

1a. OBECNÁ MIKROBIOLOGIE

1. Charakteristika prokaryontů, jejich tvar, velikost a uspořádání. Spóry.	3
2. Vnitřní skladba bakteriální buňky.	8
3. Struktura buněčné stěny bakterií.	14
4. Povrchová skladba bakteriální buňky.	19
5. Morfologie, množení virů a bakteriofágů.	22
6. Metabolismus bakterií.	28
7. Bakteriální enzymy.	34
8. Reprodukce bakterií.	38
9. Genotyp a fenotyp mikroorganismů. Mutace.	41
10. Rekombinační procesy a výměna genetické informace.	45
11. Virulentní a temperované fágy. Lysogenie, transdukce, fágová konverze.	49
12. Plasmidy a transpozóny.	52
13. Patogenita a virulence mikroorganismů.	55
14. Charakteristika exotoxinů a endotoxinů.	60
15. Nejdůležitější bakteriální toxiny, jejich vlastnosti a účinky.	64
16. Problematika bakteriálního biofilmu.	68
17. Ekologie mikroorganismů.	70
18. Komunitní a nozokomiální infekce.	77
19. Bakteriální původci nozokomiálních a komunitních infekcí.	79
20. Mikroorganismy u zdravého člověka.	91
21. Endogenní a exogenní infekce.	97
22. Sterilizace.	103
23. Dezinfekce.	108
24. Základní charakteristika antibiotik (rozdělení, mechanismy účinku).	117
25. Nežádoucí účinky antibiotik. ATB v těhotenství, u novorozenců a kojenců.	121
36. Mechanismy bakteriální rezistence k antibiotikům.	126
37. Vznik a šíření bakteriální rezistence.	129
38. Humorální faktory obrany proti infekci.	133
39. Buněčné faktory obrany proti infekci.	141
40. Specifická obrana organismu proti infekci.	149
41. Antigeny mikrobů.	161
42. Očkovací látky a aktivní imunizace.	164
43. Protilátky.	169
44. Pasivní imunizace.	175
45. Odběr a transport materiálu k mikrobiologickému vyšetření.	177

1. Charakteristika prokaryontů, jejich tvar, velikost a uspořádání. Spóry.

Charakteristika prokaryotních buněk

- fylogeneticky starší, strukturálně jednodušší a menší než eukaryotní buňky
- nemají typické jádro, jen tzv. nukleoid, bez jaderné membrány, nedělí se mitoticky
- odlišné ribosomy – 70 S (u eukaryot 80 S), složené z podjednotek 30S a 50 S
- peptidoglykan (murein) v buněčné stěně
- v cytoplasmě nemají mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát
- v cytoplasmatické membráně nepřítomnost sterolů (výjimka – mykoplasmata)

Velikost bakterií:

- velikost bakterií se udává v μm .
- největší nepatogenní spirochety dosahují délky až 60 μm .
- většina tyčinek starých kultur tvoří až 50 μm dlouhá vlákna.
- poměrně velké bakterie jsou tyčinky z rodů *Bacillus* a *Clostridium* (1 x 10 μm).
- většina pro člověka patogenních bakterií měří kolem 1 až 3 μm (*Staphylococcus* = 1 μm).
- k nejmenším patogenním bakteriím patří *hemofily* (0,3 x 0,6 μm), *rickettsie* (kolem 0,5 μm), *chlamydie* (asi 0,3 μm) a *mykoplasmata* (cca 0,2 - 0,25 μm).

Tvar bakterií:

- bakterie mají mnoho morfologických variant, bakterie dělíme na:
 - koky - kulovité, sférické (řec. kokkos, jádro)
 - pravidelně kulaté: např. *stafylokoky* (tvar kuličky)
 - oploštělé: např. *gonokoky*, *meningokoky* (tvar rumové pralinky)
 - zašpičatělé (lancetovité): např. *pneumokoky* (tvar slzy)
 - tyčinky - protáhlé (*bacillus*, *bacterium*)
 - rovné: většina tyčinek, např. *Escherichia coli*, *Salmonella*
 - krátké (=kokobacily, kokobakterie): např. *Acinetobacter*, *Kingella*, *Moraxella*
 - dlouhé (=vlákna): *Erysipelothrix*, *Actinomyces*, *Nocardia*,
 - prohnuté, zakřivené: *Vibrio*, *Campylobacter*
 - spirálovitě zahnuté tyčinky: spirochety
 - štíhlé: *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium tetani*
 - robustní: *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*
 - rozštěpené: *Bifidobacterium*
 - větvcí se: *Nocardia*, *Actinomyces*
 - s rovnými až konkávními konci: *Bacillus anthracis*
 - vřetenovité, fusiformní: *Fusobacterium* (lat. *fusus* = vřeteno)
 - kyjovité, koryneformní: *Corynebacterium* (řec. *koryné* = kyj)
 - pleomorfní: *Haemophilus influenzae*

- spirály
 - nepravidelné: *Spirillum*, *Helicobacter*
 - hrubé: *Borrelia*
 - jemné: *Treponema*
 - jemné se zahnutými konci: *Leptospira*

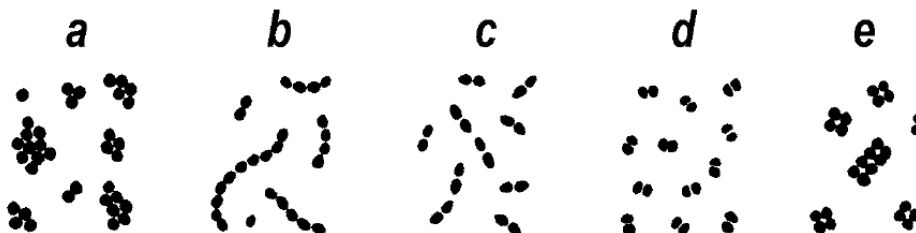
Struktura bakterií

- u všech bakterií
 - jádro
 - cytoplasma s ribosomy
 - cytoplasmatická membrána
 - buněčná stěna (výjimka *Mycoplasma sp.*)
- u některých bakterií
 - pouzdro a pouzderne substance
 - bičíky
 - fimbrie - pili
 - inkluse a plasmidy v cytoplasmě
 - endospóry

Upořádání bakterií:

Tvar a uspořádání koků:

- a) koky ve shlucích (*Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis*)
- b) koky v řetízích (*Streptococcus pyogenes*), často lehce protáhlé (*Enterococcus faecalis*)
- c) lancetovité koky ve dvojicích (*Streptococcus pneumoniae*)
- d) oploštělé koky ve dvojicích - (*Neisseria meningitidis*) a (*Neisseria gonorrhoeae*)
- e) koky ve čtveřicích = tetrádách či paketech (*Micrococcus luteus*, *Kytococcus sedentarius*)



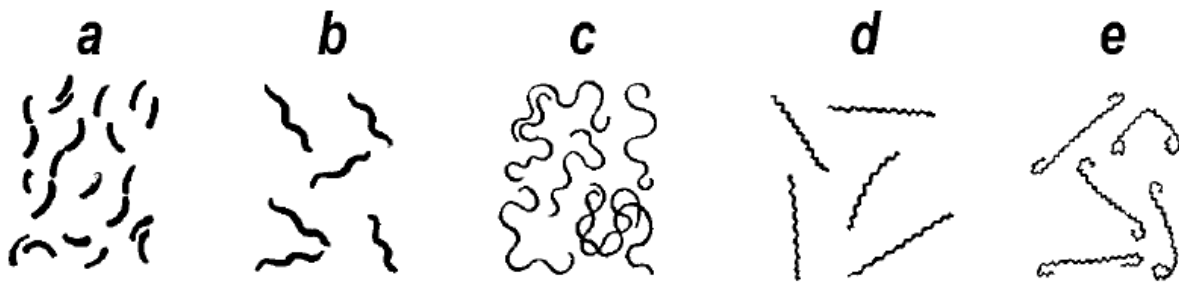
Když se bakterie dělí, mohou zůstat jedna ke druhé přichyceny. Uspořádání, které tak vznikne, závisí na rovině buněčného dělení:

- koky, které se dělí stále ve stejné rovině, vytvářejí tzv. řetízky.
- dvojice koků se označuje jako diplokok (řec. diplos = dvojitý).
- koky dělící se ve dvou rovinách jsou pak uspořádány ve čtveřicích neboli tetrádách.
- dělení ve třech na sebe kolmých rovinách vede ke vzniku útvarů označovaných jako pakety nebo sarciny (lat. sarcina = balík).

- v nepravidelných prostorových vztazích se dělí stafylokoky, jež jsou uspořádány jako shluky nebo hrozníčky (řec. stafylé = hrozen).

Tvar a uspořádání prohnutých a spirálovitých tyčinek:

- rohličkové tyčinky (*Vibrio cholerae*)
- hrubé spirály (*Spirillum minus*)
- nepravidelné spirály (*Borrelia recurrentis*)
- jemné pravidelné spirály (*Treponema pallidum*)
- velmi jemné spirály se zahnutými konci (*Leptospira icterohaemorrhagiae*)

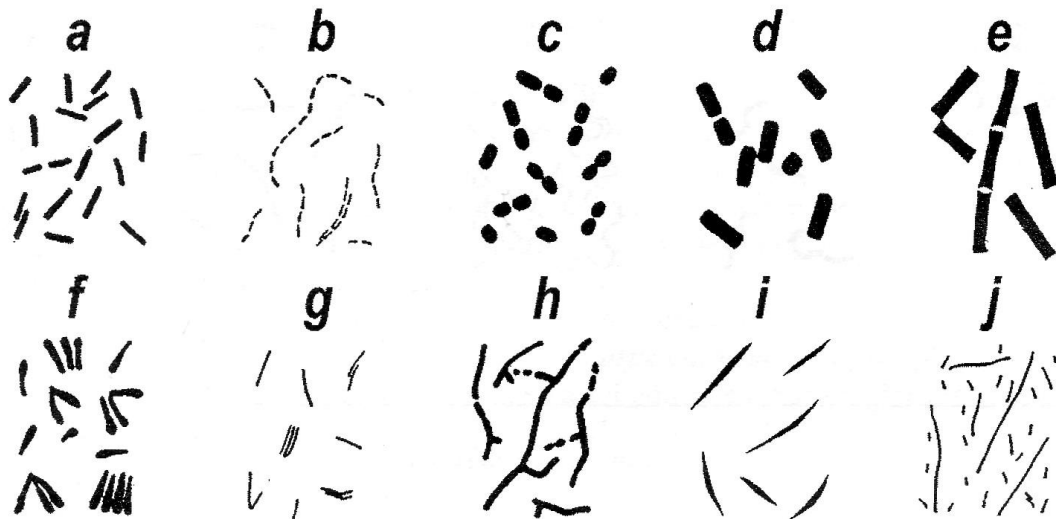


Jednoduché rozdělení uspořádání tyčinek:

- jednotlivě (artefakt při přípravě preparátu): zdánlivě většina bakterií
- ve dvojicích (diplobacily): *Moraxella*
- v řetězcích: většina bakterií, typicky *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptobacillus*, *Erysipelothrix*
- v palisádách: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*

Tvar a uspořádání víceméně rovných tyčinek:

- nejběžnější vzhled (např. *Escherichia coli*)
- jemné streptobacily (*Haemophilus ducreyi*)
- silné kokobacily, případně diplobacily (*Moraxella lacunata*)
- robustní tyčinky se zaoblenými konci (*Clostridium perfringens*)
- silné tyčinky s ostrými rohy (*Bacillus anthracis*)
- kyjovité, palisádovitě uspořádané tyčinky (*Corynebacterium diphtheriae*)
- štíhlé, palisádovitě uspořádané tyčinky (*Mycobacterium tuberculosis*)
- větvené tyčinky s náznaky fragmentace (*Nocardia asteroides*)
- vřetenovité tyčinky (*Fusobacterium fitsiforme*)
- drobné, pleomorfní tyčinky (*Haemophilus influenzae*)



Bakteriální spory

Bakteriální spory:

- Některé rody grampozitivních půdních bakterií reagují na úbytek živin či na vysychání tvorbou tzv. spor (hlavně rody *Bacillus* a *Clostridium*).
- Jejich spory se někdy označují jako endospory, protože vznikají uvnitř buňky na rozdíl od spor rodu *Streptomyces*, které se vytvářejí přeměnou zvláštních vícejaderných vláken.
- Bakteriální endospory jsou vysoce odolné útvary, v jejichž podobě jsou bakterie schopny odolávat vlivům prostředí a po léta přežívat nepříznivé podmínky.

Morfologie spor:

- pod mikroskopem vyhlíží spory jako vysoce světlomné útvary nepřijímající Gramovo barvivo.
- tvar, relativní velikost a uložení spor jsou někdy typické pro různé druhy, čehož lze využít k identifikaci sporulujících bakterií
- tvar:
 - oválné: většina (např. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*)
 - kulaté: *Clostridium tetani*, *Bacillus sphaericus*
- relativní velikost spor vzhledem k tloušťce buňky:
 - větší spory (zduřuje tyčinku): *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*
 - menší spory (nezduřuje tyčinku): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*
- uložení
 - terminální: *Clostridium tetani*, *Geobacillus stearothermophilus*
 - centrální: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, obvykle *Clostridium histolyticum*
 - subterminální: většina (např. *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus brevis*)

Sporulace:

- 1) Proces tvorby spory začíná replikací DNA a rozbalením bakteriálního chromosomu do dlouhého vlákna.
- 2) Vchlípením cytoplasmatické membrány se vytvoří septum, které rozdělí buňku na dvě nestejně části. Do obou částí se rozdělí i DNA.
- 3) Menší část (prespora) se začíná obalovat septem, tak získá dvojitou membránu a ocitne se uvnitř mateřské buňky.
- 4) Mezi membránami se tvoří tuhý kortex z peptidoglykanu.
- 5) Do prespory se ukládá velké množství kalcia a syntetizuje se v ní kyselina dipikolinová. Vzniklý kalciumdipikolinát se jinde než v endosporách nevyskytuje.
- 6) Pod kortexem vzniká další vrstva peptidoglykanu a na povrchu celého útvaru se ukládají proteinové obaly bohaté na cystein.
- 7) Tím je vývoj spory dokončen, mateřská buňka se rozpadá a spora se uvolňuje do okolí.

Klíčení spor:

- většina spor spontánně (dostane-li se do příznivých podmínek), některé - impuls, např. zahřátí na 65 °C
- začíná tzv. aktivací spory
- spora nabírá vodu – bobtná. Aktivují se enzymy, spora ztrácí svoji rezistenci, bílkoviny, které v ní vznikly jako stabilizátory, se začínají rozkládat a ze vzniklých aminokyselin se syntetizují nové proteiny.
- je odbouráván kortex, uvolňuje se Ca sůl kys. dipikolinové a rozpustné bílkoviny
- z vnitřního obalu se tvoří buněčná stěna, buňka roste, proráží zevním obalem
- sporový obal zůstává jako prázdný měchýřek nebo se rozpustí
- klíčící spory citlivější na antibiotika a antiseptika než formy vegetativní

Odolnost spor

- nejrezistentnější forma života, v podobě spor mohou bakterie přežít stovky let
- termorezistence -podmíněna nízkým obsahem vody a přítomností Ca solí kys. dipikolinové
- spory spolehlivě ničeny až při 120 °C tlakovou párou za 20 min (autoklávování). nebo při 160 °C suchým teplem za 1 h
- rezistence proti vyschnutí, UV záření, chemickým látkám, antibiotikům, barvivům (barvení možné za tepla, koncentrovanými barvivy)
- účinné dezinfekční prostředky –ethylenoxid, beta-propionlakton, konc. louhy a kyseliny, kyselina peroctová (Persteril)

Struktura spory

- nukleoid, cytoplasmatická membrána
- vnitřní obal -hlavní složkou je peptidoglykan, během klíčení spory se stává buněčnou stěnou nově vzniklé vegetativní buňky
- kortex (kůra) -tvoří asi 1/2 objemu spory, během klíčení se rozpadá. Obsahuje také peptidoglykan a Ca sůl kyseliny dipikolinové
- vnější obaly – bílkovinné povahy bohaté na cystein

2. Vnitřní skladba bakteriální buňky

Struktura bakterií

- bakteriální buňka se liší od rostlinné a živočišné podstatně jednodušší vnitřní strukturou
- obsahuje prakticky jen 4 struktury: jádro, ribosomy, cytoplasmatickou membránu a bun. stěnu
- velikost – je řádově menší než eukaryotická buňka, je srovnatelná s velikostí mitochondrie. Zatímco jaterní buňka má velikost cca 20 μm , *E.coli* je tyčinka o délce 2 μm
- důsledky malé velikosti buňky:
 - velký poměr povrchu k objemu = velká plocha kontaktu buňky s prostředím, z toho plyne vysoká rychlost výměny molekul mezi buňkou a prostředím
 - minimální čas potřebný pro vnitrobuněčnou dopravu molekul

u všech bakterií	u některých bakterií
– jádro – cytoplasma s ribosomy – cytoplasmatická membrána – buněčná stěna (výjimka <i>Mycoplasma</i> sp.)	– pouzdro a pouzderné substance – bičíky – fimbrie – pili – inkluse a plasmidy v cytoplasmě – endospóry

Nukleoid (jádro)

- je místo v cytoplasmě, kde je uložen bakteriální chromosom (většinou cirkulární DNA), v ELMI se jeví jako světlejší oblast uprostřed cytoplasmy
- nemá jadernou membránu, nemá stálý tvar
- tvoří kolem 15 % objemu buňky, váhově činí jen asi 3 % sušiny
- obsahuje 1 molekulu dvoušroubovicové DNA spojené kovalentně do kruhu
- kruhová molekula je mnohonásobně poskládána do asi 50 až 150 smyček, zhuštěných do malého prostoru tvaru klubka
- za fyziologických podmínek je dvojitá DNA ve vynucené konformaci, zvané superhelicitu (nadšroubovicové vinutí)
 - závit dvojité DNA mohou být víc „přitaženy“ (pozitivní superhelicitu), nebo více „rozvolněny“ (negativní superhelicitu) – fyziologická superhelicitu je negativní
 - stupeň negativity superhelicity významně ovlivňuje všechny funkce DNA (transkripci a tím genovou expresi, replikaci DNA a její reparaci i rekombinaci), neboť všechny předpokládají jako první krok lokální rozvolnění dvojité DNA tak, aby na jeden z řetězců nasednout příslušný enzymový komplex
 - stupeň negativní superhelicity je fyziologicky udržován činností enzymů zvaných topoisomerasy
 - topoisomerasa I bez potřeby energie přeruším jednoho z řetězců superhelicitu uvolní a poté opět řetězec spojí
 - topoisomerasa II naopak za spotřeby ATP superhelicitu vytvářejí
- v klidové nerostoucí bakterii jen jeden chromosom – haploidní jádro

- protože při dělení bakterii se nejprve replikuje DNA, mohou rychle se dělící buňky obsahovat i několik nukleoidů.
- nositel genetické informace – je rozčleněna do funkčních jednotek = genů (úseků řetězce DNA). Jádro bakterií obsahuje asi 3500 genů. Jádro bakterií je haploidní a obsahuje tedy daný gen jen v jedné alele
 - genová exprese začíná transkripcí strukturního genu za vzniku molekuly mRNA, tato molekula už není dále upravována (bakteriální strukturní gen není rozčleněn na introny a exony) a slouží přímo k translaci
 - protože jaderná DNA není oddělena od cytoplazmy membránou, mohou ribosomy nasedat hned na rodící se mRNA a vyrábět tak bílkoviny větší rychlostí než u eukaryot
 - hlavním aktérem transkripce je DNA-dependentní RNA-polymeráza (transkriptáza). Inicie transkripce začíná vazbou polymerázy na specifické místo na jedné závitnici z dvojzávitnice DNA zvané promotor.
 - promotor – úsek DNA o délce 50-70 párů bazí, který předchází strukturnímu genu (nebo sadě strukturních genů zvané operon a kódující jedinou molekulu mRNA). Promotory a jimi uvozované geny jsou vždy jen na jedné z obou závitnic, úsek na druhé závitnici je nefunkční
 - některé promotory však jsou na jedné závitnici a jiné na druhé, proto se polymeráza pohybuje po chromozomu v jednom směru po jedné závitnici a v opačném po závitnici druhé.
- bakteriální jádro na rozdíl od eukaryotního neobsahuje histony – existují zde však asi 4 druhy proteinů „histonům podobných“. V buňce je jich cca 120 000 – tedy asi 1 protein na 200 párů bazí
- během replikace je DNA přichycena na místo cytoplasmatické membrány nazývané mesosom.

Cytoplasma

- cytoplasma je vodný roztok ohraničený cytoplasmatickou membránou, v němž jsou umístěny nerozpustné složky
- vyplňuje vnitřní prostor, je rozpustná, viskózní, podobná gelu
- obsahuje
 - jádro (chromosom), ribosomy, případně inkluze a plasmidy
 - více než 50 % všech bílkovin buňky, většinou s enzymatickou aktivitou (enzymy glykolýzy, pentózového cyklu, Krebsova cyklu, dehydrogenázy, proteázy, nukleázy, esterázy, regulační molekuly, represory, enzymy katalyzující syntézu AMK a nukleotidů, molekuly mRNA a tRNA, enzymy pro replikaci, transkripci, translaci...)
 - přijaté živiny a zplodiny metabolismu
 - četné kationty a anionty
- je to jeviště života buňky – místo, kde se odehrává pohyb molekul a struktur v prostoru, jejich vzájemné vyhledávání a interakce

Cytoplasmatická membrána

- obdává povrch bakteriální cytoplasmy, je jediná vnitřní biologická membrána
- je hladkého a napjatého povrchu (výjimečně tvoří invaginace)
- je tvořena tekutou dvojvrstvou fosfolipidů s vnořenými bílkovinami (mohou jí zcela prostupovat – integrální proteiny, nebo jsou poutány elektrostatickými silami k její hydrofilní části – periferní proteiny)
- většina membránových proteinů je z vnitřní strany membrány (a tedy i jejich enzymových aktivit), a ta je tedy stavebně i funkčně asymetrická
- chemické složení membrány kolísá podle druhu bakterie a v závislosti na zevním prostředí (zhruba 70 % bílkoviny, 30 % lipidy – fosfolipidy, absence cholesterolu)
- větší podíl nenasycených MK zajišťuje potřebný stupeň tekutosti membrány
- funkce:
 - izolace vnitřního prostředí, od vnějšího, zcela odlišného prostředí – díky vnitřní hydrofobní zóně membrány, neboť je pro polární (ve vodě rozpustné) molekuly nepropustná
 - izolace ovšem nesmí být absolutní = selektivní permeabilita, transport živin do bakteriální buňky (transportní proteiny)
 - osmotická bariéra
 - v membráně jsou zakotveny bílkoviny tzv. rotoru bakteriálních bičíků
 - respirační pochody - jelikož prokaryotické buňky neobsahují mitochondrie a ER, elektronové transportní systémy sú zakotvené v cytoplasmatické membráně
 - syntéza některých složek nejen membrány, ale i buněčné stěny a slizové vrstvy
 - sekrece látek z cytoplasmy do zevního prostředí (bakteriální toxiny, extracelulární enzymy), respektive do stěny a glykokalixu.

Plasmidy

- malé molekuly extrachromosomální DNA; nejčastěji u G- bakterií
- nesou genetické znaky bakterie, nejedná se však o znaky nezbytné k životu bakterie (představují pouze přídatnou genetickou informaci)
- mohou být genetickým nosičem ATB rezistencí

Inkluze

- uloženy v cytoplasmě v podobě granul s obsahem zásobních látek, jejich tvorba závisí na metabolické aktivitě buňky a povaze prostředí
 - glykogenová granula
 - granula kyseliny poly-beta-hydroxymáselné
 - polyfosfátová granula (Babes-Ernestova u korynebakterií)

Ribosomy

- jsou složeny z dvou podjednotek, 30S a 50S, které se spojují ve funkční jednotku 70S
- ribosom je útvar supramolekulární a asymetrický
- funkce: překlad genetické informace mRNA v primární strukturu (sekvenci aminokyselin) bílkoviny
- v buňce jsou uloženy:
 - volně v cytoplasmě
 - v oblasti jádra, kde nasedají na rodící se mRNA a hned ji překládají
 - nasedlé na cytoplasmatickou membránu, kde syntetizují proteiny určené do membrány nebo na export
- počet ribosomů v buňce je proměnný a úměrný růstové rychlosti – čím rychleji buňka roste, tím více ribosomů má (klidová buňka jich má několik set, rychle rostoucí i 30 000)
- rychlost činnosti individuálního ribosomu je konstantní – asi 800 aminokyselin za minutu
- proteosyntéza:
 - překlad (translace) genetické informace z abecedy nukleových bází do abecedy 20 aminokyselin
 - translace se provádí podle předpisu zvaného genetický kód – trojici nukleotidových bází v mRNA je přiřazena jedna aminokyselina
 - existuje 64 možných různých trojic (tripletů, kodonů) na 20 aminokyselin – některé aminokyseliny jsou kódovány více než jednou trojicí
 - 3 terminační kodony, 2 iniciační (AUG – methionin, GUG – valin)
 - molekula mRNA kóduje zpravidla v průměru 3 bílkoviny
 - translace navazuje těsně na transkripci – na mRNA nasedá ribosom ihned, jakmile je pro něj přítomno vazebné místo (krátká specifická sekvence bází), a jeho činnost začíná ihned, dříve než je transkripce dokončena
 - aminokyseliny jsou vázány na specifickou molekulu transferové RNA (tRNA) – ta nese na svém druhém konci antikodon komplementární ke kodonu na mRNA
 - iniciace translace – vznik komplexu mezi malou podjednotkou ribosomu, molekulou mRNA a molekulou tRNA (která nese první aminokyselinu, kterou je většinou methionin)
 - následuje elongační fáze, která končí, když ribosom dosáhne jednoho ze 3 terminačních kodonů
 - energetická náročnost – inkorporace jedné AMK do bílkoviny stojí 2 molekuly ATP a 2 molekuly GTP
 - protein uvolněný z ribosomu zajímá ihned a automaticky sekundární strukturu (díky elektrostatickým a hydrofobním silám) a posléze i strukturu terciární
 - správnému poskládání do funkční terciární nebo kvartérní struktury napomáhají tzv. chaperony

Chemické složení bakteriální buňky

- neliší se od eukaryotů
- biogenní prvky:
 - tvořící organické látky: O, C, N, H, P, S
 - ionty: Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^-
 - stopové prvky: Mn, Fe, Co, Cu, Zn, B, Al, V, Mo, I, Si, Sn, Ni, Cr, F, Se
- molekuly:
 - malé molekuly – CO_2 , H_2O , NH_4^+ , HPO_4^{2-} - přijímané zpravidla jako živiny a slouží ke konstrukci molekul následující kategorie
 - metabolické intermediáty a stavební kameny makromolekul – glukóza, ribosa, glycerol, pyruvát, aminokyseliny, nukleotidy, mastné kyseliny
 - makromolekuly – bílkoviny, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy
- v bakteriální buňce je asi 3300 různých druhů molekul, a celkem je v ní asi 80 milionů molekul
- 96,5% sušiny bakterie jsou makromolekuly
 - nukleové kyseliny: nositel genetické informace, realizují její uchovávání, zmnožení, přepis i překlad.
 - bílkoviny: tvoří asi 50% suché hmotnosti bakterie, mají stavebnou a funkční (enzymatickou) funkci
 - polysacharidy: jednak intracelulární zásobní látka (glykogen), jednak konstrukční i funkční (peptidoglykan, lipopolysacharid, teichoové kyseliny) součástí bun. stěny a také pouzdra a glykokalixu. Jsou nositeli specifické antigenicity buněk a schopnosti specifické adherence bakterií na specifické buňky hostitele.
 - lipidy: amfipatické molekuly, spontánně vytvářejí ve vodním prostředí dvojvrstvy. Jsou konstrukčním prvkem cytoplasmatické membrány, výjimečně (mykobakteria) i součástí buněčné stěny. Lipidy tvoří dále tukové kapénky v cytoplasmě a jsou rezervní organický materiál.
- voda
 - prostředí pro interakce molekul v životních dějích, transport biomolekul v prostoru buňky
 - tvoří 75-85% bakteriální buňky, spory 10-15%.
 - voda vázaná - menší část, nezúčastňuje se metabolických pochodů, je součástí různých bakteriálních struktur
 - voda volná - větší část, významná pro metabolismus bakt. buňky
 - umožňuje rozpouštění krystalických látek a rozptýlení látek koloidních (bílkovin v cytoplasmě)
 - umožňuje realizaci biochemických reakcí probíhajících výhradně ve vodném roztoku, do nichž poskytuje hydroxylové a vodíkové ionty
 - brání přehřátí buňky v místě probíhající reakce okamžitým odvodem tepla, vzniklého při exotermických reakcích (vynikající vodič tepla)
 - je dobrým elektrickým izolátorem
 - má velké povrchové napětí
- pigmenty
 - endopigmenty - jsou tvořeny uvnitř buněk (barevné kolonie)
 - exopigmenty - vylučovány do okolí (zbarvení půdy)
 - jsou důležitým taxonomickým znakem.
 - nejčastěji jsou deriváty karotenu, indolu, fenazinu, naftochinonu

- funkce pigmentů:
 - podíl na transportu H iontů v respiračních pochodech (pyocyanin u pseudomonád, ftiokol u mykobakterií)
 - antibiotická aktivita (fenaziny, naftochinony)
 - ochrana proti UV záření (karoteny)
 - u většiny pigmentů funkce neznámá
- chemická charakteristika
 - deriváty karotenu - žluté, oranžové, červené - rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*
 - deriváty indolu - purpurový pigment při oxidaci tryptofanu - rod *Chromobacterium*
 - deriváty fenazinu - rod *Pseudomonas*, tmavo-modrý pyocyanin - druh *Pseudomonas aeruginosa*
 - Naftochinony - od naftochinonů odvozen žlutý ftiokol izolovaný z *Mycobacterium tuberculosis*

3. Struktura buněčné stěny bakterií

Buněčná stěna

- má vysokou pevnost
- tvoří kostru bakteriální buňky
- udržuje stálý tvar
- zajišťuje vnitřní osmotický tlak (2 MPa)
- dělení podle barvení dle Grama na G+ a G-

Základní součástí buněčné stěny bakterií je vrstva peptidoglykanu (též zvaného mukopeptid nebo murein). Skládá se z vrstev polysacharidových řetězců pospojovaných napříč krátkými peptidy. Peptidoglykan obsahuje střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukosamin.

Ze zbytků kyseliny N-acetylmuramové vycházejí tetrapeptidy a reakcí zvanou transpeptidace se navzájem vážou peptidickými můstky. Další (vnější) struktura stěny se ale u bakterií gram pozitivních a gram negativních podstatně liší. K dělení bakterií dle jejich buněčné stěny nám pomáhá Gramovo barvení.

Barvitelnost

- závislá na chemické a prostorové skladbě neporušené buněčné stěny
- G+ po obarvení krystalovou violetí a moření roztokem jodu v jodidu draselném zadržují komplex krystalové violeti a jodu v buněčné stěně, neodbarví se acetonalkoholem = modrofialové
- G- se odbarví – komplex se vyplaví acetonalkoholem a buňky se dobarví kontrastním anilinovým barvivem – safraninem = červené
- Význam
 - diagnostický
 - pro iniciální antibioterapii
- Výjimky, G- špatně se barví
 - Mycobacterium sp.
 - Spirochety
 - Mycoplasma sp.
 - Chlamydia sp.
 - Rickettsia sp.

Gram pozitivní bakterie

- buněčná stěna je silnější (15-20 nm), stavěna poměrně jednoduše (tvořena polysacharidy – peptidoglykanem a teichoovými kyselinami)
- tvoří ji mohutná peptidoglykanová vrstva, v níž jsou polysacharidové řetězce uloženy v mnoha vrstvách nad sebou.
- kolmo k povrchu buňky probíhají peptidoglykanovou strukturou řetězce kyseliny teichoové.

- prakticky všechny zbytky kyseliny N-acetylmuramové jsou spojeny peptidickými můstky (na rozdíl od G-).
- právě transpeptidací brzdí antibiotika typu penicilinu a cefalosporinů.
- přes stěnu přechází volně jen velmi málo molekul, uplatňuje se zde aktivní transport, jehož se účastní mnohdy více než jeden protein.

Peptidoglykan (murein, mukopeptid)

- odpovídá za pevnost stěny
- jedná se o heteropolymer sestávající z pravidelně se střídajících zbytků N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny (éter kyseliny mléčné s N-acetylglukosaminem). N-acetylglukosamin se váže na kyselinu muramovou 1,4 glykosidickou vazbou
- řetězce peptidoglykanu vytvářejí prostorovou síť, v níž jsou propojeny pomocí tetrapeptidů a spojovacích můstků
- tetrapeptidy (aminokyseliny) se vážou přes kyselinu mléčnou na kyselinu muramovou
- spojovací můstky (jiné aminokyseliny) navzájem propojují paralelně probíhající řetězce polymérů N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny
 - spojovací můstek spojuje tetrapeptidy napříč
 - jiný počet a jiná kvalita aminokyselin u různých bakteriálních druhů -> taxonomický význam

Teichoové kyseliny

- fosfoglycerolteichoová kyselina + glukosa, N-acetylglukosamin
- ribitolteichoová kyselina + D-alanin, N-acetylglukosamin

Dělení teichoových kyselin podle funkce

- stěnová - váže se kovalentně na peptidoglykan kolmo k povrchu a spolu s ním vytváří receptor pro fágy - je ribitolového i glycerolového typu
- lipoteichoová - je zabudována ve fosfolipidech plazmatické membrány, jde kolmo k povrchu, na kterém tvoří struktury důležité pro adhezenci k podkladu (např. epitelium) - je vždy glycerolového typu

Gramnegativní bakterie

- buněčná stěna G- bakterií je stavěna daleko složitěji, i když je tenčí (10- 15nm).
- skládá se ze zevní membrány a pod ní uloženého peptidoglykanu. Ten je tenký, prakticky jednovrstevný, je součástí tzv. periplasmatického prostoru nalézajícího se nad cytoplasmatickou membránou.
- zevní membrána obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a proteiny.
- fosfolipidy vytvářejí dvojitou vrstvu analogicky jako v cytoplasmatické membráně. V ní jsou uloženy různé bílkoviny, některé vytvářejí kanálky (poriny) uplatňující se v transportu živin do periplasmatického prostoru. Poriny umožňují průnik látek rozpustných ve vodě přes vnější membránu; prostřednictvím porinů mohou projít i hydrofilní ATB.
- lipoproteiny zajišťují vazbu zevní membrány na peptidoglykan.

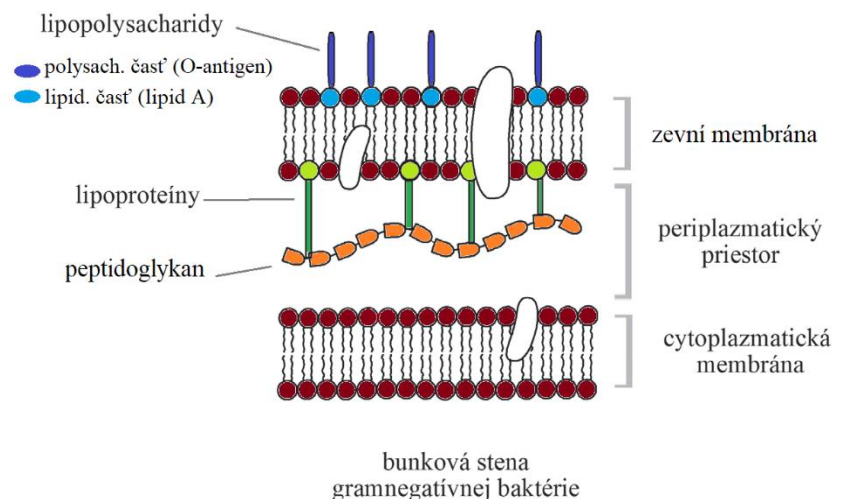
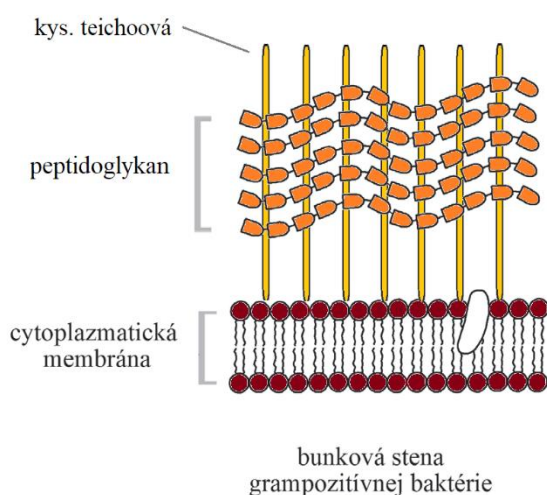
- lipopolysacharid, zvaný též endotoxin
 - zakotven v zevní vrstvě jsou svojí lipidovou částí, tzv. lipidem A.
 - polysacharidová část molekuly vyčnívá ze zevní membrány a je tvořena různými sacharidy specifickými pro určitý druh či sérotyp bakterie, což je podstatou funkce lipopolysacharidu coby tzv. antigenu O (antigenu tělového, somatického).
- zevní membrána G- bakterií brání prostupu řady molekul, které jinak snadno pronikají stěnou buněk grampozitivních. Jedná se o některá barviva (krystalovou violet), antibiotika (například erythromycin) či soli žlučových kyselin (což usnadňuje přežívání G- bakterií v zažívacím traktu).
- periplasmatický prostor obsahuje bílkoviny sloužící jako enzymy štěpící nebo transportující živiny. Některé z těchto enzymů jsou schopny inaktivovat antibiotika. Například beta-laktamasy štěpí beta-laktamový kruh penicilinů a cefalosporinů.

Shrnutí:

- mají slabší stěnu - 10-15 nm
- zevně od cytoplasmatické membrány je periplasmatický prostor (obsahuje enzymy) a jedna úzká vrstva peptidoglykanu
- směrem k povrchu jsou uloženy lipoproteiny - vazba zevní membrány na peptidoglykan.
 - jejich bílkovinná část je většinou zabudována v peptidoglykanu
 - lipidová část v povrchnější fosfolipidové vrstvě, některé proteiny vytvářejí „póry“, které sahají až k povrchu
- na povrchu jsou lipopolysacharidy
 - lipidová část (lipid A) - endotoxin, zakotvena v membráně
 - polysacharidová část – spojena s antigenicitou (O-antigen)

Výjimky ve stavbě stěny

- např. mykobakterie, korynebakterie, nocardie – mají ve stěně glykolipidy
- mykoplazmata – bez buněčné stěny
- Staphylococcus aureus–protein A
- Streptococcus pyogenes–protein M



Protoplasty, sféropasty a L-formy:

- vnější prostředí je pro bakterie většinou hypotonické, voda má snahu pronikat do buňky (osmóza).
- v hypotonickém prostředí tedy buňka zvětšuje svůj objem, ale nepraská, protože pevná bakteriální stěna vysokému osmotickému tlaku odolává.
- naopak, ve vysoce hypertonickém prostředí bakterie ztrácejí vodu, podléhají tzv. plasmolýze a posléze hynou. Toho se využívá při uchovávání potravin (nasolování masa, nakládání do cukru, příprava marmelád).

Rozrušíme-li bakteriální stěnu například lysozymem, dostaneme okrouhlé útvary ohraničené cytoplasmatickou membránou, protoplasty nebo sféropasty.

- protoplasty vznikají z grampozitivních bakterií a neobsahují žádné součásti buněčné stěny.
- sféropasty se připravují z gramnegativních bakterií a na jejich povrchu zůstávají zbytky stěny.

Obojí útvary jsou schopny přežívat jen v izotonickém médiu, jinak praskají.

Bakterie, které ztratily buněčnou stěnu, se nazývají L-formy bakterií.

- mohou vznikat vlivem agens rozrušujících buněčnou stěnu (lysozym, penicilin, protilátky s komplementem) i v makroorganismu.
- v podobě L-form mají bakterie možnost vliv těchto činitelů přežít.

Barvitelnost dle Grama

- nejdůležitější diagnostické barvení, a to pro těsnou korelaci jeho výsledku s mnoha dalšími vlastnostmi daného mikroorganismu, především s citlivostí tohoto mikroba na různá antibiotika.
- barvením dle Grama často zahajujeme identifikaci neznámého kmene izolovaného od pacienta. Výsledek barvení klinického vzorku, například mozkomíšního moku, přináší cennou a rychlou informaci pro ošetřujícího lékaře. Na jeho základě může zvolit vhodné antibiotikum dříve, než mikrobiolog příslušné agens vypěstuje, určí a zjistí jeho citlivost.
- je důležité pro klasifikaci bakterií. Jeho pomocí se odliší navzájem velké skupiny bakterií, jako grampozitivní koky, gramnegativní koky, grampozitivní tyčinky a gramnegativní tyčinky.
- existují bakterie v podstatě grampozitivní, jejichž stěna obsahuje takové množství látek voskovitého charakteru, že barviva nepřijímají a běžným postupem se dle Grama obarvit nedají.
 - přinutíme-li je však přijmout barvivo například barvením za horka, pak zase vzdorují odbarvování kyselinami, louhy a alkoholy.
 - říkáme jim bakterie acidorezistentní a jejich nejdůležitějším zástupcem je původce tuberkulózy, acidorezistentní tyčinka *Mycobacterium tuberculosis*.
 - částečně acidorezistentní mohou být i někteří příslušníci nokardií a známky acidorezistence vykazují i bakteriální spory.

Tímto barvením lze rozlišit bakterie, které jsou nebo nejsou schopny podržet si barvivo (jímž byly před tím nabarveny) v přítomnosti alkoholu nebo acetonu.

Postup:

- 1) fixovaný preparát bakterií se nejprve barví krystalovou violetí, která bakteriální buňky obarví tmavomodře až modrofialově (30s)
- 2) přidá se Lugolův roztok, což v obarvených buňkách vede ke vzniku komplexu barviva s jodem (30s)
- 3) následuje působení alkoholu (96% etanolu) nebo acetonu. (15s) Není-li působení alkoholu dlouhé, některé bakterie si komplex krystalové violeti s jodem podrží, jiné se rychle odbarví. Ty bakterie, které si barvivo podrží nazýváme grampozitivní a zůstanou tmavomodré.

Druhé, odbarvené zvané gramnegativní, je třeba dobarvit. Preparát propláchneme vodou.

- 4) k dobarvení se používá např. safranin nebo zředěný fuchsin (60s) → gramnegativní bakterie jsou pak červené barvy (obě relativně slabá červená barviva tmavomodrý tón grampozitivních bakterií ovlivní jen nepatrně).

Podstata Gramová barvení není dodnes přesně známa. Rozhodně ale souvisí se stavbou bakteriální stěny. Vysvětlení se ujímají dvě teorie:

- Teorie první – stěna G- bakterií obsahuje více lipidů než stěna bakterií G+, alkohol v ní vytváří póry, jimiž se barevný komplex snáz vyplavuje.
- Teorie druhá – příčinou grampozitivity je silnější vrstva peptidoglykanu ve stěně G+ bakterií, která se po dehydrataci alkoholem smrští, což zpomalí únik komplexu krystalové violeti s jodem z grampozitivních buněk.

4. Povrchová skladba bakteriální buňky

Extracelulární polymery – pouzdro, glykokalix

- na povrchu některých bakterií se mohou nalézat polymery vytvářející:
 - 1) *mikropouzdra* - nejsou pravá pouzdra, nepřesahují tloušťku 0,2 nm, tvoří nej povrchnější část stěny - detekovatelné pouze sérologicky a elektronopticky
 - 2) *makropouzdra* – pravá pouzdra aktivně tvořena bakteriemi na svém povrchu
 - polysacharidy (pneumokoky, hemofily, neisserie, streptokoky a další)
 - kys. hyaluronová (streptokoky sk. A)
 - polypeptidy (bacily)
 - 3) *slizová vrstva* – dextranová vrstva u *Streptococcus mutans*, polysacharidový sliz u některých koagulasaneg. stafylokoků
- pouzdra jsou pevně k bun. stěně a vykazují určitou strukturální integritu, zatímco slizová vrstva je tvořena volně nasedající amorfni hmotou
- **glykokalix** – souhrnný název pro polysacharidové struktury, ať pouzdra nebo sliz
- opouzdrěné bakterie obvykle lépe vzdorují obranným pochodům makroorganismu - jsou rezistentní vůči fágům, pouzdro je chrání před fagocytózou
- díky lepkavé slizové vrstvě adherují bakterie jak k sebe navzájem, tak i na různé povrchy – tvorba biofilmu (na zubní sklovině, na výstelce tělesných dutin, na povrchu kanyl a katétrů)
- některá mikropouzdra mohou být vnější součástí buněčné stěny (M protein, Vi antigen)
- extracelulární polymery se nebarví běžnými barvivami, dají se znázornit tzv. negativním barvením pomocí tuše. Částičky tuše jimi neproniknou, takže buňky se zdají být obklopeny prázdňným dvorcem
- při pěstování bakterií se tvorba pouzdra či slizu projeví mukózním vzhledem kolonií
- pouzdro má antigenní vlastnosti, většinou velmi rozmanité u téhož druhu bakterie (u *Klebsiella pneumoniae* existuje více než 70 kapsulárních antigenů)

Bičíky

- průměr 20 – 30 nm, délka 20 μm
- jsou organelami pohybu pohyblivých bakterií (většina nepohyblivá)
- uspořádání bičíků:
 - monotricha - s 1 bičíkem na pólu (*Vibrio* sp.)
 - lofotricha - svazek bičíků na 1 pólu (*Pseudomonas* sp.)
 - amfitricha - svazky bičíků na obou pólech (*Spirillum* sp.)
 - peritricha - bičíky po celém povrchu (*E. coli*)
- pohyb - vyvolán rotací rigidního bičíku (jako lodní šroub) – 40–60 ot/s, rychlost bakterií je 50–200 μm/s (50x větší než je délka buňky)
- směr pohybu - dán koncentrací živin v okolí, pohyb směrem k živinám (pozitivní chemotaxe), pryč od jedovatých metabolitů (negativní chemotaxe). Zpracování chemického signálu pomocí molekulárních chemosenzorů na cytoplasmatické membráně (jsou rozloženy po

celém jejím povrchu). Senzory nereagují na samotnou přítomnost látky v prostředí, ale na změnu její koncentrace.

- mechanicky málo odolné – již při třepání suspenze bakterií se lámou (dorůstají rychle – $1\mu\text{m}/\text{min}$)
- mají antigenní povahu (H antigeny)
- dají se znázornit stříbřením (obtížně), v praxi na přítomnost bičíku usuzujeme nepřímo na základě důkazu pohybu bakterií v polotuhých půdách
- stavba bičíku: lze rozeznat vlákno, kolénko a bazální tělísko.
 - **vlákno**
 - skládá se z opakujících se podjednotek bílkoviny zvané **flagelin**.
 - aminokyselinové složení flagelinu (a tím i jeho antigennost) se u jednotlivých druhů bakterií liší.
 - podjednotky flagelinu jsou ve vlákně bičíku uloženy spirálovitě a centrum vlákna je duté.
 - **tuhé kolénko**
 - nachází se při povrchu bakterie a mění směr bičíku vystupujícího z buněčné stěny o 90° .
 - **bazální tělísko**
 - skládá se z několika prstenců upevňujících bičík v cytoplasmatické membráně a bakteriální stěně.
 - prstence nacházející se v peptidoglykanové vrstvě zůstávají nepohyblivé a z mechanického hlediska fungují jako stator
 - prstenec uložený v cytoplasmatické membráně se může otáčet. Je spojen tyčinkovitou strukturou s kolénkem a vláknem a udílí bičíku rotaci.
 - výsledkem je rovnoměrný pohyb bakterie střídaný při obrácené rotaci bičíků krátkým obdobím převalování a tím změny směru.

Fimbrie (pili)

- tenké štětinovité výběžky viditelné pouze ELMI; krátká rigidní rovná vlákna trčící všemi směry ven z povrchu bakterie
- jsou na povrchu některých G- bakterií (až stovky)
- rovné tyčinky o průměru 7-10 nm, délky 1-4 μm
- sestávají z bílkovinného polyméru svinutého do šroubovice
- některé mají funkci adhezínů - umožňují bakteriím přichytit se k podkladu (faktor adherence)
- některé mají i hemaglutinační aktivitu

Sex pili

- mohou se vyskytovat na povrchu některých G- bakterií (obsahujících F faktor, buňky samčí, donorové)
- jsou širší a delší než fimbrie (dlouhé 0,5-10 μm)
 - duté bílkovinné tyčinky, 1-2 na buňku

- informace pro jejich tvorbu je kódována plasmidem zvaným F-faktor
- z bakterie, označované jako samčí nebo donorová, vystupuje obvykle 1 sex pilus
- slouží k přenosu DNA do buňky recipientní, procesem konjugace

5. Morfologie, množení virů a bakteriofágů

- nejmenší organismy, 20 nm (picornaviry) – 400 nm (poxvirus), přímé pozorování – elektronový mikroskop
- nejsou organizovány jako buňky, ale jako částice (organismy nebuněčné, resp. podbuněčné)
- bez vlastního metabolismu, metabolismus závislý na živé buňce (intracelulární parazité)
- nerostou a nemnoží se mimo hostitelské buňky
- obsahují vždy jen jediný typ nukleové kyseliny (DNA nebo RNA).
- nerostou na živných půdách a nejsou citlivé na antibiotika.
- nemnoží se dělením, ale syntézou svých složek hostitelskou buňkou.

Morfologie

- virová částice se nazývá virion
- vnitřní část virionu se nazývá dřeň, nebo nukleoid – obsahuje nukleovou kyselinu a je obklopen bílkovinnou schránkou – kapsidou. Celek se nazývá nukleokapsida
- viriony nejjednodušších virů jsou pouhými holými nukleokapsidami, u jiných virů je nukleokapsida uložena ve virovém obalu.
- obal se u většiny virů skládá z vnitřního proteinu (M-protein) a ze zevní lipidové dvojvrstvy (původem z membrán hostitelské buňky), ve které jsou uloženy virové glykoproteiny
 - M-protein váže obal k nukleokapsidě a je specifický pro jednotlivé druhy.
 - glykoproteiny se sdružují v pravidelně uspořádané peplomy, které obvykle vyčnívají z obalu v podobě výběžků. Jejich úloha spočívá především v adsorpci, ale současně plní i další funkce.

