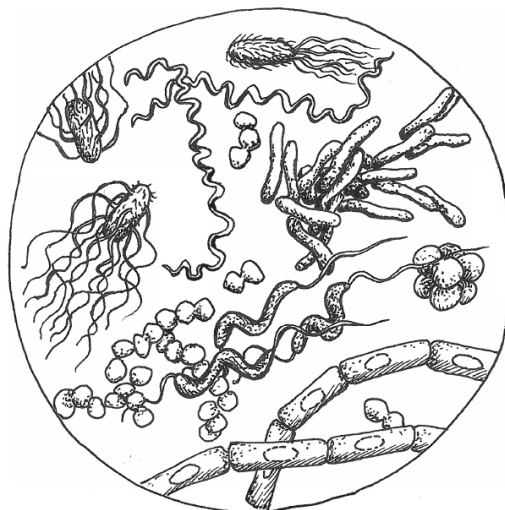


VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

VYBRANÉ KAPITOLY Z VETERINÁRNÍ
BAKTERIOLOGIE I
Obecná bakteriologie



MVDr. Aneta Papoušková

MVDr. Martina Masaříková, PhD.

Doc. RNDr. Ivan Rychlík, PhD.

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

BRNO 2019

Tato skripta jsou financována z projektu IVA VFU Brno 2019
2019FVL/1230/06.

Předmluva.....	4
1. Klasifikace a nomenklatura bakterií (AČ).....	5
2. Běžná bakteriální mikroflóra (IR).....	10
2.1 Mikrobiom, mikrobiota, komenzál, kolonizace	10
2.2 Význam běžné mikroflóry pro zdraví zvířat	11
2.3 Mikrobiota kůže, sliznic horních cest dýchacích a urogenitálního aparátu	13
2.4 Mikrobiota sliznic horních cest dýchacích a plic	13
2.5 Mikrobiota urogenitálního aparátu	13
2.6 Mikrobiota GIT ptáků, monogastrů a přežvýkavců a jejich zvláštnosti	14
2.7 Faktory vyvolávající nerovnováhu mikrobiomu a důsledky tohoto stavu.....	16
2.8 Prebiotika, probiotika, synbiotika.....	17
3. Patogenita a virulence.....	19
3.1 Definice pojmů (AP).....	19
3.2 Cesty vstupu bakterií do organismu (AP).....	21
3.3 Infekce jednotlivých orgánových systémů (MM)	23
3.3.1 Respirační systém	23
3.3.2 Gastrointestinální systém.....	24
3.3.3 Vylučovací systém	25
3.3.4 Reprodukční systém	26
3.3.5 Kůže	27
3.3.6 Centrální nervový systém	28
3.4 Faktory asociované s virulencí (AP).....	31
3.4.1 Adheziny.....	31
3.4.2 Invaziny	34
3.4.3 Toxiny	36
3.4.3.1 Toxiny poškozující cytoplasmatickou membránu	38
3.4.3.2 Toxiny modifikující buněčný cytoskeleton.....	39
3.4.3.3 Toxiny ovlivňující signální dráhy.....	40
3.4.3.4 Toxiny inhibující proteosyntézu.....	41
3.4.3.5 Toxiny aktivující imunitní systém (superantigeny)	41
3.4.3.6 Klostridiové neurotoxiny.....	42
3.4.3.7 Endotoxin	42
3.4.4 Sekreční systémy.....	43

3.4.5	Mechanismy pro vazbu železa.....	46
3.5	Interakce bakterií s imunitním systémem (AP).....	48
3.5.1	Maskování bakterií a ochrana bakteriálního povrchu.....	49
3.5.2	Interference s molekulami imunitního systému.....	51
3.5.3	Interference s fagocytózou.....	52
3.5.4	Interference s adaptivní imunitní odpovědí.....	53
3.6	Interakce bakterií s hostitelskou buňkou.....	55
3.6.1	Intracelulární způsob života (AČ).....	55
3.6.2	Perzistentní infekce (AP).....	58
3.6.2.1	Perzistence na sliznicích.....	58
3.6.2.2	Extracelulární perzistence.....	59
3.6.2.3	Intracelulární perzistence.....	59
3.7	Další faktory související s virulencí (AP).....	62
3.7.1	Regulace exprese faktorů virulence.....	62
3.7.2	Biofilm.....	64
3.8	Genetické základy virulence bakterií (IR).....	69
3.8.1	Zdroje genetické variability, mutace a rekombinace.....	69
3.8.2	Horizontální šíření genů.....	70
3.8.3	Plazmidy.....	71
3.8.4	Transpozóny.....	71
3.8.5	Integrony.....	72
3.8.6	Bakteriofágy.....	72
3.8.7	Ostrovy patogenity.....	73

Předmluva

Bakteriologie je zajisté jedním z nejkrásnějších odvětví přírodních věd. Nabízí fascinující pohled do světa, jenž je našim smyslem nedostupný, a přesto ovlivňuje naši existenci každý den doslova od kolébky po hrob. Bakterie hýbají světovým ekosystémem, pomáhají vytvářet prostředí, ve kterém žijeme, poskytují nám nutričně hodnotné potraviny a nápoje. Bakterie, které s námi žijí v bezprostředním kontaktu, ovlivňují náš vývin a nejrůznější fyziologické pochody, včetně psychiky. Naše pozornost se ovšem zcela pochopitelně zaměřuje na bakterie jakožto původce onemocnění.

Tato skripta mají být především pomůckou ke studiu bakteriologické části předmětu veterinární mikrobiologie. Myslíme si však, že nebude na škodu nahlédnout problematiku bakteriálních onemocnění poněkud komplexněji. Pochopení obecných principů interakce mezi hostitelským organismem a bakteriemi, ať už patogenními či běžně kolonizujícími, zajisté napomůže také pochopení patogeneze významných onemocnění a bude budoucím veterinářům k užítku při vykonávání běžné praxe. Zjednodušený koncept jeden patogen = jedno onemocnění v bakteriologii přináší jen více zmatku, neboť různé kmeny bakterie jednoho druhu se velmi liší schopností způsobovat onemocnění a infekce je výsledkem často velice složité interakce mezi hostitelem, prostředím a různými patogeny. Bakterie navíc ovlivňují zdraví nejen přímým poškozováním makroorganismu, ale i svým vlivem na funkci všech možných systémů, a svým způsobem mohou hrát roli i při vzniku neinfekčních onemocnění, např. autoimunitních.

Bakteriální infekce jsou nejčastější bezprostřední příčinou smrti jak lidí, tak zvířat. Mají nezměrný hospodářský dopad, do něž lze započítat kromě přímých ztrát úhyny a náklady na léčbu také mnoho dalších souvisejících výdajů. Náš boj s bakteriálními infekcemi připomíná závody ve zbrojení mezi dvěma velkými mocnostmi a nutno si přiznat, že bakterie jsou vždy o krok napřed. Složitost vztahů mezi bakteriemi člověka, zvířat a prostředí je demonstrován problematikou narůstající antibiotické rezistence, ale i vznikem nových virulentních původců (tzv. „emerging pathogens“). Máme před očima evoluci v malém a pověstná lidská invence má co dělat, aby jí stačila. Je třeba stále zdůrazňovat princip „one health“, jedno zdraví člověka i zvířat. Veterinární lékař má zodpovědnost za obojí.

Komplexní, nikoli mechanický přístup k této problematice činí proto studium veterinární bakteriologie jak fascinujícím, tak smysluplným. Doufáme, že tato učební pomůcka Vám pomůže nejen při přípravě na zkoušku z veterinární mikrobiologie, ale i v budoucí praxi. Příjemné studium přeje kolektiv autorů.

1. Klasifikace a nomenklatura bakterií

Biologové tradičně organismy zařazovali do pěti říší: zvířata, rostliny, houby, protista a bakterie. Analýza sekvencí genů kódujících menší podjednotku ribozomální RNA však naznačila existenci tří základních linií buněčných organismů, které se nazývají **domény** a jsou nadřazeny úrovni říší. Dvě z nich, *Bacteria* a *Archea*, představují výhradně prokaryotické mikroorganismy, zatímco třetí doména *Eukarya*, zahrnuje eukaryotické organismy s pravým jádrem.

Mikroskopické organismy byly dříve klasifikovány především na základě fenotypových znaků (morfologie, fyziologické vlastnosti a biochemická aktivita). Dnes se při jejich systematickém třídění (klasifikaci) musíme stále častěji spoléhat na analýzu jejich genotypu. Porovnáním podobnosti a příbuznosti dostupných vlastností jsou mikroorganismy zařazovány do skupin tzv. **taxonů**, které patří do určité taxonomické kategorie na určité taxonomické úrovni, jako jsou kmen, třída, řád, čeleď, rod a druh.

Označení (nomenklatura) taxonů podléhá závazným mezinárodním pravidlům. Název základní taxonomické jednotky druhu bakterie (lat. *species*) je kombinací rodového a druhového označení, např. *Bacillus cereus*. Tento binomiální systém zavedl již v 18. století švédský botanik Carl Linné. Názvy bakterií, podobně jako rostlin a živočichů, jsou odvozeny z latiny nebo se jedná o latinizovaná označení pocházející z řečtiny. Hojná jsou také označení odvozená od jmen významných mikrobiologů nebo podle místa jejich první izolace a podobně. Každé takové označení má svůj původ (etymologii), tak např. všeobecně známé označení druhu střevní bakterie *Escherichia coli* je odvozeno od příjmení rakousko-německého lékaře, bakteriologa a vysokoškolského pedagoga Theodora Eschericha, který popsal časnou kolonizaci střeva (kolonu) novorozenců bakterií *Bacterium coli communae* (později změněno na *Escherichia coli*). Název rodu *Streptococcus* je odvozen z řeckého *streptos* (řetěz) + *kokkos* (bobule, bobulovitý plod). Podobně název rodu *Campylobacter* pochází z řeckého *kampylos* (zakřivený) + baktron (tyčinka).

Příklad nomenklatury taxonomických úrovní pro bakterii druhu *Streptococcus agalactiae*, původce chronických katarálních mastitid dojníc (tabulka č. 1).

Tabulka 1 Taxonomické zařazení *Streptococcus agalactiae*

Taxonomická kategorie	Název
Doména	Bacteria
Kmen	Firmicutes
Třída	Bacilli
Řád	Lactobacillales
Čeleď	Streptococcaceae
Rod	<i>Streptococcus</i>
Druh	<i>Streptococcus agalactiae</i>

Podrobnější náhled na klasifikaci domény *Bacteria*, kam řadíme naprostou většinu medicínsky významných bakterií, najdeme v aktualizovaném stavu na stránkách LPSN (List of

Procaryotic names with Standing in Nomenclature) (<http://www.bacterio.net/-classification.html>). Zakladatelem těchto stránek je Jean Paul Marie EUZÉBY, veterinární lékař a profesor mikrobiologie a imunologie na École nationale vétérinaire v Toulouse, Francie.

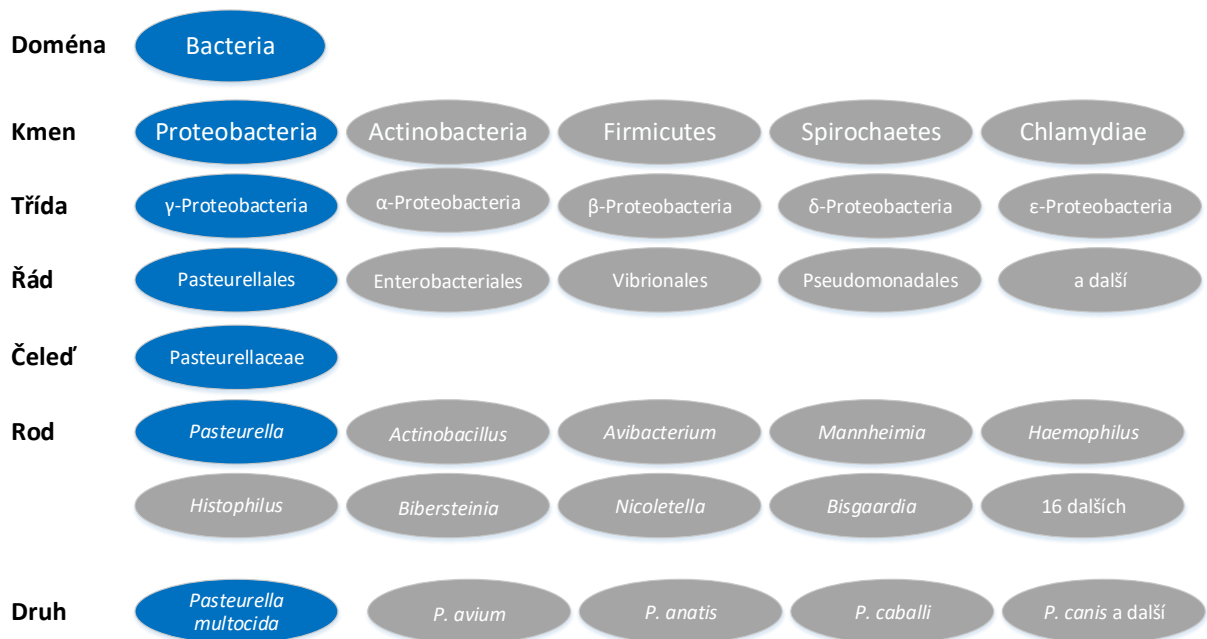
Doménu *Bacteria* tvoří aktuálně 35 kmenů a z nich pět *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Chlamydiae* zahrnuje většinu klinicky významných druhů bakterií. *Proteobacteria* představují gramnegativní bakterie s typickou sekvencí rRNA a jsou pojmenovány po starořeckém mořském bohu Próteovi, který vynikal svými proměnami, podobně tato skupina bakterií je charakteristická značným počtem různých tvarových forem. Je to nejpočetnější kmen, který se dělí na pět tříd – alfa, beta, gamma, delta a epsilon. Kmen *Firmicutes* integruje grampozitivní bakterie s nízkým obsahem nukleotidů G a C v genomu, kmen *Actinobacteria* obsahuje rovněž grampozitivní bakterie, ale naopak s vysokým obsahem nukleotidů G a C v genomu. Další kmen *Bacteroidetes* je velmi početnou skupinou gramnegativních bakterií různého původu a vlastností. Kmen *Spirochaetes* je fylogeneticky starou a významnou skupinou gramnegativních bakterií s charakteristickým štíhlým spirálovitým tvarem buňky, a konečně pátý kmen *Chlamydiae* zahrnuje gramnegativní drobné ovoidní bakterie, které se množí pouze v eukaryotických buňkách a jsou to tedy obligátně intracelulární bakterie.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny veterinárně významné rody a skupiny bakterií patřící do pěti medicínsky významných kmenů bakterií.

Tabulka 2 Kmenové zařazení medicínsky významných bakteriálních rodů

Kmen	Veterinárně významné rody nebo skupiny bakterií
<i>Proteobacteria</i>	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Brucella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Pseudomonas</i> aj.
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , bakterie mléčného kvašení, <i>Mycoplasma</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i> , flavobacteria
<i>Chlamydiae</i>	Chlamydie

Pro lepší představu členění jednotlivých taxonomických úrovní je v schématu č. 1 uvedena hierarchie taxonomického zařazení původce cholery drůbeže, *Pasteurella multocida*.

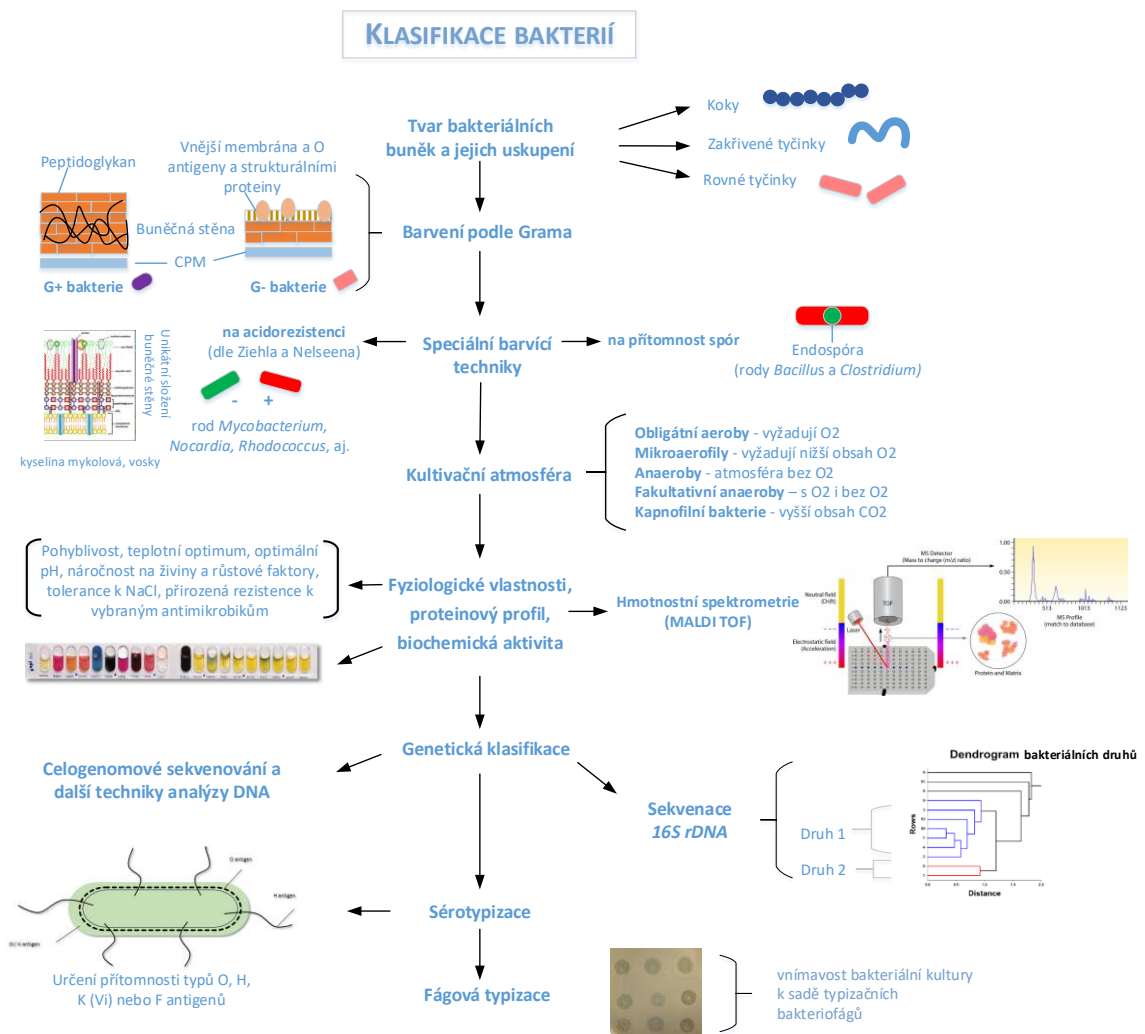


Obrázek 1 Taxonomické zařazení *Pasteurella multocida*

Snahou bakteriologů, kteří se zabývají systematickou mikrobiologií, je přesně definovat a zařadit základní taxonomickou jednotku – bakteriální druh. Ten zahrnuje izoláty či kmene bakterií vzájemně podobné včetně typového představitele druhu, tzv. typového kmene. Fylogenetická definice druhu je souhrnem fenotypových znaků s převládající shodou a zejména se jedná o shodu sekvencí konzervativních úseků 16S rDNA. Obecně přijímanou mírou shody této sekvenční analýzy je minimálně 97 %. Případně lze využít za účelem porovnání příbuznosti i jiné vysoce konzervativní geny.

Při laboratorní diagnostice medicínsky významných bakterií často nevystačíme s jejich identifikací na úroveň druhu a musíme přikročit k podrobnější charakteristice bakteriálních kultur (izolátů) získaných z infekcí člověka a zvířat. Rozdíly ve vlastnostech prokázané různými diagnostickými testy nám mohou v rámci druhu vymezovat různé variety (přípona -var), např. **biovar** (specifická biochemická aktivita, má např. význam pro rozlišení antigenně shodných biovarů *Salmonella Gallinarum* a *S. Pullorum*); **sérovar** (odlišení dle antigenní struktury; má např. význam při epidemiologickém šetření zdrojů a cest šíření původců salmonelózy, leptospirózy, yersiniózy, koliinfekcí); **fagovar** (vnímavost bakteriální kultury k sadě typizačních bakteriofágů; má význam např. při epidemiologických studiích salmonelóz vyvolaných často se vyskytujícími sérovary salmonel – *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis*).

Lékařská i veterinární diagnostická bakteriologie se zabývá identifikací bakteriálních kultur získaných z infekcí člověka a zvířat, případně ze zdrojů takových infekcí. Bakteriologické diagnostické postupy využívají kombinaci metod, které umožňují identifikovat neznámé bakteriální kultury. Zvolenými metodami se hodnotí zejména morfologii bakteriálních buněk (mikroskopie), složení buněčné stěny (barvicí metody – Gramova reakce, barvení dle Zeehla a Nelseena), biochemická aktivita, antigenní struktura, profil proteinů (hmotnostní spektrometrie) a složení nukleových kyselin (různé metody, včetně celogenomového sekvenování). Jedná se tedy o praktickou aplikaci části taxonomické klasifikace na úroveň druhu, případně i jeho variet, za účelem získání přesné laboratorní diagnózy (viz. schéma č. 2).



Obrázek 2 Přehled metod využívaných k praktické klasifikaci bakterií v lékařské a veterinární diagnostické bakteriologii

Taxonomické vědecké studie, které se zabývají popisem nových druhů bakterií, využívají tzv. polyfázový přístup k identifikaci. To znamená, že využívají kombinují výsledky dostupných metod analýzy fenotypu, genotypu a fylogeneze. Výběr metod se může lišit podle cílové skupiny bakterií. Přehled základních metod využívaných v polyfázové taxonomii a jejich rozsah rozlišení je znázorněn na schématu č. 3.

Metody

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

DNA fingerprinting (různé metody)

Profil proteinů

DNA-DNA hybridizace

Procentuální obsah nukleotidů GC

Složení/struktura buněčné stěny

Chemotaxonomické znaky (mastné kyseliny, chinony, ...)

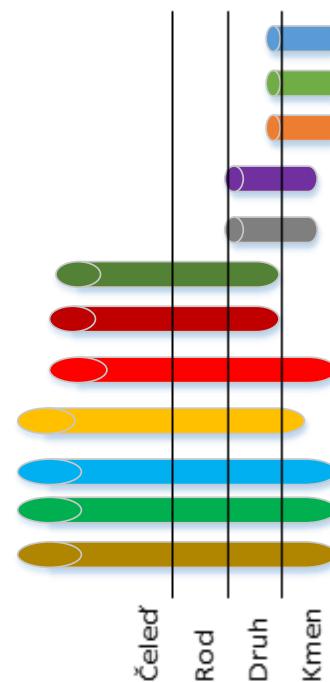
Fenotyp (morfologie, biochemická aktivita, ...)

Sekvenování rRNA

DNA sondy (ribotypizace, ...)

Sekvenování DNA

Celogenomové sekvenování



Obrázek 3 Znárodnění využitelnosti dostupných metod pro polyfázovou identifikaci bakterií

Doporučená literatura:

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 103, 2014, pp. 80-100, ISSN 0167-7012

2. Běžná bakteriální mikroflóra

Ani hospodářská zvířata, ani člověk nežijí ve sterilním světě. Právě naopak, vyšší organismy žijí v neustálém kontaktu a konfrontaci s jednoduchými formami života představovanými bakteriemi nebo viry. Přestože se jedná o jednoduché formy života, jejich výhodou je velmi krátká generační doba. *E. coli* nebo *Clostridium perfringens* jsou schopny se za optimálních podmínek rozmnožit každých 30 minut, zatímco kur domácí na to potřebuje 5 měsíců a člověk cca 15 let. Je tedy zřejmé, že se vyšší organismy musely na danou situaci adaptovat a přítomnost mikroorganismů ve vnějším prostředí tolerovat.

