

Nepřátelské mikroby

ČÁST

1

1. Mikroby jako parazité	9
2. Bakterie	13
3. Viry	35
4. Fungi	45
5. Protozoa	49
6. Helminti a členovci	51
7. Priony	57
8. Vztah hostitele a parazita	61

Mikroby jako parazité

1.1 Rozmanitost mikrobů

1.1.1 Prokaryota a eukaryota

Při posuzování vztahu infekčního onemocnění způsobeného jakýmkoli organismem je třeba brát v úvahu široké spektrum důležitých biologických charakteristik. Jednou z nich je stavba buňky, zvláště pak způsob organizace genetického materiálu, a buněčných komponent.

Všechny organismy, kromě virů a prionů, jsou složeny z buněk

Viry nejsou buňky – obsahují genetický materiál (DNA nebo RNA), ale nemají buněčnou membránu ani cytoplazmu a postrádají celý soubor procesů syntézy makromolekul. V nich jsou zcela závislé na hostitelské buňce. Konvenční viry mají genetický materiál zabalen do kapsule. Priony způsobují lidská onemocnění, např. Creutzfeldt–Jakobovu nemoc (CJD), variantní CJD a kuru. U zvířat způsobují scrapie a bovinní spongiformní encefalopatie (BSE). Zdá se, že tato agens nemají nukleovou kyselinu a jsou složena pouze z infekčních proteinových partikulí.

Všechny ostatní organismy mají buněčnou organizaci, jejich tělo je složeno z jedné (u většiny mikrobů) nebo více buněk. Každá buňka má genetický materiál (DNA) a cytoplazmu s komplexem mechanismů, zajišťujícím syntézu makromolekul, a je ohraničena buněčnou membránou.

Bakterie jsou prokaryota, všechny ostatní organismy jsou eukaryota

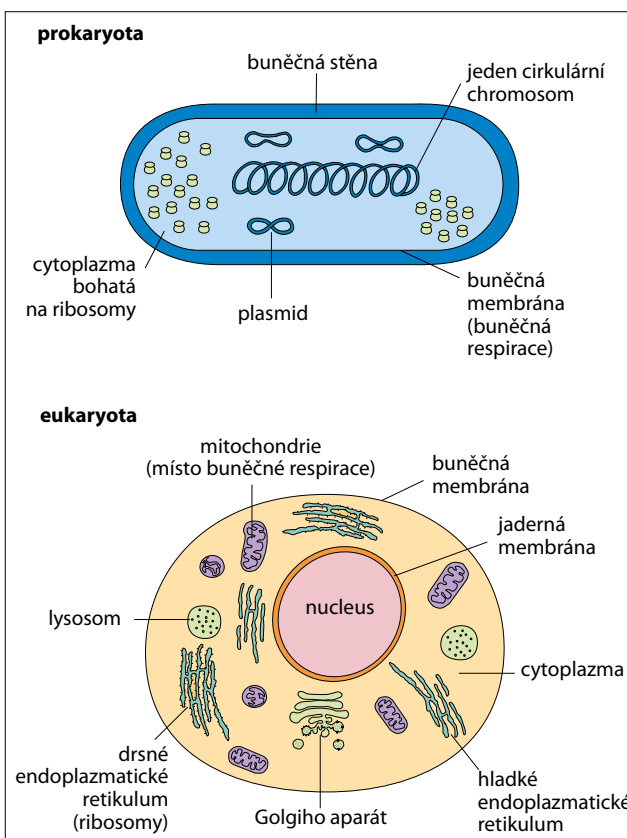
Buněčné organismy, prokaryota a eukaryota, se v mnohém odlišují.

U prokaryot:

- Chybí jasně ohraničené, pravé jádro
- DNA je ve formě jednoho cirkulárního chromosomu. Další DNA, extrachromosomální, se nalézá v plasmidech.
- Transkripce a translace může probíhat současně.

U eukaryot:

- DNA je organizována v několika chromosomech, které jsou lokalizovány v jádru.
- Jádro je ohraničeno jadernou membránou.
- Transkripce zahrnuje vytvoření messenger RNA (mRNA) a její transport ven z jádra do cytoplazmy.
- Translace probíhá na ribosomech.



Obrázek 1.1 Prokaryotická a eukaryotická buňka. Schematicky jsou znázorněny hlavní charakteristiky buněčné organizace.

- Cytoplazma obsahuje množství organel ohraničených membránou (mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysosomy), které chybí v prokaryotické buňce.

Gram-negativní bakterie mají vnější vrstvu s vysokým obsahem lipopolysacharidů

Další důležitý rozdíl mezi prokaryoty a většinou eukaryot je přítomnost buněčné stěny s ochrannou funkcí, která se nalézá vně cytoplazmatické membrány. U Gram-pozitivních bakterií je tato stěna z peptidoglykanu a tvoří vnější povrch buňky. U Gram-negativních bakterií se vně buněčné stěny

Nepřátelské mikroby

nachází další vnější vrstva, bohatá na lipopolysacharidy. Tyto vrstvy hrají důležitou roli v ochraně bakteriální buňky proti působení imunitního systému a chemoterapeutik a také ve vyvolání specifické patologické odpovědi. Odpovídají rovněž za antigenní vlastnosti buňky.

1.1.2 Mikroparazitě a makroparazitě

Mikroparazitě se množí uvnitř hostitele

Rozdíl mezi mikroparazitem a makroparazitem nespočívá jen ve velikosti. Mikroparazitě (viry, bakterie, prvoci, houby) se množí uvnitř hostitele a teoreticky se mohou namnožit do obrovského počtu jedinců, což je příčinou velmi závažných infekcí. Naproti tomu makroparazitě (červi, členovci), i pokud jsou mikroskopických rozměrů, tuto schopnost nemají. Infekční stádium v hostiteli přechází do jiného, reprodukčního stadia, aby mohl cyklus pokračovat. Závažnost infekce je tedy závislá na počtu organismů, které infikovaly tělo hostitele. Rozdíl mezi mikroparazity a makroparazity je velmi důležitý a má závažné klinické a epidemiologické důsledky.

Hranice mezi mikroparazity a makroparazity však není vždy ostrá. Potomstvo některých makroparazitů zůstává v hostiteli a výsledkem infekce může být obrovský počet jedinců, zvláště u imunokompromitovaných pacientů. Příkladem tohoto typu parazitů jsou hlístice rodu *Trichinella*, *Strongyloides stercoralis*, někteří příslušníci čeledi vlasovcovitých (*Onchocercidae*, syn. *Filariidae*) a zákožka svrabová (*Sarcoptes scabiei*).

Některé organismy jsou tak malé, že mohou žít uvnitř jiné buňky

Absolutní velikost, podle které dělíme organismy na mikro- a makroparazity, má ještě další biologicky důležité důsledky pro vztah patogenu a hostitele. Pravděpodobně nejdůležitějším z nich je rozdíl relativní velikosti buněk patogenu a hostitele. Organismy, které jsou dostatečně malé, mohou žít uvnitř cizí buňky a tím navodit biologický vztah s hostitelem, který je zcela odlišný od extracelulární žijících organismů – tento vztah ovlivňuje jak průběh onemocnění, tak i jeho kontrolu.

1.1.3 Život uvnitř a vně buňky

Základem všech vztahů hostitel-patogen je využití prostředí, které poskytuje jeden organismus (hostitel), organismem jiným (patogen). Povaha a stupeň využívání se u různých druhů liší, ale primárním požadavkem patogenů je vždy využití metabolických materiálů hostitele – buď živin, nebo i aparátu pro syntézu nukleových kyselin (jako je tomu v případě virů). Závislost virů na syntetickém aparátu hostitele je nutně spjata s intracelulárním způsobem života: viry nemohou žít mimo hostitelskou buňku. Také některé další skupiny patogenů (*Chlamydia*, *Rickettsia*) žijí pouze v buňkách. V jiných skupinách se různé druhy přizpůsobily buď intracelulárnímu, nebo extracelulárnímu způsobu života. Jsou ale i organismy, které využívají oba tyto možné způsoby. Intracelulární mikroparaziti (kromě virů) získávají živiny přímo z buňky, zatímco extracelulární organismy z tkáňových tekutin, nebo se živí přímo hostitelskými buň-

kami (např. *Entamoeba histolytica*, způsobující amébovou dysentérii). Makroparazitě jsou téměř vždy extracelulární (ačkoli *Trichinella* je intracelulární); mnozí z nich se živí přímo buňkami hostitele, jiní získávají živiny z tkáňových tekutin nebo z obsahu střeva.

