetky baktérie ho striktne pre svoj život vyžadujú.

5.1.1 Baktérie podľa náročnosti na prítomnosť kyslíka

Podľa náročnosti na prítomnosť kyslíka poznáme baktérie :

aeróbne (obligátne aeróbne, striktne aeróbne)

žijú len v prítomnosti kyslíka. Typ metabolizmu je
oxidatívna fosforylácia (respirácia).

anaeróbne (obligátne anaeróbne, striktne anaeróbne)

žijú len bez prístupu kyslíka, ktorý je pre ne toxický.
Typ metabolizmu je fermentácia.

fakultatívne anaeróbne –

sú to aeróbne mikroby, ktoré sú schopné žiť i bez prítomnosti kyslíka. Typ metabolizmu je fermentácia a respirácia.

mikroaerofilné (kapnofilné)

táto skupina baktérií rastie v prostredí so zníženým obsahom kyslíka a zvýšenou tenziou kyslíčnika uhličitého. Typ metabolizmu je fermentácia.

anaeróbne aerotolerantné -

rastú v prítomnosti kyslíka, ale jeho prítomnosť má na ich rast negatívny vplyv. Typ metabolizmu je fermentácia.

Toto rozdelenie baktérií podľa náročnosti na plyné prostredie má význam v laboratórnej diagnostickej praxi.

5.1.2 Zdroje energie a uhlíka pre bakteriálnu bunku

Uvoľnenie energie je pri oxidácii doprevádzané uvoľnením elektrónov a ich zachytením na iné molekuly (nosiče). Strata elektrónu sa považuje za **oxidáciu**, prijatie elektrónu sa považuje za **redukciu**. Pri oxidácii organických molekúl sa obyčajne stratí elektrón spolu s protónom vo forme atómu vodíka, a preto sa takáto oxidácia nazýva **dehydrogenácia**. V baktériách sa elektróny prenášajú na molekuly, ktoré sú lokalizované v cytoplazmatickej membráne. Podľa **zdroja uhlíka** delíme baktérie do dvoch skupín. Prvú skupinu tvoria baktérie, pre ktoré je zdrojom uhlíka oxid uhličitý – **autotrofné baktérie**. Druhú skupinu tvoria baktérie, ktoré získavajú uhlík rozkladom organických látok – baktérie **heterotrofné**. Väčšina baktérií získava energiu chemicky - oxidáciou redukovaných látok. Pre patogénne (choroboplodné baktérie) sú zdrojom energie látky organické. U mnohých baktérií je možné rôzne kombinovať získavanie energie a uhlíka. Lekársky dôležité baktérie zaradíme medzi baktérie chemoheterotrofné, resp. chemoorganotrofné, ktoré rozkladom organických zlúčenín získavajú nielen energiu, ale aj uhlík.

5.1.3 Katabolické procesy baktérií

Metabolické procesy, pri ktorých sa uvoľňuje energia sa nazývajú katabolické. Existujú dva základné katabolické procesy v metabolizme baktérií: **fermentácia a respirácia**.

Fermentácia (kvasenie)

Je to oxidačný proces, pri ktorom organická molekula slúži ako darca elektrónov. Organickou látkou je najčastejšie sacharid, z ktorého sa elektróny prenášajú na inú organickú molekulu. Kyslík sa pri fermentácii neuplatňuje, je to proces anaeróbny. Kvasenie glukózy sa nazýva **glykolýza**. Konečným príjemcom elektrónov pri glykolýze je kyselina pyrohroznová, ktorú rôzne druhy baktérií menia na radu rôznych produktov (kyselina mliečna, octová, maslová). Produkty fermentácie sa využívajú na identifikáciu baktérií v rámci dôkazu ich biochemických vlastností.

Respirácia u baktérií

Je to proces získavania energie, pri ktorom sa elektróny uvoľnené oxidáciou prenášajú na tzv dýchací reťazec. U baktérií je dýchací reťazec umiestnený na cytoplazmatickej membráne. Konečným prijímateľom elektrónov môže byť kyslík (aeróbne dýchanie) alebo iná molekula ako nitrát, sulfát .. – (anaeróbne dýchanie). Baktérie, ktoré získavajú energiu dýchaním využívajú tiež glykolýzu. Pri aeróbnej respirácii na rozdiel od kvasenia je pyruvát v citrátovom cykle úplne oxidovaný na kyslíčnik uhličitý a vodu a uvoľnené elektróny a protóny sú prenášané k dýchaciemu reťazcu. Zdrojom elektrónov sú nielen cukry, ale i lipidy a bielkoviny. Aeróbnou respiráciou sa získa viac molekúl ATP, ako pri fermentácii. Je dôležité upozorniť na baktérie, ktoré žijú ako obligátne intracelulárne parazity a sú v celom svojom metabolizme závislé na energetickom metabolizme hostiteľskej bunky (chlamýdie). Chlamýdiám chýbajú potrebné enzýmy napr. v tvorbe ATP.

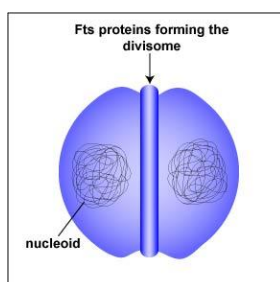
5.1.4 Biosyntéza – anabolizmus

Makromolekuly sa syntetizujú zo základných stavebných látok: aminokyselín, purínov a pyrimidínov, jednoduchých cukrov, glycerolu a mastných kyselín. Tieto stavebné látky vznikajú počas katabolických procesov metabolizmu slúžiacich k získaniu energie. Zdrojom uhlíka pre heterotrofné organizmy, medzi ktoré patria i patogénne baktérie, sú organické zlúčeniny. Nízkomolekulárne zdroje uhlíka (monosacharidy a disacharidy) sa do mikrobiálnej bunky dostávajú priamo, vysokomolekulárne (škrob, glykogén) musia byť najskôr rozštiepené extracelulárnymi enzýmami – hydrolázami. Niektoré klostrídie a enterobaktérie sú schopné viazať dusík za anaeróbnych podmienok a nahradiť nedostatok

vhodných dusíkatých látok. Väčšinou je však pre baktérie zdrojom dusíka amoniak, ktorý vzniká pri rozklade bielkovín, resp. aminokyselín.

5.2 Rast a rozmnožovanie baktérií

V optimálnom prostredí narastajú bakteriálne bunky do určitej veľkosti, a potom sa delia. Charakteristické pre ne je nepohlavné – pričné delenie v období maximálneho rastu – v exponenciálnej fáze. Pred rozdelením materskej bunky, sa najprv rozdelí jadrová hmota a z plazmatickej membrány vytvorená dvojvrstvová priehradka zosilnie. Tá zodpovedá po rozštípení za to, že obe dcérske bunky majú svoju priečnu stenu. U niektorých baktérií sa bunky úplne neoddelia od seba, ale ostávajú spojené jemným mostíkom (streptokoky a streptobacily). U kokovitých baktérií sa môže priehradka vytvárať v niekoľkých na seba kolmých rovinách – vznikajú pravidelné útvary (tetrakoky a sarcíny), alebo nepravidelné zhluky (stafylokoky).



Obr. 36. Pričné delenie bakteriálnej bunky

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/ftsring.html>

Generačný čas (čas potrebný na jeden deliaci cyklus) baktérií in vitro je rôzny. Charakteristickou vlastnosťou je to, že rýchlosť množenia baktérií podmienená metabolizmom je oveľa intenzívnejšia ako u buniek vyšších organizmov. Vznik novej generácie buniek *Escherichia coli* sa pohybuje v rozpätí 15-20 minút, u *Mycobacterium tuberculosis* 13-16 hodín, u *Vibrio cholerae* 20 minút. In vivo je generačný čas baktérií dlhší (sila hostiteľskej imunity a obmedzenie nutričných faktorov). Rast bakteriálnej kultúry závisí od mnohých faktorov prostredia a je obmedzený. Obrazom zmien prostredia v priebehu kultivácie je rastová krivka s charakteristickými rastovými fázami.

Rastové faktory

Sú to metabolity, ktoré si baktérie nedokážu syntetizovať a musia sa preto do živného prostredia (napr. do kultivačného média) pridávať. Rastovými faktormi sú väčšinou vitamíny, aminokyseliny a purínové a pyrimidínové bázy. Baktérie, ktoré si vyžadujú rastové faktory sa

nazývajú **auxotrofy**. Baktérie, ktoré sú schopné si vytvárať všetky potrebné molekuly zo živín samy sa nazývajú **prototrofy**.

5.3 Kultivácia

Väčšina baktérií (aj huby, prípadne aj niektoré prvoky) je schopných rozmnožovať sa aj mimo živých orgánov na umelých médiách, čo sa využíva pri ich kultivácii v laboratórnych podmienkach. Túto vlastnosť nemajú vírusy, ktoré sú obligátnymi intracelulárnymi parazitmi a niektoré intracelulárne baktérie napr. chlamýdie (vzhľadom na neexistenciu nástrojov energetického metabolizmu).

5.3.1 Statická kultivácia

Najčastejšie používaná kultivácia v mikrobiologickej diagnostickej praxi je statická kultivácia. Pri tejto kultivácii sa baktérie rozmnožujú v určitom ohraničenom objeme kultivačnej pôdy s presne definovaným zložením. Faktory obmedzujúce rast sú vyčerpanie živín a nahromadenie produktov metabolizmu. Rastová krivka baktérií je obrazom siedmich rastových fáz.

1/ Pokojová – lag fáza

– inokulum je prenesené do nového prostredia. Baktérie sa prispôsobujú, adaptujú novým podmienkam – fáza prispôsobenia alebo adaptácie. V tejto fáze je možný pokles množstva žijúcich baktérií.

2/ Fáza zrýchleného rastu

– prežívajúce a prispôsobené baktérie sa začínajú deliť a intenzita metabolizmu je vysoká.

3/ Exponenciálna fáza – log fáza

– delenie bakteriálnych buniek je intenzívne a ich počet narastá geometrickým radom.

– rýchlosť delenia buniek sa spomaľuje, narastá počet odumierajúcich buniek. V prostredí nastáva postupné vyčerpanie živín a hromadenie metabolitov látkovej výmeny. Produkty látkovej výmeny sú často toxickej povahy. U niektorých baktérií sa na konci tejto fázy začína sporulácia.

5/ Stacionárna fáza

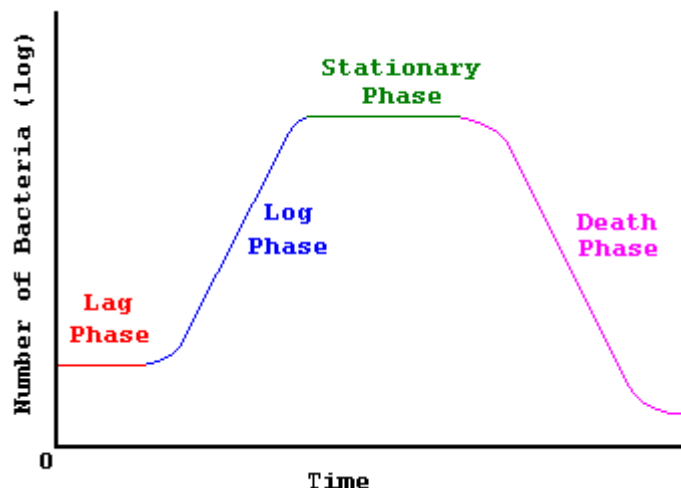
– prostredie sa stáva nevhodným pre delenie buniek, vyrovnáva sa počet odumierajúcich a vznikajúcich buniek. Rýchlosť delenia je nulová a celkový počet buniek dosahuje maximum.

6/ Fáza poklesu – fáza exponenciálneho úbytku

– bunky maximálnou rýchlosťou odumierajú. Počet mŕtvych buniek je v prevahe nad živými.

7/ Konečná stacionárna fáza – autosterilizácia

– nevznikajú nové generácie buniek a existujúce bunky sa začínajú rozpúšťať vlastnými autolytickými enzýmami.



Obr. 37. Rastová krivka.

<http://www.peakprosperity.com/forum/population-growth-s-shaped-not-exponential/7250>

Nie vždy sa riadi rozmnožovanie baktérií podľa takejto rastovej krivky. Odlišný priebeh je pri špeciálnych typoch kultivácií:

1/ Rast v mnohonásobnej logaritmickú fáze

Pri tomto raste nasleduje niekoľko exponenciálnych fáz za sebou. Po vyčerpaní základných živín baktérie prechádzajú na iné živiny (môžu nimi byť aj nahromadené metabolity – sekundárne zdroje živín).

2/ Dvojitá rastová krivka – diauxia

Bunky po ukončení log-fázy sa vracajú späť do lag-fázy a potom prechádzajú do novej exponenciálnej fázy. Prostredie musí obsahovať 2 zdroje uhlíka (napr. glukózu a sorbitol).

5.3.2 Hĺbková (submerzná) kultivácia

Prevzdušňovaním a premiešavaním bakteriálnej kultúry pri statickej kultivácii je možné dosiahnuť dokonalejšie využitie živín a intenzívnejšie rozmnožovanie. Tento typ kultivácie má využitie hlavne vo farmaceutickom priemysle (mapr. pri výrobe antibiotík).

5.3.3 Kontinuálna kultivácia

Vo vhodnej aparátúre sa k rastúcej a rozmnožujúcej sa bakteriálnej kultúre trvalo privádzajú potrebné živiny a na druhej strane sa odvádzajú metabolity látkovej premeny. Bakteriálna kultúra sa udržiava v trvalej, exponenciálnej fáze rastu. V praxi sa takáto kultivácia využíva na štúdium fyziológie a genetiky bakteriálnych kultúr.

Zákonitosti, ktoré platia pri raste a rozmnožovaní baktérií, môžeme vyjadriť i matematicky. Pri geometrickom raste vo fáze exponenciálneho rastu z jednej materskej bunky vznikajú dve dcérske bunky, ďalej štyri t.j. $2^0 2^1 2^2 2^3 \dots 2^n$. Ak v ohraničenom objeme pri statickej kultivácii máme na začiatku delenia N_0 buniek, po n deleniach je počet buniek v objeme : $N = N_0 \cdot 2^n$. Z jednotlivých konštánt sa môže vypočítať rýchlosť delenia za časovú jednotku. Čas potrebný na jeden deliaci cyklus sa nazýva generačná doba. Bakteriálna bunka je životaschopnejšia a rýchlejšie sa množí, čím je generačná doba kratšia. Ak vieme, koľko mikróbov je v médiu na začiatku kultivácie (čas = t_0) a po 10 hod. kultivácie (t_{10}), potom je možné vypočítať jednotlivé konštanty kultivácie.

Rýchlosť množenia (v) :

$$v = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 \cdot (t - t_0)}$$

$$\text{Generačná doba (g) je } g = \frac{1}{v}$$

Napríklad, ak predpokladáme, že na začiatku bolo v médiu 10^3 buniek a po 10 hod. 10^9 buniek.

$$v = \frac{\log 10^9 - \log 10^3}{0,3010 \cdot 10} = \frac{6}{3} = 2 \quad g = \frac{1}{v} = \frac{1}{2}$$

Rýchlosť množenia (delenia) za 1 hod. je 2 a generačná doba je $\frac{1}{2}$ hodiny.

5.3.4 Kultivácia baktérií z biologického materiálu

Ide o postup, pri ktorom zabezpečujeme rast a rozmnožovanie baktérií v laboratórnych podmienkach. Cieľom v lekárskej mikrobiologickej diagnostike je zachytenie, izolácia a pomnoženie baktérií. Získanie čistej kultúry je podmienkou pre väčšinu diagnostických postupov. Pre úspešnú izoláciu a kultiváciu baktérií je dôležité, okrem dodržiavania podmienok sterility pri práci, splniť aj ďalšie podmienky.

Výber vhodnej kultivačnej pôdy

Univerzálna pôda na izoláciu a kultiváciu všetkých známych baktérií neexistuje. Kultivačné pôdy napodobňujú prirodzené prostredie baktérií, z ktorého boli izolované. Pôda musí vyhovovať nutričným požiadavkám baktérií (obohacujeme ju o potrebné živiny, rastové faktory, vitamíny, atď.). Pre medicínsky významné baktérie je potrebné vytvoriť prostredie podobné prostrediu vo vnútri organizmu (prítomnosť erytrocytov, zdroj uhlíka, fyziologickú teplotu). Najbežnejšou pôdou, ktorá vyhovuje väčšine baktérií vyvolávajúcich ochorenie človeka, je krvný agar.

Kultivačné pôdy **podľa pôvodu**

- o Prirodzené – obsahujú zložky rastlinného a živočíšneho pôvodu (krv, mlieko, vajcia, zemiaky).
- o Syntetické – obsahujú chemicky definované zlúčeniny.
- o Polosyntetické – obsahujú chemicky definované zlúčeniny, ku ktorým sa pridávajú prírodné zložky.

Kultivačné pôdy **podľa konzistencie:**

- Tekuté pôdy:

slúžia ako pôdy rozmnožovacie. Baktérie v živnom bujone vyrastajú vo forme blanky na povrchu pôdy (sporulujúce baktérie, *Pseudomonas sp.*) – aerofilné baktérie. Formou difúzneho zákalu (enterobaktérie) - hydrofilné baktérie a formou sedimentu (streptokoky) – hydrofóbne baktérie. Povrchová blana môže byť pevná alebo drobivá, sediment vločkovitý, zrnitý alebo homogénny. Často pozorujeme kombinácie jednotlivých foriem rastu. Príkladom je živný bujón, sladinka, peptónová voda.