Kapsida

- virová kapsida se skládá ze stejných, opakujících se molekul bílkoviny, tzv. proteinových jednotek neboli kapsomer (protomer)
- uspořádání kapsomer určuje typ symetrie (kubická, helikální).
- kubická symetrie – kapsidy jsou stavěny jako pravidelný dvacetistěn (ikosaedr) - těleso o 12 vrcholech a 20 stěnách tvaru rovnostranného trojúhelníka
- u virů se spirální (helikální) symetrii se nukleoid a kapsida nedají dobře rozeznat – hovoříme jen o nukleokapsidě. Tvoří ji závitnice vláknů NK těsně obložených bílkovinnými protomery – vzniká tak dutý válec připomínající hadici vysavače.
- mezi viry s komplexní symetrií patří bičíkaté fágy, jejichž hlavička je stavěna na základě symetrie kubické a bičík má symetrii binární

Chemická stavba

Nukleové kyseliny

- NK je nositelem jednak genetické informace pro tvorbu sebe samy a ostatních virových makromolekul, jednak infekčnosti, schopnosti vyjádřit tuto informaci v hostitelské buňce
- ve virech se vyskytují nukleové kyseliny různého typu:
 - dsDNA – poxviry, herpesviry, adenoviry
 - ssDNA – parvoviry
 - ssRNA o kladné polaritě – pikornaviry, togaviry
 - ssRNA o negativní polaritě – paramyxoviry, rhabdoviry, filoviry
 - dsRNA – reoviry

Virové proteiny a lipidy

- většina proteinů – stavebná funkce, některé účinkují jako enzymy
- proteiny kapsidy – ochranná funkce před vlivy prostředí; u neobalených virů také odpovídají za adhezi
- strukturální bílkoviny ve dření se vážou na NK a stabilizují ji
- enzymy:
 - neuraminidasa – umožňuje uvolnění zralých virionů z buňky
 - polymerasy, reverzní transkriptasa – zahajují množení
- glykoproteiny obalených virů – adheze a průnik do buňky
- lipidy – u obalených virů, z membrán hostitelské buňky, tvoří dvojvrstvu, ochranná funkce před enzymatickým poškozením. Jsou příčinou citlivost obalených virů k éteru a jiným rozpustidlům

Virové antigeny

1. Nestrukturální
 - nevstupují do hotového virionu, vyskytují se během virového množení v hostitelské buňce (různé virem kódované enzymy). Virové antigeny se objevují i na povrchu buňky – důležité pro imunitní reakci
2. Strukturální
 - povrchové
 - bílkoviny zevní části kapsidy neobalených virů, resp. glykoproteiny peplomer u obalených
 - bývají vysoce specifické, na jejich podkladě se rozlišují sérotypy
 - protilátky proti povrchovým antigenům bývají protekční – chrání před reinfekcí po zbytek života
 - protilátky proti nim se prokazují neutralizační reakcí nebo zábranou hemaglutinace
 - vnitřní
 - bílkoviny a nukleoproteinové komplexy nukleoidu, příp. nukleokapsidy
 - méně specifické, bývají společné všem virům určité skupiny
 - protilátky proti nim se dokazují většinou KFR

Odolnost a inaktivace

- inaktivace viru – poškození virionu, které ho zbaví schopnosti infikovat buňku
- neobalené viry
 - jsou relativně odolné k zevním podmínkám, jsou většinou rezistentní k éteru a tukovým rozpouštědlům.
 - jejich přenos se uskutečňuje přímým kontaktem se zdrojem nákazy, prostřednictvím kontaminovaných předmětů, vody nebo potravin.
 - neobalené viry nejsou většinou inaktivovány kyselým pH žaludku.
- obalené viry
 - jsou citlivější vůči fyzikálním a chemickým vlivům. Jsou inaktivovány éterem, tukovými rozpouštědly a kyselým pH, z tohoto důvodu nepronikají do dolních partií GIT.

Reprodukce virů

- předpoklad – vnímavá buňka, v níž reprodukční cyklus doběhne až do konce, z níž se uvolní nové viriony

1. Vstup NK do buňky

- a. přilnutí
 - kontakt virionu s receptorem pro daný virus na povrchu buňky
 - receptory – povrchové buněčné glykoproteiny nebo sacharidové zbytky, které jinak slouží jako normální receptory pro jiné molekuly – virus je tedy zneužívá
 - s receptory se vážou virové struktury – např. hemagglutinin
 - u některých virů je kromě vazby na receptor vyžadována ještě vazba na koreceptor – např. u HIV
 - přítomnost/nepřítomnost receptorů na dané buňce je podstatou tkáňového tropismu (tkáňová selektivita) – neurotropní, dermatropní, hepatotropní viry..
- b. penetrace do buňky
 - některé obalené viry – obal splyne s buněčnou plasmatickou membránou a virová nukleokapsida se ocitne v cytoplasmě
 - ostatní viry (všechny neobalené a některé obalené) – do buňky se dostávají pasivně endocytózou – indukovanou vazbou na receptor. U obalených virů splyne jejich obal s membránou endosomu, neobalené viry se z endosomu uvolňují pomocí svých povrchových proteinů, které se nízkým pH endosomu aktivují a následně lyzují endosomální membránu
- c. svlékání virionu
 - pochody, jimiž se virový genom zbavuje kapsidy a obalu, většinou dochází k rozpadu povrchových struktur vlivem enzymů a nízkého pH v endosomu
- d. doprava virového genomu na vhodné místo v buňce
 - RNA viry – replikace v cytoplasmě (kromě chřipky), DNA viry v jádře (kromě poxvirů)
 - mechanismy málo známy, podstatnou úlohu hraje buněčný cytoskelet

2. Syntéza virových složek

- virus využívá metabolismus buňky, která místo svých bílkovin a NK tvoří bílkoviny a nukleové kyseliny virové
- syntéza těchto látek je řízena virovými enzymy a odehrává se na buněčných ribozomech na úkor energetického a materiálního hospodářství buňky
- u DNA virů – rodičovská DNA se nejprve transkribuje na mRNA (buď pomocí vlastní DNA dependentní RNA polymerasy, nebo pomocí buněčných enzymů). Vzniklé mRNA kódují syntézu tzv. časných proteinů, např. polymerasy DNA – ty začínají replikovat virovou DNA. Strukturální proteiny se začínají tvořit později, po nareplikování dostatku DNA. Jejich mRNA se tedy přepisuje až ze dceřinných molekul virové DNA
- ssRNA viry o pozitivní polaritě – jejich RNA působí jako informační mRNA. Infikovaná buňka vytvoří RNA polymerasu a ta na matrici rodičovské virové RNA vytvoří komplementární negativní vlákna – ty slouží jako vzor pro stavbu dceřinných molekul RNA, jež pak fungují jako mRNA pro syntézu strukturálních virových bílkovin.
- větší RNA viry - mají ve virionech vlastní RNA polymerasu. Jejich genom je negativně polarizován. Transkriptasa na něm sestrojí doplňkové vlákno o + polaritě, teprve toto může jako mRNA předávat informaci nutnou pro další syntézu viru.
- u nádorových RNA virů a retrovirů se jejich RNA pomocí vlastní reverzní transkriptasy přepisuje na DNA. Tato DNA se jako provirus integruje do buněčného genomu, reprodukční cyklus viru pak někdy pokračuje až po sérii bun. dělení.

3. Dozrávání virionů

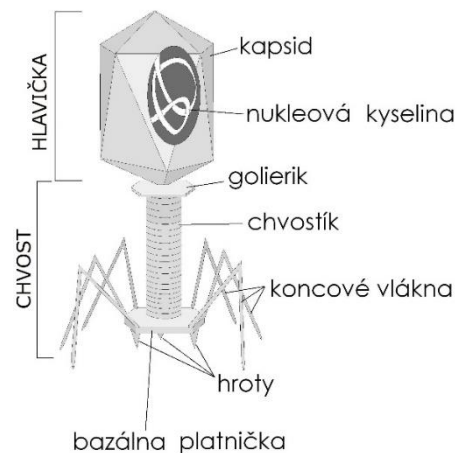
- nově vytvořené virové složky se hromadí v buňce v cytoplasmě nebo v jádře
- virové proteiny a glykoproteiny se ukládají na buněčných membránách – v ER, na jaderné nebo povrchové membráně
- virové bílkoviny se organizovaně sdružují kolem nukleové kyseliny a vytvářejí nukleoid (nukleokapsidu)
- kapsida se díky symetrickému uspořádání sestavuje samostatně, bez dalších enzymů a energie
- chybně sestavené nebo prázdné částice se nazývají defektní nebo inkompletní
- uvolňování zralých virionů z buňky – obalené viry postupně „pučí“ přes membránu, u jiných virů se buňka rozpadá a nová generace virionů jí opouští naráz

Bakteriofágy

- bakteriofág – bakteriální viry, rozšířené v přírodě
- jsou obligátními nitrobuněčnými parazity
- napadají pouze živé bakterie
- samy nemají vlastní metabolismus, nemohou se rozmnožovat mimo bakteriální buňku, která jim poskytuje veškerou energii, potřebné chemické stavební sloučeniny apod.
- díky kapsidě mohou přežívat i mimo bakterii

Morfologie bakteriofágů

- viriony se skládají většinou z hlavy a bičíku
- hlava (40-150 nm) – bývá hexagonální
 - její dřeň tvořena DNA (výjimečně RNA)
 - kapsida (schránka NK) je bílkovinné povahy, kubické nebo spirální symetrie
- límeček - tenký disk v místě spojení bičíku s hlavou
- bičík (120-200 nm) - tvořen trubicí a zevní pochvou
- bazální ploténka
- koncová vlákna – jsou napojeny na bazální ploténku, funkce - přichycení na povrchové receptory bakterie
- hroty bičíku



Životní cyklus

- rozmnožování bakteriofágů je specifické tím, že kapsida neproniká dovnitř buňky.
- virová částice se adsorbuje na povrch buňky – nutná přítomnost specifických receptorů
 - adsorpce má různé stupně specifity – některé fágy účinkují i na buňky biologicky vzdálené, jiné infikují určitý bakteriální druh (polyvalentní fágy), některé natolik specifické, že je lze využít k přesné typizaci kmenů.
- po rozpoznání receptoru na povrchu bakterie vstříkne svoji nukleovou kyselinu (DNA nebo RNA) do hostitelské buňky, ve které se v průběhu životního cyklu vytvoří nové fágové částice.

Podle životního cyklu rozlišujeme dvě skupiny fágů:

- virulentní (lytický) fág – infikovaná bakteriální buňka produkuje nové fágové částice, buněčná stěna praská, dochází k lýze bakteriální buňky
- avirulentní (temperovaný) fág – bakterii nepoškozuje, je v ní přítomný ve formě profága a přenáší se do dceřiných buněk – tomuto jevu se říká lysogenie.

Temperovaný fág (avirulentní)

- DNA fága se v buňce nereplikuje, ale začlení se do bakteriálního chromozomu – replikuje se tedy s každým dělením buňky a dostává se do všech buněk dceřiných
- bakterie tak v některých případech dostává nové dědičné znaky
- profág se může z bakteriálního chromozomu spontánně nebo vlivem indukčních činitelů (např. UV záření) vyčlenit a přejít do lytického cyklu
- profág - fágový chromozom, který se začlenil do chromozomu bakteriální buňky, s ním se replikuje a dědí
- lyzogenní buňka – bakteriální buňka s profágem
- lyzogenizace – přeměna na buňku s profágem
- lyzogenní konverze - změna ve fenotypu bakteriální buňky vyvolaná přítomností profága (např. produkce toxinů – záškrťový u *Corynebacterium diphtheriae*, erytrogenní u *Streptococcus pyogenes*)

Kultivace bakteriofágů:

- jen na vnímavých buňkách
- v bujónové bakteriální kultuře se pomnožení fágů projeví projasněním až vyčeřením bujonu – důsledek rozpadu infikovaných buněk
- na pevné půdě dochází k tvorbě tzv. plaků – okrouhlých prázdných míst v bakteriálním nárustu
- tzv. kritické ředění (RTD) obsahuje tolik fágových částic, že na agarové bakteriální kultuře vyvolají splynutím plaků úplnou, neboli kontinuální lýzu

Lékařský význam bakteriofágů:

- fagotypizace: laboratorní využití vysoce specifických bakteriofágů k podrobnému rozlišení vypěstovaných bakteriálních kmenů. Měla velký význam v diagnostice a epidemiologii břišního tyfu.

6. Metabolismus bakterií

Metabolismus

- = souhrn všech reakcí probíhajících uvnitř bakteriální buňky. Cílem těchto biochemických reakcí je získání energie a stavebního materiálu.
- zahrnuje dva procesy:
 - anabolismus – přeměnou jednodušších látek vznikají látky složitější (bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny, polysacharidy) – asimilační reakce, nutno dodávat E
 - katabolismus – látky složité štěpeny na látky jednodušší za současného uvolňování energie – disimilační reakce, energie se uvolňuje
- oba děje probíhají současně, jsou v dynamické rovnováze
 - převládá-li asimilace – buňka roste
 - převládá-li disimilace – buňka se zmenšuje a nakonec odumírá
- podstata metabolismu:
 - získávání energie ve formě energie chemické a její přetváření na jiné druhy energie, které bakterii umožní uskutečnit základní životní pochody (růst, rozmnožování, pohyb) a syntetizovat látky stavební, zásobní a funkční
 - bakteriální bb. na rozdíl od jiných organismů syntetizují i specifické produkty – toxiny, atb
- vzniklá energie je uchovávána ve formě ATP nebo uvolňována jako teplo.
- ATP – slouží jako pohotový zdroj energie

Z vývojového hlediska:

- viry – žádná metabolická aktivita (nahrazuje ji hostitelská buňka), někdy produkují enzymy, které jsou faktory patogenity
- rickettsie – rudimentární (zbytkový) metabolismus (defektní enzymatický aparát - nitrobuněčný parazitismus)
- ostatní bakterie – dokonalý metabolismus

Enzymy

- většina metabolických procesů je katalyzována enzymy
- ty ke svému účinku vyžadují často další molekuly – kofaktory
 - jednoduché - ionty vápníku, hořčíku
 - složitější molekuly typu vitamínů – koenzymy
- enzymy snižují aktivační energii chemických reakcí, tím umožňují, aby tyto reakce probíhaly v buňce, aniž by se její vnitřní prostředí porušilo a aby probíhaly dostatečně rychle
- enzymy, chemicky bílkoviny, obsahují ve své molekule tzv. aktivní místo, na něž se specificky váže substrát
- specifita je dána především konformací aktivního místa. To obvykle obsahuje aminokyseliny s pozitivně nebo negativně nabitými skupinami, tyto skupiny se pak mohou účastnit v rozrušování příslušné chemické vazby
- účinnost katalyzované reakce dále závisí např. na pH nebo na teplotě

- inhibitory enzymů
 - kompetitivní – soutěží s normálním substrátem o aktivní místa na molekule enzymu, jejich struktura je podobná přirozenému substrátu, avšak nemohou být přeměněny na normální produkt reakce. Zvýšením koncentrace substrátu se enzymatická aktivita může obnovit
 - nekompetitivní – vážou se na jiné než aktivní místo a způsobí takové konformační změny, že produkt vzniká velmi pomalu nebo nevzniká vůbec, bez ohledu na koncentraci substrátu
- využití enzymů:
 - proteasy z nepatogenního *Bacillus licheniformis* – součást pracích prášků
 - sladidla nealkoholických nápojů se vyrábějí ze škrobu rozštěpeného bakteriálními amylasami
 - streptokinasa – rozpouštění fibrinových sraženin v cévách

Zdroje energie a uhlíku pro mikrobiální buňku:

Dělení podle zdroje E na:

- fototrofy - fotosyntetické mikroby - dovedou využívat slunečního světla a přeměňovat jeho energii na energii chemickou, nejsou patogenní (choroboplodné)
- chemotrofy - získávají energii oxidací redukovaných látek
 - chemolitotrofy - bakterie redukující látky anorganické (vyžadují pouze přítomnost vitamínů)
 - chemoorganotrofy - bakterie redukující látky organické – sem patří většina bakterií a všechny bakterie patogenní) Vyžadují vitamíny a nativní bílkovinu

Dělení podle zdroje uhlíku na:

- autotrofy - zdrojem uhlíku je oxid uhličitý
- heterotrofy - zdrojem uhlíku je organická látka
- mixotrofy – autotrof a heterotrof dohromady

U různých bakterií jsou možné všechny 4 kombinace získávání energie a uhlíku

- fotoautotrofní – např. sinice
- fotoheterotrofní – tzv. purpurové bakterie
- chemoautotrofní – pouze u chemolitotrofů, jako jsou bakterie sirné a železitě
- chemoheterotrofní bakterie - jsou typické pro většinu bakterií vč. všech patogenních bakterií, které štěpením organických sloučenin získávají jak energii, tak uhlík

Dělení podle vztahu ke kyslíku:

- **aeroby** – potřebují kyslík, přežijí pouze v aerobních podmínkách. (rody *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycobacterium*,..)
- **obligátní (striktní) anaeroby** - rostou pouze v nepřítomnosti kyslíku, kyslík je pro ně toxický. *Clostridium* - například *C. haemolyticum* či *C. difficile*
- **anaeroby aerotolerantní** – anaeroby, které snášejí přítomnost kyslíku. K anaerobům se řadí, protože kyslík pro ně není konečným příjemcem elektronů (například *Clostridium perfringens*).

- **fakultativní anaeroby** - většina bakterií, v přítomnosti kyslíku rostou obvykle lépe, mohou však růst i za jeho nepřítomnosti. Radí se sem např. escherichie nebo stafylokoky
- **mikroaerofilní** - rostou v přítomnosti nízké atmosférické koncentrace kyslíku (méně než 21%). Na rozdíl od aerotolerantních anaerobů využívají kyslík jako konečný akceptor elektronů. Patří k nim např. laktobacily a kampylobaktery.
- **kapnofilní** - pěstují se za zvýšené tenze CO₂ – např. Meningokoky a gonokoky
- aerobní bakterie, které využívají kyslík jako konečný akceptor elektronů, mají enzym cytochromoxidasu katalyzující konečný přenos elektronů a výslednou tvorbu vody
- působením dalších enzymů vznikají u aerobů ještě toxické produkty (peroxid vodíku, superoxidový anion, hydroxylový radikál) – buňka brání vzniku superoxidu a dalších radikálů syntézou superoxid dismutasy.
- k rozštěpení přitom vznikajícího peroxidu vodíku užívají mikroby dva enzymy: katalasu a peroxidasu (=oxidasu)
- u fakultativních anaerobů kyslík indukuje respirační enzymy, a přitom inhibuje anaerobní proces získávání energie

Katabolické děje (disimilace)

= získání stavebního materiálu a energie

U heterotrofních bakterií mají katabolické reakce tato stadia:

1. **digesce** - makromolekuly v zevním prostředí rozštěpeny pomocí exocelulárních enzymů tzv. hydroláz (faktory patogenity)
2. **penetrace** - štěpné produkty (AK, oligosacharidy) transportovány do nitra buňky pomocí enzymů permeázového systému CM
3. **stadium úprav** - proniknuvší molekuly většinou ještě nejsou vhodným substrátem a jsou intracelulárními enzymy (dekarboxylázy, deaminázy aj.) dále zpracovávány
4. **stadium biologických oxidací** - postupná řada oxidoredukčních reakcí s výhodným postupným uvolňováním energie. Její část se ztrácí jako teplo, část využívá pro biosyntézu a další životní projevy a zbytek se ukládá pro budoucí potřebu pomocí fosforylovaných sloučenin (NADP, ADP, ATP)

Hlavním zdrojem energie pro bakterie je glukóza

Štěpení monosacharidů má dvě fáze:

1. fáze - odbourávání na kyselinu pyrohroznovou
 - anaerobně (anaerobní glykolýza) – preferovaná dráha u aerobních aj anaerob. baktérii
 - aerobně (pentózový cyklus) – alternativní dráha
2. fáze - přeměna kyseliny pyrohroznové
 - anaerobně - fermentace
 - aerobně - Krebsův cyklus -> respirace

Anaerobní glykolýza

- základní anaerobní metabolická cesta odbourávání glukózy
- z glukózy vzniká pyruvát (kyselina pyrohroznová)

Alternativní metabolické dráhy ke glykolýze:

- Pentózový cyklus
 - vytváří NADPH (využit při syntéze mastných kyselin)
 - produkce ribosa 5-fosfátu - syntéza nukleotidů a nukleových kyselin
 - produkce erythrosa 4-fosfátu - syntéza aromatických aminokyselin
- Metabolická dráha Entner-Doudoroff

Respirace

Krebsův cyklus

- aerobní oxidace – pyruvát je v cykle úplně oxidován na CO_2 a H_2O a uvolněné elektrony jsou dopravovány k dýchacímu řetězci.
- neúplný cyklus poskytuje stavební jednotky pro syntézu sacharidů a aminokyselin

Dýchací řetězec

- u bakterií je umístěn na cytoplazmatické membráně
- přenos elektronů a oxidativní fosforylace
- řetězec speciálních redoxních přenašečů, které získávají elektrony z redukované formy NADH a FADH_2 a transportují je v pevně daném pořadí z jedné makromolekuly do další.
- finální akceptor elektronů:
 - molekulární kyslík – aerobní respirace – vznik 38 ATP
 - jiné anorganické látky (nitrát, sulfát..) – anaerobní respirace, pouze u prokaryot – vznik 2-36 ATP
- zisk E je mnohonásobně vyšší než u kvašení (38ATP : 2ATP)
- zdroj elektronů mohou být nejen cukry, ale i lipidy a proteiny.

Fermentace (kvašení)

- anaerobní proces, nižší výtěžek ATP jako u respirace = 2 ATP
- konečným příjemcem elektronů je kyselina pyrohroznová, která se dále mění na řadu dalších produktů (kys. mléčná, ethanol, kys. propionová..).
- tyto produkty nejsou úplně oxidovány, část energie v nich zůstává nevyužita a buňka je vylučuje do okolí
- ethanolové kvašení - přeměna pyrohroznové kyseliny na ethanol, produkty: ethanol a CO_2
 - pivo (*Saccharomyces carlsbergensis*), víno (*Saccharomyces cerevisiae*), kynutí těsta (*Saccharomyces cerevisiae*)
- mléčné kvašení - přeměna pyrohroznové kyseliny na kyselinu mléčnou
 - potravinářství, má konzervační účinek – snížené pH brání množení nežádoucích bakterií a tím kažení potravin

- k zakysání smetany, při výrobě másla (*Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc cremoris*), k zakysání mléka kulturou (*Lactobacillus acidophilus*), k výrobě jogurtů (*Lactobacillus bulgaricus*) a kefiru (*Saccharomyces kefir*), ke kvašení okurek a zelí (*Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum*), k výrobě sýrů, siláže, dextranu (Leucon)
- propionové kvašení
 - dozrávání sýrů; máselné kvašení (*Clostridium acetobutylicum*) – využívá se k průmyslové výrobě rozpustidel (butanolu, acetonu, izopropanolu aj.) a výbušnin.

Identifikace mikroorganismů založená na jejich metabolismu

- některé mikroorganismy mohou metabolizovat určité molekuly zatímco jiné ne.
- při metabolizaci určité molekuly, vznikají určité specifické odpadní produkty.
- identifikací metabolických schopností testovaného mikroorganismu, můžeme určit jeho druh a kmen.
- chromogenní kultivační media
 - tato technologie je založená na rozpustné bezbarvé molekule (zvané chromogen), složené ze substrátu (cílí na specifickou enzymatickou aktivitu) a chromoforu.
 - jakmile enzym testovaného mikroorganismu rozštěpí chromogenní konjugát uvolní se chromofor, který díky snížené rozpustnosti vypadne jako barevný precipitát.

Anabolické děje

- tvorba makromolekul ze základních stavebních látek - monosacharidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, nukleobáze a vitamíny
- ty mohou být získávány ze dvou různých zdrojů:
 - buňka je získává z okolního prostředí jako živiny
 - buňka je syntetizuje prostřednictvím různých biosyntetických metabolických drah
- biosyntéza sacharidů - heterotrofy využívají pro výrobu sacharidů tři až čtyřuhlíkaté organické molekuly, vzniklé během katabolismu (pyruvát, laktát, glycerol, meziprodukty citrátového cyklu)
- biosyntéza aminokyselin, proteinů a nukleových kyselin
 - některé organismy dokáží syntetizovat všech 20 aminokyselin
 - některé organismy (především zvířata) musí esenciální aminokyseliny získávat ve formě živin

Růstové faktory

- metabolity, které nemohou být syntetizovány, musí být do živného prostředí přidány
- jedná se většinou o vitamíny, AMK a purinové a pyrimidinové báze.
- bakterie vyžadující růstové faktory se označují jako auxotrofy
- bakterie, které dovedou všechny potřebné molekuly vystavět z živin samy, se nazývají prototrofy.

	ATB INHIBICE
BIOSYNTÉZA DNA ----- REPLIKACE	Fluorochinolony
BIOSYNTÉZA RNA -----TRANSKRIPCE	Rifampicin
BIOSYNTÉZA PROTEINŮ ----- TRANSLACE	Aminoglykosidy Chloramfenikol Makrolidy Tetracykliny
BIOSYNTÉZA PEPTIDOGLYKANU ----- BUNĚČNÁ STĚNA	Peniciliny Cefalosporiny Vankomicin

7. Bakteriální enzymy

Enzymy

- biokatalyzátory, specificky katalyzující reakci jen určitého substrátu.
- urychlují a usměrňují přenášení vodíku a chemických skupin z donoru na akceptor, samy se reakce neúčastní
- zvyšují rychlost reakce tím, že sníží aktivační energii.
- jsou složené (převážně) z proteinů, někdy vyžadují kofaktory
- vykazují specifické charakteristiky jako je tvar, specifita a funkce
- umožňují, aby metabolické reakce probíhaly rychlostí kompatibilní se životem
- mají aktivní místo pro vazbu cílové molekuly (substrátu)
- aktivita enzymů silně závisí na teplotě a pH
- mohou být regulovány
 - zpětnou vazbou (inhibice či aktivace)
 - genetickými mechanismy (regulace exprese)
- proteiny vykazují několik úrovní strukturní komplexity nazývané primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura.

Složení enzymu

- holoenzym – katalyticky aktivní komplex (apoenzym + kofaktor)
- apoenzym – bílkovinná část, určuje substrátovou specifitu
- kofaktor - nebílkovinná nízkomolekulární složka (vitamíny, organické molekuly, atomy kovu), která má funkční aktivitu - přenáší chemické skupiny či atomy
 - koenzym - vázán na enzym slabými interakcemi
 - prostetická skupina - kovalentně vázaná na enzym

Rychlost produkce enzymu

- enzymy nejsou v buňce produkovány ve stejných množstvích ani stejnou rychlostí
- konstitutivní enzymy: jsou produkovány stále a relativně konstantní rychlostí
- regulované enzymy: produkce je buď indukována a nebo potlačena (například v závislosti na koncentraci substrátu)

Regulace enzymové aktivity

- přímá regulace enzymové aktivity (konstitutivní enzymy)
 - kompetitivní inhibice: buňka produkuje molekuly podobné přirozenému substrátu. Tyto molekuly se vážou do aktivního místa enzymu a tak blokují přístup substrátu.
 - nekompetitivní inhibice: enzym má kromě aktivního místa ještě další regulační vazebné místo, do kterého se váže inhibitor a změnou konformace enzymu snižuje jeho aktivitu.
- regulace syntézy enzymu (regulované enzymy)
 - enzymová represe: potlačení syntézy enzymu (inhibice transkripce). Nadbytek produktu inhibuje transkripci tudíž produkci enzymu
 - enzymová indukce: aktivace syntézy enzymu

Role mikrobiálních enzymů při infekci

- mnoho patogenů vylučuje unikátní exoenzymy.
- exoenzymy pomáhají patogenu překonat hostitelův imunitní systém nebo usnadňují dělení v tkáních.
- tyto exoenzymy se nazývají i faktory virulence nebo toxiny.

<u>toxiny rozrušující mezibuněčnou hmotu</u>	enzymy <i>Streptococcus pyogenes</i>
<u>toxiny poškozují buněčné membrány</u>	<i>Clostridium perfringens</i> (lecithinasa), <i>Staphylococcus aureus</i> (sfingomyelinasa, alfatoxin), <i>Streptococcus pyogenes</i> (streptolysin O) <i>Listeria monocytogenes</i> (listeriolysin).
<u>toxiny brzdící syntézu bílkovin</u>	záškrtový toxin, shiga toxin
<u>toxiny narušující buněčné funkce</u>	cholery toxin, enterotoxiny E.coli, pertusový toxin
<u>neurotoxiny</u>	tetanický toxin, botulotoxin
<u>superantigeny</u>	některé toxiny streptokoků a stafylokoků

Druhy enzymů:

Exoenzymy (hydrolázy)

- mikrob je uvolňuje do svého okolí, štěpí, komplexní látky a makromolekuly, štěpné produkty jsou transportovány do buňky – permeázový systém.
- některé jsou faktory virulence.

1. Proteázy

- = proteinázy - štěpí peptidické vazby bílkovin
 - endopeptidázy - štěpí bílkovinu uprostřed řetězce
 - exopeptidázy - odštěpují koncovou aminokyselinu
- kolagenáza - štěpí kolagen (faktor virulence klostridií anaerobních traumatóz)
- plazmakoaguláza - mění fibrinogen na fibrin, v kapilárách vznikají tromby, ohraničují tak infekční ložiska čímž omezují fagocytózu, diagnostický význam pro *Staphylococcus aureus*
- streptokináza - štěpí fibrin - šíření infekce (*S. pyogenes*)
- stafylokináza – obdoba streptokinázy = fibrinolýza, rozpouští fibrinové sraženiny (*S. aureus*)
- streptodornáza - štěpí DNA v jádrech leukocytů
- (bakt. proteináz se hojně používá jako přísad do pracích prostředků pro natrávení bílkovinných skvrn - mléko ap.)

2. Karbohydrázy

- polyázy – štěpí polysacharidy (amyláza, celulóza, pektináza aj.)
- oligázy – štěpí oligosacharidy na hexózy a pentózy
- hyaluronidáza – štěpí kys.hyaluronovou v mezibuněčném tmelu – umožňuje šíření infekce, faktor virulence některých bakterií (stafylokoky, streptokoky, anaeroby)

3. Esterázy

- lipázy - štěpí glyceridy na glycerol a mastné kyseliny
- fostatázy - štěpí fosfoglyceridy na kys.fosforečnou a alkoholy
 - Lecitináza - štěpí lecitin (žloutek) - faktor virulence u klostridií a stafylokoků
 - Fosfatáza C (hemolysin *S.aureus*) - štěpí sfingomyelin ve stěně erytrocytů

Endoenzymy (redoxázy)

- jsou vázány na cytoplazmatickou membránu a vyskytují se v cytoplazmě

1. Dehydrogenázy (oxidoreduktázy)

- odnímají H (event. jiné skupiny, NH_2 , COOH při deaminaci a dekarboxylaci) a přenášejí je na další enzymy (třeba flavinové) a ty pak terminálním oxidázám
 - jedna látka ztrácí elektrony (je oxidována)
 - jedna látka přijímá elektrony (je redukována)
- patří sem řada enzymů lišících se koenzymem
 - pyridinové enzymy
 - NAD = koenzym I
 - NADP = koenzym II
 - nikotinamidmononukleotid = koenzym III
 - SH enzymy
 - glutation
 - kys. lipová
 - flavinové enzymy
 - vit. B2, B1, B6
 - FAD (flavinadeninnukleotid)
 - flavinadeninmononukleotid

2. Terminální oxidázy

- Cytochromy a,b,c = komplex enzymů hemoproteinového typu, přenášejí H z dehydrogenáz (flavinových enzymů) na cytochromoxidázu, která je přenáší na O_2 , vzniká H_2O_2 , metabolický jed pro každou buňku
- Kataláza - železnatý enzym, štěpí H_2O_2 za vzniku O_2
- Peroxidáza - enzym hemoproteinového typu (podobně jako kataláza) - štěpí H_2O_2 za vzniku H_2O

3. Transferázy

- zprostředkovávají transfer funkčních skupin:
 - Aminotransferázy
 - Fosfotransferázy
 - Methyltransferázy
 - Dekarboxylázy
 - Glykosyltransferázy

8. Reprodukce bakterií

Růstový cyklus bakterií

- začíná oddělením dceřinné buňky od buňky rodičovské a končí jejím rozdělením na buňky dceřiné
- má procesy
 - růst buňky – jako koordinovanou tvorbu makromolekul a buněčných složek
 - tvorba septa
 - dělení buňky (replikace DNA, syntéza buň. stěny a cytoplazmatické membrány)

Replikace DNA

1. iniciační perioda:

- zahájení replikace chromozomu – v okamžiku, kdy buňka dosáhne kritické velikosti, případně kdy koncentrace bílkoviny spouštějící replikaci dosáhne kritické hladiny.
- u pomalu rostoucích bakterií je dlouhá (u mykobakterií desítky hodin), u rychle se množících bakterií může chybět

2. perioda C

- replikace chromozomu začíná z určitého počátečního místa oběma směry cirkulární molekuly proti sobě
- výsledkem jsou dvě kruhové molekuly dvouřetězcové DNA - každá má 1 původní a 1 nově vzniklý řetězec (semikonzervativní replikace)
- např. u *E. coli* trvá několik desítek minut
- podílejí se na ní enzymy:
 - helikasy - rozplétají obě vlákna DNA
 - topoizomerasy - uvolňují napětí vznikající v molekule DNA
 - DNA-gyrasa - odstraňující nadbytečné závitky vznikající během replikace (gyrasy je inhibována chinolony)
- každé z obou vláken DNA se prodlužuje odlišným způsobem – DNA-polymerasa totiž dovede syntetizovat DNA pouze jedním směrem od konce 5' ke konci 3'
 - jedno vlákno (tzv. vedoucí) se syntetizuje tímto směrem průběžně
 - druhé vlákno (tzv. zaostávající) se syntetizuje v podobě krátkých fragmentů (Okazakiho fragmenty) posléze spojovaných enzymem ligasou
- replikace DNA probíhá s velkou přesností, případné chyby odstraňuje sama polymerasa, příp. další opravné systémy. Nezdaří-li se to, chyba přetrvává – mutace
- replikace chromozomu končí syntézou terminačních proteinů, čímž začíná poslední perioda cyklu, perioda D čili perioda dělení
- terminační proteiny reagují s bílkovinami účastnicími se na buněčném dělení, což vede nejprve k rozsáhlé syntéze makromolekul, a poté k vlastnímu rozdělení buňky

3. perioda dělení

- vlastní rozdělení buňky
- vchlipování cytoplazmatické membrány z protilehlých stran (ne vždy cirkulárně),

- rozdělená DNA je připojena vláknem k cytoplazmatické membráně v těch místech, kde vrůstá dovnitř septum – cytoplazmatická membrána tak zajišťuje rozdělení obou molekul DNA do dceřinných bb. - vykonává funkci mitotického aparátu,
- po vytvoření septa z cytoplazmatické membrány začne vrůstat cirkulárně buněčná stěna směrem do středu,
- po vytvoření úplné přepážky se buňky nemusí hned oddělit. Buněčná stěna obou dceřinných bb. narůstá od místa novotvořené přepážky – stěna přivrácených polovin bb. je novotvořená !
- Úloha cytoplasmatické membrány:
 - na začátku cyklu se jeden řetězec rodičovské DNA připojí na zvláštní místo na cytoplasmatické membráně (mesosom), což zahájí replikaci DNA. Druhý rodičovský řetězec se přichytí v jiném místě.
 - vmezeřená membrána mezi oběma přípojnými místy se rozrůstá a replikované chromosomy se tak od sebe oddělí.
- Úloha buněčné stěny:
 - Buněčná stěna začíná nově vznikat v oblastech tzv. stěnových pásů.
 - tyto pásy probíhají po povrchu kokovité buňky v podobě rovnoběžek.
 - v místě rovníkového pásu se hromadí prekursory stěny a cytoplasmatická membrána se tu začíná vklenovat dovnitř buňky.
 - povrch buňky se v ekvatoriální oblasti mění v prohlubující se vrub.
 - v oblasti vrubu se syntetizuje nová buněčná stěna a jednak se z něho vysunuje na obě strany, čímž se původně kulovitá bakterie protahuje, jednak vrůstá dovnitř buňky, kde se z ní stává tzv. septum, jež nakonec buňku rozdělí na dva koky dceřinné.
 - na rozdíl od koků se u bakterií tyčinkového tvaru nová stěna tvoří na mnoha místech a tyčinka se tak prodlužuje. Obvykle v jednom místě membrána a stěna vrůstají dovnitř buňky a tvoří septum. Až septum proroste celou šíří buňky, tyčinka se rozdělí.

Generační doba

- = délka růstového cyklu
- doba, za kterou se zdvojnásobí počet bakterií tj. doba zdvojení za ideálních podmínek
- např: *E.coli* - 20 min, *M. tuberculosis* – 12 h
- je individuální vlastností buňky, ale závisí i od dostupnosti živin a podmínek prostředí (např. při snížení teploty z 37°C na 30°C se doba u *E.coli* prodlužuje na 60 min)
- rychle se množících bakterií může být kratší, než doba replikace chromozomu (chromozom se začne replikovat dříve, než skončí replikace předchozí)
- význam znalosti generační doby:
 - epidemiologické důvody (množství bakterií v potravinách, prodromální stadium infekčních chorob),
 - délka kultivace
 - otázky aplikace ATB – u většiny bakteriálních infekcí 2 - 4 – 6 x/den, u TBC 1 x/den. !

Druhy kultivace

- statická kultivace - množení bakterií v uzavřeném kultivačním systému omezeno, vyčerpání živin a nahromadění metabolických produktů
- submerzní kultivace - intenzivnější množení při provzdušňování a stálém míchání kultury, kdy je dokonalejší využití živin, využití - průmysl, při výrobě ATB a jiných biologických látek
- kontinuální kultivace - nejdokonalejší způsob, živiny jsou trvale dodávány, odpadní produkty odváděny.

Růstová křivka:

při statické kultivaci je množení bakterií nepravidelné, v závislosti na kultivační době

1) Lag-fáze (zpoždění, adaptace, klidu)

buňky se pouze zvětšují (syntetizují RNA a enzymy), ale nemnoží se, adaptují se po dobu několika hodin na nové prostředí (medium, orgán hostitele), absolutní počet bb. dokonce klesá – odumírání a autolýza starých bb., délka lag-fáze závisí na kvalitě media (v chudém se prodlužuje), ale i na velikosti a stáří inokula

2) Fáze akcelerace:

fáze fyziologického mládí, zrychlení růstu, buňky se začnou překotně dělit - přizpůsobení novým životním podmínkám

3) Fáze logaritmická (exponenciální):

intenzivní množení bb., rychlost dělení je konstantní, počet bb. narůstá geometrickou řadou, do zevního prostředí produkována většina exoenzymů (proteázy, penicilináza), délka exponenciální fáze závisí na kultivačních podmínkách a množství živin

4) Fáze zpomalení růstu:

rychlost dělení bb. se zpomaluje, narůstá počet uhynulých bb. – začínají se hromadit odpadní metabolické produkty a vyčerpávat živiny, mění se pH

5) Fáze stacionární:

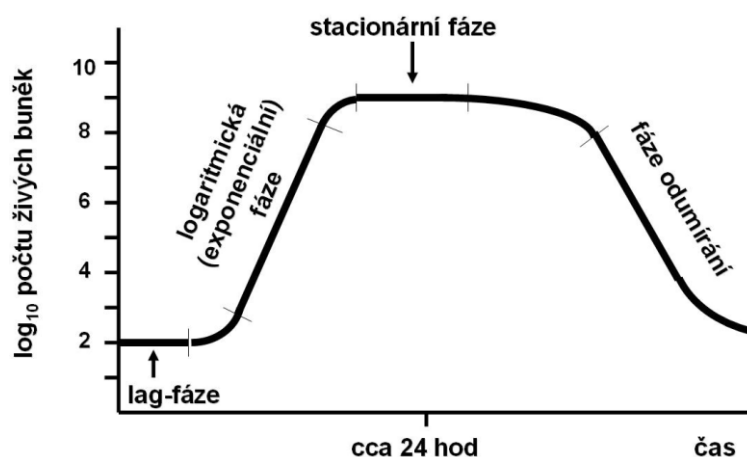
přírůstek bb. se vyrovnává s počtem odumírajících bb., absolutní počet bb. nabývá maxima, trvání 4. a 5. fáze bývá nejdelší

6) Fáze odumírání (poklesu):

převažuje odumírání bb. nad jejich přírůstkem, uplatňují se hlavně autolytické enzymy

7) Fáze zrychlení úbytku

8) Fáze konečná, autosterilizace



9. Genotyp a fenotyp mikroorganismů. Mutace

Genetická informace, geny, genotyp a fenotyp

- genetická informace je obsažena ve struktuře DNA, a to v sekvencích nukleotidů
- pokud je výsledkem polypeptid, každá aminokyselina je dána tripletovým kodonem, trojicí nukleotidů
- uložení genetické informace:
 - chromozom – v buňce se nachází pouze jeden (bakterie jsou tedy trvale haploidní organismy); cirkulární uzavřená molekula DNA, může obsahovat sekvence dodané zvenčí, např. bakteriofágem
 - extrachromozomální DNA – plasmidy (autonomně se replikující menší molekuly DNA.)

Gen, genom

- gen – je sekvence nukleotidů DNA (RNA u RNA virů) obsahující genetickou informaci, která kóduje konkrétní polypeptid nebo RNA nepodléhající translaci
- genom - soubor všech genů v buňce nebo viru

Bakteriální genom

- běžně obsahuje jedinou sestavu genů - je tedy haploidní.
- je uložen na bakteriálním chromosomu, jím bývá jedna cirkulární molekula dvouvláknité DNA
- v bakteriálním genomu je informace obvykle bez přerušení (bez intronů)
- před vlastní oblastí kódující polypeptidický řetězec se nacházejí oblasti promotor a vedoucí sekvence (leader), za oblastí pak koncová sekvence (trailer) a terminátor
- ostrovy patogenity – označují se tak poměrně velké oblasti chromosomu patogenních bakterií, které obsahují geny kódující faktory virulence. Všechny tyto geny se mohou exprimovat současně a všechny se mohou přenést naráz i na jinou bakterii

Geny

- dědičné determinanty stabilní struktury
- tvořeny asi 200-2000 nukleotidovými páry
- na chromozomu mají zcela určitou pozici - locus
- seřazeny ve funkční posloupnosti enzymů, které determinují
- jejich struktura se nemění vlivem zevního prostředí
- struktura může být pozměněna mutací

Exprese genů

- =proces dekódování genetické informace obsažené v genu, proces vedoucí ke vzniku funkční bílkoviny nebo RNA
- genetická informace (sekvence bází v DNA) je nejprve podrobena transkripci do pořadí nukleotidů v RNA (naprostá většina je transkribována do mRNA, jiné do tRNA nebo rRNA)
- molekula mRNA nese informaci pro syntézu bílkoviny, rRNA tvoří s proteiny složky ribosomu, tRNA (transferové) přenášejí během proteosyntézy molekuly aminokyselin
- jako transkriptasa funguje enzym DNA-dependentní RNA-polymerasa. Obsahuje mimo jiné bílkovinu zvanou σ -faktor, která pomáhá rozeznat začátek genu, čili promotor
- na promotoru se nalézá jednak místo rozeznávající RNA-polymerasu, jednak místo, na něž tento enzym nasedne a zahájí transkripci informace z DNA na RNA.
- transkripci ukončuje sekvence zvaná terminátor
- na funkci promotoru jsou často vázány i regulační úseky mnohých genů.
 - příkladem je tzv. operátor, na nějž se váže regulační bílkovina zvaná represor, která brání polymerase v zahájení transkripce.
 - operátor tedy kontroluje expresi genu čili to, zda se genetická informace v něm uložená projeví.
 - často je jedním represorem řízena syntéza několika bílkovin.
 - celá sekvence bází kódující tyto polypeptidy se pak spolu s operátorem nazývá operon.
 - toto uspořádání umožňuje bakterii koordinovat syntézu metabolicky na sebe navazujících enzymů.
- závěrečným krokem je translace - syntéza bílkoviny.
 - u bakterií probíhá mnohem rychleji než u eukaryot a protože prokaryota nemají jadernou membránu, ribosomy se připojují hned na ještě nehotovou mRNA.
 - k zahájení translace jsou třeba speciální bílkoviny zvané iniciační faktory.
 - translaci ukončují zvláštní kodony na mRNA (UAA, UAG, UGA)
- ribosomy prokaryot jsou menší a strukturálně odlišné od ribosomů eukaryot
 - proto mnohé antimikrobiální látky účinkují selektivně jen na bakterie
 - streptomycin se váže na menší (30S) ribosomální subjednotku a způsobuje chybné čtení mRNA.
 - vazba erytromycinu na subjednotku 50S zase brzdí prodlužování peptidického řetězce

Kontrola genové exprese

- bakterie dovedou pozoruhodně reagovat na změny prostředí
- nejdůležitějším podkladem jejich schopnosti adaptovat se na změny prostředí je kontrola genové exprese
- tak je zajištěno, že příslušné bílkoviny (enzymy či faktory patogenity), se netvoří zbytečně, ale jen tehdy, když je jich zapotřebí.
- např. vniknutí patogenní bakterie do makroorganismu pro ni znamená neobyčejnou změnu prostředí. Bakterie na to reaguje spuštěním či vypnutím celé řady genů spjatých s metabolismem či virulencí.
- na úrovni transkripce je exprese genů řízena většinou pomocí regulačních bílkovin, které se vážou na úseky DNA zvané operátory.
- některé z regulátorů urychlují zahajování transkripce (aktivátory, účastní se tzv. pozitivní regulace), jiné transkripci brzdí (represory).

- mnohdy se jedná o proces dvoustupňový, kdy jedna bílkovina působí jako čidlo (sensor) změn prostředí a teprve druhá se váže na DNA a ovlivňuje transkripci, jindy jeden regulátor aktivuje expresi dalšího.