Uvnitř buněk jsou patogeny chráněny před řadou obranných mechanismů hostitele

Jak bude detailně popsáno v Kapitole 13, intracelulární patogeny čelí problémům, které jsou zcela odlišné od těch, kterým čelí extracelulární organismy. Patogeny žijící v buňkách jsou chráněny před celou řadou obranných mechanismů hostitele, zejména proti imunitě zprostředkované specifickými protilátkami. Kontrola těchto infekcí tedy závisí na intracelulárních obranných mechanismech, krátkodobě působících mediátorech a cytotoxických agens, přestože cytotoxické agens může zničit jak patogen, tak i hostitelskou buňku a může vést k poškození tkáně hostitele. Tento problém zacílení na intracelulární patogen je také důležitý z pohledu výběru správného léku nebo antibiotika, protože je obtížné dosáhnout selektivního účinku ničícího patogenu a nepoškodit přitom hostitelskou buňku. Ještě problematičtější je skutečnost, že mnoho intracelulárních patogenů žije v buňkách, které hrají významnou roli v obranných mechanismech hostitele, čímž snižují jeho obranyschopnost. Řada virů, bakterií a prvoků žije například uvnitř makrofágů a některé viry (včetně HIV) jsou specifické pro lymfocyty.

Život uvnitř buňky má pro patogen mnoho výhod. Poskytuje mu přístup k živinám hostitele a jeho genetickému replikačnímu aparátu a dovoluje mu uniknout z dosahu hostitelovy obrany. Ale ne všechny organismy mohou být po celou dobu svého vývoje zcela intracelulární. Pokud se mají úspěšně množit, musí být zajištěn přenos mezi buňkami hostitele, a to nevyhnutelně zahrnuje určitou expozici vnějšímu prostředí. Tato extracelulární fáze ve vývoji patogenu poskytuje hostiteli příležitost kontroly infekce obrannými mechanismy, jako jsou fagocytóza, protilátky a komplement. Přenos mezi buňkami může ale také zahrnovat destrukci původní infikované buňky a tím přispívat k poškození tkáně a obecně k patologickým projevům.

Život mimo buňky poskytuje příležitost k růstu, množení a rychlému šíření

Extracelulární patogeny mohou svobodně růst a množit se a mohou se velmi snadno šířit do tkání hostitelova těla. Jejich vývoji a přežití ale brání řada překážek. Nejvýznamnější je neustálá expozice jednotlivým složkám obranných mechanismů hostitele, zvláště účinkům protilátek, komplementu a fagocytů. Výsledkem infekce extracelulárními organismy jsou zcela odlišné patologické projevy ve srovnání s aktivitou intracelulárních druhů. Tyto důsledky jsou u extracelulárních parazitů mnohem dramatictější. Nehledě na jejich velikost, rychlost množení a pohyblivost mohou způsobit velmi rozsáhlou destrukci tkání. Mnoho extracelulárních patogenů se může rychle šířit prostřednictvím mimobuněčných tekutin nebo se rychle pohybovat. Výsledkem je rychlé rozšíření infekce v relativně krátkém čase. Dobrým příkladem tohoto šíření je rychlá kolonizace mukózního povrchu tenkého střeva bakterií *Vibrio cholerae*. Úspěšná obrana hostitele proti extracelulárním parazitům vyžaduje

naprosto odlišné mechanismy ve srovnání s obranou proti parazitům intracelulárním. Variabilita tkání a míst možného působení extracelulárních parazitů je také pro hostitele komplikací, neboť jeho mechanismy musí zajistit účinnou obranu ve všech, často velmi odlišných, místech. Obrana proti střevním parazitům zahrnuje komponenty přirozené i adaptivní imunity, které jsou zcela odlišné od účinných mechanismů na jiných místech. Navíc organismy žijící v lumen střeva nemusí být nutně zasaženy mechanismy působícími v mukóze. Problém, jak zorganizovat efektivní obranu, je nejakutnější u velkých makroparazitů, protože jim jejich velikost umožňuje uniknout před obrannými mechanismy hostitele, které jsou efektivně používány proti menším organismům. Červi například nemohou být fagocytováni, navíc se mohou aktivně pohybovat a tak uniknout z oblastí, kde je aktivována obrana hostitele.

1.1.4 Systém klasifikace

Infekční nemoci způsobují organismy, které jsou příslušníky mnoha různých skupin – priony, viry, bakterie, houby, prvoci, helminti (červi) a členovci. Každá z těchto skupin má vlastní systém klasifikace, který umožňuje identifikaci a kategorizaci těchto organismů. Správná identifikace je základním požadavkem pro určení přesné diagnózy a efektivní léčby. K identifikaci je používána řada nástrojů, počínaje prostým pozorováním a konče molekulární analýzou. Revolucí v klasifikaci jsou metody sekvenování genomu. Mnoho hlavních patogenů všech skupin je v současnosti již osekvenováno, a to umožňuje nejen přesnou identifikaci, ale také větší pochopení vztahů mezi jednotlivými zástupci uvnitř každé taxonomické skupiny.

Použité přístupy jsou ale pro různé skupiny odlišné. Pro prvoky, houby, červi a členovce je použitelná klasifikace na úrovni druhu, který je definován jako skupina organismů schopná pohlavního rozmnožování. Klasifikační jednotka „druh“ (species) je základem pro binomický systém klasifikace, používaný u eukaryotických a některých prokaryotických organismů. Skupina druhů vytváří rod (genus), definovaný jako skupina příbuzných, ale vzájemně se nekřížících druhů. Každý organismus nese dvě jména označující

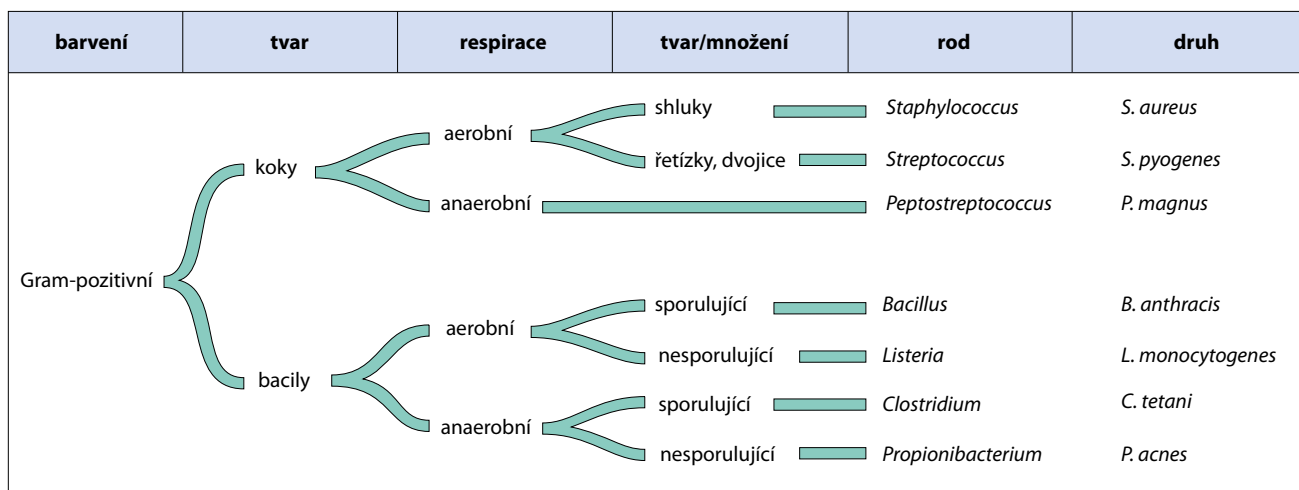
cí „rod“ a „druh“, například *Homo sapiens* nebo *Escherichia coli*. Příbuzné rody jsou dále uspořádány do dalších širších skupin v hierarchii klasifikace.

1.1.4.1 Klasifikace bakterií a virů

Koncept „druhu“ je však pro klasifikaci prokaryot a virů jen velmi obtížně aplikovatelný, přestože kategorie rod a druh jsou u bakterií běžně užívány. Klasifikace bakterií využívá soubor snadno definovatelných mikroskopických, makroskopických a biochemických charakteristik. Ty jsou založeny na velikosti, tvaru, barvě, výsledcích specifického barvení, způsobech respirace a reprodukce a sofistikovaných imunologických a molekulárních metodách. Tyto výsledky můžeme použít pro rozdělení do konvenčních taxonomických skupin, jak je znázorněno pro Gram-pozitivní bakterie na Obrázku 1.2 (viz také Kapitola 2).