- Polotuhé (polotekuté):

používajú sa na dôkaz niektorých vlastností, napr. kultivačný dôkaz pohyblivosti metódou podľa Hajna, v ktorej sa baktérie môžu pohybovať a rásť na väčšej ploche alebo u pôdy

Gardovej na uvoľnenie niektorých antigénov pred aglutináciou (kolónie na tejto riedkej pôde rastú na väčšej ploche, čím sa baktérie v kolónii usporiadajú v tenšej vrstve, a tak antigény nie sú prekryté telom iných baktérií).

- Tuhé pôdy:

umožňujú rast baktérií v izolovaných kolóniách. Ich základ tvorí agar – morská riasa, ktorá sa povarením rozpúšťa a pri ochladení pod 42o C tuhne. Používa sa na prípravu tuhých pôd v 2-5 % koncentrácii. Nie je zdrojom živín pre baktérie. Ako zdroj živín sa pridávajú rôzne látky, najčastejšie barania krvi (krvný agar).

Kultivačné pôdy **podľa použitia:**

- Základné (univerzálne)

Na týchto pôdach vyrastá väčšina medicínsky významných baktérií (mäso-peptónový bujón, krvný agar) a používajú sa na zachytenie väčšiny medicínsky významných baktérií z biologického materiálu.

-Diagnostické

Obsahujú indikátor, ktorý identifikuje charakteristické metabolické alebo fyziologické vlastnosti vyšetrovaného mikroorganizmu (skvasovanie cukrov, produkcia hemolýzínov). Indikátorom je obvykle chemická látka, ktoré mení farbu pri zmene pH (podobne ako lakmus, alebo fenolftaleín). Pri metabolizme cukrov je konečným štádiom alebo medziproduktom kyseliny, ktorá zmení pH pôdy, a preto aj pH. To znamená, že ak baktéria metabolizuje substrát (sacharid) prítomný v pôde, prejaví sa to zmenou farby pôdy.

-Selektívne

Obsahujú látky, ktoré cielene potláčajú rast určitých baktérií alebo celých skupín baktérií a hľadané diagnostikované baktérie sú rastovo zvýhodnené. Ako inhibičné faktory sa používajú napr. soli ťažkých kovov, antibiotiká, farbivá, atď.).

Medzi kultivačnými pôdami nejestvujú ostré hranice. Niektoré pôdy môžu súčasne slúžiť ako základné a pre určité mikroorganizmy sú aj pôdami diagnostickými (streptokoky a krvný agar), iné spájajú selektivitu s diagnostickými vlastnosťami (Escherichia coli a Endova pôda).

5.3.5 Kolónie

Na vhodných tuhých kultivačných médiách baktérie rastú vo forme kolónií. Kolónia je nahromadenie baktérií jedného typu, ktoré vznikli binárnym delením každej z baktérií v tzv. kolóniu tvoriacej jednotke (CFU – colony forming unite). CFU je obvykle mikroskopický kúsok tkaniva, hlienu, biologického materiálu, ktorý sa oddelili pri rozočkovaní z biologickej vzorky prenesenej na tuhú kultivačnú pôdu.

Vyrastené kolónie môžeme posudzovať zrakom, môžeme použiť lupu, pre ich často charakteristický zápach (vôňu) použijeme čuch, bakteriologickou kľučkou môžeme posúdiť ich konzistenciu. Pri ich identifikácii si musíme všímať aj nasledovné charakteristické prejavy rastu: veľkosť kolónií, tvar kolónií, okraje kolónií, povrch kolónií, farbu kolónií, vzťah vyrastených kolónií k erytrocytom v krvnom agare – alfa hemolýzu, beta hemolýzu a gama hemolýzu).

Pri kultivácii rovnakého druhu baktérií môžeme posudzovať rôzne tvary kolónií – disociačné fázy. Rozoznávame tri základné disociačné fázy:

M fáza (mukózna – mucous): Kolónie sú mukózne, hlienovité, pripomínajú kvapku oleja, Takto rastú opúzdrené virulentné baktérie.

S – fáza (hladká - smooth): Kolónie sú hladké, ostro ohraničené od okolia. Takto rastú baktérie, ktoré nemajú púzdro a majú zachovanú virulenciu.

R- fáza (drsá – rough) : Kolónie majú povrch drsný, nepravidelné okraje, slabú virulenciu a sú takmer avirulentné .

Počas optimálnych kultivačných podmienok baktérie vyrastajú v M alebo S fáze. V nepriaznivých podmienkach vyrastajú v disociačnej fáze R.

5.3.6 Kultivácia anaeróbných baktérií

Na kultiváciu anaeróbných baktérií používame pôdy obohatené o látky, ktoré znižujú redoxpotenciál. Môžu nimi byť glukóza, L –cysteín, kyselina askorbová, thioglykolát sodný vitamín K, kúsky vareného mäsa alebo pečene. Oxidoredukčný potenciál musí byť nízky (rH okolo 0 mV) t.j. musí byť silne redukovaný.

Pre dosiahnutie nízkeho oxidoredukčného potenciálu v kultivačnom prostredí môžeme použiť nasledovné metódy:

Fyzikálna metóda

Má najnižšiu účinnosť. Kyslík sa z prostredia odstraňuje výevou a nahrádza sa inertným plynom (dusíkom). Používa sa ako súčasť efektívnejších kombinovaných postupov. Najjednoduchším spôsobom je použitie sviečkového exikátora.

Biologická metóda

V laboratórnej praxi je známa ako Fortnerova metóda. Pri tejto metóde sa fakultatívny anaerób *Serratia marcescens* naočkuje na $\frac{1}{3}$ vysoko naliatej kultivačnej pôdy a na $\frac{2}{3}$ pôdy očkujeme infekčný materiál v ktorom predpokladáme prítomnosť anaeróbných baktérií. Platňa sa po naočkovaní hermeticky uzavrie. Rast anaeróbných baktérií závisí od rýchlosti spotreby kyslíka *Serratia marcescens*. Metóda nespĺňa požiadavky na kultiváciu striktné anaeróbných baktérií.

Chemická /Absorbčná / metóda

Do anaerostatu s naočkovanými kultivačnými pôdami sa na dno umiestni miska s pyrogalolom (dobré oxidovateľná látka), ku ktorej sa pred uzavretím pridá roztok Na_2CO_3 , čím sa pyrogalol aktivuje.

Katalytická metóda

Je to najrýchlejšia a najvýhodnejšia metóda používaná v rutinej mikrobiologickej diagnostike. V anaerostate s objemom 3l môžeme umiestniť 10-12 kultivačných platní a sieťku s paládiovým katalyzátorom. Odsávaný vzduch sa nahrádza zmesou CO_2 , H_2 a N_2 .

Kultivácia v hlbkovom agare

Kyslík odstraňujeme z pôdy (regeneráciou - varom) s následným prudkým ochladením. Infekčný materiál sa očkuje vpichom až po dno pôdy. Po naočkovaní tieto pôdy prelievame vrstvou sterilného parafrínového oleja alebo vazelínou.

5.3.7 Dôkaz pohyblivosti mikroorganizmov

Aktívna pohyblivosť patrí k prejavom fyziologických vlastností niektorých mikroorganizmov. Pre diagnostické účely sa o pohyblivosti vyšetrovaného mikroorganizmu môžeme presvedčiť mikroskopickým a kultivačným dôkazom.

Mikroskopický dôkaz

Prípravou natívneho preparátu môžeme odlíšiť aktívny pohyb baktérií (pohyb pomocou bičíkov – pohyb všetkými smermi) od pohybu pasívneho – Brownovho molekulárneho pohybu (pohyb bez bičíkov – pohyb jedným smerom).

Kultivačný dôkaz

Na dôkaz používame dve metódy. Metódu podľa Hajna v U-trubičke s obsahom polotekutej agarovej pôdy s farebným pH indikátorom a metóda podľa Garda – Raussov fenomén u plazivých proteov (*Proteus vulgaris* a *Proteus mirabilis*).

Z diagnostických alebo pomnožovacích pôd preočkujeme mikroorganizmy na pôdy, na ktorých zisťujeme biochemické vlastnosti (rozklad sacharidov, tvorba sírovodíka, tvorba indolu atď.). Pri identifikácii možno použiť i sérologické metódy, pri ktorých sa pomocou známych protilátok určí príslušnosť k určitému rodu alebo druhu, typu alebo antigénne zloženie.

6 FYZIOLOGICKÁ MIKROFLÓRA

Ľudské telo je tvorené asi 10^{13} buniek organizovaných do tkanív, orgánov a orgánových sústav. Mnohé z týchto sústav sú za fyziologických podmienok osídlené (kolonizované) baktériami. Ich množstvo v zdravom ľudskom organizme predstavuje 10^{14} baktérií a ich spektrum je relatívne stabilné. Tieto baktérie vytvárajú tzv. fyziologickú mikroflóru (aj keď to nie sú rastliny). V priebehu života je vytvorená krehká ekologická rovnováha medzi baktériami fyziologicky osídľujúcimi niektoré časti orgánov a ľudským organizmom (tzv. eumikróbia).. Jej narušenie (dysmikróbia), či už v zmysle zmeny zloženia alebo pomeru zastúpenia určitého druhu v danom tkanive, alebo zmeny lokalizácie mikroorganizmu znamená ochorenie. Kolonizácia patogénnymi baktériami predovšetkým v určitom prostredí (*Streptococcus pneumoniae*, opúzdrené kmene *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis* v nosohltane osôb v uzavretých komunitách – vojenské tábory, sústredenia mladých, predškolské zariadenia, *Staphylococcus aureus* na koži, v nose, nosohltane v nemocničnom prostredí) je považovaná za prejav dysmikróbie, napriek neprítomnosti klinických príznakov.

6.1 Význam fyziologickej flóry

Pôsobenie baktérií fyziologickej mikroflóry je obvykle priaznivé.

- súťažia o receptorové miesta a nutričné faktory s patogénnymi mikroorganizmami. Na vyvolanie ochorenia salmonelami je obvykle potrebných 10^6 baktérií. U zvierat držaných v sterilnom prostredí od narodenia rovnaké ochorenie vyvolá 10 salmonel)
- podieľajú sa na tvorbe vitamínov (*E. coli* – K vitamín), bakteriocínov
- podieľajú sa na eliminácii toxínov (*Bacteroides*)
- vytvárajú vhodné prostredie pre inhibíciu rastu patogénnych baktérií (*Lactobacillus*)
- stimulujú imunitu – rozvoj špecifickej imunity a ochrany pred patogénmi na základe skrížene reagujúcich protilátok
-

Okrem priaznivého pôsobenia môžu niektoré baktérie fyziologickej mikroflóry podporovať vznik iných aj neinfekčných ochorení. (napr. *Streptococcus mutans*, *Str. milleri* – zubný kaz). Rovnako dlhodobá prítomnosť parazitov, plesní a vírusov aj bez klinických príznakov nie je považovaná za fyziologickú mikroflóru.

6.2 Zloženie fyziologickej flóry

Ľudský organizmus je po pôrode sterilný. Postupne dochádza ku kolonizácii niektorých slizníc mikroorganizmami. Táto kolonizácia závisí na množstve a zložení baktérií v prostredí, strave a v priebehu života sa mení predovšetkým v súvislosti s hormonálnou aktivitou (u žien).

Umelé je možné fyziologickú flóru zmeniť alebo zničiť podávaním širokospektrálnych antibiotík, hormónov, antiseptík. To sa môže prejaviť klinickými príznakmi (hnačky, nechutenstvo, zlé trávenie, svrbenie), niekedy aj život ohrozujúcimi ochoreniami (premnoženie anaeróbných baktérií v čreve po podávaní širokospektrálnych antibiotík – pseudomembranózna kolitída). Po každom takomto zásahu sa v zdravom organizme mikroflóra upraví obvykle spontánne.

Niekedy je potrebné podávanie živých kultúr alebo bakteriálnych lyzátov na obnovu fyziologickej flóry. Znalosť zloženia fyziologickej bakteriálnej mikroflóry jednotlivých tkanív a orgánov je nevyhnutná pre správnu interpretáciu mikrobiologických nálezov a účinnú a racionálnu terapiu infekcií.

6.2.1 Orgány za fyziologických podmienok sterilné a zodpovedajúci biologický materiál

*Dýchacie cesty kaudálne od faryngu – bronchoalveolárna laváž, aspirát dolných ciest dýchacích, punktát pľúc, správne odobraté spútum

*GIT kaudálne od oesofagu po colon. Je možná prechodná prítomnosť baktérií obsiahnutých v strave a v prehltnutých slinách – bioptický materiál

*Močové cesty. Ojedinele prítomnosť baktérií prenesených z perinea v dolnej tretine uretry – punkcia močového mechúra, správne odobratý stredný prúd moču, obsah z katetra

*Vnútorne pohlavné orgány – punktáty orgánov, dutín a ich obsah, peroperačne odobratý materiál

*Stredné ucho – aspirát stredného ucha

*Vnútorne tkanivá – punktát, obsah z redonu

*Orgány nervového systému – excízia, punktát, cerebrospinálny mok

*Intravaskulárne tekutiny – krv na hemokultiváciu

6.2.2 Zloženie a význam fyziologickej bakteriálnej flóry

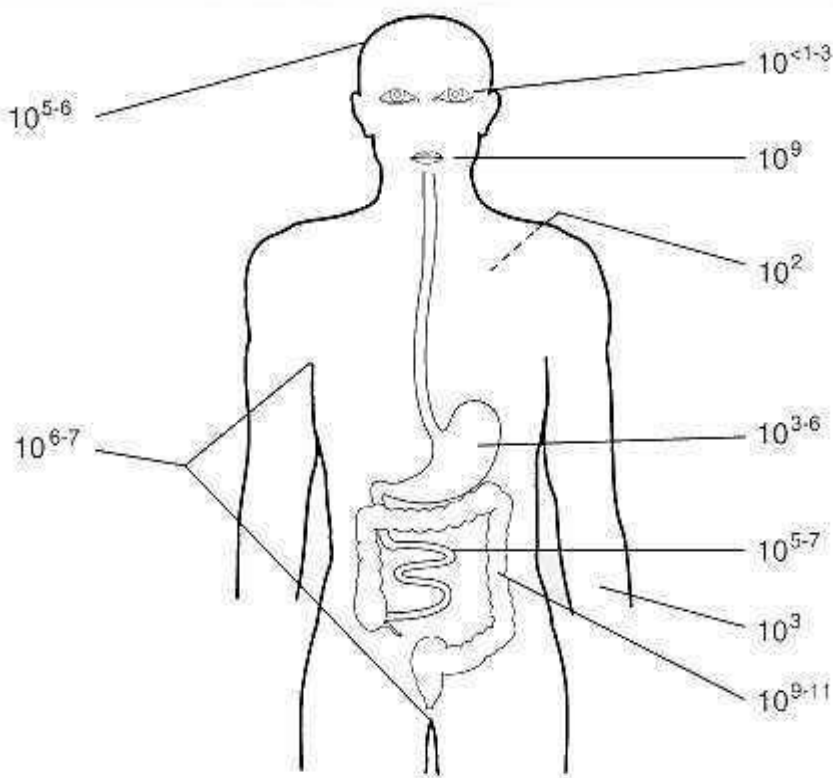
Koža – povrch kože je tvorený viacerými odlišnými oblasťami, a preto aj spektrum baktérii nie je jednoliate. Väčšina ľudskej kože je tvorená prostredím relatívne suchým, nepravidelnou tvorbou potu. Je vystavená výkyvom prostredia a je osídlená *St. epidermidis*, *Propionibacter sp.*, *Corynebacterium sp.*. Oblasť axily a perinea predstavuje vlhké prostredie s ústím potných a mazových žliaz. V tejto oblasti fyziologicky nachádzame *St. aureus*, *Corynebacterium sp.* a ojedinele Gram negatívne baktérie. Koža v okolí mukokutánných prechodov môže byť kolonizovaná baktériami nachádzajúcimi sa na príslušných slizniciach.

- Ústa a nosohltan – predstavujú vlhké prostredie s dočasnou prítomnosťou baktérií, ktoré prichádzajú z nesterilného vonkajšieho prostredia kontaktom alebo potravou. Sliny a transsudát v gingiválnych záhyboch predstavujú účinnú obranu voči patogénom (v slinách prítomný lyzozým účinkuje na G+ baktérie a IgA protilátky, v transsudáte pôsobia súčasti krvného séra – IgG protilátky, súčasti komplementu). Bežne prítomné sú tu streptokoky, anaeróbne baktérie a nepatogénne neisérie. Aj u zdravých ľudí nachádzame prítomnosť podmiennečne patogénnych baktérií (neopúzdrené kmene *H. influenzae*).

- Črevná flóra – črevo – predovšetkým hrubé črevo a čím kaudálnejšie tým viac je osídlené väčšinou našej mikrofóry. Obsahuje $10^9 - 10^{10}$ baktérií na gram stolice. Väčšinu tvoria anaeróbne baktérie predovšetkým *Bacteroides sp.*, *Bifidobacterium sp.*, anaeróbne streptokoky, *Clostridium sp.* Tieto baktérie inhibujú rast patogénov. Niektoré sú potenciálne patogény (*Cl. difficile* – spôsobujúce pseudomembranóznu kolitídu pri premnožení v prípade

dysbalancie zloženia fyziologickej mikroflóry - dysmikrobia). Z fakultatívne anaerobných baktérií sa v niektorých oblastiach hrubého čreva nachádza rôzne spektrum G-paličiek z rodu *Enterobacteriaceae* podieľajúcich sa na vytváraní stavu ekologickej rovnováhy – eumikróbia.

