

**MIKROB LEARNING**

**MIKROBIOLÓGIA NIELEN PRE MEDIKOV**

**Všeobecná mikrobiológia**

**Kompaníková J., Nováková E., Neuschlová M.**

projekt KEGA č. 067UK-4/2012

# **1 LEKÁRSKA MIKROBIOLÓGIA A KLINICKÁ MIKROBIOLÓGIA**

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 antioitiká a mechanizmy rezistencie medicínsky významných mikroorganizmov ako aj procesy obranných reakcií organizmu voči nim.

Klinická mikrobiológia je špecializačný odbor medicíny, ktorý sa zaoberá etiopatogenézou a laboratórnou diagnostikou chorôb mikrobiálnej etiológie. Poskytuje a interpretuje výsledky priamej a nepriamej mikrobiologickej laboratórnej diagnostiky. Nové poznatky v odbore viedli k výraznému rozvoju všetkých integrálnych častí klinickej mikrobiológie: klinickej bakteriológie, klinickej virológie, klinickej parazitológie a klinickej mykológie. Zaoberá sa aj mikrobiologickou diagnostikou importovaných, nových a novorozpoznávaných nákaz, aj nákaz spôsobených biologickými zbraňami.

Špecialista klinický mikrobiológ poskytuje komplexnú a kvalifikovanú mikrobiologickú diagnostiku pre účely zistenia etiológie mikrobiálnych chorôb a stanovenia kauzálnej antimikrobiálnej terapie a pre účinné opatrenia proti vzniku, rozvoju a šíreniu týchto chorôb. Zúčastňuje sa na činnosti komisií pre racionálnu antibiotickú liečbu a zdravotnícku politiku na všetkých úrovniach. Klinický mikrobiológ má prehľad o aktuálnych poznatkoch v mikrobiológii v celej šírke a o najnovších poznatkoch v oblasti patogenézy, diagnostiky a terapie mikrobiálnych chorôb. Klinický mikrobiológ spolupracuje a vykonáva konzultačnú činnosť pre všetky odbory medicínskej praxe. Navrhuje a odporúča ďalšie postupy pri diagnostike mikrobiálnych ochorení. Vo svojej činnosti vychádza z najnovších vedeckých poznatkov v odbore, ako aj z poznatkov iných medicínskych odborov a ďalších vedných odborov v oblasti prírodných, sociálnych a technických vied. Koncepcia odboru klinická mikrobiológia je schválená Ministerstvom zdravotníctva SR. Vykonanie špecializačnej skúšky v odbore Klinická mikrobiológia je podmienkou pre vykonávanie samostatnej činnosti v tomto špecializačnom odbore. 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
- anitiinfekčná 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** laboratóriá. Pre potreby objektivizácie faktorov vonkajšieho prostredia sa vyčlenil samostatný odbor vrámci verejného zdravotníctva – mikrobiológia vonkajšieho prostredia.

Základné členenie mikrobiologického pracoviska:

[http://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/user\\_upload/editors/Mikrobiol\\_Files/Slov\\_Praktika\\_LS/Mikrobiologia/Seminarne\\_1.pdf](http://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/user_upload/editors/Mikrobiol_Files/Slov_Praktika_LS/Mikrobiologia/Seminarne_1.pdf)

## 2 VŠEOBECNÁ BAKTERIOLÓGIA

### Zloženie bakteriálnej bunky

#### Prezentácia:

1.Úvod do štúdia lekárskej mikrobiológie a imunológie. Definícia mikrobiológie, náplň, história a rozdelenie. Význam mikroorganizmov v prírode a v spoločnosti. Morfológia mikroorganizmov - baktérie, vírusy, a huby. Význam poznania štruktúry pre pochopenie biologických funkcií.

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)

Bakteriálne bunky sú bunky prokaryotické. Od eukaryotických (somatické bunky, huby, prvoky) sa líšia odlišnou štruktúrou bunky.