Správná identifikace bakterií na detailnější úrovni než druh je často klíčová pro odlišení patogenních a nepatogenních forem

Správná identifikace je podmínkou správné léčby. U některých bakterií jsou důležité skupiny „poddruhů“ (subspecies) identifikovány na základě svých imunologických vlastností. Antigeny buněčné stěny, bičíku a pouzdra umožňují pomocí testování se specifickými séry dělení do skupin zvaných sérotypy (např. u salmonel, streptokoků, shigel, *Escherichia coli*). Tyto testy jsou zvláště důležité v případech, že organismus se obtížně (nebo vůbec) množí v podmínkách *in vitro*. Biochemické charakteristiky se používají k určení jiných skupin poddruhů (biotypy, kmény, skupiny). Některé kmény *Staphylococcus aureus* například produkují β -hemolyzin, který způsobuje lýzu červených krvinek. Produkce jiných toxinů je také důležitým znakem pro rozlišení mezi jednotlivými skupinami např. u *Escherichia coli*. Bakterie mohou být také klasifikovány na základě citlivosti k infekci specifickými bakteriofágy. Tato tzv. fagotypizace se užívá například k rozlišení mezi izoláty *Vibrio cholerae* a sérovary *Salmonella enterica*. V identifikaci a klasifikaci se využívají i genetické metody: jedná se zejména o použití polymerázové řetězové reakce (PCR) a prób k detekci specifických sentinelových DNA sekvencí.



Obrázek 1.2 Použití strukturálních a biologických charakteristik bakterií pro klasifikaci, příklad Gram-pozitivních bakterií

nukleová kyselina	uspořádání nukleové kyseliny	struktura virové partikule	symetrie	čeleď	druh	
DNA	jeden řetězec	obalený		žádná		
		neobalený		parvoviridae	lidský parvovirus	
	dvoj-řetězec	obalený	ikosaedrální		herpesviridae	virus herpes simplex
			komplexní		poxviridae	virus vakcinice
		neobalený	ikosaedrální		adenoviridae	adenovirus

Obrázek 1.3 Použití charakteristik virů pro klasifikaci, příklad DNA virů

Klasifikace virů je ještě mnohem odlišnější od binomické klasifikace

Pro viry jsou také někdy používány termíny „rod“ a „čeleď“, ale v současnosti se vede diskuse o použitelnosti tohoto konceptu. Jména virů obvykle popisují jejich různé charakteristiky jako velikost, strukturu, patologické působení nebo lokalizaci a distribuci v tkáních. Jednotlivé skupiny jsou děleny podle druhu nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), způsobu replikace, symetrie virové partikule (ikosaedrální, helikální nebo komplexní) a přítomnosti či nepřítomnosti vnějšího obalu, jak je znázorněno pro DNA viry na Obrázku 1.3 (viz také Kapitola 3). Ekvivalenty kategorií jako „poddruh“ jsou také používány a oproti kategorii „druh“ mohou být snáze definovány podle svých typických biologických charakteristik. Tyto kategorie zahrnují termíny a jednotky jako sérotyp, kmen, varianta a izolát a primárně jsou určovány sérologickými testy virového materiálu. Například u viru chřipky existují jako ekvivalent jednoho rodu 3 různé typy (A, B, C). K identifikaci se používá stabilní nukleoproteinový antigen, který je u každého z těchto tří typů jiný. Vysokou míru variability vykazují nestabilní antigeny neuraminidasy a hemaglutininu. Různé izoláty mají specifické varianty hemaglutininu (H) a neuraminidasy (N), označované čísly. H5N1 je např. varianta způsobující fatální chřipku ptáků, tzv. ptačí chřipku (viz Kapitola 19). Dalším příkladem jsou adenoviry, které rozdělujeme na základě antigenních vlastností kapsidy na skupiny, typy a další kategorie. Velká frekvence mutací, kterou vykazují některé viry (např. HIV) klasifikaci dále velmi komplikuje. Populace z jednotlivých infikovaných jedinců mohou být geneticky velmi odlišné a označují se jako tzv. „quasispecies“, které reprezentují průměr ze širokého spektra všech přítomných variant.

Klasifikace napomáhá určení diagnózy a pochopení patogenity

Rychlá identifikace je nezbytná pro určení klinické diagnózy a zahájení vhodné léčby. Porozumění interakcím mezi hostitelem a parazitem není ale důležité pouze pro identifikaci organismů. Je také nutné pro získání maximálního množství informací o obecně biologických vlastnostech patogenu, které jsou důležité pro určení všech možných důsledků infekčního procesu. Z těchto důvodů budou následující kapitoly popisovat jednotlivé důležité klasifikované patogeny podle jejich makro- i mikroskopické struktury, způsobu života, molekulární biologie, biochemie a způsobu replikace a reprodukce.

KLÍČOVÁ FAKTA

- Organismy, které jsou příčinou infekčních onemocnění, dělíme do 7 hlavních kategorií: priony, viry, bakterie, houby, prvoci, helminti a členovci.
- Identifikace a klasifikace těchto organismů jsou důležitými úkoly mikrobiologie a zároveň základem správné diagnózy, léčby a kontroly onemocnění.
- Každá tato skupina má své specifické charakteristiky (strukturální a molekulární stavbu, biochemické a metabolické strategie, reprodukční proces), které podmiňují její interakce s hostitelem a způsob vzniku a průběhu onemocnění.
- Řada patogenů žije uvnitř buněk, kde jsou chráněny před mnoha mechanismy hostitelovy obrany.

Bakterie

Úvod

Existuje obrovské množství volně žijících bakterií, ale jen poměrně málo druhů může způsobovat onemocnění. Tyto patogenní bakterie jsou dobře známé a dobře prostudované. Nové patogeny se ale stále objevují. Důležitost poznání těchto dosud neznámých infekcí je více než zřejmá. Příkladem může být infekce bakteriemi rodu *Legionella*, které způsobují legionářskou nemoc, syndrom akutního respiračního selhání (SARS), jehož příčinou je infekce koronaviry nebo žaludeční vředy spojené s infekcí *Helicobacter pylori*.

Bakterie jsou jednobuněčná prokaryota, která nemají pravé jádro. Jejich DNA vytváří dlouhou cirkulární molekulu. Mnoho bakterií se aktivně pohybuje pomocí unikátních souborů bičíků. Bakteriální buňka je obklopená komplexem buněčné stěny a často i mohutným pouzdrém. Rozmnožují se binárním dělením, generační doba je velmi krátká. Bakterie disponují širokým spektrem metabolických procesů, které jim umožňují život v aerobních i anaerobních podmínkách. Klasifikace bakterií je založena na jejich genotypu a fenotypu. Pro klinické účely je praktičtější použití fenotypových vlastností, studium genotypů je užíváno při studiu struktury a biologie bakteriální buňky (Obr. 32.15).

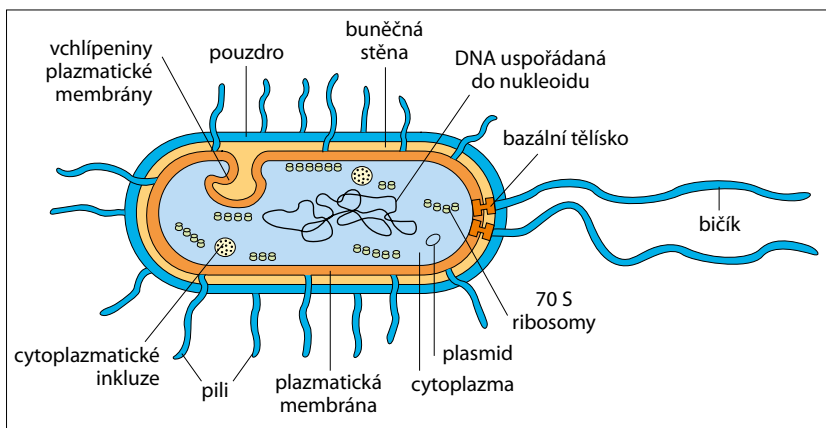
2.1 Struktura

Bakterie jsou prokaryota s charakteristickou buněčnou organizací

Genetická informace bakterií je obsažena v dlouhé, dvojřetězcové (ds), cirkulární molekule DNA (Obr. 2.1). Podobně jako u eukaryot (Kapitola 1) mluvíme o chromosomu. Tento chromosom ale neobsahuje introny a jeho DNA je tedy kontinuální kódující sekvencí genů. Bakteriální chromosom není lokalizován v jasně ohraničeném jádru buňky, není přítomná jaderná membrána, DNA je organizována v nukleoid. Genetická informace bakteriální buňky může být také extrachromosomální či mimochromosomální, přítomná jako

malé autonomně se replikující cirkulární formy DNA, zvané plasmidy. Kromě ribosomů, sloužících k syntéze proteinů, neobsahuje cytoplazma žádné jiné organely. Ačkoli funkce ribosomů je stejná u prokaryotních i eukaryotních buněk, jejich struktura je odlišná. Ribosomy jsou odlišné velikostí, označované jako 70 S u prokaryotních a 80 S u eukaryotních buněk (symbol S charakterizuje odlišné chování ribosomů během ultracentrifugace). Bakteriální 70 S ribosomy jsou cílem pro antibiotika ze skupiny aminoglykosidů (viz Kapitola 33). Mnoho metabolických funkcí, které v eukaryotické buňce zajišťují organely ohraničené membránami, jako např. mitochondrie, jsou u bakteriální buňky zajištěny přímo buněčnou membránou. U všech bakterií, kromě mykoplasmat, se

Obrázek 2.1 Schématické znázornění obecné struktury bakteriální buňky



Nepřátelské mikroby

na vnější straně buněčné membrány nachází komplex buněčné stěny. Vně této stěny může být pouzdro, bičíky a vláknité struktury zvané pili (jednotné číslo pilus, synonymum fimbrie). Znalosti vlastností buněčné stěny a uvedených vnějších struktur jsou klíčové pro diagnostické účely, patogenitu i pro porozumění biologii bakteriální buňky.