- Urogenitálna flóra – urogenitálny trakt je sterilný s výnimkou vagíny a distálnej časti uretry. Rôzne druhy rodu *Lactobacillus* sa nachádzajú vo vagíne hneď po narodení. V čase hormonálnej zrelosti laktobacily štiepia glykogén epitelu, čím dochádza k zmene pH a vytvoreniu kyslého prostredia, ktoré inhibuje rast ostatných patogénnych a podmienene patogénnych mikroorganizmov. Zničenie laktobacilov antibiotikami vedie často k premnoženiu kvasiniek – kandidióza. Ojedinele sa v tejto oblasti môžu nachádzať rôzne kožné baktérie – streptokoky, stafylokoky, difteroidné paličky. Prítomnosť *Str. viridans* a *Str. agalactiae* na sliznici vagíny ako podmienene patogénnych mikroorganizmov bude diskutovaná v kapitole zo špeciálnej mikrobiológie.



Obr. 38. Množstvo mikroorganizmov fyziologickej flóry.

<http://kdshives.com/2012/12/10/ask-a-microbiologist-3-whats-in-the-almond-milk/fig-6-1-ch-6-normal-flora-med-micro-4th-ed/>

6.2.3 Infekcie spôsobené predstaviteľmi fyziologickej flóry

Predstavitelia fyziologickej flóry sú nepatogénne len v mieste ich fyziologickej lokalizácie a za fyziologických podmienok danej oblasti. Akékoľvek premiestnenie daného mikroorganizmu na miesto, kde nie sú súčasťou fyziologickej mikroflóry alebo porušenie eumikróbie v zmysle zloženia alebo počtu baktérií, znamená vytvorenie podmienky pre uplatnenie sa nástrojov patogenity daného mikroorganizmu.. Prerušenie celistvosti kože a slizníc a ich poškodenie inými noxami (vírusmi, chemickými látkami, sterilným zápalom) môže viesť k ochoreniu spôsobenému predstaviteľmi fyziologickej mikroflóry. (zubný kaz, periodotitída). Rovnako zlyhávanie imunity hostiteľa a jeho ďalšie ochorenia môžu viesť k nedostatočnej kompetencii fyziologickej mikroflóry s patogénmi alebo k ich invázii (endocarditis). Prítomnosť *E. coli* na iných slizniciach ako v hrubom čreve vyvolá hnisavý zápal a jeho premnoženie v čreve môže spôsobiť príznaky hnačky.. Prítomnosť dostatočného množstva glukózy umožňuje syntézu glukanu, ktorý je potrebný na adherenciu *Str.mutans* na povrch zubnej skloviny, čím dochádza k vzniku zubného kazu.

7 NOZOKOMIÁLNE NÁKAZY

Nozokomiálna nákaza – nemocničná nákaza – je každé prenosné ochorenie, ktoré vzniklo v súvislosti s pobytom v zdravotníckom zariadení a postihlo pacienta. Pri postihnutí pracovníka zdravotníckeho zariadenia sa hovorí o profesionálnej nákaze. Nozokomiálna nákaza môže vzniknúť pri diagnostických a terapeutických zákrokoch, alebo pri pobyte na lôžkovom oddelení, ambulancii, zákrokovom alebo diagnostickom pracovisku. Prejaví sa v priebehu pobytu v zdravotníckom zariadení alebo po prepustení. Nie každé prenosné ochorenie, ktoré sa prejaví v nemocnici je nozokomiálna nákaza. Priemerný výskyt nozokomiálnych nákaz je 1-15% ošetrovaných pacientov podľa druhu oddelenia. V rámci zdravotníckych zariadení existujú pracoviská, v ktorých je výskyt NN vyšší (sú rizikové pre vznik NN).

7.1 Riziká vzniku NN

- *vek (rovnako novorodenci ako starší pacienti),
- *prítomnosť cudzích telies (katétre, i.v.kavaly, intubácie, šicí materiál, endoprotézy)
- *sprievodné ochorenia (dialyzovaní pacienti, diabetes mellitus, imunodeficit, stáza cirkulácie, prekážky v dýchaní)
- *terapia (používanie širokospektrých antibiotík, imunosupresívna liečba, cytostatiká, kortikosteroidy, ožarovanie, obnažené plochy – popáleniny)
- *množstvo zákrokov, dĺžka hospitalizácie
- *kvalita ošetrovacej techniky
- *možnosti dekontaminácie (neexistencia centrálnej sterilizácie, nedostatok jednorázového materiálu, nedodržiavanie expozičného času a koncentrácie)
- *zásobovanie potravinami

7.2 Najrizikovejšie oddelenia

- *ARO, JIS
- *chirurgické a urologické oddelenie
- *geriatria
- *novorodenecké oddelenie

7.3 Nozokomiálne nákazy podľa vzniku

*endogénne – vyvolávateľom je vlastná mikroflóra po porušení rovnováhy

*exogénne – vyvolávateľom sú kmene od iných pacientov, personálu a návštev, prípadne nozokomiálne kmene

Špecifické NN – odzrkadľujú epidemiologickú situáciu v oblasti (pri chrípkovej epidémii, výskyte ovčích kiahní v populácii). Nešpecifické NN – infekcie vyskytujúce sa sporadicky.

7.4 Prenos nozokomiálnej infekcie

*ingesciou – výskyt je ovplyvnený kvalitou potravinového reťazca a často sa vyskytujú hromadne v zdravotníckom zariadení

*inhaláciou – ich výskyt je len veľmi ťažko ovplyvniteľný vzhľadom na nutnosť izolácie pri volatilnej infekcii

*kontaktom – ovplyvniteľné ošetrovacou technikou a správnou dekontamináciou

*inokuláciou – ovplyvniteľné používaním jednorázového materiálu, dodržiavaním podmienok dekontaminácie a kontroly liečebných roztokov a krvných preparátov (krvou prenosné infekcie – VHC, VHB, HIV)

7.5 Najčastejší vyvolávatelia nozokomiálnych nákaz

Gram pozitívne baktérie

St. aureus – vyvoláva hnisavé komplikácie a per secundam hojace sa rany. Doteraz dobre citlivý na oxacilin (meticilin). V súčasnosti je potrebné myslieť na nastupujúce riziko kolonizácie personálu a vzniku infekcií vyvolaných nemocničnými kmeňmi MRSA – meticilín rezistentný *St. aureus*. Tie na rozdiel od MRSA kmeňov izolovaných z ambulancií (komunitné kmene CoMRSA) bývajú rezistentné aj na iné antibiotiká (multirezistencia).

St. epidermidis a ostatné PK negatívne stafylokoky – kolonizujú katetre, kavalu, umelé náhrady, ku ktorým majú afinitu a môžu byť pôvodcami infekcií.

Gram negatívne paličky z rodu Enterobacteriaceae (*E.coli*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*)

E. coli – indikátor fekálneho znečistenia a vyvolávateľ hnisavých komplikácií

Podmienečne patogénne mikroorganizmy

Gram negatívne nefermentujúce paličky – *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacea* – kmene prítomné v prostredí, osídľujúce nástroje a povrchy – katetre, intubačné kanyly, respirátory. Sú to nebezpečné nozokomiálne kmene s prenosnou rezistenciou na antibiotiká, ktoré u dlhodobo

hospitalizovaných pacientov liečených širokospektrálnymi antibiotikami kolonizujú ich sliznice a následne vyvolajú často fatálne infekcie pľúc. (ARO)

7.6 Boj proti nozokomiálnym nákazam

Ide o problém odborný, organizačný, etický, ekonomický a právny. Hlavným princípom je surveillance nozokomiálnych nákaz – systém epidemiologickej bdlosti. Je to multidisciplinárny prístup pozostávajúci z klasifikácie oddelení podľa rizika, vytypovania rizikových miest terapeutického, diagnostického a ošetrovacieho procesu, zavedenia systému sledovania, evidencie, hlásenia a analýzy infekcií na oddelení a následného zavedenia opatrení. Opatrenia na zabránenie vzniku a zastavenie šírenia NN prebiehajú na úrovni personálu, prostredia, ošetrovacej techniky, terapeutických a preventívnych zákrokov (cirkulácia ATB, režim dezinfekcie, očkovanie)

8 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA A ŠPECIFICKÉ VLASTNOSTI VÍRUSOV, PARAZITOV A HÚB

8.1 Všeobecná virológia

8.1.1 Všeobecná charakteristika

Vírusy predstavujú veľkú skupinu obligátne intracelulárne parazitujúcich mikroorganizmov, schopných infikovať rôzne typy buniek (živočíšne, rastlinné, bakteriálne). Sú závislé na hostiteľskej bunke, ktorej nástroje energetického metabolizmu a proteosyntézy využívajú pre svoju reprodukciu. Na rozdiel od ostatných typov mikroorganizmov, z ktorých niektoré sú tiež obligátne intracelulárne parazity alebo využívajú hostiteľské nástroje pre energetický metabolizmus (napr. chlamýdie), vírusy obsahujú buď len DNA alebo len RNA, ktoré sú nositeľmi celej genetickej informácie – genóm. Nukleová kyselina môže byť jednovláknová alebo dvojvláknová: jednovláknová môže mať pozitívnu alebo negatívnu polaritu. Typ a štruktúra nukleovej kyseliny ovplyvňujú možnosti reprodukcie vírusov, prípadne náchylnosť na vznik rekombinácií. Nukleová kyselina je pokrytá a chránená proteínovým kabátom (kapsida), ktorý môže mať niektorú z viacerých možných morfológických konfigurácií (íkozaedrálna, helikálna, komplexná). Kapsidy sú obvykle vytvárané z viacerých charakteristických jednotiek (kapsoméry – pentaméry, hexaméry) a obaľujú nukleovú kyselinu spôsobom, ktorý vytvára charakteristický vzhľad vírusov (nukleokapsida). Niektoré vírusy sú obalené fosfolipidovou dvojvrstvou (obal), ktorého pôvod je v hostiteľskej bunke a nalieha na proteínovú kapsidu. Prítomnosť lipidového obalu určuje niektoré vlastnosti molekuly vírusu voči vonkajším vplyvom, a tým aj možnosti prenosu a dekontaminácie. Niektoré štrukturálne a morfológické vlastnosti medicínsky významných vírusov sú uvedené v tabuľke (Tab. 1.).

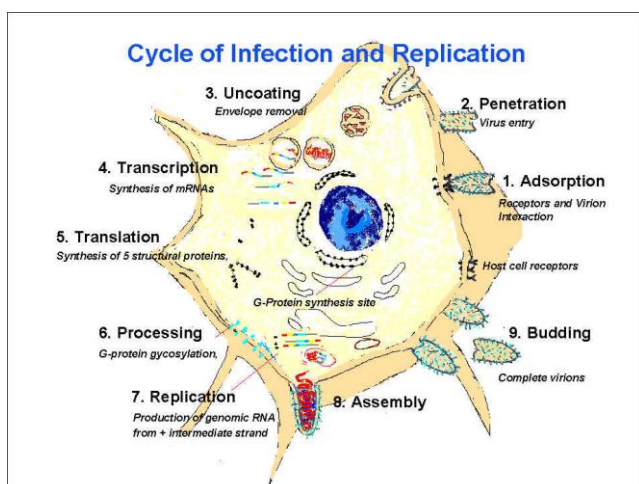
Vírus	Genóm	Polarita	Segmenty	Morfológia kapsidy	Lipidový obal	Ochorenie
<i>Picorna</i>	RNA	+ss	1	<i>Icosahedrálna</i>	-	<i>polio, VHA</i>
<i>Toga</i>	RNA	+ss	1	„	+	<i>ružienka, encefalitída</i>
<i>Retro</i>	RNA	+ss	1+1	„	+	<i>AIDS</i>
<i>Orthomyxo</i>	RNA	-ss	6- 8	<i>Helikálna</i>	+	<i>chripka</i>
<i>Rhabdo</i>	RNA	-ss	1	„	+	<i>besnota</i>
<i>Paramyxo</i>	RNA	-ss	1	„	+	<i>mumps, osýpky</i>
<i>Papova</i>	DNA	ds	1	<i>Icosahedrálna</i>	-	<i>bradavice</i>
<i>Adeno</i>	DNA	ds	1	„	-	<i>APC</i>
<i>Herpes</i>	DNA	ds	1	„	+	<i>herpes, varicella-zoster, IM</i>
<i>Hepadna</i>	DNA	ds	1	„	+	<i>VHB</i>
<i>Pox</i>	DNA	ds	1	<i>Complex</i>	+	<i>kiahne</i>

Tab. 1. Štrukturálne a morfológické vlastnosti medicínsky významných vírusov.

8.1.2 Replikácia vírusu

Proces replikácie vírusu pozostáva z niekoľkých krokov:

- prvý je rozpoznanie cieľovej bunky, na základe povrchových receptorov hostiteľskej bunky zabezpečujúcich tkanivový tropizmus vírusu
- uchytenie na hostiteľskú bunku (antireceptorové molekuly vírusu)
- pohltenie a internalizácia do hostiteľskej bunky
 - translokácia (neobalené vírusy)
 - pinocytóza (neobalené vírusy)
 - fúzia plazmatickej membrány s lipidovým obalom (obalené vírusy)
- vyzlečenie proteínovej kapsidy
- replikácia vírusového genómu (v cytoplazme alebo v jadre)
- spojenie replikovaných častí
- uvoľnenie vírusu z hostiteľskej bunky (prípadne spolu so získaním lipidového obalu) pučaním



Obr. 39. Proces replikácie vírusu. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/cycle.jpg>

Vysvetlivky: adsorpcia (1, 2); penetrácia (3); rozmnoženie (4); rozšírenie vírusov (6, 7).

Znalosť jednotlivých fáz replikácie vírusu je dôležitá pre určenie možných miest zásahu prípravkov antivírusovej terapie. Proces replikácie vírusového genómu závisí na type nukleovej kyseliny.

8.1.2.1 RNA +ss

+ssRNA je ekvivalentom mRNA, a preto genóm môže byť rovno preložený (translácia) do podoby proteínov. Tieto proteíny – enzýmy sa podieľajú na syntetizovaní negatívnej kópie

(– RNA), ktorá sa kopíruje na +RNA. Jej transláciou sú vyprodukované štrukturálne preteíny, ktoré sa použijú na obalenie +RNA do viriónu.

8.1.2.2 RNA –ss

–ssRNA musí byť najskôr premenená na +RNA (mRNA). Uskutočňuje sa tak prostredníctvom enzýmu RNA dependentná RNA polymeráza, ktorý je súčasťou viriónu - ssRNA. mRNA je potom preložená (translácia) do formy proteínov. Replikatívna RNA dependentná RNA polymeráza potom syntetizuje negatívnu kópiu +RNA. Štrukturálne proteíny odvodené z mRNA sa použijú na obalenie –ssRNA a polymerázy do viriónu.

8.1.2.3 DNA

Väčšina DNA vírusov využíva hostiteľské proteíny na vytvorenie mRNA, ktorá kóduje vírus špecifické proteíny pre transkripciu. Sú to proteíny replikatívne, ktoré vedú k produkcii novosyntetizovanej DNA a proteíny štrukturálne, ktoré uzatvoria DNA do viriónu.

8.1.2.4 Retrovírusy

Majú jedinečnú cestu replikácie. Ich RNA je najskôr spätne prepísaná vírusovým enzýmom (reverznou transkriptázou RT – RNA dependentná DNA polymeráza) a vytvorí sa RNA/DNA hybrid, RT odstráni RNA, dosyntetizuje sa DNA a vznikne dsDNA, ktorá je integrovaná do hostiteľského genómu. Po určitom časovom období môže dôjsť k produkcii mRNA, štrukturálnych proteínov a nových viriónov.

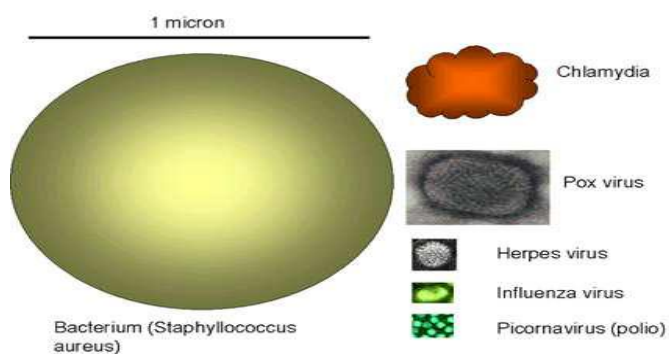
8.1.3 Patogenéza vírusových ochorení a obranné mechanizmy

Vírusy môžu pôsobiť rôzne na napadnutú hostiteľskú bunku. Ak vírus náhodne infikuje bunku, u ktorej nedokáže začať vlastnú replikáciu (**nepermisívna bunka**), dôjde k abortívnej infekcii, bez vplyvu na napadnutú bunku. Ak vírus započne vlastnú replikáciu v bunke, ktorá má na to vytvorené podmienky (**permisívna bunka**) a dôjde k bunkovej smrti – cytolýza – je to cytolytická infekcia. Medzi týmito dvoma extrémami je niekoľko prechodov prejavujúcich sa ako perzistentná infekcia. Tá môže byť *produktívna* (vírus je v bunke replikovaný dlhodobo, k smrti bunky nedochádza okamžite, bunka sa vyčerpáva, je urýchlené jej starnutie so všetkými možnými následkami – nižšia obranyschopnosť, zmena antigénnej štruktúry), *latentná* (bunka je infikovaná, ale trvalo alebo dočasne nedochádza k produkcii nových vírusových elementov) alebo *transformujúca* (spôsobuje imortalizáciu napadnutej bunky). Transformujúca infekcia DNA vírusom nie je spojená s produkciou vírusových partikul, pri transformujúcej infekcii RNA vírusom je prítomná produkcia nových jedincov.