Každá bakteriálna bunka obsahuje nasledovné základné štruktúry a organely:

- **nukleoid** je ekvivalent jadra buniek vyšších organizmov, nie je od cytoplazmy oddelený jadrovou membránou. Skladá sa z jednej molekuly DNA - chromozómu, ktorý je tvorený dvojzávitnicovou DNA kruhovitého tvaru. U niektorých bakteriálnych rodov sa nachádza aj extrachromozomálne uložená DNA, takéto štruktúry sa nazývajú plazmidy
- **cytoplazma** je látka bielkovinnej povahy tvorená koloidným roztokom bielkovín, súčasťou cytoplazmy sú aj enzýmy, v nej sa realizujú základné životné pochody bunky, pozostáva z koloidnej hmoty obsahujúcej jadrovú hmotu tvorenú jediným cirkulárnym chromozómom pozostávajúcim s dvojvláknovej deoxyribonukleovej kyseliny DNA, ribozómy tvorené podjednotkami veľkosti 70S a 40S, zásobné granuly.

- **ribozómy** - útvary zložené z dvoch podjednotiek RNK voľne uložených v cytoplazme, alebo spojených s cytoplazmatickou membránou, na nich uskutočňuje syntéza bielkovín

- **cytoplazmatická membrána** pokrýva povrch cytoplazmy, a skladá sa z fosfolipidov a bielkovín. 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).

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
- **bunková stena** tvorí vonkajší obal bakteriálnej bunky, je pevná a elastická, udržiava tvar a je osmoticky a mechanicky pevná. Bunková stena väčšiny medicínsky významných baktérií – eubaktérií s výnimkou chlamýdií 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 peptidoglykanu a transpeptidáza uzavrie nové spojenia medzi vrstvami a radmi peptidoglykanu. Mnohé antibiotiká účinkujú inhibíciou na úrovni syntézy peptidoglykanu, 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 väzbou penicilíny blokujú ich funkciu pri spájaní reťazcov monomérov. Následkom toho vzniká málo rigidná bunková stena podliehajúca osmotickej lýze.

- **vonkajšie štruktúry:** glykokalyx, púzdro, bičičky, pilli, fimbrie

Samostatnou formou baktérií sú tzv. mykoplazmy(L-formy), ktoré neohraničuje bunková stena, ale len cytoplazmatická membrána. Ide o najmenšie extracelulárne prežívajúce baktérie, ktoré nie sú farbiteľné podľa Grama.

### **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 vľetky 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 písanom texte sa 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*).

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 zhhlukoch (stafylokoky). Tvar kokov môže byť guľatý, na jednej strane sploštelý, 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*).

#### **Štvorice kokov (tetrády).**

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

#### **Dvojice kokov (diplokoky)**

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

#### **Koky v retiazkach (streptokoky).**

<http://faculty.ccbcmd.edu>

#### **Baktérie v tvare špirál.**

<http://faculty.ccbcmd.edu>

#### **Paličky v retiazkach (streptobacily).**

<http://home.cogeco.ca>

## **2.2 Vizualizácia a identifikácia baktérií**

### **Prezentácia: Mikroskopia. Orientačné farbenie.**

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.

### **Rastrový elektrónmikroskopický obraz**

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie>

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 materiáli – mikroskopia natívnych alebo farbených preparátov.

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

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

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

Acidorezistentné baktérie – odolávajúce odfarbeniu roztokom alkoholu a kyseliny.