Bakterie se podle vlastností buněčné stěny dělí na Gram-pozitivní a Gram-negativní

Barvení podle Grama je základní metodou detekce a identifikace bakterií (viz Kapitola 32). Hlavní strukturální komponentou buněčné stěny je peptidoglykan (muko-peptid, murein), směsný polymer složený z cukrů (hexosy *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylmuramové kyseliny) a aminokyselin.

- U Gram-pozitivních bakterií tvoří peptidoglykan 20–80 nm silnou vrstvu vně buněčné membrány a může obsahovat další makromolekuly.
- U Gram-negativních bakterií je vrstva peptidoglykanu silná pouze 5–10 nm a na její vnější straně se nachází druhá, vnější membrána, které je pevně vázána k lipoproteinovým molekulám v peptidoglykanu. Klíčovými molekulami vnější membrány jsou lipopolysacharidy a lipoproteiny (Obr. 2.2).

Polysacharidy a aminokyseliny s nabitým polárním postranním řetězcem obsažené v peptidoglykanu vytvářejí silně polární prostředí, které zajišťuje, že povrch bakterií je velmi silně hydrofilní. Tato vlastnost dovoluje Gram-pozitivním bakteriím odolat účinkům žluči v gastrointestinálním traktu. Na druhé straně může být povrch bakterií narušen účinkem lysozymu, enzymu přítomného v tělních sekretech, který má proto baktericidní vlastnosti. Syntéza peptidoglykanu je blokována působením beta-laktamových a glykopeptidových antibiotik (Kapitola 33).

U Gram-negativních bakterií je vnější membrána také hydrofilní, ale obsah lipidových komponent a dalších molekul jí propůjčuje rovněž vlastnosti hydrofobní. Vstup hydrofilních molekul, jako jsou cukry a aminokyseliny, nutných

pro výživu bakteriální buňky, je zde zajištěn pomocí speciálních kanálů či pórů, jejichž stavební jednotkou jsou proteiny zvané poriny. Lipopolysacharidy (LPS) v membráně jsou zodpovědné za antigenní (O-antigen tvořený uhlovdíkovými řetězci) a toxické vlastnosti (lipidová komponenta A endotoxinu, Kapitola 17).

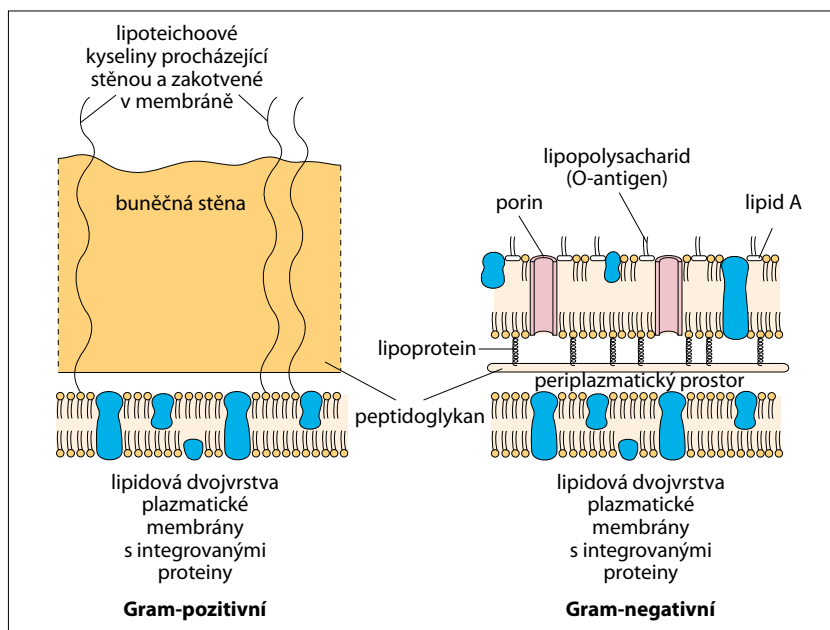
U Gram-pozitivních mykobakterií je peptidoglykanová stěna provázána s lipoproteinovou membránou jiným způsobem a navíc vnější vrstva obsahuje mnoho komplexních lipidů (mykolové kyseliny). Ty vytváří na povrchu voskovitou vrstvu, která mění schopnost těchto organismů barvit se dle Grama (tzv. acidorezistentní bakterie) a propůjčuje jim velkou odolnost proti vyschnutí a jiným faktorům vnějšího prostředí. Komponenty buněčné stěny mykobakterií mají také silný adjuvantní účinek (zesilují imunitní odpověď).

Vně buněčné stěny se může nacházet pouzdro složené z polysacharidů s velkou molekulovou hmotností (nebo z aminokyselin u *Bacillus anthracis*), které vytváří slizovitý povrch. Pouzdro poskytuje ochranu proti fagocytóze buňkami hostitele a je důležitým faktorem virulence. Infekce kmeny *Streptococcus pneumoniae* s pouzdem mají těžký až fatální průběh, zatímco neopouzdržené mutanty onemocnění nezpůsobují.

Buněčná stěna je také zodpovědná za konečný tvar buňky, který je důležitou charakteristikou pro identifikaci bakterií. Tento tvar může být obecně kulovitý (koky), tyčinkovitý (bacily, tyčinky) nebo šroubovicovitý/helikální (spirila), ale existuje řada variant těchto tvarů.

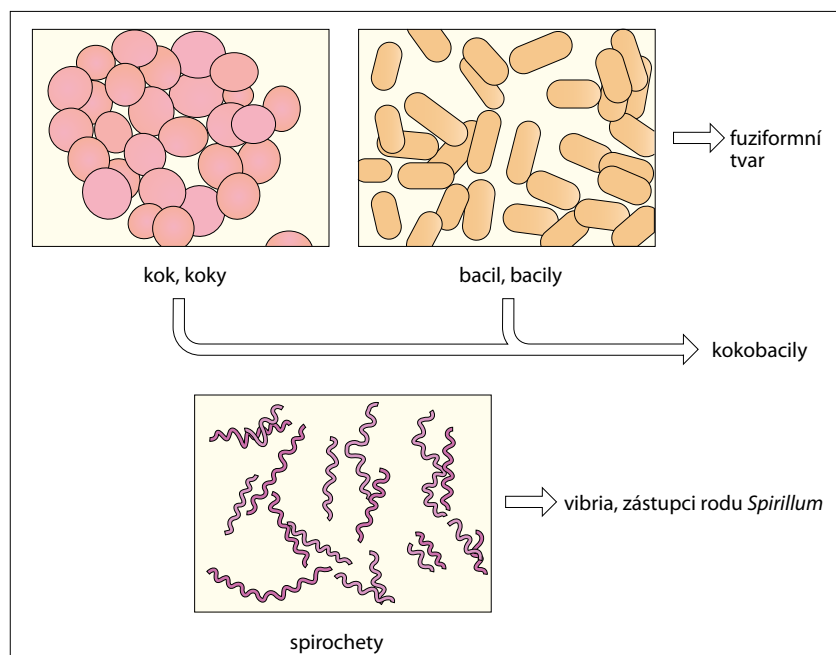
Mnoho bakterií má bičíky

Bičíky jsou dlouhé helikální struktury vycházející z povrchu buněk, které umožňují pohyb v prostředí. Mohou být umístěny na pólech buňky buď jednotlivě (polární umístění), nebo ve shlucích (lofotrichální umístění), nebo mohou být na celém povrchu buňky (peritrichální umístění). Bakteriální bičíky jsou zcela odlišné od eukaryotních a síly, které jim umožňují pohyb, jsou také zcela odlišné (jsou nezávislé



Obrázek 2.2 Stavba buněčné stěny Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií

Obrázek 2.3 Tři základní tvary bakteriálních buněk



na adenosin trifosfátu - ATP). Pohyblivost dovoluje reagovat na pozitivní a negativní stimuly (chemotaxe). Bičičky jsou tvořeny proteinovými komponentami (flageliny), které jsou významnými antigeny. Na tyto tzv. H-antigeny je zaměřena protektivní protilátková odpověď hostitele.