Mnoho kompartmentů těla hostitele není a nemá být sterilní. Naopak, jsou kolonizovány různými mikroorganismy, jako jsou eukaryotické protozoa i některé mnohobuněčné eukaryotické organismy, plísně, kvasinky a houby, bakterie nebo viry. Správná funkce mnoha kompartmentů hostitele je dokonce na kolonizaci mikrobiální komunitou závislá. Mikrobiální komunity o různém složení tak najdeme na kůži, v respiračním, urogenitálním i trávicím traktu. Celková mikroflóra se sestává z bakterií, jednobuněčných protozoárních (eukaryotických) mikroorganismů, hub a plísní, ale taky virů a bakteriofágů. Z hlediska absolutní početnosti jsou nejběžnějšími kolonizátory bakterie, které dosahují nejvyšších počtů v trávicím traktu.

2.1 Mikrobiom, mikrobiota, komezál, kolonizace

K označení všech mikroorganismů se běžně používá termín mikroflóra. Nově se však začínají užívat i termíny mikrobiota a mikrobiom. Termíny mikrobiota a mikrobiom se velmi často zaměňují, přestože mezi nimi je jasný významový rozdíl. Termín mikrobiota se používá k označení všech živých mikroorganismů tvořících danou populaci. Termín mikrobiom se naopak používá k označení všech genů, které v souhrnu daná populace prostřednictvím svých jednotlivých členů kóduje. Mikrobiota je tedy totéž co mikroflóra, zatímco mikrobiom je souhrn všech genů, které jednotliví členové uvažované populace kódují. Běžná záměna obou termínů je dána i skutečností, že často sice hovoříme o bakteriích tvořících danou populaci, ale současně hovoříme o tom, čeho je daná populace schopna, na základě složení a genetických vlastnostech jednotlivých bakteriálních kmenů. Pokud jasně hovoříme jen o živých mikroorganismech, použijeme termín mikrobiota. Pokud však diskutujeme, čeho všeho je daná populace schopna na základě genetického vybavení jednotlivých členů, použije se termín mikrobiom.

mikrobiota = mikroflóra	Souhrn všech živých mikroorganismů tvořících danou mikrobiální populaci
mikrobiom	Souhrn všech genů, které jednotliví členové dané mikrobiální populace kódují; celkový "genom" mikrobiální populace

Mnoho povrchů a kompartmentů vyšších organismů je trvalé osídleno specifickou mikroflórou. Schopnost daného mikroorganismu trvale osídlit příslušný kompartment se nazývá též kolonizace. Definovat „trvalost“ osídlení není ve zjednodušené podobě možné. Např.

u kura domácího trvá průchod potravy trávicím traktem jen necelé tři hodiny. Pokud tedy kuřatům orálně podáme bakteriální směs, její přítomnost v trusu za tři hodiny po podání je zcela logická, ale nevypovídá nic o úspěšné kolonizaci. Podobně nelze hovořit o trvalé kolonizaci v případě, kdy jsou některé bakterie podávány denně např. jako součást krmiva nebo pitné vody a jsou ve stejné období zachytávány i v trusu. Na druhou stranu, jen velmi málo mikroorganismů kolonizuje svého hostitele trvale po celý život. Systém interakcí mezi mikroflórou a hostitelem je nutno chápat jako dynamický, neměnicí se sice v hodinách, ale ani ne stabilní a zafixovaný v horizontu let. Pokud máme na mysli skutečnou kolonizaci, trvalou, pak bez jakéhokoli dalšího vnějšího zásahu bychom měli daný mikroorganismus na daném místě zachytávat minimálně několik dnů, lépe však týdnů a měsíců po sobě.

Trvalé kolonizace nemůže být dosaženo, pokud by jedna strana (hostitel) nebo druhá strana (mikroflóra) na daném vztahu prodělávala. Trvalý vztah může být založen jen na vzájemné prospěšnosti anebo vzájemně neutrálním vztahu. První případ nazýváme symbiózou a dané mikroorganismy jako symbiotické. Druhou typ vztahu nazýváme jako komenzalismus skupinu mikroorganismů jako komensální neboli komenzály. Další typy mikroorganismů (podle vztahu k jejich hostiteli, jako jsou paraziti nebo patogeny) jsou představeny na jiném místě tohoto učebního textu.

Kolonizace	Schopnost daného mikroorganismu trvale osídlit příslušný povrch nebo orgán hostitele
Symbióza	Vzájemně prospěšný vztah mezi hostitelem a daným mikroorganismem
Komenzalismus	Vzájemně neutrální vztah mezi hostitelem a daným mikroorganismem

2.2 Význam běžné mikroflóry pro zdraví zvířat

Běžná mikroflóra kolonizující kůži, respirační, urogenitální a trávicí trakt má ochranný účinek a chrání hostitele před kolonizací patogenními organismy. Principy ochrany jsou různé a zahrnují např. snížení pH produkcí organických kyselin (k. mléčná, octová nebo máselná), které následně omezí multiplikaci patogenních bakterií. Bakterie běžné mikroflóry mohou produkovat proteiny a peptidy s antimikrobiálním účinkem (bakteriociny), které účinkují proti patogenním mikroorganismům. Nejčastějším způsobem ochrany zdraví hostitele běžnou mikroflórou před patogenními organismy však spočívá v soutěži o dostupné živiny – stovky patogenních mikroorganismů v kontaminovaném krmivu nebo vodě stěží prorostou mikrobiální komunitou o počtech 10^{10} bakterií na gram nebo cm^2 . V trávicím traktu se k výše uvedenému přidávají ještě další vlastnosti. Střevní mikroflóra se sestává ze striktních anaerobů. Udržování anaerobního prostředí omezuje multiplikaci fakultativně-anaerobních bakterií jako je *E. coli* nebo *Salmonella*. Schopnost respirace, tedy značně výhodnějšího energetického metabolismu, je u těchto patogenů v plně osídleném střevě potlačena. Dále mikroflóra trávicího dokáže degradovat i látky, které vyšší organismy odbourat neumí. Jedná se zejména o nestravitelné polysacharidy, které se souhrnně označují jako vláknina. Protože v anaerobním prostředí trávicího

traktu není možné vlákninu metabolizovat až na CO₂ a vodu jako za přístupu kyslíku, metabolismus střevní mikroflóry obvykle končí produkcí organických kyselin, jako je k. mléčná, octová, propiónová a máselná. Tyto organické kyseliny nejenže chrání před infekcí patogenními mikroorganismy, ale mohou být hostitelem resorbovány a v aerobním metabolismu přeměněny na CO₂ a vodu se ziskem molekul ATP. Uvedené organické kyseliny se pro svou strukturu označují jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids – SCFA). Přitom mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (k. olejová, palmitová) patří mezi energeticky nejvýznamnější složky potravy a krmiva. Přestože energetický zisk z metabolismu k. octové nebo máselné je přirozeně nižší, pořád se jedná o podstatné zdroje energie. Baktérie střevní mikroflóry tak svému hostiteli rozšiřují zisk energie i na substráty, které hostitel sám o sobě není schopen zpracovat. Jiným příkladem degradace substrátů, které jsou pro hostitele obtížně stravitelné a s jejichž degradací mohou pomoci baktérie střevní mikroflóry, je lepek. Lepek je protein, s jehož degradací mají někteří jedinci problémy. Lepek však umí degradovat některé druhy rodu *Lactobacillus* (např. *Lactobacillus salivarius*), a tak mikroflóra obohacená o takové druhy může usnadnit trávení lepku přítomného v obilovinách.

Význam mikroflóry pro zdraví zvířat
Snížení pH prostředí produkcí organických kyselin
Produkce proteinů a peptidů s antimikrobiálním účinkem (bakteriociny)
Anaerobizace prostředí (v trávicím traktu)
Soutěž o dostupné živiny s patogenními organismy
Degradace složek krmiva, které vyšší organismy odbourat neumí
Konverze složek krmiva, které vyšší organismy odbourat neumí, na energeticky bohaté organické kyseliny s krátkým řetězcem využitelné hostitelem v aerobním metabolismu

V asociaci s teplotokrevnými živočichy se nejčastěji vyskytují baktérie náležící do 4 kmenů (phylum, nezaměňovat se stejným termínem používaným pro označení jednotlivých izolátů bakterií, konkrétních bakteriálních kultur). Zástupci kmenů *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* patří mezi gramnegativní baktérie, zatímco zástupci kmenů *Firmicutes* a *Actinobacteria* patří mezi grampozitivní baktérie. Současně je potřeba mít na paměti, že taxonomická úroveň „kmen“ je velmi vysoká a zahrnuje mnoho taxonomicky příbuzných, ale chováním velmi odlišných bakterií. Pokud se podíváme na zařazení člověka do taxonomického systému, tak člověk náleží do kmene *Chordata* (strunatci). Do kmene však *Chordata* náleží i sumky, salpy, vršenky, sliznatky, mihule nebo paryby. Dvě různé baktérie kmene *Firmicutes* tak mohou mít podobně odlišné vlastnosti, jako má člověk a sumka nebo mihule. Právě u bakterií kmene *Firmicutes*, které osídlují vyšší organismy, jsou dvě odlišné skupiny a to třída *Bacilli* a řád *Clostridia*. Třída *Bacilli* zahrnuje fakultativně anaerobní bakteriální druhy, zatímco většina zástupců třídy *Clostridia* jsou striktně anaerobní baktérie. Mezi striktně anaerobní baktérie patří i zástupci kmenů *Actinobacteria* a *Bacteroidetes*, zatímco zástupci *Proteobacteria* jsou fakultativní anaerobové. Povrch a orgány v kontaktu s aerobní atmosférou (kůže, respirační nebo urogenitální trakt) tak budou nejčastěji kolonizovat zástupci třídy *Bacilli* z kmene *Firmicutes* a *Proteobacteria*, zatímco anaerobní prostředí bachoru nebo

distální části trávicího traktu budou osídleny zejména zástupci z třídy *Clostridia* z kmene *Firmicutes*, společně s *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*.

kmen – (třída)	Barvení dle Grama	Vztah ke kyslíku
<i>Firmicutes</i> – <i>Bacilli</i>	grampozitivní	fakultativní anaerobové
<i>Firmicutes</i> – <i>Clostridia</i>	grampozitivní	striktní anaerobové
<i>Bacteroidetes</i>	gramnegativní	striktní anaerobové
<i>Proteobacteria</i>	gramnegativní	fakultativní anaerobové
<i>Actinobacteria</i>	grampozitivní	striktní anaerobové

2.3 Mikrobiota kůže, sliznic horních cest dýchacích a urogenitálního aparátu

Mikroflóra kůže je tvořena bakteriemi kmenů *Firmicutes* (okolo 55 %), *Bacteroidetes* (20 %), *Actinobacteria* (15 %) a *Proteobacteria* (5 %). Zastoupení *Bacteroidetes* narůstá zejména na kůži v okolí análního otvoru. Jinak je mikroflóra kůže je tvořena zejména aerobními, grampozitivními bakteriemi. Povrch kůže je běžně kolonizován bakteriemi mléčného kvašení jako je *Lactobacillus*, *Aerococcus* nebo *Streptococcus*. Kůže je běžně kolonizována i bakteriemi rodu *Staphylococcus*, které společně s laktobacily patří do kmene *Firmicutes*.

2.4 Mikrobiota sliznic horních cest dýchacích a plic

Jak horní cesty dýchací, tak plíce představují vysoce aerobní prostředí. Proto se na jejich kolonizaci podílí zejména zástupci třídy *Bacilli* z kmene *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Striktně anaerobní zástupci kmene *Bacteroidetes* v mikroflóře horních cest dýchacích obvykle zcela chybí. Mezi nejběžnější rody kolonizující nosní sliznici proto patří *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* (vše *Bacilli* – *Firmicutes*), *Pasteurella*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Escherichia* a *Klebsiella* (vše *Proteobacteria*).

V plicích se mezi běžnou mikroflóru řadí zejména laktobacily. Při respiračních problémech se však ve zvýšené míře může vyskytnout i *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Haemophilus* nebo *Pseudomonas*.

2.5 Mikrobiota urogenitálního aparátu

Urogenitální trakt coby semiaerobní prostředí je osídlen zejména *Firmicutes* a *Proteobacteria* se sníženým podílem *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Na úrovni rodu dominují *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* (vše *Firmicutes*), nebo *Cronobacter* a *Escherichia* (obě *Proteobacteria*).

2.6 Mikrobiota GIT ptáků, monogastrů a přežvýkavců a jejich zvláštnosti

Mikroflóra tenkého, slepého a tlustého střeva všech teplokrevných živočichů s běžnými potravními nároky vykazuje shodné rysy, což je dáno shodnými podmínkami v tomto prostředí. Ty jsou definovány stálou teplotou v rozmezí 37 až 42 °C, kontinuálním přísunem živin a klesající koncentrací kyslíku až na zcela anaerobní prostředí ve slepém a tlustém střevě. Odlišná a charakteristická mikroflóra je pochopitelně v orgánech, které jsou specifické jen pro určité živočišné druhy, např. vole u drůbeže nebo bachor u přežvýkavců.

Vole drůbeže je charakteristické stále ještě vysokým podílem aerobní atmosféry. Vole je tedy osídleno bakteriemi, které jsou schopny tolerovat kyslík ze vzduchu. Proto se zde vyskytují zástupci *Proteobacteria* a aerotolerantní *Firmicutes* (třída *Bacilli*). Typickým zástupcem mikroflóry vole je z kmene *Proteobacteria* je rod *Gallibacterium* a z kmene *Firmicutes* pak bakterie rodu *Lactobacillus*.

Dalším specifickým orgánem u hospodářských zvířat je bachor přežvýkavců. Prostedí v bachoru je anaerobní a tak se v něm vyskytují podobné bakterie jako v distálních částech trávicího traktu. Způsob výživy přežvýkavců však vede k obohacení mikroflóry bachoru zejména o celulolytické bakterie. Mezi nejběžnější bakterie v bachoru patří gramnegativní bakterie čeledi *Prevotelleaceae* (kmen *Bacteroidetes*) a bakterie čeledi *Ruminococcaceae* (patří mezi Gram pozitivní bakterie třídy *Clostridia* a kmene *Firmicutes*). V případě, že je krmivo obohaceno o jednoduché mono- nebo oligosacharidy, mohou v bachoru přerůst bakterie rodu *Lactobacillus*. Jejich metabolismus mono- nebo oligosacharidů vede k poklesu pH bachoru pod žádoucí mez a vzniku acidózy bachoru. Mezi specifické bakterie bachoru patří i metanogenní archebakterie. Nejčastěji se v bachoru přežvýkavců vyskytuje *Methanobrevibacter*, který je zodpovědný za produkci metanu, protože je také chov přežvýkavců spojován s uvolňováním a hromaděním skleníkových plynů v atmosféře.

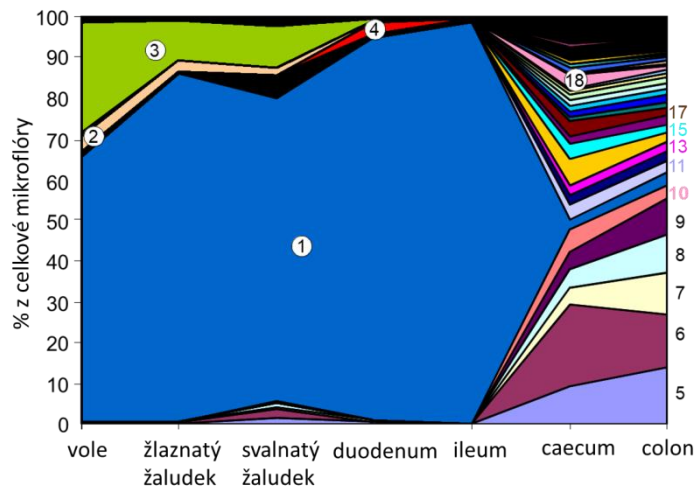
Složení mikroflóry tenkého, slepého a tlustého střeva vykazuje shodné rysy u všech teplokrevných a omnivorních hospodářských zvířat i člověka, což nevylučuje hostitelskou adaptaci určitých druhů, klonů a izolátů na konkrétního hostitele. V trávicím traktu je značný rozdíl mezi mikroflórou tenkého střeva a mikroflórou distálních částí trávicího traktu (slepé nebo tlusté střevo, Obr. 1.). V tenkém střevě jsou počty bakterií na gram tráveniny 1000-10 000 x nižší než v distálních částech trávicího traktu. Rovněž komplexita mikrobiální populace je v tenkém střevě výrazně nižší než ve slepém a tlustém střevě. Přestože je tenké střevo kolonizováno desítkami různých bakteriálních druhů, s jistou dávkou zjednodušení lze říci, že mikroflóre tenkého střeva dominují bakterie mléčného kvašení, tedy zástupci kmene *Firmicutes* a to z čeledi *Lactobacillaceae* nebo *Enterococcaceae*.

Ve slepém a tlustém střevě se vyskytují zejména příslušníci 4 kmenů bakterií. Dva dominantní kmene dohromady tvoří obvykle kolem 95 % z celkové mikroflóry. Mezi dominantní kmene patří grampozitivní bakterie třídy *Clostridia* a kmene *Firmicutes* (v distálních částech zejména zástupci čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*),

a gramnegativní bakterie kmene *Bacteroidetes* (zejména čeleď *Bacteroidaceae*). Mezi minoritní, méně čítně zastoupené bakterie, patří bakterie z kmene *Proteobacteria* (gramnegativní bakterie např. včetně *E. coli* nebo *Salmonella*) a *Actinobacteria* (grampozitivní bakterie např. včetně *Bifidobacterium*). Méně často se v trávicím traktu mohou objevit i zástupci další kmenů jako např. *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Synergistetes*, *Spirochaetes* nebo *Elusimicrobia*. Zjednodušeně lze říci, že slepé a tlusté střevo dospělých jedinců jsou osídleny grampozitivními a gramnegativními bakteriemi v poměru 1 ku 1. Je to proto, že zástupci grampozitivních *Firmicutes* stejně jako gramnegativních *Bacteroidetes* tvoří okolo 45 % z celkové mikroflóry, a grampozitivní *Actinobacteria* stejně jako gramnegativní *Proteobacteria* tvoří každý po 5 % z celkové mikroflóry. Od tohoto konsenzuálního složení střevní mikroflóry distálních částí trávicího traktu však docela běžně existují u konkrétních jedinců odchylky a některé názory na skladbu střevní mikroflóry spojují její pozitivní vliv pro hostitele spíše s její stabilitou ve složení v čase než s vlastním složením.

kmen – (třída)	čeleď	část trávicího traktu
<i>Firmicutes - Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae, Enterococcaceae</i>	tenké střevo
<i>Firmicutes – Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae, Ruminococaceae</i>	slepé a tlusté střevo
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	slepé a tlusté střevo
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	slepé a tlusté střevo
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	slepé a tlusté střevo

Jedno ze zažitých dogmat říká, že *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry. Toto dogma je ale pravdivé jen částečně. *E. coli* lze skutečně kultivovat z trusu téměř všech jedinců všech druhů hospodářských zvířat i člověka. Je však důležité si přitom uvědomit, že v mikroflóře slepého nebo tlustého střeva dosahují bakterie počtů až 10^{11} na gram tráveniny. Počty *E. coli* se však pohybují mezi 10^6 až 10^7 bakterií na gram tráveniny. *E. coli* tedy tvoří mezi 0,001-0,01 % z celkové mikroflóry a rozhodně nepatří mezi nejběžnější a nejvíce zastoupené bakterie trávicího traktu.



Obrázek 4 Skladba mikroflóry kura domácího podél trávicího traktu. 1 – *Lactobacillus*, 2 – *Veillonella*, 3 – *Gallibacterium*, 4 – *Campylobacter*, 5 – unclassified *Lachnospiraceae*, 6 – *Bacteriodes*, 7 – *Faecalibacterium*, 8 – *Megamonas*, 9 – *Olsenella*, 10 – *Phascolarctobacterium*, 11 – *Prevotella*, 12 – *Blautia*, 13 – *Pseudoflavonifactor*, 14 – *Barnesiella*, 15 – *Desulfovibrio*, 16 – *Clostridium XIVa*, 17 – unclassified *Porphyromonadaceae*, 18 – *Alistipes*.

2.7 Faktory vyvolávající nerovnováhu mikrobiomu a důsledky tohoto stavu

V předchozích odstavcích byla zmíněna skladba mikroflóry jednotlivých kompartmentů těla hostitele. I přes pravdivost uvedených skutečností je důležité si uvědomit, že od průměru a konsensu běžně existují výjimky, které se z jednoduchého průměru vymykají. Proto je kromě vlastní skladby mikroflóry důležitá i její stabilita v čase. Pokud hostitel a mikroflóra najdou svůj ustálený stav, lze očekávat přínos pro obě strany. Výchyly od rovnovážného stavu nazýváme jako dysbióza. Tímto pojmem se běžně rozumí snížení komplexity mikroflóry v daném místě, ale používá se i obecně pro jakékoli náhlé odchýlení od ustálené rovnováhy. Mezi nejběžnější příčiny nerovnováhy ve skladbě mikroflóry patří infekce patogenními mikroorganismy, změna ve výživě anebo podání antibiotik. Indukce průjmovitých onemocnění např. salmonelovou infekcí je součástí evolucí selektované strategie salmonel, umožňující jejich efektivní šíření. Průjmová reakce vede k rychlému vyprázdnění obsahu trávicího traktu, eliminaci běžné mikroflóry a dočasnému využití uvolněné ekologické niky patogenními salmonelami.

Dalším způsobem, jak dosáhnout dysbiózy s negativním dopadem pro hostitele, je dlouhodobé podávání antibiotik. Z pohledu střevní mikroflóry jednorázová aplikace antibiotik nepředstavuje závažný problém. Jednorázové a časově omezené podání antibiotik nedokáže úplně eliminovat bakterie střevní mikroflóry a po ukončení léčby dochází velmi rychle k obnovení mikroflóry o podobném složení jako před terapií. To je nepřímě dokazováno i dlouhodobou zkušeností s pozitivním dopadem podáváním antibiotik při léčbě infekčních chorob bakteriálního původu u hospodářských zvířat a lidí. Výrazné problémy však mohou nastat při chronickém podáváním antibiotik spojeném se změnou antibiotik v průběhu terapie, někdy dokonce s několika změnami po sobě. Po opakovaných zásazích již může dojít k podstatnému ovlivnění skladby střevní mikroflóry, snížení její komplexity a navození dysbiózy s negativními dopady pro hostitele. Změnám v podáváním antibiotik v průběhu léčby vzhledem k negativním dopadům na skladbu střevní mikroflóry by se tak mělo co nejvíce předcházet.

Příčiny dysbiózy
Infekce patogenními mikroorganismy
Náhlá změna ve složení krmiva
Dlouhodobé podávání (různých) antibiotik

2.8 Prebiotika, probiotika, synbiotika

Skladbu mikroflóry hospodářských zvířat lze záměrně modifikovat. Toto tvrzení platí pro všechny kompartmenty od kůže, přes urogenitální až po trávicí trakt. Nejčastěji je však předmětem aktivních zásahů do skladby mikroflóry trávicí trakt. Skladbu střevní mikroflóry lze modifikovat úpravou krmných směsí nebo přímým podáváním živých kultur. V případě obohacení krmných směsí o aditiva, která následně vedou ke změně skladby střevní mikroflóry, hovoříme o podávání prebiotik. **Prebiotika** jsou tedy látky biologické povahy (ale neživé), které zvýhodní žádoucí bakterie v trávicím traktu na úkor nežádoucích. Aby měla prebiotika co nejvyšší a nejpravděpodobnější účinnost, mělo by se jednat o látky, které jsou hostitelem nevyužitelné. Pokud by totiž hostitel uměl podávaná prebiotika sám resorbovat, metabolizovat a využít, vstřebal by je již v tenkém střevě a pro bakterie by se taková prebiotika stala nedostupnými a nemohla by tedy podstatným způsobem ovlivnit skladbu mikroflóry. Jako prebiotika se proto používají látky, které hostitel není schopen trávit a využít přímo, ale některé bakterie z trávicího traktu tuto schopnost mají. Proto se pro hospodářská zvířata nejčastěji využívají polymery, jako je inulín nebo vláknina. Tyto biologické polymery rostlinného původu nejsou degradovány hostitelem, a jsou využívány jen některými bakteriemi. Takové bakterie jsou pak pozitivně selektovány a obohaceny ve střevní mikroflóře.