8.1.4 Princípy identifikácie vírusovej infekcie

Vírusy ako obligátne intracelulárne parazity nie je možné kultivovať na umelých médiách. Replikujú sa len v živých štruktúrach a na ich pomnoženie sa používajú tkanivové kultúry, bunkové línie alebo laboratórne zvieratá. Po pomnožení je potrebné vírus identifikovať, a to je možné dôkazom typického tkanivového poškodenia alebo poškodenia bunky (cytopatický efekt), dôkazom interferencie (prítomnosť niektorých vírusov v bunkových kultúrach alebo na tkanivách zabráni rastu iných vírusov), pri typickej štruktúre pozorovaním v elektrónovom mikroskope, dôkazom nukleovej kyseliny vírusu (PCR), dôkazom antigénu (aglutinácia, latexaglutinácia, hemaglutinácia, komplementfixácia, neutralizácia) alebo imunoserologickými metódami – dôkazom vírusového antigénu pomocou špecifických protilátok značených kvôli detekcii fluorescenčným farbivom (imunofluorescencia), enzýmami (ELISA), rádionuklidom (RIA). V praxi sa stále používajú nepriame metódy dôkazu vírusového ochorenia na základe zisťovania a znalostí dynamiky tvorby špecifických protilátok imunoserologickými metódami.

Vzhľadom na časovú náročnosť pri pomnožovaní vírusov (minimálne 14 dní) a technické požiadavky na vybavenie a sterilitu nie je možné metódy na priamu identifikáciu vírusového vyvolávateľa ochorenia považovať za bežné a vhodné. Na vytvorenie detegovateľných hladín protilátok je potrebný po expozícii určitý čas (14 dní), a preto ani sérologické metódy nepatria k rýchlym laboratórnym diagnostickým postupom. Na rýchlu diagnostiku vírusových infekcií v podozrivých situáciách, kde je vysoká pravdepodobnosť vírusovej etiológie, je možné použiť dôkaz antigénu, PCR alebo dôkaz vírusu genetickými sondami. Rýchly dôkaz vírusovej infekcie má veľký význam pri epidemiologicky významných ochoreniach a umožní cielený profylaktický zásah s cieľom zabránenia rozsiahlejšieho výskytu alebo vzniku epidémie. U niektorých skupín vírusov je podkladom pre špecifickú terapiu alebo špecifickú profylaxiu, aj keď výber antivirov je stále obmedzený a pre niektoré skupiny vírusov negatívny.



Obr. 40. Veľkosť vírusov. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/vir-size.jpg>

8.2 Všeobecná parazitológia

Parazity sú organizmy (mikroorganizmy alebo makroorganizmy), ktoré celý svoj život alebo len určitú jeho časť žijú na tele alebo vo vnútri tela iného organizmu – hostiteľa. Napriek tomu, že nie všetky parazity sú mikroorganizmy, parazitológia ako veda o parazitoch tvorí súčasť mikrobiológie, pretože na identifikáciu parazitov sa využívajú mikrobiologické metódy.

Parazit žije na úkor hostiteľa a rôznymi spôsobmi ho poškodzuje, u väčšiny parazitóz je ochorenie dlhotrvajúce – chronické, obvykle nie letálne. Parazity môžu byť obligatórne – neprežijú bez hostiteľa alebo fakultatívne – za určitých okolností alebo v určitom vývojovom období môžu existovať aj mimo tela hostiteľa. Niektoré parazity sú patogénne, iné sú skôr komenzálmi. Fylogeneticky staršie parazity sa dobre adaptovali na cudzopasný spôsob života, nemajú záujem likvidovať svojho hostiteľa a nie sú pre neho zvlášť nebezpečné (pásomnica). Naproti tomu fylogeneticky mladšie parazity nie sú na takýto spôsob života adaptované a často svojho hostiteľa usmrťia (trypanozóma). Parazity majú obvykle zložitý vývojový cyklus so striedaním hostiteľov alebo pohlavných a nepohlavných generácií. Hostiteľ môže byť definitívny – parazit v ňom dozreje a pohlavne sa rozmnožuje, alebo je len medzihostiteľom – prebieha v ňom nepohlavné množenie parazita. Parazit môže napadnúť hostiteľa priamo, alebo je prenesený prostredníctvom prenášača – vektora. Diagnostika parazitárnych ochorení na základe klinických príznakov je vzhľadom na ich rozmanitosť veľmi obtiažna. Spoločnou a často jedinou metódou dôkazu prítomnosti parazita v tele sú metódy laboratórnej diagnostiky a z nich stále na prvom mieste mikroskopia. Ak nie je možný priamy dôkaz parazita, používajú sa metódy nepriame, ktoré sú založené na dôkaze protilátok. Tieto metódy sú však použiteľné len u niektorých systémových ochorení. Mimoriadne dôležitá pre správne načasovanie odberu biologického materiálu na parazitologické vyšetrenie je znalosť vývojového cyklu parazita (znalosť prepatentného štádia, negatívnej fázy a pod.) v tele človeka, ktorá umožní indikovať lekárovi spôsob, množstvo, frekvenciu odberu a typ odoberaného materiálu a vyšetrenia. Prepatentné štádium je doba, kedy sa parazit po nákaze dá laboratórne dokázať v biologickom materiáli. Negatívna fáza infekcie je obdobie, kedy nie je možné parazita dokázať vo vyšetrovanom materiáli napriek pretrvávajúcej nákaze.

Medicínsky významné parazity sú:

1) prvoky (améby, bičíkovce, výtrusovce, nálevníky) .Prvky sú jednobunkové živočíchy mikroskopických rozmerov, ktoré obsahujú pravé jadro (eukaryotické bunky). Jediná bunka predstavuje ich telo a je štrukturálne aj fyziologicky kompetentná vykonávať všetky funkcie

umožňujúce jej existenciu, vrátane zložitostí zmeny hostiteľa. Majú rôzny tvar, veľkosť, štrukturálne a morfológické detaily. Podľa týchto znakov sa taxonomicky triedia do tried, radov, čeľadí, rodov, druhov. Mnohé sú voľne žijúce v prírode. Ich výskyt je ubikvitárny, incidencia a prevalencia infekcií prvokmi je vysoká predovšetkým v tropických oblastiach.

2) červy (oblé červy, ploché červy – motolice, pásomnice)

Parazitické červy sú viacbunkové organizmy s rôzne vyvinutou tráviacou, nervovou, exkretorickou a reprodukčnou sústavou. Motolice sú ploché červy štrukturálne veľmi jednoduché, ale so zložitým biologickým cyklom. Majú charakteristické prísavky a sú hermafrodity. Pásomnice sú výrazne adaptované na parazitický spôsob života. Ich vývoj je nepriamy so striedaním jedného alebo dvoch medzihostiteľov. Majú ploché článkované telo rozdelené na hlavičku (skolex), nesegmentovaný krčok a telo (strobila), ktoré sa delí na články (proglotidy). Sú dlhé od niekoľkých centimetrov až po niekoľko metrov. Potravu prijímajú celým telom – nemajú tráviacu sústavu. Väčšina z nich sú hermafrodity a v každom článku je kompletná sústava samčích aj samičích pohlavných orgánov.

Oblé červy – nematoda, hlístovce majú nesegmentované telo pokryté kutikulou. Sú rozšírené geopolitne.

3) článkonožce (roztoče, kliešte, hmyz – vši, ploštice, blchy, dvojkrídly hmyz – muchy, komáre).

Predmetom štúdia článkonožcov v rámci lekárskej mikrobiológie nie je ich štruktúra a životný cyklus, ale ich význam pre prenos rôznych mikroorganizmov (baktérie – predovšetkým riketsie, vírusy, protozoa, helminty). Pôsobia ako vektory – prenášače, cicajú krv a vyvolávajú v mieste bodnutia reakcie alebo infekcie nesúvisiace s parazitózou, ktorej vektorom sú. Väčšina článkonožcov sú ektoparazity. Niektoré roztoče môžu invadovať do tkanív. Prenos infekcie ektoparazitmi ako vektormi sa uskutočňuje mechanicky alebo biologicky. Článkonožce môžu slúžiť aj ako kultivačné médium, v ktorom sa mikroorganizmus môže značne rozmnožiť a až potom je inokulovaný do hostiteľa. Niektoré článkonožce prenášajú nákazu aj na ďalšie generácie (vertikálny prenos) alebo prostredníctvom vajíčok.

8.3 Všeobecná mykológia

8.3.1 Huby (plesne a kvasinky)

Patogénne huby vyvolávajú u človeka, živočíchov alebo rastlín ochorenia, ktoré sa označujú ako mykózy. Odbor, ktorý sa zaoberá týmito mikroorganizmami, sa nazýva mykológia. Predmetom štúdia lekárskej mykológie sú huby parazitujúce na človeku. Lekárska mykológia úzko komunikuje s ďalšími odbormi – hygienou, veterinárnou medicínou a je neoddeliteľnou súčasťou kožného lekárstva.

Huby sú heterotrofné organizmy, ktoré získavajú organické látky pre svoj metabolizmus:

- saprofytický – z odumretých tiel rastlín alebo živočíchov
- symbiotický – vzájomným poskytovaním si živín medzi rastlinami, živočíchmi a hubami
- parazitický – využívaním napadnutých organizmov ako zdrojov živín, čím ich súčasne poškodzujú (väčšina medicínsky významných húb)

Medzi huby sa zaraďujú:

- všetky klobúkovité huby označované ako makromycéty,
- plesne, kvasinky a im podobné štruktúry – mikromycéty – (medicínsky významní pôvodcovia mykóz)

8.3.1.1 Charakteristika

Huby sú rôznorodá skupina eukaryotických mikroorganizmov. Ich bunková membrána obsahuje ergosterol, čo poskytuje možnosť pre selektívny zásah antimykotík. Väčšinou sú podmienenčne patogénne a len malá skupina je primárne patogénnych. Huby obvykle pri raste produkujú enzýmy a rozkladajú napadnuté tkanivá. Huby rastú v dvoch fázach – vegetatívnej a reprodukčnej. Vo vegetatívnej fáze sú bunky haploidné. Rastú ako plesne s hýfami (mycélium) alebo ako jednobunkové bunky kvasiniek, zväčšujú svoj objem.

Niektoré huby môžu meniť morfológiu a prejavuje sa u nich tzv. teplotný dimorfizmus (pri 37 °C rastú ako kvasinky, pri 22 °C ako plesne). V reprodukčnej fáze môžu bunky podstúpiť asexuálne alebo sexuálne delenie a zväčšujú počet členov kolónie. Asexuálne delenie zahŕňa tvorbu spór, sexuálne vyžaduje špecifické bunkové štruktúry, ktoré sa používajú na taxonomickú diferenciáciu a klasifikáciu.

8.3.1.2 Morfológia

Bunky húb sú eukaryotické, obsahujú jedno alebo viac jadier. Sú obalené povrchovou membránou obsahujúcou ergosterol, chitín, prípadne polysacharidy, lipidy, fosforečnany. Látky polysacharidového charakteru ovplyvňujú povrchovú rigiditu a uplatňujú sa aj ako antigény. Cytoplazma húb je koloidný roztok obsahujúci vakuoly, kryštáliky minerálov, anorganické látky, bielkoviny, glykogén, pigmenty, enzýmy, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, ribozómy, Golgiho aparát, jadro (alebo jadrá) s jadierkom. Bunky húb neobsahujú chlorofyl, a teda nie sú schopné fotosyntézy.

Medicínsky významné huby sa vyskytujú vo forme:

- vláknitej
- kvasinkovej

Vláknité formy sú charakteristické tvorbou vetviacich sa tubulárnych štruktúr hýf, ktoré sa predlžujú na konci. Môžu byť rozdelené priečnymi prepážkami – septami – septované hýfy, alebo sú mnohoadrové a duté – coenocytické hýfy. Sú ohraničené bunkovou stenou obsahujúcou chitín alebo celulózu. Vetviace sa hýfy vytvárajú sieť – mycélium. Existujú dva typy mycélií:

- trofické – (vegetatívne, bazálne)
- vzdušné – (reprodukčné)

Časť hýf vrastá do substrátu odkiaľ čerpá výživné látky a vytvára bazálne mycélium (podľa funkcie vegetatívne alebo trofické mycélium). Nad povrchom sa vytvára vzdušné mycélium s možnosťou oddeľovania húb, a ak sa na vláknach vytvárajú výtrusy – spóry – s funkciou rozmnožovacou, ide o reprodukčné mycélium.

Kvasinkové formy sú tvorené bunkami guľovitého alebo oválneho tvaru, ktoré môžu vytvárať retiazky. Sú jednobunkové reprodukujú sa sexuálne tvorbou blastokonídií pučaním alebo rozdelením. Počas rastu na tuhých pôdach vytvárajú typické kolónie jednobunkových kvasiniek:

- pravé kvasinky – netvorí podhubie (mycélium) – *Cryptococcus neoformans*
- kvasinkovité kolónie – smerom do hĺbky pôdy sa vytvárajú reťazce pučiacich buniek, ktoré sa vzájomne prepletajú a vytvárajú pseudomycélium (*Candida albicans*)

Kvasinkovité aj plesňové formy sú grampozitívne, pre histologické účely sa používa farbenie PAS (periodic acid Schiff). Znázornenie typickej a diagnostickej štruktúry hýf je možné pri kultivácii a pozorovaní svetelným mikroskopom v ryžovom agare. Kultivujú sa na krvnom agare, selektívnou pôdou pre kvasinkovité aj plesňové formy je Sabouraudov agar. Kvasinky

sa kultivujú pri 37 °C, plesne pri 20 °C niekoľko dní až týždňov. Pri kultivácii jednotlivé druhy húb vytvárajú charakteristické kolónie, spóry, hýfy, mycélia, ktoré sú dôležitými diagnostickými znakmi. Kolónie kvasiniek a plesní sa odlišujú vzhľadom, sfarbením, konzistenciou :

- pologuľovité, lesklé s hladkými okrajmi (*Candida sp.*), niekedy mukózne ukazujúce na prítomnosť púzdra (*Cryptococcus sp.*)
- ploché, zamatové (*Cladosporium sp.*), kôrovité (*Penicilium sp.*), zvrásnené, kráterovité (Dermatofyty)
- membránovité, matné (*Trichophyton sp.*)
- vypuklé, drsné (*Aspergillus sp.*)
- vatovité (*Alescheria sp.*)
- vláknité s rôzne dlhými vláknami (*Mucor sp.*)

Sfarbenie povrchu kolónií prípadne pôdy býva rôzne podľa produkovaných pigmentov a farby spór.

8.3.1.3 Rozmnožovanie húb

- pohlavne – vytvárajú sa tzv. gametangia, v ktorých sa formujú pohlavné bunky – gaméty
- nepohlavne – prostredníctvom štruktúr nazývaných sporangium, ktoré vytvárajú nepohlavné spóry. Sporangia vyrastajú na sporangiofórach a oboje sú rôznych foriem s diagnostickým významom.

Rozdelenie húb podľa spôsobu reprodukcie:

Zygomycety

- pohlavné rozmnožovanie spojením gametangií
- nepohlavné rozmnožovanie prostredníctvom sporangiospór
- tvorba mycéla coenocytického (nemá septá)
- *Rhizopus*, *Mucor*

Ascomycety

- pohlavné rozmnožovanie prostredníctvom ascospór
- nepohlavné rozmnožovanie – fragmentáciou hýf (chlamydospóry) alebo tvorbou konidiospór na konidiofóroch
- tvoria septované hýfy
- *Saccharomyces*

Basidiomycety

- pohlavné rozmnožovanie bazídiospórami tvorenými na bazídiách
- nepohlavné rozmnožovanie fragmentáciou hýf, tvoria conídiá
- tvoria septované hýfy so špeciálnymi spojeniami
- šampiňóny, Amanita

Deuteromycety

- pohlavné rozmnožovanie nebolo zistené – imperfektné huby
- nepohlavné rozmnožovanie – rôzne typy nepohlavných spór
- netvoria hýfy
- *Penicilinum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Geotrichon*, *Trichoderma*

8.3.1.4 Mykózy podľa primárnej lokalizácie infekčného procesu

Povrchové:

- povrchová vrstva kože a vlasov
- hlbšie vrstvy epidermis a vlasov

Hĺbkové:

- podkožné, podpovrchové – dermis, podkožné tkanivá, svaly
- systémové (s origom obvykle v pľúcach alebo črevách)

Samostatnú skupinu mykotických ochorení s ohľadom na imunopatogenézu tvoria oportúnne mykózy.

Mykotické infekcie sú často následkom predisponujúcich faktorov (vek, stres, patologické stavy – karcinómy, Diabetes mellitus, AIDS). Len dermatofyty a kandidózy sú prenosné interhumánne, ostatné sú akvirované z prostredia (rastliny, pôda, vzduch).

8.3.1.5 Typy postihnutia hubami

1. Mykóza – infekčné ochorenie spôsobené mikromycétami predovšetkým askomycétami a deuteromycétami

2. Mykotoxikóza – intoxikácia mykotoxínmi, ktoré sú vytvorené metabolizmom húb

- hubové intoxikácie – po požití plodníc makromycét

- vlastné mykotoxikózy – chronická intoxikácia – dlhodobé pôsobenie toxínu (aflatoxín) – kancerogenéza

3. Mykoalergóza – dlhodobé malé dávky vyvolajú hypersenzitívnu reakciu.

4. Zápalová reakcia

- imunopatologické následky spôsobené obrannou reakciou

- mycetizmy – mechanické podráždenie tkaniva

9 MOŽNOSTI OVPLYVNENIA POTENCIÁLU MIKROORGANIZMOV SPÔSOBIŤ OCHORENIE

V boji proti infekčným a mikrobiálnym ochoreniam je možné ovplyvniť patogénny potenciál mikroorganizmov v priebehu infekcie (antimikrobiálna terapia), alebo pred jeho vniknutím do organizmu, a to na úrovni mikroorganizmu (dekontaminácia) alebo na úrovni vnímavého hostiteľa (imunizácia).