Pili jsou další strukturou bakteriálního povrchu

Pili (jednotné číslo pilus, synonymum fimbrie¹⁾) jsou pevnější než bičičky a slouží jako struktury, které umožňují kontakt buď s jinými bakteriemi (sex pili), nebo s hostitelskými buňkami (obecné pili). Adherence k hostitelské buňce je způsobena interakcí mezi molekulárními komponentami pili (adhezínů) a molekulami membrán hostitelských buněk. Např. adheziny *Escherichia coli* interagují s molekulami fukosy/mannosy na povrchu epitelálních buněk střeva (viz Kapitola

22). Přítomnost většího množství pilů může ochránit bakterie před fagocytózou buňkami hostitele a tak snižovat jeho odolnost proti infekci. Přestože jsou pili imunogenní, bakterie může tyto antigeny měnit a tím uniknout rozpoznání imunitním systémem. Mechanismus této antigenní obměny byl popsán u gonokoků a zahrnuje rekombinaci genů kódujících konstantní a variabilní oblasti molekul pilů.

2.2 Potravní nároky

Bakterie získávají živiny hlavně ve formě malých molekul procházejících buněčnou stěnou

Bakterie přijímají malé molekuly, jako jsou aminokyseliny, oligosacharidy a krátké peptidy, přes buněčnou stěnu.

Tabulka 2.1 Hlavní růstové potravní nároky bakterií

Prvek	% hmotnosti sušiny	Hlavní úkol v buňce
uhlík	50	Molekulární „stavební blok“ získáván z organických látek nebo z CO ₂
kyslík	20	Molekulární „stavební blok“ získáván z organických látek, O ₂ nebo H ₂ O; O ₂ je příjemce elektronů v aerobní respiraci
dusík	15	Součástí aminokyselin, nukleotidů, nukleových kyselin a koenzymů získávaných z organických látek a anorganických zdrojů jako NH ₄ ⁺
vodík	8	Molekulární „stavební blok“ získáván z organických látek, H ₂ O nebo H ₂ ; zúčastněný v respiraci a energetickém metabolismu
fosfor	3	Nachází se v řadě buněčných komponent jako nukleotidy, nukleové kyseliny, lipopolysacharidy (LPS), a fosfolipidy; získáván z anorganických substrátů (PO ₄ ³⁻)
síra	1–2	Součástí některých aminokyselin a koenzymů, získáván z organických sloučenin a anorganických zdrojů, jako jsou sulfáty (SO ₄ ²⁻)
draslík	1–2	Důležitý anorganický kation, kofaktor enzymů atd., získáván z anorganických zdrojů

1) Pozn. překl.: Nejedná se zcela o synonyma, přestože jsou morfologicky nerozlišitelné. Termínem pili by měly být označovány spíše orgány zprostředkující konjugaci a agregaci, zatímco fimbrie spíše zprostředkují adhezi k povrchům a mohou být faktorem virulence.

Nepřátelské mikroby

Gram-negativní bakterie mohou také přijímat větší molekuly po předběžném štěpení těchto látek v periplazmatickém prostoru. Vstřebávání a transport živin do cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu je zajištěn různými transportními mechanismy. Mezi ty patří usnadněná difuze využívající transportní mechanismy, které přenášejí jednotlivé molekuly tak, aby došlo k vyrovnání koncentrací uvnitř a vně buňky. Další variantou je aktivní transport, při kterém je spotřebována energie a při němž se zvyšuje intracelulární koncentrace daného substrátu. Oxidativní metabolismus (viz níže) je také lokalizován na rozhraní membrány a cytoplazmy.

Některé bakterie mají zcela minimální nároky na živiny v okolním prostředí, zatímco jiné mají nároky velmi komplexní. Např. *E. coli* může růst v médiu, které obsahuje pouze glukosu a anorganické soli, streptokoky rostou zase pouze v komplexním médiu, které obsahuje řadu organických látek. Přesto se však dá zobecnit, že všechny bakterie mají podobné nároky na živiny, které jsou shrnuty v Tabulce 2.1.

Všechny patogenní bakterie jsou heterotrofní

Všechny bakterie získávají energii oxidací organických molekul (cukrů, tuků a bílkovin). Výsledkem metabolismu všech těchto látek je ATP jako zdroj energie. Metabolismus může

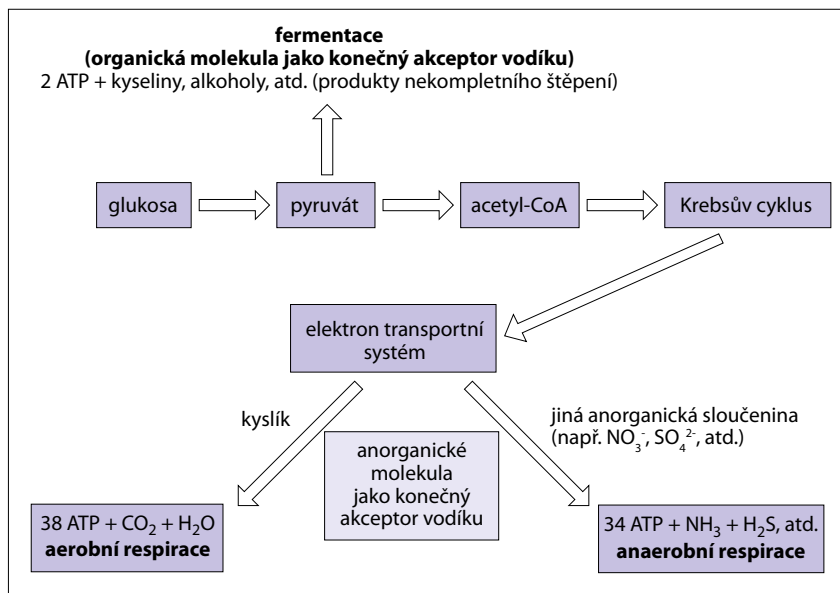
být aerobní, kdy konečným příjemcem elektronů je kyslík, nebo anaerobní, kdy konečným příjemcem může být organická nebo anorganická molekula jiná než kyslík.

V aerobním metabolismu (tedy v aerobní respiraci) je energie kompletně využita a využitím jedné molekuly glukosy získá 38 molekul ATP.

Anaerobní metabolismus (anaerobní respirace) využívající jako konečného příjemce vodíků anorganické molekuly jiné než kyslík je nekompletní a produkuje méně ATP ve srovnání s aerobní respirací.

Anaerobní metabolismus s organickou molekulou jako konečným příjemcem vodíků (fermentace) je mnohem méně účinný a produkuje pouze 2 molekuly ATP na 1 molekulu glukosy.

Přes svou malou účinnost může být anaerobní metabolismus využit v přítomnosti mnoha organických substrátů v prostředí bez kyslíku, což je obvyklé v těle hostitele. Nároky na kyslík pro respiraci jsou buď obligátní, nebo mohou být pouze fakultativní. Některé organismy jsou schopné „přepínat“ mezi aerobním a anaerobním metabolismem. Organismy schopné fermentace často využívají pyruvát v sekundárním metabolismu, který může být zdrojem dodatečné energie. Schéma těchto metabolických drah znázorňuje Obrázek 2.4.