Alternativně lze skladbu střevní mikroflóry ovlivnit podáváním živých kultur mikroorganismů. Živé mikroorganismy podávané za tímto účelem se pak označují jako **probiotika**. Mezi nejčastěji používaná probiotika patří bakterie rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* nebo *Bifidobacterium*. Experimentálně se testuje i podávání spor bakterií rodu *Bacillus*. V poslední době se však ukazuje, že tyto bakterie neosídlují trávicí trakt trvale a pro dosažení pozitivního efektu na zdraví zvířat je nezbytné jejich opakované podávání pitnou vodou nebo krmivem. Jednorázovou aplikací lze docílit trvalého osídlení, jen pokud se použijí bakterie s gramnegativní strukturou buněčné stěny, např. zástupci rodů *Bacteroides*. Přestože používání těchto bakterií jako probiotik nemá tak dlouhou tradici jako používání laktobacilů, poslední výsledky ukazují, že právě tyto bakterie chrání kuřata před kolonizací salmonelami nebo selata před kolonizací *Clostridium perfringens*.

Posledním způsobem, jak ovlivnit skladbu střevní mikroflóry, je současné podání prebiotik i probiotik, tedy živých kultur současně s krmným doplňkem, který růst probiotické bakterie posiluje. Takové směsné přípravky se označují jako **synbiotika**.

Prebiotika	Krmné doplňky, které zvýhodní žádoucí bakterie v trávicím traktu
Probiotika	Živé mikroorganismy podávané pro svůj pozitivní vliv na hostitele
Synbiotika	Preparáty obsahující současně prebiotika i probiotika

3. Patogenita a virulence

3.1 Definice pojmů

Z obrovského počtu existujících bakteriálních druhů vždy největší pozornost přitahovaly ty, jež charakterizuje schopnost infikovat hostitelské organismy a způsobovat onemocnění. Podstatou **infekce** je pomnožení mikroorganismu s následkem poškození hostitelského organismu. Pouhá přítomnost bakterií v organismu ještě neznamená infekci. Kůže a sliznice, které jsou v kontaktu s vnějším prostředím, jsou přirozeně kolonizovány nepatogenními komenzálními bakteriemi, které zjevně nezpůsobují svému hostiteli žádnou újmu. **Komezálové** (lat. *cum mensa* – tedy „spolustolovníci“) mají dle tradiční definice neutrální vztah k hostiteli a jejich přítomnost neznamená ani užitek, ani škodu hostitelského organismu, který jim sám poskytuje místo k životu a živiny. Toto hledisko se v poslední době přehodnocuje; soubor přirozeně se vyskytujících bakterií (mikroflóra) má zřejmě obrovský vliv na nejrůznější fyziologické funkce makroorganismu včetně psychického vývoje (viz kapitolu o přirozené mikroflóře). Naproti tomu patogeny nazýváme ty bakterie, důsledkem jejichž pomnožení je poškození makroorganismu. Z ekologického hlediska je jejich vztah k makroorganismu vyjádřen pojmem **parazitismus** – prospěch mikroorganismu je vykoupen újmou hostitele. **Patogenita** je tedy zcela obecně schopnost vyvolávat onemocnění. Různé kmeny patogenních druhů bakterií se však liší stupněm této schopnosti, a tehdy hovoříme o vyšší či nižší **virulenci**, míře patogenity.

Tzv. **obligátní patogeny** jsou natolik přizpůsobeny parazitickému způsobu života, že jejich pomnožení je prakticky vždy doprovázeno různou mírou poškození hostitelského organismu, pouhá jejich přítomnost v podstatě znamená infekci, ať už se klinicky projevuje (**manifestní infekce**) či nikoliv (**asymptomatická infekce**). Naproti tomu **potenciální** neboli **oportunní patogeny** se chovají dvojace. Za normálních okolností kolonizují povrchy hostitele jako komenzálové, mezi nimi a makroorganismem však panuje pouhé „příměří“ a probíhá neustálá dynamická komunikace. Bakteriální kolonizátoři neváhají využít příležitosti, kdy je linie hostitelské obrany prolomena či dozor imunitního systému ochabne, k průniku do míst, kde se přirozeně nevyskytují, nebo k namnožení v míře, která hostitelský organismus poškozuje. Změna motility střeva nebo dietní změna, ale i stres jakéhokoli typu může vést k množení určitých toxinogenních bakterií (např. klostridií) nebo přestupu bakterií přes střevní stěnu do krevního oběhu. Poškození epitelu dýchacích cest virovou infekcí vede množení bakterií způsobujících hnisavý zánět. Pokud je zdrojem infekce vlastní mikroflóra, hovoříme o **endogenní infekci**. Typickým příkladem endogenní infekce je aktinobacilóza skotu, kdy dochází k průniku bakterie *Actinobacillus lignieresii* do podslizniční po mechanickém poškození, např. ostrou pící. Zdánlivě je toto rozdělení jednoduché, při bližším pohledu se však hranice mezi oportunními a obligátními patogeny i mezi patogeny a komenzály rozmazává. Každá infekce je vlastně jedinečný proces, závislý jak na vlastnostech patogenu, tak na momentálním stavu hostitelského organismu a vnějších okolnostech.

Vlastnosti, které zvyšují schopnost patogenu poškozovat hostitele, nazýváme **faktory virulence**. Definice tohoto pojmu je mimořádně obtížná. V užším slova smyslu je lze chápat jako znaky, které mají přímou účast v patogenezí a klinickém projevu onemocnění, například když enterotoxiny střevních patogenů vyvolávají průjem. **Pravé faktory virulence** tedy slouží

k přímému poškození hostitele a vyskytují se pouze u patogenů. Převládá však tendence chápat tento pojem v širším smyslu jako jakékoli znaky, jež zvýhodňují patogen v infekčním procesu, byť se na patogenezí podílí nepřímě. Takové znaky se mohou vyskytovat a být využívány i u nepatogenních bakterií. Někdy je přesnější mluvit o **faktorech asociovaných s virulencí** nebo dokonce jen **faktorech asociovaných s fitness**. Zahrnují různé kolonizační faktory, mechanismy, jimiž bakterie konkurují ostatní mikroflóře a jež jim zajišťují výživu v prostředí chudém na některé živiny, strategie, jimiž se vyhýbají likvidaci imunitním systémem, transportní systémy, secernující jiné faktory virulence (především adhesiny nebo toxiny) a v neposlední řadě regulační mechanismy, nezbytné pro adekvátní adaptaci měnícím se podmínkám prostředí. Tyto faktory virulence v širším slova smyslu představují nezbytnou podmínku pro vznik infekce, ale samy se přímo na poškození makroorganismu nepodílejí.

Slavný německý mikrobiolog a objevitel původce tuberkulózy Robert Koch popsal v druhé polovině devatenáctého století kritéria pro uznání mikroorganismu jakožto původce konkrétního onemocnění, tzv. **Kochovy postuláty**. Podle nich se musí daný mikroorganismus 1) vyskytovat u všech nemocných jedinců a žádného zdravého, 2) musí být izolován a vypěstován v čisté kultuře, 3) musí při experimentální infekci vyvolat příznaky shodné s daným onemocněním a 4) musí být z experimentálně infikovaných jedinců opět izolován a shodovat se s mikroorganismem z původního nemocného jedince. Kochovy postuláty platí dodnes, třebaže s jistými výhradami. Některé mikroorganismy se například nedaří pěstovat *in vitro*, jiné vyvolávají typické příznaky teprve v součinnosti s jiným mikroorganismem. Postuláty také opomíjí stav hostitelského organismu, který má zejména u oportunních infekcí zásadní význam.

Jelikož virulence mikroorganismu je geneticky determinovaná vlastnost a při charakterizaci patogenu je v současnosti velmi důležité definovat geny kódující faktory virulence, definoval v roce 1988 americký mikrobiolog Stanley Falkow tzv. **molekulární Kochovy postuláty**: 1) gen se musí vyskytovat u všech patogenních kmenů a žádného nepatogenního, 2) inaktivace genu musí vyústit ve snížení virulence nebo ztrátu patogenity v experimentálním modelu a 3) opětovné „zapnutí“ genu musí vést k návratu patogenity. V řadě případů není ani tento postup aplikovatelný, ať už je problém v absenci vhodného modelu nebo nemožnosti s mikroorganismem geneticky manipulovat. Některé geny navíc mohou zvyšovat virulenci patogenu a vyskytovat se zároveň i u nepatogenních kmenů. Geny virulence často fungují ve vzájemné součinnosti. Někdy „vypnutí“ geny nevyúští ve snížení virulence, protože je funkce daného systému nahrazena jiným systémem, jindy zase přenesení daného genu do apatogenního organismu nevyúští ve zvýšení virulence, protože zde chybí potřebné regulační mechanismy.

Čtvrtý molekulární Kochův postulát se týká vakcinace: proti patogenní determinantě musí být produkovány specifické protilátky a poskytovat aspoň částečnou ochranu. Ne všechny faktory virulence jsou však stejně imunogenní, a proto nejsou všechny použitelné pro výrobu vakcín.

Doporučená četba: Wassenaar T.M., Gaastra W. Bacterial virulence: can we draw a line? FEMS Microbiology Letters 201 (2001): 1 – 7.

3.2 Cesty vstupu bakterií do organismu

Infekční proces zahrnuje průnik patogenního mikroorganismu do hostitele a pomnožení v jeho tkáních s následným vylučováním a přenosem patogenu na dalšího hostitele. Mikroorganismus se v první fázi infekce obvykle přichycuje na vnější struktury hostitele, překonává obranné bariéry a proniká do míst, která nabízejí nejvhodnější podmínky pro jeho množení. To často předpokládá penetraci vnitřního prostředí, pokud pomnožení neprobíhá přímo na epitelálním povrchu. Zde i tam se musí vyrovnávat s mechanismy vrozené a získané imunitní odpovědi; poškození hostitele nastává buď přímo činností patogenu, nebo v důsledku sebedestruktivní obranné reakce.

Makroorganismus komunikuje s vnějším prostředím pěti systémy, osazenými většinou vlastní přirozenou mikroflórou a vybavenými rozličnými obrannými mechanismy. Je to kůže a sliznice trávicího a dýchacího traktu, konjunktivy a urogenitálního aparátu.

K infekci přes kůži, **perkutánní infekci**, dochází především v místě, kde je kožní bariéra poškozená. Bakterie jsou tak přímo **inokulovány** do odhalených hlubších tkání či dokonce do krevního/lymfatického oběhu. Poškození může zprostředkovat bodavý hmyz, který je buď pouze náhodným, mechanickým přenašečem infekce, nebo je na něj patogen přímo biologicky vázán, jako je tomu například u lymeské boreliózy. Životní cyklus *Borrelia* spp. je odvislý od přenosu **krev sajícími členovci** (klíšťata, klíšťáci, ale i vši) a jiný způsob není prakticky možný. Naopak mouchy figurují jako mechaničtí přenašeči *Trueperella pyogenes* v případě tzv. letní mastitidy, velice nebezpečné infekce, ke které dochází zejména v letních měsících u skotu na pastvě. Mouchy zanášejí infekci do míst drobných traumat. **Infekce ran** jsou velmi rozdílné z hlediska rozsahu, hloubky a kontaminace. Zvláštní místo zde zaujímají rány po kousnutí, které bývají kontaminovány ústní mikroflórou zvířete. Hluboké rány, nevystavené vzduchu, představují riziko infekce anaerobními histotoxickými klostridii, původci plynových flegmón, ale také *Clostridium tetani*. Inokulace samozřejmě může proběhnout stejným způsobem i přes sliznice. Průniku bakterií přes na první pohled neporušenou kůži napomáhají změněné podmínky, podporující růst bakterií a oslabující přirozené obranné mechanismy. Ve vlhkém prostředí dochází k maceraci kůže, což je důležitým predispozičním faktorem pro vznik řady kožních infekcí, například dermatofilózy nebo interdigitální dermatitidy přežvýkavců. Macerace na mikroskopické úrovni narušuje integritu epidermis a navíc poskytuje příznivější prostředí většině mikroorganismů, pro něž je kůže za normálních okolností příliš suchá a slaná.

Infekce přes trávicí trakt neboli **alimentární infekce** začíná ingescí patogenu, především v kontaminované vodě nebo krmivu. Patogen musí být schopen projít v dostatečném počtu až do místa svého připojení a případné penetrace. Musí proto vykazovat určitou rezistenci ke kyselému pH žaludku nebo ke žlučovým solím. Po adhezi na sliznici se může patogen pomnožit a způsobovat poškození (například produkci toxinů ovlivňujících sekreci iontů do lumina střeva), anebo je vybaven invazivními faktory, umožňující internalizaci do buněk a průnik do systému. Po těžkém poškození střevní sliznice například virovou infekcí nebo mechanicky způsobenou inchémií se trávicí aparát může stát vstupní branou bakteriální septicémie, jejímž zdrojem je vlastní mikroflóra. K průniku patogenů přes nepoškozenou sliznici může také dojít v různých částech trávicího traktu, především v oblastech s hojnou lymfatickou tkání; má se za

to, že invazivní *E. coli* jakožto původce neonatálních sepsí proniká v oblasti hltanu, naproti tomu řada patogenních bakterií – např. *Salmonella* spp. nebo *Shigella* spp. – využívají tzv. M buňky střevní sliznice a další antigen-prezentující buňky, které vycytávají „vzorky“ obsahu střevního lumina a nabízejí je k rozpoznání hlouběji ložené lymfatické tkáni.

Infekce přes dýchací systém se nazývají **respiratorní infekce**. Pojem **aerogenní infekce** vyjadřuje, že k infekci dochází inhalací patogenu, nejčastěji přichyceného na drobných kapénkách nebo pevných částech poletujících ve vzduchu. Inhalace infekčního aerosolu je obzvláště efektivní způsob infekce a často stačí velmi nízká infekční dávka, aby způsobila nebezpečné onemocnění, jako je tomu například u tularémie, moru či antraxu. Oportunní bakteriální patogeny osazují přirozeně kolonizovanou část dýchacího traktu a k masivnímu pomnožení nebo průniku do plic využívají poškození sliznice a funkce mukociliárního aparátu, zprostředkovaného například virovou nebo mykoplasmovou infekcí nebo chemickým podrážděním stá-jovými plyny.

Infekce **přes spojivku** je usnadněna mechanickým drážděním, cizím tělesem nebo hmyzem, svou roli hraje i UV záření. Všem těmto faktorům je vystaven kupříkladu skot na pastvě; je jimi predisponován k infekční keratokonjunktivitidě skotu způsobované *Moraxella bovis*. Některé bakterie – například *Leptospira* spp. a jiné spirochety svým vývrtkovitým pohybem – jsou schopny penetrovat i neporušené sliznice.

I vaginální a prepuciální sliznice má svou vlastní mikroflóru. Zdrojem potenciálních patogenů, které mohou za příznivých okolností postupovat hlouběji do močových cest nebo reprodukčního traktu, bývá perineální mikroflóra a fekální kontaminace. Rizikovým faktorem zde může být katetrizace nebo jiný zákrok a močové infekce úporně rezistentními bakteriálními kmeny patří k častým typům tzv. nosokomiálních infekcí. Jiným případem jsou tzv. **venerické infekce**, vázané na přenos pohlavním stykem. Jedno pohlaví může být asymptomatickým nosičem a zdrojem onemocnění pro pohlaví druhé, jako je tomu například u nakažlivé metritidy klisen, způsobované *Taylorella equigenitalis* nebo infekce *Campylobacter foetus ssp. venerealis* skotu.

3.3 Infekce jednotlivých orgánových systémů

Většinu mikroorganismů charakterizuje schopnost vyvolat onemocnění konkrétních orgánových systémů, některé se staly specialisty na poškozování určitých tkání či dokonce buněk. Jsou k tomu obdařeny celou škálou strategií, jak rozpoznat v organismu místa, která ať už díky svým jedinečným vlastnostem, expozici specifickým podmínkám, nebo v důsledku oslabení lokální obranyschopnosti hůře odolávají kolonizačnímu tlaku patogenů.

3.3.1 Respirační systém

Respirační systém je jedním z bariérových aparátů, který je nepřetržitě vystaven enormnímu antigennímu tlaku, jenž v tomto případě přichází s inhalovaným vzduchem. Fyzikální, chemické a biologické vlastnosti vdechovaného vzduchu rozhodují o tom, zda dýchací systém tomuto tlaku odolá, či nikoliv. Různé druhy zvířat jsou ze zcela zřejmých důvodů chovány odlišně; kocour, mezinárodní šampion svého plemene, zajisté dýchá jiný vzduch, než který obklopuje prasata ve výkrmových halách či telata v teletnicích. Část vdechovaných bakterií tvoří druhově specifická mikroflóra kolonizující horní cesty dýchací, ale i zde o její skladbě z velké části rozhoduje mikroklima (stájového) prostředí. Jsou-li zoohygienické parametry optimální, disponuje dýchací systém takovými obrannými mechanismy (mukociliární clearance, lysozym a laktoferin v respiračních sekretech, sekreční IgA, alveolární makrofágy), které udrží jeho distální úseky mikrobů prosté. Pokud je však respirační trakt dlouhodobě exponován stájovému vzduchu nevyhovujícího složení (tedy s vysokými koncentracemi mikroskopických prachových partikulí a dráždivých plynů), může být tato imunitní bariéra překonána. Některé potenciálně patogenní bakterie, jejichž lokalizace v dutině nosní nezpůsobuje hostiteli žádné obtíže, u něj mohou za těchto nepříznivých okolností a zejména pokud se navíc připojí i další nežádoucí vlivy vedoucí k imunosupresi, způsobit závažnou respirační infekci. Takovým příkladem může být bronchopneumonie vyvolaná *Mannheimia haemolytica* u telat, která jsou vystavena stresorům v podobě transportu a suboptimálních zoohygienických podmínek. Na rozvoji onemocnění respiračního systému se velmi často podílí více patogenů současně, modelová situace zahrnuje virové agens jako primárního původce s následným uplatněním sekundárních bakteriálních nox. Tento scénář však nemusí platit bezvýhradně, i některé bakteriální druhy disponují schopností poškodit dýchací aparát jako první (*Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*).

Mezi nejvýznamnější původce bakteriálních infekcí horních a dolních cest dýchacích hospodářských i zájmově chovaných zvířat patří *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella avium*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Histophilus somni*, *Haemophilus paragallinarum*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydia psittaci*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*,

Enterobacter spp., *Salmonella* Dublin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus equuli*, *Mycobacterium* spp., *Rhodococcus equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Staphylococcus* spp., obligátní anaeroby.

Aby byl terapeutický zásah úspěšný, vyžaduje především přesnou mikrobiologickou diagnózu, ta se však neobejde bez správně odebraného vzorku z vhodně zvoleného místa. Vykažuje-li pacient příznaky postižení dolních cest dýchacích, není možné dospět ke správnému výsledku na základě vyšetření materiálu z dutiny nosní! Ta totiž může být kolonizována celou řadou mikrobů, včetně těch potenciálně patogenních, jež však do distálních úseků systému nepronikly a na rozvoji onemocnění se tedy nepodílejí. Není neobvyklá ani situace, kdy se sice v horních i dolních cest dýchacích kultivačně prokáže stejný bakteriální druh, ve skutečnosti se ale jedná o dva různé kmeny s odlišnou citlivostí k antimikrobiálním látkám. Nasazení antibiotik na základě vyšetření kmene z dutiny nosní pak zákonitě vede k selhání léčby. Přestože je tedy odběr vzorku z dolních cest dýchacích bronchoalveolární laváží či transtracheální aspirací nesrovnatelně obtížnější než výtěr dutiny nosní, pro úspěšnou léčbu pacienta je zásadní.

3.3.2 Gastrointestinální systém

Také gastrointestinální systém je neustále konfrontován s mikroorganismy, které do něj alimentární cestou pronikají z vnějšího prostředí. Bezprostředně po narození je trávicí trakt sterilní, ihned po kontaktu s okolím je však zahájena jeho kolonizace mikroorganismy. Po určité době, závislé na druhu zvířete, se mikroflóra střeva ustálí do podoby dynamického mikrobiálního společenstva, jehož složení zásadně ovlivňuje zdraví i kvalitu života svého hostitele. Tato mikroflóra sestává převážně z druhů bakterií náležících do kmenů Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Actinobacteria, viz kapitolu 2.6. Díky přirozeným obranným mechanismům v podobě vrstevnatého dlaždicového epitelu sliznice jícnu, kyselých sekretů žaludečních žláz a hlenu pokrývajícího sliznice jícnu a žaludku je převaha mikroorganismů lokalizována až v terminálních úsecích tenkého střeva a ve střevě tlustém. U přežvýkavců se ke střevním bakteriím přidávají kvasinky a prvoci tvořící součást rezidentního mikrobiomu bachoru, slepého a tlustého střeva, kde slouží k degradaci jinak nestravitelných rostlinných polysacharidů celulózy, hemicelulózy, ligninu a pektinů a uplatňují se i při dalších metabolických procesech štěpení mnoha dalších uhlíkatých a dusíkatých sloučenin.

Přirozená střevní mikroflóra dále zásadně napomáhá při rozvoji imunitního systému sliznice gastrointestinálního traktu (Gut-associated lymphoid tissue, GALT), který tvoří imunokompetentní buňky organizované v kompaktní lymfatickou tkáň (Peyerovy plaky), buňky difúzně rozptýlené v lamina propria střevní sliznice a intraepiteliální lymfocyty. Peyerovy plaky zaujímají postavení ústředního orgánu GALT, zodpovědného za přímý kontakt lymfatické tkáně s antigeny ve střevním lumen a zahajujícího specifickou slizniční imunitní odpověď. Buňky difúzně rozptýlené v lamina propria mucosae představují hlavní výkonný aparát GALT, rekrutující se z pomocných T- lymfocytů, B-lymfocytů a plazmatických buněk. Poslední jmenované vylučují převážnou část molekul IgA, které významně přispívají k prevenci kolonizace střeva patogenními mikroby. Intraepiteliální lymfocyty se účastní buňkami zprostředkovaných

cytotoxických reakcí, vykazují totiž charakter cytotoxických lymfocytů. Přirozená střevní mikroflóra také napomáhá prevenci infekce trávicího traktu produkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem, jež inhibují růst potenciálně patogenních bakterií, soutěží s nimi o živiny a v neposlední řadě o vazebná místa na enterocytech, podílí se tedy na jevu, který označujeme jako kolonizační rezistence.

Nežádoucí změny ve složení přirozené střevní mikroflóry mohou usnadnit vazbu patogenních mikroorganismů na povrchové receptory enterocytů a přispět tím k rozvoji střevní infekce. K narušení rovnováhy střevního mikrobiomu dochází zejména vlivem antimikrobiální terapie, radikálních dietních zásahů a nevyhovujících environmentálních podmínek. Obzvláště citlivé je však střevo v neonatálním období, než dojde k jeho úplné kolonizaci rezidentní mikroflórou. Patogenní mikroorganismy využívají celou řadu mechanismů, jimiž narušují funkci a integritu střevní sliznice, což je podstatou klinického obrazu střevní infekce zahrnujícího průjem, zvracení a abdominální bolestivost. Mezi nejvýznamnější bakteriální patogeny trávicího traktu malých i hospodářských zvířat řadíme *E. coli*, zástupce mnoha sérotypů druhu *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens* typů A, B, C, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis* a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Pro laboratorní diagnostiku etiologického agens onemocnění trávicího systému odebíráme buď klinický materiál, tedy vzorky trusu zvířat, rektální výtěry, zvratky, nebo sekční, získaný během patoanatomického vyšetření v podobě obsahu střev. Při podezření na alimentární infekci hledáme původce také v krmivu či vodě.