**Základné farbiace metodiky používané v mikrobiológii, prezentácie na praktické cvičenia:**

[Farbenie podľa Grama.](#)

[Farbenie acidorezistentných baktérií a granul](#)

Farbenie bakteriálnych [púzdier a spór](#)

- dôkaz antigénov v biologickom materiáli – aglutinácia, latex aglutinácia, ELISA
- dôkaz NK v biologickom materiáli – genetické sondy, PCR

Najnovšie zavádzané metódy identifikácie mikroorganizmov nájdete na:

[http://bioinfo.tym.sk/MB/7\\_Diagnosticke\\_metody\\_v\\_mikrobiologii.pdf](http://bioinfo.tym.sk/MB/7_Diagnosticke_metody_v_mikrobiologii.pdf)

do 24 hodín po odbere

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

Základné postupy používané pre kultiváciu baktérií nájdete na stránkach ÚMI JLF UK v Martine:

[Fyziológia mikroorganizmov](#)- kultivácia, kultivačné pôdy, dôkaz životných prejavov baktérií.

[Anaeróbna kultivácia.](#)

do 36 hodín – 48 hodín:

- určenie biochemických vlastností
- stanovenie antigénnej štruktúry – skličková 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 citlivosti na antibiotiká

**Metódy na stanovenie biochemických vlastností a nástrojov patogenity a virulencie nájdete na stránkach ÚMI JLF UK v Martine:**

**Prezentácie na praktické cvičenia:**

[Biochemické vlastnosti](#) mikroorganizmov.

**Nástroje patogenity a významné [bakteriálne enzýmy a toxíny](#).**

4.deň a viac:

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

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.

**Bunková stena grampozitívnych baktérií:**

Bunková stena grampozitívnych 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)

### **Bunková stena gramnegatívnych baktérií.**

Je tvorená :

- z tenkej vrstvy peptidoglykátu (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 prejavujú 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

### **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 mykobaktérii 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).

### **Baktérie bez bunkovej steny.**

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<sup>+</sup>. Ich cytoplazmatická membrána obsahuje steroly, ktoré poskytujú pevnosť. Príležitostne, keď sú baktérie (G<sup>+</sup> aj G<sup>-</sup>) 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<sup>+</sup> 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<sup>-</sup> baktérie vytvárajú sféroplasty, ktoré obsahujú väčšinu štruktúr vonkajšej membrány. Bez peptidoglykanu si neudržia svoj tvar a nadobúdajú sférický tvar.

### **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.

*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 vrodenu 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.

#### *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 produkciu 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 vyštiknúť tento úsek - samých seba – z nukleoidu alebo plazmidu a opäť sa inkorporovať na inom mieste.

### *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 proteínového reťazca

### **Bakteriálny ribozóm:**

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

### *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, [Farbenie acidorezistentných baktérií a granul](#)).

### *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 dipikolínátov 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

#### **Schéma sporulácie:**

[http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell\\_envelope.htm](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 (Farbenie bakteriálnych púzdier a spór).

## 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.

### *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 púzdier 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 pôsobiacich 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 (Farbenie bakteriálnych púzdiar a spór.)**, dôkazom bobtnania púzdiar špecifickou protilátkou – Quellung reakcia, alebo aglutináciou pomocou špecifický antisér alebo latexovou aglutináciou. Opúzdrené kmene obvykle rastú v mukózných hlienovitých kolóniách.

### *Bičiky*

Bičiky sú nástrojmi pohybu baktérií. Asi polovica známych bakteriálnych kmeňov je pohyblivá. Podstatou pohybu je rotácia bičíka na základe protónového gradientu. Bičík 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 chemické – chemotaxis, svetelné – fototaxis, zmeny osmotického tlaku – osmotaxis, na vzduch – aerotaxis, na teplotu – termotaxis.

Štruktúra bičíkov:

- 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 púzdrom (s výnimkou *Vibrio cholerae* a *Bdellovibrio*). Proteín flagelín je podstatou bičíkových H antigénov
- hák – je flexibilné spojenie medzi vláknom a bazálnym telesom
- bazálne teleso pozostáva z tyčinky a niekoľkých prstencov, ktoré upevňujú bičík do bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány.