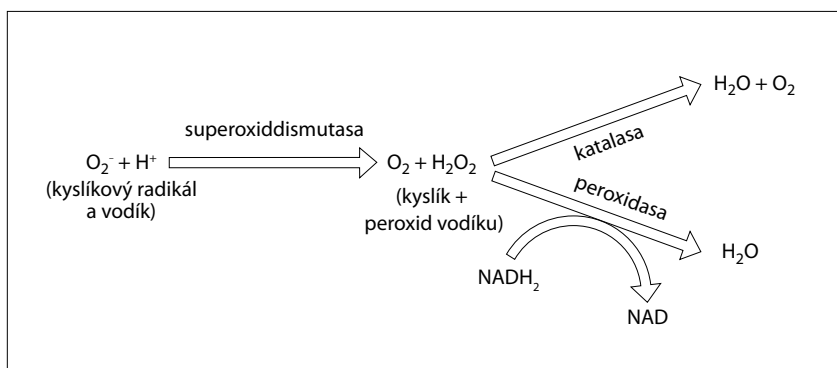


Obrázek 2.4 Katabolický rozklad glukosy ve vztahu ke konečným příjemcům vodíku

Tabulka 2.2 Klasifikace bakterií podle využití kyslíku

Kyslík v okolním prostředí			
Kategorie bakterií	přítomen	nepřítomen	Detoxifikační enzymy podílející se na odstranění kyslíku (např. superoxid dismutasa, katalasa, peroxidasa)
striktně aerobní	roste	neroste	přítomny
mikroaerofilní	roste v přítomnosti malého množství kyslíku	neroste	některé enzymy chybí, snížená koncentrace enzymů
anaerobní	neroste	roste	chybí
fakultativní (anaerobní/aerobní)	roste	roste	přítomny

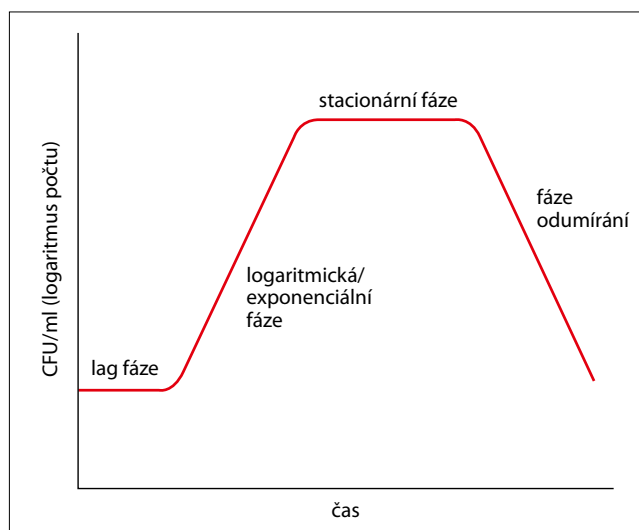
Obrázek 2.5 Interakce mezi enzymy detoxifikujícími kyslík



Schopnost bakterií růst v přítomnosti atmosférického kyslíku je dáována do souvislosti s jejich schopností vypořádat se s pomocí své enzymatické výbavy s potenciálně destruktivními intracelulárními formami kyslíku, např. s volnými radikály, anionty obsahujícími kyslík atd. (Tabulka 2.2). Interakce mezi škodlivými sloučeninami a detoxifikačními enzymy, jako jsou superoxidodismutasa a katalasa, jsou ilustrovány na Obrázku 2.5 (viz také Kapitola 9, Tabulka 9.2).

2.3 Růst a dělení

Rychlost růstu a dělení závisí zejména na dostupnosti živin v okolním prostředí. Růst a rozdělení jedné buňky *Escherichia coli* ve dvě „dceřiné“ buňky může trvat v bohatém laboratorním médiu 20–30 minut, zatímco v prostředí chudém na živiny může být mnohem pomalejší (1–2 hodiny). Na druhé straně jiné bakterie, např. *Mycobacterium tuberculosis*, rostou i v optimálním prostředí velmi pomalu a dělí se každých 24 hodin. Když jsou bakterie přeneseny do nového prostředí, rostou vždy charakteristickým způsobem zobrazeným na Obrázku 2.6. Po počáteční fázi adaptace (lag fáze) se začnou rychle dělit a populace se zdvojnásobuje s konstantním časem dělení (generační doba) během logaritmické či exponen-



Obrázek 2.6 Růstová křivka bakteriální kultury. CFU = jednotka schopná vytvořit kolonii

ciální fáze. Jak ubývá živin a přibývá toxických produktů, růst se zpomaluje a zastavuje (stacionární fáze) a může přejít do fáze sestupné, kdy počet buněk klesá (odumírání).

Bakteriální buňka musí před svým rozdělením duplikovat svou genomovou DNA

Všechny bakteriální genomy jsou cirkulární a jejich replikace začíná v místě zvaném počátek replikace (origin, OriC). Multienzymový komplex se váže na origin a iniciuje rozvolnění a oddělení obou vláken DNA. Enzymy zodpovědné za tuto činnost se jmenují helikasy a topoisomerasy (např. DNA gyrasa). Oba oddělené řetězce DNA slouží jako předloha (templát) pro DNA polymerasu. Polymerace zahrnuje zabudovávání deoxyribonukleotidů, které jsou komplementární předloze, tedy templátu DNA. Vytvoří se dvě charakteristické replikační vidličky postupující v opačných směrech po chromosomu. Každá kopie kompletní genetické informace (genom) vzniklá replikací obsahuje vždy jeden řetězec z mateřské buňky a jeden nově syntetizovaný řetězec DNA.

Replikace genomu *E. coli* trvá přibližně 40 minut a pokud se bakterie dělí každých 20–30 minut, znamená to, že nová replikace musí být zahájena ještě před tím, než je předcházející replikace dokončena. Znamená to, že dceřiná buňka dědí DNA, která již zahájila svou vlastní další replikaci.

Replikace musí být přesná

Přesnost replikace je pro buňku zcela zásadní, protože DNA nese informaci, která určuje všechny vlastnosti a procesy buňky. To je zajištěno procesem zpětné kontroly inkorporace deoxyribonukleotidů (proofreading), během kterého je DNA polymerasa schopna identifikovat a nahradit nesprávně vložený deoxyribonukleotid správným. Tento proces snižuje frekvenci omylů na hodnotu přibližně 1 chyba na 10^{10} zabudovaných párů bází.

Buněčnému dělení předchází oddělení genomů a vytvoření septa

Proces buněčného dělení zahrnuje:

- oddělení zreplikovaných genomů,
- vytvoření přepážky (septum) ve střední části buňky,
- rozdělení buňky za vzniku dvou dceřiných buněk.

Septum vzniká vchlípením cytoplazmatické membrány a vrůstáním peptidoglykanové buněčné stěny (a vnější membrány u Gram-negativních bakterií). Vytvoření septa,

Nepřátelské mikroby

replikace DNA a oddělení genomů není úzce propojeno, ale je dostatečně účinně koordinováno tak, aby bylo zajištěno, že drtivá většina takto vzniklých buněk má přesnou kopii genomové DNA.

Výsledkem mechanismu buněčného dělení je reprodukovatelné uspořádání buněk, které je pozorovatelné mikroskopem. Například koky dělí se v jedné rovině mohou vytvářet řetízky (streptokoky) nebo dvojice (diplokoky), zatímco výsledkem dělení v několika rovinách jsou shluky (stafylokoky). Tato uspořádání spolu s tvarem buňky slouží jako důležitý charakteristický znak pro identifikaci bakterií.

Růst a dělení bakterií jsou důležité cíle pro antimikrobiální agens

Antibakteriální látky, které zasahují do procesů bakteriálního růstu a dělení, zahrnují:

- chinolony (např. ciprofloxacin, levofloxacin), které inhibují rozvolnění řetězců DNA gyrasou během replikace,
- mnoho skupin inhibitorů syntézy peptidoglykanu v buněčné stěně – mezi ně patří např. beta-laktamy (peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy) a glykopeptidy (vancomycin).

Antibakteriální látky jsou podrobně popsány v Kapitole 33.

2.4 Genová exprese

Expresí genů popisuje procesy zahrnující dekódování genetické informace genu až po vznik funkční bílkoviny nebo molekuly RNA.

Většina genů je přepsána do molekuly messenger RNA (mRNA)

Naprostá většina genů (např. u *Escherichia coli* více než 98 %) je procesem transkripce (přepisu) přepsána do mRNA, která je poté procesem translace (překlada) přeložena do primární struktury (sekvence aminokyselin) bílkovin. Výsledkem přepisu další skupiny genů jsou ribosomální RNA (rRNA: 5 S, 16 S, 23 S), které jsou základem pro sestavení ribosomálních podjednotek. Další skupina jsou geny, jejichž přepisem vznikají molekuly transferové RNA (tRNA), které se, spolu s rRNA, podílejí na dekódování mRNA do funkčního proteinu.

2.4.1 Transkripce (přepis)

DNA je kopírována DNA-dependentní RNA polymerasou a výsledkem tohoto procesu je RNA transkript. Polymerizační reakce zahrnuje zabudování odpovídajících ribonukleotidů podle předlohy DNA.