3.3.3 Vylučovací systém

Vylučovací systém, s výjimkou distálních částí močové trubice, není osídlen mikroorganismy. K šíření mikrobů v močových cestách může dojít dvěma způsoby, hematogenně, nebo mnohem častěji cestou ascendentní infekce. Vzhledem k anatomickým poměrům v podobě kratší uretry a lokalizace jejího vyústění v blízkosti rekta, se infekce močových cest vyskytují častěji u samic, než u samců. Samice jsou také více ohroženy zavlečením cizorodých organismů při přirozené či umělé inseminaci. Predispoziční faktory pro vznik infekce potom pro obě pohlaví představují zejména různé formy obstrukce močových cest (urolitiáza u sterilizovaných kocourů, hypertrofie prostaty u psů), ale také diagnostické či terapeutické úkony založené na mechanické manipulaci v urogenitálním aparátu (katetrizace, cystoskopie).

Podstatná část ascendentních infekcí vylučovacího systému je vyvolána zástupci rezidentní mikroflóry gastrointestinálního aparátu, nejvíce se uplatňují zástupci čeledi Enterobacteriaceae v čele s *E. coli*. Největší šanci vyvolat močovou infekci mají především bakterie vybavené takovými faktory asociovanými s virulencí, které napomáhají kolonizaci močových cest a přežívání v prostředí se specifickými podmínkami vytvořenými močí. Právě těmito vlastnostmi jsou charakterizovány tzv. uropatogenní *E. coli* (UPEC), které jsou etiologickým agens extraintestinálních koliinfekcí nejen u zvířat, ale také u člověka. Mezi nejvýznamnější faktory

asociované s virulencí uropatogenních escherichií patří adheziny (bakteriální proteiny integrované do buněčné membrány či fimbrií a pilů), toxiny (alfa hemolyzin, cytotoxický nekrotizující faktor 1), lipopolysacharid a systémy vázající železo. Oportunní patogeny invadující vylučovací systém, jako jsou klebsiely, pseudomonády, proteové a další, jsou vybaveny obdobnými faktory virulence jako UPEC, na rozdíl od escherichií však navíc dokážou prostřednictvím enzymu ureázy rozkládat močovinu na amoniak. Tím zvyšují pH moči, což ji predisponuje k tvorbě urolitů a mikroorganismům usnadňuje množení.

Kromě mikrobů trávicího aparátu vzestupnou cestou pronikají do močové trubice také kolonizátoři kůže či bakterie z prostředí. Ascendentní infekce potom postihují především močový měchýř, nebo závažněji ledvinnou pánvičku. Mezi nejčastější bakteriální patogeny izolované z klinických případů infekcí vylučovacího systému hospodářských i zájmových zvířat patří *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *vulgaris*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Enterococcus faecalis* a *faecium*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Ureaplasma* spp., *Leptospira icterohaemorrhagiae* a *canicola*, *Corynebacterium renale*, *pilosum* a *cystitidis*, *Actinobaculum suis* a *Actinobacillus equuli*.

Pro identifikaci původce močové infekce kultivujeme moč, pokud je však odebrána při spontánní mikci, třebaže ze středního proudu moči, může obsahovat bakterie distální uretry a perinea. Vhodnější jsou tedy diagnostické postupy, kterými získáme vzorek z močového měchýře, tedy katetrizace či cystocentéza. Samotná druhová identifikace původce však pro stanovení definitivní diagnózy nestačí, je nutné přihlídnout i na čistotu kultury (mnoho různých druhů, zejména těch environmentálních, svědčí o kontaminaci vzorku při jeho odběru) a její kvantitu (CFU/ml).

3.3.4 Reprodukční systém

Infekce **reprodukčního aparátu** jsou významné především proto, že mohou negativně ovlivnit plodnost u obou pohlaví hospodářsky i zájmově chovaných zvířat. K jejich šíření může dojít buď sexuálním přenosem, nebo ascendentně fekální mikroflórou, kolonizátory kůže či mikroby z prostředí. Za jistých okolností doputuje infekt i hematogenní cestou. Samčí prepucium je běžně osídleno smíšenou populací sestávající z mnoha druhů bakterií, hub a protozoí, některé z nich jsou potenciálně patogenní a za určitých pro ně vhodných environmentálních podmínek vyvolávají klinické onemocnění jak vlastní předkožky, tak i dalších úseků pohlavního systému (*Actinobaculum suis*, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium renale*).

K infekci varlat většinou dochází hematogenní cestou, v případě nadvarlat také ascendentně jako důsledek onemocnění močových cest. Infekce skrotálního vaku může potom rezultovat v postižení varlat i nadvarlat. Významným patogenem s afinitou k pohlavnímu aparátu je rod *Brucella*, u býků způsobuje testikulární nekrózu *B. abortus*, u beranů se lokalizace změní v případě onemocnění vyvolaného *B. melitensis* (orchitida) a *B. ovis* (epididymitida, nebo orchoepididymitida). Supurativní orchitidu kanců vyvolává *B. suis*, záněty varlat, nebo nadvarlat potom *B. canis*. Mezi další významné patogeny způsobující záněty varlat a nadvarlat řadíme

bakterie *E. coli*, některé sérotypy salmonel (*S. Abortusequi*), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Trueperella pyogenes* či *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Na zánětu předstojné žlázy se často podílí ascendentně postupující enterobakterie *E. coli* a *Proteus* spp. V neposlední řadě je třeba zmínit také bakterie způsobující pohlavně přenosné nákazy, kde může samec figurovat jen jako asymptomatický nosič (*Tylorella equigenitalis*, chlamydie).

U nebřezí dělohy je rozvoj infekce úzce spjat s fází říjového cyklu, pohlavní cesty jsou z fyziologického důvodu více prostupné u samic v říji a také děložní sliznice, připravující se na výživu embrya, je mnohem náchylnější k infekci během estru. V tomto období se na vzniku infekce děložního krčku a endometria podílí právě ascendentně postupující bakterie střevního původu, kolonizátoři kůže, bakterie z prostředí, ale také mikroby původem od samce, zanesené do pohlavních cest samice přirozenou či umělou inseminací. Jde zejména o tyto rody a druhy: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. aureus*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Enterococcus* spp., obligátní anaeroby, *Chlamydomphila* spp., *Rhodococcus equi*, *Actinobacillus equuli*.

Děloha a vejcovody jsou obzvláště náchylné k infekci v souvislosti s březostí. Celá řada mikrobusů vykazuje afinitu k březí děloze a ohrožuje plod (*Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *Leptospira interrogans*, *Chlamydomphila abortus*, *Histophilus somni*, *Haemophilus parasuis*). Také poporodní období, zejména pokud byl průběh porodu komplikovaný, predisponuje dělohu k zánětu často doprovázeného retencí sekundin a secernací zánětlivého exudátu různého charakteru do děložní dutiny. Poporodní infekce bývají nezdřídka smíšené za účasti gramnegativních a grampozitivních aerobních, fakultativně anaerobních, ale také anaerobních bakterií jako jsou již výše uvedené enterobakterie, kamylobaktery, streptokoky, stafylokoky, enterokoky, pasteurely, pseudomonády či anaeroby z rodů *Fusobacterium* a *Bacteroides*.

Podmínkou pro přesnou mikrobiologickou diagnózu a doporučení účinných antimikrobiálních preparátů je správný odběr vzorků, i u pohlavního systému platí, že pokud chceme získat materiál z hlouběji uložených částí aparátu, zejména z dělohy, musíme se vyvarovat kontaminace mikroflórou vývodných pohlavních cest např. za použití vaginálního spekula a krytých odběrových souprav s možností vysunutí tampónu až v děložním krčku.

3.3.5 Kůže

Kůže představuje efektivní mechanickou a chemickou bariéru zabraňující prostupu environmentálních mikrobusů do vnitřních struktur organismu. Přirozená mikroflóra kolonizující kůži, pH, vyšší koncentrace soli, absence vlhkosti a keratinizující vrstva epidermis představují hlavní překážky pro přemnožení patogenů na jejím povrchu. Pro infekci kůže a její rozšíření do hlouběji uložených tkání je narušení integrity stratum corneum podmínkou. Pokožka dlouhodobě vystavená vlhkosti je obzvláště predisponovaná pro vznik infekce, na které se rády podílejí rozličné plísňe a kvasinky.

Mikrobiologickou diagnostiku vyžadují zejména infikované rány, ať už vzniklé úrazem či chirurgickým zásahem. Komplikované hojení lze očekávat u ran kousných, kdy kromě narušení celistvosti pokožky je tkáň kontaminována mikroorganismy dutiny ústní útočníka (z těchto poranění často izolujeme bakterii *Pasteurella multocida*). Terapeutickým oříškem bývají poranění s cizím tělesem penetrujícím podkoží. V letním období se u psů častěji objevují poranění způsobené osinami trav, které díky svému pichlavému konci proniknou kůží a podkožím pak putují i několik decimetrů. Nalezení penetrujících osin bývá nezřídka velmi komplikované a jejich vybavení z rány může vyžadovat i opakované chirurgické zásahy. Úspěšné zhojení infikovaných ran je podmíněno odstraněním veškeré nekrotické tkáně, hnisu a cizích těles, jsou-li přítomna a nasazení cílené antibiotické terapie po předchozí bakteriologické kultivaci.

Z ložisek infikované kůže a podkoží nejčastěji izolujeme bakterie osidlující kůži, ubikvitárně rozšířené potenciálně patogenní environmentální mikroorganismy, i zástupce střevní mikroflóry adaptované na život mimo střevo. Jsou to zejména koaguláza pozitivní stafylokoky *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. hyicus*, dále *Bacillus cereus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *P. multocida*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus lignieresii*, *Trueperella pyogenes*, *Dermatophyllus congolensis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Velmi obtížně se hojí hluboká poranění tkáně infikovaná potenciálně a obligátně anaerobními mikroorganismy (*Clostridium perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides fragilis*, *B. melanigenium*, *Dichelobacter nodosus*).

V souvislosti s kůží je potřeba zmínit také původce dermatomykóz, k jejichž vzniku predisponuje právě dlouhotrvající či opakované vystavení pokožky vlhkému prostředí, ale také oslabení systémové či lokální imunity (diabetes mellitus), nebo terapie antibiotiky. Protože jde o onemocnění vyvolané plísněmi či kvasinkami, je k jejich léčbě nutné podávat antimykotika, nikoliv antibiotika a v některých případech lze terapeuticky využít i vakcinaci. Mezi původce nakažlivých dermatomykóz se zoonotickým potenciálem řadíme dermatofyta z rodů *Trichophyton* (*T. mentagrophytes*, *verrucosum*, *equinum*) a *Microsporum* (*M. canis*, *equinum*), kvasinkové infekce potom vyvolávají zástupci rodu *Candida* a druh *Malassezia pachydermatis* (kandidy a *M. pachydermatis* frekventně izolujeme z klinických případů otitid).

Materiál pro diagnostiku kožních onemocnění představují zánětlivé exudáty, kožní seškraby, výtěry z ran, nebo i vzorky srsti z okraje ložiska infekce. Bakteriologická kultivace bude v případě identifikace plísní a kvasinek vyžadovat selektivní média, stejně tak pro kultivaci obligátních anaerobů, které navíc vyžadují specifické podmínky atmosféry, jichž lze v některých případech dosáhnout pouze v anaerobních boxech.

3.3.6 Centrální nervový systém

Centrální nervový systém (CNS) je pro život jedince nenahraditelný, sebemenší morfoloická či funkční alterace může mít závažné celoživotní následky, nebo, v horším případě, končí fatálně. S infekcemi CNS se sice nesetkáváme tak často jako s jinými onemocněními,

jejich výskyt je však doprovázen vysokou mortalitou často navzdory včasnému a cílenému terapeutickému zásahu. Mikroorganismy mohou poškodit CNS různými mechanismy, proniknutím a replikací v jeho tkáni, stimulací autoimunitní reakce, či tvorbou neurotoxinů. Na výsledný klinický obraz onemocnění má zásadní vliv také cesta šíření etiologického agens, která může být hematogenní, podél nervových vláken anebo ze sousedících orgánů či tkání. Environmentální bakterie či kolonizátoři kůže mohou mozek kontaminovat při frakturách lebky. Lebeční kosti, hematoencefalická bariéra a redukováná imunitní odpověď v nervové tkáni sice poskytují CNS vynikající ochranu před vnějšími vlivy, pokud jsou však přesto překonány, jsou pro hostitele naopak spíše přítěží. Rigidní kostěná schránka lebky představuje smrtelnou past pro otékající mozek, hematoencefalická bariéra zadrží záchrannou misi v podobě imunoglobulinů a imunitních buněk.

K rozšíření bakterií do CNS krevní cestou může dojít při těžkých systémových infekcích, jako je např. hříběcí vyvolané *S. equi* subsp. *equi*, Glässerova choroba prasat (*Haemophilus parasuis*), salmonelóza prasat vyvolaná *Salmonella Choleraesuis*, streptokoková meningitida prasat (*Streptococcus suis*), lymeská borelióza psů (*Borrelia burgdorferi* sensu lato), sporadická bovinní encefalomyelitida skotu (*Chlamydophila pecorum*) a další. Ke klinickému obrazu základního onemocnění se po rozšíření patogenu do nervového systému přidávají i příznaky neurologické. Ke generalizovanému poškození endoteliálních buněk, které může postihnout i cévy zásobující mozek, dochází při infekcích ehrlichielemi (*Ehrlichia canis*, *ruminantium*, *ovina*). Šíření podél nervových vláken je doménou především virových agens, z bakterií tuto taktiku ovládá *Listeria monocytogenes*, která je u přežvýkavců schopna doputovat z místa infekce v dutině ústní až do mozku za vzniku charakteristických mikroabscesů v mozkovém kmeni. Obzvláště vysokou mortalitou jsou doprovázeny infekce bakteriemi produkujícími toxiny s neurotoxickým účinkem. Asi nejobávanějšími zástupci této skupiny mikroorganismů jsou bakterie rodu *Clostridium*. Extrémně nízká letální dávka, kterou se vyznačuje botulotoxin tvořený *Clostridium botulinum*, jej dokonce dostala do hledáčku legálně i ilegálně operujících organizací (armáda versus teroristé), pro jeho potenciální využití jako biologické zbraně. Kromě armádních specialistů se ale botulotoxinu obávají také řezníci, ne nadarmo se botulotoxin pyšní přізviskem „klobásový jed“, které odkazuje na případy otrav člověka po konzumaci špatně tepelně opracovaných masových konzerv. K intoxikaci tedy dojde především alimentární cestou, následně je botulotoxin vstřebán sliznicí trávicího traktu do krve a roznesen k cholinergním zakončením motorických nervů. Tam zabraňuje uvolnění neurotransmiteru acetylcholinu do synaptické štěrbině, což rezultuje v generalizované ochrnutí kosterní svaloviny s fatálními následky. Naopak tetanický toxin *Clostridium tetani* tetanolysin snižuje práh dráždivosti motorických neuronů pod obrazem tonicko-klonických křečí. Také vstupem do organismu se toto klostridium od svého „klobásového“ příbuzného liší, k infekci dochází poraněním kontaminovaným předmětem, nicméně osud pacienta může být přes adekvátní léčbu také fatální v důsledku asfyxie či srdečního selhání. Fokální symetrickou encefalomalácií a edém způsobují toxiny *Clostridium perfringens* typu D a některé sérotypy *E. coli* (edémová choroba prasat).

Vzhledem k obtížné dostupnosti klinických vzorků z CNS jsou pro diagnostiku některých infekčních onemocnění využívány sérologické metody, zde nám jako vzorek poslouží krevní sérum. Sofistikovanějším přístupem je potom mikrobiologické vyšetření cerebrospinálního moku kladoucí vyšší nároky na veterinární pracoviště. V případě úhynu odebereme vzorek

mozkové tkáně vykazující patoanatomické změny a původce identifikujeme po bakteriologické kultivaci.

Doporučená četba: Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2th ed., Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2011. 912 pp. ISBN 978-1-4051-5823-7.

3.4 Faktory asociované s virulencí

Pro svůj životní styl bývají patogenní bakterie vyzbrojeny celým arzenálem rozličných zbraní. Již sama definice tohoto pojmu je však obtížná a bývá často přehodnocována. Faktor virulence *sensu stricto* se definuje jako taková součást patogenu, která poškozuje hostitele; pak bychom mohli počítat, obrazně řečeno, mezi zbraně rytíře pouze meč a kopí, nikoli však štít a brnění. V širším slova smyslu je faktor virulence produkt, který umožňuje patogenu způsobovat onemocnění. Pak by tam ale spadalo i mnoho systémů, jež sice experimentálně zvyšují virulenci a zvýhodňují patogen během infekce či dokonce jsou nezbytné pro přežití v hostiteli, ale zároveň nacházejí uplatnění i při nepatogenním životním stylu zcela neškodných kmenů daného bakteriálního druhu. Příkladem takových „pravých“ faktorů virulence jsou toxiny, přímočaře poškozující buňky hostitele, nebo invazivní faktory, umožňující aktivní penetraci vnitřního prostředí. Naopak příkladem ambivalentních faktorů virulence jsou nejrůznější adhezivní faktory, které mohou být využity při přirozené kolonizaci nebo i mimo hostitele, například při formaci biofilmu (i tato schopnost však může být klíčovým momentem některých infekcí). Některé faktory virulence – toxiny nebo adheziny – musí být transportovány z bakteriální buňky různými typy sekrečních systémů, a jejich exprese podléhá specifickým regulačním systémům. Proto i sekreční a regulační systémy dlužno považovat za faktory související s virulencí. Situaci dále komplikuje fakt, že některé faktory zastávají více funkcí, například jsou zároveň adhezivem a toxinem (tzv. pertusis toxin bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle). Virulence je tedy výsledkem složité interakce různých „genů asociovaných s virulencí“ a jejich produktů a nelze ji redukovat na prosté schéma gen → produkt → poškození → specifický symptom. Přesto se pokusme podat základní přehled faktorů virulence a faktorů s virulencí asociovaných, rozdělených podle jejich specifikované role v patogenezi onemocnění – pokud je známa. Toto rozdělení je pouze akademické a v literatuře se můžeme setkat s různými variacemi. Vzhledem ke všem výše uvedeným obtížím se budeme o některých známých faktorech virulence zmiňovat vícekrát v různých kapitolách.

3.4.1 Adheziny

Makroorganismus je před infekcí chráněn mechanickými bariérami. Nejedná se jen o vlastní hmotu epiteliálních „hradeb“, ale i aktivní čištění těchto povrchů sekrecí hlenu, slz nebo potu, antimikrobiálních látek v nich obsažených, střevní peristaltikou, pohybem řasinek v dýchacím traktu, proudem moči nebo krve a podobně. Tyto mechanismy brání uchycení bakterií, které se potřebují nejprve pevně usadit, než se pustí do další „práce“, již může být například invaze vnitřního prostředí nebo produkce toxinů. Adheze neboli uchycení na povrchu určité tkáně je proto iniciálním krokem většiny infekcí.

Adheze může být nespecifická, s využitím elektrostatických sil a hydrofobních interakcí. Uplatnit se zde mohou i komponenty s primárně strukturální či jinou funkcí – například

kapsulární polysacharidy nebo součásti buněčné stěny gramnegativních i grampozitivních bakterií, lipopolysacharid nebo teichoová kyselina, mykobakteriální mannany a podobně. Většinou se však na bakteriálním povrchu setkáváme se specializovanými strukturami sloužícími ke specifické vazbě na určitý receptor hostitelské buňky – adheziny. Rozeznáváme obecně dva hlavní typy adhezínů, fimbriální a afimbriální.

Fimbrie jsou tuhé vláknité struktury, složené z různých proteinových podjednotek a rozmístěné po celém povrchu bakterie. Základní stavební složkou bývá tzv. základní fimbriální podjednotka, zatímco vazbu na receptor zajišťuje vlastní adhezin na špičce fimbrie. Fimbrie nacházíme především u gramnegativních bakterií, kde bývají ukotveny ve vnější membráně. Podobné struktury byly však identifikovány i u některých grampozitivů. Fimbrie se také někdy nazývají pili (sg. pilus), přestože většina autorů vyhrazuje tento pojem pro struktury sloužící ke konjugaci (tzv. sex pilus).

Příklady fimbrií je mnoho, uveďme si aspoň některé z těch známějších. *E. coli* expri- muje velké množství rozličných fimbriálních i afimbriálních adhezínů, které bývají často ty- pické pro jednotlivé patotypy. U většiny kmenů (včetně komenzálních) se nacházejí tzv. **fim- brie typu 1** – F1, jejichž adhezin FimH váže manózoové zbytky. Pomáhají *E. coli* kolonizovat například močový trakt nebo dýchací aparát. Další fimbriální varianty *E. coli* se označují větši- nou číslem a někdy i písmenem podle subtypu (např. F18ab), ale můžeme se setkat i se starším značením (např. K88 = F4; K99 = F5) nebo odlišným značením u lidských kmenů (CFA), což může být poněkud matoucí. Enterotoxinogenní kmeny (ETEC) se od sebe liší expresí různých variant fimbrií a tím také schopností kolonizovat střevo různých druhů a různých věkových kategorií. Například receptory pro F5 a F6 se nacházejí u selat (a telat v případě F5) pouze v prvním týdnu života, pak se mláďata stávají rezistentními k infekci těmito kmeny; naopak F4 pozitivní kmeny způsobují závažné průjmy selat až asi do dvou měsíců věku a F18 pozitivní kmeny napadají selata po odstavu a ve spojení s tvorbou shigatoxinu vyvolávají tzv. edémovou chorobu. **P fimbrie** (F7-16) se naopak uplatňují u kmenů způsobujících extraintestinální in- fekce zvířat i lidí (název pochází od pyelonefritidy) a jsou kódovány tzv. ostrovem patogenity spolu s dalšími faktory virulence, uplatňujícími se v tomto typu infekce.

Zajímavým typem fimbriálních struktur jsou také „kudrlinky“ – **curli** – zprostředková- vající vazbu k molekulám extracelulární matrix, lamininu a fibronektinu. Svou roli hrají také při formaci biofilmu.

Stavbou a funkcí podobné fimbrie se uplatňují samozřejmě i u dalších enterobakterií i ostatních gramnegativů. Tzv. **fimbrie typu IV** představují zcela specifickou strukturu (od typických fimbrií v užším slova smyslu se liší způsobem transportu na bakteriální povrch, po- lárním umístěním i funkcí; s výše zmíněnými antigenními variantami fimbrií ETEC nemají nic společného) a nacházejí se u mnoha rozličných gramnegativních druhů, např. *Neisseria* spp., *Pseudomonas* spp. nebo *Pasteurella multocida*. *Moraxella bovis* jimi adhezuje ke korneálnímu epitelu, *Dichelobacter nodosus*, původce hniloby paznehtů, k interdigitální epidermis. Jsou fle- xibilní a jak již bylo řečeno, umístěné na pólu bakterie. Tyto fimbrie kromě toho umožňují zvláštní, na bičíku nezávislý, tzv. škubavý pohyb („twitching motility“), protože mají schopnost zatáhnout se přes buněčnou stěnu. I ony se uplatňují v iniciační fázi formace biofilmu. Bakterie

schopné trhavého pohybu často vytvářejí v kultuře velké ploché kolonie; pseudomonády jsou typickým příkladem.

Fimbrie jsou imunogenní, což je činí vhodným terčem při tvorbě vakcín. Pro invazivní bakterie mají význam pouze v počáteční fázi infekce, později je naopak jejich přítomnost nevýhodná. Patogenní bakterie proto mohou mít schopnost jejich expresi potlačit, jakmile se ocitnou v prostředí, kde již nenacházejí uplatnění a naopak představují rizikový faktor.