9.1 Antimikrobiálna terapia

Antimikrobiálna terapia je komplex postupov používajúcich účinné prípravky na ciele zlikvidovanie mikroorganizmu a vyliečenie ochorení vyvolaných mikroorganizmami. Podľa cieľového mikroorganizmu sú to:

- antibakteriálne preparáty – antibiotiká v užšom zmysle slova. Patrí sem väčšina známych antibiotík a chemoterapeutík pôsobiacich proti G+ a G– baktériám, riketsiám a mykobaktériám
- antimykotické preparáty – látky účinné na plesne a kvasinky
- antiprotozoárne preparáty – látky, prípadne antibiotiká účinné na parazitárne červy, prvoky a améby
- antivírusové preparáty – prevažne chemoterapeutiká účinkujúce zastavením replikácie, prípadne šírenia vírusov v organizme

Antimikrobiálne látky (platí to predovšetkým pre antibiotiká a antimykotiká) môžu byť pre praktické použitie klasifikované podľa:

1. Účinku na cieľový mikroorganizmus – mikroorganizmus zabíjajú alebo zastavia jeho pomnožovanie – baktericídne alebo bakteriostatické
2. Spektra účinnosti – širokospektrálne, úzkospektrálne
3. Miesta účinkovania – inhibícia syntézy bunkovej steny, dezintegrácia celistvosti bunkovej steny, inhibícia celistvosti a syntézy plazmatickej membrány, inhibícia syntézy a integrity nukleových kyselín, inhibícia celistvosti a syntézy proteínov, atď.

Aj dezinfekčné prostriedky sú látkami účinkujúcimi proti mikroorganizmom. Vo vzťahu k mikroorganizmu môžu mať rovnaký účinok ako antibiotiká, ale vo vzťahu k makroorganizmu majú výrazne vyššiu toxicitu. Interval bezpečnosti, t. j. rozdiel medzi koncentráciou účinnou a toxickou, je malý alebo žiadny.

9.2 Antibiotiká

Antibiotiká sú látky produkované hubami alebo baktériami, ktoré majú cídny alebo statický účinok na iné mikroorganizmy. Už v malých koncentráciách sú schopné ich usmrtiť alebo zastaviť ich rast a rozmnožovanie. Iné v prírode sa nevyskytujúce synteticky získané látky s antimikrobiálnym účinkom alebo látky pôvodu iného ako mikrobiálneho používané terapeuticky na inhibíciu alebo usmrtenie mikroorganizmov nazývame chemoterapeutiká. Semisyntetické antibiotiká majú svoj pôvod v prírode, ale boli vytvorené alebo upravené chemicky.

Pôvod antibiotík v prírode – producentami ATB sú:

1. aktinomycéty (aminoglykozidy, tetracyklíny, makrolidy)
2. iné baktérie – predovšetkým bacily (bacitracín, polymyxín)
3. mikroskopické huby – penicilium
4. rastliny – fytoncidy

9.2.1 Účinok antibiotík na cieľovú bunku

Antibiotiká môžu mať dva typy účinku na cieľovú bunku. Tie, ktoré zabíjajú mikroorganizmus nazývame – cídne (baktericídne, fungicídne, vírusicídne). Tie, ktoré len inhibujú rast mikroorganizmu, sú bakteriostatické. Táto vlastnosť antibiotík ovplyvňuje ich výber podľa typu infekcie. Napr. baktericídne antibiotiká usmrcujú živé rastúce a rozmnožujúce sa baktérie. Tento účinok je významný v prvých štyroch hodinách po aplikácii lieku. Ak je v tomto období usmrtených 99 % baktérií, účinok je charakterizovaný ako klinicky relevantná baktericídia. Bakteriostatické antibiotiká len inhibujú rast, preto eliminácia mikroorganizmu závisí na fagocytóze a jej schopnosti usmrtiť mikroorganizmus. Prirodzené odumieranie kľudovej nemnožiacej sa populácie nie je bakteriostatickými antibiotikami ovplyvnené. Dĺžka terapie je tiež ovplyvnená touto vlastnosťou. Bakteriostatické antibiotiká sa podávajú dlhšie (minimálne 10 dní).

Baktericídne antibiotiká – penicilíny, streptomycín, aminoglykozidy, cefalosporíny

Bakteriostatické antibiotiká – sulfonamidy, tetracyklín, chloramfenikol

9.2.2 Kombinovanie antibiotík

Antibiotiká je možné kombinovať za účelom dosiahnutia vyššieho účinku alebo nižšej toxicity. Súčasné pôsobenie antibiotík sa môže prejavovať ako účinok:

- synergický

- antagonistický
- neutrálny

Synergický účinok sa prejaví účinkom vyšším ako by bol súčet účinnosti každého z podaných antibiotík. Napríklad podanie dvoch bakteriostatických antibiotík má účinok porovnateľný s účinkom baktericídneho antibiotika. Antagonistický účinok sa prejaví znížením účinnosti všetkých kombinovaných antibiotík pri súčasnom podaní. (podanie baktericídneho antibiotika súčasne s bakteriostatickým neumožní uplatnenie sa účinku baktericídneho antibiotika).

9.2.3 Spektrum účinnosti

Účinnosť antibiotík charakterizuje aj rozsah ich aktivity alebo spektrum účinnosti. Úzkospektrálne antibiotiká sú látky pôsobiace len na relatívne malý počet organizmov. Niektoré antibiotiká proti G⁺ baktériám môžu byť charakterizované ako úzkospektrálne (penicilín, oxacilín, polymyxín). Širokospektrálne antibiotiká majú účinok na všetky prokaryotické bunky s výnimkou mykobaktérií a pseudomonád (chloramfenikol, tetracyklín). Medzi týmito hraničnými skupinami existujú prechody – antibiotiká s rozšíreným spektrom účinku na G⁺ a väčšinu G⁻ infekcií (sulfonamidy, aminoglykozidy, ampicilín, cefalosporíny I. a II. generácie). Antimykobakteriálne prípravky – izoniazid, etambutol – sú úzkospektrálne z pohľadu spektra účinnosti. Streptomycín, rifampicín – sú používané takmer výhradne len proti mykobaktériám, hoci ich spektrum účinnosti je široké.

9.3 Miesto pôsobenia alebo mechanizmus účinku v cieľovej bunke

Antibiotiká môžu ovplyvniť integritu jednotlivých súčastí cieľovej mikrobiálnej bunky alebo zabrániť ich syntéze. Najčastejšie cieľové štruktúry mikrobiálnej bunky (baktérie, kvasinky, plesne) sú bunková stena, plazmatická membrána, proteíny, nukleové kyseliny a procesy, pri ktorých vznikajú (Tab. 2.):

Cieľová štruktúra	Antimikrobiálna látka
Zmena integrity bunkovej steny	lyzozým
Inhibícia syntézy bunkovej steny	
Biosyntéza cytoplazmatických enzýmov	cykloserín, fosfomycín
- polymerizácia podjednotiek	betalaktámy
- fosfolipidové nosiče viazané na PM	bacitracín
- väzba s molekulami bunkovej steny	vankomycín
Zmena integrity plazm. membrány	polyény, polypeptidy
Inhibícia syntézy plazm. membrány	
Zmena integrity NK	alkylujúce látky, chlorochín

Inhibícia syntézy NK	
- metabolizmus DNA	5-fluorocytozín, acyklovir
- replikácia DNA	kys. nalidixová, novobiocín, nitroimidazol
- syntéza RNA	rifampicín
Zmena proteínov	fenoly, ťažké kovy
Inhibícia syntézy proteínov	
- 30S jednotky ribozómov	streptomycín, kanamycín, tetracyklín
- 50S jednotky ribozómov	chloramfenikol, makrolidy
- metabolizmus kys. listovej	sulfonamidy, trimetoprim

Tab. 2. Miesto pôsobenia antibiotík.

9.4 Rezistencia

Nárast rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká sa stáva stále významnejším a niektoré mikroorganizmy už nie sú postihnuteľné dostupnými antibiotikami.

Objavujú sa kmene, u ktorých nie je k dispozícii žiadne známe antibiotikum, alebo zostalo len jedno z celej škály pôvodne účinných preparátov (niektoré MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* a pod.). Rezistencia dosiahla dnešné rozmery a stala sa problémom na základe mnohých nerozumných zásahov do ekológie človeka a mikroorganizmov, nadmerného a nesprávne indikovaného užívania antibiotík, používania antibiotík v poľnohospodárstve, neprezieravej antibiotickej politike. Rezistencia na antibiotiká je podmienená geneticky. Pôvodne účinné antibiotikum sa stane neúčinným na určitý mikroorganizmus zmenou genetickej informácie mikroorganizmu (mutáciou) alebo prenosom informácie (rekombináciou). Medzikmeňový prípadne medzidruhový prenos rezistencie sa uskutočňuje prenosom genetickej informácie mechanizmom transdukcie, konjugácie, transformácie. Rezistencia baktérií na antibiotiká môže byť získaná na úrovni chromozomálnej mutácie alebo môže vzniknúť a šíriť sa extrachromozomálne uloženou informáciou v plazmide. Chromozomálne mutácie sa vyskytujú spontánne s rôznou frekvenciou a ich výskyt nie je závislý na prítomnosti farmaka. Šíria sa pri dedení na ďalšie generácie alebo pri infekcii bakteriofágom sa môžu preniesť na iný kmeň alebo iný druh.

Plazmidy – extrachromozomálna DNA nesie obmedzené množstvo genetickej informácie obvykle nepotrebné pre život baktérie, ale nesie informácie zvýhodňujúce baktériu v nepriaznivom prostredí, napr. informáciu o rezistencii na antibiotikum, resp. o syntéze mechanizmov zabezpečujúcich takúto rezistenciu. Plazmidy sú prenositeľné v rámci druhu aj medzidruhovo a prispievajú k šíreniu rezistencie. Aj DNA plazmidu môže podliehať

mutáciám a prenos takejto informácie je častejší na ďalšie kmene prostredníctvom bakteriofágu.

1. Primárna rezistencia – geneticky podmienená necitlivosť baktérie na niektoré antibiotiká z dôvodu neexistencie cieľových štruktúr (rezistencia mykoplazmiem na antibiotiká účinkujúce na úrovni bunkovej steny).

2. Sekundárna rezistencia – vzniká v priebehu alebo po liečbe antibiotikom, kedy sa selektujú rezistentné bakteriálne kmene.

3. Mutačná rezistencia – vzťahuje sa k predchádzajúcej liečbe antibiotikom. Na základe mutácie sa baktérie stali rezistentnými, a ďalej sa množia v bakteriálnej populácii až postupne prevládajú. Môže sa vyvinúť aj v priebehu terapie.

4. Prenosná rezistencia – sprostredkovaná plazmidmi, obvykle sekundárna rezistencia. Častejšia u G⁻ baktérii. Prenos je možný konjugáciou, kedy plazmid nesúci informáciu kódujúcu systémy pre vznik rezistencie, nesie obvykle aj informáciu kódujúcu vznik pilusu na jej prenos na inú bunku.

5. Skrížená rezistencia – znamená súčasnú necitlivosť na ATB s podobnou chemickou štruktúrou a rovnakým mechanizmom účinku.

6. Inducibilná rezistencia – prítomnosť antibiotika navodí syntézu štruktúr spôsobujúcich jeho poškodenie a tým stratu účinnosti.

9.4.1 Mechanizmy vzniku rezistencie

- alterácia receptorov mikroorganizmu pre liek
- sťažený vstup antibiotika do bunky
- zníženie koncentrácie antibiotika v bunke, efflux
- deštrukcia alebo inaktivácia lieku enzýmami mikroorganizmu

Alterácia receptorov a enzýmov je mechanizmom vzniku rezistencie na:

1. betalaktámy – zmena na úrovni PBP, znížená afinita receptorov pre PNC tzv. PBP
2. makrolidy – metylácia 2 adenín reziduí 50S subjednotiek
3. rifampicín – zmena jedinej aminokyseliny v RNA polymeráze
4. sulfonamidy – alterácia syntetázy, ktorá prednostne viaže PABA (para-aminobenzoová kyselina)
5. trimetoprim – alterovaná reduktáza
6. kyselina nalidixinová – zmena gyrázy
7. streptomycín – zmena proteínu na 30S podjednotke

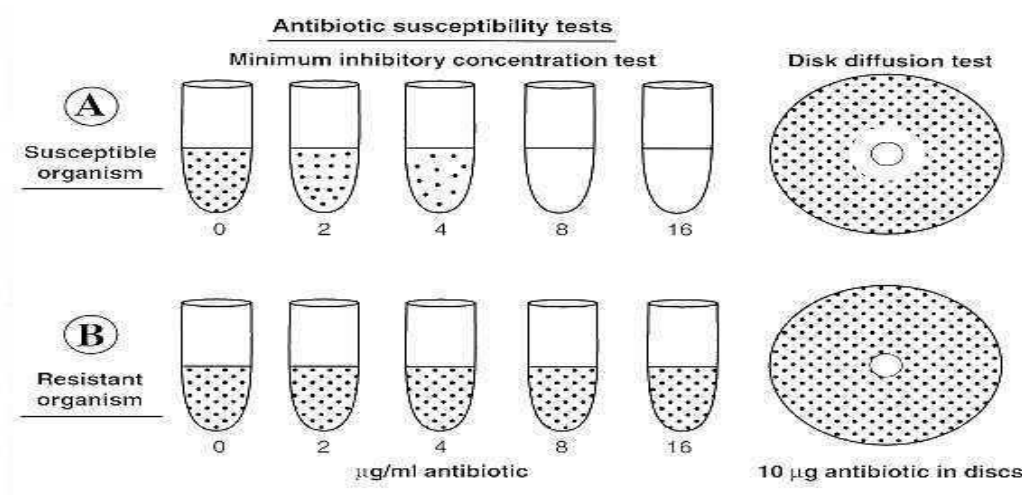
Sťažený vstup:

1. tetracyklín – redukovaný aktívny transport
2. fosfomycín – porucha transportu glc-6-fosfátu

Efflux – únik antibiotika z napadnutej baktérie

Deštrukcia alebo inaktivácia:

1. chloramfenikol transferáza – acetylácia chloramfenikolu
2. betalaktamáza, cefalosporináza – narušenie betalaktámového alebo cefalosporínového kruhu
3. aminoglykozidy – acetylácia a fosforylácia prípravku pri prechode membránou



Obr. 41. Testovanie citlivosti na antibiotiká.

http://www.politicsandthelifesciences.org/Biosecurity_course_folder/print/u3s5_tests.html

9.4.1.1 Betalaktamázy

Produkcia enzýmov inaktivujúcich účinnosť antibiotík pôsobiacich na úrovni syntézy bakteriálnej steny je klinicky najčastejším mechanizmom vzniku rezistencie baktérií na ATB. Betalaktamázy sú enzýmy schopné hydrolyzovať betalaktámové antibiotiká (penicilínázy pre penicilíny, cefalosporinázy pre cefalosporíny) čím strácajú svoju antimikrobiálnu účinnosť. Klasifikujeme ich podľa biochemických a funkčných vlastností, prípadne podľa molekulovej štruktúry enzýmu.

Klasifikácia podľa funkcie identifikuje 4 skupiny: 1, 2a, b, c, d, 3, 4.

Klasifikácia podľa molekulovej štruktúry identifikuje triedy: A,B,C,D

Najznámejšie sú tzv. ESBL – expanded spectrum beta lactamase - (betalaktamázy s rozšíreným spektrom) – patria sem betalaktamázy TEM-1, TEM-2, SHV-1, CTX-M, AmpC. Ich producentami sú najčastejšie *Enterobacteriaceae*, G– nefermentujúce paličky (*Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*).

9.5 Nežiadúce a toxické účinky

Antibiotiká môžu zachraňovať život, ale predstavujú určitý zásah do ekológie človeka, alebo môžu mať iné nežiadúce či toxické účinky. Ich závažnosť je podmienená podobnosťou cieľových štruktúr mikroorganizmu a človeka, na ktoré pôsobia. Príkladom je netoxickosť penicilínových preparátov účinkujúcich na úrovni bunkovej steny – štruktúry, ktorá neexistuje u človeka. Na druhej strane je faktom výrazná toxicita antivírusových preparátov pri celkovom podaní vzhľadom na intracelulárnu lokalizáciu vírusu a závislosť životaschopnosti vírusov od procesov napadnutej (ľudskej) bunky.

9.5.1 Nežiadúce účinky

Nežiadúce účinky antibiotík vznikajú pri obvyklých dávkach a doporučovaných farmakoterapeutických koncentráciách dosahovaných v telesných tekutinách a tkanivách. Medzi najčastejšie prejavy patria alergie a biologické efekty. **Alergie** sú obvyklé po predchádzajúcej senzibilizácii vyvolanej aj minimálnou dávkou daného antibiotika, napríklad kontaktom (pri podávaní a príprave lieku). Sú časté u penicilínových preparátov. Ich prejavom môžu byť polymorfné exantémy, eozinofília, edémy, konjunktivitída, anafylaktický šok. Závažnejšie prejavy sú po parenterálne podávaných antibiotikách a reakcia môže vzniknúť na ktorúkoľvek súčasť antibiotického prípravku (pomocné látky v liekových formách). **Biologické efekty** podania antibiotík súvisia obvykle so zmenami fyziologickej mikroflóry a s narušením stavu eumikróbie slizníc a kože. Sú časté pri podávaní širokospektrálnych antibiotík. Súvisia s lokálnym prerastaním kvasiniek a rezistentných baktérií a prejavia sa ako kandidóza úst, sliznice vagíny, hnačky, dyspepsia, hypovitaminóza K až pseudomembranózna enterokolitída pri prerastaní anaeróbnych baktérií.