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

Usporiadanie bičíkov na bakteriálnej bunke:

- monotrichálne – jediný bičík na jednom póle
- amfitrichálne – jeden bičík na každom póle
- lofotrichálne – viac bičíkov na jednom alebo oboch pólach
- peritrichálne – bičiky na celom povrchu bunky
- axiálne vlákna – vnútorné bičiky – prítomné len u spirochét, pozostávajú z 2 až 100 axiálnych vlákien, ktoré sa šíria z oboch koncov baktérie

### Štruktúra bičika:

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Flagellum\\_base\\_diagram\\_en.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Flagellum_base_diagram_en.svg)

Prítomnosť bičíkov a schopnosť pohybu môžeme dokázať kultiváciou v U rúrke, naočkovaním vpichom do agaru v skúmavke, u *Proteus mirabilis* znázornením Raussovhovho fenoménu plazivého rastu na tuhých kultivačných médiách.

### *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. Kmene *Neisseria gonorrhoeae* bez fimbrií sú avirulnetné.

### **Pillus:**

<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/coli-2.jpg>

### **Kontrolné otázky k diskutovanej kapitole:**

Základná charakteristika mikroorganizmov

Zaradenie baktérií 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.

Diagnostický význam mikroskopie v bakteriológii

Farbenie podľa Grama

Farbenie acidorezistentných mikroorganizmov

Farbenie bakteriálnych púzdier

Farbenie bakteriálnych spór

Farbenie cytoplazmatických granúl

### 3 Nástroje patogenity a virulencie u mikroorganizmov

**Prezentácia:**

**5.Nástroje patogenity baktérií. Endotoxíny a exotoxíny. Faktory kolonizácie. Ostatné nástroje virulencie baktérií. Základné princípy patogenity pri parazitoch. Huby ako ľudské patogény. Infekcia a jej formy, reakcia organizmu na infekciu, priebeh a šírenie bakteriálnej infekcie.**

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 vrodených 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 nenahradiateľného 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...).

## **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.

### **Proces šírenia nákazy**

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.

### **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 produkciou 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.

### **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.

#### *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 šroubovovitým 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*, vláknitý 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 adherenciu mikroorganizmov (napr. štiepenie sacharózy na glukózu a tvorba dextranu umožňuje adherenciu *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 (cudzia) – (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.

### 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 zlyhávanie
- poškodenie kapilár – vedúce k petéchiám, rašu, kapilárnemu presakovaniu, hypovolémii
- konsumpčná koagulopatia
- diseminovaná intravaskulárna koagulácia (DIC)
- hypotenzia
- zníženie kardiálneho výkonu
- ireverzibilný šok
- hnačka

### Superantigény (toxín I typu)

Súčasti 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, nausea, 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.

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
- cholerový exotoxín
- 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.

**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.

**Prezentácia na praktické cvičenia:**

**Nástroje patogenity významné bakteriálne enzýmy a toxíny.**

## 2.2 Bakteriálna genetika

### Prezentácia:

3.Genetika mikroorganizmov. Adaptácia, premenlivosť, modifikácie, mutácie, konjugácia, transformácia ,lyzogénna konverzia, biotechnológia a bakteriálna bunka.

### 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 informácii 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.

## 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 zreých ribozómoch 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 štruktúrálnych génov = represia. Uvoľnenie operátora je možné pôsobením induktora ( napr. substrát metabolizmu ) na represor = indukcia alebo derepresia.

### POZITÍVNA REGULÁCIA:

gén je stále aktívny.

## **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.

### **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 cielené 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.

## **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.

### **Mechanizmus rekombinácie:**

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

**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 myšiam - 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 pilusu. Pillusy sú to útvary na povrchu bakteriálnej bunky. Spájajú baktérie 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)

#### **Mechanizmus konjugácie:**

<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/trans-8.jpg>

**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 diphtheriae*, pôvodca záškrtu (diftérie), schopnosť tvoriť difterický toxín. Len tie bunky *Corynebacterium diphtheriae*, 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.