Afimbriální adheziny jsou hojné u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Na rozdíl od fimbrií se skládají zpravidla z jedné proteinové podjednotky a tvoří filamentózní struktury, proto také jimi zprostředkovaný kontakt je intimnější. Tato vlastnost se ozývá i v názvu **intiminu**, velmi známého adhezinu enteropatogenních kmenů *E. coli* (EPEC). Mimořádným ho činí zejména jeho spojení se sekrečním systémem typu 3, strukturou připomínající injekci, která slouží k transportu efektorových molekul do buněk hostitele. V tomto případě se kromě dalších působků indukujících přestavbu cytoskeletu transportuje tzv. Tir („transported intimin receptor“), jenž je následně exprimován na povrchu buňky. EPEC tak „vstříkuje“ do hostitelské buňky receptor pro svůj vlastní adhezin.

Bordetella spp., patogen dýchacích cest, tvoří řadu adhezínů umožňujících jí úspěšně kolonizovat řasinkový epitel, např. tzv. filamentózní hemagglutinin (FHA), autotransportéry Tcf (tracheální kolonizační faktor) a pertaktin a dále Ptx, pertusis toxin, jenž funguje zároveň jako adhezin i jako ADP-ribosylující toxin.

MSCRAMM („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) je velká skupina adhezínů grampozitivních bakterií, především streptokoků a stafylokoků, které zprostředkují vazbu k molekulám extracelulární matrix a jsou důležitými faktory virulence často s dalšími funkcemi. Například **protein A** *S. aureus* váže Fc fragment protilátek, čímž inhibuje opsonizaci (viz kapitola o interakci s imunitním systémem), **protein M** *S. equi* může vyvolávat patologické imunitní reakce s dlouhodobými následky po překonání infekce.

Doporučená četba: Finlay, B. B., and S Falkow. “Common themes in microbial pathogenicity revisited.” *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR vol. 61,2 (1997): 136-69.

Stones, D. H., and Krachler, A. M.. “Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization.” *Biochemical Society transactions* vol. 44,6 (2016): 1571-1580.

Ribet, D., Cossart, P.. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* 17, (2015): 173–183.

3.4.2 Invaziny

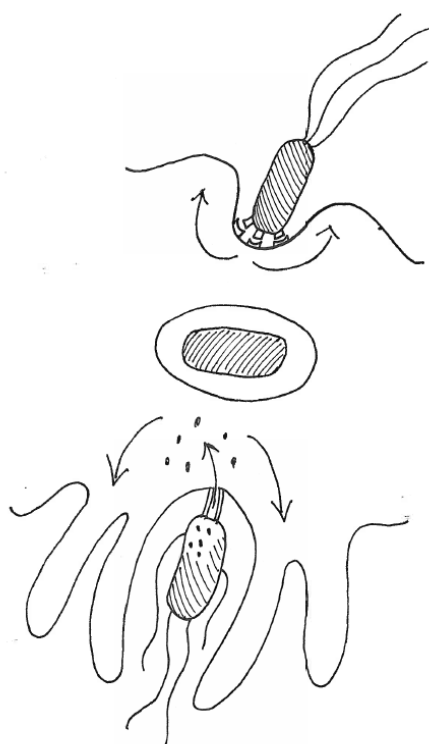
Bakterie, které nezůstávají na vnějších površích hostitele, překonávají epiteliální bariéry a pronikají do vnitřního prostředí za pomoci faktorů virulence, jež souhrnně nazýváme invaziny. Ve vnitřním prostředí se mohou bakterie vyskytovat v různých kompartmentech, především buď extracelulárně, nebo intracelulárně. Kromě obligátně intracelulárních bakterií, jako jsou Rickettsiaceae a Chlamydiaceae, které již nejsou schopné množit se mimo hostitelskou buňku, využívá řada patogenů velice výhodný fakultativně intracelulární životní styl (o intracelulárním přežívání bakterií je řeč v jiné kapitole). Typickými příklady fakultativně intracelulárních bakterií jsou *Salmonella* spp., *Shigella* spp., některé patotypy *E. coli*, *Yersinia* spp., *Listeria* spp., *Mycobacterium* spp. aj., nicméně ani zde hranice není pevná a postupně se zjišťuje, že i bakterie považované tradičně za extracelulární tráví určitou fázi infekce intracelulárně nebo se tam dokonce množí.

Jak se bakterie dostane do buňky? Nejjednodušší způsob je ovšem nechat se pohltit přirozeně fagocytující buňkou. Profesionální fagocyty mají ovšem velký arzenál mechanismů, jak pohlcené bakterie zlikvidovat, takže bakterie, které v nich chtějí přežít, potažmo množit se, se musí naučit jim odolávat či je zablokovat. Zajímavé je, že zatímco neutrofilní granulocyty s naprostými výjimkami (např. *Anaplasma phagocytophilum*) nejsou tímto způsobem využívány, zřejmě proto, že jsou v ničení bakterií velice efektivní, a také snad pro svou krátkou životnost, řada bakterií je adaptována na přežívání a množení v makrofázích přes množství jejich antimikrobiálních mechanismů, jako jsou degradativní enzymy, okyselení fagolysosomů, oxidativní vzplanutí a tvorba NO aj. Možným vysvětlením tohoto tzv. makrofágového paradoxu je adaptace některých bakterií na predátorské améby, běžně se vyskytující v prostředí. Dobrý příklad poskytuje *Legionella pneumophila*, v podstatě náhodný patogen člověka, jež přirozeně napadá améby, ale způsobí těžkou pneumonii, protože se dokáže množit v plicních makrofázích.

Jinou možností je invaze primárně nefagocytující buňky. Jsou v zásadě dva způsoby, jak indukovat vlastní pohlcení cílovou buňkou. Prvním z nich je interakce s určitým buněčným receptorem a vyslání signálu, jež spustí kaskádu reakcí vedoucích k endocytóze bakterie tzv. zipovým mechanismem. Receptorem bývají molekuly zajišťující vzájemnou adhezi hostitelských buněk – cadheriny a integriny a signál vede ke strukturním přestavbám, které by za normálních okolností vedly k těsnějšímu připojení buněk k sobě. Zipový mechanismus je typický pro *Listeria* spp., jejíž povrchové proteiny **internaliny** interagují s E-cadheriny na bazolaterálních stranách epiteliálních buněk. Podobně protein *Yersinia* spp., zvaný přímo **invazin**, reaguje s buněčnými integriny.

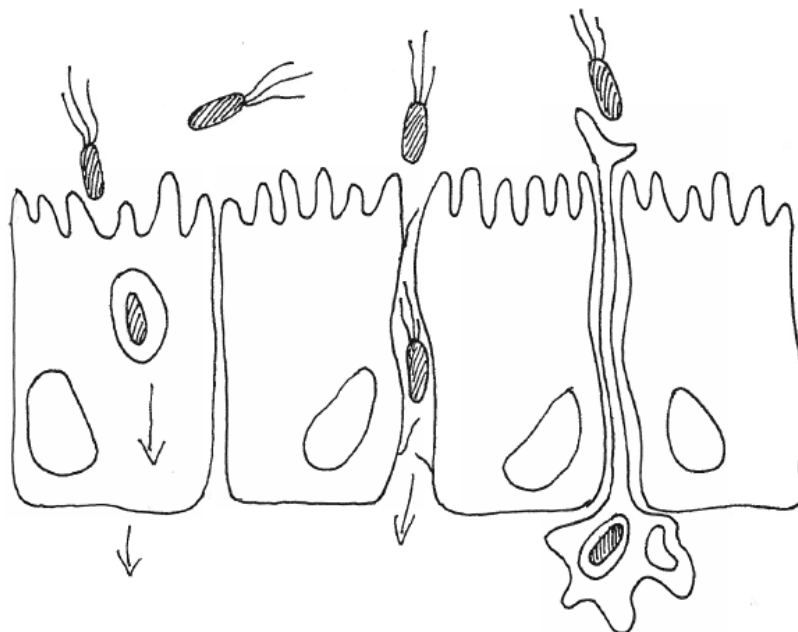
Druhou možností, jak indukovat pohlcení bakterie nefagocytující buňkou, je využití účinku efektorů, jež bakterie přímo injektuje cílové buňce sekrečním systémem typu III. Efektory v cytoplasmě buňky indukují strukturní změny, jež vedou k tvorbě výrazných řas, „panožek“ na membráně, jež obklopí a pohltní bakterii jako při normální fagocytóze. Tento způsob se také nazývá „mechanismus spouštěče“. Nejtypičtějším příkladem je internalizace *Salmonella* spp. s využitím produktů ostrova patogenity SPI-1 **SipB-D**. Podobně fungují invaziny **IpaB-D** *Shigella* spp.

Aby bakterie dosáhly vnitřního prostředí, ať už je jejich cílem intracelulární nebo extracelulární kompartment, musí nejprve překonat přirozené bariéry, jakou je například střevní sliznice nebo mozková bariéra. Nepoškozenou slizniční bariéru představuje řada epiteliálních buněk těsně k sobě připojených tzv. tight junctions. Přechod v místě těchto spojení, často za jejich dezintegrace, se nazývá **paracelulární**. Přechod přes cytoplasmu epiteliální buňky (jedním ze způsobů popsaných výše) se nazývá **transcelulární**. Pojem **mechanismus Trojského koně** trefně vyjadřuje, že bakterie se nechají zanést do vnitřního prostředí profesionálními fagocyty. Na sliznicích se vyskytují různé typy antigen-předávajících buněk, které „vzorkují“ prostředí a předávají antigeny ke zpracování níže ložené slizniční imunitní tkáni (MALT) nebo je zanášejí do lokálních mizních uzlin (především dendritické buňky). Typickým příkladem prvního typu jsou M-buňky nad Peyerovými plaky střeva, jež jsou cílem již zmíněných salmonel,



Obrázek 5 Internalizace bakterií do buněk mechanismem zipu a mechanismem spouštěče (upraveno dle Ribet et Cossart, 2015).

yersinií, ale i např. *Campylobacter jejuni*. Jakkoli jsou tyto mechanismy sofistikované, změny doprovázející bakteriální invazi bývají často méně subtilní. Paracelulární přechod se obvykle pojí s destabilizací tight junctions, k čemuž může sloužit nejen přímo cílená přestavba cytoskeletu, ale také prostá indukce zánětlivé odpovědi. Některé proinflamatorní cytokiny (např. TNF- α) způsobují disrupci tight junctions a zvyšují permeabilitu kapilár. Kupříkladu *Neisseria meningitidis* (tzv. meningokok) destabilizuje endoteliální junkce a zvyšuje permeabilitu cév, což jí umožňuje proniknout do cerebrospinální tekutiny. Naopak jiný původce meningitidy, *E. coli* (NMEC, *neonatal-meningitis E. coli*), využívá nejspíš transcelulární přechod přes vakuolu poté, co indukuje svou endocytózu interakcí s buněčným receptorem.



Obrázek 6 Přestup bakterií přes bariéry transcelulárně, paracelulárně a mechanismem Trojského koně.

Do skupiny invazinů můžeme zařadit i faktory umožňující tzv. extracelulární invazi. Mnoho různých enzymů napomáhá bakteriím rozrušovat extracelulární matrix a šířit se tkání. Jedná se o různé proteázy, lipázy i nukleázy. **Streptokináza** a **stafylokináza** příslušných rodů aktivují plasminogen na plasmin, který pak způsobuje degradaci fibrinu. **Hyaluronidáza**, již nacházíme u *S. aureus* nebo *Erysipelothrix rhusiopathiae*, štěpí hyaluronovou kyselinu obsaženou v pojivových tkáních. Taktéž proteázy (např. **V8 proteáza** *S. aureus* nebo **elastáza** *P. aeruginosa*) štěpí proteiny pojivové tkáně jako elastin, laminin či fibronectin, čímž napomáhají jejímu rozvolnění.

Doporučená četba: Ribet, D., Cossart, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* 17 (2015): 173–183.

Price, J.V., Vance, R.E. The Macrophage Paradox. *Immunity* 41 (2014): 685–693.

3.4.3 Toxiny

Podstatou vlastního poškození organismu při mnohých bakteriálních onemocněních je produkce toxických substancí, zpravidla enzymů, jejichž účinkem dochází k narušení buněčných funkcí. Součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií je tzv. endotoxin, který má charakter lipopolysacharidu. O něm se zmíníme zvlášť. V této kapitole pojednáme o bakteriálních proteinových exotoxinech, jež jsou různým způsobem secernovány do okolí (viz kapitola o sekrečních systémech) a jsou vůbec nejsilnějšími známými toxiny, působícími již v extrémně nízkých koncentracích. Například LD50 botulotoxinu pro člověka je 1 – 3 ng/kg. Srovnajme to

s prudkým jedem strychninem (LD50 = 0,5 – 1 mg/kg) či Maryšíným otrušíkem (LD50 = 20 mg/kg)!

Mechanismy účinku bakteriálních exotoxinů jsou různé, právě tak jako místo jejich účinku, cílové struktury a výsledky jejich působení. Lze je klasifikovat z různých hledisek, ale žádný ze způsobů klasifikace není dokonalý a všeobšáhly. Některé toxiny můžeme zároveň považovat za adheziny a kolonizační faktory nebo invaziny, umožňující šíření extracelulární tkáni, jindy hrají zásadní roli v supresi imunitní odpovědi, např. leukotoxin *M. haemolytica* nebo *F. necrophorum* lyzující bílé krvinky. Někdy také není snadné odlišit pojem toxin od pojmu efektor, který se používá pro proteiny transportované určitými typy sekrečních systémů do cytoplasmy hostitelské buňky s cílem modifikovat její funkce. Že tato modifikace se děje ve prospěch bakterie a na újmu hostitele, je samozřejmé. Toxiny lyzující buňky mohou sloužit k uvolnění živin – např. hemolyziny uvolňují železo, jehož je v extracelulárním prostoru nedostatek. Produkce toxinů lyzujících krevní buňky je významná i z diagnostického hlediska, neboť tak lze tyto bakterie detekovat při kultivaci na krevním agaru.

Různé deskriptivní termíny vyjadřují, na jaký orgánový systém toxin účinkuje, aniž by cokoli říkaly o mechanismu účinku na úrovni molekulární. Tak **enterotoxiny** vyvolávají primárně gastrointestinální příznaky, **neurotoxiny** působí na nervový systém. Pro některé se používá pojem **letální toxin** zkrátka proto, že způsobuje smrt pokusného zvířete (známým příkladem je letální toxin *B. anthracis*).

Většina toxinů je uvolňována do okolí v určité fázi bakteriálního růstu. Účinkují pak na buňky v bezprostřední blízkosti, čímž dochází k lokálnímu poškození tkáně, anebo je naopak jejich účinek systémový, přičemž cílové struktury mohou být místu sekrece velice vzdáleny. Tetanový toxin, vytvořený v infikované ráně, působí v CNS, jiný klostridiový toxin – ϵ toxin – se tvoří ve střevě, ale poškozuje ledviny a jiné orgány.

Toxiny uvolňované do okolí mohou účinkovat na povrchové struktury buněk. Přímá interakce toxinů s buněčnými receptory je ale poměrně vzácná. Příkladem mohou být superantigeny produkované některými streptokoky a stafylokoky, které reagují s receptory T-lymfocytů a vyvolávají jejich hyperstimulaci spojenou s excesivním uvolňováním cytokinů, jež vede k příznakům toxického šoku.

Cílovou strukturou jiných toxinů je buněčná membrána, ať už způsobují enzymatický rozklad jejích složek (fosfolipázy mnoha grampozitivních bakterií, cytolyziny typu listeriolyzinu O, streptolyzinu, perfringolyzinu aj.) nebo v ní zvláštním mechanismem vytvářejí póry (RTX toxiny gramnegativních bakterií).

Většina exotoxinů však cílí na struktury uvnitř buňky. Musí být proto nějakým způsobem nejprve transportovány přes membránu. Při tzv. kontakt-dependentní sekreci se nechají jednoduše „vstříknout“ jedním z typů bakteriálních „injekcí“ (sekreční systémy typu III, IV a VI). To se týká zejména efektorů modifikujících buněčný cytoskeleton – výsledkem je pak třeba internalizace bakterií do buňky nebo jiná strukturální a funkční změna membrány.

Existuje však velká skupina toxinů, která je schopna indukovat vlastní transport do buňky interakcí s buněčným receptorem. Jsou to tzv. **A-B toxiny**. Skládají se z jedné nebo více B-podjednotek (*binding chain*), které zprostředkují vazbu na receptor a transport,

a A-podjednotky (*active chain*), jež je nositelkou vlastní enzymatické aktivity. Nejčastější struktura je A-B nebo A-5B, kdy jsou B-podjednotky uspořádané kolem dokola. Vazba B-podjednotky na receptor vyvolá tvorbu póru v membráně, jímž pak toxin proniká dovnitř, nebo vchlípení membrány – toxin je pak internalizován endocytózou v uzavřeném vezikulu.

Další klasifikace, jež se může uplatnit, je rozdělení toxinů podle jejich enzymatické aktivity. Některé bakteriální produkty přímo enzymaticky štěpí povrchové struktury cílových buněk. Například membránu poškozují enzymy charakteru **lipáz**; v případě, že bakterie bojují mezi sebou, může být cílem i buněčná stěna (**muramidázy** aj.). Toxiny také často fungují jako **proteázy**. Tam spadají nejen různé invazivní faktory štěpící proteinové složky extracelulární matrix a buněčné spoje, ale i vysoce specifické **zinkové metaloproteázy** *C. tetani* a

C. botulinum. Ty proteolyticky štěpí tzv. synaptobreviny, komponenty nervových synapsí, důsledkem čehož je blokáda uvolňování neurotransmiterů a určitý typ nervové paralýzy. **Exfoliatin B** *S. aureus* štěpí desmoglein 1 v desmozomech stratum granulosum epidermis a výsledkem je exfoliativní dermatitida. Další příklady proteáz uvádíme v kapitole o invazinech.

Častým způsobem modifikace cílové struktury je ADP-ribosylace. **ADP-ribosylující toxiny** katalyzují přenos ADP z koenzymu NAD na cílové proteiny. Výsledkem je změna aktivity tohoto proteinu. Do této skupiny patří mnoho nejznámějších bakteriálních toxinů – např. **cholerový toxin**, **termolabilní enterotoxin** *E. coli*, ale i různé toxiny/efektory modifikující aktinový cytoskeleton. Dalším možným způsobem modifikace cílových proteinů je **UDP-glukosylace**, **deamidace** aj.

3.4.3.1 Toxiny poškozující cytoplasmatickou membránu

Velká skupina bakteriálních toxinů rozrušuje membrány hostitelských buněk, což vede obvykle k jejich lýze. Účelem jejich produkce může být uvolnění živin z cytoplasmy, ale také likvidace buněk imunitního systému. Nejspíš však existují i další, námi dosud nerozpoznané důvody. Narušení tkáně a vylití buněčného obsahu (proteinů, nukleových kyselin apod.) může například napomáhat formaci biofilmu a tím usnadňovat kolonizaci sliznic. Tak se tyto zdánlivě agresivní faktory mohou možná uplatnit nejen při invazivních infekcích, ale i při běžné kolonizaci.

S. aureus produkuje řadu toxinů s hemolytickou aktivitou (α , β , γ , δ , leukocidin). **α toxin** je nejsilnější, vyvolává úplnou hemolýzu na krevním agaru a je typickým zástupcem tzv. β -PFTs (toxinů tvořících póry s β strukturou). Tyto toxiny jsou uvolňovány v rozpustné monomerní formě, aby se při kontaktu s hostitelskou buňkou složily v oligomer a vytvořily tak v membráně pór hřibovitého tvaru. Dochází k úniku iontů z buňky, narušení signálních drah a buněčné smrti. Do této skupiny patří dále i stafylokokový γ hemolysin, leukocidin, enterotoxin a ϵ toxin *C. perfringens*.

Stafylokokový **β toxin** jakožto sfingomyelináza je příkladem toxinu přímo enzymaticky štěpícího komponenty cytoplasmatické membrány. Na krevním agaru se jeho produkce projevuje neúplnou hemolýzou. Produkce podobných enzymů typu fosfolipáz (lecitináza, sfingomyelináza) je poměrně častá u grampozitivních bakterií. Dalším příkladem je například **α**

toxin *C. perfringens* (fosfolipáza C), **fosfolipáza D** *Corynebacterium pseudotuberculosis* nebo **equifaktor** *Rhodococcus equi*.

Fakultativně intracelulární *Listeria monocytogenes* produkuje fosfolipázu C a **listeriolysin O** (LLO) ze skupiny hemolyzinů aktivovaných sulfhydrylovou (thiolovou) skupinou. LLO se aktivuje při sníženém pH a lyzuje membránu fagozomu. Umožňuje tak listerii uniknout z fagozomu do cytoplasmy a vyhnout se tak likvidaci lysozomálními enzymy. Příbuznými toxiny jsou **streptolysin O** streptokoků, **pyolysin O** (*Trueperella pyogenes*) a **perfringolysin O** (θ toxin *Clostridium perfringens*).

Velice specifickou skupinou toxinů s hemolytickou aktivitou jsou tzv. **RTX toxiny** (*repeats-in toxins*), pojmenované podle opakujících se sekvencí bohatých na glycin a aspartát. Jsou produkovány mnoha gramnegativními bakteriemi a secernovány typicky sekrečním systémem typu I. Patří sem hemolyziny *E. coli* (HlyA), *Bordetella* spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp. Nejtypičtěji producenty RTX toxinů je čeleď Pasteurellaceae. **Leukotoxin** *Mannheimia haemolytica*, jak název napovídá, poškozuje především bílé krvinky přežvýkavců. *Actinobacillus pleuropneumoniae* produkuje v různých kombinacích 4 **Apx toxiny** (v závislosti na sérovaru) s různě silnou hemolytickou aktivitou (sestupně Apx I až IV), namířenou především proti plicním makrofágům a polymorfonukleárům. Toxiny Apx hrají hlavní roli v poškození plic infikovaných prasat.

3.4.3.2 Toxiny modifikující buněčný cytoskeleton

Aktinový cytoskeleton se podílí na mnoha důležitých buněčných procesech jako je pohyb, zaujetí určitého tvaru, nitrobuňkový transport a endocytóza. Jeho organizace proto vyžaduje sofistikovanou regulaci. Klíčovou roli zde hrají tzv. GTP-vázající Rho proteiny, jež se proto stávají cílem řady bakteriálních toxinů. Destabilizace cytoskeletu vede ke změně buněčných funkcí s rozličným výsledkem – např. narušením integrity epiteliálních bariér, umožňující penetraci hlubších tkání, nebo bloádou aktivace, migrace, fagocytózy či degranulace imunitních buněk. Na aktinový cytoskeleton působí také efekторы některých fakultativně intracelulárních bakterií, které tak indukují vlastní pohlcení přirozeně nefagocytujícími buňkami. Efekторы T3SS kódovaného SPI-1 *Salmonella* spp. aktivují Rho-GTPázy, což vede k přestavbě aktinových vláken a tvorbě membránových výběžků (filopodií), jež obklopi a pohltí bakterii. Naopak enteropatogenní *E. coli* podobným způsobem indukuje strukturální změnu povrchu enterocytů, na něž pak adheruje.

Bez ohledu na přesný mechanismus na molekulární úrovni, klinické důsledky aktivity této skupiny toxinů jsou velice pestré. **Pmt** (*Pasteurella multocida* toxin) a **dermonekrotoxin** *Bordetella bronchiseptica* poškozují sliznice horních cest dýchacích a inhibují zrání osteoblastů. Společně se podílejí na obrazu tzv. atrofické rhinitidy prasat, s charakteristickou atrofií a deformací nosních konch, což se ve vážných případech projevuje až deviací celého rypáku do strany. Závažnou formu onemocnění způsobuje koinfekce oběma bakteriálními druhy s produkcí obou zmíněných toxinů, přičemž v patogenезi hrají důležitou roli i další faktory virulence charakteru kolonizačních faktorů. **Cytotoxické nekrotizující faktory** (CNF) kmenů *E. coli* s extraintestinální patogenitou (původců infekcí močových cest a novorozeneckých meningitid) deaminují a tím aktivují Rho proteiny, čímž napomáhají invazi CNS a přechodného epitelu

močových cest. **Toxiny A a B** střevního patogenu *Clostridioides difficile* naopak inaktivují Rho GTPázy glukosylací. Důsledkem je v tomto případě narušení buněčné signalizace, disrupce tight junctions mezi enterocyty a dezintegrace střevní sliznice.