9.5.2 Toxické účinky

Toxické účinky vznikajú pri vysokých dávkach a vysokých plazmatických koncentráciách antibiotík, prípadne pri zvýšenej reaktivite alebo poškodení organizmu. Antibiotiká môžu mať hematotoxické, nefrotoxické, hepatotoxické alebo neurotoxické účinky. U každého antibiotika

sa stanovuje interval medzi účinnou a toxickou koncentráciou lieku. Čím je tento interval širší (terapeutická koncentrácia je niekoľkokrát nižšia ako toxická), tým je prípravok bezpečnejší. Pri niektorých liekoch nie je možné sa vyhnúť určitému toxickému účinku ani pri terapeutických koncentráciách, čo sa môže prejaviť klinicky. V takom prípade je potrebné pacienta aktívne monitorovať za účelom vyhľadania príznakov toxicity. Toxicitu je možné znížiť kombináciou antibiotík so synergickým účinkom, kedy na dosiahnutie rovnakého terapeutického efektu ako pri jednom preparáte, postačí nižšia dávka toxického preparátu spolu s iným liekom s nižšou alebo inou toxicitou. (príkladom je antituberkulózna liečba).

9.6 Racionálna antibiotická terapia

Najideálnejším prístupom pri terapii antibiotikami a chemoterapeutikami je cieľená liečba, pri ktorej je najskôr izolovaný pôvodca infekcie a následne je určená jeho individuálna citlivosť na antibiotikum. Podľa citlivosti sa zvolí najvhodnejšie antibiotikum pri zohľadnení typu infekcie, lokalizácie, veku pacienta, prípadne sprievodných ochorení. Takáto terapia sa používa pri chronických infekciách vyvolaných vysokorezistentnými pôvodcami alebo pri infekcii nozokomiálnymi kmeňmi u hospitalizovaných pacientov. Pri akútnych infekciách a v bežnej praxi lekára prvého kontaktu sa postupuje empiricky – antibiotikum sa volí podľa lokalizácie infekcie, na základe znalostí spektra najčastejších vyvolávateľov a prehľadov rezistencie mikroorganizmov na dostupné antibiotiká v danej geografickej oblasti alebo pre danú populáciu. Takýto prístup vyžaduje správne zhodnotenie klinického stavu (odlíšenie bakteriálnej infekcie od vírusovej), znalosť najčastejších patogénov (*Streptococcus pyogenes* pre bakteriálnu tonzilitídu, *E.coli* pre infekciu močových ciest v komunite) a znalosť stavu rezistencie daného vyvolávateľa v oblasti a jej správnu interpretáciu (viac ako 99 % kmeňov *Streptococcus pyogenes* je citlivých na PNC. Rezistencia viac ako 15 % kmeňov určitého druhu (napr. *Haemophilus sp.*) na určité antibiotikum (napr. ampicilín) neumožňuje jeho empirické podanie. Ak nie je možné preukázať pôvodcu infekcie, pristupuje sa k tzv. intervenčnej liečbe. Je to postupná liečba, ktorá je začatá okamžite a v prípade neúčinnnej iniciálnej terapie sa pristúpi ku zmene antibiotika. Takýto postup je možný len pri ľahších infekciách, alebo ak nie je možné čakať na výsledok a neexistuje také širokospektrálne antibiotikum, ktoré by pokrylo všetkých pravdepodobných vyvolávateľov (napr. bakteriálna pneumónia môže byť spôsobená napr. *Str. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, anaeróbne baktérie a ďalšími). U život ohrozujúcich infekcií (bakteriálna meningitída) s rýchlym nástupom ťažkého klinického stavu a možnosťou trvalých následkov sa volí širokospektrálna liečba antibiotikom alebo kombináciou, ktorá pokryje celé spektrum potenciálnych pôvodcov (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* u detí do 3. rokov života, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* u novorodencov – cefalosporíny III. generácie). V prípade empirickej alebo intervenčnej terapie je potrebné dodržiavať určité opatrenia na zabezpečenie účinnosti používaných antibiotík. Rovnako je potrebné dodržiavať opatrenia na zabránenie vzniku a šírenia rezistencie v nemocničnom prostredí alebo komunite. Medzi takéto opatrenia patrí:

- správne indikovanie terapie antibiotikami,
- určenie individuálnej citlivosti kmeňa na ATB, pokiaľ to je možné,
- dodržiavanie odporúčanej dávky a doby podávania (škodlivé je zvyšovanie dávky a predlžovanie terapie, rovnako ako znižovanie a skracovanie),
- používanie účinných antibiotík s dostatočnými, ale nie nevyhnutne najlepšimi parametrami (uchovanie tzv. rezervných antibiotík),
- rotácia antibiotík (stiahnutie niektorých stále účinných, ale často používaných antibiotík pri zaznamenaní znižujúcej sa citlivosti a jeho nahradením iným na určitú dobu iným antibiotikom) za účelom zamedzenia vzniku inducibilnej rezistencie,
- podanie ATB bez stanovenia citlivosti na základe prehľadov a aktuálnej situácie v danej oblasti.

9.6.1 Stanovenie citlivosti mikroorganizmov na antibiotiká

Na stanovenie citlivosti mikroorganizmu na antibiotiká a určenie stavu rezistencie *in vitro* za účelom predpovedania úspešnosti terapie sa používajú laboratórne testy difúzne alebo dlučné, kvantitatívne alebo kvalitatívne. Najčastejšie sa v praxi používa:

- určenie difúznej diskovej citlivosti
- určenie MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie)
- určenie MBC (minimálnej baktericídnej koncentrácie)
- určenie kvantitatívnej citlivosti prostredníctvom E-testov
- stanovenie mechanizmov rezistencie
- stanovenie účinku kombinácie antibiotík

Podrobné popisy metodík sú v príslušnej literatúre (návody na praktické cvičenia).

9.6.1.1 Difúzny diskový test

Je to najčastejšie používaná metóda kvalitatívneho stanovenia citlivosti. Používa sa pri ňom disk z filtračného papiera napustený presne stanovenou koncentráciou antibiotika. Takýto disk sa umiestni na povrch kultivačného média s husto naočkoványm testovaným kmeňom. Počas kultivácie antibiotikum z disku difunduje do kultivačného média do určitej vzdialenosti. Pokiaľ je účinné na daný kmeň spôsobí kruhovú zónu inhibície rastu mikroorganizmu. Pre jednotlivé mikroorganizmy a antibiotiká existujú tzv. break pointy – hraničné hodnoty šírky inhibičnej zóny, za ktoré nemôže baktéria rásť, pokiaľ je dané antibiotikum na testovaný mikroorganizmus účinné. Výsledkom je určenie citlivosti alebo rezistencie mikroorganizmu na dané antibiotikum (C, R., +, -). Používanie tretej charakteristiky I alebo intermediárna, +/- citlivosť sa neodporúča, pretože vnáša neistotu do hodnotenia.

9.6.1.2 Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie

Je to kvantitatívny dilučný test, pri ktorom sa pre daný mikroorganizmus a určité antibiotikum stanovuje najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá inhibuje rast a rozmnožovanie baktérie *in vitro*. V rade skúmaviek sa nariedi antibiotikum v klesajúcich koncentráciách a do roztokov sa naočkuje rovnaké inokulum testovaného kmeňa. Koncentrácia antibiotika v poslednej skúmavke v rade, v ktorej sa vytvoril zákal ako znak rozmnoženia inokulovaného kmeňa, zodpovedá MIC – minimálnej inhibičnej koncentrácii, t.j. minimálnej koncentrácii antibiotika, ktorá zastaví rast a rozmnožovanie kmeňa. Na základe porovnania tejto koncentrácie a znalosti koncentrácie antibiotika, ktorá sa dosiahne pri bežnom dávkovaní v krvi alebo tkanivách pacienta, je možné určiť (na základe break pointu) účinnosť antibiotika a jeho vhodnosť pre použitie. Čím je dosiahnutá MIC pre danú baktériu nižšia v porovnaní s koncentráciou break pointu, tým je antibiotikum účinnejšie. Sledovanie dynamiky vývoja minimálnych inhibičných koncentrácií určitého antibiotika pre určitý mikroorganizmus umožní predpovedať blížiaci sa nástup rezistencie.

9.6.1.3 Minimálna baktericídna koncentrácia

Je to najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá usmrť mikroorganizmus. Zisťuje sa vyočkovaním kultúry mikroorganizmu kultivovanej v rôznych koncentráciách antibiotika z radu skúmaviek z MIC testu na agarovú platňu. Najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá usmrť mikroorganizmy a znázorni sa tým, že po vyočkovaní skúmavky a kultivácii nenarastú na platni žiadne baktérie, je baktericídna (MBC).

9.6.1.4 E-test

Technicky sa testovanie uskutočňuje podobne ako pri difúznom diskovom teste. Mikroorganizmus je husto naočkovaný na kultivačné médium a na povrch sa priloží prúžok napustený rôznymi koncentráciami antibiotika (gradient koncentrácií). Po vykultivovaní sa vytvorí zóna inhibície, ktorá má tvar slzy, dotýkajúcej sa najužšou časťou prúžku s antibiotikom v mieste koncentrácie zodpovedajúcej MBC.

Difúzne aj dilučné testy majú svoje opodstatnenie, výhody aj nevýhody. Difúzny test je kvalitatívny, mikroorganizmus vidíme rásť na kultivačnej pôde a môžeme identifikovať prípadnú kontamináciu inokula alebo iné vlastnosti, ktoré znehodnocujú výsledok. Dilučný test poskytuje kvantitatívne výsledky, nie je však možné vidieť prípadnú kontamináciu alebo viacero druhov kmeňov. Výhody obidvoch typov testov spája E-test. Je to kvantitatívny difúzny test. E-test predstavuje prúžok napustený stúpajúcou koncentráciou antibiotika. Je umiestnený na agarovú platňu naočkovanú testovaným kmeňom. Antibiotikum difunduje podľa rôznej koncentrácie rôzne ďaleko od prúžku. V mieste, kde sa rast baktérie priblíži až k prúžku, sa odčíta minimálna inhibičná, resp. baktericídna koncentrácia.

9.6.1.5 Testovanie mechanizmov rezistencie

Mechanizmy rezistencie sa obvykle prejavujú určitým fenotypom citlivosti. Podľa charakteristickej citlivosti mikroorganizmov na určité antibiotiká je možné identifikovať typ rezistencie mikroorganizmu. Preto interpretácia laboratórne zistenej citlivosti mikroorganizmu na antibiotiká nie je identická s klinickou a musí sa uskutočňovať na základe existujúcich znalostí (skrížená rezistencia, prirodzená rezistencia, zastupiteľnosť prípravkov, dosiahnuteľné hladiny v zdraví, zmeny farmakodynamiky lieku pri chorobe alebo v určitých tkanivách, rozdielny prienik antibiotika do zdravého tkaniva alebo poškodeného zápalom).

9.6.1.6 Súčasné pôsobenie viacerých antibiotík

Testuje sa difúznym diskovým testom, umiestnením dvoch antibiotických diskov vedľa seba. Synergizmus sa prejaví ako rozšírenie zóny inhibície, antagonizmus ako zúženie zóny inhibície. Rovnakým spôsobom sa testujú aj niektoré mechanizmy pôsobenia a vzniku rezistencie na ATB, ktoré sa môžu prejavovať rôznou deformáciou zóny inhibície.

9.7 Pôsobenie antibiotík podľa miesta účinku

9.7.1 Inhibícia syntézy bunkovej steny

Syntéza bakteriálnej steny je katalyzovaná enzýmami (transpeptidázy, endopeptidázy), ktoré vsunú syntetizovanú štrukturálnu molekulu do postupne skladajúcej sa bunkovej steny. Tieto enzýmy sa nazývajú tiež penicillin binding proteins – penicilín viažuce proteíny. Penicilíny sa dokážu naviazať na tieto enzýmy, čím dôjde k ich inaktivácii, neuzavretiu štruktúry bunkovej steny a k osmotickej lýze bakteriálnej bunky.

9.7.1.1 Betalaktámové antibiotiká

Patria sem penicilíny a cefalosporíny. Základnou štruktúrou je tzv. betalaktámový kruh.

Penicilíny

Z hľadiska chemickej štruktúry sú derivátmi 6-aminopenicilánovej kyseliny. Na jej aminoskupinu je možné naviazať rôzne radikály, čím vznikajú rôzne deriváty penicilínu. Charakter postranných reťazcov ovplyvňuje antibakteriálnu aktivitu prípravkov (spektrum). Antibakteriálny účinok závisí od afinity k väzobným proteínom (PBP – penicillin binding proteins), schopnosti penetrovať cez bakteriálnu bunkovú stenu, dostupnosti penicilínových receptorov a obsahu peptidoglykánu v bunkovej stene.

Penicilínové preparáty:

- penicilín G – parenterálny liek s účinkom na streptokokové, pneumokokové infekcie
- penicilín V – p. o. penicilín
- antistafylokokové penicilíny, odolné voči stafylokokovým penicilinázam – oxacilín, metilicilín
- penicilíny s rozšíreným spektrom na G– baktérie – ampicilín, amoxicilín
- a parenterálne penicilíny s rozšíreným spektrom aj na klebsiely, enterobaktérie a pseudomonády – karbenicilín, tikarcilín, piperacilín

Cefalosporíny

Sú betalaktámové antibiotiká, základná štruktúra je tvorená 7-aminocefalosporánovou kyselinou pôvodne izolovanou z huby *Cephalosporium*. Cefamycíny sú preparáty podobné ako cefalosporíny. Rozdiel je v substitúcii síry v dihydrothiazínovom kruhu v pozícii 5 kyslíkom, čo ich robí odolnejšími voči betalaktamázam. U cefalosporínov je v tejto pozícii síra. Majú rovnaký mechanizmus pôsobenia, ale širšie spektrum a lepšie farmakologické vlastnosti ako penicilíny.

Typy generácií cefalosporínov so zastupiteľnými preparátmi

- I. generácia – spektrum podobné penicilínu a ampicilínu (cefalotín, cefazolín, cefalexín)
- II. generácia – rozšírené spektrum na hemofily, anaeróbne baktérie, enterobakteriaceae (cefuroxim, cefamandol, cefoxitin, cefaclor)
- III. generácia – protipseudomonádové, G+ koky (cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim)
- Ďalšie generácie – zlepšenie farmakologických vlastností

Na cefalosporíny sú rezistentné na PNC rezistentné streptokoky, oxacilín rezistentné stafylokoky, enterokoky, listerie. To znamená, že existuje skrížená rezistencia s penicilínom u streptokokov, oxacilínom u stafylokokov, enterokokov a listérií. Vývoj rezistencie je možný aj počas terapie, a potom je skrížená s ostatnými betalaktamovými ATB.

Karbapenemy

Spájajú účinok penicilínov a širokospektrálnych cefalosporínov. Sú širokospektrálne, baktericídne. Pokrývajú takmer celé spektrum baktérií a majú rovnaký mechanizmus účinku ako ostatné betalaktámy. Imipenem má spektrum účinnosti na všetky G+ baktérie a mnohé G– baktérie s výnimkou niektorých pseudomonád, enterokokov. Aplikuje sa parenterálne.

Monobaktamy

Majú úzke spektrum účinnosti na gramnegatívne paličky. S úspechom sa používajú na enterobakteriaceae a predovšetkým pseudomonády.

Rezistencia na penicilíny má niekoľko príčin:

- produkcia betalaktamáz – enzýmov, ktoré otvárajú betalaktámový kruh. Tieto enzýmy je možné inaktivovať inibítormi betalaktamáz (kyselina klavulánová, sulbaktam). Tieto inhibítory sú samotne slabo účinné, ale v kombinácii s penicilínovými preparátmi (ampicilín, amoxicilín, ticarcilín) sú účinné pri liečbe betalaktamázu produkujúcich baktérii. Inhibitor betalaktamázy inaktivuje bakteriálnu betalaktamázu, čím umožní penicilínu vstup do baktérie
- neprítomnosť príslušných väzbových receptorov
- zlá penetrácia cez bunkovú stenu baktérie
- neprítomnosť bakteriálnej steny
- kľudové štádium baktérie (bez syntézy bunkovej steny)

Pôvodne účinné penicilínové antibiotikum sa stáva rezistentným

- mutáciou na úrovni porínových proteínov, cez ktoré ATB prestupuje cez bunkovú stenu G– baktérií (*Pseudomonas aeruginosa* na imipenem)

- mutácia na úrovni PBP (*S. aureus* na oxacilín, *Str. pneumoniae* na PNC) – ich mutácia spôsobí neschopnosť viazať penicilín, čo sa prejaví neschopnosťou ATB zabrániť tvorbe celistvej bunkovej steny
 - hydrolýza antibiotika betalaktamázami prenosnými plazmidmi
- Nežiadúce účinky: alergická reakcia, neutropénia.

9.7.1.2 Ostatné ATB pôsobiace na úrovni bunkovej steny

Vankomycín

Producentom sú aktinomycéty. Chemicky je to komplex glykopeptidov, ktoré interferujú so syntézou bunkovej steny predovšetkým G⁺ baktérií, u ktorých blokuje tvorbu peptidoglykánových reťazcov. Inhibuje tvorbu prekursorov peptidoglykátu. Je neúčinný proti G⁻ baktériám, pretože molekula je príliš veľká, aby prenikla cez vonkajšiu membránu. Používa sa pri liečbe oxacilín rezistentných stafylokokov (MRSA). Rezistencia na vankomycín sa objavuje u baktérií s poškodením terminálnych častí reťazcov peptidoglykátu, alebo u kmeňov produkujúcich proteín, ktorý zabraňuje väzbe vankomycínu na receptory. Prirodzene rezistentné sú laktobacily, erysipelotrix. Získaná rezistencia bola zaznamenaná už aj u niektorých kmeňov stafylokokov a enterokokov.

Bacitracín

Chemickou štruktúrou je polypeptid, ktorý inhibuje syntézu bunkovej steny poškodením lipidových nosičov zodpovedných za transport peptidoglykánových prekursorov cez cytoplazmatickú membránu do bunkovej steny. Môže poškodzovať aj samotnú cytoplazmatickú membránu a inhibovať RNA transkripciu. Pre vysokú toxicitu sa používa len lokálne na liečbu infekcií grampozitívnymi baktériami.