#### **Mechanizmus transdukcie:**

<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/trans-2.jpg>

#### **Elektrónový snímok a schéma bakteriofága:**

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

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

#### **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 generáciach dôjde ku konverzii a cyklus sa dokončí ko pri lytickej infekcii. Lyzogénia je stálym dedičným znakom kmeňa.

**Životný cyklus bakteriofága:**

[http://textbookofbacteriology.net/phage\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/phage_2.html)

### **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.

**Transpozóny, schéma:**

<http://www.docstoc.com/docs/124988970/Transposon---PowerPoint>

## **2.3 Fyziológia baktérií**

**Prezentácia:**

[2.Fyziológia mikroorganizmov.](#)

**Metabolizmus mikroorganizmov - základné mechanizmy látkovej premeny a získavania energie. Teoretické a praktické využitie biologických funkcií 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.

### **Metabolické deje mikroorganizmov**

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.

### **Rozdelenie baktérií podľa požiadaviek 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, typ metabolizmu je fermentácia.

**fakultatívne anaeróbne** : sú to aeróbne mikróby, 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.

**Rast a rozmnožovanie baktérií**

V optimálnom prostredí narastajú bakteriálne bunky do určitej veľkosti, a potom sa delia . Charakteristické pre ne je nepohľavné – priečne 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 rozštiepení 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).

**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**.

## **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).

### **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.

### **Rastová krivka.**

[http://pathmicro.med.sc.edu/fox/growth\\_c.jpg](http://pathmicro.med.sc.edu/fox/growth_c.jpg)

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

#### **1/ Rast v mnohonásobnej logaritmicknej 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 (napr. pri výrobe antibiotík).

### **Kontinuálna kultivácia**

Vo vhodnej aparatúre 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.

## Kultivácia baktérií z biologického materiálu

### Prezentácia na praktické cvičenia:

#### Fyziológia mikroorganizmov- kultivácia, kultivačné pôdy, dôkaz životných prejavov baktérií.

#### Pozri aj na:

<http://www.slideshare.net/musakhan9216/culture-media-used-in-microbiology>

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 42°C tuhne. Používa sa na prípravu tuhých pôd v 2-5 % koncentracii. 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, ktorá 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).

### **Hodnotenie rastu baktérií na kultivačných médiách**

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 (drsna – 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.

## **Metódy používané na kultiváciu 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 (dobro oxidovateľná látka ), ku ktorej sa pred uzavretím pridá roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  , 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  $\text{CO}_2$  ,  $\text{H}_2$  a  $\text{N}_2$  .

### **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.

### **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 odlišiť 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 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA A ŠPECIFICKÉ VLASTNOSTI VÍRUSOV, PARAZITOV A HÚB**

### **Všeobecná virológia**

#### **Prezentácia:**

[Všeobecná virológia, úvod do virológie.](#) Mechanizmy replikácie vírusov. Patogenéza ochorení vyvolaných vírusmi. Diagnostika vírusových ochorení, nástroje patogenity vírusov. Vírusy a nádory.

#### [Základy virológie.](#)

#### **Prezentácia na praktické cvičenia:**

#### [Virologická diagnostika](#)

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.).

### **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

### **Proces replikácie vírusu:**

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/cycle.jpg>

**Vysvetlivky:** adsorbcia (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.

### **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.

### **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),

<http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/IMF.html>

-enzýmami, <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle>,  
(ELISA),

-rádionuklidom

(RIA), [http://www.euroimmun.com/index.php?id=radioimmuntests\\_ria\\_irma&L=1](http://www.euroimmun.com/index.php?id=radioimmuntests_ria_irma&L=1)

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.