3.4.3.3 Toxiny ovlivňující signální dráhy

Jednou z klíčových molekul v buněčné signalizace je cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) v úloze tzv. druhého posla, vznikající účinkem enzymu adenylátcyklázy. Adenylátcykláza je aktivována G proteinem (typem GTPáz), který zprostředkuje spojení mezi ní (či jiným enzymem zapojeným v signalizačních drahách) a membránovým receptorem. G protein se aktivuje vazbou GTP na jeho α podjednotku; odtud také pochází jeho název. Naopak hydrolyza GTP na GDP jej činí inaktivním. Výsledkem celé této signalizační kaskády je změna buněčného metabolismu, genové exprese nebo přestavba cytoskeletu (tím tato skupina toxinů v některých případech splývá s předchozí). Bakteriální toxiny alterující všemožné buněčné procesy mohou zasáhnout na různých úrovních této kaskády. Nejčastěji je cílem G protein. Některé bakterie však tvoří vlastní adenylátcyklázu nebo dokonce cAMP. Bez ohledu na to je konečným důsledkem zvýšení koncentrace cAMP v buňce a alterace její funkce.

Asi nejnámějším příkladem takto fungujícího toxinu je **cholerový toxin** *Vibrio cholerae*, prakticky stejně však působí také **termolabilní enterotoxin** ETEC (enterotoxinogenní *E. coli*). Jejich účinkem dochází k ADP-ribosylaci α podjednotky G proteinu, který je tak „uzamčen“ v poloze trvale stimuluje adenylátcyklázu. Dochází tak ke konstitutivní tvorbě cAMP a aktivaci proteinkinázy A, což vede k otevření iontových kanálů a masivnímu přestupu Cl^- a HCO_2^- do střevního lumina. Ionty za sebou táhnou vodu, důsledkem čehož je vodnatý sekreční průjem a těžká dehydratace organismu.

Pertusis toxin původce černého kašle *Bordetella pertussis* působí podobně, ač v dýchacích cestách. Jeho souvislost s hlavním klinickým příznakem – tedy kašlem – nicméně není zcela jasná, zdá se, že především interferuje s funkcí fagocytytujících buněk imunitního systému. *Bordetella* spp. dále produkuje i vlastní adenylátcyklázu s podobným účinkem.

Termostabilní enterotoxiny ETEC ovlivňují jiné kroky buněčné signalizace. STa konvertuje GMP na cGMP, čímž aktivuje cGMP-dependentní proteinkinázu. STb aktivuje kalmodulin-dependentní proteinkinázu; výsledek je však týž – otevření iontových kanálů, sekrece iontů do střevního lumina a průjem.

Bacillus anthracis produkuje dva toxiny, které vznikají vždy připojením protektivního antigenu k edematóznímu (EF), respektive letálnímu (LF) faktoru. Zatímco LF je Zn^{2+} dependentní metaloproteáza, EF je kalmodulin-dependentní adenylátcykláza. LF štěpí určité enzymy zapojené v alternativních signálních drahách (tzv. MAPKK – mitogen-activated protein kinase kinase). Oba toxiny narušují řadu buněčných funkcí v souvislosti s imunitní odpovědí včetně produkce cytokinů, nakonec dochází k buněčné smrti. Příznaky antraxu souvisí především s jejich přímým účinkem na myokard a cévní endotel. **Letální toxin** je asi desetkrát silnější než **edematózní toxin**, účinky jsou ale v zásadě stejné – poškození tkání, zvýšená permeabilita cév, extravazace, kardiovaskulární šok a smrt.

3.4.3.4 Toxiny inhibující proteosyntézu

Některé bakteriální toxiny zasahují syntézu bílkovin na úrovni translace. Cílem **diftera toxinu** *Corynebacterium diphtheriae*, původce záškrtu, stejně jako **exotoxinu A** *Pseudomonas aeruginosa* je elongační faktor 2 (EF2), jež ADP-ribosylují a tím inhibují jeho funkci. Jejich účinkem dochází k lokálnímu poškození tkáně, tj. vzniku typických pseudomembrán v dýchacích cestách v případě záškrtu a například korneálním ulceracím v případě pseudomonádových očních infekcí (pozn. pseudomonády produkují ještě mnoho dalších toxinů, například exotoxiny S a T, poškozující cytoskeleton, exotoxin Y, který je adenylátcyklázou, fosfolipázu, bakteriociny a toxické pigmenty, takže jejich výzbroj je opravdu velice pestrá).

Notoricky známými toxiny inhibujícími proteosyntézu jsou **shigatoxiny** *Shigella dysenteriae* a EHEC/STEC (enterohemoragických a shigatoxinogenních *E. coli*). Stx inaktivují ribosomy podobně jako např. ricin a jejich účinkem dochází především k poškození cév. Důsledkem jejich lokálního působení je hemoragická kolitida, ale mají i systémový účinek. U lidí, ale i psů způsobují tzv. hemolyticko-uremický syndrom (HUS), u prasat edémovou chorobu. HUS je život ohrožující stav, který bývá nejčastěji spojován s infekcí EHEC sérotypu O157:H7. Podstatou je tzv. trombotická mikroangiopatie, v jejímž důsledku dochází k hemolýze a renálnímu selhání. Naproti tomu při edémové chorobě, jak název napovídá, vede poškození cév k extravazaci s typickými edémy očních víček a čela a edému mozku s nervovými příznaky.

Zvláště diftera toxinu a většiny typů shigatoxinů je, že jsou kódovány lysogenním bakteriofágem. S jistou nadsázkou lze říci, že je to vlastně primárně bakterie, kdo je „infikován“.

3.4.3.5 Toxiny aktivující imunitní systém (superantigeny)

Přemíra dobrého škodí, jak ilustruje příklad tzv. superantigenů. Tak nazýváme bakteriální toxiny, jež vyvolávají drastickou imunitní odpověď, která může být až smrtelná pro vlastní organismus. Jaká výhoda z toho vlastně plyne pro bakterii, zatím není zcela jasné. Superantigeny jsou známy zejména u rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Váží se na MHC-II antigen-prezentující buněk (APC) a receptory T-lymfocytů – přesněji řečeno zajišťují přímé spojení variabilní β domény receptorů T-buněk s MHC-II APC, což vede k nespecifické stimulaci a extrémní proliferaci T-lymfocytů s masivní tvorbou cytokinů (např. IL-2, TNF β , IFN γ , dále IL-1, IL-6 a TNF α , jež produkují monocyty). Cytokinová bouře způsobí příznaky toxického šoku (horečka, vyrážka, hypotenze).

Tak funguje stafylokokový **TSST-1** (toxin syndromu toxického šoku), toxický šok však může způsobit i stafylokokový enterotoxin, pokud se dostane do cirkulace, přestože mnohem častěji je spojován s intoxikacemi z potravin.

Nejvíce **streptokokových pyrogenních toxinů** (SPE) je známo u streptokoků ze skupiny A, především *S. pyogenes*, původce spály a angíny. Z nich nejznámější je tzv. **M protein**. Byly však nalezeny i u zástupců jiných skupin, např. *S. equi* ssp. *equi*. Se syndromem toxického šoku a nekrotizující fasciitidou byly asociovány i infekce štěňat *S. canis*.

3.4.3.6 *Klostridiové neurotoxiny*

Toxiny neurotoxických klostridií *C. botulinum* a *C. tetani* tvoří zcela specifickou skupinu. **Botulotoxiny** (A-G) a **tetanový toxin** (tetanospasmin) jsou Zn^{2+} dependentní proteázy, které štěpí tzv. SNARE proteiny neboli synaptobreviny. Ty zajišťují fúzi synaptických vezikul s presynaptickou membránou. Jsou-li rozštěpeny, uvolňování neurotransmiterů je blokováno. Mechanismus u obou původců je tedy stejný, původ infekce i její důsledky jsou však odlišné. Botulotoxiny se až na výjimečné případy tvoří při pomnožení bakterií v substrátech mimo hostitele. S tímto substrátem jsou posléze pozřeny a vstřebávají se ve střevě. Jedná se tedy spíše o intoxikaci než infekci. Naproti tomu tetanový toxin se vytváří při infekci hlubokých ran (nezbytné je anaerobní mikroprostředí, neboť klostridia jsou striktní anaeroby), odkud se vstřebává do systému. Zatímco botulotoxiny zasahují periferní nervový systém, blokují uvolňování acetylcholinu na nervosvalových ploténkách a vyvolávají tak chabou parézu, tetanospasmin působí v CNS. Důsledkem blokády uvolňování inhibičních neurotransmiterů, jako jsou GABA a glycin, je spastická paréza.

3.4.3.7 *Endotoxin*

Pojem endotoxin, tedy toxin, který není secernován vně buňky, se obvykle ztotožňuje s lipopolysacharidem (LPS), typickou složkou buněčné stěny gramnegativních bakterií. Plní především strukturální a ochrannou funkci, přispívá k bariérové funkci vnější membrány (ochrana proti různým antibakteriálním molekulám), působí jako nespecifický adhesin a hraje významnou roli v interakci s imunitním systémem. Je imunogenní – součástí jeho polysacharidové části je somatický O antigen gramnegativních bakterií. Naopak jeho lipidová část je nositelkou toxických účinků. Na rozdíl od exotoxinů působí v podstatně vyšších koncentracích a do okolí je uvolňován až po lýze bakteriální buňky.

Lipopolysacharid je v membráně ukotven lipidem A, jenž se skládá z dimeru N-acetylglukosaminu s několika (obvykle šesti) připojenými mastnými kyselinami. Na NAD navazuje tzv. základní polysacharid neboli R antigen. Tato struktura se příliš nemění, ačkoli se nalézají drobné odlišnosti mezi jednotlivými bakteriálními druhy; je tedy užitečná při určování fylogenetické příbuznosti. Somatický O antigen je oproti tomu vysoce variabilní struktura a určuje antigenní variantu (sérovar nebo séroskupinu) v rámci bakteriálního druhu. Skládá se z různě dlouhého řetězce sacharidů (až několik desítek). Délka řetězce je důležitá z hlediska virulence. Dlouhé sacharidové řetězce působí protektivně, brání například přisednutí MAC (membrane attacking complex) komplementu nebo protilátek. V kultuře se produkce dlouhých O polysacharidů projevuje hladkou strukturou (S fáze) bakteriálních kolonií. Mutanty, vyznačující hrubými koloniemi (R fáze), jsou mnohem citlivější k baktericidním účinkům séra a k fagocytóze. LPS působí zejména proti prvotní, nespecifické imunitní odpovědi. Jelikož je však silně imunogenní, jeho exprese je po nástupu specifické imunitní odpovědi spíše nevýhodná. Některé bakterie se tomu do jisté míry brání tvorbou různě velkého množství antigenních variant (vzpomeňme na více než dva a půl tisíce sérovarů salmonel).

Lipid A funguje jako silný stimulant imunitního systému. Za normálních okolností je skryt ve vnější membráně a uvolňuje se až po lýze bakterie. Spouští bouřlivou nespecifickou imunitní reakci známou jako endotoxinový šok. Lipid A je rozpoznáván receptory TLR4

a CD14 na buňkách přirozené imunity. Spuštění bouřlivé produkce cytokinů, komplementové a koagulační kaskády vede k diseminované intravaskulární koagulopatii, hypotenzi a cirkulačnímu kolapsu.

Doporučená četba

Alouf J., Ladant D., Popoff M. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Elsevier (2015): pp 1200.

Rudkin J.K., McLoughlin R.M., Preston A., Massey R.C. Bacterial toxins: offensive, defensive, or something else altogether? PLoS Pathog 13, 9 (2017): e1006452.

Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.D. Bacterial toxins: friends or Foes? Emerg Infect Diseases 5,2 (1999): 224 – 234.

3.4.4 Sekreční systémy

Některé bakteriální produkty, mezi nimi i řada faktorů virulence, musí být nejprve transportovány vně bakteriální buňky, aby mohly být využity. O způsobu transportu rozhoduje místo jejich určení. Některé molekuly, kupříkladu adheziny, zůstávají připojeny na povrchu bakterie, jiné se uvolňují do extracelulárního prostoru. Pro transport působků vně bakteriální buňky se užívá obecně pojem sekrece. Jiné produkty však mohou být transportovány specializovanými molekulárními komplexy přímo do cytoplasmy eukaryotické buňky, případně sousedních bakteriálních buněk. Pro tento typ transportu, v němž se uplatňují sekreční systémy typu III, IV a VI, užíváme pojem translokace a takto přenášené molekuly se nazývají efektory.

Situace je poměrně jednoduchá u grampozitivních bakterií, kde v cestě stojí pouze jedna membrána. Naproti tomu gramnegativní bakterie musí při sekreci svých produktů navíc překonávat periplasmatický prostor a druhou vnější membránu, a proto si vytvořily řadu značně sofistikovaných struktur, jež mají často přímý vztah k virulenci a zasluhují, abychom jim věnovali více pozornosti. Většina grampozitivů si vystačí s jednoduchými univerzálními systémy. Výjimku tvoří mykobakteria, jejichž silná voskovitá buněčná stěna představuje obtížnou překážku. Mykobakteria si vytvořila zvláštní, dosud nepřesně charakterizovaný sekreční systém typu VII.

Gramnegativní i grampozitivní bakterie, ale i archea a eukaryota sdílejí dva univerzální systémy sekrece: tzv. **sec** (*general secretion*) a **tat** (*two-arginine*). Zatímco u grampozitivů slouží k sekreci přes jejich jedinou membránu, u gramnegativů končí takto transportované molekuly v periplasmatickém prostoru. Rozdíly mezi těmito systémy jsou pro nás zde celkem podružné; sec systém transportuje proteiny v rozvoněném stavu za současné hydrolýzy ATP a protonového gradientu, tat systémem se přenáší proteiny prostorově uspořádané s využitím pouze protonového gradientu. Liší se také specifickou N-terminální signální peptidovou sekvencí. Důležité však je, že u gramnegativních bakterií, má-li se protein dostat ven z buňky, musí v této fázi navazovat jiný systém (tzv. sec-dependentní), nebo musí být primárně využit jiný systém, překonávající vnitřní i vnější membránu a periplasmatický prostor.

Sekreční systém typu I (T1SS) je poměrně jednoduchá struktura, tvořená třemi složkami: tzv. ABC transportérem (*ATP-binding cassette*), zajišťujícím hydrolyzu ATP a umístěným ve vnitřní membráně, kanálem penetrujícím vnější membránu (OMP – *outer membrane protein*) a krčkem spojující tyto dvě složky přes periplasmatický prostor (MFP – *membrane fusion protein*). Nejznámějším příkladem T1SS je transportní komplex TolC-HlyD-HlyB uropatogenních *E. coli* (původců močových infekcí), jenž slouží k sekreci hemolyzinu HlyA (TolC je OMP, HlyD je MFP, HlyB je ABC transportér).

Naproti tomu **sekreční systém typu II** je sec-dependentní a sám se týká v zásadě pouze transportu přes vnější membránu. Skládá se z prstencového komplexu proteinových podjednotek vnořeného ve vnější membráně a dalších podjednotek, sloužících k hydrolyze ATP. Je spojen se sekrecí řady významných toxinů, například cholerového toxinu *V. cholerae*, exotoxinu A *P. aeruginosa* nebo termolabilního enterotoxinu *E. coli*.

Sekrečnímu systému typu III přísluší v tomto výčtu zvlášť významné místo, neboť jej lze v řadě případů označit za faktor virulence v pravém slova smyslu. Bývá kódován často mobilními genetickými elementy v blocích vzájemně souvisejících genů virulence (tzv. ostrovy patogenity). T3SS slouží k translokaci působků – efektorů – přímo do cytosolu eukaryotické buňky hostitele. Cílem efektorů – což se považuje za rozdíl oproti toxinům – není ani tak prosté poškození buňky, jako spíš modifikace určitých jejích funkcí, rozumí se, že ku prospěchu bakterie. Ty využívají tento systém často v různých fázích invaze hostitelských buněk.

Základní struktura T3SS se nazývá injektizom a skutečně připomíná injekční stříkačku, jíž jsou buňce vstříknuty substance měnící její chování. T3SS je velice sofistikovaná struktura, která se pravděpodobně vyvinula z bakteriálního bičíku. Skládá se z jehly připojené ke kruhovému proteinovému komplexu ve vnější a vnitřní membráně spojených krčkem. Jehla je tvořena helikálně uspořádanými proteinovými podjednotkami a zakončena špičkou, která je vysoce variabilní mezi různými typy T3SS a pravděpodobně slouží k signalizaci při kontaktu s eukaryotickou buňkou, aby systém nepracoval „naprázdno“.

Zásadní význam má T3SS enteropatogenních *E. coli*. Tento patotyp jím transportuje receptor pro vlastní adhezín, intimin, do enterocyty, jenž je donucen jej vystavit na svém povrchu. Zároveň dalšími efekty indukuje přestavbu aktinového cytoskeletu, což ústí v tvorbu zvláštních piedestalovitých útvarů, na něž bakterie adheruje. Dochází tak doslova k „oholení“ střevní sliznice od mikrokloků a vzniku zvláštních lézí, v anglické literatuře nazývaných A/E – *attaching and effacing lesions*. Také *Salmonella* spp. indukuje svými efekty přestavbu cytoskeletu, v jejím případě je však cílem internalizace do primárně nefagocytující buňky, např. enterocyty. První T3SS (kódovaný ostrovem patogenity SPI-1) slouží k indukci vlastního pohlcení. Naproti tomu jiný salmonelový T3SS, kódovaný SPI-2, slouží k přežití v makrofázích a je exprimován po fúzi fagozomu s lysozomem. Efekty jsou translokovány přes stěnu fagozomu do cytoplasmy. Podobný systém má i *Yersinia* spp., jejíž efekty – Yop proteiny – blokují fagocytózu a inhibují oxidativní vzplanutí makrofágů.

Sekreční systém typu IV úzce souvisí s mechanismem bakteriální konjugace. Mezi sekrečními systémy je unikátní schopností transportovat také DNA, a to jak do eukaryotických buněk, tak i jiných bakterií. Vyskytuje se u grampozitivních i gramnegativních bakterií. Typický pilus pravděpodobně slouží k připojení akceptorové buňky. Systémy tohoto typu

se nejčastěji uplatňují právě při transportu konjugativních plazmidů, což má nepřímý vztah k virulenci, neboť tímto způsobem se mohou různé determinanty virulence šířit horizontálně v bakteriální populaci (o genech rezistence vůbec nemluvě). Některé patogeny jej využívají k transportu efektorových proteinů a toxinů. Například CagA *H. pylori* indukuje zánětlivou odpověď v žaludeční sliznici a má vztah ke karcinogenezi. Sekrece pertussis toxinu *Bordetella pertussis* je také spojena s T4SS, nicméně je uvolňován pouze do blízkosti buněk, nikoli translokován přes membránu. Podobně jako T3SS, také T4SS má zásadní význam u některých intracelulárních bakterií. Efektory *Brucella* spp., *Coxiella burnetti* nebo *Legionella pneumophila* modifikují fagozom a umožňují přežití v makrofázích.

Proteiny transportované **sekrečním systémem typu V** se nazývají také autotransportéry, neboť – jak název napovídá – vlastně transportují samy sebe. Jsou sec-dependentní, proto obsahují zvláštní N-terminální sekvenci, a přes vnitřní membránu jsou transportovány jednou z cest zmíněných na začátku. Vlastní autotransportér má dvě domény: β doména se vnořuje do vnější membrány a přenáší druhou, tzv. „pasažérovou“ doménu, vně buňky, kde se od ní odštěpuje nebo s ní zůstává spojena. Geniální prostota tohoto systému je předpokladem jeho širokého využití. Jako autotransportéry funguje řada afimbriálních adhezínů, toxinů a proteinů s kombinovanou funkcí, zejména zvláštní skupina proteinů, tzv. SPATE (serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae). Tam patří například termosenzitivní hemagglutinin Tsh ptáčích *E. coli*, který štěpí hlen i hemoglobin a váže hem. Jako další příklady autotransportérů si uveďme třeba adhezín AIDA-1 difúzně adherentní *E. coli*, pertaktin *Bordetella* spp. a další její adheziny důležité pro vazbu k řasinkovému epitelu, vakuolizující cytotoxin VacA a adheziny BabA a SabA *H. pylori*, které hrají důležitou roli v kolonizaci a poškození žaludeční sliznice. Navíc jsou tímto mechanismem secernovány také IgA1 proteázy (*Neisseria* spp., *Haemophilus* spp.), degraďující lidské slizniční protilátky.

Poměrně nedávno bylo zjištěno, že mnoho gramnegativních bakterií (včetně patogenů jako *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* či *S. marcescens*) kóduje **sekreční systém typu VI**, složitý proteinový komplex, který strukturou připomíná bičík bakteriofága T4. Systém se skládá z kanálu spojujícího vnitřní a vnější membránu, bazální destičky, připojené z vnitřní cytosolové strany, a kontraktálního aparátu, jež tvoří vnější stažitelná pochva a vnitřní trubice z hexamerů proteinu Hcp. Při kontrakci pochvy proniká trubice kanálem přes obě membrány a penetruje membránu cílové buňky (eukaryotické nebo prokaryotické). Penetraci umožňuje špička trubice z tzv. PAAR (Prolin, Alanin, Alanin, Arginin) proteinů. Konkrétní mechanismus, jakým jsou transportovány jednotlivé efektory, není ještě docela objasněn, nicméně se zdá, že kontrakce představuje klidový stav aparátu. Nejprve tedy dochází k „nabití“ a natažení pochvy, v druhé fázi pak k vystřelení trubice, penetraci membrány cílové buňky a uvolnění efektorové „nálože“. Celý systém tedy poněkud připomíná balistu. Jeho terčem mohou být jak eukaryotické buňky hostitelského organismu, tak i sousední bakterie. Systém se spouští v blízkosti cílové buňky, přesný signál k „výstřelu“ však není znám. Výzkum ukazuje, že T6SS je v pravém slova smyslu válečná zbraň, kterou bakterie mohou namířit proti buňkám hostitelského organismu, ale také bojovat mezi sebou. Efektory bývají různé cytotoxické enzymy, jako muramidázy, lipázy a nukleázy. Bakterie obvykle zároveň exprimuje i příslušné antiektory, zajišťující odolnost vůči vlastním efektorům. Příkladem efektorů spojených s T6SS mohou být pyociny *P. aeruginosa*, poškozující cytoplasmatickou membránu.

Doporučená četba:

Gerlach, R.G., Hensel, M.. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 297 (2007): 401–415.

Galán, J.E., Waksman, G. Protein-Injection Machines in Bacteria. *Cell* 172 (2018): 1306–1318.

Ho, B. T., Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*, 15,1 (2014): 9–21.

Backert, S., Meyer, T.F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 9 (2006): 207–217.

3.4.5 Mechanismy pro vazbu železa

Všechny bakterie, patogenní či nikoliv, musí být schopny efektivně využívat živiny ze svého okolí. Bakterie kolonizující sliznice musí úspěšně konkurovat ostatní mikroflóře v boji o omezené zdroje. Naopak bakterie, které invadují vnitřní prostředí a přirozeně sterilní tkáň, se sice zbavují konkurence, ale musí se potýkat se značně nehostinnými podmínkami. Železo je prvkem nezbytným pro růst většiny bakterií. Výjimku tvoří snad jedině některé laktobacily. Přestože je železo nejhojněji zastoupeným kovem v organismu, za aerobních podmínek při neutrálním pH se nachází převážně v nerozpustné, pro bakterie nedostupné formě. Koncentrace využitelného železa v organismu je pro růst bakterií nedostatečná. Jedná se o jeden z obranných mechanismů hostitele – železo je vázáno na transportních proteinech, jako je například sérový transferrin nebo laktoferrin v slizničních sekretech. Také uvolněný hem nebo hemoglobin se rychle váže na haptoglobin, hemopexin, albumin apod.