Transkripce je zahájena v promotoru

Promotory jsou nukleotidové sekvence v DNA, které váží RNA polymerasu. Frekvence zahájení (iniciace) transkripce může být ovlivněna mnoha faktory, např.:

- konkrétní sekvencí DNA v místě promotoru,
- celkovou topologií, tedy uspořádáním (supercoiling) DNA,
- přítomností nebo nepřítomností regulačních proteinů, které se váží těsně kolem místa promotoru, nebo ho překrývají.

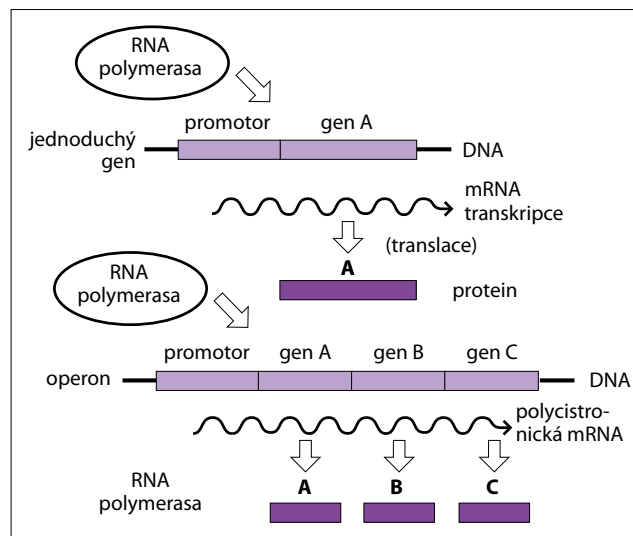
Důsledkem toho je, že promotory mají velmi široké spektrum frekvence iniciace (více než 3000násobný rozdíl). Aktivita promotorů je ovlivněna regulačními proteiny. Důležitou roli v rozpoznání promotoru hraje sigma faktor, který je součástí RNA polymerasy. Přítomnost několika různých sigma faktorů v bakteriích umožňuje zapínat sestavy genů jednoduše změnou úrovně exprese jednotlivých sigma faktorů. To je zvláště důležité při kontrole exprese genů zodpovědných za tvorbu spor Gram-pozitivních bakterií.

Transkripce obvykle končí ve specifických terminačních místech

Tato terminační místa jsou charakteristická sériemi uracilových zbytků v mRNA, za nimiž následuje invertovaná repetice, která zaujme strukturu palindromu (vytvoření smyčky se stopkou, kterou tvoří komplementární sekvence nukleotidů) a interferuje s aktivitou RNA polymerasy. Některé transkripty jsou ukončeny po interakci RNA polymerasy s terminačním proteinem r ρ .

mRNA transkripty bakterií často kódují více než jeden protein

Tato organizace transkripce pro jednoduché geny (promotor – strukturální gen – terminátor transkripce) se nazývá monocistronická. Jeden promotor a jeden terminátor ale mohou ohraničovat v sekvenci DNA několik strukturálních genů a toto uspořádání je označováno jako polycistronické, neboli operon. Výsledkem transkripce operonu je polycistronická mRNA kódující více než jeden protein (Obr. 2.7). Struktura operonu zajišťuje, že proteinové podjednotky, které dohromady tvoří enzymové komplexy, nebo jsou nutné pro speciální biologické procesy, jsou syntetizovány současně a ve správných stechiometrických poměrech. Například proteiny vyžadované pro metabolismus laktosy jsou kódovány v lac operonu. Mnoho proteinů zodpovědných za pa-



Obrázek 2.7 Bakteriální geny jsou na DNA umístěny buď jako jednotlivé geny (single geny) s vlastním promotorem, nebo jako operony (multigeny), kdy je jedním promotorem kontrolováno více genů. Přepisem single genu vzniká monocistronická mRNA, přepisem operonu, které obsahují více genů, vzniká polycistronická mRNA: mRNA je dále překládána do struktury proteinu.

togenní působení medicínsky důležitých organismů jsou podobně kódovány v operonech, např.:

- choleroový toxin *Vibrio cholerae*,
- fimbrie/pili uropatogenních kmenů *Escherichia coli*, které slouží k přichycení na sliznice.

2.4.2 Translace (překlad)

Přesná sekvence aminokyselin v proteinu (polypeptidu) je určena specifickou sekvencí nukleotidů v mRNA transkriptu. Dekódování této informace do proteinu se děje prostřednictvím ribosomů a tRNA molekul v procesu translace (překlada). Každá trojice bází (triplet) v mRNA sekvenci koresponduje s kodónem pro specifickou aminokyselinu. Díky většímu množství možných kombinací nukleotidů se ale vyskytují případy, kdy více různých tripletů kóduje stejnou aminokyselinu (proto hovoříme o degenerovaném genetickém kódu). 64 možných kodónů kóduje všech 20 aminokyselin a navíc signální kodóny start a stop.

Translace začíná vytvořením iniciačního komplexu a končí stop kodónem

Iniciační komplex je tvořen mRNA, ribosomem a iniciátorovou tRNA molekulou nesoucí formylmethionin. Ribosomy se váží ke specifické sekvenci v mRNA (Shine-Dalgarnoova sekvence) a translace začíná na iniciačním start kodónu AUG, který hybridizuje se specifickou komplementární sekvencí (anti-kodónová smyčka) iniciátorové molekuly tRNA. Polypeptidový řetězec se prodlužuje posunem ribosomu podél molekuly mRNA a připojováním dalších molekul tRNA, které rozpoznávají následující triplety a nesou odpovídající aminokyseliny. Na ribosomech probíhá vlastní kondenzační reakce, která spojuje aminokyseliny (jež jsou přinášeny tRNA) rostoucího polypeptidového řetězce. Translace je ukončena, když ribosom dojde k jednomu z tří terminačních (stop) kodónů: UGA, UAA, nebo UAG.

Transkripce a translace jsou důležitými cílovými procesy pro antimikrobiální agens

Tato antimikrobiální agens jsou:

- inhibitory RNA polymerasy jako rifampicin,
- široké spektrum inhibitorů bakteriální proteosyntézy zahrnující makrolidy (např. erytromycin), aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikol, linkosamidy, streptograminy a oxazolidinony (viz Kapitola 33).

2.4.3 Regulace genové exprese

Adaptace bakterií na okolní prostředí se děje formou kontroly genové exprese

Bakterie mají velkou schopnost adaptovat se na měnící se podmínky prostředí. Toho je dosaženo zejména kontrolou genové exprese, která zajišťuje, že proteiny jsou produkovány pouze v případě potřeby. Například:

- Pokud bakterie narazí na nový zdroj uhlíku nebo dusíku, je výsledkem spuštění nových metabolických drah, které umožňují transport a zpracování těchto sloučenin.
- Pokud jsou z prostředí odstraněny některé sloučeniny, jako např. aminokyseliny, je spuštěna produkce enzymů, které umožňují bakteriím syntetizovat tyto látky *de novo*.

Expres mnoha faktorů virulence patogenních bakterií je vysoce regulována

Expres faktorů virulence je smysluplná pouze tehdy, pokud je skutečně v daných podmínkách potřebná. Například zdrojem patogenních enterobakterií jsou kontaminované odpadní vody. Teplota těchto vod bývá obvykle méně než 24 °C a tyto vody jsou chudé na živiny. Pokud ale dojde k přenosu do gastrointestinálního traktu člověka, podmínky se dramaticky změň: teplota stoupne k 37 °C, v okolí se vyskytuje hojnost uhlíku a dusíku, naproti tomu kyslíku a železa jako esenciálních živin je podstatně méně. Bakterie se adaptují na takové změny zapnutím nebo vypnutím řady genů zodpovědných za metabolismus nebo produkci faktorů virulence. Analýza exprese genů pro faktory virulence je jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí studia patogeneze mikrobiálních infekcí. Poskytuje důležité informace o způsobu, jakým se bakterie adaptují na řadu změn v souvislosti s počátkem infekčního procesu a šířením do různých tkání hostitele.