Genotyp x fenotyp

- genotyp
 - genom – soubor všech genů buňky
 - genotyp - soubor všech alel určitého jedince
 - genotyp určuje celý soubor dědičných vlastností jak vyjádřených navenek, tak skrytých (fenotypově nevyjádřených)
- fenotyp - vyjádření genotypu
 - zahrnuje projevy genů, je tedy souhrnem pozorovatelných vlastností - enzymatické aktivity, mikroskopické i makroskopické morfologie, produkce faktorů virulence, antigenní struktury aj.
 - je proměnlivý, vlivem zevního prostředí může dojít k jeho modifikaci
 - modifikace jsou reverzibilní, probíhají masivně u všech buněk najednou (většinou po dobu působení modifikujícího faktoru)

Mutace

- mutace je stabilní a dědičná změna genomu, její podstatou je změna pořadí nukleotidů
- bodová mutace
 - postihuje jediný nukleotid (mění tripletový kód) v jednom genu.
 - transice – záměna purinu za jiný purin, nebo pyrimidinu za pyrimidin
 - transverze – výměna purinu za pyrimidin a opačně
 - mikrolece, mikroinzerce – ztráta nebo přidání jednoho nukleotidu
 - může ale nemusí se fenotypově projevit - na tom má zásluhu tzv. degenerovaný kód, kdy jedna AMK je kódována více kodony
 - neprojeví se, pokud nový kodon specifikuje aminokyselinu náhodou zcela totožnou, nebo se po translaci v polypeptidickém řetězci objeví odlišná aminokyselina, což může, ale nemusí ovlivnit tvar a funkci bílkoviny
 - může vzniknout terminační kodon (stop-kodon) a syntéza bílkoviny se předčasně zastaví
 - většina bodových mutací je buňkou opravitelná
- větší změny genomu – většinou jde o letální mutace, buňka je neumí opravit
 - delece - odstranění sekvence nukleotidů
 - inverze - náhrada sekvencí jinou (většinou ale stejnou, ale vloženou obráceně)
 - inzerce - vložení nové sekvence

Následky mutací

- mutace vedou buď ke změně fenotypu buňky (vitální mutace), nebo k její zániku (letální mutace)
- mutace mohou vést k přerušení metabolické dráhy a neschopnosti syntetizovat její konečný produkt. Taková mutanta, zvaná auxotrof, nevyroste na kultivačním médiu, v němž onen produkt chybí. Původní kmeny, které na takovém médiu rostou, se nazývají prototrofy.
- vzácně vedou k získání užitečných vlastností – např. rezistentní mutanty, které nabyly schopnost odolávat bakteriofágům, chemikáliím či antibiotikům (tito činitelé vznik mutací nevyvolávají, pouze selektují již existující mutanty)
- mutací lze napravit mutace předchozí
 - reverse – změněná base v DNA je nahrazena basí původní
 - pseudoreverse – změněná base je nahrazena jinou, ale díky degeneraci tripletového kódu je produktem původní aminokyselina

Mutace podle způsobu vzniku

- spontánní
 - vznikají příležitostně v každé buňce
 - následek chyby při replikaci DNA, vlivem poškození DNA, vlivem transpozonů
 - výskyt vzácný, velmi nízký (1 mutace na 10^7 - 10^{11} buněk)
- indukované
 - vyvolány vnějšími faktory, tzv. mutageny
 - frekvence 10-1000x vyšší

Mutageny

- některé mutageny působí na NK při replikaci, jiné i v klidovém stadiu
- fyzikální mutageny:
 - X paprsky, gama záření, UV záření, vyšší teplota (teplotní šoky se jako mutageny používají u spor)
- chemické mutageny:
 - analoga dusíkatých bází – mohou nahrazovat přirozené nukleové báze (5-bromouracil – analog thyminu)
 - alkylační činidla
 - interkalační agens – vkládají se mezi báze a přerušují tak normální čtení, např. akridinová barviva

Význam mutací

- náhodně vzniklé mutanty mohou svými změněnými vlastnostmi lépe odolávat podmínkám prostředí, selektivním množením nahradí původní populaci (rezistentní mutanty)
- disociace kultur pasážováním na umělých půdách - série mutačních kroků vedoucí ke změnám morfologickým, antigenním a biologickým (pokles virulence související např. se ztrátou schopnosti produkce pouzdra)
- příprava vakcín - izolací mutant, které ztratily virulenci, ale mají zachovány antigenní strukturu

10. Rekombinační procesy a výměna genetické informace

Rekombinace

- rekombinace předpokládá přerušení a opětovné spojení molekuly DNA s výměnou jejich částí
- vzniká rekombinantní molekula s vyměněnými částmi nukleotidových sekvencí
- dva typy:
 - heterologní – vnesení nových genů
 - homologní – přeskupení stávajících genů

Heterologní – vnesení nových genů

- všeobecná rekombinace - zahrnuje vzájemnou výměnu mezi párem homologních sekvencí DNA
- místně specifická – uskutečňuje se jen mezi specifickými místy dvou genomů, např. temperovaný bakteriofág se integruje jen do jistého místa bakteriálního chromosomu
- transpoziční - malé segmenty DNA (transpozony) se přesouvají buď uvnitř genomu, nebo z plasmidu do chromozomu a naopak, nevyžaduje přílišnou homologii mezi transpozonem a oblastí, do níž se transpozon včleňuje

Homologní – přeskupení stávajících genů

- místní inverze
 - je podkladem variace bičkových H-antigenů salmonel
 - ty se mohou vyskytovat v I. nebo II. fázi, podle toho, je-li exprimován gen H1 nebo H2
 - je-li promotor genu H2 orientován správně, exprimuje se gen H2 a represor pro gen H1
 - dojde-li k inverzi promotoru pro gen H2, pak se transkribuje pouze gen H1
 - inverze je umožněna tím, že segment DNA nesoucí geny H obsahuje krátké převrácené sekvence; tato inverze je specificky regulována proteinem Fis (faktor pro stimulaci inverze)
- genová konverze
 - např. u gonokoků, které mohou měnit antigenní strukturu fimbrií. Fimbrie jim umožňují přilnout na sliznice a odolávat fagocytóze
 - proti antigenům fimbrií sice naše tělo vytváří účinné protilátky, gonokoky jsou však schopny periodicky měnit antigenní složení fimbrií, takže pacient je osídlen novým serotypem gonokoka
 - podkladem tohoto jevu je fakt, že gonokok má řadu genů pro zmíněné antigeny, jen jeden je však funkční, zbytek je defektní. Během množení dochází k postupnému přeskupování genů, čímž se původně funkční gen stává defektním a jeden z defektních nabývá na funkčnosti

Mezibakteriální přenos genetické informace

- mechanizmy vedoucí k přenosu genetické informace (části DNA) z bakterie dárcovské (donora) do buňky příjemce (recipienta)
- přenos DNA je vždy jednosměrný
- funkce DNA recipienta je pak modifikovaná vniklou DNA
- DNA donora (chromozomální, plasmidová) může být zabudována do chromozomu příjemce (crossing-over) nebo se vyskytuje i nadále extrachromozomálně (plasmidová)

Konjugace

- popisuje se u G- bakterií
- přenos DNA přímým stykem mezi buňkami, k jejichž spojení slouží sex-pilus
 - donor - musí obsahovat F-faktor (fertilní, sex faktor) = buňka F+ (samčí)
 - recipient - neobsahuje F-faktor = buňka F- (samičí, transkonjugant)
- mohou se přenášet geny jak plasmidové, tak chromosomální
- F-faktor
 - nese soubor genů nutných pro konjugaci (geny pro tvorbu sex-pilů)
 - sex-pilů bývá na buňce kolem 20, jsou 2-3 μm dlouhé a uvnitř duté
 - F-faktor se jako F-plasmid nachází volně v cytoplasmě, může se replikovat a přecházet do dceřinných buněk
- proces konjugace:
 - náhodné střetnutí F+ a F- buněk
 - F-faktor determinuje vznik sex pilu, vznikne konjugační kanálek mezi oběma buňkami
 - kanálkem dojde k přenosu genetického materiálu
 - výsledkem konjugace jsou tedy dvě buňky F+. Ty už spolu konjugovat nemohou, protože na povrchu F+ bakterií vznikají bílkoviny nedovolující připojení sex-pilu.
- konjugace Hfr:
 - F-faktor je episomální a může se tudíž integrovat do bakteriálního chromozomu, ale jen v určitém místě.
 - donor s integrovaným F-faktorem se nazývá kmen Hfr (high frequency of recombination), na rozdíl od kmene F+ se vyznačuje vysokou frekvencí rekombinací, tedy schopností vysoce účinně přenášet chromosomální geny
 - přestože je F-faktor integrován v chromozomu, dovede stále řídit syntézu pilů, replikovat se a přenášet genetický materiál do recipienta F- , aniž by byl nejprve vyříznut z bakteriálního chromozomu
 - vzhledem k vlastní tendenci F faktoru se během konjugace přenášet, zbytek bakteriálního genomu je spolu s ním tažen. Na rozdíl od normální buňky F+ se proto kmeny Hfr pokusí přenést svou celou DNA skrz párovací můstek způsobem podobným normální konjugaci.
 - při konjugaci kmene Hfr se jeho chromosom začíná replikovat na specifickém místě uvnitř integrovaného F-faktoru. Nejprve se tedy do recipienta přenáší část F-faktoru, pak postupně geny dárcovského chromozomu a nakonec zbývající geny F-faktoru (vzhledem ke kruhové povaze bakteriálního chromozomu se kruh při replikaci „přeruší“ uvnitř F-faktoru)

- celý proces trvá asi 100 minut, ale jen zřídka doběhne až do konce, protože mezitím se spojení mezi buňkami obvykle přeruší. I když se tedy přenesou mnohé geny F-plasmidu i chromosomu, ke kompletaci celého F-faktoru nedojde, takže příjemce zůstane F-
- přenesená část chromosomu může být v příjemci rozrušena, nebo rekombinací včleněna do genomu buňky F-
- sexdukce (konjugace F')
 - přenos bakteriálních genů bezprostředně sousedících s F faktorem
 - F-plasmid může HFR-chromosom opustit, během tohoto procesu se ale někdy vyštípne z chromosomu víc, než by se mělo a vznikne plasmid F', který obsahuje navíc několik málo bakteriálních genů, které s F-faktorem bezprostředně sousedily
 - při konjugaci F' s F- se s F'-plasmidem přenášejí i tyto bakteriální geny a v příjemci se mohou projevit, aniž se inkorporují do jeho chromosomu
 - příjemce se stane jednak F', a jednak pro zmíněné geny dočasně diploidní
- význam konjugace:
 - přenos faktorů virulence
 - přenos faktorů rezistence
 - poznávání bakteriálního chromozomu
 - genetické inženýrství (produkce inzulínu v E. coli...)

Transformace

- jev, kdy bakterie převezme část DNA jiné bakterie a včlení ji do svého chromosomu
- přenos volné DNA z donora (rozložené bakterie nebo uměle získané) do recipienta
- tohoto procesu je schopna zhruba každá 1000 buňka (tzv. kompetentní)
- přenáší se jen kolem 10-20 genů, a to zcela náhodně z kterékoli části genomu; ovlivní 1 - 2 vlastnosti příjemce
- popsána u G+ bakterií (streptokoky, bacily)
 - vyžaduje přítomnost peptidu zvaného kompetenční faktor
 - dárcovská DNA se váže na buněčný povrch, jedno vlákno je rozloženo a druhé je pomocí zvláštního proteinu vneseno do buňky
 - existuje-li dostatečná homologie s hostitelskou DNA, může dojít k rekombinaci
- popsána i u G- bakterií (jen Neisserie, Hemofily), u nichž kompetenční faktor není třeba, transformovat se však mohou jen navzájem velmi příbuzné bakterie
- recipientní buňka, která DNA takto přijala - transformant
 - rekombinantní - rekombinací donorové DNA s chromozomem recipientní buňky
 - plasmidový - přenesením neporušeného plasmidu
- význam transformace
 - získání genů virulence
 - získání genů rezistence
 - přenos eukaryontních genů do bakterie (syntéza lidských bílkovin)

Transdukce

- přenos DNA z donora do recipienta zprostředkovaný bakteriofágem
- bakteriální geny se do fága dostanou během jeho reprodukce víceméně omylem, chybou
- existují dva typy bakteriofágů
 - virulentní (lytický) fág – infikovaná bakteriální buňka produkuje nové fágové částice, buněčná stěna praská, dochází k lýze bakteriální buňky
 - avirulentní (temperovaný) fág – bakterii nepoškozuje, je v ní přítomný ve formě profága = začleňuje se do buněčného chromosomu, a genom fága se tak replikuje zároveň s genomem infikované buňky – tomuto jevu se říká lysogenie. Vlivem např. UV záření se může lysogenní fág aktivovat a přejít do lytické formy.
- během transdukce se může přenést jakákoli část bakteriálního genomu.
 - v případě lytického cyklu se během sestavování nových fágových partikulí mohou do fágové kapsidy omylem zabalit zlomky částečně rozrušeného bakteriálního genomu. Vznikne transdukující částice, která přenese část DNA z původní buňky do buňky nové.
 - při lysogenii se DNA temperovaného fága může vyštípnout z chromosomu nepřesně, tj. včetně několika málo buněčných genů. Část potomstva takového fága bude defektní: kromě neúplného fágového genomu bude obsahovat kousek genomu buňky.
- v obou případech se přijatá bakteriální DNA buď:
 - integruje do chromosomu (přenos genu je stabilní)
 - rozloží (neúspěšný přenos)
 - zůstává v buňce neintegrována (abortivní transdukce) a nepřenáší se na potomstvo.
- nespecifická -fág přenáší jakékoliv geny z donorového kmene
 - rekombinantní – přijatá bakteriální DNA se integruje do chromozomu recipienta
 - abortivní – zůstává v buňce neintegrována a při dělení přechází jen do jedné dceřinné buňky nebo se v buňce rozloží (neúspěšný přenos)
- specifická - fág přenáší jen zcela určité bakteriální geny. Vyskytuje se během lysogenního cyklu u fágů, které se včleňují v podobě profága do určitých míst bakteriálního genomu. Při uvolnění profága asi v 1 promile případů dojde k excizi přiléhající části bakt. chromosomu (analogicky jako u F'-plasmidu)
- význam transdukce především přenos rezistence (R-faktory), faktorů virulence...

Praktický význam rekombinací a mezimikrobiálního přenosu

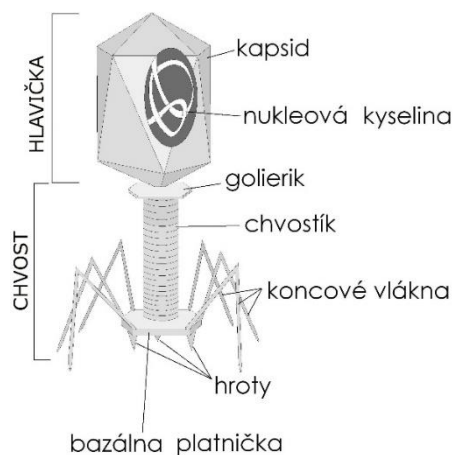
- přežití nepříznivých podmínek
 - získání rezistence k ATB (časté u nemocničních kmenů - nozokomiální infekce)
- vznik nových antigenních typů
 - např. *Neisseria gonorrhoeae*, virus chřipky
- příprava vakcín
- zvýšení virulence
 - plasmidy kódující např. tvorbu enterotoxinů

11. Virulentní a temperované fágy. Lysogenie, transdukce, fágová konverze

- bakteriofág – bakteriální viry, rozšířené v přírodě
- jsou obligátními nitrobuněčnými parazity
- napadají pouze živé bakterie
- samy nemají vlastní metabolismus, nemohou se rozmnožovat mimo bakteriální buňku, která jim poskytuje veškerou energii, potřebné chemické stavební sloučeniny apod.
- díky kapsidě mohou přežívat i mimo bakterii

Morfologie bakteriofágů

- viriony se skládají většinou z hlavy a bičíku
- hlava (40-150 nm) – bývá hexagonální
 - její dřeň tvořena DNA (výjimečně RNA)
 - kapsida (schránka NK) je bílkovinné povahy, kubické nebo spirální symetrie
- límeček - tenký disk v místě spojení bičíku s hlavou
- bičík (120-200 nm) - tvořen trubicí a zevní pochvou
- bazální ploténka
- koncová vlákna – jsou napojeny na bazální ploténku, funkce - přichycení na povrchové receptory bakterie
- hroty bičíku



Životní cyklus

- rozmnožování bakteriofágů je specifické tím, že kapsida neproniká dovnitř buňky.
- virová částice se adsorbuje na povrch buňky – nutná přítomnost specifických receptorů
 - adsorpce má různé stupně specifity – některé fágy účinkují i na buňky biologicky vzdálené, jiné infikují určitý bakteriální druh (polyvalentní fágy), některé natolik specifické, že je lze využít k přesné typizaci kmenů.
- po rozpoznání receptoru na povrchu bakterie vstříkne svoji nukleovou kyselinu (DNA nebo RNA) do hostitelské buňky, ve které se v průběhu životního cyklu vytvoří nové fágové částice.

Podle životního cyklu rozlišujeme dvě skupiny fágů:

- virulentní (lytický) fág – infikovaná bakteriální buňka produkuje nové fágové částice, buněčná stěna praská, dochází k lýze bakteriální buňky
- avirulentní (temperovaný) fág – bakterii nepoškozuje, je v ní přítomný ve formě profága a přenáší se do dceřinných buněk – tomuto jevu se říká lysogenie.

Temperovaný fág (avirulentní)

- DNA fága se v buňce nereplikuje, ale začlení se do bakteriálního chromozomu – replikuje se tedy s každým dělení buňky a dostává se do všech buněk dceřiných
- bakterie tak v některých případech dostává nové dědičné znaky
- profág se může z bakteriálního chromozomu spontánně nebo vlivem indukčních činitelů (např. UV záření) vyčlenit a přejít do lytického cyklu
- profág - fágový chromozom, který se začlenil do chromozomu bakteriální buňky, s ním se replikuje a dědí
- lyzogenní buňka – bakteriální buňka s profágem
- lyzogenizace – přeměna na buňku s profágem
- lyzogenní konverze - změna ve fenotypu bakteriální buňky vyvolaná přítomností profága (např. produkce toxinů – záškrťový u *Corynebacterium diphtheriae* , erytrogenní u *Streptococcus pyogenes*)

Kultivace bakteriofágů:

- jen na vnímavých buňkách
- v bujónové bakteriální kultuře se pomnožení fágů projeví projasněním až vyčeřením bujonu – důsledek rozpadu infikovaných buněk
- na pevné půdě dochází k tvorbě tzv. plaků – okrouhlých prázdných míst v bakteriálním nárustu
- tzv. kritické ředění (RTD) obsahuje tolik fágových částic, že na agarové bakteriální kultuře vyvolají splynutím plaků úplnou, neboli kontinuální lýzu

Transdukce

- přenos DNA z donora do recipienta zprostředkovaný bakteriofágem
- bakteriální geny se do fága dostanou během jeho reprodukce víceméně omylem, chybou
- existují dva typy bakteriofágů
 - virulentní (lytický) fág – infikovaná bakteriální buňka produkuje nové fágové částice, buněčná stěna praská, dochází k lýze bakteriální buňky
 - avirulentní (temperovaný) fág – bakterii nepoškozuje, je v ní přítomný ve formě profága = začleňuje se do buněčného chromosomu, a genom fága se tak replikuje zároveň s genomem infikované buňky – tomuto jevu se říká lysogenie. Vlivem např. UV záření se může lysogenní fág aktivovat a přejít do lytické formy.
- během transdukce se může přenést jakákoli část bakteriálního genomu.
 - v případě lytického cyklu se během sestavování nových fágových partikulí mohou do fágové kapsidy omylem zabalit zlomky částečně rozrušeného bakteriálního genomu. Vznikne transdukující částice, která přenese část DNA z původní buňky do buňky nové.
 - při lysogenii se DNA temperovaného fága může vyštípnout z chromosomu nepřesně, tj. včetně několika málo buněčných genů. Část potomstva takového fága bude defektní: kromě neúplného fágového genomu bude obsahovat kousek genomu buňky.

- v obou případech se přijatá bakteriální DNA buď:
 - integruje do chromosomu (přenos genu je stabilní)
 - rozloží (neúspěšný přenos)
 - zůstává v buňce neintegrována (abortivní transdukce) a nepřenáší se na potomstvo.

- nespecifická -fág přenáší jakékoliv geny z donorového kmene
 - rekombinantní – přijatá bakteriální DNA se integruje do chromozomu recipienta
 - abortivní – zůstává v buňce neintegrována a při dělení přechází jen do jedné dceřinné buňky nebo se v buňce rozloží (neúspěšný přenos)
- specifická - fág přenáší jen zcela určité bakteriální geny. Vyskytuje se během lysogenního cyklu u fágů, které se včleňují v podobě profága do určitých míst bakteriálního genomu. Při uvolnění profága asi v 1 promile případů dojde k excizi přiléhající části bakt. chromosomu (analogicky jako u F'-plasmidu)
- význam transdukce především přenos rezistence (R-faktory), faktorů virulence...

12. Plasmidy a transpozóny

Plasmidy

- malé cirkulární molekuly extrachromozomální DNA (<1%), většinou tvaru otevřeného kruhu, nachází se volně v cytoplazmě
- dovedou se samostatně replikovat, nezávisle na hlavním chromozomu.
- jejich velikost se pohybuje do několika set kilobází
- nesou jeden nebo několik genů, které nejsou nezbytně nutné pro přežití bakterie, jsou však pro ni výhodné
- každý plasmid se vyskytuje v určitém počtu kopií – malých bývají desítky, velkých bývá méně, někdy jen jeden
- někdy je lze některými zásahy (zvýšená teplota, mutageny, opakované pasážování) z buňky odstranit
- mají schopnost přecházet z buňky do buňky několika mechanismy:
 - konjugace - nejčastěji (F+ faktor tj. sex faktor E.coli).
 - transdukce
 - transformace

Dělení:

- episomový – může existovat jak mimo chromosom, tak do něj může být integrován
- konjugativní- obsahují geny podmiňující přenos DNA konjugací (geny pro tvorbu sex pilů), dovedou přenášet kopie sebe sama do jiných bakterií (nejznámější je F-faktor, dále např. mnohé R-faktory, metabolické plasmidy..)
- nekonjugativní - přenášeny do recipienta jen transdukcí nebo transformací

Nejdůležitější plasmidy

- F-plasmid - nese geny pro tvorbu sex-pili, které připojují buňku F+ (dárcovskou) k buňce F-
- Col-plasmid - obsahuje genetickou informaci o syntéze kolicinů – bakteriocinů působících především proti E. coli. Bakteriociny jsou bakteriální bílkoviny, které zabíjejí jiné bakterie.
- R-plasmid - obsahuje geny rezistence k ATB – geny pro enzymy schopné rozkládat nebo modifikovat antibiotika. Jsou často součástí transpozonu, takže bakteriální kmen se může rychle stát nositelem plasmidů mnohočetné rezistence. Protože mnohé R-plasmidy jsou konjugativní, šíří se mezi bakteriemi, a to i mezi rozličnými druhy. Šíření u G- konjugací, u G+ transdukcí
- Plasmidy virulence – zvyšují virulenci svého hostitele. Kódují tvorbu enterotoxinů, kolonizačních faktorů (fimbrie...)
- Metabolické plasmidy – geny pro tvorbu enzymů
- Kryptické plasmidy – funkce není známa, tyto plasmidy pravděpodobně nesou pouze geny nezbytné pro jejich existenci, a nemění fenotyp bakterie

Fyziologické vlastnosti udělené plasmidy:

- rezistence na ATB: může být navozena několika mechanismy:
 - produkce enzymu, který ATB rozloží, nebo chemicky modifikuje
 - tvorba enzymu, který modifikuje cílové místo antibiotika a činí ho necitlivým
 - produkce membránového transportního proteinu, který exportuje ATB z buňky ven
 - tvorba enzymu, který funkčně nahrazuje enzym blokováný antibiotikem
- rezistence na těžké kovy: rezistence na ionty rtuti, kadmia, stříbra, arsenu, vismutu, olova..
- produkce antibiotik: průmyslově využívaná vlastnost
- produkce toxinů: např. LT a ST enterotoxin u ETEC E.coli, invazivní faktor u EIEC E.coli
- degradace a oxidace: degradace jinak biologicky inertních nebo toxických organických látek, jako jsou uhlovodíky (ropa), toluen apod. V současnosti se bakterie nesoucí příslušné plasmidy (zejm. rod Pseudomonas) technologicky využívají např. k likvidaci následků ropných havárií

Transpozóny (skákalí geny)

- sekvence DNA schopná transpozice, t.j. přemístění z jednoho místa v genomu do jiného místa
- transpozice – proces přemístění transpozonu
- transponáza (transposasa) – enzym zprostředkující transpozici
 - rozeznává koncové obrácené repetice transpozonu
 - štěpí cílové sekvence, do kterých se vkládá transpozon
 - po transpozici spojuje cílové sekvence s vloženým transpozonem
- nejdůležitější vektor intracelulárního přenosu informací
- mohou být přeneseny konjugativním plasmidem do recipientní buňky a pak z tohoto plasmidu na jiný plasmid nebo na chromosom
- cílová místa, do nichž se transpozony vkládají, nejsou s transpozony homologická
- od profágů se liší tím, že postrádají virový reprodukční cyklus; od plasmidů se liší neschopností samostatné replikace a existence mimo chromosom

Transpozony vyvolávají:

- změny v genetické informaci
- je-li cílovým místem transpozice gen, tak se mutačně změní (inzerční mutace)
- některé transpozony nesou stop-kodony nebo terminační sekvence, jiné naopak promotory
- přesunem transpozonů se mohou spouštět nebo vypínat různé geny
- během transpozice může docházet k větším strukturálním změnám genomu (delece, přeskupování)

Druhy transpozice

- intermolekulární – probíhá mezi donorovou a recipientní molekulou DNA (např. mezi plasmidem a chromosomem)
- intramolekulární – probíhá mezi dvěma místy na jedné molekule DNA (např. na molekule plasmidu)

Základní typy bakteriálních transpozonů

- Inzerční sekvence - nejjednodušší, obsahují jen geny pro svou vlastní transpozici, což je obvykle gen pro transponasu, a na obou koncích obráceně orientované sekvence nukleotidů (převrácené repetice, báze odpovídající si pořadím ale v opačném pořadí). Neobsahují tedy žádné geny měnící fenotyp, vkládání do různých míst genomu však vede k roztržení a inaktivaci genů, do kterých se včlenily.
- Složené transpozony Tn – mimo geny pro vlastní transpozici obsahují nejméně jeden další (strukturní) gen. Jejich konce jsou tvořeny IS, centrální část je tvořena genem, jehož produkt může být příčinou rezistence k ATB nebo jiným strukturním genem. Přenášejí geny rezistence a virulence. Označují se předponou Tn.
- Transpozony typu TnA – přenášejí několik genů, ukončeny však nejsou kompletními IS, ale jen převrácenými opakovanými sekvencemi

Význam transpozonů

- mohou navodit mutace
- jejich přesun může vést ke spouštění nebo vypínání některých genů
- geny rezistence
- geny faktorů virulence
- tvorba a přenos nových kombinací genů

13. Patogenita a virulence mikroorganismů.

- virulence – vlastnost individuální, vyjadřuje stupeň patogenity určitého *kmene* mikroba
- patogenita – vlastnost druhová, týká se mikrobiálního *druhu* ve vztahu k určitému hostiteli

Patogenita

- přirozená schopnost mikroba poškozovat a vyvolat onemocnění, je vlastností druhovou
- přirozená x experimentální:
 - přirozená - její podmínkou je přenosnost – šíření v populaci
 - primární (obligátní) patogen - způsobují onemocnění dosud zdravých osob
 - sekundární (oportunní, fakultativní) patogen - za určitých podmínek, většinou u osob imunokompromitovaných
 - experimentální - při využití laboratorních zvířat, jejichž obranyschopnost je překonávána např. injekčním podáním mikrobů
- vnímavost hostitele vůči patogenu
 - vnímavý
 - jeden druh hostitele (*N. gonorrhoeae*, *T. pallidum*, *Shigella sp*)
 - více druhů hostitele (*B. anthracis*, *S. aureus*, *C. botulinum*, virus vztekliny)
 - rezistentní
- Podle přirozené patogenity dělíme mikroby na:
 - antropopatogenní - patogenní jen pro člověka
 - zoopatogenní – patogenní jen pro zvířata
 - zooantropopatogenní –pat. pro člověka i zvířata
 - fytopatogenní – patogenní jen pro rostliny
- Patogenita je dána:
 1. vnímavostí makroorganismu
 - styk s infekcí (nemoc, očkování) - zvyšování obranyschopnosti
 - oslabení organismu -zvýšená vnímavost k onemocnění (hormonální a nádorová onemocnění, imunosuprese, ozáření, etylismus) - oportunní infekce
 2. virulencí mikroorganismu

Virulence

- individuální vlastnost určitého kmene, vyjadřuje míru patogenity
- určena 3 složkami
 - 1) kontagiozita - schopnost přenášet se mezi hostiteli
 - 2) invazivita - schopnost proniknout do tkání, udržet se, šířit se a množit se v nich
 - 3) toxicita - schopnost mikrobů poškozovat hostitele
- stupeň virulence - vysoký, střední, nízký, avirulentní
 - zvyšování virulence - pasáž na vnímavém hostiteli
 - snižování - atenuovat (pěstování za nepříznivých podmínek – vakcíny)
- virulence – stanovení na pokusných zvířatech
- LD₅₀ (50% letální dávka) = množství mikroba, které usmrtí 50% infikovaných zvířat
- ID₅₀ (50% infekční dávka) = množství, které je schopno infikovat přesně 50% dobrovolníků

Složky virulence

1) Kontagiozita

- schopnost přenášet se mezi hostiteli

Kontagiozita závisí na

- počtu vylučovaných mikrobů - bývá značný, v nadbytku (tzv. období nakažlivosti)
- rezistenci mikrobů na vnější vlivy – choulostivé mikroorganismy se přenášejí jen přímým kontaktem mezi hostiteli, odolné mohou vytvářet vysoce rezistentní spóry
- velikosti infekční dávky (citlivost hostitele)
- chování hostitele – některé obranné reflexy (kýchání, kašláni, zvracení, průjem) jsou zároveň účinné mechanismy šíření; u toxoplasmy např. potkan ztratí strach z koček (v nichž parazit dokončuje cyklus)

2) Invazivita

- předpokládá schopnost:
 1. kolonizace, tj. přilnutí (adherence) k povrchům lidského těla (původci průjmů, záškrtu, pertuse)
 2. průniku do vnitřních partií těla a množení se v nich
 - do epitelů – chlamydie, shigelly
 - do submukózy – salmonelly, S. pyogenes
 - neproniká – C. diphtheriae, C. tetani
 3. šíření uvnitř organismu

Adherence

Faktory adherence bakterií:

- fimbrie - pilli
 - duté tyčinkovité útvary složené z pravidelně spirálovitě uspořádaných podjednotek bílkoviny zvané pilin
 - za adherenci odpovídá konec, který specificky reaguje s určitým receptorem – glykoprotein/glykopeptid hostitelské buňky
 - specifčnost vazby je pro každý druh bakterie typická
 - podle toho je-li inhibována manosa rozeznáváme – manosazesenzitivní a manosarezistentní
 - plní funkci kolonizačního faktoru u E.coli – CFA I, CFA II
 - plní funkci faktoru virulence u Neisserií patogenních, kdy v momentě navykání si na antigen dojde ke změně antigenní struktury a tím pádem k neúčinnosti IgA
- nefimbriální adheziny
 - povrchové proteiny, které nemusí vytvářet zřetelnou strukturu
 - protein F u Streptococcus pyogenes (vazba na fibronektin na buň. povrchu)
 - hemaglutinin u Bordetella pertussis
 - dále např. u yersinií, bordetel, mykoplasmat

Faktory adherence virů, plísňí, parazitů

- adheziny virů
 - výběžky obalu (povrchové proteiny, např. hemagglutinin virů chřipky a viru spalniček, vláknité výběžky u adenovirů, glykoprotein gp120 u HIV)
 - povrchové proteiny kapsidy u neobalených virů (např. enterovirů)
- adheziny plísňí a kvasinek
 - glukany a manany kvasinek
 - prorůstání hyf
 - keratofilie dermatofyt
- adheziny parazitů
 - přísavné struktury (přísavky, přísavné disky, háčky...)
 - rostellum (věnec háčků) u tasemnic

Průnik mikrobů do těla hostitele

Aktivní průnik

- neporušenou kůží (leptospirozy, larvy parazitů)
- pomocí enzymů – ničí buňky a mezibuněčné spoje – hyaluronidasa, lecithinasa, fibrinolysin (klostridia, streptokoky – flegmóna)
- drobnými trhlinkami v pokožce nebo sliznici (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *T. pallidum*, HIV)
- pokousání zvířetem (*P. multocida*, virus vztekliny) a bodnutí hmyzem (virus klíšťové encefalitidy, *B. burgdorferi*, *Plasmodium sp*)
- poškozujících leukocyty – leukocidin (např. Pantoneův-Valentinův)

Intracelulární přežívání fagocytovaných bakterií

- Blokáda spojení fagosomu s lyzozomem (mykobakterie, legionelly, toxoplasmata...)
- Únik z fagosomu před jeho spojením s lyzozomem (listerie, shigelly...), nutné poškození membrány
- Tvorba antioxidantů, produkce katalasy (patogenní neisserie...)

Vynucená fagocytóza

- jinými buňkami než fagocyty, např. epitelii sliznic
- pomocí invazinů - změnou povrchu hostitelské buňky
 - invaziny – povrchové bakteriální proteiny
 - specificky působí na buněčné receptory zvané integriny
 - po adherenci vyvolají změny v buněčném cytoskeletu – polymerací a depolymerací buněčného aktinu napodobí tvorbu pseudopodií při fagocytóze
- typické pro chlamydie, salmonelly, shigelly (Ipa), yersinie, listerie (internalin), meningokok (Opa, Opc)

Průnik virů

- uvolnění virionů do okolí z rozpadajících se infikovaných buněk a infekce sousedících buněk (často účast enzymů, např. neuraminidasy u virů chřipky)

Šíření mikroba uvnitř organismu

- lymfou
 - šíření podél lymfatických cest, dobře patrné u infekcí vstupujících kůží
 - i nepatrné poranění infikované *S. pyogenes* se projeví na kůži typických rudým pruhem nad zanícenou lymfatickou cévou (lymfangoitis) a zduřením regionální lymfatické uzliny (lymfadenitis)
 - *M. tuberculosis* využívá šíření lymfatickými cestami ukryt uvnitř makrofágů
- krví
 - bakteriémie – přítomnost bakterií v krvi, normální stav i u zdravého jedince - např. během žvýkání, čištění zubů se do krve dostávají příslušníci běžné mikroflóry, jsou však zachyceni a zničeni makrofágy ve slezině a játrech
 - pokud však do krve pronikají virulentní mikroby z chorobného ložiska, může se projevit septickými příznaky (u pyogenních bakterií)
 - primární bakteriémie – do krve se dostávají mikroby z místa vstup, resp. z regionálních uzlin
 - sekundární – zaplavení krevního oběhu po pomnožení agens v játrech, slezině, endoteliích.. Vede k zanesení agens do cílového orgánu (pokud do něj agens neproniklo již dříve)
- per continuitatem
 - schopnost šířit se tkáněmi z postiženého místa do jejich okolí
 - pneumokoky u otitidy přes kost spánkovou na meningy
 - u *S.pyogenes* – enzym hyaluronidasa, slouží jako průnikový faktor
 - přímo z buňky do buňky – viry (herpes simplex, RS-virus), listerie, shigelly
 - sekretem po sliznicích – patogeny dýchacího, zažívacího a urogenitálního traktu
 - z místa poranění na okolní tkáň – klostridia
 - infekce v peritoneální dutině po poranění střeva, přestupem z appendixu apod.
- podél nervových vláken
 - především viry – vzteklna, herpes simplex, varicella-zoster
 - améby rodu *Naegleria*
 - tetanický toxin

Schopnost překonávat obranné mechanismy hostitele

Odolávání nástrojům nespecifické rezistence

- komplement
 - zábrana aktivace komplementu
 - tvorbou pouzdra (meningokoky, pneumokoky, stafylokoky)
 - pokrytím protilátkami IgA (meningokoky)
 - tvorba inhibitorů aktivace (gonokoky, virus herpes simplex)
 - vazba inhibitorů aktivace na svůj povrch (*E. coli*, *S. pyogenes*)
 - štěpení C3b a C5a (*S. pyogenes*, *P. aeruginosa*)
 - ochrana povrchu bakteriální buňky před účinkem komplementu
 - dlouhými řetězci O-antigenů (salmonely v S-fázi)
 - aktivací komplementu na konci bičíků (pohyblivé bakterie)

- fagocytóza
 - vyhýbání se fagocytóze
 - tvorba pouzdra (pneumokoky, meningokoky, hemofily, klebsiely)
 - zábrana aktivace komplementu a tudíž opsonizace (viz výše)
 - tvorba inhibitorů migrace leukocytů (bordetely, mykobakteria, pseudomonády)
 - zabíjení fagocytů leukocidiny (stafylokoky, streptokoky, pseudomonády, klostridia)
 - zábrana opsonizace (protein A u *S. aureus*)
 - přežití uvnitř fagocytu
 - usnadnění fagocytózy aktivací komplementu (*M. tuberculosis*)
 - indukce fagocytózy u neprofesionálních fagocytů (chlamydie, EBV)
 - únik z fagosomu (*Listeria*)
 - inhibice vzniku fagolysosomu (chlamydie, mykobakterie, legionely)
 - tvorba antioxidantů a katalasy (meningokoky, gonokoky)

Odolávání nástrojům specifické rezistence

- rychlé pomnožení než se stačí imunita rozvinout
 - respirační viry, původci průjmů, malarická plasmodia
- oklamání imunních lymfocytů
 - skrývání mikroba
 - nervová ganglia (herpes simplex, varicella-zoster)
 - nitrobuněčné membrány (HIV, adenoviry)
 - infekční ložiska (mykobakteria, plasmodia)
 - antigenní kamufláž
 - stafylokoky (protein A), streptokoky (protein G), cytomegalovirus
 - navození tolerance
 - cytomegalovirus, virus zarděnek, leishmanie, kryptokoky
 - antigenní proměnlivost
 - trypanosomy, borrelie návratných horeček, gonokoky, virus chřipky
- potlačení imunitní reakce
 - invaze imunitního systému
 - HIV, spalničky
 - schopnost vázat FC-fragment IgG
 - stafylokoky, streptokoky, virus herpes simplex
 - tvorba proteas štěpících IgA
 - gonokoky, meningokoky, hemofily, pneumokoky

14. Charakteristika exotoxinů a endotoxinů

Endotoxin

- lipopolysacharid v zevní membráně stěny gramnegativních bakterií,
- obsažen v bakteriální buněčné stěně G- bakterií, ze kterých se uvolňuje při jejich rozpadu

Obecná charakteristika:

- 1) chemicky - komplexní látka z lipopolysacharidu - tvoří O antigen G- bakterií, skládá se z:
 - a) z lipidu A (lipidová část) - je v lipopolysacharidu zastoupen 10–15% a je hlavní biologicky aktivní složkou – společný pro lipopolysacharidy všech G- bakterií = vlastní toxická složka
 - b) střední polysacharidová část - společný pro příbuzné druhy
 - c) periferní část polysacharidu (O-antigen) - vyčnívá z povrchu mikroba, určuje sérotyp (specifický polysacharid)
- 2) je termostabilní
- 3) má nespecifické biologické účinky
- 4) detoxikace se nedaří
- 5) je špatným antigenem, má nízkou imunizační aktivitu

Biologické účinky endotoxinu:

- pyrogenní účinek – působí na mononukleární fagocyty a indukuje v nich tvorbu IL-1 a TNF, ty pak jako endogenní pyrogeny ovlivní termoregulační centrum v hypothalamu
- pokles hladiny glukózy v krvi
- neutrofily – nejprve pokles (leukopenie), následně významné zvýšení (leukocytóza)
- B-lymfocyty - stimulace tvorby protilátek
- makrofágy – aktivace (rychleji a účinněji fagocytuje, zvyšuje tvorbu lysosomálních enzymů a hydrolas)
- aktivace komplementu alternativní cestou
 - dochází tak k chemotaxi neutrofilů a k opsonizaci bakterií složkou C3b, vzniká útočný membránový komplex ale i anafylatoxiny (C3a, C5a), což má za následek zvýšenou permeabilitu kapilár a degranulaci neutrofilů. Endotoxin tedy vyvolává lokální zánětlivou reakci.
- všechny popsány efekty endotoxinu jsou výraznější při jeho vyšších koncentracích, k nimž dochází zejména při bakteriální sepsi
 - výsledkem je endotoxický šok, který se projevuje těžkou hypotenzí a diseminovanou intravaskulární koagulací
 - při závažných infekcích bývá příčinou smrti
 - klíčovými mediátory vzniku hypotenze jsou opět IL-1 a TNF
 - poruchy srážlivosti jsou pak vyvolány vlivem endotoxinu:
 - na koagulační faktor XII (Hagemanův faktor), který se aktivuje
 - na krevní destičky, které vyprázdní obsah svých granul
 - na neutrofily, z nichž se uvolní bílkoviny stabilizující fibrinové sraženiny

- na menší množství endotoxinu reaguje organismus spíše jako na poplašný signál, který oznamuje, že do vnitřního prostředí pronikl cizorodý element. Účinky nízkých hladin endotoxinu jsou tedy spíše blahodárné ve smyslu celkové stimulace obranyschopnosti proti mikrobům.

Exotoxiny

- toxické bakteriální proteiny.
- název získaly proto, že jsou vždy secernovány do okolí, na rozdíl od endotoxinu, který je součástí buněčné stěny a do okolí se uvolňuje až po rozpadu bakterie
- bílkoviny (toxické proteiny), mají dobré antigenní vlastnosti
- syntetizují se na ribozomech
- v bakteriální buňce se mohou vyskytovat buď hotové nebo v inaktivním stavu jako prekurzor (prototoxin)
- inaktivita prototoxinu spočívá v jeho vazbě na RNA nebo protein, ze které je uvolňován působením bakteriálních enzymů
- tvorba exotoxinu - podmíněná geneticky, buď chromozomálně nebo temperovanými fágů (profágů) (Dickův erytrogenní toxin), nebo plazmidy (E. coli)
- tvorba toxinu není pro růst a množení mikroba nezbytná, může však být užitečná pro jeho přežití nebo šíření - kmeny tvořící toxin jsou virulentnější.

Toxicita

- podmíněna prostorovým uspořádáním aminokyselin v bílkovinné molekule, (má charakter albuminů nebo globulinů) a lokalizací aktivních NH₂ skupin na povrchu molekuly
- je možné blokování NH₂ skupin – formolem, jodem, diazoselemi, čímž zbavíme exotoxin toxicity za vzniku tzv. toxoidu (= anatoxinu), který má zachované antigenní vlastnosti (užití při výrobě vakcín)

Obecná charakteristika exotoxinů

- 1) bakteriemi produkován (uvolňován) do vnějšího prostředí
- 2) chemicky - protein (albumin, globulin)
- 3) termolabilní, nesnese teplotu 56 – 60°C s výjimkou botulotoxinu (rezistentní k varu 10 min) a stafylokokových enterotoxinů, (rezistentních k varu 20 min)
- 4) specifické účinky – podle klinických projevů lze určit o jaký toxin a bakteriální druh jde
- 5) možná detoxikace na anatoxin (toxoid)- zachované antigenní vlastnosti (vakcíny)
- 6) dobrý antigen, v organismu vzniká antitoxická protilátka – antitoxin

Dělení exotoxinů

1) faktory průniku

- účinné hydrolytické enzymy rozrušující mezibuněčnou hmotu
- jejich pomocí mikroby pronikají tkáněmi a zároveň získávají živiny a energii.
- jsou tedy zároveň faktory invazivity
- řadou průnikových faktorů jsou například vybaveny streptokoky skupiny A (*Streptococcus pyogenes*):
 - hyaluronidasa - rozpouští mezibuněčné tmely
 - DN-asa - snižuje hustotu hnisu vznikajícího z rozpadlých leukocytů, a
 - streptokinasa - funguje jako fibrinolysin a umožňuje streptokokům pronikat fibrinovými bariérami, jež jim organismus staví v cestu, mají sklon vytvářet ve tkáních rychle se šířící flegmony. V medicíně se užívá k rozpouštění krevních sraženin.
- podobnou funkci mají kolagenasy a elastasy (klostridia, pseudomonády)

2) cytolytické enzymy (cytolyziny)

- fosfolipasy - odnímají z fosfolipidů polární skupiny, čímž destabilizují membránovou dvojvrstvu a výsledkem je lýza buňky. Příkladem je lecithinasa (fosfolipasa C neboli alfa-toxin *Clostridium perfringens*) nebo sfingomyelinasa (beta-hemolysin *Staphylococcus aureus*).
- toxiny vytvářející v membránách kanálky (póry) - jejich podlouhlé molekuly se včlení do buněčné membrány, takže mezi nimi vznikne kanálek (pór), jímž do buňky vniká voda. Toto narušení membrány je neenzymatické. Příkladem je alfa-toxin *Staphylococcus aureus* nebo streptolysin O *Streptococcus pyogenes*. Streptolysin O nepoškozuje neutrofily přímo, ale poškodí membrány jejich granul, takže se hydrolasy z nich vyliji do cytoplazmy. Podobným způsobem i listeriolysin O *Listeria monocytogenes* umožňuje bakterii uniknout z fagosomu.

3) blokátory syntézy proteinů

- většina se skládá z dvou částí; jedna část odpovídá za vlastní toxickou aktivitu (označuje se jako složka A, z angl. active, aktivní), druhá část se váže na buněčnou membránu (složka B, z angl. binding, vazba). Toxiny tohoto typu se proto někdy označují jako toxiny A-B.
- vazba na membránu vyžaduje specifický receptor, a vede k pohlcení toxinu.
- velká část toxinů A-B katalyzuje stejnou reakci: účinkuje jako ADP-ribosyltransferasa. Příkladem je záškrťový toxin. Substrátem pro něj je tzv. elongační faktor 2 (EF-2), molekula, která hraje nezastupitelnou roli v syntéze proteinů v eukaryotní buňce. Výsledkem účinku záškrťového toxinu je tedy zástava tvorby bílkovin a smrt napadené buňky. Shigatoxin zase brzdí tvorbu bílkovin tím, že štěpí buněčnou rRNA.

4) další farmakologicky účinné látky

- látky, které buňku přímo nezabíjejí, ale narušují (zesilují nebo potlačují) její funkce.
- mnohé zvyšují hladinu cAMP uvnitř buňky (choleragen).
 - cholerový toxin patří též mezi toxiny A-B.
 - jeho B-složka se skládá z pěti podjednotek a specificky se váže na jistý gangliosid na povrchu střevních epitelů.
 - tato vazba vede k internalizaci složky A
 - účinkem toxinu se začne tvořit CAMP, což vede k masivnímu úniku vody, minerálů a dalších látek z buňky. Výsledkem je profusní průjem.

- stejným způsobem vyvolávají průjem enterotoxické kmeny *E. coli*. Jejich termolabilní enterotoxin je prakticky totožný s choleragenem
 - pertussový toxin původce dávivého kašle *Bordetella pertussis* obdobným způsobem zvyšuje hladinu CAMP v neutrofilech. To má neblahý vliv na jejich pohyblivost a tudíž blokuje jejich chemotaxi.
- 5) neurotoxiny
- fungují jako peptidázy. Působí v nervových synapsích na bílkoviny, které jsou odpovědné za uvolňování neurotransmiterů
 - tetanický toxin (vyvolává křeče), a botulotoxin (vyvolává obrny)
- 6) superantigeny
- vážou se na T-lymfocyty a makrofágy. Po vazbě indukují celkovou obrannou reakci (uvolnění velkého množství cytokinů). Tím se podílejí na vzniku autoimunitních onemocnění. Zvyšují citlivost k účinku endotoxinů G⁻ bakterií.
 - některé toxiny stafylokoků (exfoliatin, toxin syndromu toxického šoku, enterotoxiny) a streptokoků (pyrogenní exotoxiny a další molekuly pravděpodobně vč. proteinu M).

15. Nejdůležitější bakteriální toxiny, jejich vlastnosti a účinky

Difterický toxin

- produkován *Corynebacterium diphtheriae*, jen kmeny obsahujícími gen tox
- je trojsložkový – dvě složky umožní vazbu na membránu hostitelské buňky a vstup do ní buňky, kde pak třetí složka blokuje proteosyntézu
 - A - odpovědný za aktivitu,
 - B - má vazebnou funkci (protilátky namířeny proti fragmentu B)
- formou lze připravit toxoid
- průkaz toxicity
 - PCR
 - imunodifuze
 - pokus na morčeti – s.c., do 12 h edém, hemoragie, nekróza, smrt do 5 dnů

Charakteristika záškrtu

- lokální zánět – bakterie nepronikají do organismu; lokální nekróza vedoucí k tvorbě pablán
- intoxikace organismu – do organismu proniká toxin - poškození nervového systému, obrna měkkého patra, poškození myokardu až jeho selhání, poškození parenchymatózních orgánů (jater, ledvin), hemoragie na plicích, perikardu, krvácení do dřeně nadledvin
- Záškrtný antitoxin – k profylaxi a léčbě záškrtu
- Záškrtný toxoid – k prevenci záškrtu (povinné očkování)

Tetanický toxin

- protein globulinové povahy, produkován *Clostridium tetani* za anaerobních podmínek
- složen ze 2 složek:
 - tetanolysin – hemolysinová složka (typu SLO), s dermonekrotickými a leukocidními vlastnostmi, uplatňuje se při pomnožení *C. tetani* v ráně (uchycení infekce), pro vlastní patogenézi tetanu je to složka bezvýznamná
 - tetanospasmin
 - dva fragmenty (po rozštěpení proteázami), jeden umožní průnik do nervových buněk (póry v membráně), druhý vede k zábraně uvolňování inhibičních mediátorů (GABA a glycinu)
 - z rány se toxin dostává do krve a lymfy, vstřebáván nervovými zakončeními, nervovými svazky do CNS k motorickým neuronům
 - blokáda inhibice motorických neuronů vede ke snížení prahu dráždivosti a zvýší odpověď na periferní podněty
 - výsledkem jsou tonicko-klonické křeče příčně pruhovaného svalstva (včetně dýchacího a srdečního)
 - postižení vegetativního NS – pocení, teplota ...