Cykloserín, ethionamid, izoniazid

Antimykobakteriálne preparáty inhibujú syntézu súčastí bunkovej steny inhibíciou enzýmov alebo interferenciou replikácie mykobaktérií. Rezistencia je spôsobená redukovaným príjmom lieku do bakteriálnej bunky alebo zmenou cieľových štruktúr.

9.7.2 Poškodenie plazmatickej membrány

Polymyxíny – chemická štruktúra predstavuje vetvené cyklické deka-peptidy, ktoré deštruujú cytoplazmatickú membránu citlivých baktérií, predovšetkým G⁻ baktérií väzbou na jej lipidové a proteínové štruktúry. Narúšajú tak hlavne bariérovú funkciu cytoplazmatickej membrány účinkom podobným detergentom. Pre pomerne vysokú nefrotoxicitu sa používajú

len lokálne v liečbe infekcií ucha, oka a kože (polymyxín). Rezistencia vzniká, ak antibiotikum nie je schopné prejsť cez bunkovú stenu k cytoplazmatickej membráne. Predstaviteľmi antibiotík účinkujúcich na úrovni bunkovej membrány sú predovšetkým polyénové antifungálne antibiotiká (amfotericín, nystatín).

9.7.3 Inhibícia syntézy proteínov

Aminoglykozidy

Chemickou štruktúrou aminoglykozidov je streptozamín alebo podobný cyklický aminoalkohol glykozidicky viazaný s dvoma cukrami. Látky, produkované *Streptomyces sp.* majú koncové prípony – mycín (streptomycín, tobramycín, kanamycín). Látky produkované mikromonospórami majú príponu – micín (gentamicín, netilmicín). Spoločným mechanizmom účinku je inhibícia proteosyntézy na úrovni bakteriálnych ribozómov (irrevezibilná väzba na ribozómy). Mechanizmom účinku je indukcia chybných translácií. Väzba aminoglykozidov na ribozómové podjednotky zabráni tvorbe polyzómov. Aminoglykozidy sú širokospektrálne a baktericídne antibiotiká. Spektrum účinku zahŕňa G⁻ paličky, vrátane pseudomonád a niektoré G⁺ organizmy. Ich účinok je baktericídny. Účinkujú aj v kludových a proliferačných fázach baktérií a majú veľmi silný synergický účinok s betalaktámovými antibiotikami. Streptokoky a anaeróby nie sú citlivé na aminoglykozidy. Rezistencia je spôsobená:

- produkciou deštruujúcich enzýmov (fosforyláza a adenyláza) – rozdiely medzi aminoglykozidmi súvisia s ich citlivosťou na tieto enzýmy
- mutáciou väzobných miest ribozómov – je zriedkavá s výnimkou enterokokov, na terapiu, ktorých je obvykle potrebné využiť synergizmus antibiotík účinkujúcich na bunkovú stenu a aminoglykozidov, preto je táto rezistencia klinicky významná
- zníženým príjmom ATB do bunky – vyskytuje sa u pseudomonád a anaeróbných baktérií

Prípravky:

- Amikacín. Vzhľadom na vyššiu stabilitu a zriedkavú rezistenciu sa používa pri liečbe baktérií rezistentných na iné aminoglykozidy.
- Kanamycín. Napriek širokému spektru sa používa zriedkavo, kvôli neúčinnosti na pseudomonády a toxicitu.
- Streptomycín. Napriek širokému spektru sa využíva takmer výlučne na liečbu mykobakteriálnych infekcií v kombinácii s ATB účinkujúcimi na úrovni bunkovej steny. Účinný je aj pri liečbe tularémie. Je to parenterálne aplikovaný liek, ktorý sa nevstrebáva takmer vôbec z GIT. Nežiaduce účinky a toxicita sú klinicky významné a je potrebné ich

monitorovať v priebehu terapie i po jej skončení. Tobramycín, gentamicín, netilmicín majú ototoxické účinky (s klesajúcou tendenciou).

Tetracyklíny

Sú širokospektrálne antibiotiká s naftacénovým kruhom s naviazanými postrannými reťazcami. Mechanizmom účinku je inhibícia proteosyntézy zablokovaním inkorporovania aminokyselín do vznikajúceho peptidového reťazca. ATB blokuje väzbu tRNA na ribozóm. Táto väzba je slabá. Tetracyklínové antibiotiká sú bakteriostatické. Majú dobrý prienik do tkanív. Využívajú sa pri liečbe infekcií kostí, periapikálnych abscesov zubných koreňov (tetracyklín, doxycyklín). Spektrum je veľmi široké, sú účinné na mikroorganizmy bez bunkovej steny (mykoplazmy, L-formy, ureaplazmy), na chlamýdie, riketsie a väčšinu intracelulárnych baktérií a bakteriálnych vyvolávateľov zoonóz, anaeróbne baktérie, stafylokoky. Nie sú účinné na pseudomonády. Rezistencia je spôsobená effluxom – odplavením antibiotika z bunky a je prenosná plazmidom. Vznik rezistencie v priebehu infekcie je zriedkavý. Vyskytuje sa aj rezistencia spôsobená alteráciou väzbových proteínov pôvodne citlivej bakteriálnej bunky. Nežiaduce účinky sú časté a početné. Obvyklé sú žalúdočné a črevné obtiaže, poškodenie pečene, fotodermatóza, alergia, žlté zafarbenie zubov (aj vyvíjajúcich sa), vzostup intrakraniálneho tlaku, poškodenie obličiek, poruchy srdcového rytmu. Pri intravenózne aplikácii sú časté lokálne prejavy podráždenia.

Chloramfenikol

Chemická štruktúra je odvodená od esenciálnej aminokyseliny fenylyalanínu, ktorý s mastnými kyselinami vytvára estery, ktoré nemajú antibakteriálny účinok. V tele sa hydrolýzou uvoľňuje voľný chloramfenikol. Mechanizmus účinku je spôsobený väzbou na 50S podjednotku, čím vzniká inhibícia transportu RNA na ribozómoch a tlmí sa syntéza proteínov. Spektrum účinku je veľmi široké. Účinkuje výborne na G– baktérie, salmonely, chlamýdie, mykoplazmy, leptospiry, nokardie, pseudomonády. Je liekom voľby pri brušnom týfuse spôsobenom *S. typhi*. V americkej praxi sa používa na liečbu bakteriálnych meningitíd. Rezistencia vzniká produkciou chloramfenikol-acetyltransferáz baktériou, prípadne menej často alteráciou ribozómov alebo zmenou permeability pre vstup lieku do bunky. Nežiaduce účinky – u nás sa používa len veľmi striktne indikovaný vzhľadom na možnosť vzniku závažnej komplikácie aplastickej anémie blokádou syntézy proteínov v kostnej dreni.

Makrolidy

Chemická štruktúra makrolidov je predstavovaná makrocyclickým laktónovým kruhom s glykozidicky viazanými neutrálnymi cukrami alebo aminocukrami. Ich účinok je bakteriostatický. Účinkujú väzbou na 50S ribozomálne subjednotky, čím bránia úspešnej

proteosyntéze. Výhodou makrolidov je výborná distribúcia do tkanív a buniek, u novších preparátov do zápalom poškodených tkanív. Spektrum zahŕňa mykoplazmy, chlamýdie, legionely, kampylobaktery. Sú praktickou náhradou penicilínových preparátov u alergických pacientov pri liečbe G⁻ infekcií. Modifikácie makrolidovej štruktúry viedli k vývoju nových prípravkov (azitromycínu a clarithromycínu). Ich spektrum, farmakologické vlastnosti a mechanizmus účinku sú dôvodom nezastupiteľnosti klasických (erytromycín) a nových prípravkov. Makrolidy sú širokospektrálne baktericídne antibiotiká.

Klindamycín

Patrí do skupiny linkozamidov. Molekula je zložená z aminokyseliny prolín naviazanej amidovou väzbou na piranozid. Mechanizmus účinku je inhibícia proteosyntézy väzbou na 50S ribozomálnu podjednotku a inhibícia peptidyltransferázy. Spektrum účinku tvoria predovšetkým stafylokoky a anaeróbne G⁻ paličky. Liek pôsobí bakteriostaticky, pri vysokých koncentráciách aj baktericídne. Rezistencia, ktorá je plazmidom prenosná, vzniká indukciou enzýmu metylujúceho ribozomálnu RNA. Indukciu tohto enzýmu navodzuje klindamycín aj erytromycín, a preto existuje skrížená rezistencia na obidve antibiotiká.

9.7.4 Inhibícia syntézy NK

Kyselina nalidixová

S úspechom sa používa na terapiu močových infekcií spôsobených G⁻ baktériami s rýchlym nástupom rezistencie.

Chinolóny

Sú syntetické chemoterapeutiká inhibujúce DNA gyrázu alebo topoizomerázu, enzýmy potrebné na ukončenie syntézy DNA v bakteriálnej bunke. Spektrum účinku zahŕňa G⁻ baktérie, predovšetkým u infekcií močových ciest. Novšie preparáty účinkujú aj na G⁺ baktérie (norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin). U niektorých enterobacteriaceaei neexistuje zastupiteľnosť medzi preparátmi. Rezistencia je chromozomálne viazaná a vzniká zmenou väzobných podjednotiek na enzýme gyráza, alebo zníženým príjmom antibiotika baktériou zmenou porínových proteínov v bunkovej stene baktérií. Preparáty nie sú vhodné pre pediatrických pacientov.

Rifampicín

Patrí do skupiny ansamycínov. Je to semisyntetický derivát odvodený od rifamicínu B, ktorý je produkovaný *Streptomyces mediterranei*. Mechanizmus účinku je väzba DNA dependentnej RNA polymerázy a inhibícia iniciácie RNA syntézy. Spektrum účinku zahŕňa predovšetkým

Mycobacterium tbc., aeróbne G+ koky vrátane MRSA. Jeho účinok je baktericídny. Rezistencia streptomycínového typu (alterácia polymerázy) je najčastejšia.

Metronidazol

Patrí medzi nitroimidazoly s chemickou štruktúrou heterocyklických látok s 5-členným kruhom. Mechanizmus účinku je inhibícia syntézy nukleových kyselín so silne baktericídnym účinkom. Čiastočne redukovaný medziprodukt metabolizmu metronidazolu prerušuje syntézu DNA. Spektrum účinku zahŕňa *Trichomonas vaginalis* a ostatné protozoa (entamoeba, giardia) a významné anaeróbne patogény. Neúčinkuje na aeróbne alebo fakultatívne anaeróbne baktérie. Rezistencia vzniká zriedkavo a je spôsobená spomalením redukcie metronidazolu a nižšou koncentráciou zmienenej metabolitu (typická je rezistencia na *Bacteroides fragilis*).

9.7.5 Antimetabolity

Antibiotiká tejto skupiny zabraňujú syntéze kyseliny listovej. Účinkujú napríklad mechanizmom vyššej afinity antibiotika k dihydrofolát-reduktáze, čím ju vyviažu a zabránia jej aktivite pri konverzii dihydrofolátu na tetrahydrofolát (trimetoprim, dapson – liek proti lepre). Ďalším miestom pôsobenia je blokáda enzýmov inkorporujúcich kyselinu paraaminobenzoovú do kyseliny listovej (sulfonamidy). Tým sa utlmuje bakteriálna respirácia. Účinok na množiace sa baktérie je bakteriostatický. Pretože ľudské bunky nesyntetizujú kyselinu listovú, sulfonamidy nezasahujú do metabolizmu živočíšnych buniek. Niektoré prípravky kombinujú antibiotiká účinkujúce na oboch miestach metabolizmu kyseliny listovej, čím sa dosiahne klinicky baktericídny účinok napriek tomu, že samotné antibiotiká sú bakteriostatické.

Sulfonamidy

Sú derivátmi kyseliny PABA. Spektrum účinku je rozsiahle, pôsobia na streptokoky, meningokoky, aktinomycéty, nokardie, chlamýdie. Slabší účinok majú na *E. coli* a ostatné enterobakteriaceae (farmakodynamika lieku spôsobuje úspech pri močových infekciách). Účinkujú tiež na niektoré protozoá (*Pneumocystis sp*, *Toxoplasma gondii*, plazmódia). Trimetoprim v kombinácii so sulfamethoxazolom dosahuje klinicky takmer baktericídny účinok vzhľadom na synergizmus spôsobený blokovaním syntézy kyseliny listovej na dvoch miestach. Tento účinok sa prejavil rozšírením spektra na G+ aj G– baktérie a *Pneumocystis carini*. Trimetoprim sám sa používa veľmi zriedkavo. Patril medzi úspešné antimalariká.

9.7.6 Antimykobakteriálne prípravky a ich špecifiká sú súčasťou špeciálnej bakteriológie.

9.7.7 Antimykotiká

Základnou charakteristikou rozdielu v terapeutickom prístupe mykóz je eukaryotický typ buniek, ktoré sú vývojovo bližšie živočíšnym bunkám a je problematické vytvoriť liek s dostatočnou účinnosťou a nízkou toxicitou so selektívnym pôsobením. Antifungálne látky sa zameriavajú na ergosterol v bunkovej stene, čo umožňuje ich selektívne pôsobenie. Napriek tomu väčšina antimykotík je toxická. Používajú sa azolové a polyénové deriváty. Lokálne prípravky obsahujú azolové deriváty (miconazole, fluconazole, ketoconazole) a používajú sa pri povrchových dermatomykózach. Mykózy vlasov a nechtov sa liečia aj orálne podávaným griseofulvínom (dlhodobo). Na terapiu podkožných mykóz sa používa KI (jodid draselný) alebo amfotericín B. Systémové mykózy sa liečia amfotericínom B, 5-fluorocytozínom, mikonazolom alebo ketokonazolom.

Pacienti postihnutí mykotickými infekciami sú do určitej miery imunodeficitní, či už na úrovni lokálnej alebo celkovej imunity. Podľa typu infekcie (systémová, oportúnna, kožná, povrchová, podpovrchová infekcia) sa uplatňuje lokálna alebo celková terapia. Na terapiu lokálnych infekcií sa okrem ošetrovacích zákrokov používajú prípravky obsahujúce KI. Na systémové použitie existujú tri skupiny zlúčenín:

- polyény – pôsobia na cytoplazmatické biologické membrány
- azoly – inhibujú biosyntézu ergosterolu
- analógy pyrimidínu – interferujú so syntézou RNA alebo DNA

Polyény

Amfotericín B, nystatín – účinnejšie postihuje fungálnu než živočíšnu bunku (vyššia afinita k ergosterolu ako ku cholesterolu). Mechanizmom účinku je tvorba pórov v plazmatickej membráne a únik iónov.

Azoly

Imidazoly (ketokonazol, klotrimazol, ekonazol) a triazoly (flukonazol) obsahujú 5-členný azolový kruh s rôznymi substituentmi na metylovej skupine. Pôsobia fungistaticky na väčšinu húb a niektoré G⁺ baktérie.

Nukleotidové analógy

5-fluorocytozín – úzkospektrálne antimykotikum podávané p. o. pri liečbe systémových ochorení spôsobených *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* sp. Je dobre znášaný a absorbovaný z GIT. Rýchlo sa však vyvíja rezistencia. Na liečbu infekcií spôsobených dermatofytmi sa používajú griseofulvín, allylamíny.

Griseofulvin je antimykotikum produkované *Penicillium griseofulvum*. Podáva sa *per os*, ale nie je účinný na kandidy a systémové mykózy. Allylamíny sú účinné na vláknité huby a dimorfné huby, ale nie sú účinné na kvasinky. Terapia mykóz je úporná, dlhodobá (aj niekoľko mesiacov, až 18), často kombinovaná a vyžaduje ďalšie hygienické, chirurgické a iné opatrenia, ako napr. pri celkovom podávaní a pri imunodeficitných pacientoch monitorovanie vedľajších účinkov.

9.7.8 Antiparazitiká

Chemoterapia parazitárnych infekcií nemá k dispozícii takú škálu antiinfekčných prípravkov ako to je u baktérií a často sa aj dnes používajú pri liečbe prípravky z predantibiotického obdobia. Antiparazitiká sú relatívne toxické, ich počet je limitovaný a pri ich používaní je potrebné poznať nielen vyvolávateľa, ale aj štádium jeho vývoja a infekcie hostiteľa. Odlišnosť prístupov pri liečba parazitárnych ochorení od bakteriálnych spočíva v tom, že parazity sú eukaryotické organizmy a ich bunky sú vývojovo bližšie ľudským bunkám. Chronický priebeh infekcií, komplexný životný cyklus a viaceré vývojové štádiá parazitov prispievajú ku komplikovanosti chemoterapie. Ďalšími faktormi prispievajúcimi k zložitosti terapie v oblastiach s najvyšším výskytom parazitárnych ochorení (rozvojové krajiny) sú:

- prítomnosť iných infekcií
- možnosť reinfekcie
- podvýživa
- imunokompromitovaní pacienti (AIDS, malnutícia, chronické infekcie)
- zlé hygienické podmienky
- klimatické podmienky umožňujúce šírenie nákazy
- ekonomické podmienky limitujúce použitie terapie
- vojnové konflikty
- sociálne otázky
- absencia verejného zdravotníctva

Parazity sú eukaryotické organizmy a na bunkovej úrovni majú s bunkami ľudského hostiteľa mnohé spoločné charakteristiky. Preto mnohé cieľové štruktúry účinku antiparazitík na bunkovej úrovni (syntéza nukleových kyselín, metabolizmus uhlíkovodíkov) sú spoločné bunkám parazita aj hostiteľa, čím sa stávajú nepoužiteľné pre absenciu selektívneho pôsobenia, ktoré by eliminovalo toxicitu prípravku pre človeka. Preto prípravky využívajúce biochemické odlišnosti eukaryotických buniek parazita a človeka sú zriedkavé. Odlišnú toxicitu pre parazita a človeka je možné docieľiť zmenou vlastností prípravku jeho

metabolizovaním v organizme parazita. Cieľom antiparazitárnej liečby je eradikácia mikroorganizmu a vyliečenie pacienta. V mnohých prípadoch, predovšetkým v endemických oblastiach výskytu má liečba prazitárnych infekcií za úlohu aj znížiť záťaž a expozíciu parazitom a zabrániť vzniku chronických komplikácií. Samotná chemoterapia ľudí nemusí byť dostatočná, alebo má len dočasný účinok vzhľadom na endemicitu výskytu parazita a infekciu vektorov nákazy. Na rozdiel od mechanizmov rezistencie u ostatných antibiotík, znalosti molekulárneho a genetického základu rezistencie parazitov na antiparazitiká sú limitované. Väčšina štúdií sa týka terapie malárie. Rezistencia plazmódií na chlorochín súvisí s prítomnosťou aktívneho efluxného mechanizmu. Vývoj rezistencie plazmódií na antimetabolity účinkujúce na úrovni kyseliny tetrahydrofolistovej súvisí so sériou mutácií kľúčového enzýmu.