Nejběžnějším způsobem změny genové exprese je změna množství transkribované mRNA

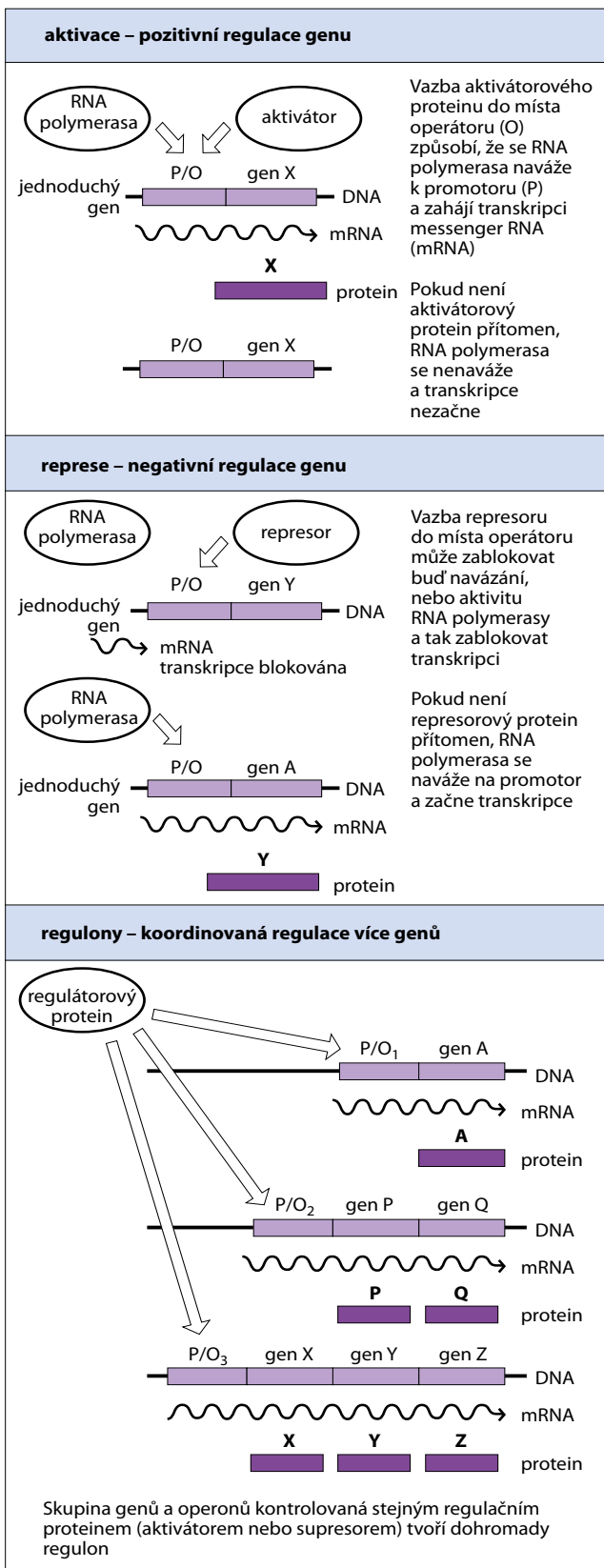
Hladina transkripce mRNA může být modifikována změnou účinnosti vazby RNA polymerasy k promotoru. Změny prostředí jako zvýšení teploty (z 25 °C na 37 °C) nebo dostupnost kyslíku mohou změnit uspořádání DNA a tím změnit topologii promotoru a frekvenci iniciace transkripce. Za většinu transkripčních regulací jsou ale zodpovědné regulační proteiny, které se specificky vážou na přilehlé úseky DNA nebo přímo do oblasti promotoru, čímž měň schopnost vazby RNA polymerasy a tím účinnost transkripce. Úseky DNA, na které se váží regulační proteiny, se nazývají operátory nebo operátorová místa. Rozlišujeme dvě skupiny regulačních proteinů:

- skupinu, která zvyšuje transkripci (aktivátory),
- skupinu, která inhibuje transkripci (represory, Obr. 2.8).

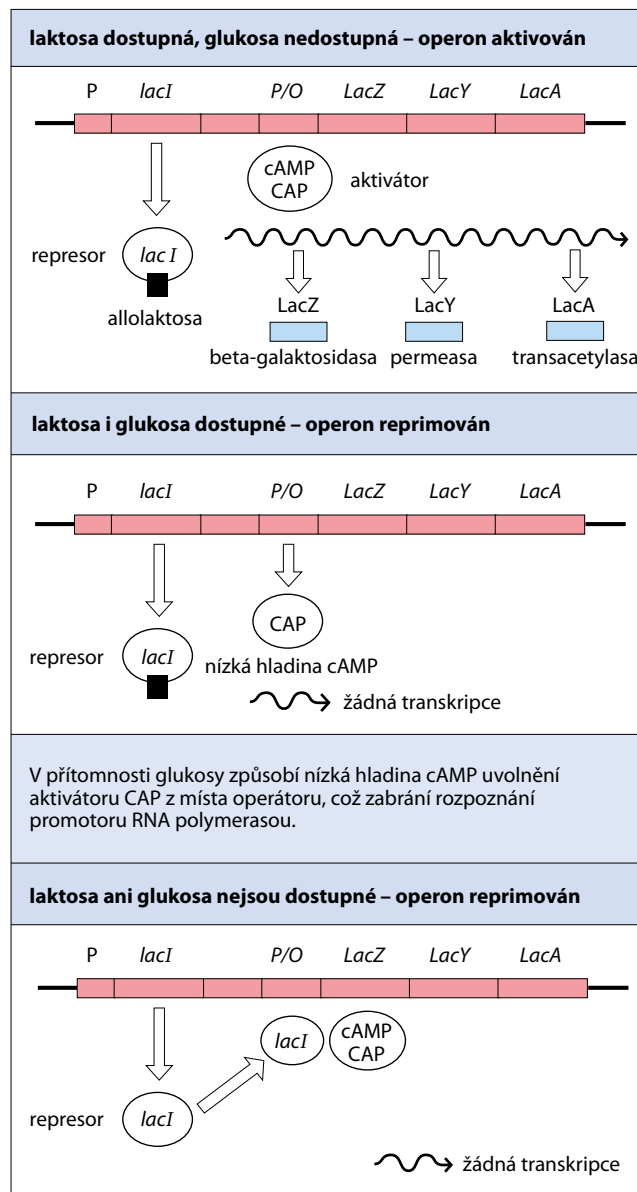
Geny s negativní regulací vážou represory. Geny s pozitivní regulací potřebují k iniciaci transkripce navázání aktivovaného regulátoru či regulátorů.

Principy genové regulace u bakterií mohou být nejlépe ilustrovány na regulaci genů zapojených v metabolismu cukrů

Bakterie používají pro svůj růst cukry jako zdroj uhlíku a preferují glukosu před jinými hůře metabolizovatelnými cukry. Pokud rostou v prostředí s glukosou i laktosou, bakterie jako *E. coli* přednostně spotřebovávají glukosu a současně brání expresi lac operonu, jehož produkty se podílí na transportu a metabolismu laktosy (Obr. 2.9). To označujeme jako katabolickou represi. Je možná díky tomu, že iniciace transkripce lac operonu závisí na pozitivním regulátoru, cAMP-dependentnímu aktivačnímu proteinu (CAP), který je aktivován pouze navázáním cAMP. Když bakterie rostou v prostředí s glukosou, je cytoplazmatická hladina cAMP nízká a CAP není aktivován. CAP není proto schopen navázat se na vazebné místo na DNA v blízkosti lac promotoru a RNA polymerasa nezahájí jeho transkripci. Když je glukosa vyčerpána, zvýší se koncentrace cAMP, vznikne aktivovaný cAMP-CAP komplex, který se naváže



Obrázek 2.8 Exprese bakteriálních genů je vysoce regulovaná a umožňuje bakteriím zapínat či vypínat jednotlivé geny v závislosti na dostupnosti substrátu nebo jiných změn v okolním prostředí. Geny a operony, které jsou pod kontrolou jednoho regulátoru, tvoří dohromady regulon.



Obrázek 2.9 Kontrola lac operonu. Transkripce je kontrolována laktosovým represorickým proteinem (*lac I*, negativní regulace) a katabolickým aktivátorovým proteinem (CAP, pozitivní regulace). V přítomnosti laktosy jako jediného zdroje uhlíku je lac operon zapnutý. Bakterie ale preferuje utilizaci glukosy před utilizací laktosy, takže pokud je glukosa k dispozici, je lac operon vypnutý, dokud glukosa není spotřebována.

na vazebné místo DNA a tím se zvýší vazba RNA polymerasy a následuje transkripce.

CAP je příkladem obecného regulačního proteinu, který kontroluje expresi mnoha genů. U *Escherichia coli* je takto regulováno více než 100 genů. Všechny geny kontrolované jedním regulátorem tvoří regulon (Obr. 2.8). Kromě regulace lac operonu CAP proteinem je tento operon regulován také negativní regulací pomocí laktosového represorického proteinu (*lacI*, Obr. 2.9). *LacI* je kódován genem *lac I*, který je umístěn těsně u lac operonu proti směru transkripce (upstream) a je přepisován z vlastního promotoru. Pokud není laktosa v prostředí, *lac I* se váže specificky na oblast operátoru lac promotoru