- průkaz toxinu (bakteriální kultura, krev)
 - neutralizačním testem - s.c. ke kořeni ocásku myši – při pozitivní reakci esovitě vztyčený ocásek, křeče zadních končetin a jejich postupné šíření směrem k hlavě včetně dýchacího svalstva, smrt udušením (kontrolní myš chráněná antitoxinem přežívá)
- tetanický antitoxin – k profylaxi i terapii tetanu
- toxoid (anatoxin) – k prevenci (povinné očkování proti tetanu)

Charakteristika tetanu:

- začíná jako lokální infekce
- *Clostridium tetani* se pomnoží v místě poranění (nebezpečí hluboké a uzavřené rány bez přístupu O₂, k anaerobióze přispívá nekrotická tkáň, znečištění a průvodní bakteriální flóra, obleněné krevní řečiště)
- toxin putuje podél nervů, pokud se dostane do krve, je vychytáván viscerálními receptory a znovu podél nervů postupuje na synapse gangliových buněk předních rohů míšních)
- na synapsích gangliových buněk blokuje účinek tlumivých vlivů (pravděpodobně rušivým zásahem do mechanismu syntézy acetylcholinu –způsobuje jeho hromadění)
- převládají účinky dráždivých vlivů, kosterní svaly dostávají neustále impulzy -> tonicko-klonické křeče svalových skupin - postupují od svalů mimických (trismus – risus sardonius), žvýkacích, descendentním směrem na zádové svaly, svaly končetin a dýchací svaly; křečí zádového svalstva dochází k opistotonu (až zlomení páteře), smrt u člověka nastává zástavou srdce (event. udušením)
- organismus reaguje na minimální množství toxinu, že ani nestačí odpovídat tvorbou dostatečného kvanta protilátek
- tetanus nezanechává imunitu (přežije-li člověk přirozenou infekci nestává se odolným k tetanotoxinu)

Botulinický toxin (botulotoxin)

- protein, produkován *Clostridium botulinum* za anaerobních podmínek
- termorezistentní, v potravinách ničen varem až po 10 minutách
- rezistentní proti HCl, peptickému a tryptickému trávení, vstřebává se proto neporušený střevní sliznicí (nejčastěji v potravinových konzervách, přičemž živé bakterie nemusí již být přítomny)
- 7 antigenních typů: A, B, C, D, E, F, G)u lidských onemocnění nejčastěji A, B, E)
- botulotoxin - nejjedovatější toxin – 1 mg = 16000 LD pro člověka: 20.106 LD pro myš
- transportován krví, lymfou i podél nervů
- účinkuje na periferní nervový systém – neuromuskulární ploténku - blokuje uvolňování acetylcholinu - dochází k přerušení přenosu vzruchu na cholinergních periferních nervech
- vznikají periferní paralýzy (obrný) – poruchy oční akomodace, ptóza víček, následují paralýzy horních končetin, dolních končetin, břišních a dýchacích svalů, smrt nastává udušením za plného vědomí
- terapie antitoxinem homologním (proti jednomu typu toxinu) nebo polyvalentním (proti více typům toxinu) - méně účinný, rozhodující je včasnost podání
- využití paralytických účinků botulotoxinu
 - k léčbě chorob s abnormálně vysokým svalovým tonusem
 - v kosmetice k vyhlazení vrásek (dočasný efekt)

Erytrogenní (spálový, Dickův) toxin

- bílkovina, produkována streptokoky skupiny A (z 92 %), ojediněle streptokoky B, C, G
- toxigenita - navozena mechanismem lyzogenní konverze
- relativně termorezistentní, vydrží zahřívání 60°C několik hodin
- 3 antigenní typy A, B, C
- účinek - působí toxicky na kapiláry -> toxický spálový exantém a enantém
- má pyrogenní účinek
- onemocnění - spála

TSST-1 - *Staphylococcus aureus*:

- protein, syntéza řízena chromozomálně
- pyrogenní efekt
- poškozuje syntézu makromolekul v endoteliích
- exantém
- superantigen – nadprodukce cytokinů –šokový stav
- pokles krevního tlaku

Bordetella pertusis

- pertusový toxin - dereguluje adenylátcyklasu hostitelské buňky, což vede k produkci hlenu, inhibuje fagocytózu a podněcuje uvolňování B a T lymfocytů z kostní dřeně - lymfocytóza. 6 subjednotek – jedna toxická subjednotka S1 a 5 vazebných subjednotek S2, S3, 2xS4 a S5
- tracheální cytotoxin - toxické pro řasinkový epitel, podporují uvolnění interleukinu-1 a horečku
- dermonekrotický toxin - role není zcela jasná, v experimentu na zvířeti způsobuje kožní leze

Toxiny s účinkem v zažívacím traktu

1. toxiny vyvolávající alimentární intoxikace
 - toxin-produkovan bakteriemi množícími se v kontaminované potravě
 - k onemocnění dochází účinkem preformovaného toxinu
 - inkubační doba je krátká (1 – 6h)
 - závažnost příznaků závisí na množství požitého toxinu:
 - slinění, nauzea, zvracení, průjem, dehydratace → poruchy cirkulace až kolaps (hlavně u dětí a starých lidí) onemocnění odezní do 1 – 3 dnů
2. toxiny produkované bakteriemi množícími se v tenkém střevě → toxoinfekce (otrava z potravin)
 - předpokladem je kolonizace střeva (adheziny), namnožené bakterie produkují toxin průběžně
 - => delší inkubační doba (1 – 5 dnů) a delší průběh (7 – 10 dní)
 - tzv. enterotoxiny → vyvolávají přesun vody a elektrolytů z cirkulace do střevního lumen
 - mechanismus působení se liší podle typu enterotoxinu
 - aktivace systému adenylcykláza – cAMP
(*Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Shigella*)
 - aktivace GMP
(*Salmonella*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*)
 - terapie: voda, elektrolyty, u těžkých stavů ATB

Cholerový toxin

- produkuje *Vibrio cholerae*
- A – 2 podjednotky
- B – 5 podjednotek
- produkce velkého množství cAMP vede k masivnímu úniku především vody a minerálů
- silné průjmy, dehydratace

Enterotoxiny *Escherichia coli*

- produkovány enterotoxickými kmeny (plasmid)
- termolabilní enterotoxin (totožný s choleroým toxinem)
- termostabilní enterotoxin

Stafylokokový enterotoxin

- protein odolný k enzymům trávicího traktu
- termorezistentní (není zničen při 100°C/30 minut), nejčastěji A, B, C, D; vzácně E
- lokální neurotoxin, působící na střevní trakt přes vegetativní a CNS systém (centrum pro zvracení), ↑ střevní peristaltiky
- při pokusu na zvířeti má i pyrogenní a letální účinky, podobné účinkům endotoxinu
- nejcitlivější je člověk
- diagnostika: precipitace v gelu, ELISA

Emetický toxin *Bacillus cereus*

- z rýže, těstoviny – dlouho skladované při pokojové teplotě
- obdobný účinek jako u enterotoxinu *S. aureus*

Shigatoxin

- *Shigella sp.* – kolonizace tlustého střeva
- *S. dysenteriae* sérotyp 1 – shigatoxin – aktivita enterotoxická, účinek neurotoxický, cytotoxický
- zprostředkován inhibicí proteosyntézy s následnou nekrózou buněk → hemoragie a ulcerace střevních buněk

16. Problematika bakteriálního biofilmu

- růst bakterii může být:
 - planktonický - v podobě izolovaných buněk (in vitro)
 - biofilm – v přirozených podmínkách. Jde o strukturovaná mikrobiální společenství, uložená v mezibuněčné hmotě a adherující k umělým i živým povrchům

Charakteristika biofilmu

- strukturované mikrobiální společenství uložené v mezibuněčné hmotě a adherující k inertním a živým povrchům
- takhle bakterie rostou v přirozených podmínkách
- slizovitá mezibuněčná matrix je tvořena polysacharidy mikrobiálního původu
- obklopuje jednotlivé mikroby i jejich seskupení a spolu s nimi vytváří složité struktury obsahující volné a široké prostory či kanálky, kterými proudí voda
- voda přináší živiny a odnáší zplodiny metabolismu - připomínají tkáň vyšších organismů

Vznik biofilmu

- bakterie rostoucí v podobě biofilmu se svými fenotypickými vlastnostmi zásadně liší od bakterií planktonických
- již přilnutí na nějaký povrch (většinou pomocí fimbrií) spouští činnost některých genů, především pro tvorbu extracelulárních polymerů
- jakoby bakterie měly zárodek hmatu, jimiž poznají přítomnost pevného povrchu, aby mohly začít produkovat lepkavé slizovité substance a vytvářet mikrokolonie
- po jisté době dosáhne množství bakterií kritického počtu a slizem obklopené mikrokolonie se začnou diferencovat v pravý biofilm = v množící se populaci bakterií se chemické signály z jednotlivých buněk natolik zesílí, že vyvolají expresi specifických genů a tvorbu nových produktů nutných pro vývoj biofilmu
- tomuto jevu se říká quorum sensing
- za příznivých podmínek se z biofilmu odlupují jednotlivé planktonické buňky, případně celé shluky - mohou se šířit a kolonizovat nové oblasti. Působí jako ložiska, z nichž se chorobný proces stále obnovuje a která ani obrana těla, ani terapeutické zásahy nejsou schopny eliminovat.
- na rozdíl od volných, planktonicky rostoucích bakterií, jsou bakterie v biofilmu nesrovnatelně více chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí

Výhoda biofilmu pro bakterie:

1. Výhodnější prostředí pro život
 - možnost účinné kooperace a specializace buněk (mezibuněčná hmota udržuje buňky a různé enzymy ve stálé vzájemné poloze);
 - mnohem snadnější přenos genů konjugací nebo plasmidy;
 - primitivní oběhový systém, který přináší a odnáší živiny, odpadní látky i signální molekuly

2. Ochrana před nepříznivými vlivy

- v přírodě odolávají vysychání, fágům, amoebám živícím se bakteriemi, toxickým látkám včetně dezinficiencí
- v makroorganismu vzdorují účinku fagocytů, protilátek i antibiotik, která spolehlivě likvidují jen volné planktonické bakterie

Onemocnění s tvorbou biofilmu

- zubní kaz - orální streptokoky
- osteomyelitis - *S. aureus*
- zánět středního ucha - hemofily
- subakutní bakteriální endokarditida – viridující streptokoky
- zánět žlučových cest - G- střevní tyčinky
- zánět plic při cystické fibróze – *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*

Výskyt na površích pomůcek a náhrad zaváděných do organismu

- intravenózní katetry (koagulasa-negativní stafylokoky, zejména *S. epidermidis*)
- umělé srdeční chlopně, kloubní náhrady a chirurgické stehy (*S. aureus*, koagulasa-negativní stafylokoky)
- cévní štěpy – G+ koky
- nitroděložní tělíška – aktinomycety
- močové katétry (*E. coli* a další gramnegativní tyčinky)
- kontaktní čočky - *Pseudomonas aeruginosa* a G+ koky

Možnosti ovlivnění biofilmu:

- Preventivní předcházení vzniku biofilmu
 - o ovlivnění povrchu materiálů
 - o impregnace biomateriálů antimikrobiálními látkami (antibiotika, antiseptika)
- Rozrušení již přítomného biofilmu
 - o zvýšení koncentrace antimikrobiální látky - ATB zátka
 - o kombinace antimikrobiálních látek s různým mechanismem působení
 - o rozvolnění mezibuněčné hmoty – např. enzymaticky

17. Ekologie mikroorganismů

- ekologie – zabývá se vztahy:
 - mezi organismy a prostředím
 - mezi organismy navzájem

Vztahy mezi organismy navzájem

- symbióza - jakékoliv soužití dvou nebo více různých organismů (tohle pojetí symbiózy je širší než uváděly starší příručky, které symbiózu definovaly jen jako vzájemně prospěšný vztah organismů)
- symbiont – organismus, který alespoň část svého života tráví s jiným organismem
- symbiotické vztahy mohou nabývat několik forem:
 - komensalismus – jednomu z partnerů (=komezál) přináší užitek, kdežto druhému (hostitel) ani neškodí, ani neprospívá (např. normální příslušníci střevní flóry člověka – tlusté střevo jim poskytuje dostatek živin a vhodné podmínky)
 - mutualismus – oba partneři mají prospěch (u člověka střevní bakterie *E.coli* – produkce vitamínu K; v přírodě lišejníky – řasa nebo cyanobakterie produkující kyslík a organické sloučeniny + houba poskytující ochranu, vodu a minerály)
 - parazitismus – jeden organismus (parazit) druhému (hostitel) škodí – ať přímo, nebo ubíráním živin. Parazit bývá menší a na svém hostiteli zcela závislý
- v každé z těchto forem se může jednat o vztah:
 - endosymbiotický – jeden organismus je přítomen uvnitř druhého
 - ektosymbiotický – organismus zůstává vně

Přirozená mikroflóra zdravého člověka

- kolonizuje místa komunikující s vnějším prostředím, liší se podle lokality, závisí na věku, výživě a okolním prostředí
- význam
 - působí proti usídlení patogenů
 - stimuluje imunitní systém
 - tvorba některých vitaminů střevní mikroflórou
 - možný vznik endogenní infekce
 - translokace do míst fyziologicky sterilních (infekce močového traktu ...)
 - po léčbě širokospektrými antibiotiky k pomnožení rezistentních mikrobů (kvasinek ...)

Patogenita

- patogenita je důsledkem parazitismu
- patogen – mikroorganismus, který je schopen poškodit makroorganismus a vyvolat onemocnění

- patogenita je poměrně vzácná vlastnost mezi mikroby, prostředí makroorganismu je totiž pro většinu mikrobů nehostinné
- uspějí v něm jen ty mikroby, u nichž se vyvinuly dědičné znaky, které jim umožňují proniknout do makroorganismu a udržet se v něm – tzv. faktory patogenity nebo faktory virulence

Vztahy mezi organismy a prostředím

- Životní aktivita a vývoj mikroorganismů závisí na vnějším prostředí
 - Zdroje živin a využitelné energie
 - Fyzikální, chemické a biologické podmínky
- Schopnost rychlého přizpůsobení se aktuálním podmínkám = adaptace
 - Změna enzymů
 - Změna morfologie buňky
- Mikroorganismy svou činností vnější prostředí modifikují
- V přírodě se mikroorganismy vyskytují v čistých kulturách výjimečně, vytvářejí mikrobiální společenstva
 - Prostor osídlený určitým mikrobiálním společenstvem se nazývá mikrobiální stanoviště (biotop)
- Ekosystém - soubor všech organismů a jejich přirozeného prostředí
 - Biotická složka (společenstva, např. mikrobiální)
 - Abiotická složka (fyzikální a chemické podmínky)

Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikrobů

- v zevním prostředí jsou vystaveny řadě nepříznivých faktorů - teplota, záření, nedostatek vody, nedostatek živin, nevhodné pH a další.
- pokud intenzita daného faktoru (např. teploty) stoupá jen pozvolna, lze pozorovat, že mikroby se nejprve přestávají množit, a teprve pak začínají postupně odumírat.
- první fáze bývá obvykle vratná, častá je zejména během působení chemických prostředků a v případě bakterií se někdy označuje názvem bakteriostáza. Co se týká druhé fáze, tak ta je nevratná a vede k postupné smrti mikrobů.
- podobně jako množení mikrobů je exponenciální, tak i jejich odumírání probíhá podle logaritmické křivky, čili konstantní rychlosti. Až ke konci se rychlost odumírání zpomaluje, protože naživu zůstávají odolnější jedinci.
- obecně platí, že
 - počet usmrcených buněk závisí nejen na intenzitě smrtícího činitele, ale i na době jeho působení
 - vztah mezi počtem přežívajících buněk a dobou působení antimikrobiálního agens je logaritmický
 - čas potřebný k usmrcení mikrobů závisí na jejich výchozím počtu

- účinnost antimikrobiálního agens dále závisí na druhu mikroba (velmi rezistentní jsou spory)
- ochranný vliv prostředí - hlavně přítomnost organických látek (bílkoviny a tuky poskytují někdy i téměř dokonalou ochranu)

Voda

- voda je základní složkou živé hmoty.
 - činí až 80% živé váhy bakteriální buňky
 - asi 15% u spor
- část vody je vázána na různé buněčné struktury
- volně přístupná voda slouží jako rozpustidlo pro řadu molekul a v hydrované formě je přenáší přes cytoplasmatickou membránu. Účastní se mnoha biochemických reakcí (hydrolýza) a vzhledem ke své polární povaze ovlivňuje tvar a stavbu řady polymerů, zejména bílkovin.
- většina bakterií vyžaduje ve svém prostředí volně přístupnou vodu a patří tedy mezi organismy hygrofilní. Snížení množství dostupné vody pod optimum prodlužuje generační dobu a v extrémním případě způsobí smrt buňky vyschnutím.
- výjimkou je lyofilizace, sušení zmražených bakterií ve vakuu, která se naopak používá ke dlouhodobému uchovávání bakterií
- k bakteriím citlivým na nedostatek vody patří spíše gramnegativní bakterie, především patogenní neisserie. Na nedostatečně vlhkých kultivačních půdách meningokoky a zejména gonokoky nevyrostou a po vyschnutí hynou během několika málo hodin.
- k vyschnutí jsou mnohem odolnější bakterie grampozitivní a acidorezistentní. Příkladem jsou příslušníci kožní mikroflóry: stafylokoky a korynebakteria. Původce tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis*) zaschlý ve sputu vydrží infekční řadu týdnů.
- s vodou vázanou na povrch částic v prostředí (v půdě) se dovedou spokojit organismy xerofilní: nokardie, aktinomycety a zejména plísňe.
- k vysychání jsou dále odolné spory bakterií, cysty prvoků a vajíčka parazitárních červů. O sporách se traduje, že vydrží v suchém stavu životaschopné i staletí.
- viry jsou k vysychání obecně choulostivější než bakterie (například zaschlé krustičky u planých neštovic již infekční virus neobsahují); výjimkou jsou poxviry (virus varioly čili pravých neštovic), které odolávají vysychání až několik měsíců.

Teplota

- mikroby jsou schopny se množit jen v určitém rozmezí teplot
 - minimální růstová teplota
 - maximální růstová teplota
- pokud teplota i jen na krátkou dobu vybočí z intervalu mezi těmito body, dojde k teplotnímu šoku, který část mikrobiálních buněk nepřežije
- optimální teplota růstu – rychlost růstu dosahuje maxima, u patogenních bakterií mezi 35°C a 37 °C

- obecně platí, že teplotní rozmezí u patogenů je užší
 - velmi úzké teplotní rozmezí růstu - např. *N. gonorrhoeae* (30 až 38,5 °C s optimem při 37 °C)
 - naproti tomu salmonely rostou mezi 8 a 42 °C.
 - jiné enterobakterie (*hafnie*, *serracie* a zejména *yersinie*), jakož i listerie se množí, byť pomalu, i při chladničkové teplotě, což má význam epidemiologický, hlavně v potravinářství.
- podle optimální růstové teploty lze mikroby rozdělit na tři skupiny:
 - psychrofilly - rostoucí při nízkých teplotách,
 - mesofily - optimálně rostoucí při běžných teplotách
 - termofily - množící se při vysokých teplotách.
- psychrofilly
 - optimální teplota růstu mezi 0 a 20 °C.
 - většinou k nim patří nepatogenní mikroby chladných oceánských a jezerních vod a bahna (bakterie, které vyrostou na povrchu potravin v chladničkách v podobě mazlavého povlaku, patří spíše k mesofilům s nízkou minimální růstovou teplotou. Tyto mikroby se někdy označují jako psychrotolerantní.
- mesofily
 - teplotní optimum mezi 20 a 40 °C
 - řadí se k nim naprostá většina mikrobů významných pro lékařskou mikrobiologii, zejména pak všechny mikroby patogenní.
 - při teplotách kolem 45 °C se z patogenů ještě množí např. salmonely, kampylobaktery a *Bacillus cereus*.
- termofily
 - teplotní růstové optimum nad 40°C.
 - vyskytují se v horkých pramenech, v chlěvské mrvě a v kompostu.
 - většinou nevyvolávají infekce člověka a některé ani při teplotě našeho těla nerostou.
 - mnohé nepatří mezi pravé bakterie, ale mezi Archaea. Získávají se z nich však termorezistentní enzymy (amylasy a proteasy) užívané v potravinářství, případně do pracích prášků.
 - hypertermofily - s růstovým optimem nad 80 °C. Pod 60 °C přežívají, ale nerostou. Většina byla izolována z podmořských sopečných oblastí a patří mezi Archaea. Při teplotách vyšších než 100 °C dokáží růst např. příslušníci rodů *Pyrobaculum*, *Pyrococcus* a *Hyperthermus*.
- i krátkodobé zvýšení teploty nad hodnotu teploty maximální vede k teplotnímu šoku. Při něm se v bakteriální buňce tvoří tzv. teplotně šokové proteiny (HSP, z angl. heat shock proteins), které mají pravděpodobně protistresovou funkci.
- další zvyšování teploty vede posléze k postupnému usmrcení mikrobiálních buněk - pravděpodobně nevratná inaktivace (denaturace) životně důležitých enzymů, případně rozpad lipidických membrán.
- usmrcování mikroorganismů probíhá dle logaritmické křivky. Teoreticky tedy vlastně není možné „úplně zničit“ všechny mikroby v zahříváném vzorku. Proto se za přesnější hodnotu považuje hodnota D (decimální smrtící doba), která udává čas nutný ke snížení počtu mikroorganismů na desetinu původního množství (=jde o dobu nutnou ke zničení 90 % přítomných mikrobů)

Hydrostatický tlak

- existence života při vysokých teplotách předpokládá přítomnost vody v kapalném skupenství, což je možné jen při zvýšeném tlaku vodního sloupce.
- ten narůstá přibližně o 1 atm s každými 10 m hloubky a v hlubokomořských příkopech přesahuje 1100 atm. Do hloubky asi 2000 m převládají mikroorganismy barotolerantní.
- v extrémních hloubkách se vyskytují barofily, které rostou lépe za zvýšeného hydrostatického tlaku. Z Mariánského příkopu z hloubky přes 10 000 m byl izolován z mrtvého koryše dokonce obligátně barofilní mikroorganismus, který se při teplotě 2 °C přestával množit při tlaku nižším než 380 atm.

Osmotický tlak

- mikroorganismy se většinou nalézají v prostředí hypotonickém, v němž koncentrace rozpuštěných látek je nižší než v buněčné cytoplasmě. Přesto v tomto prostředí mikroby nelyzují, neboť je chrání pevná buněčná stěna.
- naopak existují jisté biotopy, kde prostředí je vysoce hypertonické. V tomto prostředí běžné buňky propadají tzv. plasmolýze: ztrácejí vodu, jejich cytoplasma se smršťuje a protože nemohou přijímat vodu se živinami, přestávají se množit. Tohoto jevu se využívá ke konzervaci potravin (solení masa, nakládání do slaných nálevů, do cukru, příprava džemů a marmelád).
- halofily - mikroby, které se množí v prostředí s vyšším obsahem soli
 - halotolerantní - vyšší koncentraci solí nevyžadují
 - obligátní, případně extrémní halofily - za běžných koncentrací solí nerostou.
- halotolerantní jsou např. enterokoky (tolerují 6,5% NaCl v kultivačním médiu) a zejména stafylokoky (rostou i na agaru s 10 % NaCl). Vysoký osmotický tlak daný přítomností cukrů lépe než bakterie snášejí mikroskopické houby.
- obligátní halofily se nalézají zejména v mořské vodě – příslušníci rodu *Vibrio* (*Vibrio metschnikovii*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus* aj.), které na půdách bez přídavku 1% NaCl většinou nevyrostou.
- extrémní halofily - rostou v nasycených roztocích soli (především archeonty například rodů *Halococcus* a *Halobacterium*)

Záření

- pomineme-li fotoautotrofy a ftoheterotrofy, pro něž je sluneční záření zdrojem energie, pak pro většinu bakterií je záření, zejména pak ultrafialové a ionizační, příčinou poškození biologicky důležitých molekul.
- ultrafialové záření, hlavně o vlnové délce mezi 240 a 300 nm, je nejškodlivější. Je schopno vnějším valenčním elektronům molekul dodat takovou energii, že se molekula ocitne v excitovaném stavu, což zvýší její schopnost chemicky reagovat.
- UV-záření absorbují hlavně molekuly obsahující tzv. konjugované vazby (střídající se vazby jednoduché a dvojné). U nukleových kyselin se jedná o všechny báze, u bílkovin o cystein a aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan, tyrosin).

- excitovaná buňka je výjimečně schopna energii vyzářit, častěji však chemicky reaguje a tím se změní.
- bakteriální buňky sice dovedou vznikající poruchy rychle napravovat, ale jen do určité míry, pak poškození vede k jejich smrti.
- protože hlavní složkou buňky je voda, vytvářejí se radikály typu hydroxylu (OH), které poškozují molekuly DNA. Kyslík je měněn na superoxidový radikál O⁻, jenž rovněž destruuje DNA a další molekuly.
- ionizační záření, například paprsky gama, má na některé mikroby poměrně silné účinky. Porušuje jejich DNA jednak přímo, jednak prostřednictvím vznikajících volných radikálů.
 - nejcitlivější jsou gramnegativní bakterie, kdežto plísňe a kvasinky bývají odolnější.
 - velmi odolné vůči radiaci jsou některé viry, například viry hepatitid A a B

Vliv pH

- většině mikroorganismů vyhovuje pH blízké neutralitě (mezi pH 6 až 8) a lze je označit jako neutrofilny.
- alkalofily – rostou dobře v zásaditém prostředí
 - *Vibrio cholerae* roste výborně mezi pH 7,4 a 9,6, v kyselém prostředí naopak rychle hyne
 - poněkud alkalotolerantní jsou mikroby štěpící ureu a proteiny, kupř. rod *Proteus*
- acidofily – dobře se množí v kyselém prostředí,
 - fakultativní acidofily se množí též při neutrálním pH. Patří mezi ně například kvasinky a plísňe, které jsou schopny růst i při pH 3.
 - jako obligátní acidofily se označují mikroby rostoucí optimálně kolem pH 3 i méně.
 - z bakterií lékařsky významných např. laktobacily (optimální pH 6, toleruje i pH 3), *Coxiella burnetii* množí se v kyselém prostředí fagolysosomu při pH kolem 4,0.
- příliš vysoké nebo příliš nízké pH mikroby usmrcuje - příčinou je inhibice enzymů a transportních bílkovin anebo též přímé poškození cytoplasmatické membrány.
- v alkalickém i kyselém prostředí rychle hynou gonokoky.
- řada mikrobů zplodinami svého metabolismu okyselí své okolí natolik, že pak přestane růst. Kultury streptokoků v málo pufrovaných půdách se sacharidy dokonce během několika málo dnů odumírají

Oxidoredukční potenciál

- oxidoredukční potenciál odráží poměr mezi oxidovanými a redukovanými látkami v prostředí.
- je-li pozitivní, převládají v prostředí podmínky oxidující, je-li negativní, je prostředí výrazně redukováno.
- běžné kulturační půdy vystavené vlivu kyslíku jsou zřetelně oxidovány a mají redox potenciál kolem 200 mV.
- oxidované prostředí vyhovuje aerobům, které při svém metabolismu redox potenciál snižují (někdy k tak nízkým hodnotám, které umožní zahájit množeni anaerobům).

- anaeroby tedy vyžadují naopak nízký redox potenciál (hodnoty kolem 0 mV až negativní) čili redukované prostředí. To lze docílit jednak odstraněním kyslíku, jednak přidavkem redukovaných (a tudíž své okolí redukujících) látek.
- vlastní mechanismus působení redox potenciálu spočívá v regulaci funkcí některých enzymů.

18. Komunitní a nozokomiální infekce

Komunitní infekce

- získané v běžné populaci mimo zdravotnická zařízení
- rezistence na antibiotika nižší než u kmenů kolujících v nemocnici
- rezistencí zasažení zejména původci respiračních infekcí (*Streptococcus pneumoniae* rezistentní k penicilinu, *Streptococcus pyogenes* rezistentní k erytromycinu)
- rezistence se objevuje i u bakteriálních původců střevních infekcí (salmonel, kampylobakterů)
 - souvislost s používáním antibiotik ve veterinární oblasti

Nozokomiální nákazy

- endogenní nebo exogenní původ (exogenně i vlastním kmenem)
- příčinná souvislost s pobytem pacienta v nemocnici (ústavní i ambulantní části)
- vznik
 - v nemocnici
 - po propuštění pacienta do domácí péče nebo přeložení do jiného zdravotnického zařízení
- nezahrnují infekce, se kterými pacient do nemocnice přichází
- zavlečení etiologického agens při ošetření nebo vyšetření pacienta (možné postižení kteréhokoliv systému) - agens podle typu operace, oddělení
- nejčastěji:
 - pooperační nákazy ran
 - nákazy močových cest
 - nákazy respirační (DDC) včetně aspirace z GIT
 - sepse
- zdroje infekčního agens
 - pacient (vlastní endogenní flóra nebo jiný pacient)
 - zdravotnický personál
 - návštěvník ...
- přenos infekčního agens
 - přímý (kontaktem, kapénkami, alimentárně, během porodu)
 - nepřímý (závisí na schopnosti agens přežít mimo hostitele, na existenci vehikula pro pomnožení a přenos na vnímavého jedince – kontaminované pomůcky, biologické produkty, potravina, vzduch, hmyzí vektor ...)
 - vektorem přenosu nejčastěji ruce zdravotníků
- vznik nákazy ovlivňuje:
 - infekční dávka, virulence a vstupní brána infekčního agens
 - vnímavý pacient - věk, stav imunity, základní onemocnění, současná léčba (imunosupresiva, cytostatika, kortikoidy ...), osobní návyky (alkohol, kouření ...), psychické faktory ...
- podle individuálních vlastností
 - manifestní onemocnění
 - nákaza s necharakteristickým průběhem

- nosičství
- Šíření infekčního agens lze sledovat pomocí markerování kmenů
 - biotypizace (morfologické a biochemické vlastnosti)
 - fagotypizace
 - sérotypizace (antigenní analýza)
 - produkce toxinů, bakteriocinů, hemolysinů ...
 - posouzení antibiogramu
 - posouzení citlivosti k dezinfekčním prostředkům
 - elektroforéza proteinů (PFGE)
 - profil DNA, plasmidů (přítomnost genů rezistence, virulence)
- Úskalí nozokomiálních nákaz
 - další zátěž pro jinak nemocného pacienta
 - další ekonomická zátěž
 - snadné šíření rezistence k ATB (MRSA, VRE, ESBL ...)
 - snadné šíření rezistence k dezinfekčním prostředkům
 - morbidita, mortalita
 - průnik rezistentních kmenů do komunity
- Prevence nozokomiálních nákaz
 - individualizace pomůcek
 - účinná hygienicko-epidemiologická opatření
 - mytí a dezinfekce, ochranné rukavice a jiné pomůcky
 - přiměřená izolace pacientů
 - racionální antibioterapie včetně schémat iniciační léčby

19. Bakteriální původci nozokomiálních a komunitních infekcí

Komunitní infekce

Infekce CNS

Etiologie infekcí CNS se liší podle toho, jde-li o meningitidu, encefalitidu nebo mozkový absces, případně jestli jde o infekci akutní nebo chronickou

U meningitid a encefalitid se vyšetřuje likvor, u mozkového abscesu bývá likvor i krev sterilní a je třeba absces punktovat

ETIOLOGIE INFEKČÍ CNS	
Akutní meningitidy nehnisavé (aseptické)	enteroviry (echoviry, coxsackieviry) virus klíšťové encefalidity virus příušnic méně často: virus herpes simplex, virus varicelly-zosteru vzácně některé bakterie: borrelie, leptospiry, treponemata
Akutní meningitidy hnisavé (purulentní)	novorozenci: <i>Streptococcus agalactiae</i> enterobakterie (<i>Escherichia coli</i> , salmonely) <i>Listeria monocytogenes</i> kojenci a batolata: <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> starší děti a mladí dospělí: <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> stafylokoky, enterobakterie, jiné streptokoky dospělí: <i>Streptococcus pneumoniae</i> stafylokoky, enterobakterie, jiné streptokoky <i>Neisseria meningitidis</i> osoby starší 60 let: <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> stafylokoky, enterobakterie, jiné streptokoky vzácně: kvasinky (<i>Cryptococcus neoformans</i>) amoeba (<i>Naegleria fowleri</i>)
Chronické meningitidy	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (basilární meningitida) kryptokoky
Encefalitidy	virus klíšťové encefalidity virus herpes simplex virus parotitidy výjimečně: enteroviry při postižení imunity: <i>Toxoplasma gondii</i> vzácná chronická encefalitida: rod <i>Acanthamoeba</i>
Akutní mozkové abscesy	smíšená anaerobní (peptostreptokoky, prevotely) a aerobní flóra (stafylokoky, streptokoky, enterokoky, enterobakterie a nocardie)
Chronické ložiskové infekce v mozku	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Nocardia asteroides</i> grampozitivní koryneformní tyčinky (<i>Rhodococcus equi</i>), mikromycety (aspergily, kryptokoky), cysticerky tasemnice <i>Taenia solium</i>

Septické stavy

Je třeba rozlišovat mezi bakteriémií a sepsí.

- bakteriémie – přítomnost bakterií v krvi
- seps (septický syndrom) – systémová zánětlivá reakce organismu na infekci, pokud jde o reakci na jiné, neinfekční poškození, použije se název SIRS. Bakterie jsou tedy pouhým spouštěcím mechanismem seps.

Základním předpokladem úspěšného průkazu etiologie je odběr krve na hemokulturu

TYPY BAKTERIÉMIE A MIKROBY PŘI NICH IZOLOVANÉ
Přechodná bakteriémie u lokalizovaných infekcí pneumonie (pneumokoky) meningitidy (meningokoky, u novorozenců streptokoky skupiny B) pyelonefritidy (<i>Escherichia coli</i>) osteomyelitidy (<i>Staphylococcus aureus</i>) septické artritidy (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>) cholecystitidy (enterobakterie, enterokoky) peritonitidy (smíšená střevní flóra anaerobní a fakultativně anaerobní) ranné infekce (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>) dekubity (smíšená aerobní kožní a střevní flóra)
Kontinuální bakteriémie u celkových infekcí břišní tyf (<i>Salmonella Typhi</i>) brucelóza (<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i>)
Bakteriémie při infekcích krevního řečiště flebitidy, tromboflebitidy, endarteritidy (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>) akutní endokarditidy (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>) subakutní a chronické endokarditidy (<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mutans</i> a další alfa-hemolytické streptokoky, enterokoky, skupina HACEK (<i>Haemophilus aphrophilus</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Kingella kingae</i>) endokarditidy „kultivačně negativní“, kdy agens v běžné hemokultuře nevyrůstá (nejčastěji <i>Coxiella burnetii</i> a bartonely, dále mykoplasmata, mykobakterie, chlamydie, legionely, <i>Tropheryma whippelii</i>) infekce chlopenních náhrad (<i>Staphylococcus epidermidis</i> a další koagulasanegativní stafylokoky, korynebakterie jako <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Corynebacterium jeikeum</i> aj., mikrokoky, nokardie, ale i burkholderie a mykoplasmata)
Bakteriémie při některých malignitách karcinom tlustého střeva (<i>Streptococcus bovis</i>) leukémie (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium septicum</i>)
Bakteriémie při nitrožilní aplikaci drog kožní flóra (<i>Staphylococcus aureus</i> , koagulasanegativní stafylokoky, korynebakterie) ústní flóra (<i>Neisseria sicca</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , příp. patogeny z nosohltanu) bakterie z prostředí (zejména rody <i>Clostridium</i> a <i>Bacillus</i>)
Iatrogenní bakteriémie po instrumentálních zákrocích: extrakce zubů (alfa-hemolytické streptokoky, anaeroby: prevotely, <i>Veillonella parvula</i>) bronchoskopie (flóra nosohltanu, i případně respirační patogeny) cévkování (<i>Escherichia coli</i>) během infusí (kožní flóra, nenáročná gramnegativní nefermentující tyčinky) katérové seps (koagulasanegativní stafylokoky, <i>Staphylococcus aureus</i> , kandidy) infikované umělé chlopně, cévní spojky apod. (flóra popsána v třetím odstavci) febrilní neutropenie po cytotoxické chemoterapii (nad gramnegativními tyčinkami začínají převládat rezistentní grampozitivní mikroby – stafylokoky, enterokoky, příp. i kvasinky a plísně)

BĚŽNÉ KLINICKÉ TYPY SEPSE A JEJICH NEJČASTĚJŠÍ PŮVODCI	
ranná sepe	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
fulminantní sepe	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
urosepe	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
abdominální sepe	smíšené infekce (enterobakterie, enterokoky a anaeroby)

Infekce horních cest dýchacích a ucha

Respirační infekce obecně patří zejména u dětí k nejčastějším. Nejméně 3/4 jsou virového původu. Příznaky a etiologie závisí na lokalizaci. S infekcí horních dýchacích cest úzce souvisí infekce středního ucha infekce vedlejších dutin nosních.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ INFEKCE HCD A JEJICH BĚŽNÍ PŮVODCI	
rhinitis nasopharyngitis	rhinoviry, koronaviry, adenoviry sekundárně: <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> chronická: tytéž bakterie, navíc <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>
tonsillitis acuta pharyngitis acuta	rhinoviry, koronaviry, adenoviry, EB-virus, coxsackieviry A <i>Streptococcus pyogenes</i> , beta-hemolytické streptokoky jiných skupin (C, F, G), <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> vzácně: <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> soor: <i>Candida albicans</i>
otitis media acuta sinusitis maxillaris acuta sinusitis frontalis acuta	respirační viry, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> sekundárně: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , anaeroby (rody <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i>)
otitis externa	<i>Staphylococcus aureus</i> , plísně
chronická otitida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
chronická sinusitida	stafylokoky, anaerobní koky (peptostreptokoky, peptokoky)
epiglottitis acuta	<i>Haemophilus influenzae</i> typ b
laryngotracheitis acuta	viry parainfluenzy, viry chřipky A a B, RS-virus, adenoviry, <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> sekundárně: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>

Infekce dolních cest dýchacích a plic

NEJČASTĚJŠÍ PŮVODCI ZÁNĚTŮ PLIC				
akutní záněty plic	získané v terénu	u původně zdravých	dospělých	bronchopneumonie: <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> atypické pneumonie: <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> virus chřipky A
			děti	bronchopneumonie: <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> enterobakterie (zvl. <i>Klebsiella pneumoniae</i> , ale i <i>Escherichia coli</i>) <i>Branhamella catarrhalis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (u novorozenců) atypické pneumonie: respirační viry (RS-virus, virus chřipky A, adenoviry) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> (u novorozenců)
		u oslabených jedinců	kromě pneumokoků, stafylokoků a hemofilů ještě enterobakterie (např. <i>Klebsiella pneumoniae</i>) a <i>Legionela pneumophila</i> ; u těžšího postižení imunity: <i>Pneumocystis jirovecii</i> cytomegalovirus atypická mykobakteria <i>Nocardia asteroides</i> aspergily, kandidy	
		po kontaktu se zvířaty	bronchopneumonie: <i>Pasteurella multocida</i> <i>Francisella tularensis</i> atypická pneumonie: <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Coxiella burnetii</i>	
	nosokomiální (podrobně v tab. 12.2.12)		enterobakterie gramnegativní nefermentující tyčinky (pseudomonády, acinetobaktery aj.) <i>Staphylococcus aureus</i> anaeroby <i>Legionela pneumophila</i>	
subakutní a chronické záněty plic			aspirační pneumonie a plicní abscesy: <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Bacteroides fragilis</i> peptokoky, peptostreptokoky plicní tuberkulóza: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ PŮVODCI INFEKČÍ DOLNÍCH CEST DÝCHACÍCH	
bronchitis acuta	viry chřipky A a B, adenoviry, viry parainfluenzy, RS-virus, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> sekundárně: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
bronchiolitis acuta	RS-virus, lidský metapneumovirus

Oční infekce

Od lehkých postižení spojivky nebo víčka, až po zrak ohrožující infekce rohovky, očního bulbu nebo očníce

Některé patogeny (pneumokoky, gonokoky, listerie, viry) proniknou i do neporučené spojivky a rohovky, většina agens se uplatní až po traumatu, a to i nepatrném (kontaktní čočky)

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ OČNÍ INFEKCE A JEJICH PŮVODCI	
zánět spojivky (conjunctivitis)	adenoviry (např. typ 3, 8, 19) enteroviry (coxsackievirus A24, enterovirus 70) virus herpes simplex <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Moraxella lacunata</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> (serotyp D až K) <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
zánět víčka (blepharitis)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Moraxella lacunata</i> virus herpes simplex
ječné zrno (hordeolum)	<i>Staphylococcus aureus</i>
zánět rohovky (keratitis)	virová keratitida: virus herpes simplex virus varicelly-zosteru adenoviry bakteriální keratitida (ulcus corneae): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (kontaktní čočky) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Bacillus cereus</i> mykotická pórůrazová keratitida: oportunně patogenní plísně rodů <i>Fusarium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pseudoallescheria</i> , kvasinky (rod <i>Candida</i>) parazitární keratitida: amoeba rodu <i>Acanthamoeba</i>

chronické keratokonjunktivitidy	<i>Chlamydia trachomatis</i> (serotyp A až C) <i>Staphylococcus aureus</i> netuberkulózní mykobakteria nokardie mykotické organismy
infekce slzního ústrojí	zánět slzní žlázy (dacryoadenitis): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> virus parotitidy zánět slzního kanálku (canaliculitis): hlavně grampozitivní anaeroby (<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Actinomyces israelii</i>) a aeroby (stafylokoky, streptokoky) zánět slzního vaku (dacryocystitis): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
endophthalmitis	koagulasanegativní stafylokoky <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Propionibacterium acnes</i> viridující streptokoky enterokoky <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Candida albicans</i> vláknité houby rodů <i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Curvularia</i> aj. <i>Toxoplasma gondii</i> larvy helmintů (<i>Onchocerca</i> , <i>Toxocara</i>)
chorioretinitidy	virové: cytomegalovirus virus herpes simplex virus varicelly-zosteru virus zarděnek (kongenitální retinopathie) bakteriální: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Treponema pallidum</i> mykotické: rody <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> parazitární: <i>Toxoplasma gondii</i> <i>cysticercus cellulosae</i> (<i>Taenia solium</i>) larva <i>Toxocara canis</i> a <i>Toxocara cati</i> červ <i>Loa loa</i>

Infekce ran

ETIOLOGIE RANNÝCH INFEKČÍ	
povrchová zranění	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> beta-hemolytické streptokoky skupin G, F, C aj. cizí tělisko v ráně: <i>Clostridium tetani</i>
těžká poranění (dopravní úrazy, válečná poranění)	klostridia anaerobních traumatóz (<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. histolyticum</i> aj.) <i>Clostridium tetani</i>
operační rány	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> koagulasanegativní stafylokoky (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) enterobakterie (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp.) anaeroby (<i>Bacteroides fragilis</i> , peptostreptokoky aj.)
Poranění utrpěná ve vodě	sladká voda: pseudomonády, aeromonády mořská voda: <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Mycobacterium marinum</i>
Poranění utrpěná v tropech	půdní nokardie (<i>Dermatophilus congolensis</i> , <i>Rhodococcus equi</i>) atypická mykobakteria (<i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i>) mikromycety (<i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)
popáleniny	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
pokousání	člověkem: příslušníci ústní mikroflóry <i>Staphylococcus aureus</i> zvířetem: <i>Pasteurella multocida</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i> <i>Spirillum minus</i> virus vztekliny
poranění po jiném kontaktu se zvířetem	<i>Francisella tularensis</i> <i>Bartonella henselae</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i>

Infekce měkkých tkání

ETIOLOGIE INFEKČÍ PODKOŽNÍ TKÁŇE A SVALŮ	
cellulitis	<i>Streptococcus pyogenes</i> vzácněji: <i>Staphylococcus aureus</i> klostridia peptostreptokoky u dětí ve tváři: <i>Haemophilus influenzae</i>
myositis	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> směs anaerobů a enterobakterií <i>Trichinella spiralis</i>

Artritidy

ETIOLOGIE ARTHRITID	
hnisavé artritidy	novorozenci: <i>Streptococcus agalactiae</i> enterobakterie <i>Staphylococcus aureus</i> kojenci: <i>Haemophilus influenzae</i> beta-hemolytické streptokoky (jiné než sk. B) enterobakterie starší děti: <i>Staphylococcus aureus</i> beta-hemolytické streptokoky (jiné než sk. B) <i>Neisseria meningitidis</i> dospělí: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
infikované kloubní náhrady	koagulasanegativní stafylokoky <i>Staphylococcus aureus</i> koryneformní bakterie (vč. anaerobního <i>Propionibacterium acnes</i>) vzácně pseudomonády a serratie
nehnisavé artritidy	během řady viróz v rekonvalescenci po nich po očkování

Osteomyelitidy

ETIOLOGIE OSTEOMYELITID	
akutní osteomyelitidy	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> vzácně: <i>Streptococcus pneumoniae</i> u dětí též: <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Salmonella Enteritidis</i> u novorozenců: <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> u imunodeficitů též oportunní plísňe, pseudomonády, nokardie
chronické osteomyelitidy	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>

Kožní infekce

SEKUNDÁRNÍ INFEKCE KOŽNÍCH LÉZÍ	
decubitus (proleženina), trofický vřed	flóra z okolního prostředí vč. endogenní flóry (stafylokoky, streptokoky, enterokoky, enterobakterie, pseudomonády, anaeroby, kvasinky)
infikované atheromy	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Propionibacterium acnes</i>
infikované intertrigo (opružení)	<i>Staphylococcus aureus</i> enterobakterie <i>Candida albicans</i>
sekundárně infikovaná poranění	viz tab. 12.2.6.1
sekundárně infikované dermatomykózy	<i>Streptococcus pyogenes</i>

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ PRIMÁRNÍ AKUTNÍ BAKTERIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ KŮŽE	
acne vulgaris	<i>Propionibacterium acnes</i>
carbunculus nuchae	<i>Staphylococcus aureus</i>
ecthyma gangraenosum	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
erysipelas (růže)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
erysipeloid (červenka)	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
erythema migrans	<i>Borrelia burgdorferi</i>
erythrasma	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
folliculitis	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
furunculosis (nežít)	<i>Staphylococcus aureus</i>
hidradenitis suppurativa	<i>Staphylococcus aureus</i>
impetigo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
lymphangoitis	<i>Streptococcus pyogenes</i>
sycosis barbae	<i>Staphylococcus aureus</i>

CHRONICKÉ BAKTERIÁLNÍ KOŽNÍ INFEKCE	
aktinomykóza	<i>Actinomyces israelii</i>
chronické podkožní abscesy	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Nocardia asteroides</i> <i>Rhodococcus equi</i>
kožní granulomy	<i>Mycobacterium marinum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>Mycobacterium leprae</i>
lepra (malomocenství)	<i>Mycobacterium leprae</i>
scrofuloderma	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>

KOŽNÍ PROJEVY SYSTÉMOVÝCH BAKTERIÁLNÍCH INFEKcí	
břišní tyf generalizovaná kapavka infekční endokarditida meningokokcémie spála stafylokokový syndrom opárené kůže (SSSS) syndrom toxického šoku syphilis	<i>Salmonella Typhi</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> viz tab. 12.2.2a třetí odstavec <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Treponema pallidum</i>

Sexuálně přenosné infekce

PŮVODCI KLASICKÝCH VENERICKÝCH NÁKAZ	
gonorrhoea (kapavka) syphilis (lues, příjice) ulcus molle (měkký vřed) granuloma inguinale (donovanosis) lymphogranuloma venereum	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Calymmatobacterium granulomatis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> serotyp L1, L2 a L3

Močové infekce

ETIOLOGIE MOČOVÝCH INFEKcí	
nekomplikované infekce močového traktu	cca 80% <i>Escherichia coli</i> cca 10% enterokoky (převážně <i>Enterococcus faecalis</i>) cca 5% <i>Proteus mirabilis</i> zbytek: ostatní enterobakterie (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> aj.) <i>Streptococcus agalactiae</i> koagulasanegativní stafylokoky (<i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> aj.) <i>Candida albicans</i>
komplikované infekce močového traktu	cca 80%: <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> ostatní enterobakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> enterokoky zbytek: <i>Serratia marcescens</i> , acinetobaktery, kandidy aj.

Infekční průjmy

ETIOLOGIE INFEKČNÍCH PRŮJMŮ	
bakteriální	<i>Campylobacter jejuni</i> Salmonella serotyp Enteritidis (>80 %) Typhimurium (<10%) Infantis (cca 2 %) Hadar, Agona, Saintpaul, Virchow, Newport, Montevideo aj. (<1%) <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenní (ETEC) enteropatogenní (EPEC) enterohemorhagická (EHEC) enteroinvasivní (EIEC) <i>Shigella sonnei</i>, zřídka <i>Shigella flexneri</i>, <i>Shigella boydii</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> u novorozenců též <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aj. v nemocnicích <i>Clostridium difficile</i>
	v cizině <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio cholerae</i> vzácněji <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas sobria</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Edwardsiella tarda</i> další halofilní vibria pravděpodobně i <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Morganella morganii</i> aj.
původci otrav z potravin	<i>Staphylococcus aureus</i> tvořící enterotoxin A a D <i>Bacillus cereus</i> tvořící emetický toxin <i>Clostridium botulinum</i> tvořící botulotoxin A, B a E <i>Clostridium perfringens</i> typ A

Nosokomiální infekce

ETIOLOGIE NOSOKOMIÁLNÍCH NÁKAZ	
močové infekce katetrizovaných nemocných (asi 40 %)	<i>Escherichia coli</i> ostatní enterobakterie enterokoky <i>Pseudomonas aeruginosa</i> jiné gramnegativní nefermentující tyčinky kandidy
hnisavé infekce operačních ran (asi 25 %)	<i>Staphylococcus aureus</i> koagulasanegativní stafylokoky <i>Streptococcus pyogenes</i> enterobakterie gramnegativní nefermentující tyčinky bakteroidy, prevotely, peptostreptokoky aj. <i>Clostridium perfringens</i>
respirační infekce (asi 20 %) <i>časné ventilátorové pneumonie</i> <i>pozdní ventilátorové pneumonie</i> <i>aspirační pneumonie</i> <i>jiné</i>	citlivé terénní kmeny: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> anaeroby: <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Veillonella parvula</i> rezistentní nemocniční kmeny: <i>Staphylococcus aureus oxacilinrezistentní (MRSA)</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Serratia marcescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> kandidy anaeroby enterobakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RS-virus (rod <i>Pneumovirus</i>) viry chřipky (<i>Influenzavirus A a B</i>) <i>Legionella pneumophila</i>
sepsě při zavedených i.v. katetrech (asi 10 %)	koagulasanegativní stafylokoky (>50%) <i>Staphylococcus aureus</i> enterobakterie (<i>Escherichia coli</i> , <i>klebsielly</i> , enterobaktery) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Candida</i> spp.

20. Mikroorganismy u zdravého člověka

Vztahy mezi organismy - symbióza

- Komenzalismus - komenzálovi přináší užitek, hostiteli neprospívá ani neškodí
- Mutualismus - oboustranný prospěšný vztah
- Parazitismus - parazit hostiteli škodí
 - přímo (faktory virulence)
 - ubíráním živin

Přirozená mikroflóra zdravého člověka

- kolonizuje místa komunikující s vnějším prostředím, liší se podle lokality, závisí na věku, výživě a okolním prostředí.
- význam
 - působí proti usídlení patogenů
 - stimuluje imunitní systém
 - tvorba některých vitaminů střevní mikroflórou
 - možný vznik endogenní infekce
 - translokace do míst fyziologicky sterilních (infekce močového traktu ...)
 - po léčbě širokospektrými antibiotiky k pomnožení rezistentních mikrobů (kvasinky...)

Kůže

Mikroflóra kůže

- Rezidentní
 - Aerobní
 - koagulasa-negativní stafylokoky (*S. epidermidis*)
 - *Corynebacterium* sp.
 - Anaerobní
 - propionibakterie (*P. acnes*) v ústí mazových žlázek
- Transientní
 - *S. aureus*, kvasinky, enterobakterie

Bariéry

- pokožka je suchá a stále se olupuje
- kyselé pH (kyselina mléčná) v ústí folikulů a potních žláz
- lysozym
- kožní maz, který obsahuje nenasycené mastné kyseliny, má slabé antiseptické vlastnosti
- vysoká koncentrace NaCl
- přítomnost keratinocytů (schopnost fagocytózy)
- v podkoží lymfocyty a buňky prezentující antigen

Respirační systém

Mikroflóra nosní sliznice

- Rezidentní
 - koagulasa-negativní stafylokoky (*S. epidermidis*)
 - *Corynebacterium* sp.
- Transientní
 - *Staphylococcus aureus* (vestibulum nasi)
 - *Haemophilus influenzae* (průduchy)
 - *Streptococcus pneumoniae* (průduchy)

Paranazální dutiny, Eustachova trubice

- sterilní

Mikroflóra nosohltanu

- Rezidentní
 - viridující streptokoky
 - *Neisseria* sp.
 - *Haemophilus* sp.
 - koagulasa-negativní stafylokoky ...
- Transientní
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Streptococcus pyogenes*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Haemophilus influenzae*
 - *Moraxella catarrhalis*
 - *Neisseria meningitidis*
 - čeled' *Enterobacteriaceae*
 - kvasinky (*Candida* sp.) ...