**Princípy základných sérologických vyšetrovacích metód, dynamika tvorby protilátok:**

**[Nové metódy diagnostiky](#) – ELISA, WESTERN BLOT, PCR**

[http://www.google.sk/url?sa=t&ret=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CEIOFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.ifmed.uniba.sk%2Ffileadmin%2Fuser\\_upload%2Feditors%2FMikrobiol\\_Files%2FSlov\\_Praktika\\_LS%2FImunologia%2FVL.2.roc.LS-10.pr.c.-serologicke\\_reakcie.ppt&ei=WCafUsaWL-HJ4ASYzoHoAw&usq=AFQjCNHNnzG1K1nFOVgXgKtIEpBD218l4g&bvm=bv.57155469,d.bGE](http://www.google.sk/url?sa=t&ret=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CEIOFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.ifmed.uniba.sk%2Ffileadmin%2Fuser_upload%2Feditors%2FMikrobiol_Files%2FSlov_Praktika_LS%2FImunologia%2FVL.2.roc.LS-10.pr.c.-serologicke_reakcie.ppt&ei=WCafUsaWL-HJ4ASYzoHoAw&usq=AFQjCNHNnzG1K1nFOVgXgKtIEpBD218l4g&bvm=bv.57155469,d.bGE)

## **Všeobecná parazitológia**

**Prezentácia:**

**[Základy parazitológie](#)**

**Učebné texty:**

**[Parazitológia- vybrané kapitoly](#)**

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) .Prvoky 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.

**Klasifikácia prvokov:**

[http://www.cliffsnotes.com/sciences/biology/microbiology/the-protozoa/classification-of-  
protozoa](http://www.cliffsnotes.com/sciences/biology/microbiology/the-protozoa/classification-of-<br/>protozoa)

## **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.

## **Odber materiálu na parazitologické vyšetrenie:**

### **odber biologického materiálu a spôsob vyšetrenia v laboratóriu**

# Všeobecná mykológia

## Prezentácia:

### Mykologická diagnostika

#### *Charakteristika húb*

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.

#### *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.

#### **Štruktúra bunkovej steny húb:**

<http://www.doctorfungus.org/thedrugs/images/drug-targets.jpg>

#### **Medicínsky významné huby sa vyskytujú vo forme:**

- vláknitej
- kvasinkovej

Vlákňité 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 reprodukovávajú sa sexuálne tvorbou blastokonídií pučaním alebo rozdelením. Počas rastu na tuhých pôdach vytvárajú typické kolónie jednobunkových kvasiniek:

- pravé kvasinky – netvoria podhubie (mycélium) – *Cryptococcus neoformans*
- kvasinkovité kolónie – smerom do hĺbky pôdy sa vytvárajú reťazce pučiach 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.

#### *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.

#### **Pozri na:**

<http://huby-plesne.webnode.sk/archive/news/>

#### **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 bazídiospórmi 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
- netvorí hýfy
- *Penicilium, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Geotrichon, Trichoderma*

## **Mykózy podľa primárnej lokalizácie infekčného procesu**

### **Rozdelenie mykóz:**

<http://photos1.blogger.com/x/blogger/6631/848/1600/480286/fungus1.jpg>

### **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).

### **Prehľad pôvodcov mykóz:**

<http://photos1.blogger.com/x/blogger/6631/848/1600/122265/mmic1.jpg>

### *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) – kancerogén
- 3. Mykoalergóza** – dlhodobé malé dávky vyvolávajú hypersenzitívnu reakciu.
- 4. Zápalová reakcia**
  - imunopatologické následky spôsobené obrannou reakciou

- mycetizmy – mechanické podráždenie tkaniva

**Odber materiálu na mykologické vyšetrenie:**

<http://www.hpl.sk/odborna-zona/vysetrenia/mykologia/mikroskop>

## **MOŽNOSTI OVPLYVNEŇANIA POTENCIÁLU MIKROORGANIZMOV SPÔSOBIŤ OCHORENIE**

**Prezentácia:**

**Antibiotiká a chemoterapeutiká** - vysvetlenie pojmov, mechanizmus pôsobenia, typ účinku nežiaduce účinky, rozdelenie ATB, zásady liečby.

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).

### **Antimikrobiálna terapia**

Antimikrobiálna terapia je komplex postupov používajúcich účinné prípravky na cieleňé 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<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> 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 mikroorganizmu – 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.