Jedinečnosť účinku	Prípravok	Organizmus
Schopnosť parazita nakoncentrovať liek	<i>chlorochín</i>	<i>Plasmodium</i>
Neschopnosť metabolizovať exogénne foláty	<i>Pyrimethamín</i> <i>Trimetoprim+sulfa</i>	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>
Inhibícia redukcie thiolových skupín	Arzénové prípravky difluorometyornitín	<i>Trypanosoma</i>
Interferencia s mediátormi typickými pre parazity	piperazín	<i>Ascaris</i>
Inhibícia GABA	ivermectin	<i>Filaria</i>
Interakcia s tubulínom prítomným len u parazitov	benzimidazoly	Červy

Tab. 3. Príklady stratégie liečby založenej na medzidruhovej odlišnosti.

Skupina používaných prípravkov	Mechanizmus	Indikácie
Ťažké kovy, zlúčeniny arzénu a antimónu (<i>melarsoprol</i>)	inaktivácia SH skupiny	trypanozomóza leishmanióza
Analógy aminochinolónu (<i>chlorochín, primaquine</i>)	akumulácia v bunke parazita zábrana DNA replikácie	profylaxia a terapia malárie
Antagonisti kyseliny listovej (<i>trimetoprim, sulfonamidy</i>)	inhibícia syntézy kys. listovej	toxoplazmóza pneumocystóza
Inhibítory proteosyntézy (<i>spiramycín, tetracyklín</i>)	Blokovanie proteosyntézy na úrovni ribozómov	amebóza, babesióza, kryptosporidióza
Diamidíny (<i>pentamidín</i>)	väzba DNA, interferencia s polyamínmi	amebóza leishmanióza trichomoniáza
Nitroimidazoly (<i>metronidazol</i>)	nejasné interakcia DNA replikácie interferencia funkcie mitochondrií	amebóza giardióza trichomoniáza
Chinolóny (<i>ciprofloxacín</i>)	inhibícia DNA gyrázy	malária
Oxidujúce látky (<i>qinghaasu</i>)	inhibícia a preťaženie antioxidačných mechanizmov	malária
Analógy ornitínu (<i>DMFO</i>)	inhibícia ornitín-dekarboxylázy	trypanozomóza
Inhibícia syntézy NK (<i>allupurinol</i>)	inhibícia enzýmov metabolizmu purínov	leishmanióza
Naftylamíny (<i>suramin</i>)	inhibícia tvorby ATP	trypanozomóza

Tab. 4. Antiprotozoárne prípravky, mechanizmus pôsobenia a indikácia.

Skupina používaných prípravkov	Mechanizmus	Indikácie
Benzimidazol (<i>mebendazol</i>)	Inhibícia reduktázy kys.mravčej Inhibícia transportu glc Porucha tvorby mikrotubulov	širokospektrálne
Tetrahydropyrimidín (<i>pyrantel</i>)	Blokáda neuromuskulárneho prenosu	askarióza enterobióza
Piperazín (<i>piperasin</i>)	Neuromuskulárna paralýza Stimulácia fagocytózy GABA agonizmus	filarióza askarióza enterobióza
Pyrazinoizochinolín (<i>praziquantel</i>)	Kalciový agonista	širokospektrálne
Avermectin (<i>ivermectin</i>)	Neuromuskulárna blokáda GABA antagonizmus	filarióza
Fenol (<i>niclosamid</i>)	Inhibícia oxidatívnej fosforylácie	paragonimóza
Organofosfáty (<i>suramin, naftylamidin</i>)	Anticholinesterázová aktivita Inhibícia glycerolfosfát oxidázy a dehydrogenázy	schistozomióza onchocerkóza

Tab. 5. Antihelmintiká, mechanizmus pôsobenia a indikácie.

9.7.9 Antivírusová terapia

9.7.9.1 Princípy terapie

Základnou prekážkou rozsiahlejšej antivírusovej terapie je intracelulárny parazitizmus vírusov, ktoré využívajú hostiteľské štruktúry pre svoju replikáciu. Preto akýkoľvek zákrok zameraný na vírus vo vnútri hostiteľskej bunky je spojený s toxicitou pre bunky hostiteľa. Prístupy k liečbe vírusových infekcií jednak kopírujú replikačný cyklus vírusu a jednak využívajú poznanie, že najlepšou terapiou vírusových infekcií je silný a dobre fungujúci imunitný systém. Antivirotiká sú vo väčšine prípadov úzkospektrálne. Najlepšie zasiahnuteľné skupiny vírusov sú herpetické vírusy, vírusy hepatitídy B a C, vírus chrípky A, papilomavírusy a vďaka extrémnemu úsiliu vedy a výskumu aj HIV. Väčšina antivirotik účinkuje najlepšie profylakticky alebo v počiatočných fázach infekcie. Pôvodné antivirotiká sa zameriavali na bunky s rozsiahlou syntézou DNA alebo RNA. Tiež mali široké spektrum závažných nepriaznivých účinkov. Ďalšiu skupinu tvorili látky nasmerované proti enzýmom kódujúcim vírus (vírusové inhibítory). Novšie preparáty sú zamerané na blokovanie expresie vírusového genómu a zvláštnu skupinu tvoria látky podporujúce imunitu na zvládnutie

infekcie (interferón, induktory interferónu). Cieľové štruktúry antivirových kopírujú fázy replikačného cyklu vírusu. Mechanizmy účinku antivirových v jednotlivých fázach replikačného cyklu a ich príklady:

- Rozpoznanie a prichytenie – jednou z možností je neutralizácia povrchových vírusových antigénov protilátkami (pasívna imunizácia). Antagonisti receptorov hostiteľskej bunky pre antigény vírusu sú napr. peptidové analógy, heparín alebo dextranulfát.
- Penetrácia a vyzlečenie – vstup vírusu do cytoplazmy a kyslé prostredie endocytických vakuol môže byť neutralizované slabými organickými zásadami (amantadín, ribavirín).
- Syntéza mRNA – je kľúčovým bodom replikácie. Nie je však možné ju inhibovať bez zničenia mRNA hostiteľskej bunky. Preparáty sú namierené proti enzýmom – transkriptáza (interferón), polymeráza. Takto pôsobí antibakteriálny prípravok Rifampicín, ktorý je účinný voči adenovírusom a poxvírusom. Ďalšou možnosťou je použitie opačných – antikomplementárnych nukleotidov, ktoré blokujú väzbu nukleotidov na ribozómy a zastavia predlžovanie peptidového reťazca RNA (acyklovir, gancyklovir, adenínarabinozid, ziduvudín) alebo inkorporáciou spôsobia chybu vo vznikajúcom reťazci (Idoxuridín). Thimidínkináza je enzým poskytujúci svojou aktivitou nukleotidový substrát pri proteosyntéze. Jej inhibítory spôsobia nedostatok stavebných jednotiek proteosyntézy.
- Pospájanie syntetizovaných proteínov je inhibované účinkom proteáz a likvidáciou lipidového obalu sa navodí detergentom podobnými molekulami. Antivirových pôsobiace zvyšovaním imunity – interferón, interferón indukujúce látky, podpora nešpecifickej imunity, vakcíny.

9.7.9.2 Príklady účinku antivírusových preparátov na skupiny vírusov

Prichytenie

- peptidové analógy receptorov – HIV gp120
- neutralizujúce protilátky – väčšina vírusov, vakcinácia, pasívna imunizácia
- dextranulfát, heparín – HIV, HSV

Vniknutie a vyzlečenie

- amantadín, rimantadín – vírus chrípky A
- rimantadín – HSV
- disoxaril – picornavírusy

Transkripcia, syntéza proteínov

- interferón – VHA, VHB, VHC, papilomavírus

DNA replikácia

- polymeráza, nukleotidové analógy – herpesvírus, HIV

- fosfonofumarát – herpesvírusy

Syntéza nukleozidov

- ribavirín – RSV

Thymidinkináza

- nukleozidové analógy – HSV, VZV

Spracovanie

- proteázy proti zoskupeniu súčastí – HIV

Najlepšie zasiahnuteľné vírusy antivirotikami sú herpetické vírusy HSV, VZV, CMV, HIV, vírus chrípky A, RSV, vírusy hepatitídy A, B, C. papilomavírusy.

HSV – acyklovir (Zovirax), adenínarabinozid (Vidarabin), iododeoxyuridín, trifluorothymidín (lokálne)

CMV – gancyklovir, fosfonoformat (Foscarnet)

HIV – azidothymidín (Retrovir, Zidovudine), dideoxyinosine DDI, dideoxycytidine

Vírus chrípky A – amantadín

VHC – interferón (Intron, Roferon)

Papilomavírusy – interferón alfa

RSV, Lassa vírus – ribavirín (Virazol)

10 DEKONTAMINÁCIA

10.1 Základné pojmy

Dekontaminácia je súbor opatrení, ktorých cieľom je usmrtiť, inaktivovať alebo odstrániť patogénne mikroorganizmy (dezinfekcia), zlikvidovať a odstrániť epidemiologicky dôležité článkonožce a neprijemný hmyz (dezinsekcia), zničiť škodlivé a obťažujúce hlodavce (deratizácia). Za týmto účelom sa používajú chemické, fyzikálne alebo biologické metódy. Najčastejšie používané dezinfekčné látky sú:

- organické a anorganické zlúčeniny chlóru
- peroxozlúčeniny
- jódové preparáty
- aldehydy
- alkoholy
- organické amóniové zlúčeniny s kvartérnym dusíkom – KAZ – kvartérne amóniové zásady
- biguanidínové deriváty chlórhexidínov

Medzinárodné označovanie účinnosti dezinfekčných látok podľa vyvolávateľov:

- A – baktericídny a fungicídny
- B – viruscídny
- C – sporicídny
- T – tuberkulocídny
- M – mycobaktericídny
- V – fungicídny (vláknité huby)

Vhodné kombinácie dezinfekčných prípravkov sa prejavujú synergizmom a existujú rôzne dvojzložkové alebo trojzložkové prípravky. S úspechom sa používa kombinácia KAZ s aldehydom a/ alebo chlórhexidínom a/ alebo alkoholom, prípadne alkoholu s aldehydom, alebo biguanidínom, či alkoholu s aldehydom a chlórhexidínom.

Sterilizácia – proces, ktorý usmrcuje všetky mikroorganizmy (vrátane inaktivácie vírusov, odstránenia priónov a usmrtenia spór). Sterilita je definovaná ako stav bez prítomnosti životaschopných mikroorganizmov. Sterilizačný proces má zabezpečiť úroveň bezpečnej sterility tzv. SAL - sterility assurance level = 10^{-6} – udáva pravdepodobnosť prežitia mikroorganizmu, ktorá je pri tejto úrovni menšia ako výskyt jedného nesterilného materiálu na 1 milión vysterilizovaných materiálov.

Metódy sterilizácie:

· **horúcovzdušná sterilizácia**

160 °C 60min

170 °C 30min

180 °C 20 min

· **sterilizácia nasýtenou parou**

115 °C 170 kPa 35 min

120 °C 200 kPa 20 min

125 °C 240 kPa 15 min

134 °C 300 kPa 10 min

· **sterilizácia radiačná**

· **sterilizácia etylénoxidom**

· **sterilizácia formaldehydom**

· **sterilizáciou plazmou**

· **sterilizácia v pretlakových nádobách**

Postup sterilizačného procesu má niekoľko fáz:

- predsterilizačná príprava (mechanické odstránenie nečistôt, balenie),
- vlastná sterilizácia,
- manipulácia s vysterilizovaným materiálom,
- expedícia,
- dokumentácia procesu,
- monitorovanie sterilizačného procesu,
- vlastné použitie sterilného materiálu,
- archivácia informácie o sterilizácii nástrojov v dokumentácii pacienta.

Asepsa – súbor opatrení na zabránenie prístupu alebo zanesenie mikroorganizmov do otvorených rán alebo obnažených telových dutín.

Antisepsa – súbor opatrení na zneškodnenie choroboplodných mikroorganizmov na povrchu tela, v otvorených ranách alebo obnažených telových dutinách.

ZOZNAM OBRÁZKOV:

Obr.1. Zaradenie bakteriálnej bunky.....	11
Obr. 2. Rôzne usporiadanie špirál, paličiek a kokov.....	12
Obr. 3. Štvorice kokov (tetrády).....	13
Obr. 4. Dvojice kokov (diplokoky).....	13
Obr. 5. Koky v retiazkach (streptokoky).....	14
Obr. 6. Koky v zhlukoch (stafylokoky).....	14
Obr. 7. Baktérie v tvare špirál.....	14
Obr. 8. Paličky s rozšíreným koncom (terminálne uložené spóry).....	14
Obr. 9 Rožtekovito zahnuté paličky (vibrio).....	15
Obr.10. Paličky v retiazkach (streptobacily).....	15
Obr. 11. Špirálovité baktérie.....	15
Obr.12. Negatívne farbenie.....	16
Obr. 13. Rastrovaný elektronmikroskopický obraz.....	16
Obr. 14. Rôzne spôsoby znázornenia spór v mikroskope –rastrovaný elektronmikroskopický snímok, Gramovo farbenie, diagnostické farbenie Wirtz-Conklin, Gramovo farbenie, elektrónová mikroskopia.....	16
Obr. 15. Elektrónová mikroskopia štruktúry bakteriálnej bunky.....	18
Obr. 16. Stavba bakteriálnej bunky.....	18
Obr. 17. Cytoplazmatická membrána.....	19
Obr. 18. Osmóza-presun voľnej vody proti koncentračnému gradientu rozpustenej látky.....	19
Obr.19. Možnosti prenosu cez cytoplazmatickú membránu.....	20
Obr. 20. Schéma štruktúry peptidoglykánu.....	22
Obr. 21. Schéma farbenia podľa Grama.....	22
Obr. 22. Zloženie bunkovej steny G+ baktérií.....	23
Obr. 23. Zloženie bunkovej steny G- baktérií.....	24
Obr. 24. Zloženie bunkovej steny acidorezistentných baktérií.....	24
Obr. 25. Bakteriálny ribozóm.....	27
Obr. 26. Schéma sporulácie.....	28
Obr. 27. Burriho negatívne farbenie púzdier – <i>E.coli</i> , <i>H. influenzae b</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	30
Obr. 28. Štruktúra bičíka.....	31

Obr. 29. Lofotrichálne bičíky a fimbrie.....	32
Obr. 30. Pillus.....	32
Obr. 31. Mechanizmus poškodenia hostiteľskej bunky G+ baktériou.....	40
Obr. 32. Mechanizmus poškodenia hostiteľskej bunky G- baktériou.....	40
Obr. 33. Účinok superantigénu.....	41
Obr. 34. Bakteriofág.....	48
Obr. 35. Elektronový snímok a schéma bakteriofága.	49
Obr. 36. Priečne delenie bakteriálnej bunky.....	53
Obr. 37. Rastová krivka.....	54
Obr. 38. Množstvo mikroorganizmov fyziologickej flóry.....	64
Obr. 39. Proces replikácie vírusu.....	70
Obr. 40. Veľkosť vírusov.....	72
Obr. 41. Testovanie citlivosti na antibiotiká.....	85

POUŽITÁ LITERATÚRA:

Nováková, E., Oleár, V., Klement, C.,: Lekárska vakcinológia nielen pre medikov. PRO, Banská Bystrica 2007, ISBN 978-80-89057-18-4

Murray, P. R., et al.,: Medical microbiology. 2nd. Ed., Mosby-Year book, London 1994, ISBN 0-7234-2010-6.

Buc, M., a kol.,:Imunológia. Vydavateľstvo UK, Bratislava 1999, ISBN 80-223-1268-1

Trnovec, T., Dzúrik, R.,: Štandardné diagnostické postupy. Osveta, Martin 1998, ISBN 80-88824-82-2, s. 83

Rajčáni, J., Čiampor, F.,: Lekárska virológia. Veda, Bratislava 2006, ISBN 80-224-0911-1, s. 582

Bednář, M., Souček, A., Vávra, J.,:Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie, Triton, Praha 1994, ISBN 80-901521-4-7, s.227

Talaro, K., Talaro, A., Foundantions in Microbiology, 2nd. Ed., Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA1996. ISBN 0-697-26141-7

Greenwood, D., Slack, R., C., B., Peutherer, J., F., a kol.: Lékařská mikrobiologie. Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Grada Publishing, Praha 1999, ISBN 80-7169-365-0, s.690

Čatár, G., Böhmer, D.,: Lekárska parazitológia. BON-BON, Praha 1998, ISBN 80- 902483-0-6, s. 163

<http://de.nimsuniversity.org/prg/sc/mscmb/>