Další partie dýchacího traktu

- nejsou fyziologicky osídleny, možný výskyt přechodné mikroflóry.
- čím nižší části, tím chudší mikroflóra.
- malé bronchy prakticky sterilní – pokud mikrobi proniknou do plic, makrofágy je intenzivně odstraňují - cílem sterilita plic

Další bariéry dýchacího traktu

- chloupky v dutině nosní
- profilovaný povrch dutiny nosní, ohyb nosohltanu
- zvlhčování vdechovaného vzduchu nosní sliznicí
- vrstva hlenu na sliznicích

- řasinkový epitel
- slizniční imunitní systém
- alveolární makrofágy
- kýchání, kašlání

Speciální smysly

Oko - spojivka

- většinou sterilní
- mohou být
 - koagulasa-negativní stafylokoky
 - korynebakterie
- méně často přechodně
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - bakterie nosohltanu – *Haemophilus* sp., *Neisseria* sp., viridující streptokoky

Bariéry

- oplachování slzami a mžikání
- v slzách lysozym, laktoferin (váže Fe), IgA

Ucho

- nejčastěji koag. neg. Stafylokoky

Trávicí systém

Dutina ústní

- Aerobní rody
 - *Streptococcus* sp. (viridující a anhemolytické)
 - *S. salivarius*– sliny, jazyk, sliznice
 - *S. sanguis*, *S. mitis*–povrch zubů ...
 - *Neisseria* sp.
 - *Staphylococcus* sp.
 - *Corynebacterium* sp.
 - *Haemophilus* sp.
- Anaerobní rody
 - *Lactobacillus*
 - *Actinomyces*
 - *Peptostreptococcus*
 - *Veillonella*
 - *Fusobacterium*
 - *Bacteroides*

- Treponema
 - Prevotella ...
 - převládají pod jazykem, gingiválních chobotech, tonzilárních kryptách ...
- vzájemné zastoupení se liší podle lokality v dutině ústní, podle věku a stavu chrupu

Bariéry v dutině ústní

- proud slin
- ve slinách antibakteriálně
 - lysozym
 - laktoferin
 - rhodanid
 - IgA
- polykání
- slizniční imunitní systém (MALT)

Žaludek

- Občas rody
 - Lactobacillus
 - Enterococcus
 - Candida
 - Helicobacter pylori nelze považovat za fyziologickou mikroflóru

Bariéry žaludku

- kyselé pH
- přítomnost pepsinu

Tenké střevo

- většinou sterilní, občas enterobakterie, enterokoky

Bariéry

- většinou sterilní, občas enterobakterie, enterokoky
- trypsin a žlučové soli v duodenu
- odlučování epitelí
- tvorba hlenu
- lysozym a antibakteriální peptidy
- rychlejší pasáž střevní tekutiny
- slizniční imunitní systém

Tlusté střevo

- Aerobní rody (1 %)
 - Escherichia coli
 - Enterococcus sp.
 - a další především z čeledi Enterobacteriaceae ...
- Anaerobní rody (99 %)
 - Bifidobacterium
 - Eubacterium
 - Peptostreptococcus
 - Bacteroides
 - Clostridium ...
- z dalších kandidy, prvoci (Endolimax nana...)
- u kojenců kojených – Bifidobacterium sp.
- s umělou výživou – Lactobacillus sp.

Urogenitální trakt

Močový systém

- sterilní (osídleno pouze zevní ústí uretry - kožní, případně střevní mikroflórou)

Bariéry

- svěrač močové trubice
- proud moče
- pH moči
- u muže prostatické sekrety (antibakteriální spermin)
- ženská trubice kratší, proto infekce střevními bakteriemi častější

Vagina

- Kvalita mikroflóry závisí na hladině estrogenů, na obsahu glykogenu v epiteliích vaginální sliznice.
- Novorozenec – v prvních dnech života, pod vlivem estrogenů matky – laktobacily (směs několika druhů = Döderleinův bacil)
- Dětský věk – po vymizení mateřských estrogenů alkalizace poševního sekretu (až do puberty)
- Dospělá žena
 - Lactobacillus sp. (L. acidophilus...) od puberty až do přechodu
 - fermentují glykogen epiteli na kys. mléčnou – snížení pH (kolem 4,5) → obrana proti patogenům
 - růst v biofilmu
 - v malém množství mohou být přítomny enterokoky, gardnerely, koaguláza negativní stafylokoky, kvasinky

Plod

- vyvíjí se v děloze matky ve sterilních podmínkách
- možná transplacentární infekce
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Treponema pallidum*
 - virus rubeoly
 - cytomegalický virus (CMV)
 - *Toxoplasma gondii*.
- při porodu
 - tvoří se fyziologická flóra, dochází k osídlení kůže a sliznic, u novorozence dochází ke kolonizaci dýchacích cest a polykáním zažívacích cest.

Kojenec

- kůže je osídlena koaguláza negativními stafylokoky do 24 hod.
- smolka je sterilní
- kojením
 - *Lactobacillus bifidus* → kyselá reakce zažívacího traktu brání invazi patogenů.
- při umělé výživě
 - pronikání enterokoků a enterobakterií
 - při náhlém a masivním osídlení těmito bakteriemi dochází ke kojeneckým dyspepsiím (*Escherichia coli* O26, O55, O111).

Význam fyziologické flóry

- Pozitivní dopad fyziologické flóry
 - antagonistickými účinky brání pomnožení patogenních mikrobů -nepatogenní *Escherichia coli*
 - stimuluje imunitní aparát
 - tvoří vitaminy
- Negativní dopad fyziologické flóry
 - mimo svou fyziologickou oblast (výskyt) mohou být bakterie z GIT patogenní
 - mohou vyvolat endogenní nákazu
 - po aplikaci hlavně širokospektrých antibiotik může dojít k poruše mikrobiální rovnováhy → dysmikrobie

21. Endogenní a exogenní infekce

- endogenní infekce: pochází z mikrobiálního rezervoáru nemocného
- exogenní infekce: infekční agens je ze zdroje mimo mikrobiální rezervoár nemocného, přenos zejm. rukama, přístroji, pomůckami
- kolonizace x infekce:
 - kolonizace - přítomnost množících se mikroorganismů bez reakce hostitele nebo známek infekce
 - infekce - zánětlivá odpověď na přítomnost mikroorganismů nebo jejich invaze do fyziologicky sterilních tkání

Endogenní infekce

- v patogenezi se pravidelně uplatňují mikrobi přirozené mikroflóry (fakultativně patogenní)
- při infekci se jejich počet značně zvýší nebo působí na neobvyklém místě
- nejsou nakažlivé, není prokazatelná inkubační doba
- sklon k chronicitě (je potlačen vznik specifické imunity)
- vznikají při celkovém nebo lokálním oslabení hostitele (fyziologická rovnováha je porušena)
 - jiným onemocněním (nádorem, AIDS, poraněním střeva ...)
 - podáváním léků (antibiotik, imunosupresiv, cytostatik ...)
 - těžkými invazivními zákroky

Enterobakterie střevní mikroflóry

- v GIT patogenní výjimečně - při hrubém porušení rovnováhy střevní mikroflóry
- většinou onemocnění extraintestinální
 - močového traktu (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*)
 - sepse (*E. coli*, *rody Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*)
 - meningitidy (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*)

Pseudomembranózní enterokolitida

- může vzniknout po potlačení fyziologické střevní mikroflóry při léčbě širokospektrými antibiotiky
- agens *Clostridium difficile* produkující toxiny
- vzniká těžký zánět s pablánami, po jejich odloučení eroze až vředy, komplikace toxické megacolon (paralytický ileus s mohutným rozpětím střeva) a možnou perforací
- lokální příznaky – stolice průjmovitá, později s hlenem, krví, kousky sliznice, intenzivní bolest břicha
- celkové příznaky – horečka, dehydratace s hypotenzí až šokem
- kauzální léčba – vankomycin nebo metronidazol p.o.

Nekrotizující toxiinfekce měkkých tkání a nitrobřišních orgánů obsahujících svalovinu

- histotoxické klostridie (*C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. difficile*)
- viscerální plynatá sněť
- sepse
 - při poruše střevní pasáže spojené s místní nedokrevností
 - při tlaku nádoru nebo kaménku
 - při poranění nebo operaci na střevě

Mikrobi dutiny ústní

- Plaut-Vincentova angína
- gingivitis ulcerosa
- noma
 - etiologicky fusobakterie a ústní spirochety
 - gangrenózní rozpad tkáně
 - výskyt dnes vzácný (tropické oblasti), spojený s celkovým oslabením organismu hladověním
- zubní kaz
 - kariogenní streptokoky (*S. mutans*...)

Endocarditis lenta

- etiologicky především *Streptococcus sp.* (viridující a anhemolytická skupina)
- průnik do krve (invazivní zákroky v oblasti orofaryngeální)
- disponování jedinci s poškozenými chlopněmi (např. po revmatické horečce ...)

Aktinomykóza

- etiologicky *Actinomyces sp.* (*A. israelii*, *A. naeslundii*), součást fyziologické mikroflóry zejména dutiny ústní
- pleomorfní G+ bakterie tvořící větvená vlákna, častý rozpad na kokovité nebo kokobacilární útvary, obsahují peptidoglykan a kyseliny mykolové
- kultivace dlouhá (až 10 dní i více), anaerobní s CO₂
- formy – cervikofaciální, thorakální, abdominální, genitální (dělohy)
- průběh
 - chronický granulomatózní proces, progresivní charakter, pomalý a plíživý průběh
 - typické mnohočetné abscesy, píštěle, prknovité a nebolestivé infiltráty, jizvení
 - hnis s obsahem drúz (zrníčkovité shluky bakterií)
 - aktinomykóza dělohy v souvislosti s nitroděložním tělískem
- laboratorní průkaz – mikroskopie, kultivace
- léčba
 - penicilin (často v megadávkách)
 - možný doxycyklin, linkomycin, klindamycin (při alergii na penicilin, déletrvající léčbě)
 - často současný chirurgický zákrok
 - odstranění nitroděložního tělíska

Kandidóza

- u imunokompromitovaných (nádory, cukrovka, neutropenie ...)
- při léčbě kortikosteroidy, imunosupresivy, cytostatiky ...
- při léčbě antibiotiky (zejména širokospektrými)
- formy
 - mukokutánní (soor u novorozenců, AIDS, vaginální forma, kvasná dyspepsie, zánět kůže v místech vlhké zapádky, onychomykóza, u hematologických pacientů)
 - systémová (cystitida, endokarditida)

Exogenní infekce

- jak bude infekce probíhat, jaký bude mít rozsah, jaké projevy a jaký bude konečný výsledek závisí od obou účastníků infekčního procesu:
 - ze strany mikroba:
 - 1. patogenita mikroba
 - 2. virulence konkrétního kmene
 - 3. infekční dávka čili počet mikrobů
 - ze strany makroorganismu:
 - 1. vnímavost, respektive rezistence napadeného hostitele jako druhu
 - 2. stupeň nespecifické odolnosti napadeného jedince
 - 3. přítomnost, resp. kvalita jeho specifické imunity

Mikrobiální vlivy

- 1. Patogenita
 - primární (obligátní) patogeny - vyvolávají infekce u normálního hostitele s neporušenou nespecifickou odolností (klasické infekce - břišní tyf, chřipka, tuberkulóza, exantematické virózy a mnohé další)
 - fakultativní (oportunní) patogeny - se uplatní jen za jistých podmínek, obvykle je-li obrana nějakým způsobem narušena (většina infekcí endogenního původu vyvolaná příslušníky normální flóry apod.)
- 2. Virulence
 - u různých kmenů se vyskytují v různé míře, čímž se tyto kmeny projevují jako různě virulentní
- 3. Infekční dávka
 - určuje především, zda se infekce vůbec rozvine, jak rychle bude postupovat, jakých forem nabude a jaký bude její výsledek.
 - u shigel několik desítek až stovek bakterií; u salmonel cca 10^8 mikrobiálních buněk

Vlivy ze strany hostitele

- 1. Vnímavost hostitele jako druhu
 - druhů patogenních pouze pro člověka je málo, specializovanější na hostitele se jeví viry.
 - z bakterií příkladem patogenů čistě jen humánních jsou shigely a původci většiny nákaz přenášených pohlavním stykem.
- 2. Stupeň nespecifické (vrozené) odolnosti jedince
 - je nejdůležitějším faktorem, který rozhoduje, zda se jako určití jedinci nakazíme a jak to s námi dopadne.
 - roli hraje celková zdatnost a zdravý způsob života, důležitější se ale jeví faktory genetické.
 - další důležité faktory - věk, výživa, stres, jiná onemocnění a okolnosti psychické a sociální
- 3. Specifická (získaná) imunita
 - záleží na tom, zda se jedinec s příslušným agens již setkal nebo nikoli.
 - při prvním setkání se musí rozběhnout celá primární imunitní reakce, trvá zhruba 10 dnů, než hladina protilátek dosáhne účinné výšky
 - při opakovaném setkání s antigeny infekčního agens v organismu koluje dostatečný počet paměťových buněk – rozvoj sekundární imunitní reakce již během několika dnů

Vliv prostředí a vstupní brány

- prostředí ovlivňuje jak mikroby, tak makroorganismus
- šíření infekcí značně závisí na podnebí, u mnoha chorob epidemiologie popisuje charakteristické sezónní výkyvy (v zimě častější respirační infekce, v létě průjmý)
- odolnost vůči nachlazení je nejnižší, nikoli když mrzne, ale když se okolní teplota snižuje za relativně stoupající vzdušné vlhkosti (snáze se nachladíme za sychravého počasí než za třeskutého mrazu)
- zaprášení plic u horníků (pneumokoniosa uhlokopů) snižuje jejich odolnost vůči tuberkulóze.
- charakter vstupní brány infekce:
 - mor, anthrax či tularémie mají lepší prognózu, přejdou-li příslušná agens do organismu kůží, než vstoupí-li infekce plícemi
 - jinak probíhá tularémie, pronikne-li francisela při stahování přejetého zajíce do kůže (zdravý zajíc se obvykle přejet nenechá) - výsledkem je ulceroglandulární forma tularémie s dobrou prognózou – a zcela jinak, dostane-li se do střeva s vodou ze studánky kontaminované uhynulým hlodavcem – zde vznikne daleko nebezpečnější tyfoidní forma tularémie.

Průběh a formy infekce

Průběh infekce

- v průběhu infekčního onemocnění rozeznáváme několik etap či období
 - inkubační dobu
 - prodromy
 - typický syndrom dané choroby
 - rekonvalescenci
- inkubační doba - počítá se od okamžiku vniknutí původce nákazy do organismu hostitele do prvních příznaků nemoci. Krátkou inkubační dobou se vyznačují akutní průjemová a respirační onemocnění (salmonelózy obvykle 12–36 hodin, chřipka 1-2 dny), dlouhou inkubační dobu mají například tuberkulóza (2-8 týdnů) a některá virová onemocnění jako vzteklna (rovněž 2-8 týdnů), hepatitida B (90-100 dnů), AIDS (léta).
- prodromální příznaky - mohou trvat několik hodin až dnů, mnohdy však zcela chybí. Vyznačují se nespecifickými symptomy, svědčícími, že došlo k poruše zdraví (zvýšená teplota, bolesti hlavy, nevolnost, slabost, pocit nemoci apod.).
- typický syndrom infekční nemoci - obvykle plynule navazuje na prodromy, někdy jej však od nich odděluje krátké období zdánlivého zlepšení potíží. Podle trvání rozeznáváme infekce akutní, subakutní a chronické
- rekonvalescence – začíná ústupem klinických potíží. Končí normalizací klinických a některých laboratorních nálezů (jaterní testy, sedimentace). Mýlně se někdy čeká na pokles titru protilátek – zvýšení hladiny protilátek po infekci je normální, nelze je považovat za poruchu či za patologický nález. Rekonvalescence může trvat i několik měsíců.
- relaps - pokud během rekonvalescence vzplane nemoc znovu
- recidiva - rovněž jako relaps je vyvolána tímtež původcem, který zůstává v těle, ale dochází k ní až po uzdravení
- reinfeke - opakovaná infekce zvenčí při nedostatečné imunitě
- superinfekce - další nákaza vyvolaná jiným typem mikroba nasedající na infekci původní

Infekce inaparentní a manifestní

- infekce bezpříznaková neboli inaparentní – buď nedojde ani k pomnožení mikroba a tedy ani k infekci, nebo se sice začne rozvíjet, ale imunita proces zastaví dříve, než dojde k většímu poškození. Taková infekce se neprojeví žádnými příznaky. Jediným důsledkem bude objevení se protilátek nebo - po opakovaném kontaktu - zvýšením jejich titru.
- manifestní infekce - dosáhne-li poškození organismu při infekci určité výše a projeví se chorobnými příznaky.
 - subklinická forma - příznaky zcela necharakteristické, z nichž nepoznáme, o jakou infekci vlastně jde (podobné jako u prodromů)
 - typicky probíhající - infekce se všemi vyjádřenými příznaky jako z učebnice

Infekce lokální, systémové a generalizované

- lokální infekce - bývá omezena na místo vstupu, nanejvýš na regionální uzliny, případně na určitý orgán. Typickou lokální infekcí je rhinovirová rýma omezená na sliznici nosu, případně nosohltanu, kožní infekce - dermatomykózy nebo bradavice, nekomplikovaná kapavka, orgánový absces. Rovněž po podání některých atenuovaných vakcín (BCG-vakcína) dochází vlastně v místě podání k lokální infekci.
- fokální infekce - infekční proces omezený na určité ložisko (fokus) a projevující se příznaky ve zcela jiné oblasti. Jako příklad se uvádí revmatická horečka (postižení srdce, ledvin a kloubů) jako pozdní následek infekce tonzil pyogenním streptokokem. Mohly by sem patřit též sterilní kožní léze (mykidy) například na dlaních, kdy infekčním fokusem je dermatomykóza meziprstních prostorů na nohou.
- systémová infekce - postihne-li celý systém nebo jeho podstatnou část. Systémovými nákazami jsou například chřipka, plicní forma tularémie, plicní tuberkulóza, kapavčitá adnexitida, meningitida, rozsáhlé pyodermie, pyelonefritida vznikající ascendentně z cystitidy apod.
- generalizované infekce - probíhají tak některé infekce zcela pravidelně (břišní tyf, skvrnivka), jiné se mohou generalizovat jen za určitých podmínek (anthrax po nešťastném chirurgickém zásahu, salmonelóza u kojence, stafylokoková nebo streptokoková sepsis po poranění, kolibacilární sepsis jako komplikace cystitidy nebo cholecystitidy)

Infekce akutní, subakutní a chronické

- akutní - trvají dny (salmonelózy, rýma) až týdny (většina)
- subakutní - měsíce (zpomalený průběh může být prostou komplikací jakékoli infekce, nebo je pravidlem - subakutní bakteriální endokarditida)
- chronické - trvají roky
- fulminantní - neobvykle prudce probíhající infekce (např. meningokoková sepsis) (lat. fulmineus, bleskový)

Infekce perzistentní a latentní

- u bezpříznakových chronických infekcí
- infekce perzistentní - agens přetrvávající v organismu lze prokázat běžnými způsoby (kongenitální cytomegalie, hepatitida B)
- latentní - agens se v těle skrývá v neinfekční formě a běžné postupy, například kultivace, se k jeho průkazu nehodí (infekce ganglií virem herpes simplex, HSV, nebo virem varicelly-zosteru, VZV). Vzácně se tu užívá neurčitý termín infekce skrytá čili okultní.
- perzistentní a latentní infekce je známkou selhání obranyschopnosti, která nedovedla agens zlikvidovat a dospěla jen k určitému stavu příměří.
- snížení odolnosti hostitele může kteroukoli perzistentní či latentní infekci aktivovat –
 - oslunění, úlek, hormonální vlivy, jiná infekce mohou aktivovat virus herpes simplex.
 - po aktivaci infekce virem planých neštovic (varicelly) vzniká pásový opar, herpes zoster.
 - aktivací infekce původcem skvrnivky (Rickettsia prowazekii) je choroba Brillouva-Zinsserova.

22. Sterilizace

Základní pojmy

- kontaminace = osídlení (znečištění) předmětu mikroorganismy
- sterilizace = odstranění všech mikroorganismů z předmětu nebo prostředí
- dezinfekce = přerušení cesty šíření nákazy – odstranění původců infekce
- antiseptice = likvidace mikroorganismů na živých tkáních (pokožce, ranách, sliznicích)
- aseptice = preventivní opatření s cílem zabránit kontaktu živých tkání a mikroorganismů
- asanace = soubor opatření bránící přenosu u infekčních nákaz od zdroje k vnímavému jedinci
 - dezinfekce, sterilizace = usmrcení mikroorganismů
 - dezinsekce = usmrcení škodlivého hmyzu a členovců
 - deratizace = usmrcení obratlovců
- nozokomiální nákazy = onemocnění infekčního původu s příčinnou souvislostí s hospitalizací nebo zdravotnickým zákrokem

Sterilizace

- postup zajišťující zničení všech mikroorganismů včetně spor, hub a vajíček červů
- cílem je zajistit úroveň bezpečné sterility 10^{-6} - pravděpodobnost výskytu nesterilních předmětů menší než jedna miliontina
- provádí se podle zásad zakotvených v zákonech a vyhláškách MZ ČR, používané postupy a prostředky musí být schváleny hlavním hygienikem ČR
- používají se převážně fyzikální metody

Postup sterilizace

1. předsterilizační příprava
 - omytí, dezinfekce, oplach, osušení a kontrola sterilizovaného předmětu, opatření vhodnými obaly
 - na její kvalitě závisí úspěšnost dalších postupů (např. přítomnost bílkovin zhoršuje dostupnost mikroorganismů pro dezinfekční a sterilizační procesy)
 - dezinfekční prostředky – musí mít současný dezinfekční, čisticí a protikorozivní účinek, nesmí koagulovat bílkoviny
2. vlastní sterilizace
3. kontrola materiálů a testů, uložení, expedice
 - kontrola účinnosti sterilizačních přístrojů
 - kontrola sterilizačního cyklu, monitorování a validace sterilizace
 - účinnost sterilizačních přístrojů a sterilizace
 - přístroje se v pravidelných intervalech validují - prověřuje se jejich správná činnost a správnost údajů zabudovaných měřicích aparatur
 - kontrola sterility materiálu
 - odběr za aseptických podmínek
 - způsoby odběru – oplach, stěr, otisk, vložení předmětu přímo do kultivační půdy

Metody sterilizace

I. TEPLO

1) Plamen

- Sterilizace bakteriologické kličky v plameni, spalování drobných předmětů ve spalovacích pecích - u virulentních nákaz, likvidace infikovaných pokusných zvířat, obvazů a biologického materiálu ze zdravotnických zařízení

2) Horký vzduch

- využívá se teplot mezi 160°C- 180°C, s nucenou cirkulací vzduchu po dobu 20-60 min.
- mechanismus účinku: denaturace bílkovin. Prakticky všechny nesporeující mikroby jsou při teplotě 180°C zabity do 5 min, spory se zničí při teplotě 180°C do 15 min.
- výhoda: horkovzdušné sterilizátory jsou poměrně levné
- nevýhoda: sterilizace omezena pouze na předměty z odolných materiálů (sklo, porcelán) a na termostabilní látky neobsahující vodu (tuky, oleje, vosky, glycerin...). Kovové nástroje ztrácejí opakovanou horkovzdušnou sterilizací tvrdost a tupí se.

3) Pára pod tlakem

- teplota vodní páry stoupá téměř lineárně s jejím tlakem.
- při tlaku 2 atmosfér má pára teplotu 121°C, při tlaku 3 atmosfér cca 134°C (pozn. princip Papinova tlakového hrnce).
- přístroj určený ke sterilizaci parou pod tlakem se nazývá parní sterilizátor neboli autokláv.
- mechanismus účinku: při styku s chladnějším předmětem pára kondenzuje na vodu a přitom předá ohromné množství výparného tepla. To usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán.
- protože v případě páry se jedná o tzv. vlhké teplo, je jeho působení na mikroorganismy daleko účinnější než v případě suchého tepla. Proto jsou předepsané expoziční doby při autoklávování daleko kratší než při horkovzdušné sterilizaci
- použití páry za zvýšeného tlaku je z praktického hlediska nejspolehlivější a poměrně i ekonomický sterilizační postup.
- autoklávovat lze kov, sklo, porcelán, obvazový materiál, prádlo, některé roztoky, poměrně málo druhů plastů; gumové předměty pouze pokud se navzájem nedotýkají

4) Proudící pára

- proudící pára za normálního tlaku má teplotu 100°C
- příprava některých mikrobiologických kultivačních půd nebo lékařských substancí;
- přístroj k tomu určený se nazývá Arnoldův přístroj nebo Kochův hrnec.
- z hlediska sterilizace se jedná o postup nedostačující.

5) Var

- stejně jako metoda proudící páry je pro sterilizaci nedostačující
- spory *Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani* mu odolávají až 5 i více hodin, viru hepatitidy B může odolávat více než 30 minut.

6) Frakcionovaná sterilizace

- vhodná ke zničení spor v termolabilních roztocích, které nelze autoklávovat
- jedná se o trojnásobné opakované zahřívání na 100°C po dobu 30 min. proložené inkubací při 37°C přes noc.
- předpokládá se, že první zahřátí zničí vegetativní formy mikrobů, přítomné spory pak při 37°C vyklíčí, vzniklé vegetativní buňky se zlikvidují dalším zahřátím a případné zbylé spory zmizí po druhé inkubaci třetím zahřátím.

7) Pasteurizace

- tepelné technologické postupy sloužící ke snížení počtu mikrobů v potravinách a nápojích (pivo, víno, mléčné výrobky)
- rozeznáváme pasteurizaci:
 - dlouhodobou- půlhodinové zahřátí na teplotu cca 62°C
 - krátkodobou- zahřátí po dobu 15-20 sek. na teplotu 72-75°C
 - mžikové zahřátí na 85°C

8) Tyndalizace

- užívá se u extrémně termolabilních roztoků.
- postup je obdobný frakcionované sterilizaci, ale zahřívá se až šestkrát a na nižší teploty (60 °C)

II. ZÁŘENÍ A VLNĚNÍ

1) UV záření

- v praxi se příliš neuplatňuje. Lze užít k doplňkové dezinfekci či dekontaminaci relativně čistých a prázdných pracovních ploch a v bezpečnostních boxech či aseptických provozech.
- nevýhody: Neproniká do hloubky, dosah mikrobicidního působení UV- paprsků je poměrně malý (30-50 cm). Účinnost germicidních zářičů klesá s časem

2) Infračervené záření

- působí baktericidně svým tepelným účinkem

3) Ionizační záření

- k tzv. radiační sterilizaci se využívá pronikavého gama-záření v dávce minimálně 25 kGy (gray), například z radioizotopu ⁶⁰Co.
- výhodou ionizačního záření je, že proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem.
- nevýhody: Některé typy virů přežívají působení radiačního záření (HBV, HIV), materiály se před radiační sterilizací dezinfikují např. parami Persterilu.
- ionizačním zářením lze sterilizovat jen nepatrně kontaminované předměty, jako jsou právě vyrobené zdravotnické potřeby pro jedno použití (kanyly, injekční stříkačky, obvazy, šicí materiál, některá léčiva a transplantáty); použité materiály nelze již tímto způsobem sterilizovat.

4) Ultrazvuk

- čištění dutých nástrojů (např. jehel) před vlastní sterilizací.

III. PLAZMA

- využití nízkoteplotního plazmatu
- ve sterilizační komoře se nejprve vytvoří vakuum, v němž se nechá odpařit vhodná chemikálie (peroxid vodíku nebo kyselina peroctová).
- pak se pomocí energie vysokofrekvenčních vln molekuly plynu v komoře rozloží na vysoce reaktivní částice.
- tento fyzikální stav plynu se označuje jako nízkoteplotní plazma.
- částice plazmatu reagují s molekulami organických látek, tyto látky se rozkládají a usmrcují tak mikroorganismy.
- plazmatem se dá sterilizovat většina lékařských nástrojů a pomůcek, aniž se poškodí. Teplota přitom nepřevyší 50°C.
- vhodné - sterilizace většiny lékařských nástrojů z plastů i kovů
- nevhodné - porézní materiál, materiály snášející vysoké teploty nebo obsahujících celulózu (bavlna, papír, prádlo, gáza, dřevo...)

IV. FILTRACE

- definovaná velikosti pórů (0,22 μm)
- roztoky obsahující termolabilní složky, vzduch
- nepoužívané membránové filtry (z nitrocelulózy), dříve porcelánové, skleněné, azbestové
- filtrací se sterilizují (resp. dekontaminují) termolabilní složky některých kultivačních půd (sérum, kvasničný extrakt, roztoky sacharidů), média pro tkáňové kultury a především mnohá léčiva. Velmi rozšířené je filtrování mikrobů ve vodárenství a potravinářském průmyslu.
- příkladem filtrace vzduchu je používání chirurgické masky (obličejové roušky), vatové zátky kultivačních nádobek.
- nejspolehlivějším systémem filtrace vzduchu jsou tzv. HEPA- filtry (high efficiency particule air filters), které jsou schopny odstranit až 99,97% částic o velikosti 0,3 μm . HEPAfiltry se užívají např. v laminárních bezpečnostních boxech, které jsou určeny pro práci s materiálem o vyšším stupni infekčnosti (sputum)

V. CHEMICKÁ

- pro termolabilní materiál, který nelze sterilizovat fyzikálními způsoby (nesnesou vyšší teplotu)
- médiem jsou plyny předepsaného složení, koncentrace, tlaku a teploty

1) sterilizace formaldehydem

- působení plynné směsi formaldehydu s vodní párou v paroformalinové komoře při teplotě do 80°C a podtlaku až 90 kPa
- vhodné např. pro některé druhy textilu

2) sterilizace etylénoxidem

- páry etylénoxidu za podtlaku či přetlaku, 37°C nebo 55°C, relativní vlhkost 55 -85%
- etylenoxid - prudký protoplasmatický jed
- vhodné např. pro plasty, pryž, optiku, ostré nástroje, papír i porézní materiály (peří, molitan, matrace)

23. Dezinfekce

1.OXIDAČNÍ ČINIDLA

- většina odštěpuje atomární kyslík, který porušuje molekulární vazby a tak pravděpodobně nevratně inaktivuje enzymy.
- většinou velmi účinné a univerzální - působí nejen na vegetativní formy bakterií, ale i na spory a na neobalené viry.
- působí rovněž jako výborné látky dezodorizační (odstraňují zápach)
- nevýhoda - jejich účinek výrazně snižuje přítomnost bílkovin.

Peroxosloučeniny

- kyselina peroctová (peroxooctová) - vyrábí se pod názvem Persteril
- účinkuje poměrně rychle a spolehlivě
- povrch předmětu ponořeného do 2,5% Persterilu lze už za 1min považovat za sterilní
- 0,7-1% - k běžné povrchové dezinfekci
- 0,2-0,5% - k hygienické dezinfekci rukou
- 0,5-0,7% - k chirurgické dezinfekci
- nízká stabilita Persterilu při vyšší teplotě, na světle a při styku s kovy.
- Persteril nemá žádný reziduální ani penetrační účinek, tzn. působí jen krátce a na povrchu předmětu
- roztoky a páry Persterilu silně korodují kovy

Ozon

- účinkuje i za chladu, ale jen v relativně čistém prostředí, proto se v praxi používá hlavně k dezinfekci vody, jak pitné, tak v bazénech.
- dobře ničí prvoky a jejich cysty (lamblie, kryptosporidia)

Peroxid vodíku

- účinkuje cestou volných hydroxylových radikálů.
- v podobě 3% roztoku slouží jako antiseptikum, případně desodorans hnisavých ran. Koncentrovanější roztoky dráždí a leptají.
- i když působí i na viry a spory, k dezinfekci předmětů se pro svou labilitu příliš nehodí, slouží spíše k odstranění nečistot z ran.
- zdá se, že peroxid vodíku dobře rozrušuje biofilm

Manganistan draselný

- zředěné roztoky hypermanganu (0,1%) se užívají ke koupelím, výplachům a ke kloktání.
- pozitivní účinek při léčbě kožních onemocnění.
- hypermangan údajně působí dobře na viry

Superoxidovaná voda

- elektrolýzou vodných roztoků ve speciálních přístrojích vznikají mikrobicidně účinné radikály.
- výsledný produkt se označuje jako superoxidová voda (Sterilox).

2.HALOGENY

- nejdůležitější účinek zejm. chloru je založen na oxidačních procesech, takže by je bylo možné řadit i mezi oxidační činidla, jod však působí přímo na buněčné bílkoviny
- účinek rychlý a univerzální, snižuje ho ale přítomnost organických látek v prostředí.

Chlor a jeho deriváty

- **chlor**
 - se užívá k dezinfekci pitné vody i odpadních vod.
 - účinek všech chlorových preparátů se zrychluje přidáním amonných solí (aktivace chlorových přípravků).
 - železo účinek chlorových preparátů snižuje a zároveň je jimi korodováno.
- **chlornany (hypochlority)**
 - levné dezinfekční prostředky určené k hrubé dezinfekci
 - chlorové vápno - užívá se k dezinfekci např. výkalů žump nebo stájí
 - chlornan sodný (SAVO) - užívá se mimo jiné jako bělicí prostředek, tvoří složku Dakinova roztoku dříve často užívaného k rychlé sterilizaci chirurgických nástrojů.
- **chloraminy**
 - patří k nejběžnějším dezinfekčním prostředkům
 - jejich účinek je univerzální, likvidují i neobalené viry.
 - k běžné dezinfekci povrchů se chloramin B užívá v koncentraci 2%.
 - spory a zejména pak mykobakteria vyžadují vyšší koncentrace - obvykle 5%
 - ruce dezinfikujeme 0,2-0,5% roztokem po dobu 2-3 min.
- **dichlorisokyanurát sodný** (preparát Dikonit)
 - obsahuje velké množství aktivního chloru.
 - používá se v nižších koncentracích než chloramin, přesto působí rychleji a dobře zasahuje i mykobakteria.
- **oxid chloričitý** (přípravek Tristel)
 - patří k nově zkoušeným prostředkům, které jsou určeny k dezinfekci nástrojů.
 - má mít rychlý a univerzální účinek

Jodové preparáty

- ojedinělé postavení mezi dezinfekčními přípravky spočívá v jeho intenzivním a především rychlém působení na všechny mikroorganismy při celkem nízké toxicitě.
- nevýhodou je poměrně malá rozpustnost jodu ve vodě.

- **Lugolův roztok**
 - obsahuje kromě jodu ještě jodid draselný
 - ke Gramovu barvení se užívá Solutio Lugol diluta, celkem nepatrné dezinfekční účinnosti. Doporučuje se však požití ji při nechtěném proniknutí infekčního materiálu v laboratoři do úst.
 - lékopisná Solutio iodi aquosa obsahuje 1% I a 2,5% KI.
 - Solutio iodi glycerosa s vyšším obsahem KI se užívá k ošetření sliznic.
- **jodová tinktura**
 - rovněž obsahuje kromě jodu ještě jodid draselný
 - lékopis předpisuje Solutio iodi spiritiosa (lihový roztok jodu) s 6,5% jodu a 2,5% KI.
 - patří mezi nejspolehlivější kožní antiseptika, protože velmi rychle zabíjí mikroby a snadno proniká kůží do hloubky.
 - případné kožní reakce na jodovou tinkturu u citlivějších jedinců se většinou mylně považují za alergické; spíše však jde o podráždění až poleptání pokožky starými, exspirovanými roztoky, v nichž se po vyprchání alkoholu neúnosně zvýšila koncentrace jodu.
- **jodofory** - organické sloučeniny jodu
 - jod je v nich vázán na vysokomolekulární povrchově aktivní sloučeniny, které svými vlastnostmi zvyšují dezinfekční účinek jodu.
 - jodofory jsou netoxické, vysoce účinné (po kyselině peroctové údajně nejúčinnější) a všestranně použitelné.
 - vyžadují však dvouetapové postupy – nejdříve mechanické očištění a pak dezinfekci,
 - korodují železo a barví pokožku a textilie.

Deriváty bromu a fluoru

- **sloučeniny bromu** se prakticky využívají například k dezinfekci vod v bazénech. Mají i výrazný antimykotický účinek.
- **sloučeniny fluoru** - jejich dezinfekční účinek se využívá spíše jen průmyslově. Organické sloučeniny fluoru působí výrazně antimykoticky a virucidně

3.ALKYLAČNÍ ČINIDLA

Ethylenoxid

- prchavá jedovatá kapalina, jejíž páry jsou ve směsi se vzduchem výbušné
- používá se ve speciálních přístrojích za zvýšeného tlaku a vlhkosti
- ethylenoxid účinkuje na všechny formy mikrobů.
- pozoruhodná je zejména jeho schopnost ničit spory.
- používá se ke sterilizaci zdravotnických pomůcek z termolabilních umělých hmot, jemných nástrojů (oční skalpely), šicího materiálu, textilu, kožešin a jiných porézních materiálů

Formaldehyd

- dráždivý plyn, rozpouštějící se ve vodě na téměř 40% roztok zvaný formalin.
- s jistotou ničí bakterie, spory, plísňe i viry.
- ve formě par jej lze užít k prostorové dezinfekci a k povrchové dezinfekci prádla, polštářů a matrací, problematické je ale nechat takto dezinfikovaný materiál odvětrat
- v 1-3% koncentraci je součástí dezinfekčních přípravků se spolehlivým baktericidním a virucidním účinkem. Formalin obsahuje např. solutio Galli-Valerio k uchování nástrojů a jinak celá řada komerčních preparátů

Glutaraldehyd

- olejovitá kapalina, méně dráždivá a rychleji účinkující než formalin
- bakterie i viry ničí spolehlivě již v minutových expozicích, k usmrcení spor nutno nechat působit déle
- jako 2% roztok se používá především k dezinfekci až sterilizaci endoskopů a choulolistivých nástrojů

Beta-propiolakton

- výborně působí na spory
- podobně jako formalin neovlivňuje antigenní složení, proto byl využit při výrobě vakcín - toxoidů a inaktivovaných vakcín.
- dají se jím sterilizovat živné půdy a termolabilní materiály.
- pro údajnou kancerogenitu se od něj odstupuje.

4.CYKlickÉ SLOUČENINY

- prakticky působí jen na vegetativní formy bakterií, některé i na mykobakteria nebo na plísňe.
- účinek na viry je velmi nespolehlivý, na spory nepůsobí vůbec.
- organické látky jejich dezinfekční působení ruší

Fenol a jeho deriváty

- **Fenol** (kyselina karbolová)
 - je klasické desinfekční činidlo zavedené do medicíny Listerem a užívané jako standard ke srovnání účinnosti jiných fenolových derivátů.
- **Lysol** (Liquor cresoli saponatus)
 - roztok tří isomerů kresolu v draselném mýdle
 - poměrně rychle usmrcuje všechny bakterie včetně mykobakterií.
 - používá se ke hrubé povrchové dezinfekci a čištění, k dezinfekci stolice, sputa a kontaminovaného prádla.

- **Trikresol**
 - je 2,5% roztok všech tří kresolů s trochou fenolu
 - užívá se jako antiseptikum ve stomatologii
 - 10% roztok trikresolu (Kresosan) se slouží k mytí a dezinfekci podlah.
- **Polykresulen**
 - polykondenzát kyseliny metakresolsulfonové a formaldehydu.
 - používá se jako místní antibakteriální léčivo v gynekologii (preparát Vagothyl)
- **Amylmetakresol**
 - poměrně výrazně účinkující slizniční antiseptikum.
 - je přítomen ve známých přípravcích proti bolesti v krku NeoAngin a Strepsils

Difenyly

- **chlorhexidin**
 - užívá se jako antiseptikum na sliznicích a k dezinfekci rukou
 - likviduje bakterie, kvasinky, prvoky a obalené viry.
 - mykobakteria jsou vůči němu rezistentní. Na spory a na neobalené viry nepůsobí.
 - výhodný je jeho reziduální účinek, po použití zůstává na pokožce dlouho aktivní
 - uplatňuje se jako součást kožních přípravků (Spitaderm, Hibicet, Hibiscrub, Desigalin....).
- **triclosan (Irgasan)-**
 - účinkuje zejména na G+ mikroby, v kombinaci s dalšími látkami i na G- tyčinky a na kvasinky.
 - používá se i jako kožní antiseptikum k léčbě acne vulgaris.
 - je součástí zubních past a kosmetických přípravků

Trifenylnmethanová a akridinová barviva

- klasická antiseptika a ranná desinficiencia
- **fuchsin, malachitová a brilantová zeleň, krystalová (gentianová) violet**
 - působí hlavně na G+ bakterie a na kvasinky.
 - jsou součástí různých dermatologických magistraliter lékových forem
 - krystalová violet se mimo to užívá ve stomatologii při onemocnění sliznice dutiny ústní a v neonatologii k profylaxi mastitid a sooru (moučnivky).
- **akridinová barviva**
 - působí kromě bakterií i na prvoky.
 - používají se jako ranná a slizniční antiseptika k výplachům chronických lézí a ran.
 - nejznámější jsou rivanol a trypflavin.

5 .ALKÁLIE A KYSELINY

Alkálie

- silné zásady (nad pH 12) jsou velmi spolehlivé dezinfekční prostředky.
- jsou levné, výborně pronikají organickými materiály do hloubky, přítomnost organických látek jim příliš nevadí, protože z bílkovin tvoří měkké, rozpustné albumináty, kdežto tuky zmýdelňují.
- mají široké spektrum účinnosti – působí na všechny typy mikrobusů včetně virů a spor; velmi citlivé jsou k nim G- tyčinky.
- mechanismem účinku je drastická destrukce buněčných struktur.
- nevýhodou alkálií je jejich velká žíravost a schopnost poškozovat kovy (hlavně hliník) a textilie.
- **louhy draselný a sodný** - hrubá dezinfekce (stáje, skleněné láhve)
- **nehašené vápno** - zasypávání mršin
- **vápenné mléko** - (10-20% hydroxid vápenatý) - dezinfekce žump a omítek
- **čpavek** - aktivátor chlorových preparátů
- **horká soda** – (uhličitan sodný) - detergent
- **vodní sklo** – (křemičitan sodný) - nakládání vajčiek, usmrcuje salmonely na skořápce

Kyseliny

- dostatečně koncentrované silné kyseliny jsou dobrými biocidy
- na rozdíl od louhů v prostředí zatíženém organickými látkami nemusí působit tak spolehlivě – koagulací bílkovin vzniklé kyselé albumináty jsou totiž na rozdíl od alkalických poměrně pevné a mohou tak umožnit mikrobusům uvnitř koagula přežít
- leptavost a vysoká korozivnost kyselin znemožňuje širší využití kyselin.
- **kyselina solná nebo sírová**
 - jejich několikaprocentní roztoky dříve k likvidaci spor antraxu; virucidní vlastnosti;
- **kyselina chromsírová** (směs kyseliny sírové a dvojchromanu draselného).
 - dezinfekce a sterilizace skla (podložní sklo s preparáty sputa)
- **kyselina boritá**
 - součástí očních kapek, mastí a zásypů na rány; slabě účinná
 - borová voda (3% roztok)
 - Solutio Jarisch- výplach špatně se hojících ran
 - borax (tetraboritan sodný) – antiseptické účinky
- **organické kyseliny**
 - konzervační činidla v potravinářství (kyselina mléčná, octová, citronová a sorbová);
 - antimykotika (kyselina propionová a undecylenová) - příprava léků a kosmetických přípravků
 - aromatické kyseliny (kyselina benzoová a estery kyseliny p-hydroxybenzoové (parabeny) – ke konzervaci potravin a léčiv
 - kyselina salicylová- antimykotikum a keratolytikum

6. SLOUČENINY TĚŽKÝCH KOVŮ

- těžké kovy se vyznačují tzv. oligodynamickým účinkem, kdy jejich ionty přecházejí v nepatrném množství do roztoku a působí bakteriostaticky až baktericidně. Takto účinkují zejména stříbro, měď a jejich slitiny (např. mosaz). Zlato oligodynamický účinek nemá.
- téměř všechny sloučeniny těžkých kovů účinkují lépe na G-bakterie než na G+.
- nepůsobí na spory, mykobakteria, některé plísně a na viry
- v praxi se k dezinfekčním účelům uplatňují sloučeniny rtuti, stříbra, mědi a cínu. Jsou však poměrně toxické, alergizující a korozivní.
- Měďnatostříbrné sloučeniny se užívají k dezinfekci vodovodního systému (odstranění rizika přenosu legionel)

Sloučeniny rtuti

- **merthiolát (thiomersal)** – konzervační činidlo
- **hydrargirum amidochloratum** - rtuťová mast užívaná v dermatologii

Sloučeniny stříbra

- působí zejména na G- mikroorganismy
- jsou poměrně málo jedovaté
- **dusičnan stříbrný** - v 2% jako profylaxe oční kapavky u novorozenců (tzv. credéisace)
- **chlorid sodnostříbrný** (Sagen) - dezinfekce studní na chatách
- **koloidní sloučeniny stříbra** - dezinfekce sliznic, oční kapky
- **stříbrná sůl sulfadiazinum argenteum** – k léčbě infikovaných popálenin

Sloučeniny mědi

- **modrá skalice** (CuSO_4)- zemědělství, vinohradnictví – jako fungicidy; bazény - k likvidaci řas

Sloučeniny cínu

- některé organické sloučeniny cínu mají výborné účinky i na mykobakteria, spory a plísně včetně dřevokazných hub
- užívaly se do nátěrů a omítek

7. ALKOHOLY

- dezinfekční účinek alkoholů spočívá v rychlé denaturaci bílkovin a projeví se jen v přítomnosti vody.
- poměrně málo účinné, zesilují ale sporicidní účinek kyseliny solné nebo formaldehydu.

Ethanol

- koncentrovaný ethanol mikroby spíše koncentruje než zabíjí
- 70% alkohol
 - nejvyšší dezinfekční účinek
 - dezinfekce pokožky před injekcí, hygienická a chirurgická dezinfekce rukou
 - běžné bakterie ničí poměrně rychle (stafylokoky a mykobakteria pomaleji)
 - k inaktivaci virů je třeba hodinové expozice
 - spory v něm většinou přežívají).
- alkohol zesiluje působení oxidačních činidel, aldehydů, kyselin a povrchově aktivních látek

Propanoly

- dezinfekce rukou (šetrnější, levnější a účinnější než ethanol);
- expoziční doba k hygienické dezinfekci rukou - 1min., k chirurgické dezinfekci- 3-5min.

Triethylenglykol

- jeho páry výborně působí na bakterie a viry vznášející se volně ve vzduchu
- protože je netoxický a nepáchne, dá se jím dezinfikovat ovzduší v místnostech i za přítomnosti lidí.

8. POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY (TENZIDY)

- snižují povrchové napětí rozpouštědla
- patří mezi ně např. mýdla, vyráběná z přírodních látek a synteticky vyráběné saponáty.

Kvarterní amoniové sloučeniny (KAS).

- ze všech povrchově aktivních látek má prakticky jen tato skupina použitelné dezinfekční vlastnosti
- mechanismus: porušení buněčné stěny a cytoplasmatické membrány
- jsou málo toxické (dají se aplikovat na sliznice) a nepáchnou.
- pro nízké povrchové napětí dobře pronikají do štěrbin a mají mycí (detergentní) účinek. Mýdlo však jejich účinek ruší.
- nevýhody: úzké spektrum jejich účinku - dobře působí jen na G+ bakterie. G- bakterie jsou až 100x odolnější, a na mykobakteria a spory nepůsobí vůbec. Neobalené viry jsou vůči nim zcela rezistentní
- příklady: **Ajatin** (benzalkonium chlorid) a **Septonex** (Carbethopendecinium bromid).
- oba existují i ve formě tinktury k dezinfekci pokožky, Septonex i jako nosní kapky (Mukoseptonex).
- KAS jsou dále součástí rozmanitých pastilek a sprejů užívaných jako pomocné léčivo při zánětech mandlí, hltanu a dutiny ústní, vzhledem k nízké koncentraci účinné látky v těchto lékových formách je však jejich antiseptický účinek slabý

9.OSTATNÍ LÁTKY

- **sloučeniny síry**
 - oxid siřičitý – použití ve vinařství
- **dithiokarbamáty**
 - antibakteriální a antimykotické účinky
- **sloučeniny fosforu**
 - kyselina fosforečná a trinitriumfosfát - detergenty s mírným dezinfekčním účinkem určené k vyvařování prádla nebo laboratorního skla
- **dusíkaté sloučeniny**
 - azid sodný – konzervans

10.KOMBINOVANÉ PŘÍPRAVKY

- využívají synergického působení různých chemických látek
- výhodné kombinace:
 - oxidační činidla a deriváty halogenů s výhodou mísíme těsně před použitím s běžnými detergenty.
 - aldehydy + kvarterní amoniové sloučeniny - mycí a čistící vlastnosti
 - alkoholy+ KAS, chlorhexidin, peroxid vodíku - dezinfekce rukou
 - alkoholy + aldehydy – zesílený účinek aldehydů
- nevhodné kombinace:
 - oxidační činidla navzájem
 - halogeny + deriváty těžkých kovů
 - KAS + obyčejné mýdlo

24. Základní charakteristika antibiotik (rozdělení, mechanismy účinku)

- **Antibiotika** – původně přirozené látky produkované různými plísněmi a jinými mikroorganismy, které jsou dnes již vyráběny průmyslově;
- **Chemoterapeutika** - na rozdíl od antibiotik od počátku vyvíjena chemickou cestou

Dnes se rozdíl mezi oběma skupinami stírá a běžně se hovoří o antimikrobních látkách nebo zkráceně právě o antibioticích

Základní popis ATB

- selektivní toxicita – poškozuje mikroorganismus, ne hostitele
 - ATB namířena na struktury a enzymy, které jsou důležité pro bakterie a hostitel je postrádá (př. buněčná stěna) nebo je má odlišné (př. ribozomy)
 - selektivní toxicitu vyjadřuje chemoterapeutický index, což je poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou účinnou na mikroba - čím je chemoterapeutický index vyšší, tím je látka pro makroorganismus méně toxická a dá se podat nejen místně, ale i systémově (index pro penicilin- 107).
- nelze užívat na virová či houbová onemocnění (virostatika, antimykotika)
- minimální inhibiční koncentrace (= MIC) – nejnižší koncentrace dané látky, která zabrání růstu daného mikroba (MIC 90% -- potlačení 90% testovaných kmenů daného druhu)
- minimální baktericidní koncentrace (= MBC) – nejnižší koncentrace antimikrobní látky, která během 24 hodin usmrtí 99,9% původní populace mikrobů

Rozdělení antimikrobních přípravků podle primárního charakteru účinku

- Baktericidní
 - usmrcují mikrobiální buňku, působí ireverzibilně a rychleji.
 - účinek se dostavuje poměrně rychle- obvykle do 48 hodin.
 - baktericidním látkám dáváme přednost u závažných klinických stavů a při snížené obranyschopnosti nemocného
 - Peniciliny, Cefalosporiny, Monobaktamy, Karbapenemy, Aminoglykosidy, Peptidy, Glykopeptidy, Ansamyciny, Nitroimidazoly, Fluorochinolony, Nitrofurany
- Bakteriostatická
 - jen reverzibilně zastavují růst a množení mikrobů
 - jejich klinický efekt bývá patrný až za 3-4 dny.
 - Po jejich vysazení se mikroby opět mohou začít množit, protože jejich likvidace závisí na nástrojích odolnosti hostitele.
 - Chloramfenikol, Tetracykliny, Linkosamidy, Sulfonamidy

Na základě primárního efektu jsou antimikrobní preparáty děleny na bakteriostatické a baktericidní. Sekundární efekt je podmíněn aplikací vyšších koncentrací antimikrobního preparátu, při kterém dochází k ovlivnění více mechanismů najednou. Praktický dopad - vyšší koncentrace primárně bakteriostatického ATB může působit i baktericidně.