Jelikož se sotva najde překážka, se kterou by si bakterie nedovedly poradit, najdeme i zde řadu mechanismů, jež zajišťují bakteriím dostatek železa potřebného pro růst. Systémy transportující železo vyhlížejí ve srovnání s jinými faktory virulence celkem nevinně, představují však nezbytnou podmínku úspěšné infekce a není jistě náhodou, že mnohé patogeny bývají vybaveny až nadbytkem různých takových systému, které mohou být využity za různých podmínek. Navíc si mohou pomáhat i poněkud agresivnějším způsobem – produkcí toxinů, které lyzují buňky a způsobují uvolnění živin včetně železa do okolí.

Jedním způsobem, jak získat železo, je redukce nerozpustné Fe^{3+} formy na rozpustnou Fe^{2+} formu. Tak působí například barvivo **pyocyanin** *Pseudomonas aeruginosa*, kromě toho, že dodává kultuře krásnou modrozelenou barvu. Některé bakterie jsou zase schopny vázat přímo vazebné glykoproteiny hostitele a získávat železo přímo z nich. Tato vazba je obvykle specifická; *Neisseria meningitidis* váže pouze lidský transferrin a jedná se proto o specifický lidský patogen.

Jiné systémy jsou schopny vázat a transportovat celou hemovou skupinu nebo celý hemoglobin, uvolněný po lýze erytrocytů. Například klíčový periodontální patogen člověka, *Porphyromonas gingivalis*, je vybaven dvousložkovým systémem: **HmuY** váže hem, **HmuR** jej transportuje přes vnější membránu. K uvolnění hemu z hemoglobinu či methemoglobinu slouží proteázy, tzv. **gingipainy**. Schopností vázat hem se vyznačují i někteří zástupci čeledi Enterobacteriaceae, např. *Yersinia* spp.

Asi nejčastější strategií je však produkce tzv. **sideroforů** – molekul, které vážou železo s větší afinitou než vazebné proteiny hostitele. Z chemického hlediska se rozdělují na tři základní skupiny: **katecholáty**, **hydroxamáty** a **karboxyláty**, vyskytují se i smíšené typy. Příkladem katecholátových sideroforů mohou být **enterobactin** mnohých enterobakterií, **salmo-chelin**, **corynebactin**, **vibriobactin** či **amonobactin** (*Aeromonas hydrophila*). Do skupiny hydroxamátových sideroforů patří **alcaligin** (*Alcaligenes* spp. či *Bordetella* spp.), **aerobactin** (*E. coli*) a **cepabactin** (*Burkholderia cepacia*). **Staphyloferrin** je zástupcem karboxylátových sideroforů. K jiným typům dále patří **pyoverdin** a **pseudobactiny** *Pseudomonas aeruginosa*. Některé bakteriální druhy tvoří jeden specifický siderofor, jiné jich kódují celou řadu. Prakticky všechny kmeny *E. coli* tvoří chromozomálně kódovaný enterobactin, produkce aerobactinu je však asociována se zvýšenou virulencí. Tento siderofor bývá navíc kódován plazmidem a lze ho oprávněně považovat za faktor virulence. Kromě toho lze u *E. coli* najít i salmochelin či yersiniabactin. *Yersinia* spp. zase kromě proteinů vázajících hemin (Hms) produkuje i zmíněný siderofor **yersiniabactin**, přičemž obojí je kódováno tzv. HPI („high pathogenicity island“), tedy genomickým ostrovem spojeným s vysokou patogenitou.

Doporučená četba

Wooldridge K.G., Williams P.H. Iron Uptake Mechanisms of Pathogenic Bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12 (1993): 325 – 348.

3.5 Interakce bakterií s imunitním systémem

Dlouhodobým soužitím za neustálé interakce s mikroby si hostitelský organismus vyvinul velké množství obranných mechanismů. Na druhé straně i mikroorganismy si vytvořily řadu strategií, jak tyto mechanismy obcházet, utlumit či je dokonce využívat ku svému prospěchu. Zatímco o jednotlivých složkách imunitního systému a jejich rolích v obraně proti různým skupinám mikroorganismů se může čtenář podrobněji poučit v učebnici veterinární imunologie, zde se pokusíme nastínit danou problematiku z hlediska bakterií samotných.

Imunitní systém má dvě základní složky – vrozenou a adaptivní imunitu. Protože mechanismy přirozené imunity jsou značně evolučně konzervované, nacházíme u bakterií skutečně bohatou škálu nejrůznějších strategií, jak se jim vyhnout. Jednotlivé komponenty přirozené a adaptivní imunity jsou však velmi úzce provázány, vzájemně se aktivují či jinak ovlivňují, a proto i bakteriální obranné mechanismy účinkují často na více úrovních. Jedná se jak o strukturální komponenty poskytující bakteriím pasivní ochranu před „útoky“ imunitního systému, tak i produkty aktivně ovlivňující jeho funkce. Pro první skupinu se někdy používá pojem „protektiny“.

V širším slova smyslu tvoří základní složku přirozené obranyschopnosti **bariérová funkce** sliznic a kůže, včetně neporušeného epitelálního povrchu, produkce hlenu a mechanického očišťování (střevní peristaltikou, řasinkovým epitelem, kýchání, kašel apod.). Ke kolonizaci a penetraci bariér bakterie používají různé adheziny a invazivní mechanismy, jimž se věnujeme v jiných kapitolách. Také některé toxiny slouží k tomuto účelu – příkladem mohou být toxiny *Bordetella* spp., paralyzující řasinkový aparát.

Dvě hlavní složky přirozené antibakteriální odpovědi jsou především fagocytóza a komplement. Obě mají vztah k adaptivní imunitě: protilátky fungují jako opsoniny při fagocytóze, komplexy protilátky a antigenu aktivují tzv. klasickou dráhu komplementu, T-lymfocyty produkují IFN- γ , který aktivuje makrofágy a zvyšuje jejich schopnost likvidovat intracelulární bakterie, abychom jmenovali jen ty nejdůležitější vazby.

Komplement je komplex sérových a membránových proteinů, které se za normálních okolností vyskytují v neaktivním stavu. Teprve určitý impuls spouští složitou komplementovou kaskádu, při níž jedna složka aktivuje druhou, jednotlivé meziprodukty plní různé imunitní funkce a konečným výsledkem je formace tzv. komplexu atakujícího membrány (MAC), který se vnořuje do vnější membrány gramnegativních bakterií a je schopen je lyzovat. Vlastní buňky organismu jsou před jeho účinky chráněny molekulami inhibujícími komplement. Jednotlivé dílčí složky komplementu fungují často jako opsoniny (C3b, C4b) nebo chemotaktiny (C3a, C5a aj.), usnadňující fagocytózu a lákající buňky imunitního systému do místa zásahu. Nejhojněji zastoupenou složkou komplementu v séru je C3 složka a klíčovým momentem komplementové kaskády je její štěpení tzv. C3 konvertázou. C3 konvertáza se liší podle způsobu aktivace komplementu: při tzv. alternativní dráze aktivace je tvořena jinými složkami než při tzv. klasické a lektinové dráze. Zatímco spuštění klasické dráhy je závislé na rozpoznání komplexu imunoglobulinu s mikrobiálním povrchem rozpoznávací složkou C1 (je tedy fylogeneticky

mladší, protože závisí na adaptivní imunitě), alternativní dráhu aktivuje prakticky samotný povrch mikroba, přesněji řečeno absence zbytků sialových kyselin, které se přirozeně vyskytují jako ochranné signály na membránách buněk vlastního organismu. Lektinovou dráhu iniciuje rozpoznání velkého množství manózových zbytků na mikrobiálním povrchu spouštěcím proteinem, tzv. MBL (mannan-binding lectin), její další průběh je ovšem shodný s klasickou dráhou.

Hlavní buněčnou složkou vrozené antibakteriální imunitní odpovědi je **fagocytóza**. Spočívá v aktivním pohlcení bakterie profesionálním fagocytem a její likvidaci účinkem nízkého pH, hydrolytických enzymů a produktů tzv. metabolického vzplanutí. Fagocytující buňky jsou buď rezidentní (např. alveolární makrofágy, Kupferovy buňky v játrech aj.), nebo migrují do místa zásahu na základě chemotaktických signálů, což jsou různé cytokiny produkované poškozenými buňkami, ale i některé složky komplementu. První linii antibakteriální obrany tvoří vysoce efektivní neutrofilové. Jejich hlavními zbraněmi jsou hydrolytické enzymy, defenzin a lysozym a produkty metabolického vzplanutí (reaktivní kyslíkové a dusíkové intermediáty). Na rozdíl od makrofágů mají myeloperoxidázu, umožňující produkci vysoce toxické kyseliny chlorné. Makrofágy zasahují zpravidla v pozdějších fázích imunitní odpovědi a jsou účinné zejména po aktivaci IFN- γ T-lymfocytů. Hlavní zbraní makrofágů je NO syntáza, tvořící radikál oxidu dusnatého (se superoxidem se slučuje v peroxyinitritový anion).

Fagocyty rozpoznávají typické struktury na bakteriálním povrchu, tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), jako například LPS, peptidoglykan nebo flagelin, za pomoci receptorů přirozené imunity (TLR, CD14 aj.), nebo rozpoznávají opsonizující složky komplementu a Fc fragmenty protilátek. Po ingestci bakterie se vzniklý fagozom okyseluje a dochází k jeho fúzi s lysozomem. Bakterie jsou pak vystaveny účinkům lysozomálních enzymů a produktům oxidativního vzplanutí a likvidovány. Důležitou funkcí některých fagocytů (zejm. makrofágů a dendritických buněk) je prezentace antigenů pohlcených mikrobů na molekulách MHC-II pomocným T-lymfocytům.

3.5.1 Maskování bakterií a ochrana bakteriálního povrchu.

Nejpřirozenější strategií bakteriálního vetřelce je na sebe pokud možno vůbec „neupozorňovat“ všudypřítomný imunitní dozor. Jak již bylo řečeno, před aktivací komplementové kaskády chrání buňky vlastního organismu zbytky sialových kyselin – vážou totiž faktor H, regulační molekulu, která inaktivuje C3 konvertázu. *Haemophilus influenzae* dokáže vychytávat zbytky sialových kyselin uvolněné z hostitelských buněk a obalovat se jimi. Jiné bakterie přímo vážou inhibitory komplementu, k nimž kromě faktoru H patří C4BP (protein vázající C4 složku) a tzv. protektin. Povrchové proteiny **OmpA** *E. coli*, **YadA** *Yersinia enterocolitica*, **fimbrie typu IV** *Neisseria gonorrhoeae* a různé proteiny streptokoků vážou C4BP, čímž se brání před depozicí C3b, opsonizující složky komplementu. *Leptospira* spp. vážou faktor H. *Borrelia burgdorferi* produkuje protein velice podobný protektinu, který brání zformování MAC. *Helicobacter pylori* vychytává protektin uvolněný z buněk žaludeční sliznice, poškozené zánětem.

Inhibice komplementu sialovými kyselinami je založena na faktu, že mikrobiální povrch bývá obvykle na zbytky této kyseliny chudý. Některé bakterie se však chrání syntézou kapsuly s obsahem sialových kyselin (*E. coli* K1, *Neisseria* spp.). Taková kapsula má nejen regulační účinek na komplement, ale plní řadu dalších funkcí jako jiné typy kapsul. **Kapsulou** neboli pouzdrem označujeme obvykle polysacharidový obal těsně připojený k bakteriálnímu povrchu. Volněji asociovanou polysacharidovou matérii produkovanou bakteriemi do okolí nazýváme sliz nebo biofilm. Prvořadou funkcí kapsul je funkce maskovací a ochranná. Maskují povrchové struktury rozpoznávané imunitním systémem a poskytují „molekulární mimikry“, neboť kryjí bakteriální povrch „nevinně“ vyhlížejícími substancemi, jako jsou již zmíněné sialové zbytky nebo kyselina hyaluronová (hlavní složka kapsul *S. pyogenes*

a *S. equi* ssp. *equi* nebo *Pasteurella multocida* typ A), která je běžnou složkou pojivové tkáně. Kapsuly brání nasednutí protilátek a tím aktivaci klasické dráhy komplementu a fagocytóze, stejně tak brání nasednutí MAC a fagocytů přímo (fagocyt doslova nemá bakterii zač „popadnout“). Důležitou roli zde hraje také hydrofobicita a negativní náboj kapsuly. Enkapsulované bakterie zpravidla vykazují zvýšenou virulenci. V kultuře se produkce polysacharidového obalu projevuje mukózní růstovou fází. Produkce pouzdra je typická pro některé kmeny *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Neisseria* spp., *Pasteurella* spp., *Bordetella* spp., *S. pyogenes*, *S. equi* ssp. *equi*.

Určitou výjimku tvoří kapsula *Bacillus anthracis*, která je tvořena polypeptidem (poly- γ -D-glutamát). Pouzdro produkuje také kvasinka *Cryptococcus neoformans*, původce oportunních infekcí CNS. Jeho kapsula z glukuronoxylomananu má kromě výše zmíněných funkcí i imunomodulační efekt, mimo jiné ovlivňuje tvorbu cytokinů, omezuje leukocytární migraci a aktivuje supresorové T-lymfocyty.

Pouzdro sice také může hrát roli v nespecifické adhezi na povrchy, nicméně sama zakrývá specializované adhezivní molekuly, takže v určité fázi infekce může spíše překážet. Proto její produkce může být podle potřeby regulována.

Podobnou mechanickou ochranu poskytují také dlouhé řetězce **O-polysacharidu** (viz endotoxin). I jím si gramnegativní bakterie mohou držet MAC „dále od těla“.

Některé bakterie tvoří na vnějším povrchu další monomolekulární vrstvu mřížovitě uspořádaného proteinu (tzv. **S layer**, surface layer, doslova povrchová vrstva), která má také všeobecnou ochrannou funkci, např. přes nízkým pH, bakteriofágy, ale i různými antibakteriálními enzymy.

Ke své ochraně mohou bakterie využívat také proteiny extracelulární matrix, jimiž se doslova zabarikádují před molekulami a buňkami imunitního systému. Stafylokoky kupříkladu produkují **volnou a vázanou koagulázu** (tzv. clumping factor), jejichž účinkem dochází ke sražení fibrinu kolem bakterie. Fagocyty a další složky imunitního systému se k ní pak prostě nedostanou. Fibronektinovým „pláštěm“ se kryje i původce syfilidy, *Treponema pallidum*.

3.5.2 Interference s molekulami imunitního systému

Mnoho bakteriálních produktů váže, případně štěpí imunoglobuliny, čímž interferují jak s fagocytózou, tak s aktivací klasické dráhy komplementu. **Protein A** *S. aureus* je významným zástupcem skupiny proteinů, která váže Fc fragment IgG. Tím, že chytá protilátku za „špatný konec“, blokuje fagocytózu zprostředkovanou Fc receptorem. Bakterie se tak navíc obalí protilátkami jako ochranným pláštěm, neboť jejich Fc fragmenty jsou zablokovány a nemohou tak plnit svou funkci. Podobné proteiny produkují i streptokoky.

Jinou možností je protilátky naštěpit. Streptokoky, stafylokoky, *Neisseria* spp. nebo *H. influenzae* produkují **IgA proteázy** nebo jiné typy proteáz, jejichž účinkem také mlže dojít k odštěpení nebezpečného Fc fragmentu, přičemž Fab fragment zůstává navázán a kryje epitopy na povrchu bakterie. Pro takovou maskovací strategii se v literatuře můžeme setkat s pojmem „fabulace“.

Také jednotlivé složky a meziprodukty komplementu mohou být enzymaticky štěpeny nebo vázány tak, aby byla blokována jejich funkce – ať už hrají roli chemokinů, opsoninů nebo jinou. Velice komplexním účinkem se vyznačuje například tzv. **SCIN** – stafylokokový inhibitor komplementu. Váže se ke konvertázám klasické i alternativní dráhy, blokuje je a zároveň stabilizuje, čímž brání vzniku nových konvertáz. Streptokokový inhibitor komplementu, **SIC**, váže komplementový komplex v jednom z posledních kroků kaskády a brání vnoření tohoto komplexu do membrány. Paradoxní je, že streptokoky jsou grampozitivní, takže vnější membránu vůbec nemají; dá se předpokládat, že SIC plní ještě další funkce. Zdá se, že zároveň inhibuje účinek lysozymu a β -defenzinu neutrofilů. Formaci finálního komplexu brání i protein **TraT** *E. coli* – zde je jeho funkce ovšem jasnější. Interferovat s funkcí komplementu lze také účinkem na komplementové receptory. **CHIPS** (chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus*) se například váže na receptory pro C5a, čímž účinně omezuje chemotaxi.

Pseudomonády a některé streptokoky skupiny A a B produkují **C5a peptidázu**, štěpící – jak název napovídá – C5a složku komplementu, tedy významný chemotaktin.

Zvláštní skupinu faktorů virulence tvoří proteázy, jež mohou štěpit různé molekuly imunitního systému a zároveň i složky extracelulární matrix – hrají tedy i roli invazinů, usnadňujících šíření tkání (tzv. „spreading“ faktorů). **Stafylokináza** a **streptokináza** jsou enzymy, které konvertují plasminogen na plasmin. Plasmin je proteáza účinná nejen proti složkám pojivové tkáně, ale i komplementu a IgG. Právě tak funguje i protein **Pla** *Yersinia pestis*. Nejen aktivuje plasmin a koagulázu thrombin, ale sám také štěpí C3 složku komplementu. Dále do této skupiny můžeme zařadit **PgtE** *Salmonella* Enterica, štěpící C3b, C4b i C5 složky a aktivující plasmin, **SpeB** *Streptococcus pyogenes* (štěpí proteiny extracelulární matrix, C3, C3b, IgG a properdin, což je aktivační protein alternativní dráhy) a proteázy (**elastáza** a **alkalická proteáza**) *Pseudomonas aeruginosa*.

Aktivace komplementu má kaskádový charakter. Teoreticky by tedy stačilo zasáhnout jediný krok, aby byla zablokována celá kaskáda. Naproti tomu ale vidíme, že mnohé bakterie (jmenovitě streptokoky a stafylokoky) produkují celou škálu různých produktů, které zasahují

na všech možných úrovních. Vzhledem k složitosti a provázanosti jednotlivých složek imunitního systému je taková strategie zřejmě mnohem účinnější. Není výjimkou, že jsou tyto faktory virulence kódovány společně na ostrovech patogenity nebo mobilních genetických elementech.

3.5.3 Interference s fagocytózou

Podobně jako komplement i proces fagocytózy může být zasažen ve všech jednotlivých fázích. Většina bakterií se primárně snaží vyhnout se rozpoznání a pohlcení fagocytem. Interference s chemotaxí nebo opsonizací často souvisí se štěpením nebo vázáním složek komplexu nebo protilátek a různé příklady už byly zmíněny výše, podobně jako ochranná funkce kapsuly a některých typů LPS.

Jsou i bakterie, které se zvolí agresivnější strategii a produkují toxiny, aktivně poškozující buňky imunitního systému, jako je **leukotoxin** *Mannheimia haemolytica*, **leukocidin** *S. aureus* a další typy hemolyzinů, **exotoxin A** *P. aeruginosa* a **Apx toxiny** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Některé toxiny mají méně přímočarý supresivní efekt – například **pertusis toxin** nějakým způsobem snižuje produkci chemokinů. Také **antraxové toxiny**, mimo jiné účinky, narušují signální dráhy a inhibují chemotaxi.

Efektory modifikující aktinový cytoskeleton hostitelské buňky mají vliv na membránové procesy, k nimž patří fagocytóza. Zatímco fakultativně intracelulární bakterie využívají tento mechanismus k indukci vlastní internalizace do buňky primárně nefagocytující (stále zmiňovaná *Salmonella* spp.), jiné mohou podobným způsobem fagocytózu blokovat. Typickým příkladem jsou proteiny **Yop** proteiny *Yersinia* spp., kódované na plasmidu společně s T3SS, kterým jsou transportovány do buňky. Způsobují depolymerizaci aktinu a blokádu fagocytózy. Zároveň inhibují NFκB (nukleární faktor kappa B, důležitý transkripční faktor), čímž zastavují další prozánětlivé procesy, a blokují též oxidativní vzplanutí.

Když už je bakterie „proti své vůli“ pohlcena, musí se pokusit přežít ve skutečně nehostinných podmínkách fagocytu. Některé bakterie se však adaptovaly natolik, že jsou schopny i ty nejučinnější likvidační prostředky fagocytů účinně blokovat nebo modifikovat a v profesionálních fagocytech se dokonce i množit. K tomuto účelu jsou s úspěchem využívány zejména makrofágy; neutrofile produkují více reaktivních forem kyslíku, kyselinu chlorovou a další vysoce toxické formy chlóru. Navíc je jejich životnost velice krátká.

Je několik základních strategií, jakými se bakterie mohou vyhnout likvidaci ve fagocytech. Jednou z nich je **inhibice fagolyzomální fúze**. Určitá složka nebo produkt bakterie modifikuje membránu fagozomu, takže nemůže dojít ke splynutí s lyzozomem a uvolnění lyzomálních enzymů. Například *Brucella* spp. v odpověď na okyselení fagozomu spouští expresi T4SS, transportuje efektory přes stěnu fagozomu, blokuje fúzi a maturaci fagozomu, čímž brání dalšímu okyselení. Vzniká modifikovaný fagozom neboli brucelozom. Před oxidativním vzplanutím ji potom chrání řada detoxikačních mechanismů. Podobně brání fúzi lipoarabinomanan a další složky buněčných stěn mykobakterií, VapA lipoprotein buněčné stěny *Rhodococcus equi* a komponenty elementárních tělísek chlamydií. Stejnou strategii využívá i *Legionella pneumophila*.

Salmonella spp. využívá **modifikaci fagolysozomu**. Exprese T3SS a efektorů na SPI-2 a jimi indukované změny cytoskeletu vedou ke smrštění vakuoly a jejímu přemístění do blízkosti Golgiho aparátu.

Řadě bakterií, jako je *Rickettsia* spp., *Listeria* spp., *Francisella tularensis*, *Clostridium piliforme*, *Lawsonia intracellularia* a *Shigella* spp., umožňuje štěpení membrány fagosomu ještě před fúzí **únik do cytoplasmy**. Tyto bakterie produkují enzymy a toxiny různého charakteru, jako je fosfolipáza D a hemolyzin C u *Rickettsia* spp., listeriolysin O a fosfolipáza C u *Listeria* spp.

I když dojde k fagolysozomální fúzi, okyselení a respiračnímu vzplanutí, neznamená to ještě definitivní vítězství fagocytu – bakterie mohou být vybaveny faktory zajišťujícími do jisté míry **odolnost** vůči těmto mechanismům. Například extrémně silná, voskovitá buněčná stěna mykobakterií je značně rezistentní vůči nízkému pH a lysozomálním enzymům. Obligátně intracelulární bakterie *Coxiella burnetii* nejen že odolává velmi nízkému pH, ale dokonce si v něm – jak se zdá – docela libuje. Různé enzymy a antioxidační mechanismy mohou snižovat účinnost produktů metabolického vzplanutí. Mykobakteria produkují katalázu, superoxid-dismutázu a arylhydroxyperoxidázu, které působí protektivně dokonce i v aktivovaných makrofázích. Také *S. aureus* produkuje dva typy superoxid-dismutázy – SodA a SodM, a kromě toho také pigmenty, jež působí jako antioxidanty.