## **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

**Antibiotiká, rozdelenie, indikácie, komplikácie:**

<http://www.medinfo.sk/?s=heslo&id=677>

### **Účinok antibiotík na cieľovú bunku**

Antibiotiká môžu mať dva typy účinku na cieľovú bunku. Tie, ktoré zabíjajú mikroorganizmus nazývame – cídne (baktericídne, fungicídne, vírucídne). 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

### **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).

### **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<sup>+</sup> bakteriám 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<sup>+</sup> a väčšinu G<sup>-</sup> 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.

### **Spektrum účinku antibiotík:**

[http://sketchymedicine.com/wp-content/uploads/2011/10/abx\\_2.jpg](http://sketchymedicine.com/wp-content/uploads/2011/10/abx_2.jpg)

## 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:

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-fluorocytosín, 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

### Miesto pôsobenia antibiotík:

[http://sketchymedicine.com/wp-content/uploads/2011/10/abx\\_1.jpg](http://sketchymedicine.com/wp-content/uploads/2011/10/abx_1.jpg)

## 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 zvyšujúce 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 mykoplaziem 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<sup>-</sup> 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.

### **Mechanizmy vzniku rezistencie na antibiotiká:**

<http://www.ondineblog.com/wp-content/uploads/2011/09/Image3.gif>

- 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

### **Testovanie citlivosti na antibiotiká.**

[http://www.politicsandthelifesciences.org/Biosecurity\\_course\\_folder/print/u3s5\\_tests.html](http://www.politicsandthelifesciences.org/Biosecurity_course_folder/print/u3s5_tests.html)

## **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 dilačné, 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).

### *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.

### **Difúzny diskový test:**

<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm>

### *Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie*

Je to kvantitatívny dilačný 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 koncentraciou break pointu, tým je antibiotikum účinnejšie. Sledovanie dynamiky vývoja minimálnych inhibičných koncentrácií určitého antibiotika pre určitý mikroorganizmu umožní predpovedať blížiaci sa nástup rezistencie.

#### **Dilučná metóda na stanovenie MIC:**

<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>

#### *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 znázorní sa tým, že po vyočkovaní skúmavky a kultivácii nenarastú na platni žiadne baktérie, je baktericídna (MBC).

#### *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 koncentraciami 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 oboch typov testov spája E-test. Je to kvantitatívny difúzny test. E-test predstavuje prúžok napustený stúpajúcou koncentraciou 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.

**E-test:**

[http://fvl.vfu.cz/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie\\_pro\\_farmaceuty/praktikum05/4.gif](http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum05/4.gif)

## **Pôsobenie antibiotík podľa miesta účinku**

### **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.

#### *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 penicilinových 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, metecilín
- 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-aminocefalosporanovou 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, enterobacteriaceae (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 enterobacteriaceae a predovšetkým pseudomonády.

Rezistencia na penicilíny má niekoľko príčin:

- produkcia betalaktamáz – enzýmov, ktoré otvárajú betalaktamový 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 baktérií. 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.

*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 peptidoglykánov. 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 peptidoglykánov, 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.

## Poškodenie plazmatickej membrány

**Polymyxíny** – chemická štruktúra predstavuje vetvené cyklické deka-peptidy, ktoré deštruujú cytoplazmatickú membránu citlivých baktérií, predovšetkým G<sup>-</sup> 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).

## 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 mikromonosporami 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<sup>-</sup> paličky, vrátane pseudomonád a niektoré G<sup>+</sup> 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 intravenóznej aplikácii sú časté lokálne prejavy podráždenia.

### **Chloramfenikol**

Chemická štruktúra je odvodená od esenciálnej aminokyseliny fenylalanínu, 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<sup>-</sup> 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 striktno 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<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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 oboch antibiotikách.