Rozdělení baktericidních ATB z hlediska farmakokineticko-farmakodynamických vztahů:

- ATB s účinky závislými na koncentraci (dávce) - zabíjejí mikroby tím lépe, čím více jejich hladina převyšuje MIC (efekt závisí na jejich koncentraci čili na dávce). Aminoglykosidy, fluorchinolony, metronidazol, azitromycin a clarithromycin.
- ATB s účinky závislými na čase - klinický efekt závisí na době, po kterou se daří udržovat jejich hladinu v plazmě nad úroveň MIC. Glykopeptidy, většina β -laktamů a z makrolidů např. erytromycin

Mechanismus působení ATB

1. Inhibice syntézy bakteriální stěny
 - prakticky netoxické a baktericidní
 - peniciliny, cefalosporiny, glykopeptidy
2. Poškození syntézy cytoplasmatické membrány
 - mnohem toxičtější baktericidní
 - polypeptidy, antimykotika - polyeny (amfotericin B a nystatin)
3. Inhibice proteosyntézy
 - vážou se na 30S nebo 50S podjednotky RNA
 - aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, chloramfenikol, linkosamidy
4. Porucha syntézy nukleových kyselin
 - baktericidní, ale toxičtější
 - mohou ovlivňovat DNA-gyru (chinolony), rozrušovat již hotovou DNA (nitroimidazoly), ovlivňují syntézu mRNA (rifampicin)
 - rifampicin, chinolony, nitroimidazoly
5. Kompetitivní inhibice
 - brzdí syntézu kys. listové
 - sulfonamidy

Rozdělení podle spektra účinku

- spektrum účinku: výčet bakteriálních druhů, na něž má daný antimikrobní přípravek teoreticky působit
- úzkospektrá ATB - působí na malý počet mikrobiálních druhů
- středního spektra – penicilin - účinkuje na všechny grampozitivní mikroby (vyjma penicilásu produkující stafylokoky), na G- koky a na mikroby spirálovitého tvaru; nepůsobí na naprostou většinu G- tyčinek. Spektrum rozšířené o část G-tyčinek má derivát penicilinu ampicilin a cefalosporiny první generace. Především na G+ mikroby působí glykopeptidy (vankomycin),

linkosamidy a makrolidy. Naopak na G- tyčinky je zaměřen účinek aminoglykosidů, polypeptidů a cefalosporinů III. Generace.

- Širokospektrá antibiotika- tetracykliny , chloramfenikol, rifampicin, cotrimexazol, cefalosporiny vyšších generací

Přístupy k léčbě

1. Cílená léčba
 - představuje ideální postup
 - je izolován konkrétní původce infekce → určena citlivost na antibiotika → volba antibiotika (dobrá snášenlivost, úzké spektrum)
 - u chronických infekcí, vyvolaných vysoko rezistentními původci
2. Empirická léčba
 - nebyl prokázán konkrétní původce infekce
 - antibiotika volíme podle očekávaného spektra etiologických agens, na základě:
 - správného zhodnocení klinického stavu
 - znalosti možných (nejčastějších) patogenů v dané lokalizaci s danými klinickými příznaky
3. Intervenční léčba
 - pokud nebyl prokázán původce infekce
 - postupná léčba podle určitého schématu, které stanoví další ATB v případě neúčinné iniciační terapie
4. Širokospektrální léčba
 - u život ohrožujících infekcí
 - ATB schopná pokrýt téměř celé spektrum potencionálních původců
 - kombinace ATB - hlavně u sepse, peritonitidy, infikované gangrény, popálenin, endometritidy

Kombinace ATB:

- snaha rozšířit ATB spektrum
 - u závažných klinických stavů (sepse), kdy ještě přesně neznáme agens, se zahájením léčby nemůžeme čekat na výsledek bakteriologického vyšetření.
 - když předpokládáme smíšené infekce – gynekologické, peritonitida a podobně
- oddálení vzniku rezistence – např u antituberkulotik začínáme kombinací více přípravku, později přesně zacílíme
- možnost snížit dávky jednotlivých ATB a tím eliminovat jejich nežádoucí účinky
- interakce ATB je buď:
 - synergická (vyšší účinek než samostatně)
 - indiferentní (bez změny účinku)
 - antagonistická (snížený účinek)
- snaha o vznik synergického účinku - např aminoglykosidy a beta laktamy, pozor na antagonistické působení

Osvědčené synergicky působící kombinace jsou k dispozici jako hromadně vyráběné přípravky – např.:

- co-trimoxazol(co-trimethoprim/sufamethoxazol).
- bacitracin/neomycin (Framykoin) - širokospektrá kombinace lokálních antibiotik
- polymyxin/neomycin/gramicidin (Neosporin) - v očním lékařství
- spiramycin/metronidazol (Rodogyl) - ve stomatologii.

Výhodné jsou kombinace beta-laktamů s inhibitory bakteriálních beta-laktamas., a to především s kyselinou klavulanovou, sulbaktamem nebo tazobaktamem. Příkladem tohoto jsou

- co-amoxicilin (amoxicilin/kyselina klavulonová)
- co-ampicilin (ampicilin/sulbaktam)
- co-piperacilin (piperacilin/tazobaktam)
- co-tikarcilin (tikarcilin/kyselina klavulonová)
- co-cefoperazon (cefoperazon/sulfbaktam)
- Imipenem se kombinuje s cilastatinem, který ho chrání před rychlým rozkladem v ledvinách.

25. Nežádoucí účinky antibiotik. Antibioterapie v těhotenství, u novorozenců a kojenců

Nežádoucí účinky antibiotik

Nežádoucí účinky antimikrobních přípravků lze schematicky rozdělit do dvou skupin:

1. **Nežádoucí účinky omezené na konkrétního pacienta:**

- a. projevy toxické
 - obvykle pro předávkování, nebo při opomenutí úpravy dávkování u pacienta s postižením jater nebo ledvin.
 - přímé toxické účinky (např. fyzikálně chemické - lokální iritace, krystalizace v tkáních)
 - toxické projevy na velké orgánové systémy
 - neurotoxické (na VIII. mozkový nerv, neuromuskulární blokáda, periferní neuropatie) – *aminoglykosidy (ototoxicita)*
 - nefrotoxické – *aminoglykosidy, vankomycin, polymyxiny*
 - hepatotoxické – *tetracykliny, erytromycin*
 - hematotoxické – *chloramfenikol*
 - GIT projevy (nauzea, zvracení, průjemy) – *tetracykliny, erytromycin, linkomycin, isoniazid*
- b. projevy imunoalterační (nejčastěji projevy alergické)
 - nejčastější výskyt alergických reakcí je zaznamenán u penicilinových přípravků
 - hlavní komponentou odpovědnou za tyto reakce je kyselina 6-aminopenicilanová
 - tato alergie je většinou zkřížená
 - kromě vyslovených alergiků také u osob trpících plísňovými onemocněními kůže (dermatomyózami) – většina antibiotik jsou totiž produkty plísní.
 - banální projevy (kopřivka) až vážné stavy (anafylaktický šok po i.v. podání penicilinu)
 - peniciliny, cefalosporiny, sulfonamidy
- c. nepřímé bioalterační projevy
 - změny vyvolané bakteriolýzou (uvolnění bakteriálního endotoxinu) - Jarischova-Herxheimerova reakce, která je způsobena masivním rozpadem mikrobů a zaplavením organismu endotoxinem; dochází k ní při léčbě břišního tyfu a syfilidy.
 - ovlivnění (vyhubení/redukce) normální mikroflóry
 - přemnožení vlastních (endogenních) potenciálních patogenů
 - u hospitalizovaných pacientů to umožní kolonizaci nemocničními kmeny, které mohou být patogennější nebo rezistentnější než původní flóra
 - pseudomembranosní kolitidy vyvolané *Clostridium difficile* po linkomycinu
 - kvasinkové vulvovaginitidy po širokospektrých antibioticech
 - pseudomonádové či enterokokové sepse po cefalosporinech I. a II. generace
 - hypovitaminóza K s následným krvácením po cefalosporinech III generace

- zvláště tetracykliny a chloramfenikol, potlačují proteosyntézu, což může snížit protilátkovou odpověď. Stejně může být potlačen rozvoj typických klinických příznaků a nerozpozná se pravá podstata infekce.
- d. projevy plynoucí z rezistence a superinfekce

2. Nežádoucí účinky přesahující rámec konkrétního pacienta a ovlivňující celou populaci:

- vznik a šíření bakteriální rezistence v populaci (zvyšování rezervoáru multirezistentních bakteriálních patogenů),
- negativní ovlivnění přístupu odborné i laické veřejnosti k antimikrobním lékům.

Antibiotika v těhotenství

Změny farmakokinetiky v těhotenství

- zvýšení plazmatického objemu (50%)
- zvýšení objemu krve (25-50%)
- zvýšení celkové tělesné vody (20-30%)
- zvýšení glomerulární filtrace (50%)
- změny v dávkování ATB (30-50%↑) – teoreticky není nutné u infekcí močových cest (dochází ke koncentraci ATB v moči, konkrétně u beta-laktamů)

Rizikové skupina pro léčiva v těhotenství (FDA)

- Kategorie A – riziko nepravděpodobné (kontrolované studie u těhotných neprokázaly riziko pro plod – do této kategorie nepatří žádné léčivo)
- Kategorie B – riziko méně pravděpodobné (kontrolované studie u zvířat neprokázaly riziko pro plod, ale není ekvivalent u těhotných žen, nebo u zvířat prokázána toxicita, ale nepotvrzena u lidí)
- Kategorie C – riziko možné (u zvířat nežádoucí účinek na plod, u lidí nejsou studie k dispozici, nebo nejsou studie k dispozici u žen ani u zvířat – podání antibiotik jen u vymezených indikací, prospěch může převažovat nad rizikem)
- Kategorie D - riziko prokázáno (existuje jasný důkaz rizika pro lidský plod – podání antibiotika jen z vitální indikace a pokud nejsou bezpečnější alternativy, přínos může být i přes riziko přijatelný)
- Kategorie D(X) – kontraindikováno v těhotenství (prokázány fetální abnormality, riziko při podání je výrazně větší než prospěch pro pacientku)

Léčiva kategorie B

- Beta-laktamová antibiotika
 - Základní peniciliny
 - Protistafylokokové peniciliny
 - Aminopeniciliny (i s inhibitory beta-laktamázy) – dysmikrobie, klostridiová kolitida (aminopeniciliny se vylučují i žlučí a nepříznivě ovlivňují střevní mikroflóru; i u kojených dětí), podávat s opatrností
 - Cefalosporiny
 - I. a II. generace bezpečné
 - III. generace: ceftriaxon je relativně kontraindikován u kojících matek - u novorozenců dochází k vazbě na albumin → vytěsnění bilirubinu a prohloubení novorozeneckého ikteru; cefoperazon → vysoké vylučování do žluče, průjemy, nauzea, klostridiová kolitida
 - Monobaktamy
 - Karbapenemy – patří do skupiny B s výjimkou: imipenem je řazen do kategorie C (křeče)
- Linkosamidy
 - v indikovaných případech (alergie na peniciliny), dysmikrobie, klostridiová kolitida – vliv na střevní mikroflóru je tak významný, že se nedoporučuje podávat dětem do 2-3 let (tzn. při kojení jen z indikace a přerušit kojení)
- Makrolidy
 - Azitromycin
 - Roxithromycin
 - Erytromycin (léčba chlamydiových infekcí v těhotenství)
 - Erytromycin estolát (kategorie C) – kontraindikován (hepatotoxicita s významnou akcentací u gravidních);
 - Klaritromycin (kategorie C) – relativně kontraindikován (teratogenní u zvířat, zvýšený výskyt spontánních potratů u žen)
 - Spiramycin (kategorie C) - indikován při toxoplazmóze u těhotných
- Nitroimidazoly (metronidazol)
 - Při studiích u hlodavců zjištěna kancerogenita a mutagenita; neprokázané u člověka – přesto kontraindikováno v prvním trimestru, při kojení pokládány za rizikové
- Nitrofurany (nitrofurantoin)
 - Mutagenní a kancerogenní potenciál
 - Kontraindikovány v těhotenství/nepodávat v 1. a 3. trimestru (v období před porodem kvůli riziku hemolytické anémie u plodu – deficit G-6-PD)
 - Kontraindikace při kojení (hemolytická anémie u deficitu G-6-PD)
- Tetracykliny
 - Dysplazie kostí a zubů (KI v těhotenství i při kojení)

- Kotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol)
 - nesmí být podáván v graviditě, zejm. v 1. trimestru (riziko pro organogenezi) a v období před porodem a při kojení (vazba na albumin → novorozenecký ikterus)
 - Sulfonamidy – teratogenní u zvířat, u lidí indukce hemolýzy (deficit G-6-PD), vazba na albumin (jádrový ikterus) – kontraindikace pro 3. trimestr a kojení
 - Trimetoprim – u zvířat teratogenita, u lidí nedoporučen po celou dobu gravidity
- Cyklické lipopeptidy (colistin, daptomycin)
 - U zvířat neprokázán teratogenní účinek, v těhotenství pouze z vitální indikace, přerušit kojení
- Fluorochinolony
 - Kontraindikovány v těhotenství a při kojení
 - Mutagenní účinek – poškození růstových chrupavek
- Aminoglykosidy
 - Kontraindikován v těhotenství (kojení +/-?)
 - Ototoxicita, kongenitální hluchota, nefrotoxicita
- Glykopeptidy
 - Podání jen v nutnosti, ototoxicita, nefrotoxicita, (kojení +/-?)
- Amfenikoly (chloramfenikol)
 - Kontraindikován v těhotenství a při kojení
 - Teratogenní, gray baby syndrom

Antibiotika u dětí

- Nezralost orgánů a metabolismus
- Dávky jsou udávány v mg/kg váhy + interval (případně přepočet na povrch těla m²)
- Orientační určení dávky podle věku dítěte
 - Do 3 měsíců - 1/6 dávky dospělého
 - 3-6 měsíců - 1/5 dávky dospělého
 - 6-12 měsíců - 1/4 dávky dospělého
 - 1-3 let - 1/3 dávky dospělého
 - 3-6 let - 1/3 – 1/2 dávky dospělého
 - 6-9 let - 1/2 dávky dospělého
 - 10-13 let - 2/3 dávky dospělého

ATB bezpečná u dětí

- Beta-laktamová antibiotika
 - Základní peniciliny
 - Stafylokokové peniciliny
 - Aminopeniciliny (i s inhibitory beta-laktamáz) – zvážit během kojení (dysmikrobie)
 - Cefalosporiny - III. generace je relativně kontraindikovaná u novorozenců (kojení) – vazba na albumin, vytěsnění bilirubinu a prohloubení novorozeneckého ikteru (ceftriaxon); vysoké vylučování do žluče, průjemy, nauzea, klostridiová kolitidy (cefoperazon)
 - Monobaktamy, karbapenemy
- Makrolidy
 - Bezpečné ve všech věkových kategoriích
 - Spiramycin – lékem volby u kongenitální toxoplasmózy

ATB s omezením

- Linkosamidy
 - dysmikrobie, klostridiová kolitida – vliv na střevní mikroflóru je tak významný, že se nedoporučuje podávat dětem do 2-3 let (při podání matce přerušit kojení)
- Tetracykliny
 - ! Dětem pouze od 8 let
 - Průnik do kostí a ukládání do rostoucích pojivých tkání (porucha růstu kostí, hnědavé zbarvení zubů, poruchy tvorby zubní skloviny)
 - fototoxicita
- Kotrimoxazol
 - U novorozenců jádrový ikterus (kontraindikován do 2 měsíců)
 - KI u jedinců s deficitem G-6-FD
 - fototoxicita
- Nitrofurany
 - Kontraindikace při kojení (hemolytická anémie u deficitu G-6-PD)
- Chloramfenikol
 - Nepodávat novorozencům, zejména nedonošeným – gray baby syndrom (silné poškození jater a ledvin kvůli nedostatečně vyvinutému detoxikačnímu glukuronidázovému systému)
- Fluorochinolony
 - ! V terapii až od 18 let věku
 - Arthropatie (poškození chrupavek), tendinitidy (zvýšené riziko poškození u sportovních aktivit – zvýšené námahy, mohou vzniknouti po ukončení terapie)
 - Fototoxicita

36. Mechanismy bakteriální rezistence k antibiotikům

Rezistence na antibiotikum je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antimikrobního přípravku (definice WHO).

Rezistence na antibiotika je v podstatě dvojitá:

- primární (přirozená) - vrozená necitlivost bakteriálních druhů k určitému antibiotiku, důvodem je absence cíle působení antimikrobiální látky nebo její inaktivace.
- sekundární (získaná) - získaná rezistence na ATB, kdy kmeny mikrobiálních druhů na určité antibiotikum primárně citlivé se mohou stát rezistentní; vznik mutací nebo převzetím genetického materiálu od rezistentních buněk

Mechanismy rezistence

1. Změna místa působení ATB

- změny v struktuře PBP - vznik rezistence na peniciliny
- metylace aminokyseliny na 50S ribozomové podjednotce - vznik rezistence na erytromycin
- změna metabolické cesty, změna afinity cílového enzymu pro chemoterapeutikum
- makrolidy nebo linkosamidy, ale i beta-laktamy

2. Zhoršený průnik ATB do buňky

- průchod ATB je zamezen, pokud mikrob změní některé vlastnosti porinů (což jsou otvory ve vnější membráně). Tímto typem rezistence disponují především gramnegativní mikrobi, jelikož mají dvojitou membránu
- aminoglykosidy, tetracykliny, chinolony

3. Aktivní vyčerpávání z buňky

- eflux = aktivní vyčerpávání antibiotika z bakteriální buňky. Tímto mechanismem se snižuje koncentrace antimikrobiální látky a tím i její účinnost.
- chinolony, tetracykliny a makrolidy

4. Přímá inaktivace ATB vlivem enzymů

- jejich působením se mění struktura ATB = ztráta jeho účinnosti
- beta laktamázy - extracelulárně působící enzymy mikroorganismů, které štěpí beta-laktamový kruh, čímž antibiotika tohoto typu ztrácí účinek.
- podobný účinek mají intracelulárně působící acetyltransferázy na účinek chloramfenikolu
- aminoglykosidy, betalaktamy

Bakterie	Produkce	Princip	Forma
<i>E. coli</i>	β -laktamáza (penicilinasa)	rozklad penicilinu	získaná
		eflux fluorochinolonů	
		modifikace ribozomů	
<i>Haemophilus spp.</i>	β -laktamáza	rozklad penicilinu	získaná
<i>Klebsiela spp.</i>	karbapenemáza	inaktivace β -laktamů	
		ampicilin rezistentní	primární
<i>N. gonorrhoeae</i>	β -laktamáza	rozklad penicilinu	získaná
<i>N. meningitis</i>	β -laktamáza	rozklad penicilinu	získaná
<i>Pseudomonas spp.</i>		eflux betalaktamů	primární
<i>Salmonella spp.</i>	"Salmonella Genomic Island"	různé rezistence	
<i>Stafylococcus spp.</i>	β -laktamáza	rozklad penicilinu	získaná
	silná vrstva peptidoglykanu	brání prostupu vankomycinu	získaná
<i>Streptococcus spp.</i>		penicilinové rezistence	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	modifikovaný PBP	rezistence k penicilinu	získaná

Antibiotikum	Mechanismy rezistence
Beta-laktamová	produkce beta-laktamáz snížení permeability buněčné stěny změna penicilin-vazebných proteinů
Aminoglykosidy a makrolidy	snížená vazebnost na ribozómy snížení permeability buněčné stěny produkce inaktivujících enzymů
Chloramfenikol	snížení vazebnosti na cílové ribozómy snížení permeability buněčné stěny zvýšení aktivity chloramfenikol-acetyltransferázy
Tetracykliny	snížený transport k ribozómům aktivní buněčný eflux (vylučování antibiotika z buňky)
Chinolony	rezistence DNA-gyrázy snížení permeability buněčné stěny aktivní buněčný eflux
Sulfonamidy, Trimetoprim	rezistence syntetázy kyseliny listové rezistence reduktázy kyseliny dihydrolistové snížení permeability buněčné stěny

37. Vznik a šíření bakteriální rezistence

K důležitým schopnostem bakterií patří zvyšování jejich odolnosti k antimikrobním přípravkům a z tohoto důvodu k velmi závažným nežádoucím projevům antibiotik patří vznik a šíření bakteriální rezistence.

Rezistence na antibiotikum je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antimikrobního přípravku (definice WHO).

Rezistence na antibiotika je v podstatě dvojí:

- přirozená či primární,
- získaná či sekundární.

Přirozená (primární) rezistence

- vrozená necitlivost bakteriálních druhů k určitému antibiotiku.
- důvodem je absence cíle působení antimikrobiální látky nebo její inaktivace.
- je to vlastnost typická pro všechny zástupce daného druhu, kódovaná chromozomálními geny a horizontálně nepřenositelná
- využíváme ji k přípravě selektivních půd:
 - k izolaci hemofilů přidáváme do kultivačního média bacitracin
 - k izolaci patogenních neisserií vankomycin + kolistin
 - k izolaci streptokoků kolistin a kyselinu oxolinovou
 - k izolaci kampylobakterů - cefoperazon
- příklady přirozené rezistence:
 - G- střevní tyčinky - rezistentní vůči penicilinu, makrolidům a linkosamidům
 - Klebsiely jsou rezistentní na ampicilin
 - Pseudomonas aeruginosa na co-trimoxazol
 - Streptokoky jsou rezistentní na aminoglykosidy
 - enterokoky a listerie na cefalosporiny.

Získaná (sekundární) rezistence

- získaná rezistence na ATB, kdy kmeny mikrobiálních druhů na určité antibiotikum primárně citlivé se mohou stát rezistentní.
- sekundární bakteriální rezistence patří v současné době k nejzávažnějším medicínským problémům; zejména tam, kde se antibiotika používají často, tedy v nemocnicích.
- vzniklé rezistentní kmeny v přítomnosti antibiotika přežívají a díky selektivnímu tlaku antibiotika brzy přerostou vlnavou populací. V nemocničním prostředí se rezistentní kmeny snadno rozšíří i na ostatní pacienty.
- rezistence k ATB se zvyšuje rychleji, než výzkum stačí připravovat nové typy ATB
- jsou obavy, že brzy se objeví kmeny stafylokoků nebo enterokoků, které budou rezistentní ke všem dosud užívaným antibiotikům
- rozeznávají se 2 typy sekundární rezistence:
 - penicilinový typ (multiple step mutation) vzniká po dlouhodobém podávání některých antibiotik – např. penicilinu, chloramfenikolu, bacitracinu.

- streptomycinový typ (one step mutation), s rychlým vznikem vysoce rezistentních kmenů je znám u streptomycinu, erytromycinu, linkomycinu, rifampicinu.
- sekundární rezistence může vzniknout dvěma způsoby:
 - fenotypickou adaptací,
 - genetickými změnami.

Genetická podstata rezistence bývá vysvětlována:

1. Modifikací genu na chromozomu (mutace)
 - chromozomální (mutačně-selekční) rezistence
 - někdy ke vzniku rezistence stačí mutace jediná. Například k rezistenci na streptomycin stačí jediná změna ribosomálního proteinu, kdežto ke změně tzv. penicilinvázajících proteinů u pneumokoků je potřeba mutací několik.
 - tento způsob vzniku a šíření rezistence je méně významný, protože frekvence mutací je velmi nízká (10^{-6} - 10^{-9})
 - spontánní mutanty jsou často navíc biologicky defektní, jejich růst je zpomalen a postrádají virulenci
2. Převzetím genetického materiálu od rezistentních buněk
 - extrachromozomální (plasmidová) rezistence
 - tyto geny jsou nejčastěji lokalizovány extrachromozomálně (plazmidy, transpozony)
 - plazmid obsahující např. gen kódující beta-laktamasu.
 - existují i tzv. promiskuitní plasmidy schopné překonávat mezidruhovou bariéru a přenášet rezistenci např. z *Escherichia coli* na ostatní enterobakterie, gonokoky nebo hemofily.
 - transpozony - tyto genetické elementy jsou schopny se integrovat jak do chromosomu, tak do plasmidů. Příkladem jsou změny antigenní struktury trypanosom vyvolané transpozicí genů pro povrchové glykoproteiny. Tímto mechanismem se mohou měnit v krátkých, i několikadenních intervalech antigenní vlastnosti parazita a trypanosomy tak mohou odolávat imunitní reakci hostitele.

Mechanismy rezistence bakterií k antibiotikům

- Změna cílové struktury (receptoru)
- Snížená až zcela znemožněná penetrace ATB do bakteriální buňky
- Inhibice antibiotika pomocí enzymů
- Aktivní vyčerpávání z buňky

Důležité pojmy

- Multirezistence
 - nastává, když jsou mikrobi současně rezistentní k 3 -6 antimikrobiálním léčivům
 - příkladem častých multirezistentních bakterií jsou MRSA, VRE, producenti širokospektrých beta-laktamáz ESBL

- **Zkřížená rezistence**
 - znamená současnou necitlivost mikroorganismů na antibiotika, která mají podobnou chemickou strukturu a stejný mechanismus účinku.
 - Při *oboustranně zkříženém typu* rezistence na jedno antibiotikum znamená rezistenci i na antibiotikum druhé (penicilin G a V nebo tetracykliny navzájem).
 - Při *jednostranně zkříženém typu* rezistence může být citlivost bakterií vůči jednomu z antibiotik zachována (meticilin a penicilin G – stafylokoky rezistentní na penicilin G nemusí být rezistentní na meticilin; meticilin-rezistentní stafylokoky jsou zcela určitě rezistentní na penicilin G).
- **Sdružená rezistence**
 - geny rezistence bývají často sdruženy v určitých klastrech – na transpozonech, případně obecně na plasmidech. Bakterie nesoucí tyto genetické elementy jsou proto rezistentní k několika skupinám antibiotik najednou.
 - velmi častá je například sdružená rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, aminoglykosidům, fluorochinolonom a sulfonamidům.

Racionální ATB terapie

Aby námi zvolená ATB léčba byla opravdu racionální, je nutné se vyvarovat následujících nejčastějších chyb při volbě ATB léčby:

1. Podání ATB **u neinfekčních** stavů (ATB není antipyretikum!)
2. Podání ATB **u běžných** respiračních infekcí (CAVE: pac. na imunosupresi)
3. Podání ATB **před odběrem materiálu** (léčba bez znalosti etiol. agens, na základě předpokladu= empirická ATB léčba)
4. Předčasná **změna ATB** (klinický efekt lze očekávat u baktericidního ATB za 1-2dny, u bakteriostatického za 3-4dny)
5. Chybná výměna ATB (za látku téže skupiny)
6. Zbytečné **prodlužování terapie** (nebo naopak nedostatečná doba léčby - často pochybení stran pac.); nutno dodržovat dávky a intervaly
7. Podání ATB sice dle výsledku citlivosti, ale bez ohledu na **farmakokinetiku** (ATB špatně pronikají do ischemických tkání nebo opouzdřených ložisek; jiná se nevstřebávají ze střeva (kolistin) či dosahují účinných hladin jen v moči (nitrofurantoin))
8. Použití **širokospektrého ATB**, kde by stačil preparát s užším spektrem
9. Použití **parenterální formy**, kde by stačila perorální (CAVE: pac. s febrilní neutropenií v průběhu chemoterapie, s imunodeficiencí, po transplantacích, s metabolickými poruchami či u nedonošců je nutné podávat baktericidní ATB parenterálně)
10. Použití **kombinace ATB**, kde by stačilo jediné (při TBC však nutnost kombinací)
11. Dávkování bez ohledu na změněné jaterní či ledvinové fce- nebezpečí toxicity (CAVE: renální poruchy- aminoglykosidy, jaterní poruchy- tetracykliny, erythromycin; některá ATB kontraindikována v graviditě, u dětí do 8 let nepodávat tetracykliny a chinolony)
12. Podání jen lokální formy ATB, kde lze podat celkově- častý vznik alergií a rezistence
13. Neznalost místní situace, pokud jde o rezistenci (počáteční empirická léčba je pak neúspěšná)
14. Nedostatečný počet mikrobiologických vyšetření- často z úsporných důvodů

ATB chemoprophylaxe:

- má chránit nemocné ohrožené zvýšeným rizikem infekce
- zdravé osoby ohrožené infekcí, příp. její recidivou či reinfekcí
- používáme např. při chirurgických a diagnostických výkonech, které mohou způsobit bakteriemií u pac. s onemocněním srdce; u dětí s cystickou fibrózou
- k profylaxi streptokokových nákaz podáváme dlouhodobě PNC
- u zdravých osob po kontaktu s meningokokovou inf., TBC (při negat. tuberkulinové reakci)

Příčiny vývoje bakteriální rezistence

- selekční tlak antibiotik
- rekombinační procesy vedoucí k výměně genetického materiálu
- klonální, horizontální šíření identického kmene

Zásady antibiotické léčby bakteriálních infekcí

- Podat antibiotikum včas.
- Podat adekvátní antibiotickou léčbu na základě výsledků bakteriální surveillace, včetně rezistence k antimikrobním přípravkům.
- Podat antibiotikum s ohledem na PK/PD parametry.
- Podat antibiotikum s ohledem na klinický stav pacienta.

Cílem je zajistit, aby antibiotická léčba:

- vedla ke zlepšení prognózy pacientů
- nevedla k nárůstu rezistence

38. Humorální faktory obrany proti infekci

Odolnost proti infekci

- funkce obranných mechanismů:
 - brání usídlení mikrobů na tělesném povrchu
 - zamezuje jejich pronikání do tkání
 - brzdí jejich šíření uvnitř organismu
 - zneškodňuje jejich toxiny a ostatní produkty
 - ničí proniklé mikroby a odstraňuje jejich zbytky
- systémy protiinfekční obrany jsou dva:
 - vrozená odolnost (nespecifická)
 - získaná odolnost (specifická)

Vrozená odolnost (nespecifická)	Získaná odolnost (specifická)
zaměřená proti širokým skupinám mikrobů	zaměřená na určitého konkrétního mikroba
vrozená, dědí se	získaná během života, nedědí se
její mechanismy jsou nachystány na boj s infekčními agens předem	vyvíjí se až po setkání s daným agens
působí stejně, ať jde o první, nebo o opakovaný styk s mikrobem	vzniká tzv. imunologická paměť - při opakovaném styku s mikrobem vede k účinnější obraně (nemusí se projevit ani chorobnými příznaky)
působí okamžitě	

- oba systémy jsou těsně spjaté, bez signálů vycházejících z nástrojů nespecifické obrany se nemůže rozběhnout specifická reakce, jejíž produkty, protilátky a imunní lymfocyty působí tak, že zesilují a zefektivňují činnost nástrojů nespecifické rezistence

Nespecifická rezistence

- bariéry vůči usazení a průniku mikrobů
 - anatomické bariéry kůže a sliznic
 - ochranné funkce a reflexy
 - normální mikroflóra
- nástroje nespecifické rezistence
 - buněčné – fagocytóza, anatomické bariéry uvnitř těla, nepřítomnost receptorů
 - humorální – komplement, lysozym, baz. polypeptidy, interferony, cytokiny, proteiny akutní fáze
- horečka
- zánět

Bariéry vůči kolonizaci a průniku mikrobů

- kůže
 - vysoce účinná bariéra
 - aktivně ji pronikají pouze
 - larvy některých parazitů (ankylostomata, schistostomy)
 - z virů se na ní uplatňují jen viry bradavic a některé poxviry.
 - bakterie - Leptospiry a Francisely – není jisté, zda nepotřebují alespoň mikroskopické trhlinky.
 - pokožka je pro bakterie příliš suchá a nevhodná pro množení
 - pokud se přesto nějaké bakterie uchytí na povrchu, stále olupování pokožky tyto bakterie odstraňuje.
 - vhodnější je ústí vlasových folikulů a potních žláz, tyto oblasti jsou však chráněny přítomností kyseliny mléčné v potu, lysozymu (enzym, štěpí peptidoglykan a narušuje tak bakteriální stěnu) a nenasycených mastných kyselin, toxických pro některé gramnegativní bakterie.
 - poměrně vysoká konc. NaCl v potu vytváří pro většinu bakterií nevhodné prostředí.
 - normální kožní mikroflóra také brání jiným mikrobům v uchycení a získávání živin.
 - pokud patogen proniká kůží, staví se mu do cesty další překážky (keratinocyty, v podkoží obranný systém obsahující lymfocyty a antigen prezentující buňky)
- sliznice
 - skládají se z několika typů buněk (funkce sekreční, absorpční, obranná- pohárkové buňky produkující hlen, M-buňky předávající antigeny buňkám slizničního imunitního systému a na některých sliznicích i buňky řasinkové)
 - hlen je hlavním obranným nástrojem sliznic.
 - slouží jako lubrikans, které chrání jemnou sliznici před poškozením pohyblivými se částicemi potravy nebo prachu
 - mechanicky zabraňuje přístupu bakterií k epitelu a svou lepkavostí mikroby zadržuje
 - polysacharidové struktury hleny odpovídají virovým a bakteriálním receptorům na povrchu slizničních buněk => bakterie se navážou na hlen a na sliznici už nemohou
 - v hleny jsou sekreční protilátky IgA a dále látky ničící bakterie nebo brzdící jejich množení (lysozym, laktoperoxidasa, laktoferin)
 - oplachování sliznic tekutinou - slinami v dutině ústní, slzami na spojivce, močí v třetě
 - obměna slizničních buněk - bakterie, které překonaly hlen a přilnuly na povrch buněk, jsou tak brzy opět odloučeny.
 - sliznice mají svůj vlastní imunitní systém (MALT)
 - uplatňuje se již v počátečních fázích infekce
 - jeho součástí jsou M-buňky, makrofágy, T-buňky, B-buňky a sekreční buňky.
 - M-buňky jsou přítomny na povrchu sliznice, předávají bakterie a další antigeny do hlubších vrstev makrofágům.
 - makrofágy zpracovávají antigeny a aktivují podslizniční T-buňky, které stimulují B-buňky systému MALT k tvorbě IgA
 - celý tento komplex se nazývá lymfatický folikul
 - možné zneužití - patogeny přes buňky M pronikají do submukózy

- normální mikroflóra:
 - celkový počet příslušníků - asi 10^{14} mikrobů, kolonizují všechna místa makroorganismu, která jsou ve styku s vnějším prostředím.
 - brání usídlení patogenních mikrobů a také stimulují imunitní systém
 - nebezpečím je proniknutí mikroflóry do sterilních částí organismu.
- funkční překážky:
 - ochranné funkce a reflexy
 - dýchací cesty - kýchání, zvýšená expektorace, bronchospasmus, kašel.
 - GIT - zvracení a zrychlená peristaltika (průjem)
 - oko – mrkání

Humorální faktory obrany proti infekci

1. Komplement

- složitý systém bílkovin krevního séra.
- na podnět odpovídá kaskádovým jevem, kdy produkt jedné reakce je katalyzátorem reakce následující.
- některé z bílkovin jsou termolabilní – inaktivují se po 30 min. v prostředí o 56 °C.
- aktivuje se třemi možnými drahami:
 - klasická dráha: spuštěna komplexy antigenu s protilátkou IgG, nebo IgM
 - alternativní dráha: aktivována strukturami na povrchu bakterií (endotoxin, mikrobiální polysacharidy)
 - lektinová dráha: aktivována mikrobiálními sacharidy spolu se sérovou bílkovinou zvanou mannanvázející protein (MBP, neboli mannanvázející lektin – MBL)
- aktivací komplementu:
 - vznikají chemotaktické látky, které přitahují fagocyty a žírné buňky
 - zvyšuje se zánětlivá odpověď, zejm. propustnost cév
 - tvoří se opsoniny – vazba na povrch bakterií, usnadnění fagocytózy
 - aktivace antimikrobiálních systémů fagocytů
 - přímá lýza některých mikrobů a infikovaných nebo poškozených buněk.
- složky komplementu jsou označeny C1 až C9, v případě rozštěpení některé složky se menší fragment značí např. C3a, větší C3b.
- hlavní složkou systému je C3, nejdůležitější reakcí je štěpení C3 na C3a a C3b pomocí C3-konvertas.
- v séru, popř. na povrchu buněk jsou přítomny další faktory komp. systému
 - aktivační – properdinové faktory B, P, D
 - inhibiční či regulační faktory H, I, DAF, C1 inhibitor
- za normální situace:
 - pomalá spontánní aktivace C3 v plazmě, vzniklý C3b se váže s faktorem B, na ten působí faktor D, tím vzniká C3 konvertasa označovaná C3bBb
 - tato konvertasa je schopna mechanismem pozitivní zpětné vazby vyvolat lavinovitou aktivaci celého systému.

- C3bBb je ale labilní a zpětná vazba je účinně inhibována sérovými faktory H, I, a membránovým buň. faktorem DAF
- výsledkem regulace je rozpad C3 konvertasy na inaktivní produkty., proto za normální situace aktivace systému nepokračuje.

Alternativní dráha:

- v přítomnosti mikrobů se konvertasa C3bBb váže na polysacharidy na jejich povrchu (na endotoxin)
- tam je stabilizována účinkem faktoru P (properdin) a faktorů B a D. Properdinový systém labilní konvertasu upevní a rozběhne se zpětná vazba, začnou se tvořit další molekuly C3-konvertasy a komplementový systém se aktivuje tzv. alternativní drahou
- C3b vznikající v okolí mikrobů se váže na jejich povrch jako opsonin – C3b tedy slouží jako spojka mezi povrchem bakterie a fagocytující buňkou.
- další pochody jsou shodné s klasickou cestou
- C3b spolu s C3 konvertasou štěpí C5 na C5a a C5b.
- C3a spolu s C5a mají anafylatoxický a chemotaktický účinek.
- anafylaktický účinek:
 - C3a a C5a jako anafylatoxiny vyvolají degranulaci žírných buněk
 - histamin – rozšiřuje kapiláry, zvyšuje jejich propustnost, zvyšuje pohyblivost granulocytů (chemokineze), vyvolává kontrakce hl. svalstva.
 - heparin, tryptasa (aktivace C3), faktory chemotaktické pro eosinofily a neutrofile, faktor aktivující destičky.
 - mimo tyto preformované mediátory se v aktivovaných žírných buňkách začíná tvorba leukotrienů, prostaglandinů a tromboxanů.
 - mediátory s vazooaktivním účinkem aktivují adhezní molekuly na povrchu polymorfonukleárních a endoteliálních, což umožní leukocytům usazení na stěnu postkapilárních venul = marginace (nutné k diapedéze do postižené tkáně)
- chemotaktické účinky C3a a C5a
 - přitahují polymorfonukleární a monocyty z krevního řečiště do místa, kde bakterie pokryté složkou C3b celý proces zahájily.
 - fagocyty se pohybují ve směru zvyšující se koncentrace atraktantu.
- dilatace kapilár, exsudace plazmatických bílkovin a tekutiny do tkání = akutní zánětlivá odpověď
- C5b se váže na povrch buňky, a spolu se složkami C6 až C9 vytváří membránový útočný komplex = konečný produkt aktivace komplementu.
 - postupně se tvoří komplex C5bC6C7C8, usazuje se v buněčné membráně a vyvolá konformační změny poslední složky, C9.
 - složky změněné molekuly C9 se včlení do lipidové dvojvrstvy bun. membrány a polymerizací tvoří dutý útvar, který svým ostrým okrajem prorazí otvor do buňky.
 - vzniklým otvorem unikají ionty a metabolity, vniká voda => lýza buňky
- může jít o buňku bakteriální, či o antigenně pozměněnou vlastní (např. infikovanou virem)
- účinkům komplementu jsou vnímavější G- bakterie (G+ chrání silná vrstva peptidoglykanu).

Lektinová dráha:

- Mannanvázející lektin (MBL) – sérová bílkovina, tvoří se v jaterních buňkách, uvolňuje se do krve spolu s ostatními proteiny akutní fáze zánětu.
- v séru je těsně spjat s proteasami MASP1 a MASP2 (MBL associated serine protease)
- MBL se dovede vázat na mannosu, glukosu a fukosamin na povrchu G- i G+ bakterií, kvasinek, některých virů a parazitů.
- vazba MBL na tyto ligandy aktivuje obě proteasy, ty začnou štepit C2 a C4
- vzniká štěpný produkt C4bC2a, který působí jako C3 konvertasa a rozbíhá lektinovou dráhu aktivace komplementu.

Klasická dráha:

- začíná vazbou C1 na komplex antigen-protilátka.
- C1 má podjednotky C1q, C1r, C1s
- molekula protilátky se po vazbě s antigenem prostorově mění, což je signálem k navázání C1q na Fc část molekuly protilátky
- po vazbě C1r a C1s začne C1 působit jako esterasa a aktivuje C2 a C4.
- vzniká komplex působící jako C3 konvertasa, rozštěpí C3 na C3a a C3b
- C3a – zůstává volný a působí jako anafylatoxin a chemotaxin
- C3b – opsonin, v místě aktivace komplementu se rychle váže na buněčnou membránu.
 - fagocyty nesou na svém povrchu receptory pro C3b
 - komplex antigen-protilátka-komplement se přichytí na povrch fagocytu
- usnadnění fagocytace (viz výše) = imunní adherence, rozštěpení C5 na C5a a C5b
- další průběh jako u alternativní dráhy

2. Lysozym

- enzym, ve vysokých koncentracích přítomen v granulích neutrofilů, v séru, slzách, slinách, mléce, nosním sekretu, vaječném bílku, ne ale v likvoru, potu a moči.
- působí jako muramidasa – štěpí vazbu mezi kys. muramovou a acetylglukosaminem v mureinu buněčné stěny a usmrcuje tak G+ bakterie.
- patogeny však bývají proti účinku lysozymu často rezistentní
- u G- bakterií je murein ukryt pod jejich lipidickou zevní membránou, je potřeba spolupráce s komplementem – ten naruší zevní lipidickou membránu útočným komplexem
- lysozym s komplementem jsou podkladem baktericidní schopnosti séra (platí pouze pro bakterie nepatogenní)

3. Bazické (kationické) polypeptidy

- nespecificky reagují s kyselými polysacharidy bakteriálního povrchu
- ve vysokých koncentracích je najdeme na poraněných sliznicích.
- některé mají antimikrobiální účinek srovnatelný s antibiotiky.
- mechanismus - tvorba otvorů v cytoplazmatické membráně. Některé neutralizují endotoxin.
- spermin z prostaty, usmrcuje mykobakteria a některé stafylokoky
- protamin
- defensiny z fagocytů

4. Interferony

- glykoproteiny
- rozlišujeme IFN alfa, IFN beta a IFN gama, u IFN alfa je řada podtypů.
 - IFN alfa: leukocytární, tvořen monocyty a makrofágy
 - IFN beta: produkovan fibroblasty
 - IFN gama: tzv. imunní, produkt aktivovaných buněk T a NK, strukturou a funkcí odlišný.
- induktory IFN v buňce: viry, 2-vláknitá RNA (vzniká při množení RNA virů), bakterie (zejm. mykobakteria), houby, prvoci, syntetické polymery, některá antibiotika
- vytvořený IFN se uvolní z buňky, naváže se na specifický receptor sousední buňky, která pak začne tvořit další bílkoviny.
- funkce těchto bílkovin:
 - zodpovědné za antivirovou rezistenci
 - antiproliferativní – potlačení růstu nádorových buněk
 - imunomodulační účinky - hlavně IFN gama, indukuje expresi molekul MHC I a II na povrchu buněk, aktivuje makrofágy a zvyšuje jejich schopnost ničit jak intracelulární mikroorganismy, tak nádorové buňky; dále aktivuje NK buňky, neutrofile, endotelie
- po setkání s IFN se buňka stává odolnou vůči množení viru – zastavení syntézy virových proteinů a degradace virové mRNA.
- antivirový účinek interferonu je univerzální, zaměřen na všechny viry, rezistence buňky trvá asi 2 – 3 dny.
- účelem je, aby kolem první nakažené buňky vzniklo pásmo buněk odolávajících množení viru (cordon sanitaire - bezpečnostní kordon).
- na makroorganismu se přítomnost IFN projevuje chřipkovitými příznaky - zimnicí, únavou, nauseou, bolestí svalů, mentální depresí, horečkou, ztrátou chuti k jídlu, horečkou.
- použití pro terapeutické účely:
 - pro terapeutické účely se IFN připravoval z kultur lidských leukocytů nebo lymfoblastů, v současnosti se používá rekombinantních preparátů.
 - při léčbě akutních viróz se IFN kvůli vedlejším účinkům neužívá, s výjimkou život ohrožujících infekcí (hemoragické horečky, vztekliny)
 - IFN alfa se však standardně využívá při léčbě perzistentních virových nákaz (hepatitida B a C) a u HIV komplikovaném Kaposiho sarkomem.
 - IFN beta z neznámých důvodů zabírá u sclerosis multiplex
 - IFN gama u těžkých mykóz a mykobakteriálních nákaz.
 - IFN lze užít i k léčbě některých malignit – tricholeukemie, mnohočetný myelom, maligní melanom

5. Ostatní humorální faktory ovlivňující nespecifickou rezistenci:

Cytokiny

- bílkoviny produkované zejména lymfocyty a makrofágy, působí na řadu buněk včetně svých producentů.
- v nespecifické obraně proti infekci se uplatňují IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 a TNF = prozánětlivý efekt

- IL-1: produkován makrofágy, endoteliemi, fibroblasty, nerv. a gliovými buňkami, keratinocyty, epitelii. Výskyt ve formě alfa a beta. Ovlivňuje diferenciaci a funkce buněk účastníků se zánětlivé a imunitní odpovědi. Odpovídá za vznik horečky, respirační vzplanutí neutrofilů a makrofágů, indukci adhezivních molekul na endoteliích, zvýšení cévní propustnosti.
- IL-6: např. stimuluje hepatocyty ke tvorbě proteinů akutní fáze.
- IL-8: uvolňován z makrofágů a endotelií (jako odpověď na IL 1 a TNF), je chemotaxinem pro neutrofile, T–buňky a bazofily, vyvolává adhezi leukocytů na endotelie, aktivace neutrofilů k uvolnění lysosomálních enzymů (hromadění hnisu při zánětu)
- IL-12: z fagocytů a z buněk prezentujících antigen, působí na NK buňky – ty pak tvoří INF gama a další cytokiny, které posilují fagocyty. Díky pozitivní zpětné vazbě mezi NK a makrofágy mohutná aktivace makrofágů.
- TNF (tumor necrosis factor): zprostředkovává expresi genů pro rozmanité růstové faktory, cytokiny, mediátory zánětu, proteiny akutní fáze. Stimulátor imunity, mediátor zánětlivé odpovědi. Je schopen ničit nádorové buňky. Během infekce a nádorového růstu vyvolává hubnutí a horečku.

Proteiny akutní fáze

- reakce akutní fáze = nespecifická reakce jedince, který byl v odpovědi na infekci stimulován IL-1, IL-6, TNF, PG E1, nebo interferony.
- zvýší se vylučování řady hormonů, začne katabolismus svalových bílkovin.
- získané aminokyseliny a energie se využívají v játrech ke tvorbě reaktantů akutní fáze
- dostaví se leukocytóza s posunem doleva
- v plasmě klesá zinek => nechutenství => organismus nezatížen trávením.
- klesá i železo, aby nebylo využíváno bakteriemi.
- IL-1 působí na hypothalamus (endogenní pyrogen), zvyšuje se tělesná teplota – poškození virů, stimulace dalších obranných dějů.
- v mozku vznikají látky prohlubujících spánek.
- CRP (C–reaktivní protein): molekula se podobá IgM – pentamer. Váže se na fosforylcholin ve stěně některých streptokoků, aktivuje komplement i fagocytózu. Zvýšení hladiny CRP je známkou zánětu (až 1000x během 24 hodin)
- další reaktanty ak. fáze - složky komplementu, inhibitory proteas (alfa-1-antichymotripsin), koagulační faktory, ceruloplasmin, haptoglobin, orosomukoid, transferin a další.

Horečka

- normální teplota je 37°C (měřeno v axile, rektálně vždy o 0,5°C vyšší)
- nad 38°C hovoříme o pyrexii (horečka)
- fyziologická reakce organismu na infekci, existují i neinfekční příčiny (nádor, kolagenóza), naopak někdy může infekce proběhnout bez horečky (novorozenci, staré osoby...)
- exogenní pyrogeny:
 - mikrobiální produkty, které odpovídají za zvýšení teplot
 - složky bakteriální stěny (endotoxin!, kys. lipoteichoová, muramyl-dipeptid, mannan,,), některé exotoxiny (TSST-1), komplexy antigen-protilátka.

- působením těchto látek se z monocytů a makrofágů uvolňují endogenní pyrogeny: IL-1, IL-6, MIP (makrofágový zánětlivý protein), IFN alfa a beta, nepřímo IL-2 a IFN gama.
- z oběhu se endogenní pyrogeny dostanou k přední části hypothalamu, zvýší se tvorba prostaglandinu E2, centrum se nastaví na vyšší teplotu.
- fyziologické mechanismy (třesavka, kožní vasokonstrikce) se postarají o vlastní zvýšení teploty
- za horečnatých stavů se gonokoky, pneumokoky, treponema pallidum a mycobacterium leprae hůře množí, viry se hůře množí a rychleji inaktivují. Zesiluje se fagocytóza.
- přehnaná tvorba endogenních pyrogenů = septický syndrom, nebezpečí nekrózy tkání, orgánového selhání, šoku, smrti.
- do 40 °C není horečka nebezpečná, nad 41 °C klade zvýšené nároky na metabolismus a u kardiaků se podávají antipyretika + zevní ochlazování. U malých dětí při horečce nad 41 celkové křeče.

39. Buněčné faktory obrany proti infekci

Rozpoznávací funkce nástrojů vrozené rezistence

- rozpoznávání cizorodých struktur není záležitostí jen specifické imunity (lymfocyty jsou pomocí svých receptorů schopny specificky rozeznat více než miliardu antigenů)
- počet receptorů, které se zúčastní rozpoznávání cizorodých struktur v systému nespecifické rezistence, se páchí nanejvýš na pár set
- receptory v nástrojích nespecifické rezistence jsou zaměřeny na malý počet vysoce zakonzervovaných struktur, které jsou ale typické pro celé skupiny mikroorganismů (= tzv. mikrobiální molekulární vzorce či motivy)
 - zahrnují bakteriální lipopolysacharidy, peptidoglykan (murein) a kyseliny lipoteichoové, mannany a glukany z kvasinek, bakteriální DNA a dvouvláknitou, hlavně virovou, RNA.
- přes značnou chemickou odlišnost mají všechny tyto vzorce společné rysy:
 - jsou tvořeny jen mikroby, nikoli jejich hostiteli
 - jsou součástí struktur nezbytných pro přežití nebo pro patogenitu mikrobů
 - jsou společné pro celé skupiny patogenů
- vzorcové receptory jsou přítomny na povrchu mnoha buněk uplatňujících se jak v systému nespecifické rezistence, tak i specifické imunity – zejm. na povrchu makrofágů, dendritických buněk a B-buněk (tedy buněk účastnících se tzv. prezentace antigenů)
- setkají-li se s mikrobiálními molekulárními vzorci na povrchu mikrobů, aktivují se a začnou účinkovat jako buňky předkládající antigen:
 - jednak rozštěpí antigen na krátké peptidy, které vložené do molekul komplexu MHC nabídnou buňkám T
 - jednak si na svém povrchu vytvoří další molekuly nutné ke stimulaci buněk T (tzv. kostimulační molekuly B7, označované též jako CD80 a CD86).
- podstatné je, že dovedou účinně zahajovat primární imunitní reakci, při níž se imunologická paměť ještě nevytvořila
- dále je důležité, že jakmile vzorcové receptory rozeznají příslušný molekulární vzorec, ihned podnítí buňku k činnosti (zatímco v systému specifické imunity musí buňky s příslušným receptorem nejprve proliferovat a vytvořit klon) - proto mohou mechanismy nespecifické rezistence reagovat na přítomnost cizorodých struktur prakticky okamžitě.
- z funkčního hlediska lze vzorcové receptory rozdělit do tří skupin:
 - secernované
 - fungují více méně jako opsoniny - navážou se na stěnu mikrobů a označí je tak pro působení komplementu a fagocytů.
 - příkladem je mannanvázející lektin (MBL) - reaguje s mannánem na povrchu mikrobů a spouští tzv. lektinovou dráhu aktivace komplementu
 - endocytární
 - vzorcové receptory se nalézají na povrchu fagocytů
 - po kontaktu s příslušným vzorcem na povrchu mikroba zprostředkovávají pohlcení mikroba a jeho přenos do lysosomu, v němž bude rozrušen (peptidy z něj se objeví na povrchu fagocytu, kde spjaty s molekulami MHC budou nabídnuty buňkám T, aby posloužily k jejich aktivaci v systému specifické imunity).

- příkladem je makrofágový mannosový receptor rozeznávající sacharidy s velkým počtem mannosových zbytků (sacharidy typické pro mikroorganismy) nebo makrofágový vychytávací receptor (scavenger receptor), který se váže na mikrobiální stěny a je nezbytný pro vychytávání bakterií z oběhu.
- signální
 - reagují na přítomnost patogenních molekulárních vzorců spuštěním drah, jež v buňce aktivují rozmanité geny, zejména geny pro zánětlivé cytokiny. Původně byly tyto receptory popsány u octomilky a označeny termínem toll
 - u člověka se nazývají toll-like receptory a alespoň dva, TLR4 a TLR2, fungují jako vzorcové receptory.
 - TLR4 ve spolupráci s dalšími dvěma bílkovinami, CD14 a MD-2, rozeznává bakteriální lipopolysacharid a přes řadu dalších molekul vysílá do nitra buňky signál, jehož výsledkem je aktivace nukleárního faktoru kB (NF-kB). NF-kB se dostává do jádra a tam aktivuje řadu genů účastnících se na zánětlivé a imunitní reakci.
- rozpoznávání cizorodých struktur pomocí nástrojů nespecifické rezistence tedy jednak předchází rozvoji specifické imunitní reakce, jednak vytváří signály, které systém specifické imunity aktivují.
- díky vzorcovým receptorům vznikají na povrchu buněk prezentujících antigen komplexy antigenních peptidů s molekulami MHC II. třídy a objevují se signály nutné k aktivaci buněk T.

Buněčné faktory obrany proti infekci

- základní a v nespecifické obraně vůbec nejdůležitější překážkou šíření mikrobů je jejich likvidace pomocí fagocytů.
- fagocyty jsou přítomny
 - volně ve tkáních pod kůží a sliznicemi
 - jsou strategicky rozmístěny v lymfatických uzlinách a očišťují od mikrobů lymfu přitékající z příslušné oblasti.
 - Kupfferovy buňky v játrech – odstraňují bakterie přinášené krví ze zažívacího traktu
 - slezina - zachycují se zde mikroby kolující v krvi
- kromě fagocytů se v obraně uplatňují i další typy buněk.
- prostupu mikrobů tělem brání i překážky a bariéry anatomické.

Fagocyty a fagocytóza

- pohlcovat korpuskulární materiál dovedou kdejaké buňky, ale pouze tzv. profesionální fagocyty dovedou pohlcené bakterie zabít.
- nejdůležitější profesionální fagocyty jsou polymorfonukleáry (neutrofily) a makrofágy.
- obojí pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně.
- polymorfonukleáry žijí krátce, zhruba jeden den, a poněvadž je jich více než makrofágů, přicházejí do styku s mikrobiálním útočníkem jako první.
- rychle je však následují krevní monocyty, které se v místě invaze mění v makrofágy a mají za úkol fagocytovat a zabíjet bakterie.

- makrofágy kromě toho uvolňují rozmanité cytokiny, které vyvolávají vznik horečky a stimulují imunitní systém.
- další funkcí makrofágů je indukovat specifickou imunitní reakci vedoucí ke tvorbě protilátek a k aktivaci cytotoxických T-buněk.
- zatímco polymorfonukleáry se uplatňují především v obraně proti mikrobům vyvolávajícím hnisavé infekce, makrofágy se prosazují spíše v obraně proti agens schopným množit se uvnitř buněk (intracelulární bakterie, viry).

Neutrofily

- neutrofily jsou čile se pohybující buňky vznikající z kmenových buněk v kostní dřeni, vyžívají zhruba dva týdny.
- v jejich cytoplasmě se přitom vytvářejí granula dvojího typu, azurofilní a specifická, obojí obsahují řadu antimikrobiálně působících látek.
- denně dozrává asi 10^{14} neutrofilů.
- část z nich adhezuje na povrch endotelií postkapilárních venul, ale nijak pevně, takže se po povrchu endotelií spíše pomalu koulejí.
- dojde-li k poškození tkáně, objeví se na endoteliích cév postižené oblasti molekuly, k nimž neutrofily přilnou daleko pevněji a lákány chemoatraktanty se protlačí skrze stěnu venuly (=diapedesa) a zaměří do místa, z něhož vycházejí chemotaktické signály.
- neutrofily žijí krátce, necelý den, nemají mitochondrie a své energetické požadavky ukájí štěpením cytoplasmatického glykogenu. Jeho glykolýza je pochod anaerobní, neutrofily tedy dovedou účinkovat i za anaerobních podmínek, například v centru zánětlivého ložiska.

Monocyty a makrofágy

- monocyty se na místo mikrobiální invaze dostávají po neutrofilech, ve tkáni se mění na makrofágy.
- v řadě míst jsou makrofágy již přítomny: označují se jako fixní makrofágy a patří mezi ně zejména:
 - Kupfferovy buňky v játrech
 - alveolární makrofágy plic
 - osteoklasty v kostní tkáni
 - makrofágy ve výstelce dřeňových sinů lymfatických uzlin a slezinových sinusoidů
 - Langerhansovy buňky v kůži
 - mikroglie v mozku
 - v podslizniční tkáni, kde působí jako součást MALT
- makrofágy se považují za součást systému mononukleárních fagocytů, toto označení nahradilo dříve běžně užívaný termín retikuloendoteliální systém.
- žijí dlouho, měsíce až roky
- kromě schopnosti fagocytovat a předkládat antigen dovedou produkovat spoustu rozmanitých signálních a antimikrobiálních proteinů - některé z těchto molekul se účastní spuštění specifické imunitní reakce a naopak výsledkem této reakce je vznik specifické celulární imunity, v níž makrofágy ve své aktivované podobě hrají podstatnou obrannou roli.

Vlastní fagocytóza

1) Chemotaxe

- první fáze fagocytózy
- je to pohyb fagocytů směrem k místu, k němuž je přitahován molekulami označovanými jako chemotaxiny
- mezi nejúčinnější chemotaxiny patří složka aktivace komplementu, C5a
- jiné chemotaxiny jsou produkovány krevními buňkami, patří k nim leukotrieny a interleukin IL-8 z monocytů a makrofágů.
- dále jimi mohou být některé složky bakterií - jsou první, co v procesu infekce začíná přitahovat neutrofile
- bakteriální chemotaxiny - oligopeptidy, které se v rámci tvorby některých bakteriálních proteinů odštěpují z jejich N-konce. První aminokyselinou v nich je N-formylmethionin. Eukaryotní buňky si takto nepočínají, a proto zmíněné oligopeptidy působí jako velmi účinný, hlasitý signál přítomnosti bakterii.
- chemotaxiny usměrňují pohyb fagocytů, které se jinak pohybují zcela nahodile
- jak chemotaxiny difundují od svého zdroje, vytvářejí koncentrační spád.
- neutrofile jsou již alarmovány a pevně adherují na endotelie kapilár postiženého okrsku.
- na svém povrchu nesou receptory pro chemotaxiny. Po vazbě chemotaxinu na receptor se vzniklý komplex dostává dovnitř buňky a na jejím povrchu se objevují nové molekuly receptorů, aby chemotaxe mohla pokračovat.
- uvnitř fagocytu se začne měnit uspořádání cytoplazmatických mikrofilament a jejich mikrotubulů. Molekuly aktinu a myosinu v mikrofilamentech fungují analogicky jako ve svalové buňce, tvar fagocytu se začíná měnit a fagocyt zamíří ke zdroji chemotaxinu.

2) Adherence

- přichycení cizorodého materiálu na povrch fagocytu
- předpokládá to schopnost rozpoznat cizorodou strukturu (mikrobiální molekulární vzorce).
- vzorcové receptory, ať na povrchu fagocytu, nebo secernované, patří mezi lektiny, bílkoviny schopné vázat se na sacharidy.
- adherovat na povrch fagocytu bez dalších pomocných nástrojů mohou jen částice s povrchem hydrofobnějším než je povrchová membrána buňky, tedy částice inertní (prach) a snad i vysloveně nepatogenní vzdušné a půdní mikroorganismy.
- k zesílení vazby mezi povrchem mikroba a povrchem fagocytu, který se ho snaží pohltit, se vyvinula celá řada nástrojů označovaných jako opsoniny.
- opsoniny rozpoznávají cizorodé struktury účinněji než fagocytární lektiny.
- váží se na příslušné molekulární vzorce a tím upravují povrch mikrobů, aby mohly být snadněji pohlceny. Vazba opsonizované částice na povrch fagocytu je pak zprostředkována specifickými receptory.
- příkladem nespecifických opsoninů je komplementová složka C3b, která se váže na lipopolysacharid, respektive na kyselinu teichoovou na povrchu bakterii. Receptory pro C3b na povrch fagocytu pak opsonizovanou bakterii pevně přichytí.

- za nespecifický opsonin je možno považovat též MBL (z angl. mannan-binding lectin), což je normální složka krevního séra reagující s mannosou, fukosou a glukosaminem na povrchu bakterií. Mannosa je typickým bakteriálním cukrem, u eukaryotních buněk se mannosy ani fukosy nevyskytují.
- nespecifické opsoniny však neúčinkují na opouzdřené patogeny, které proto v neimunním makroorganismu fagocytóze odolávají.
- fagocytózu opouzdřených patogenů umožní až specifické opsoniny, protilátky proti pouzdrným antigenům. Navážou se na povrch pouzdra a svými Fc-fragmenty pevně připojí opsonizovanou bakterii k receptorům pro Fc na povrchu fagocytu.

3) Vlastní pohlcení a intracelulární zničení.

- vazba opsonizované částice na příslušné receptory vyšle do buňky signál, na nějž reaguje systém buněčného aktinu a myosinu.
- fagocyt začne vysílat panožky, jimiž částice obklopí a ta se ocitne ve fagocytární vakuole neboli fagosomu.
- krátce nato s fagosomem splývají buněčná granula a vzniká struktura zvaná fagolysosom, do něhož se obsah granul vylije a začne účinkovat na fagocytovaného mikroba.
- u neutrofilů jako první splývají s fagosomem tzv. specifická granula, obsahující především lysozym a laktoferin.
- lysozym napadá murein grampozitivních mikrobů, laktoferin odnímá z okolí fagocytované bakterie potřebné železo.
- z azurofilních granul neutrofilů se do fagolysosomu vlévá směs bazických antimikrobiálních proteinů a dalších enzymů.
- bazické neboli kationické proteiny působí na mikroby tak, že zvyšují permeabilitu jejich stěny. Některé z nich, nízkomolekulární, se označují jako defensiny.
- z enzymů azurofilních granul je třeba uvést například lysozym, kathepsin G a elastasu, které napadají murein, a enzym potřebný k zabíjení mikrobů, totiž myeloperoxidasu.
- z dalších granul se uvolňují jiné hydrolytické enzymy, jako kolagenasa, želatinasa apod.
- baktericidně působí i nízké pH fagolysosomu (kolem 3,5 až 4,0), optimální pro funkci lysosomálních hydrolas. Nízké pH je pravděpodobně vyvoláno přítomností kyseliny mléčné jako produktu glykolýzy.
- po pohlcení pozorujeme u fagocytů tzv. respirační vzplanutí, náhlý vzestup spotřeby kyslíku provázený zvýšením aktivity řady enzymů a redukcí molekulárního kyslíku na vysoce aktivní látky zvané reaktivní kyslíkové metabolity: superoxidový anion O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 , singletový kyslík 1O_2 , a hydroxylový radikál $OH^\cdot$.
- tyto metabolity dílem zabíjejí mikroby přímo, dílem oxidují chloridové ionty na kyselinu chlornou, vysoce toxické pro mikroby. Úloha oxidu dusnatého NO a reaktivních forem dusíku v nitrobuněčném usmrcování mikrobů prokázána nejprve u myši se u lidských fagocytů s jistotou potvrdila teprve nedávno.
- usmrcené mikroby jsou lysosomálními enzymy rozrušeny a rozpuštěny. Jejich zbytky fagocyt uvolní do okolí.

- problémem při fagocytóze je, že lysosomy se běžně nespojují jen s membránou fagosomu, ale i s povrchovou membránou fagocytu a lysosomální enzymy se uvolní do okolí.
 - to poškodí nejen bakterie v sousedství fagocytu, ale i nevinné okolní buňky hostitele.
 - výsledkem je jednak uvolnění spousty živin, což může přijít vhod přítomným bakteriím, jednak destrukce tkáně, která se pak musí hojit jizvou.
 - oba zmíněné pochody, jak intenzivní zánět, tak reparace, mohou vést k větším škodám a k závažnějším chorobným příznakům než vlastní působení mikrobů.
-
- makrofágy obsahují ve svých granulích spoustu lysozymu, zato s kationickými proteiny ani s laktoferinem se v nich nesečkáváme a rovněž myeloperoxidasy mají poměrně málo.
 - normální makrofágy skutečně některé patogeny, hlavně houby, zabíjejí hůře než neutrofily. Vynahrazují si to však po tzv. aktivaci.
 - makrofágy jsou aktivovány např. endotoxinem gramnegativních bakterií, komplementovým fragmentem C3b nebo pomocí cytokinů, zejména interferonu gama.
 - aktivované („rozhněvané“) makrofágy mohutněji fagocytují, spotřebovávají více kyslíku, vytvářejí více hydrolas, zkrátka jsou schopny ničit i tak odolné intracelulární parazity jako je *Mycobacterium tuberculosis*.
 - i když jsou makrofágy aktivovány během právě popisovaných pochodů vrozené nespecifické rezistence, výrazná aktivace makrofágů je typická pro specifickou celulární imunitu.
 - makrofágy ale plní kromě fagocytózy další úkoly. V odpovědi na lipopolysacharid a další složky bakteriální stěny uvolňují IL-1, IL-6, TNF a další chemokiny, čímž zahajují reakci akutní fáze.
 - interleukinem 12 aktivují přirozené zabíječe (NK-buňky), ty zase dovedou tvořit gama-interferon, jenž spolu s IL-1 a TNF prohlubuje aktivaci makrofágů.
 - makrofágy dále představují přechod mezi nespecifickou rezistencí a specifickou imunitou.
 - především dendritické buňky dopravují antigen do lymfatických uzlin, kde je předkládán T-buňkám typu CD4.
 - pomocí IL-1, IL-6 a IL-12 makrofágy stimulují buňky T.

Další buňky uplatňující se v obraně

NK-buňky

- buňky NK (z angl. natural killers, přirození zabíječi) jsou popisovány jako velké granulární lymfocyty.
- vyvinuly se coby součást nespecifické obrany proti virovým infekcím.
- dovedou zahubit nakaženou buňku dříve, než v ní dozrají a než se z ní uvolní nové viriony.
- podnětem pro jejich činnost jsou virové glykoproteiny, které se během dozrávání virionů objevují na povrchu infikovaných buněk.
- přirozený zabíječ se k infikované buňce těsně přiblíží a do mezery mezi sebou a napadenou buňkou uvolní obsah svých granulí, což jsou především molekuly typu perforinů.

- ty vytvoří póry v membráně, jimiž do cílové buňky proniknou z buňky NK další bílkoviny, zvané granzymy, např. granzym B.
- výsledkem tohoto smrtelného mezibuněčného polibku je apoptóza cílové buňky a přerušení reprodukčního cyklu viru.
- podobným způsobem dovedou NK-buňky ničit i buňky nádorové.

Eosinofily

- eosinofily se pravděpodobně vyvinuly k obraně proti mnohobuněčným parazitům.
- jejich granula jsou silně acidofilní a pod elektronovým mikroskopem vykazují krystaloidní strukturu.
- v granulích byly prokázány kationické proteiny, eosinofilová peroxidasa a molekula fungující jako perforin.
- na povrchu eosinofilů jsou receptory pro C3b.
- eosinofily nijak zvlášť dobře nefagocytyjí, po aktivaci ale tvoří velké množství aktivních kyslíkatých metabolitů.
- rovněž secernují leukotrieny, prostaglandiny a řadu cytokinů.
- mnozí helminti navazují na svůj povrch C3b a tím aktivují komplement alternativní drahou, jejich buňky však odolávají lytickému účinku C9.
- přítomnost C3b na povrchu parazita však umožňuje těsné přilnutí eosinofilů cestou jejich receptorů pro C3b. Aktivované eosinofily pak uvolňují svoji granulární výzbroj a poškozují povrch parazita.
- počet eosinofilů je při parazitární infekci typicky zvýšen, což je důležitým laboratorně diagnostickým znakem.

Erytrocyty a krevní destičky

- na možnou úlohu erytrocytů a krevních destiček v obraně se mnohdy zapomíná.
- protože na povrchu mají receptory pro komplement, účastní se odstraňování imunních komplexů a složek komplementového systému.

Anatomické překážky šíření mikrobů v těle

Lymfatické uzliny

- významnou překážkou šíření mikroorganismů v těle jsou mizní uzliny.
- mikroby přinášené lymfou jsou vychytávány makrofágy lemujícími sinus marginalis.
- dalšími činiteli obrany v uzlině jsou polymorfonukleáry a humorální faktory přinášené lymfou z místa zánětu.
- infiltrace uzlin zánětlivými buňkami (neutrofily, později makrofágy a lymfocyty) má za následek jejich zvětšení, což je typickou klinickou známkou přítomnosti zánětu v uzlinách a v regionu, odkud do nich lymfa přitéká.
- v lymfatických uzlinách a v lymfatických folikulech sliznic se rozbíhá specifická imunitní reakce. Její produkty (zejména imunní lymfocyty) přispívají rovněž ke zvětšení uzlin.

Mononukleární fagocytový systém

- poměrně velký počet mikrobů, byt většinou nanejvýš jen oportunně patogenních, se zcela běžně dostává ze střeva do krve a je přinášén portálním oběhem do jater.
- v jaterních sinusoidách jsou zřagocytovány a zlikvidovány fixními makrofágy (Kupfferovými buňkami).
- jiným významným typem buněk očišťujících krev od kolujících v ní mikroorganismů jsou makrofágy sinusoidů sleziny.
- makrofágy lymfatických uzlin, jater a sleziny jsou součástí systému mononukleárních fagocytů (nazývaného dříve retikuloendoteliální systém), kam patří ještě krevní monocyty, alveolární makrofágy, mesangiální makrofágy ledvinných glomerulů, některé buňky kloubní výstelky a kostní dřené, kostní osteoklasty a mozková mikroglie.

Svalové fascie a výstelky tělesných dutin

- z dalších anatomických struktur uplatňujících se jako překážka pronikání bakterií uvnitř makroorganismu je třeba uvést například svalové fascie a výstelku tělesných dutin.
- cestou menšího odporu, totiž podél fascii, nikoli napříč jimi, se šíří například flegmonózní procesy v krční krajině.
- rovněž pleura nebo pobřišnice kladou překážku bakteriím, které dávají přednost tomu šířit se nejprve po povrchu těchto výstelek.
- důležitou bariérou, kterou tělo klade do cesty bakteriím, jsou sekundárně vznikající vazivová opouzdrnění zánětlivých ložisek (stěny abscesů, srůsty na omentu apod.).

40. Specifická obrana organismu proti infekci.

Základní rysy specifické imunity

- systém získané (adaptivní) odolnosti (specifické imunity) je fylogeneticky mladší než systém vrozené odolnosti (nespecifické rezistence).
- umožnil obratlovcům zapamatovat si patogena a při příštím setkání na něj reagovat daleko rychleji a účinněji.
- podstatný rozdíl mezi nespecifickou rezistencí a specifickou imunitou spočívá v přítomnosti imunologické paměti u specifické imunity.
- to při opakovaném styku s daným infekčním agens kontakt nemusí vůbec projevit chorobnými příznaky.
- tato obrana je ale specifická, to znamená zaměřená pouze na určité, konkrétní agens, čili adaptivní, tomuto agens přizpůsobená.
- na rozdíl od vrozené nespecifické rezistence je specifická imunita získaná, postupně se vyvíjí až po setkání s daným mikrobem.
- jakkoli je specifická imunita vysoce účinná, začíná se v průběhu infekce uplatňovat poměrně pozdě a bohužel se proto někdy nerozvine včas. Jindy je zase hlavní příčinou poškození a tudíž chorobných příznaků.
- imunologická paměť ovšem trvá jen během života konkrétního jedince a nedědí se.

Specifičnost získané imunity

- specifičnost získané imunity a z ní plynoucí schopnost obrany je vysoká.
- v mnoha případech se rozpoznání cizorodé struktury týká ne celého mikrobiálního druhu, ale jednotlivých jeho variant (např. podtypů viru chřipky A) či dokonce kmenů (u gonokoků nebo u borrelií návratných horeček).
- podkladem specifičnosti je struktura receptorů na povrchu lymfocytů. Molekuly rozeznávané těmito receptory se nazývají antigeny

Průběh specifické reakce

- specifická imunitní odpověď začíná vazbou antigenu na specifický receptor na povrchu imunokompetentní buňky.
- názvem imunokompetentní se označuje buňka schopná specificky reagovat s antigenem
- ve většině případů bývá antigen upraven a předložen (prezentován) zvláštními buňkami.
- klíčovými buňkami specifické imunity jsou T-buňky (pocházející z thymu), B-buňky (původem z kostní dřeně, angl. bone marrow) a buňky APC.
- v klidovém stavu mají buňky T i B vzhled malých lymfocytů.
- lymfocyty se vyskytují převážně v lymfatických orgánech.
 - ústřední lymfatické orgány
 - kostní dřeň a brzlík (thymus)
 - v kostní dřeni lymfocyty ze zárodečných buněk vznikají a v ní anebo v thymu dozrávají.

- periferní lymfatické orgány
 - v periferních lymfatických orgánech se lymfocyty setkávají s antigeny.
 - regionální lymfatické uzliny – zahajuje se zde imunitní reakce vůči mikrobům, které se ocitly například po poranění ve tkáních,
 - slezina - pokud mikroorganismy pronikly do krve
 - systém MALT - s většinou mikrobů se však setkáváme poté, co byly vdechnuty nebo požitý a jejich antigeny tedy aktivují buňky slizničních lymfoidních tkání čili systém MALT (z angl. mucosa-associated lymphoid tissues). Náleží sem patrové mandle a adenoidní vegetace, ve střevě pak především Peyerovy plaky.
- aby se zvýšila pravděpodobnost, že se setkají s příslušným antigenem, lymfocyty cestují nejen mezi jednotlivými lymfatickými orgány, ale kolují celým tělem.
- k této migraci dochází i po setkání s antigenem, takže např. lymfocyty aktivované v Peyerových placích se dostávají i do lamina propria dalších sliznic, na nichž se pak rovněž tvoří tzv. sekreční protilátky.
- na základě povrchových znaků lze rozlišit různé populace lymfocytů. Základními dvěma skupinami lymfocytů jsou buňky B a T.
 - B-buňky odpovídají za tvorbu imunoglobulinů, což jsou protilátky specificky se vážící na příslušný antigen a odpovědné za odstranění extracelulárních mikrobů a jejich produktů.
 - T-buňky jednak pomáhají buňkám B tvořit protilátky, jednak pomáhají likvidovat intracelulární parazity: aktivují makrofágy a usmrcují buňky nakažené virem.
- celulární imunita:
 - jestliže ve specifické obraně vůči určitému agens hrají roli spíše lymfocyty T a aktivované makrofágy, mluvíme o imunitě celulární.
 - celulární neboli buňkami zprostředkovaná imunita má význam v obraně především proti mikrobům množícím se uvnitř buněk (příkladem jsou herpesviry nebo mykobakterie).
- humorální imunita:
 - pokud je účinná obrana podmíněna přítomností protilátek, jde o imunitu humorální.
 - chrání nás především proti patogenům vyskytujícím se extracelulárně (rozmanité opouzdřené bakterie, z virů například enteroviry).

Primární a sekundární imunitní reakce

- při prvním styku s určitým antigenem je v našem těle k dispozici nanejvýš několik tisíc lymfocytů, které jsou schopny specificky s tímto antigenem reagovat a zahájit primární imunitní reakci.
- primární imunitní reakce se rozbíhá poměrně pomalu a protilátky se ve znatelném množství objevují až během druhého týdne po styku s antigenem.
- zpočátku to bývají protilátky třídy IgM a bývají vystřídány protilátkami IgG o nízké aviditě. Nízkoavidní protilátky bývají méně specifické, a proto jejich vazba s antigenem je méně pevná.
- po primární imunitní reakci však zůstává v těle daleko větší zásoba tzv. paměťových lymfocytů, jejichž receptory jsou schopny se specificky vázat s daným antigenem

- k sekundární (též anamnestické) imunitní reakci dochází po opakovaném kontaktu s antigenem
- protože je při ní k dispozici o několik řádů vyšší počet buněk schopných rozpoznat daný antigen, probíhá sekundární imunitní reakce daleko rychleji, mohutněji a účinněji
 - protilátky se objevují dříve (již koncem prvního týdne po styku s antigenem)
 - jejich množství (titr) stoupá daleko rychleji a dosahuje mnohem vyšších hodnot
 - mnohem specifičtěji (a proto pevněji) se vážou na antigen (mají vyšší aviditu).
- důsledkem sekundární imunitní reakce je, že opakovaná infekce se vůbec nemusí projevit, a o tom, že k ní vůbec došlo nás informuje jen stoupnutí titru protilátek
- rozdíl mezi intenzitou odpovědi při primární a sekundární (event. další) imunitní reakci je podstatou účinnosti očkování neboli vakcinace.
- mikrob, jeho produkt nebo součásti použité k očkování jsou upraveny tak, aby nevyvolaly poškození, zachovávají si však stejné antigenní složení.
- po primární imunitní reakci vyvolané očkovací látkou vzniká dostatečná zásoba paměťových buněk, aby po následujícím přirozeném kontaktu s antigenem mohlo rychle dojít k mohutné sekundární reakci.
- ta zlikviduje příslušné agens dříve, než se infekce stačí projevit chorobnými příznaky

Mikrobiální antigeny

- jak receptory na buňkách T, tak protilátky, které slouží jako receptor na B-buňkách rozeznávají jen malou část antigenní molekuly, zvanou antigenní determinanta neboli epitop.
- antigenní determinantu někdy tvoří jen několik zbytků aminokyselin nebo sacharidů.
- na molekule bílkoviny může být epitop tvořen specifickou řadou za sebou následujících aminokyselin (lineární epitop), nebo těsně vedle sebe probíhajícími částmi polypeptidového řetězce (konformační epitop).
- v obou případech je antigen poznáván na základě svého tvaru.
- prostorové uspořádání epitopu dosti přesně (ale ne zcela přesně) odpovídá tvaru kombinačního místa na T-receptoru, respektive tvaru vazného místa na molekule protilátky.
- epitop je s těmito místy prostorově komplementární, podobně jako klíč odpovídá zámku.
- mikrobiální antigeny jsou většinou velmi složité, skládají se z celé mozaiky jednotlivých epitopů a stimulují aktivaci mnoha lymfocytárních klonů – indukují tedy polyklonální odpověď.
- zvláštním postupem dovedeme v laboratoři připravit protilátky proti jedinému epitopu; protože vznikají aktivací jediného klonu lymfocytů, říkáme jim monoklonální protilátky.
- antigeny, které vyvolají vznik imunitní reakce, se nazývají imunogeny.
- ne všechny antigeny jsou imunogenní: malé antigeny zvané hapteny se stávají imunogenními až po vazbě na velké imunogenní molekuly čili nosiče, s protilátkami ale reagovat dovedou.
- příkladem haptenu jsou jednoduché sacharidy nebo některé léky (penicilin).
- dobrými imunogeny jsou molekuly bílkovin, polysacharidy už méně a lipidy a nukleové kyseliny se obvykle stávají imunogenními až po navázání na proteiny.
- i poměrně velké bílkovinné antigeny se mohou stát ještě více imunogenními v přítomnosti tzv. adjuvans.

- ke zvýšení imunogennosti očkovacích látek se jako adjuvans využívá hydroxid hlinitý.
- mnohé mikroby samy o sobě působí adjuvantně, což je dáno imunostimulačními molekulami typu lipopolysacharidu nebo muramylpeptidu
- naopak, na některé antigeny se imunitní systém naučí nereagovat, vyvine se vůči nim tzv. imunitní tolerance.
- např. během fetálního období vznikne tolerance vůči vlastním antigenům těla, jakož i cizím antigenům, s nimiž se plod dostane do styku, než jeho imunitní systém vyzraje.
- antigeny nezávislé na thymu
 - jsou schopny aktivovat B-buňky ke tvorbě protilátek přímo, bez pomoci buněk T.
 - obsahují velké, opakující se struktury, jako jsou bakteriální polysacharidy, peptidoglykan nebo flagelin.
 - protilátková odpověď na ně je rychlá, ale omezená jen na tvorbu IgM a bez imunologické paměti.
- antigeny závislé na thymu
 - většina antigenů, především bílkovinných
 - stimulují kromě buněk B i buňky T, které prostřednictvím cytokinů pomáhají B-buňkám tvořit protilátky
 - stimulují jak vznik všech tříd protilátek, tak imunologickou paměť
- z hlediska obrany proti infekci mají největší význam antigeny makromolekul uložených na povrchu mikrobů (povrchové) a antigeny makromolekul uvolňovaných do okolí mikroba (extracelulární)
- často souvisejí s faktory virulence: příkladem jsou antigeny bakteriálního pouzdra či virového obalu nebo antigeny bakteriálních exotoxinů.
- protilátky proti těmto antigenům chrání před opakovanou infekcí (nebo alespoň před zjevným onemocněním čili před vznikem klinických příznaků), a proto jim říkáme protilátky protekční (ochranné).
- antigenům, které vyvolají vznik protekčních protilátek, se říká antigeny protekční (též protektivní).
- známými protekčními antigeny jsou pouzderné antigeny pneumokoků a hemofilů, M-protein pyogenního streptokoka a toxiny tetanický, botulický a záškrťový.

BUŇKY ÚČASTNÍČI SE SPECIFICKÉ IMUNITNÍ REAKCE	
Buňky APC (buňky překládající antigen)	dendritické buňky folikulární dendritické buňky makrofágy aktivované B-buňky
Buňky B:	lymfocyty B → plasmocyty (produkují protilátky) paměťové B-buňky
Buňky T:	cytotoxické lymfocyty Tc (lymfocyty CD8 ⁺) (ničí antigenně změněné buňky) pomocné lymfocyty Th (produkují cytokiny) buňky Th1 (aktivují makrofágy, odpovídají za buněčnou imunitu) buňky Th2 (podněcují vývoj B-buněk, odpovídají za humorální imunitu) supresorové (regulační) lymfocyty Ts (specificky tlumí imunitní reakci) paměťové T-buňky

Buňky účastníci se specifické imunitní reakce

Základními typy buněk, které se účastní na specifické imunitní reakci, jsou buňky předkládající antigen, buňky B a buňky T.

Buňky předkládající antigen (APC)

- nejdůležitější z nich jsou dendritické buňky, dále mezi ně patří též makrofágy, jakož i aktivované B-lymfocyty.
- dendritické buňky získaly název podle svých dlouhých štíhlých výběžků. Zachycují antigeny, zpracovávají je na malé fragmenty, a ty pak ve spojení s molekulami MHC umísťují na svůj povrch a předkládají je buňkám T.
- vyskytují se v celém těle, kolují i v krvi, lymfou jsou dopravovány ze tkání do regionálních mízních uzlin. Tam v parakortikální oblasti nalézají nejvhodnější místo, kde svůj náklad zpracovaného antigenu mohou předat T-buňkám, aktivovat je a stimulovat k další činnosti.
- dendritické buňky se běžně nalézají i ve vnitřních orgánech, v kůži se jim říká buňky Langerhansovy.
- v mozku snad zastávají jejich úlohu astrocyty.
- zcela odlišným druhem buněk jsou folikulární dendritické buňky. Nalézají se v lymfatických folikulech a dovedou na svém povrchu vázat nezpracovaný antigen po mnoho měsíců. Takto vázaný antigen se zdá být nezbytný pro udržování zárodečných center a vznik paměťových B-buněk.

Buňky B

- dozrávají v mikroprostředí kostní dřeně.
- zralé lymfocyty B nesou na svém povrchu molekuly imunoglobulinu, jež slouží jako specifický receptor pro antigen.
- v přítomnosti antigenu a většinou ještě ve spolupráci s buňkami T se z původně malých lymfocytů vyvinou ve velké lymfoblasty, které se začnou dělit a nakonec se změní v buňky plazmatické.
- zralé plazmatické buňky (plazmocyty) se vyznačují přítomností mohutného endoplazmatického retikula. Jejich úkolem je tvorba velkého množství protilátek stejné specifity, jakou nesla původní buňka B.
- u dospělého se vyskytují desítky miliónů klonů buněk B, každý z nich specifický pro jiný antigen.
- buňky B1 - první buňky B, které se objevují během vývoje jedince
 - jsou zdrojem tzv. přirozených protilátek, což jsou málo specifické protilátky třídy IgM často reagující s několika odlišnými antigeny běžných patogenů.
- buňky B2 – označuje se tak většina ostatních buněk B, objevující se objevuje během ontogeneze později
 - na svém povrchu nesou jako receptory pro antigeny imunoglobuliny IgM a IgD a teprve později imunoglobuliny IgG, IgA nebo IgE, reagující samozřejmě s tímto antigenem.
- ke kontaktu B2-buněk s antigenem dochází v mikroprostředí zárodečných center sleziny a lymfatických uzlin

- antigen tu bývá spolu s protilátkou a komplementem lokalizován na povrchu folikulárních dendritických buněk.
- výsledkem kontaktu je tvorba imunoglobulinu jen určité třídy (IgG, IgA nebo IgE).
- zároveň dochází k somatické hypermutaci genů pro B-buněčné receptory. Drobné změny ve struktuře molekuly protilátky sloužící i jako receptor vedou k zesílené schopnosti protilátky vázat antigen (k vyšší specifitě i afinitě vazby). Buňky, které lépe vážou antigen, se lépe aktivují, a proto se rychleji množí.
- selektivně tak vzniká klon B-buněk o vysoké afinitě i antigenní specifitě.
- buňky B2 se na závěr mění v konečné producenty protilátek, v plasmocyty, k tomu dochází již mimo zárodečná centra
- některé antigeny (nezávislé na thymu) dovedou podnítit buňky B ke tvorbě protilátek samy o sobě.
 - např. bakteriální polysacharidy (např. antigeny pneumokokového pouzdra), lipopolysacharidy (O-antigeny gramnegativních bakterií) nebo polymerizovaný flagelin bakteriálních bičíků.
 - společnou vlastností těchto molekul je, že obsahují četné opakující se epitopy, které se vážou na receptory B-buněk a spolu s dalšími signály B-buňky aktivují.
 - vlivem těchto antigenů se však tvoří jen poměrně málo avidní protilátky většinou pouze třídy IgM a nedochází ke vzniku paměťových buněk.
 - přímo stimulovat B-buňky dovedou i některé sekvence mikrobiální DNA.
- většina antigenů však může stimulovat B-buňky jen s pomocí subpopulace CD4 buněk T. Těmito antigenům se říká thymusdependentní nebo též závislé na T-buňkách.
- vedle plasmocytů vznikají z buněk B po styku s antigenem ještě paměťové buňky B.
 - zatímco plasmocyty přežívají jen několik dní, paměťové buňky zůstávají v těle desítky let.
 - tyto buňky jsou příčinou jevu zvaného imunologická paměť.
 - opakovaná (sekundární) reakce na tentýž antigen je daleko rychlejší a mohutnější než reakce primární. Při opakovaném styku s antigenem je totiž k dispozici daleko více buněk, které jsou schopny s ním reagovat.

Buňky T

- nabývají svůj charakter v mikroprostředí thymu.
- dostávají se do něj kmenové buňky z kostní dřeně a pod vlivem thymových hormonů thymopoietinu a thymosinu v něm dozrávají v buňky T.
- vzdor částečné involuci thymu během dospívání se v něm buňky T průběžně vyvíjejí po celý život
- receptor T-buněk:
 - antigeny rozeznávané buňkami T (antigeny thymusdependentní) jsou většinou bílkovinné povahy.
 - receptor T-buněk existuje jen jako struktura zakotvená v buněčné membráně.
 - skládá se ze dvou řetězců, ty jsou většinou typu α/β , méně často γ/δ .

- část receptoru α/β rozeznává cizorodý peptid usazený v prohlubíně molekuly MHC, zbývající část poznává tuto molekulu jako vlastní. Antigenní komplex tvořený peptidem a MHC je uložen na povrchu buněk předkládajících antigen.
- T-buňky s receptorem γ/δ poznávají cizorodý antigen většinou přímo, bez přítomnosti molekul MHC. Tyto buňky se nalézají především v epiteliálních tkáních a předpokládá se, že se uplatňují v časně obraně našich sliznic.
- thymová výchova
 - =dozrávání T-buněk v thymu
 - její podstatou je výběr buněk, které dovedou poznat vlastní molekuly MHC, ale nereagují na vlastní antigeny.
 - většina nezralých buněk T je totiž bezcenná, protože jejich receptory vůbec nerozeznají vlastní molekuly MHC - tyto buňky podlehnou apoptóze.
 - zbytek, jehož receptory se s různou afinitou vážou na vlastní molekuly MHC, se může množit (tomu se říká pozitivní selekce a dochází k ní na epiteliálních buňkách thymové kůry).
 - některé z těchto buněk jsou ale potenciálně nebezpečné a těch se týká takzvaná negativní selekce: lymfocyt, který má receptor s vysokou afinitou pro komplex vlastního antigenu spolu s vlastní molekulou MHC, rovněž podlehne apoptóze.
 - negativní selekce autoreaktivních T-buněk probíhá na povrchu dendritických buněk a makrofágů v dřeni thymu.
 - během výchovy v thymu se mění charakter řady důležitých molekul na povrchu T-buněk. Na povrchu nezralé T-buňky jsou jak CD4, tak CD8, zralá buňka T má už jen jednu z těchto molekul.
 - CD4 se váže na molekulu MHC II. třídy, CD8 na MHC I. třídy.

T-buněčné subpopulace

- z hlediska funkce lze rozeznávat tři velké skupiny T-buněk:
 - cytotoxické (Tc)
 - pomocné (Th)
 - supresorové neboli regulační
- cytotoxické Tc-lymfocyty (CD3+ a CD8+)
 - jsou schopny specificky poznat buňku nesoucí na svém povrchu cizorodé antigeny a zabít ji.
 - účinkují i po transplantaci během odvržení štěpu, případně in vitro v tzv. směsné lymfocytární kultuře.
 - zdají se být podkladem protinádorové imunity.
 - za přirozených podmínek působí hlavně u infekcí vyvolaných virem, jejichž antigeny se vyskytují na povrchu infikovaných buněk. Tyto antigeny jsou buňkami CD8+ poznávány jen v souvislosti s molekulami MHC I. třídy.
 - antigeny MHC I jsou přítomny na všech jaderných buňkách v těle, což každé nakažené buňce umožňuje signalizovat, že se stala nebezpečnou a že by měla být odstraněna.
 - Tc-buňky ale dovedou zabít i buňky se zmutovanými a tedy pravděpodobně defektními proteiny – např. buňky nádorové.

- pomocné Th-lymfocyty (CD3+ a CD4+)
 - spolupracují s buňkami B při jejich stimulaci antigenem.
 - po své aktivaci uvolňují cytokiny, které jsou nutné pro aktivaci, proliferaci a diferenciaci B-buněk
 - podle typu cytokinů, které Th-buňka tvoří, rozeznáváme podskupiny Th1 a Th2.
- lymfocyty Th1
 - vytvářejí hlavně IL-2, IL-12 a také interferon gama, čímž aktivují především makrofágy.
 - podílejí se tak na buněčné imunitě a zánětlivých reakcích, zejména na reakci pozdní přecitlivělosti. Odpovídají tedy za imunitu vůči intracelulárním patogenům - mykobakteriím, virům (zejména herpetickým), toxoplasmám a jiným agens.
 - tyto patogeny indukují v dendritických buňkách tvorbu cytokinu IL-12, což vede k imunitní reakci typu Th1.
 - pozdní přecitlivělost:
 - po naočkování tuberkulinu do kůže
 - během 1-2 dnů se v místě podání objeví zánět charakterizovaný erytémem a indurací.
 - induraci způsobil příliv mononukleárů, zejména makrofágů pocházejících z krevních monocytů.
 - reakci vyvolaly imunní lymfocyty, z nichž se po reakci s antigenem uvolnily cytokiny, které do místa podání antigenu přitáhly monocyty a zadržely je tam.
 - cytokiny uvolněné po styku antigenu nejen přitahují a zadržují makrofágy, ale zároveň je aktivují. Pouze aktivovaný makrofág je schopen fagocytovaná mykobakteria a další intracelulární parazity usmrtit; v neaktivovaných makrofázích tyto patogeny přežívají, množí se, ba dokonce jsou jimi roznášeny po organismu.
- lymfocyty Th2
 - secernují hlavně IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10
 - podněcují tak vývoj B-buněk a tvorbu protilátek čili humorální imunitu.
 - naopak svými působky inhibují činnost makrofágů.
 - protože se systémy buněk Th1 a Th2 navzájem inhibují, je pro výsledek obrany proti patogenu podstatné, který z těchto systémů převládne.
- supresorové lymfocyty
 - subpopulace buněk T, která specificky potlačuje tvorbu protilátek B-buňkami, nebo snižuje schopnost buněk Th1 zahájit reakci buněčné imunity.

Aktivace buněk T

- k aktivaci buněk T dochází během kontaktu s buňkami předkládajícími antigen.
- antigeny extracelulárního původu bývají předkládány pomocným lymfocytům subpopulace Th (CD4+).
- buňky Th se vážou svým receptorem na komplex antigenního štěpu s molekulou MHC II. třídy umístěným na povrchu antigen prezentující buňky
- k aktivaci je třeba ještě dalších, tzv. kostimulačních signálů.
- výsledkem toho je tvorba IL-2, jenž podněcuje množení a diferenciaci T-buněk

- peptidy pocházející z intracelulárních mikrobů (viry, mykobakteria, někteří parazité) se vážou na molekuly MHC I. třídy a přes endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát jsou dopravovány na buněčný povrch.
- tam je rozeznávají cytotoxické Tc-lymfocyty CD8+ a účinkem perforinů a enzymů ze svých granul zničí nakažené buňky obvykle dříve, než se v nich intracelulární parazit stačí rozmnožit.
- i v populaci buněk T se po styku s příslušným antigenem tvoří buňky paměťové
 - vyskytují se ve dvou typech - buňky „výkonné paměti“ a „ústřední paměti“.
 - „výkonné“ paměťové T-buňky
 - tvoří IFN- γ a IL-4, případně jsou nabity perforiny.
 - na povrchu nesou receptory, které jim umožní vstupovat do zanícených míst.
 - mohou tedy začít v periferních tkáních okamžitě působit proti patogenům, které tam pronikly
 - „centrální“ paměťové buňky
 - nesou na povrchu molekuly, jejichž pomocí se zachytí v lymfatických uzlinách.
 - produkují hlavně IL-2 a velmi účinně podněcují dendritické buňky ke tvorbě IL-12.
 - některé však tvoří IL-10 a naopak aktivaci dendritických buněk tlumí.
 - po kontaktu s antigenem vyzrávají a mění se v terminálně diferencované T-buněčné populace.
 - podstatné je, že po primární imunitní reakci existuje v organismu mnohem vyšší počet buněk schopných specificky reagovat s antigenem. Při opakovaném styku s antigenem se tak produkty imunitní reakce objeví a začnou působit dostatečně brzy.

Hlavní histokompatibilní komplex

- vzájemné vztahy mezi buňkami účastnicími se na imunitní odpovědi těsně závisejí na řadě antigenních molekul kódovaných geny takzvaného hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex)
- soubor těchto genů leží u člověka na krátkém raménku šestého chromosomu.
- geny MHC I. třídy
 - nalézají se prakticky na všech buňkách
 - u člověka se tyto antigeny označují HLA-A, HLA-B a HLA-C
- geny MHC II. třídy
 - kódují antigenní molekuly např. na B-lymfocytech a na makrofázích
 - jsou známy jako antigeny HLA-DP, HLA-DQ a HLA-DR
- fyziologickou úlohou MHC je prezentace antigenu.
- na povrchu molekuly MHC je prohlubeň, do níž může být uložen segment předkládaného antigenu. Tak je zajištěno, že příslušné T-buňky rozeznají cizorodý antigen jen v těsné souvislosti s antigeny systému MHC.
- antigeny tkáňové slčitelnosti jsou velmi heterogenní. S výjimkou jednovaječných dvojčat neexistují jedinci, kteří jsou v těchto antigenech shodní.

Solubilní faktory ve specifické imunitní odpovědi

- jedná se o celý systém vzájemně provázaných regulačních proteinů, které zprostředkovávají množství imunologických, ale i neimunologických funkcí.
- obecný název těchto působků je cytokiny
- účinky cytokinů jsou mnohočetné. Nejdůležitější je jejich účast na regulaci obranných reakcí a při vzájemném propojení nervového, endokrinního a imunitního systému.
- tvorba cytokinů, případně jejich uvolnění z buněk jsou indukovány specifickými podněty, například některými bakteriálními produkty.
- cytokiny odpovídají za tvorbu, stimulaci a diferenciaci různých typů buněk a také kontrolují tvorbu jiných cytokinů.
- výsledkem je komplexní, vyvážený regulační systém, jehož cílem je zajistit odstranění mikroba, jenž proniknul do organismu.
- schopnost tvořit určitou sestavu cytokinů často určuje klinický průběh a konečný výsledek infekce. Na druhé straně chybná regulace nebo masivní tvorba cytokinů může vést k šoku, selhání orgánů a k smrti.
- mezi cytokiny lze rozeznávat velkou skupinu interleukinů, interferony, chemokiny a jiné cytokiny, hlavně TNF α .
- účinek cytokinů závisí na přítomnosti příslušných receptorů na povrchu buněk.
- většina receptorů se skládá nejméně ze dvou bílkovinných molekul, jedna má schopnost specificky vázat příslušný cytokin, druhá odpovídá za vznik a přenos odpovídajícího signálu dovnitř buňky.

Interleukiny

- interleukiny získaly svůj název proto, že zprostředkují mimo jiné i vzájemné působení mezi různými leukocyty.
- v obraně proti infekci hrají nejdůležitější roli IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 a IL-12.
- **IL-1**
 - hraje důležitou roli v nespecifické rezistenci
 - jeho účast na specifické imunitní odpovědi je zajištěna tím, že ho tvoří též makrofágy po styku s antigenem
 - aktivuje nejrozličnější buňky včetně buněk T, B, NK, neutrofilů, eosinofilů a mnoha dalších
 - in vivo vyvolává mimo jiné horečku (prostřednictvím IL-6), nechutenství, ospalost, tvorbu proteinů akutní fáze a leukocytózu; odpovídá tedy obecně za obranu proti infekci.
 - indukuje tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů a hematopoetických růstových faktorů, srážení krve a fibrinolýzu.
 - podle struktury se odlišují dva typy: IL-1 α a IL-1 β
- **IL-1ra**
 - označení antagonisty receptoru pro IL-1.
 - protože blokuje vazbu IL-1 na příslušný receptor, inhibuje všechny účinky IL-1.