### **Inhibícia syntézy NK**

#### **Kyselina nalidixová**

S úspechom sa používa na terapiu močových infekcií spôsobených G<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> baktérie, predovšetkým u infekcií močových ciest. Novšie preparáty účinkujú aj na G<sup>+</sup> baktérie (norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin). U niektorých enterobacteriaceae 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 mediteranei*. Mechanizmus účinku je väzba DNA dependentnej RNA polymerázy a inhibícia iniciácie RNA syntézy. Spektrum účinku zahŕňa predovšetkým *Mycobacterium tbc.*, aeróbne G<sup>+</sup> 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 zmieneneho metabolitu (typická je rezistencia na *Bacteroides fragilis*).

### **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*, plazmódiá). 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.

**Antimykobakteriálne prípravky** a ich špecifiká sú súčasťou špeciálnej bakteriológie.

### **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-fluorocytosín – 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 griseofulvin, 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.

### **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 liečbe 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 doceliť 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 parazitárnych 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 plazmódii na chlorochín súvisí s prítomnosťou aktívneho efluxného mechanizmu. Vývoj rezistencie plazmódii na antimetabolity účinkujúce na úrovni kyseliny tetrahydrofolovej 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

**Príklady stratégie liečby založenej na medzidruhovej odlišnosti.**

<b>Skupina používaných prípravkov</b>	<b>Mechanizmus</b>	<b>Indikácie</b>
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 ornitíndekarboxylázy	trypanozomóza
Inhibícia syntézy NK ( <i>allupurinol</i> )	inhibícia enzýmov metabolizmu purínov	leishmanióza
Naftylamíny ( <i>suramin</i> )	inhibícia tvorby ATP	trypanozomóza

## 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

## Antihelmintiká, mechanizmus pôsobenia a indikácie.

### Antivírusová terapia

#### 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 antivirotik kopírujú fázy replikačného cyklu vírusu. Mechanizmy účinku antivirotik 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. Antivirotiká pôsobiace zvyšovaním imunity – interferón, interferón indukujúce látky, podpora nešpecifickej imunity, vakcíny.

#### *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

- tromantadín – 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, dideoscopytidine

Vírus chrípky A – amantadín

VHC – interferón (Intron, Roferon)

Papilomavírusy – interferón alfa

RSV, Lassa vírus – ribavirín (Virazol)

### **Zoznam skratiek a symbolov**

ABC – ATP binding cassette

ADP – adenosindifosfát

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

APC (adenomatous polyposis coli) – adenomatózna polypóza

ARO – anesteziolo-resuscitačné oddelenie

ATB – antibiotikum

ATP – adenosintrifosfát

CFU (colony forming unite) – kolóniu tvoriaca jednotka

CMV – cytomegalovírus

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý

DIC – diseminovaná intravaskulárna koagulácia

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzýmoimunoanalýza

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

Fc – špecifické väzbové miesto pre Fc-časti molekúl imunoglobulínov

g – generačná doba

H<sub>2</sub> – vodík

HIV (human immunodeficiency 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  
N<sub>2</sub> – dusík  
Na<sup>+</sup> – sodíkový kation  
NAD – nikotínamidadenín dinukleotid  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 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 vyšetrovacie a liečebné zložky  
Th1 – pomocné (helper) T-lymfocyty prvej triedy  
Th2 – pomocné (helper) T-lymfocyty druhej triedy

TNF – tumor nekrotizující faktor

tRNA – transferová RNA

TSLS – toxic shock like syndrome

TSST-1 – toxic shock syndrome toxin1

v – rýchlosť množenia

VHA – vírus hepatitídy A

VHB – vírus hepatitídy B

VHC – vírus hepatitídy C

VZV – vírus varicella zoster

### **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., Foundations in Microbiology, 2nd. Ed., Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA 1996. 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/>

[http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/Kat\\_130/klinicka\\_mikrobiologia.pdf](http://www.szu.sk/userfiles/file/Katedry/Kat_130/klinicka_mikrobiologia.pdf)