- IL-2
 - růstový faktor lymfocytů T, podporuje množení a diferenciaci buněk T a B, množení a cytolytickou účinnost buněk NK a tvorbu IFN- γ ,
- IL-4
 - vytvářejí ho hlavně buňky Th2, spolu s IL-5, IL-10 a IL-13. Tyto interleukiny obecně podporují vznik humorální imunity
 - IL-4 specificky podporuje množení a diferenciaci B-buněk a naopak potlačuje mnohé rysy monocytární prozánětlivé reakce - brzdí funkci buněk APC a Th1, inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů (jako IL-1 a TNF- α) makrofágy, tvorbu IFN- γ buňkami T
- IL-5
 - jednak stimuluje růst buněk B, jednak účinkuje na eosinofily: přitahuje je, podněcuje jejich množení a diferenciaci a aktivuje jejich funkce.
- IL-6
 - účinky jsou pestré a zhruba se kryjí s účinky IL-1 a IL-11.
 - IL-6 působí jako endogenní pyrogen, podněcuje hepatocyty k syntéze proteinů akutní fáze a buňky B tvorbě protilátek a stimuluje tvorbu a funkci neutrofilů.
- IL-8
 - především aktivuje neutrofile.
 - pro své význačné chemotaktické vlastnosti se nyní řadí spíše mezi chemokiny
 - tvoří ho makrofágy, i samotné neutrofile
 - na neutrofile působí nejen chemotakticky, ale i aktivačně: vyvolává jejich adhesi na endotelie, degranulaci a respirační vzplanutí.
- IL-10
 - do jisté míry působí podobně jako IL-4, tedy protizánětlivě.
 - mohutně potlačuje funkce makrofágů, zejména produkci prozánětlivých cytokinů, a to cestou inhibice IL-1 a IL-12.
 - na druhé straně posiluje množení B-buněk a tvorbu imunoglobulinů.
 - kontroluje imunitní reakci u parazitárních nákaz: není nutný pro vývoj buněk typu Th2, ale omezuje vývoj buněk typu Th1.
- IL-12
 - zvyšuje cytolytickou aktivitu buněk NK a cytotoxických buněk T
 - na rozdíl od IL-4 a IL-10 působí při dozrávání T-buněk jejich polarizaci k fenotypu Th1, jenž odpovídá za celulární imunitu.
 - je tedy nutný k obraně proti intracelulárním patogenům (leishmaniím, toxoplasmám, listeriím, yersiniím, kryptokokům, ale i schistosomám).
 - většina ochranných účinků je zprostředkována IFN- γ , jehož tvorbu v buňkách NK a T IL-12 indukuje.
 - představuje důležitý spoj mezi vrozenou a adaptivní imunitou.
 - polarizace imunity směrem k odpovědi Th1 nebo Th2 je podmíněna rovnováhou mezi IL-12 a IL-4 v časných fázích imunitní reakce.
- další:
 - IL-13 - je protizánětlivý cytokin, který inhibuje tvorbu řady cytokinů v monocytech a naopak stimuluje množení a diferenciaci buněk B.
 - IL-15 - účinkuje přibližně jako IL-2, zejména aktivuje buňky T a NK.
 - IL-16 - působí chemotakticky na T-buňky: účastní se na zánětlivých reakcích typu granulomů při pozdní přecitlivělosti.
 - IL-17 - je prozánětlivý cytokin indukující např. tvorbu IL-6 a IL-8.

Interferony

- IFN- γ , zvaný též imunní, je produkován především buňkami T jako odpověď na antigen nebo mitogen.
- hraje velmi důležitou úlohu zejména na začátku imunitní reakce.
- stimuluje mimo jiné činnost makrofágů, neutrofilů a cytotoxických T-buněk a indukuje množení subpopulace Th1
- podněcuje expresi molekul MHC na povrchu buněk a podporuje ničení patogenů uvnitř makrofágů i neutrofilů.
- potlačuje naopak množení producentů IL-4 (buněk Th2)

Chemokiny

- prozánětlivé cytokiny s chemotaktickým účinkem
- na neutrofile působí chemotakticky, ale i aktivačně, hlavně skupina chemokinů CXC neboli α (například GRO α)
- na monocyty pak účinkují chemokiny ze skupiny CC

Ostatní cytokiny

- TNF α (z angl. tumor necrosis factor) neboli kachektin je velice účinným mediátorem zánětu, imunity a funkcí endoteliálních buněk a tudíž důležitým faktorem v obraně proti infekci.
- tvoří se v řadě buněk například účinkem endotoxinu.
- TNF α aktivuje množství rozmanitých buněk, jeho vazba na příslušné receptory vede k signálům nejen pro množení buněk, ale i pro jejich apoptózu (název dostal proto, že zabíjí nádorové a infikované buňky)
- tyto signály jsou nutné pro řádnou funkci imunitního systému, přehnaná signalizace ale vede k těžkým zánětlivým reakcím, k poškození tkání až k šoku.

Protilátky

- jako protilátky označujeme imunoglobuliny schopné se specificky vázat s antigenem.
- důsledkem této vazby bývá zneškodnění, případně odstranění antigenu z makroorganismu.
- protilátky se nalézají především v gamaglobulinové frakci krevního séra. Jeden litr plazmy obsahuje kolem 15 g různých imunoglobulinů.
- imunoglobuliny existují ve dvou formách:
 - 1) kolují v organismu jako běžná protilátka vytvořená vyzrálými plasmatickými buňkami
 - 2) ukotvené v buněčné membráně buněk B slouží jako receptor pro antigen.

41. Antigeny mikrobů

Antigeny na thymu nezávislé (independentní)

- jsou schopny přímo stimulovat B-buňky k tvorbě protilátek, bez pomoci T-buněk
- obsahují velké opakující se struktury (polysacharidy – peptidoglykan ..., bílkoviny - flagelin ...)
- imunitní odpověď na ně je rychlá, omezená na IgM
- bez tvorby paměťových buněk – chybí možnost sekundární odpovědi, opakované setkání s týmž antigenem indukuje opět jen přechodnou syntézu IgM

Antigeny na thymu závislé (dependentní)

- současná stimulace buněk B i T
- buňky T pomáhají pomocí cytokinů buňkám B při tvorbě protilátek
- stimulují tvorbu všech tříd protilátek
- stimulují vznik imunologické paměti - rozvoj rychlé, mohutné a účinnější sekundární (anamnestické) odpovědi, tj. titr protilátek stoupá rychleji, dosahuje vyšších hodnot a avidity (specifičtější a pevnější vazba), tzv. booster efekt
- význam při ochraně proti infekci – protekční antigeny – protekční protilátky

Antigeny bakterií

1) Povrchové antigeny

a) bičíkové

- u pohyblivých druhů
- tvořeny proteinem flagelinem (H antigeny)
- protilátky obvykle nebývají protekční (výjimkou sekreční IgA bránící kolonizaci střeva *Vibrio cholerae*)
- u salmonel dvě fáze: 1. specifická, typická pro různé druhy salmonel, 2. nespecifická, mnoha druhům společná
- pochyvy axiálních vláken –u spirochet (např. leptospir), vznik protekčních protilátek

b) fimbriální

- bílkovinné faktory adherence - kolonizace sliznic (enterobakterie ...)
- hlavně u enterobakterií, také u gonokoků, korynebakterií

c) bílkoviny stěny

- protein M u *S. pyogenes* - v podobě výběžků zakotvených v buněčné stěně, přilnutí k epiteliím, ochrana před fagocytózou - tvorba typově specifických protekčních protilátek; M protein je slabý imunogen, protilátky proti němu se objeví až po několika měsících
- protein A u *S. aureus* - vazba na Fc fragment IgG - blokáda opsonizace; protein A využíván ke koaglutinaci (reakce k důkazu rozpustných Ag, kdy protilátka je navázána stafylokoka právě díky proteinu A, v pozit. případě dojde k reakci Ag a protilátky, to se projeví viditelnou aglutinací protilátkami obalených stafylokoků)

d) sacharidové

- pouzderné
 - chrání bakterie před fagocytózou (díky své hydrofilní povaze – čím je povrch bakterie hydrofilnější, tím snáze bakterie uniká fagocytu z objetí panožek) a ochrana před bakteriofágy
 - antigen Vi u *S. typhi* nebo antigen K u *E. coli* – ochrana před bakteriolytickým účinkem komplementu
 - jejich imunogennost závisí hlavně na jejich molekulové hmotnosti
 - indukují tvorbu protekčních protilátek přímým účinkem na B lymfocyty bez spoluúčasti T
 - důležité faktory virulence u pneumokoků, meningokoků, *H. influenzae* typu b, streptokoky skupiny B, *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. Aureus*
- kyseliny teichoové v BS, kys. lipoteichoové v CM
 - u G+ bakterii
 - imunogenní, protilátky reagují zkříženě s jinými G+ bakteriemi
 - vlastnosti shodné s endotoxinem G-, ale jsou nepyrogenní a netoxické
- O-antigen
 - = endotoxický lipopolysacharid G- bakterii = tělový antigen = O antigen
 - ve velkém množství na povrchu CM, kterou stabilizuje
 - termostabilní (antigennost si zachovává i při vaření)
 - u řady bakterii prostupuje až na povrch – je jejich hlavním povrchovým antigenem, slouží k serologické klasifikaci druhů (salmonely, shigely, escherichie)
 - struktura:
 - 1. lipid A, zakotven v zevní membráně
 - 2. vnitřní polysacharid
 - 3. koncový O-specifický polysacharid (vlastní O-antigen) - směřuje ven, řada opakujících se oligosacharidových jednotek, kmeny, které tuto koncovou část postrádají, jsou méně virulentní (rostou v drsných koloniích = R-fáze), naproti tomu kmeny s touto strukturou rostou v hladkých koloniích = S-fáze)
 - pyrogenita, letální toxicita, schopnost vyvolat akutní hypoglykémii, DIC, oběhovou hypotenzi až šok, schopnost aktivovat komplement alternativní dráhou, stimulovat makrofágy, nekrotizovat nádory – za většinu z tohoto odpovídá lipid A, zprostředkováno TNF (ten se vlivem endotoxinu uvolňuje např. z makrofágů)
 - dobrý imunogen, často i protekční antigen, jeho toxicita ale znemožňuje jeho použití ve vakcínách
- společný antigen enterobakterii
 - glykofosfolipid, v zevní membráně
 - vysoce imunogenní, na povrchu neopouzdrěných kmenů enterobakterií
- peptidoglykan murein
 - dobrý imunogen, nespecificky aktivuje lymfocyty B a makrofágy

e) Forssmanův antigen

- glykolipid v buněčné stěně někt. bakterií (pneumokoky, salmonely, shigely, klostridia)
- nalézáme ho v erytrocytech a ve tkáních někt. zvířat (kůň, ovce, slepice)
- u forssmannegativních druhů (králík, člověk) vyvolává tvorbu heterofilních protilátek – ty reagují a erytrocyty ostatních forssmanpozitivních druhů

2) antigeny produkované do zevního prostředí

- toxické proteiny a enzymy, jež jsou antigenní, hlavně u G+ bakterií
- *S. aureus*, *S. pyogenes* secernují až desítky různých Ag
- důležité v patogenezi infekcí: tetanický, botulický, difterický toxin – tyto exotoxiny jsou jediným faktorem virulence, proto zde antitoxická imunita poskytuje účinnou ochranu před onemocněním
- protilátky proti bakteriálním produktům využíváme u serologické diagnostiky infekčního onemocnění – např. důkaz protilátek proti streptolysinu O

Antigeny virů, parazitů a hub

Antigeny virů

proteiny, nukleoproteiny, glykoproteiny

- nestrukturální
 - výskyt pouze během replikace viru v infikované buňce, nejsou součástí virionu, jedná se o virem kódované enzymy
- strukturální
 - povrchové - bílkoviny zevní části kapsidy neobalených virů a glykoproteiny obalu, vysoce specifické (chřipka), protilátky většinou protekční => chrání před opakovanou infekcí
 - vnitřní – bílkoviny a nukleoproteinové komplexy nukleoidu nebo nukleokapsidy, méně specifické, většinou nejsou protekční, průkaz KFR, používá se solubilní antigen = hrubý extrakt z infikovaných bb., obsahuje strukturální i nestrukturální Ag

Antigeny hub

- polysacharidy buněčné stěny hub - při povrchu buněčné stěny
 - chitin (většina hub), chitosan (zygomycety), mannan (basidiomycety), glukany (hyfomycety, dermatomycety), mannany i glukany (kvasinky, askomycety)
- proteiny, glykoproteiny – uloženy spíše při buněčné membráně
- stěna hub je pro makroorganismus značně cizorodá, tedy vysoce antigenní
- savčí tkáně neobsahují enzymy účinně štěpící stěny hub
- většina dospělých lidí imunní vůči nejběžnějším glukánům a mannánům plísní a kvasinek

Antigeny parazitů

antigenní výbava je různá podle morfologického stadia vývojového cyklu

- exogenní - uvolňují se z parazita do okolí, jde o produkty metabolismu (malárie) nebo o faktory virulence (proteáza měňavek)
- endogenní - často se uplatní až po odumření a rozpadu parazita (O a H antigeny bičíkovců), proteiny buněčné membrány ...

zkřížená příbuznost: společné antigeny např. u různých druhů trypanosom, schistosom, tasemnic a dalších, i mezi parazity a bakteriemi (leishmanie a mykobakterie, škřavky a pneumokoky, trichinelly a Salmonella Typhi)

42. Očkovací látky a aktivní imunizace

- imunizace = proces vedoucí ke vzniku imunity.
- aktivní imunizace – jedinec si vytváří imunitu sám
- pasivní imunizace – jedinec je pouze pasivním příjemcem hotových protilátek

Možnosti imunizace

- přirozená imunizace
 - aktivní imunizace – vzniká po prodělení infekce, promoření. Tělo se samo aktivně podílí na vzniku imunity
 - pasivní imunizace – plod v matčině těle, kdy prostupují mateřské protilátky transplacentárně, resp. při kojení
- umělá imunizace (arteficiální)
 - aktivní imunizace – očkování, podáváme mikrobiální antigeny v podobě očkovacích látek (vakcín) a tělo se aktivně podílí na tvorbě protilátek. Používá se k ochraně osob ohrožených pouze potenciálně. Výhodou je vznik dlouhodobé ochrany, nevýhodou, že účinek nastupuje později
 - pasivní imunizace – k profylaxi osob bezprostředně ohrožených, nebo při léčbě infekce. Podávání antisér, výhodou je okamžité získání stavu imunity, ale nevýhodou, že tento stav trvá jen několik týdnů. Dále existuje riziko alergizace na cizorodou bílkovinu, příp. riziko parenterálního přenosu jiných infekcí.

Aktivní imunizace

- slovo vakcína je odvozeno od lat. vacca (kráva), souvisí s Jennerovým očkováním proti variole (pravým neštovicím) tekutinou z puchýřků kravských neštovic.
- není nutné očkovat celými mikroby, výhodnější je, aby vakcína obsahovala jen jejich protekční antigeny, např. toxiny, pouzderné polysacharidy, povrchové antigeny nebo obalové glykoproteiny
- většinou opakované podání – vede k vyšší hladině protilátek (booster efekt = upomínací efekt)
- k získání dostatečné imunity zpravidla slouží:
 - základní očkování -event. třemi impulsy
 - přeočkování - opakované podání antigenu v delším intervalu
- význam očkování není jen v ochraně jedince, ale v ochraně populace. Jen vysoká, alespoň 95% proočkovanost zamezí přenosu agens na neimunní jedince a sníží tak nemocnost a úmrtnost na příslušnou infekci.
- díky očkování se u nás už několik let nevyskytuje poliomyelitida nebo záškrť

Typy očkovacích látek

1) Toxoidy (anatoxiny)

- bakteriální toxiny zbavené jedovatosti, obvykle formalinem
- jsou antigenně shodné s výchozími toxiny, a proto protilátka (antitoxin) vzniklá na jejich popud je schopna toxin zneutralizovat.
- k prodloužení antigenního účinku se vážou na nosiče zvyšující tvorbu protilátek, tzv. adjuvans.
- nutné očkovat několika dávkami a přeočkovávat.
- příklady
 - *tetanický* – jednak preventivně při pravidelném očkování, jednak profylakticky u poranění. U řádně proočkovaného jedince stačí jediná dávka toxoidu rychle obnovit účinnou hladinu protilátek
 - *difterický*
 - *stafylokokový* anatoxin (směs detoxifikovaných toxinů α , β a δ)

bakteriální: tetanický, difterický, stafylokokový

2) Inaktivované vakciny

- bakteriální (bakteriny)
 - připravují se z bakteriálních suspenzí usmrcených tak šetrně, aby se zachovaly protekční antigeny (to platí i pro virové)
 - nutné je podávat je opakovaně
 - vzhledem k odlišné patogenезe nákaz nejsou zdaleka tak účinné jako toxoidy.
 - příklad:
 - *pertusse* - celobuněčná vakcína, podává se v trojkombinaci (záškrt + tetanus + pertusse). Pertussová složka v ní působí zároveň jako imunogen i jako adjuvans.
 - *pseudomonádová* vakcína
 - *břišní tyfus, cholera* – pro nežádoucí reakce a nízkou účinnost se používají jen zřídka
- autovakciny
 - = vakciny vyrobené z mikrobiálního kmene vypěstovaného přímo od nemocného
 - jsou vyrobené jak z normální mikroflóry, tak i z respiračních patogenů (zlatých stafylokoků, pneumokoků a hemofilů). Pokoušíme se jimi o desenzibilaci např. u alergických stavů (asthma bronchiale).
 - pokud se používají do zásoby pro ostatní nemocné, říká se jim zásobní vakciny (slangově stockvakciny). Často se používají perorálně, mnohé působí spíše jako nespecifické modulátory imunity.
- virové inaktivované vakciny
 - připravují se z celých virionů šetrně usmrcených např. formalinem
 - *chřipka* - celovirovou vakcínu v dnešní době nahradily vakciny z chemicky rozštěpených virionů (vakcína typu split) a vakciny z izolovaných subjednotek chřipkových virů.

- *vzteklina* - po pokousání zvířetem se profylakticky očkuje vakcinami připravenými na tkáňových kulturách, virus je inaktivován beta-propiolaktonem
- dále *klíšťová encefalitida*, *hepatitida A*, *kombinovaná proti hepatitidám A a B*, *IPV proti poliomyelitidě*

bakteriální: pertusse, proti pseudomonádám, bacterium adnexitidicum (k chronickým zánětům vnitřních rodidel – adnexitidy – směs proti stafylokokům, streptokokům, enterokokům, escherichiím, gonokokům)

virové: proti chřipce, vzteklině, klíšťové encefalitidě, hepatitidě A (i smíš. s HBV), poliomyelitidě...

3) Chemovakciny a rekombinantní vakciny

- chemovakciny jsou připravené z izolovaných protekčních antigenů (je nutná identifikace, izolace a vyčištění).
- rekombinantní vakciny = pokud se chemovakciny připravují pomocí geneticky upravených organismů (kvasinky a *E.coli*), do nichž byla vložena DNA pro tvorbu příslušného protekčního antigenu
- bakteriální:
 - *H. influenzae* typ b – obsahuje polyribosylribitolfosfát, ke zvýšení účinku je konjugovaný s proteinovým nosičem. Existuje i kombinovaná vakcína proti záškrtu+tetanu+pertussi+hemofilům, kde je pertussový bakterin nahrazen směsí pertussového anatoxinu, vláknitého hemaglutininu a pertaktinu
 - *N. meningitidis* sk. A a C
 - *S. pneumoniae* – 23valentní vakcína, obsahuje čištěné antigeny 23 nejčastějších typů pneumokoka
 - *S. Typhi* – z kapsulárního antigenu Vi
- virové
 - *chřipka*:
 - 1) typu split- vyrobená rozštěpením virionů pomocí detergentů a purifikací získaných fragmentů, které obsahují antigeny aktuálně se vyskytujících kmenů chřipky
 - 2) subjednotkové vakciny- obsahují izolované antigenní glykoproteiny- hemaglutinin a neuraminidáza
 - *hepatitida A*, *klíšťová encefalitida*, *varicella-zoster*
 - *hepatitida B* – obsahuje čistý HBsAg, připravuje se z kultury kvasinek, do níž byl vnesen gen pro HBsAg

bakteriální: proti infekcím *Haemophilus influenzae* typ b, pertussi, *Neisseria meningitidis* sk.A a C, pneumokokovým infekcím , břiš.tyfu (připravena z kapsulárního antigenu Vi), Q-horečce

virové: proti chřipce

4) Živé atenuované vakcíny

- obsahují živé, ale oslabené kmeny mikroorganismů
- připravují se z méně virulentních kmenů, které se dále oslabují dlouhodobým pasážováním na umělých půdách a v případě virových vakcín na buněčných kulturách.
- jsou velmi účinné, neboť se mírně pomnožují a vyvolávají tak místní mírnou infekci, to pak vede ke vzniku solidní a dlouhodobé imunity nejen protilátkové, ale i buněčné.
- uplatňují se v obraně proti infekcím vyvolanými fakultativně intracelulárními patogeny
- virové vakcíny s živými oslabenými viry se osvědčily v prevenci chorob vyvolaných viry o malém počtu antigenních typů a u nichž se infekce generalizuje.
- příklady:
 - *tuberkulóza* – BCG vakcína, z bovinního mykobakteria oslabeného mnohaletým pasážováním na bramboru se žlučí
 - *tyfus, cholera*
 - *poliomyelitida* – OPV, trivalentní p.o. vakcína, připravena ze všech tří typů viru
 - *spalničky, příušnice, zarděnky, žlutá zimnice, varicella, variola*

bakteriální: BCG proti tuberkulóze, břiš. tyfu, choleře

virové: poliomyelitida, smíšená proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám, proti žluté zimnici, varicelle, návnadová očkovací látka proti vzteklině

Druhy očkování

1) pravidelné

- očkování všech osob určitého věku, příp. osob s vyšším rizikem infekce z důvodu jiných, než pracovních
- očkování proti:
 - TBC – novorozenci ve 4. dnu – 6 týdnu; ve věku 11 let se provede tuberkulinový test dle Mantouxové. Při negativním výsledku se přeočkují
 - záškrť, tetanus, pertusse
 - hemofilové infekce
 - poliomyelitida
 - virová hepatitida B
 - spalničky, zarděnky, příušnice
 - chřipka, pneumokok
 - hepatitida A a hepatitida B – u neprofesionálního poranění injekční jehlou
- hexavakcína – zahrnuje záškrť, tetanus, pertussi, hemofila b., poliomyelitidu a HBV

- 2) zvláštní
 - u osob vystavených zvýšenému riziku nákazy, osoby musí být imunizovány ještě před započítáním jejich činnosti na rizikovém pracovišti
 - očkování proti:
 - virová hepatitida B – zdravotníci, pracovníci ústavů soc. péče, zaměstnanci záchranných složek
 - vzteklna – pracoviště, kde se pracuje s lyssavirem
 - chřipka – pracovníci LDN, pečovatelských domů, domovů důchodců
 - meningokok – pracovníci zdravotnické záchr. služby, pracovníci některých lůžkových oddělení (ARO, infekční, dětské lůžkové odd)
- 3) mimořádné
 - k prevenci infekcí v mimořádných situacích – hrozící epidemie chřipky, hepatitidy, meningokokové meningitidy, hrozba teroristického útoku antraxem apod.
- 4) při úrazech, poraněních a nehojících se ranách
 - proti tetanu a vzteklině
- 5) před cestou do zahraničí
 - podle místa a délky pobytu
 - očkování proti:
 - žluté zimnici
 - meningokokové meningitidě (A, C, Y, W135)
 - ověří, resp. obnoví se očkování proti tetanu, poliomyelitidě a záškrtu
 - břišní tyfus, cholera, japonská encefalitida B, virové hepatitidy A a B, vzteklna
- 6) na vlastní žádost
 - klíšťová encefalitida
 - meningokoková meningitida
 - chřipka

Reakce po očkování a kontraindikace

- reakce po očkování dělíme na
 - očekávané - jsou dány povahou očkovací látky (bolesti svalů jako reakce na minerální nosič, teplota, vyrážka)
 - neobvyklé vedlejší reakce - jsou vzácné, často vznikají v pouhé časové, nikoli příčinné souvislosti s očkováním. Vždy se však musí hlásit orgánu ochrany veřejného zdraví
- očkování představuje pro imunitní systém určitou zátěž, proto může být při některých stavech kontraindikováno
- mění se po něm i úroveň specifické rezistence: v prvním týdnu po očkování klesá, v druhém stoupá.
- neočkují se zpravidla nemocní, podezřelí z nákazy, rekonvalescenti nebo oslabení. Opatrnost je na místě při těhotenství a alergických stavech.

43. Protilátky

Protilátky (imunoglobuliny)

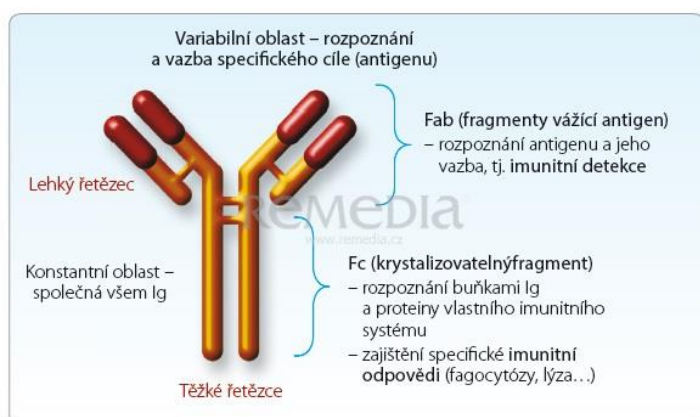
- bílkoviny produkované plasmatickými buňkami, schopné specifické vazby s antigenem - důsledkem je zneškodnění nebo odstranění antigenu z organismu
- nalézají se převážně v gamaglobulinové frakci krevního séra
- výskyt ve 2 formách jako
 - protilátka kolující v organismu
 - receptor pro antigen v membráně buněk B

Stavba imunoglobulinů

- základní stavební jednotkou jsou čtyři polypeptidové řetězce:
 - 2 těžké (H)
 - vyskytují se v 5 strukturálních a antigenních typech: γ , μ , α , ϵ , δ
 - podle nich se rozeznává 5 tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD
 - 2 lehké (L)
 - vyskytují se ve 2 strukturálních a antigenních typech: κ , λ
 - každá molekula má jen jeden typ lehkého řetězce (κ nebo λ)
- spojené nekovalentními hydrofobními silami a disulfidovými můstky do tvaru písmene Y

Enzymatickým štěpením (pomocí papainu) se dá IgG rozštěpit na:

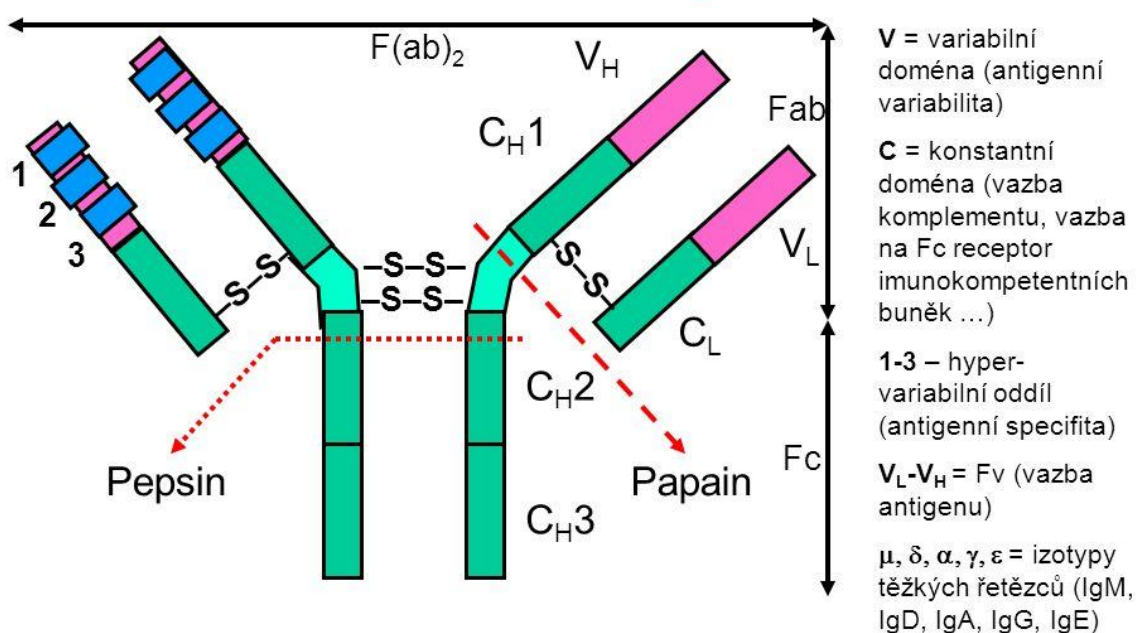
- dva fragmenty Fab (antigen binding)
 - protilátková aktivita
 - obsahují celý lehký řetězec, a asi 1/2 těžkého
 - obsahují vazebná místa pro konkrétní Ag - komplementární k jeho determinantě
 - jeden fragment Fc (crystallisable)
 - neváže antigen
 - představuje spojené poloviny těžkého řetězce
 - dovede fixovat komplement, přichycovat se na různé buňky (makrofágy ...)
- molekula protilátky je poměrně ohebná, a to zejména v místě, kde se rozevírají raménka písmene Y. Změna postavení fragmentů Fab a Fc je důležitá pro další funkci protilátky (aktivace komplementu, vazba na Fc receptory leukocytů)



Doména:

- globulární útvar do kterého je poskládán řetězec a spojen pomocí disulfidických můstků
 - o na lehkých řetězcích jsou 2 domény (V_L , C_L)
 - o na těžkých 4-5 domén (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4})
 - aminokyselinové složení domén může být:
 - o konstantní (domény C)
 - o variabilní (domény V) - na aminotermiálním konci řetězců (na volných koncích ramének). Protilátky proti různým antigenům se liší složením této domény
 - variabilní domény H a L řetězců spolu sousedí - tvoří vazebné místo protilátky (komplementární obraz antigenní determinanty)
-
- síly, které vážou protilátku s antigenem jsou poměrně slabé: van der Waalsovy síly, iontová vazba, vodíkové můstky a hydrofobní interakce
 - prostorově chemická konfigurace antigenní determinanty musí co nejpřesněji odpovídat svému zrcadlovému obrazu ve vazném místě protilátky - to se děje díky ohebnosti protilátkové molekuly (rozevírání písmene Y) a díky možnosti mírného posunu domén V_H a V_L
 - afinita protilátky – vzájemná síla vazby mezi jednou konkrétní determinantou antigenu a jedním konkrétním vazebným místem protilátky
 - avidita protilátky - síla celkové vazby mezi komplexním Ag, který obsahuje mnoho různých determinant a sérem s řadou Ig

Struktura imunoglobulinu



Třídy imunoglobulinů:

IgG

- hlavní složka humorální imunity- 85% γ - globulinové frakce
- poměrně malá molekula – snadno se dostává z krve do tkání
- přenášen přes placentu do plodu – jsou podkladem přirozené pasivní imunity
- neutralizují toxiny a viry, usnadňují fagocytózu aglutinací
- na počátku imunitní reakce ještě nedokonale specifické - mají nízkou aviditu a málo pevnou vazbu s antigenem. Najdeme-li ve vzorku séra protilátky vysokoavidní, značí to, že k infekci došlo již před delší dobou
- podle rozdílů v stavbě Fc se dělí na 4 podtřídy: IgG1 až IgG4

IgG 1 a IgG 3:

- tvoří se jako odpověď na bílkovinné antigeny a výborně se vážou na receptory pro Fc-fragment makrofágů a neutrofilů, tím se zlepšuje vychytávání antigenů a fagocytóza bakterií
- dobře aktivují komplement klasickou cestou

IgG 2:

- převážně odpověď na polysacharidové antigeny bakteriálních pouzder
- aktivují alternativní dráhu komplementu,
- zesilují fagocytózu, protože opsonizují polysacharidová pouzdra bakterií a opsonizované bakterie se pak dobře vážou na polymorfonukleáry

IgM

- má ze všech největší molekulu, tvoří cca 5-7% celkového imunoglobulinu
- tvoří pentamer, skládá se z pěti čtyřřetězcových jednotek spojených další strukturou, zvanou řetězec J (joining)
- hvězdovitý tvar IgM se po kontaktu s antigenem změní – připomíná pak pětinožého kraba
- z prostorových důvodů se uplatňuje pouze 5 vazebních míst z očekávaných 10
- v podobě monomeru jsou na povrchu B-buněk, jako receptor pro antigen
- výborně aglutinuje a váže komplement => pomáhá odstraňovat bakterie
- tvoří se na začátku imunitní reakce a působí hlavně v krevním oběhu, kvůli své velké molekule obtížně proniká do tkání
- přes placentu neprochází
- významná složka slizniční imunity
- patří sem plno tzv. přirozených protilátek: proti bakteriím, proti antigenům krevních skupin, protilátky heterofilní. Jako přirozené se označují protože se nalézají u jedince, aniž u něho proběhla prokazatelná infekce.
- průkaz IgM svědčí o probíhající nebo nedávno proběhlé infekci (protože se tvoří na začátku imunitní reakce)
- IgM nemá opsonizační funkci.

IgA

- v plazmě málo, je však významná složka sekretů sliznic (alimentární, respirační a urogenitální trakt), nalézá se rovněž v kolostru
- sérový IgA jako monomer i dimer (obě jednotky spojeny řetězcem J)
- sekreční IgA jen jako dimer, navíc obsahuje tzv. sekreční složku
- většinou tvořeny plazmocyty v submukóze zažívacího traktu
- brání adhezenci bakterií na epitelie sliznic, na sliznicích neutralizuje viry
- nemá schopnost aktivovat komplement

IgE

- v séru jen stopově, v množství ještě nižším než IgD; nalézá se též ve střevě
- ve zvýšeném množství při alergiích (pyl, srst, plísně, prach) a nemocích vyvolaných prvoky a červy
- váže se Fc fragmentem na žírné buňky a bazofily a uvolňuje z jejich granul histamin a další vazomotorické látky
- k degranulaci dochází okamžitě, což vede k projevům časně alergické reakce např. na kůži nebo sliznici dýchacího traktu
- dále mají úlohu v antiparazitární obraně (stimuluje procesy k vypuzení): mediátory, vazodilatace, vykašlání, vykýchání, zvýšení peristaltiky střev, průjem.
- vyskytují se zvláště ve slezině, mandlích, mukózních membránách plic a mukózních membránách gastrointestinálního ústrojí.

IgD

- v séru je ho málo; vyskytuje se hlavně na povrchu většiny lymfocytů B, jako receptor pro příslušný antigen
- fungují současně s IgM
- vyvolává uvolňování histaminu z mastocytů a bazofilních leukocytů. Po vazbě na antigen se také spolupodílí na rozvoji senné rýmy či alergického astmatu.

VLASTNOSTI JEDNOTLIVÝCH TŘÍD IMUNOGLOBULINŮ					
imunoglobulin	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
hlavní význam	opsonizace, neutralizace	likvidace bakteriémie	ochrana sliznic	obrana proti parazitům, alergické stavy	?
hlavní místo účinku	sérum	sérum	sekrety	žírné buňky	lymfocyty
klasická vazba komplementu	++	++++	-	-	-
přestup přes placentu	++	-	-	-	-

Průběh tvorby protilátek

- primární odpověď na antigen se liší od všech opakovaných neboli sekundárních.
- po prvním styku s antigenem trvá asi deset dnů, než se dají protilátky prokázat
- první protilátky bývají IgM + IgG
- po skončení antigenní stimulace IgM do týdne až měsíce vymizí. Mezitím dosáhnou IgG vrcholu a asi za měsíc hladina klesá, vymizí po měsících až letech. Jejich avidita je na počátku primární reakce nízká
- sekundární odpověď vzniká po opakovaném styku s antigenem
- IgG se objevují daleko rychleji (asi do týdne), dosahují mnohem vyšších hladin, které perzistují a jen velmi pomalu klesají (často jsou prokazatelné celý život). Jejich avidita je vysoká
- příčinou odlišného průběhu je přítomnost paměťových buněk, které po primární reakci zůstaly v organismu
- tím se zvýší počet imunokompetentních buněk, jež jsou pro daný antigen k dispozici a proto se celá odpověď rozvine daleko rychleji a mohutněji
- důsledkem sekundární reakce bývá, že opakovaný styk s agens může probíhat nepozorovaně, bez vzniku chorobných příznaků
- pokud se antigen při opakovaném styku poněkud liší od antigenu původního, vzniknou protilátky, které daleko lépe reagují s původním antigenem, než s jeho novou variantou. Tento jev se nazývá anamnestická reakce. Často ve virologii

Význam protilátek

- Podpora fagocytózy
 - opouzdřené bakterie (např. pneumokoky) odolávají fagocytóze, protože nelnou k povrchu fagocytu (polysacharidové pouzdro je vysoce hydrofilní)
 - navázané opsonizující protilátky zvýší hydrofobnost pouzdra a vazba mezi Fc-fragmentem protilátky a Fc receptory na povrchu fagocytů umožní pevné přilnutí a pohlcení mikroba
 - na podpoře fagocytózy se podílí i komplement – chemotakticky (C5a, C3a) i opsonizačně (C3b)
- Zábrana adherence
 - hlavně sekreční protilátky IgA v hlenu na sliznicích
 - vážou se na povrchové antigeny bakterií (fimbrie) a blokují tak jejich vazbu na receptory epitelů
- Neutralizace toxinů
 - exotoxiny jsou hlavním faktorem virulence některých bakterií, většinou bývají výbornými imunogeny a stimulují tvorbu protilátek
 - neutralizace – inhibice určité biologické vlastnosti toxinu, infekčnosti viru, či jeho schopnosti aglutinovat krvinky apod.
 - neutralizovat dovedou jen IgG, zato velice účinně i v nepatrných titrech
 - prostorově inhibují vazné místo toxinu
- Bakteriolýza
 - vyvolaná klasickou drahou aktivace komplementu komplexem antigen-protilátka
 - význam hlavně u G- mikrobů

- Průkaz protilátek
 - precipitace
 - aglutinace
 - vazba komplementu
 - neutralizace
 - reakce se značenými složkami

44. Pasivní imunizace

- přirozená
 - transplacentární přenos protilátek z matky na plod (IgG)
 - méně významný přenos mateřským mlékem (IgA v kolostru)
- umělá
 - podávání hotových protilátek
 - účinek je okamžitý, ale krátkodobý (několik týdnů)
 - riziko alergizace na cizorodou bílkovinu
 - využití v případech, kdy infekce hrozí nebo již propukla
- dříve se používala tzv. antiséra = kompletní zvířecí séra obsahující příslušné protilátky, dnešní moderní přípravky jsou izolované imunoglobuliny.

1) Heterologní (zvířecí) séra

- zvířecí léčebná a profylaktická séra se získávají usilovnou imunizací (hyperimunizací) nejčastěji koní
- jsou však pro člověka silně antigenní a organismus se je snaží rychle odstranit, proto je imunita jen krátkodobá.
- opakované podání séra vyvolá sekundární imunitní reakci, která vede ještě k rychlejší eliminaci zvířecích bílkovin.
- komplikací (i prvního podání) může být sérová nemoc a anafylaktický šok. Těmto reakcím čelíme frakcionovanou aplikací, použitím séra z jiného zvířete a pečlivou přípravou preparátů.
- dnešní antiséra jsou jen čištěné globuliny, enzymatickým štěpením částečně zbavené antigennosti. Nazýváme je imunoséra.
- používají se nejčastěji antitoxické globuliny:
 - globulin proti botulinismu (botulotoxinům A,B,E)
 - globulin proti plynaté sněti (α -toxinům klostridií)
 - globulin proti zmijímu jedu- neutralizuje jedy zmijí
- sérum proti záškrtu (Nobelova cena 1901, von Behring) se už nepoužívá
- dále existují:
 - sérum proti vzteklině
 - sérum proti otravě digoxinem

2) Homologní (lidské) imunoglobuliny

- slouží jednak k profylaxi a terapii některých infekcí, jednak jako náhrada protilátek u imunodeficitů
- rozeznáváme dva druhy homologních imunoglobulinů:
 - normální lidský imunoglobulin
 - specifické imunoglobuliny

Normální lidský imunoglobulin

- 16 % roztok gamaglobulinové frakce lidské plazmy
- pochází ze směsi plazem aspoň 1000 zdravých dárců, tudíž obsahuje protilátky proti všem v populaci běžným infekcím zanechávajících protilátkovou imunitu.
- použití u viróz - např. profylaxe hepatitidy A při kontaktu s nemocným.
- význam u bakteriálních infekcí menší - u poruch tvorby protilátek; k i.v. aplikaci se doporučuje u sepsí, těžkých hnisavých infekcí, meningitid.

Specifické imunoglobuliny

- připravují se z plazmy imunizovaných dárců, tedy z plazmy o vysokém titru příslušných protilátek.
- příklady:
 - tetanický lidský imunoglobulin
 - anti-Rh0 - k prevenci izoimunizace Rh- žen
 - protistafylokoková plasma
- daleko více se používají k profylaxi a terapii virových infekcí:
 - profylaxe hepatitidy B (např. u zdravotníků poraněných infikovanou jehlou; těhotných žen),
 - profylaxe vztekliny, klíšťové encefalitidy
 - profylaxe a terapie varicelly a zosteru, cytomegalovirových infekcí – obojí u imunosuprimovaných

3) monoklonální protilátka proti RS-viru (Palivizumab)

- obsahuje 95% lidských a 5%myších sekvencí
- neutralizuje RS-virus a potlačuje splývání infikovaných buněk, určena k prevenci RS-virové infekce u nedonošených

Technika odběru jednotlivých druhů infekčního materiálu

Stolice

Pro bakteriální vyšetření rektální výtěr – pacient klečí a opírá se o lokty nebo leží na boku. Vyzve se, aby zatlačil jako na stoličce a do konečníku se zavede asi do 5cm hloubky tampon a pootočí se jím, vloží se do transportní půdy, např. Amiesovy (nezbytné pro zachyt kampylobaktera).

Pro parazitologické vyšetření se odebírá kousek stolice umělohmotnou lopatičkou, která je součástí speciálního plastového kontejneru. Průkaz roupů – stěr z análních řas Schüffnerovou tyčinkou nebo otisk lepicí páskou

Uchovávat při teplotě 4°C z důvodu vysokého rizika kvasných reakcí.

Moč

Před odběrem nutné omytí genitálu, odebírá se střední proud moči (u uretritidy počáteční u postižení ledvin konečný!). Případně katetrizace nebo suprapubická punkce. Do sterilních plastových kontejnerů, z ní přelítí do sterilní zkumavky, ihned zazátkovat.

Transport do laboratoře, výjimečně lze skladovat nanejvýš 18 hodin při 4°C. Transport při nízké teplotě – při vyšší teplotě by došlo k přemnožení bakterií bez klinického významu (moč může obsahovat glukosu a bílkoviny, proto představuje dobrou kult. půdu)

Krev

Na kulturační vyšetření třikrát během jednoho dne (nejlépe při vzestup teploty – uvolnění mikrobů do oběhu).

1. dezinfekce kůže v místě vpichu
2. venepunkcí odběr 10-20ml krve
3. dezinfekce zátky kulturační nádoby, vyměnit jehlu
4. vstříknutí do dvou speciálních kulturačních nádobek s obsahem bujónu a protisrážlivého prostředku. Jedna se kultivuje aerobně, druhá anaerobně.
5. Proveďte se kontrolní stěr z kůže – vyloučení kožní kontaminace.

Nelze-li okamžitě odeslat do laboratoře, uložit při 37°C nebo při pokojové teplotě.

Na sérologické vyšetření (srážlivá krev) stejná technika, v množství 5-10ml, transport ve zkumavce s pevným uzávěrem.

Krev se centrifuguje, sérum se odsaje a rozplní do několika malých zkumavek, uchovávají se při -20°C a rozmrazí se bezprostředně před provedením reakce.

Pro nepřímou diagnostiku se sleduje dynamika titru protilátek – je tedy nutné odebrat dva vzorky, první nejlépe v akutní fázi onemocnění, druhý pak s časovým odstupem 1-3 týdnů.

Sérum nesmí být chylózní (odběr na lačno), kontaminované (venepunkce lege artis) ani hemolytické (rychlý transport bez mechanických inzultů a zahřátí).

Mozkomíšní mok

Lumbální punkce, přísně asepticky do stříkačky v množství 2-3 ml, poté do sterilní zkumavky s pevným uzávěrem.

Transport nutný co nejrychleji, buď při 37°C, nebo při 4°C, ne při běžné teplotě. Nutné okamžité zpracování.

Hnis, punktát

Sterilní stříkačkou do sterilní zkumavky, ihned zazátkovat, okamžitě odeslat. Je-li materiálu málo, ponechat ho ve stříkačce, vytěsnit vzduch, vyměnit sterilní jehlu a zapíchnout do gumové zátky.

Transport při 4°C, při vyšší teplotě může dojít ke kvasným procesům tvorbou plynu a porušení obalu.

Výtěry

Sterilní vatové tampony s vhodnou transportní půdou. Před použitím vhodné prostý tampon bez transportní půdy zvlhčit fyziologickým roztokem.

Výtěr z krku – šroubovitým pohybem otřeme povrch obou mandlí, nutno vyhnout se jazyku (*stafylokok, streptokok*).

Výtěr z ucha – šroubovitým pohybem setřeme zvukovod (*stafylokok, pneumokok, pseudomonády*).

Výtěr z dutiny nosní – šroubovitým pohybem setřeme sliznice obou dolních nosních průduchů (*stafylococcus aureus, diplococcus pneumoniae*).

Výtěr ze spojivkového vaku – po odchlípení víčka se na tampon odebírá sekret ze spojivkového vaku, dále stěr z vřídků nebo jiných chorobných změn na okraji víček, spojivce a rohovce (*Stafylokok*).

Výtěr z ran a kožních lézí – sterilním tamponem se setře spodina při periférii rány. Při podezření na plísňové onemocnění se po dezinfekci alkoholem seškrábnou sterilním skalpelem kožní šupiny z okraje ložiska, vzorky nehtů nebo podnehtového detritu, úlomky postižených vlasů a posílají se ve sterilní nádobě v dostatečném množství.

Výtěr z pochvy – provádí se za kontroly poševního zrcadla. Odebírá se z děložního čípku a klenby poševní (*Lactobacillus, stafylococcus, Trichomonas*). Vždy dva – jeden na bakteriologické vyšetření, druhý ve speciální půdě na trichomonády a kvasinky. Při podezření na kapavku vhodné doplnit výtěrem z uretry a rekta. Použité transportní půdy by měly být předeštěné, neboť původce kapavky je enormně citlivý na nižší teploty.

Výtěr tamponem bez transportního média – jakékoliv skladování snižuje pravděpodobnost zachytu původce, doba transportu by neměla přesáhnout 2h při 4°C.

Tampon s transportním médiem umožňuje přežívání bakterií, zachovává jejich původní kvantitativní poměry. Doba skladování by neměla přesáhnout 24 hodin při teplotě 4°C.

Sputum (dolní cesty dýchací)

Vykašlávání, nejlépe ranní, do širokých plastových kontejnerů.

V případě nedostatečné expektorace je možný laryngální výtěr tamponem a ohebné hliníkové tyčince, pacient je vyzván k zakašlání na tampon podržen nad epiglottis. V indikovaných případech se provádí bronchoalveolární laváž nebo aspirace z bronchů.

Nutný rychlý transport, uchovávání při 4°C by mohlo mít za následek uhynutí náročnějších bakterií, při vyšších teplotách hrozí pomnožení kontaminující ústní mikroflóry a zkreslení kvantitativních poměrů.

Bioptické vzorky, žaludeční a duodenální šťávy, zvratky a zbytky potravin

Sterilní zkumavky nebo plastové kontejnery s pevným uzávěrem

Pitevní materiál

Sekční vzorek vyžaduje rychlé provedení, použití sterilních nástrojů a aseptických principů (čím později, tím větší změny poměrů v přirozené mikroflóře, i na úkor primárních patogenů; translokace mikrobů do míst fyziologicky sterilních)

Materiál pro molekulárně genetické vyšetření

Tekutý materiál nebo stěr suchým vatovým tamponem. Nutno pamatovat, že enzymy používané u těchto metod mohou být inhibovány různými chemickými a biologickými látkami

Specifika odběru a transportu pro průkaz anaerobních mikrobů

Nejlepším transportním médiem je vlastní infekční materiál, neboť je pro mikroba přirozeným prostředím. Dobu transportu je nutno zkrátit na minimum, je nutné zajistit inertní atmosféru a dostatečnou vlhkost. Pokud není možný okamžitý transport, je vhodnější materiál ponechat při pokojové teplotě – některé anaeroby špatně snášejí chladničkovou teplotu. Tekuté vzorky – odběr do stříkačky, vytěsnit vzduch, vyměnit jehlu, zapíchnout gumovou zátku. Pokud se materiál odebírá na tampon – transport ve zkumavce s CO₂ – je těžší než vzduch, po otevření zkumavky neunikne; příp. zanořit do transportní půdy.

Odběr a transport materiálu na mykologické vyšetření

Povrchové a slizniční mykózy - odebírají se kožní šupiny, vlasy, nehty, stěry ze sliznic. Kožní šupiny se na rozdíl od bakt. vyšetření odebírají po dezinfekci 70% alkoholem; u vlasů je nutné získat jejich folikulární část pomocí epilační pinzety.

Hluboké mykózy (systémové – infekce resp., moč., tráv. traktu) - sputum, moč, stolice (odpovídá odběru na parazitické vyšetření), krev.

Nutnost okamžitého transportu do laboratoře. Uchovávání při teplotě 4°C

Odběr a transport materiálu na parazitologické vyšetření

Nález parazita nebo jeho části - v uzavřeném kontejneru (možno ve fyziologickém roztoku) do laboratoře.

Stolice - pro parazitologické vyšetření se odebírá kousek stolice umělohmotnou lopatičkou do speciálního plastového kontejneru. Opakovaně, nejméně třikrát obden.

Stěr z análních řas (Perianální stěr) - zvlhčenou Schüffnerovou tyčinkou se setrou perianální řasy, stěr se poté kruhovým pohybem opláchne v kapce vody na podložním skle a nechá zaschnout.

Perianální výtěr – postup jako u perianálního stěru, ale tyčinka se vsune až na okraj konečníku.

Perianální olep - průsvitná lepicí páska se přilepí přes anální otvor a sevřením hýždí se přitlačí do intergluteální rýhy; pak se nalepí na podložní sklo a odešle do laboratoře.

Kapilární krev - Krev z bříška prstu – tenký nátěr a tlustá kapka na dvou podložních sklech.

Duodenální obsah - získá se endoskopicky, 2-5 ml, transport v uzavřené zkumavce.

Moč - poslední porce ranní moči, 50-100ml v uzavřené nádobě.

Transport materiálu

Co nejrychlejší. Relativně nejlépe vydrží mikroorganismy v tekutém materiálu nebo hemokulturách. Tuhé materiály a tkáně, které mohou zaschnout - transport ve fyziologickém roztoku nebo bujónu. Nejméně vhodné je využití jen vatového tamponu bez transportního média.

Většina patogenních mikrobů snáší teplotu 4-8°C. Snížená teplota = snížená metabolických procesů, lépe tak vydrží nepříznivé podmínky. Některé specifické patogeny (*Neisseria gonorrhoeae*) nevydrží nižší teplotu, naopak vyšší teplota může naopak vést k přemnožení přirozené mikroflóry a potlačení patogenního původce (např. *Proteus* sp.).

Spracovanie jednotlivých typov materiálov z odberov – skripta Mikrobiologie 2, str. 109-112