3.5.4 Interference s adaptivní imunitní odpovědí

Adaptivní imunitní odpověď představuje způsob, jakým se hostitelský organismus vyrovnává s obrovskou genetickou variabilitou mikroorganismů, je cílená a velmi účinná. Jedním způsobem, jak se mohou mikroorganismy bránit adaptivní odpovědi, je tzv. antigenní variace. **Antigenní variace** v pravém slova smyslu, totiž že se hlavní antigenní determinanty na povrchu periodicky mění, jako je to známo např. u *Trypanosoma* spp., u bakterií není běžná. Určitou výjimku představují původci návratných horeček a tyfů *Borrelia* spp. (*B. recurrentis*, *B. crocidurae*, *B. hermsii*). Mnohočetné kopie hlavního variabilního proteinu (Vmp) jsou kódovány lineárním plazmidem. Přeskupování DNA vede k periodickému střídání exprese různých variant hlavního proteinu. Když se objeví nová antigenní varianta, bakterie se znovu vyplaví do krve a způsobí relaps klinických příznaků – horečnatý záchvat, dokud ji nově vytvořené protilátky nedonutí opět se schovat. Také *Neisseria gonorrhoeae* kóduje řadu typů pilinu, přičemž vždy jen jeden je aktivně exprimován. Kóduje jeden *pilE* lokus, který je exprimován, a mnoho tichých variant *pilS*, které jsou roztroušeny v genomu. Rekombináza RecA zajišťuje přemístění tiché kopie do exprimovaného lokusu. Exprimovaná varianta pilinu ovlivňuje jak imunoreaktivitu, tak i adhezivní vlastnosti.

Mnohem častěji se u bakterií setkáváme mnohočetnými antigenními variantami – **sérotypy** – v rámci druhu. Je to strategie výhodná z hlediska celé populace, protože imunita proti jednomu sérotypu stále umožňuje uplatnění sérotypů jiných. Velkým množstvím sérotypů se vyznačuje některé druhy gramnegativních (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Neisseria* spp. aj.) i grampozitivních bakterií (např. streptokoky). Variabilitu bakteriální populace zvyšuje také

schopnost tzv. **fázové variace**, známá u salmonel, které jsou obvykle schopné „přepnout“ mezi dvěma variantami bičíkového proteinu (H antigenu).

V souvislosti s adaptivní imunitou je na místě zmínit také **superantigeny** (podrobněji v kapitole o toxinech), které vyvolávají masivní nespecifickou stimulaci T-lymfocytů a bouřlivou imunitní reakci. Smysl této bakteriální strategie, známé např. u pyrogenních streptokoků nebo *S. aureus*, není zcela jasný. Jedním z možných vysvětlení je, že se takovou stimulací imunitní systém zcela neefektivně vyčerpá, aniž by mohl specificky zasáhnout proti danému patogenu.

Imunomodulace. Adaptivní imunitní odpověď proti extracelulárním a intracelulárním bakteriím vykazuje zásadní odlišnosti; zatímco protilátky jsou účinné především proti extracelulárním patogenům, v obraně proti intracelulárním patogenům má hlavní slovo buněčná odpověď. Rozhodujícím momentem ve směřování imunitní odpovědi je prezentace antigenu. Makrofágy a dendritické buňky vystavují antigeny tzv. exogenní cestou na molekule MHC-II pomocným CD4 T-lymfocytům. Podle okolností (vlivem odlišných cytokinů) dochází k jejich diferenciaci na Th1 nebo Th2 populaci, které se také liší především produkcí odlišných cytokinů. Zatímco Th1 vznikají pod vlivem IL-12 z makrofágů a NK-buněk a produkují opět IL-12 a IFN- γ , které aktivují celulózní odpověď, Th2 s rozhodujícím vlivem IL-4 směřují odpověď k převládající produkci protilátek. IFN- γ indukuje v makrofázích aktivitu NO-syntázy, zvyšuje jejich schopnost okyselovat fagozom. Pro intracelulární bakterie je tedy zcela zásadní rozdíl, zda se budou potýkat s aktivovanými makrofágy, jež zvyšují svou likvidační efektivitu na maximum, nebo s makrofágy pod tlumivým vlivem IL-4, které mohou poskytovat docela příjemný úkryt. Pro bakterie přežívající dlouhodobě v makrofázích, jako jsou mykobakteria, brucele nebo např. *Rhodococcus equi*, by proto bylo maximálně výhodné ovlivnit směřování imunitní odpovědi ve prospěch Th2. V případě *Mycobacterium leprae*, původce malomocenství známého už z Bible, je závažná, tzv. lepromatózní forma onemocnění s difúzními lézemi spojena s převládající neefektivní Th2 odpovědí. Naopak tuberkulózní forma, při níž vznikají ohraničené uzlovité léze, je výrazem schopnosti organismu reagovat účinnou buněčnou odpovědí. Není však jasné, zda je to prostě důsledek chybné reakce imunitního systému nebo zda jsou původci samy schopni do určité míry ovlivňovat cytokinovou produkci. Je však známo, že lipoarabinomanan a další komponenty buněčné stěny mykobakterií snižují expresi MHC-II, antigenní prezentaci a tím i produkci IFN- γ .

Doporučená četba:

Rooijackers, S.H.M., van Strijp, J.A.G. Bacterial complement evasion. *Molecular Immunology* 44 (2007): 23–32.

Finlay, B.B., McFadden, G. Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell* 124 (2006): 767–782.

Hodkins D.C., Shewen P.E. Subversion of the Immune Response by Bacterial Pathogens, in: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer G., Thoen C.O. (eds.): *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Blackwell Publishing (2010): 15 – 32.

3.6 Interakce bakterií s hostitelskou buňkou

3.6.1 Intracelulární způsob života

Patogenní bakterie můžeme podle jejich schopnosti vzájemné interakce s eukaryotickými buňkami hostitele rozdělit do tří kategorií.

1. Extracelulární
2. Fakultativně intracelulární
3. Obligátně intracelulární

Extracelulárně patogenní bakterie po vstupu do organismu hostitele nepronikají do jeho buněk a místo toho se uchytí v mezibuněčném prostoru tkání (streptokoky, stafylokoky) nebo se váží (adherují) na slizniční povrchy, jako např. enterotoxigenní kmeny *E. coli*. Osmocnění tedy vyvolávají množением na sliznicích, v tělních tekutinách nebo v pojivové tkáni. Takové bakterie můžeme nazvat neinvazivní, přesto se příležitostně zjišťují v profesionálních fagocytujících buňkách, které jsou součástí přirozených obranných mechanismů hostitele. Extracelulárně patogenní bakterie poškozují hostitele produkcí účinných toxinů nebo enzymů a využívají různé faktory virulence, kterými se snaží vyhnout obranným mechanismům hostitele. Typickým příkladem infekcí vyvolaných těmito bakteriemi jsou infekce ran, močové infekce, záněty okostice (osteomyelitidy), záněty zevního zvukovodu, některé formy pneumonií a další. Z veterinárně významných druhů do této skupiny patří např. *Bacillus anthracis*, enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*, hemofily, patogenní mykoplazmata, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Bordetella bronchiseptica* aj.

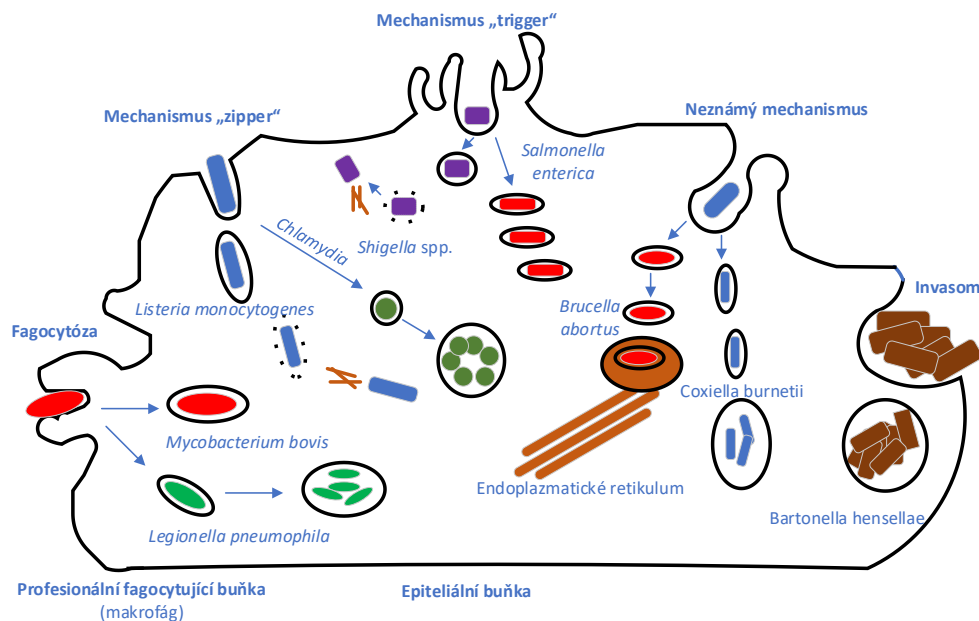
Intracelulárně patogenní bakterie se rozdělují na **obligátně** a **fakultativně intracelulární** bakterie podle schopnosti (fakultativně i. b.) nebo neschopnosti (obligátně i. b.) množit se mimo eukaryotické buňky. **Fakultativně intracelulárně bakterie** pronikem do buněk hostitele získávají selektivní výhodu úniku před jeho humorálními protilátkami. Uvnitř eukaryotických buněk jsou chráněny zvláštními mechanismy před působením lysozomálních enzymů. Jako fakultativně intracelulární bakterie mají schopnost množit se jak uvnitř buněk, tak i mimo ně. Například salmonely, po iniciální invazi enterocytů, mohou pronikat zpět ze sliznice do lumina střeva nebo do žlučového měchýře, což je zásadní předpoklad pro jejich vylučování z hostitele a tím docílení následného šíření infekce na další hostitele. Extracelulární fáze infekcí vyvolaných fakultativně intracelulárními bakteriemi může být u oslabených hostitelů kritickým zlomem v průběhu těchto infekcí a může vést až k sepsi a následné smrti hostitele.

Mezi fakultativně intracelulární patogeny patří vedle salmonel také *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., *Legionella pneumophila*, patogenní mykobakteria, nokardie, *Rhodococcus equi*, patogenní yersinie.

Obligátně intracelulární bakterie jsou neschopné, podobně jako živočišné viry, množit se mimo buňky hostitele. Zvláštní podskupinou těchto bakterií jsou chlamydie, které nemají vlastní energetický metabolismus a využívají ATP a další meziprodukty z buněk hostitele pro svůj růst a dělení. Chlamydie vstupují do buňky mechanismem označeným „zipper“ jako elementární tělíska a v lysozomu dochází k jejich dělení a vyzářování v retikulární tělíska. To vše

se děje za spoluúčasti efektorových molekul chlamydií a hostitelské buňky v těsném kontaktu s buněčnými organelami (Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie). V konečné fázi vývojového cyklu jsou elementární tělíska z buňky uvolněna a mohou vstoupit do dalších buněk hostitele nebo být vyloučena z organismu a infikovat tak další hostitele. Podobný cyklus prodělává původce Q horečky *Coxiella burnetii*. Řadíme sem i další patogeny z rodů *Rickettsia*, *Anaplasma* a *Ehrlichia*. S výjimkou chlamydií jsou tyto bakterie přenášeny krev sajícími členovci.

Na obrázku č. 7 jsou schematicky znázorněny mechanismy endocytózy a způsob přežívání různých druhů intracelulárních bakterií ve vakuolách a cytosolu buněk hostitele. Je třeba rozlišit vstup bakterií do profesionálních fagocytujících buněk (makrofágy) a buněk výstelky sliznic, které plní úlohu přirozené obrany před vstupem bakterií do hostitele. Do makrofágů se bakterie, a to nejen ty intracelulárně patogenní, dostávají fagocytózou. V makrofázích mohou některé druhy intracelulárních bakterií přežít ve vakuolách (*Mycobacterium* spp.), případně se tam i množit (*Legionella pneumophila*). Obligátně intracelulární bakterie, jako jsou chlamydie a *Coxiella burnetii*, přežívají a množí se v epiteliálních buňkách, a to ve vakuolách, které se vyvinuly z původního lysozomu. Jak je ze schématického obrázku zřejmé, tak samotný vstup do epiteliálních buněk má několik odlišných mechanismů (zipper, trigger, invasom a jiné), kdy jsou do internalizace bakteriální buňky zapojeny povrchové proteiny bakterie společně s proteiny hostitelské buňky. Přitom jsou využity signální dráhy v obou zúčastněných buňkách, včetně sekrečních systémů bakterií podrobně popsanych v kapitole 3.4.4. Celý proces vstupu je provázen přestavbou cytoplazmatické membrány a kostry (cytoskeletu) buňky. V tabulce č. 3 je uveden přehled fakultativně a obligátně intracelulárních bakterií s jejich specifickými znaky s uvedením onemocnění, cílových buněk, lokalizace bakterií v hostitelské buňce a klíčových faktorů zapojených do signálních drah celého procesu endocytózy.



Obrázek 7 Základní mechanismy vstupu intracelulárně patogenních bakterií do buněk hostitele a jejich intracelulární přežívání

Tabulka 3 Přehled fakultativně a obligátně intracelulárních bakterií s jejich specifickými znaky. Upraveno dle Price et Vance, 2014.

Bakterie	Onemocnění	Buňky	Kompartment	Klíčové faktory
<i>Escherichia coli</i> (ExPEC)	Infekce močových cest, meningitidy, sepse	Přechodný epitel, endotel mozkových cév aj.	Endozom	CNF 1, CNF 2 aj.
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritida, septikémie	Enterocyty, M buňky, makrofágy	Modifikovaný fagolysosom (SCV)	T3SS, proteiny Sip, Sop
<i>Yersinia</i> spp.	Gastroenteritida, střevní lymfadenitida, septikémie	Makrofágy, M buňky	Fagozom (indukce apoptózy a únik z buňky)	T3SS, proteiny Yop
<i>Shigella</i> spp.	Kolitida	Enterocyty, M buňky	Cytoplazma	T3SS, proteiny Ipa
<i>Brucella</i> spp.	Brucelóza	Makrofágy, placentární buňky	Modifikovaný fagozom (brucelozom)	T4SS
<i>Burkholderia mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>	Vozhřivka, melioidóza	Makrofágy, epiteliální buňky	Cytoplazma	T3SS, T4SS?
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie	Makrofágy, epiteliální buňky	Cytoplazma	? produkty FPI
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Kaseózní lymfadenitida, ulcerativní lymfangitida	Makrofágy	Fagozom	Povrchové lipidy
<i>Listeria</i> spp.	Listerióza	Enterocyty, M buňky, dendritické buňky	Cytoplazma	Internaliny, fosfolipáza C, listeriolysin O
<i>Rhodococcus equi</i>	Pyogranulomatózní pneumonie	Makrofágy	Fagozom	Povrchové lipidy, LAM, protein VapA
<i>Nocardia</i> spp.	Pyogranulomatózní léze	Makrofágy	Fagozom	Mykolové kyseliny a jiné lipidy BS
<i>Mycobacterium</i> spp.	Tuberkulóza, mykobakteriózy	Makrofágy	Fagozom	T7SS, mykolové kyseliny, LAM a jiné součásti BS
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Ileitida (proliferativní enteropatie)	Enterocyty	Apikální cytoplazma	T3SS
<i>Chlamydia</i> spp.*	Infekce různých orgánových soustav	Epiteliální buňky	„Inkluze“	T3SS
<i>Coxiella burnetti</i> *	Q horečka	Makrofágy	Fagolysosom	T4SS
<i>Rickettsia</i> spp.*	Horečky a tyfy	Endotel, makrofágy	Cytoplazma	T4SS aj.

Vysvětlivky: * obligátně intracelulární bakterie, ExPEC – extraintestinální patogenní *E. coli*; CNF – cytotoxický nekrotizující faktor; T3SS – sekreční systém typu III; T4SS – sekreční systém typu IV; T7SS – sekreční systém typu VII; FPI – Francisella pathogenicity island; LAM – lipoarabinomanan; BS – buněčná stěna

3.6.2 Perzistentní infekce

Základní schéma průběhu infekce – od průniku patogenu do organismu přes jeho pomnožení na predilekčních místech a vylučování – končí eliminací patogenu, v horším případě smrtí makroorganismu. Akutní stádium infekce odráží prvotní střet infekčního agens s obrannými mechanismy hostitele, kdy se rozhoduje, „kdo s koho“. Někdy však po tomto stádiu k rozhodnutí nedojde a nastává jakýsi rovnovážný stav, kdy je imunitní systém stimulován jen omezeně a patogen není eliminován – perzistuje v organismu, aniž by způsoboval výraznější klinické projevy. Klid zbraní je jen zdánlivý; pod povrchem zuří tichá válka mezi imunitním systémem a mikroorganismy. Jejím projevem může být nenápadně postupující chronický zánět nebo občasné vzplanutí akutních klinických příznaků. Makroorganismus bývá v defenzivní pozici; snaží se udržet infekční agens v určitých mezích. Dojde-li v důsledku oslabení imunitního systému nebo jiných okolností k rozhoření konfliktu, tedy reaktivaci infekce, výsledek může být fatální; bakterie tak zároveň přijdou o hostitele. Zdá se, že perzistentní infekce není jen náhodným zjevem, daným momentální rovnováhou sil, ale je součástí specifické strategie určitého patogenu.

Bakterie mohou pro přežívání v organismu využívat různé niky. V zásadě je můžeme rozdělit na tři skupiny: a) bakterie perzistující na sliznicích, b) bakterie perzistující v tkáních extracelulárně a c) bakterie perzistující v tkáních intracelulárně, především v makrofázích.

3.6.2.1 Perzistence na sliznicích

Kůže a sliznice komunikující s vnějším prostředím jsou přirozeně kolonizovány bakteriemi, které také neustále interagují s imunitním systémem a nejrůznějším způsobem ovlivňují funkce hostitelského organismu. O perzistentní infekci však mluvíme, teprve pokud bakterie osidlují místa přirozeně sterilní nebo pokud v důsledku jejich působení dochází k dlouhodobému poškození organismu. Příkladem bakterie, která perzistuje na sliznici, a to dokonce ve velmi drsném prostředí žaludku, je *Helicobacter pylori*. Nejen že se nenechává odradit kyselým pH, ale způsobuje často celoživotní infekci, projevující se chronickou gastritidou se zvýšeným rizikem vzniku žaludečních vředů a malignit, jako je gastrický adenokarcinom nebo lymfom. *Helicobacter* je vybaven specifickými adheziny (BabA, SabA), ureázou, která pomáhá udržet příznivé pH uvnitř bakterie, a dále produkuje dva toxiny – VacA (vakuolizující auto-transportér) a CagA (spolu s T4SS). CagA vyvolává zánět, který nevede k eliminaci mikroba; naopak bakterie váže protektin, uvolňovaný z poškozených buněk, a jsou důkazy, že také invaduje buňky gastrické sliznice a tráví aspoň určitou fázi života intracelulárně, skryta před imunitním systémem. Úspěšná kolonizace závisí na schopnosti vázat železo, které je v daném prostředí těžko dostupné. Jak je vidět, k úspěšné infekci je nutná souhra velkého množství faktorů virulence ze všech možných skupin.

Uropatogenní kmeny *E. coli* mají schopnost perzistovat na sliznici, přesněji řečeno ve sliznici močových cest. Invadují buňky v hlubších vrstvách přechodného epitelu, v nichž vytvářejí komunity podobné biofilmu, které mohou perzistovat po měsíce a být zdrojem rekurentních infekcí. I zde hrají zásadní role specifické adheziny, toxiny, hrající roli v internalizaci do buněk, a velké množství molekul vázajících železo. Je možné, že bakterie také nějakým způsobem ovlivňují přirozené dozrávání a odlupování epitelálních buněk.

3.6.2.2 Extracelulární perzistence

Některé notoricky známé druhy spirochet jako *Treponema* spp. nebo *Borellia* spp. perzistují zřejmě extracelulárně, ale ve vnitřním prostředí. Musí tedy čelit intenzivnímu tlaku imunitních mechanismů. Tento typ perzistence je proto založen především na různých strategiích úniku před imunitním systémem. Bakterie tvoří „molekulární mimikry“, například povrchové proteiny, které vážou fibronektin. Ten pak vytváří kolem bakterie plášť ze zdánlivě nevinné bílkoviny. Také mohou vázat faktor H a jiné inhibitory komplementu. Borrelie, které jsou původci návratných horeček a tyfů (např. *B. hermsii*, *B. crocidurae*, *B. recurrentis*), jsou schopny antigenní variace. To jim umožňuje periodické vyplavování do krve, na němž závisí jejich přenos krev sajícím hmyzem. Tzv. Vmp (variable major protein) je kódován mnohočetnými geny na lineárním plazmidu, jejichž exprese se periodicky mění díky translokaci těchto sekvencí střídavě na místo, kde dochází k expresi. Také *T. pallidum*, původce syfilidy, využívá antigenní variace a perzistuje v celé řadě tkání. Spirochety se s oblibou usazují na imunologicky privilegovaných místech, kam imunitní systém tolik nezasahuje – např. v kloubech a CNS (*B. burgdorferi*, původce lymeské boreliózy) nebo v ledvinách (leptospiry). Poškození tkání vzniká, jak se zdá, spíše důsledkem imunitní odpovědi než přímým působením bakterií. Shrňme si tedy, že základními mechanismy tohoto typu perzistence je tedy především nízká imunogenita mikrobiálního povrchu a molekulární mimikry, různá schopnost antigenní variace a skrývání se na imunologicky privilegovaných místech.

3.6.2.3 Intracelulární perzistence

Řada „tradičních“ původců perzistentních infekcí, jako je například tuberkulóza, brucelóza, salmonelové infekce s dlouhodobým nosičstvím a přirozeně také infekce obligátně intracelulárními bakteriemi (chlamydie, rickettsie aj.), využívají intracelulární prostředí. Oblíbeným cílem jsou zejména makrofágy. Perzistence v těchto případech závisí na schopnosti invadovat makrofágy a modifikovat jejich prostředí, aby poskytovalo příznivý úkryt před imunitním systémem a zároveň i výhodný dopravní prostředek. Bakterie zpravidla brání maturaci fagosomu a indukují jeho přeměnu na specifickou vakuolu, v níž přežívají (např. tzv. brucelozom nebo SCV, salmonela containing vacuole). V jiných případech unikají do cytosolu (*Rickettsia* spp.).

Perzistentní salmonelová infekce zpravidla nehrozí při gastroenteritidě; bývá následkem systémové infekce (u člověka způsobovaná zejména *S. Typhi*, *S. Typhimurium* pak často u ptáků či hlodavců). Salmonela invaduje M buňky nad Peyeroými plaky střeva a hlouběji dendritické buňky a makrofágy, které ji transportují do mezenterálních mízních uzlin a jiných orgánů (slezina, játra, kostní dřeň). Infikované makrofágy zůstávají v dané tkáni a salmonely se z tohoto rezervoáru příležitostně uvolňují a vylučují se z organismu. Infikovaný jedinec tak představuje dlouhodobý zdroj infekce. Nepříjemně se o tom přesvědčily rodiny, které zaměstnaly „Tyfovou Mary“ ve své kuchyni.

Jiný patogen mimořádného významu ve veterinární, ale i humánní medicíně, který latentně infikuje makrofágy, je *Brucella* spp. V prvním stádiu dochází k invazi makrofágů v regionálních mízních uzlinách. Brucelová infekce je dlouhodobá a charakterizuje ji střídání aktivní a latentní fáze. Aktivní infekci stimulují fyziologické změny (gravidita). V této fázi dochází k bakteriémii a množení v predilekčních orgánech. Tím je především gravidní uterus, což souvisí s koncentrací růstového faktoru erythritolu, který brucele přednostně metabolizují. Teprve tehdy je stimulován imunitní systém a tvoří se protilátky. Jakmile se objeví, brucele se opět ukrývají, a tentokrát jsou jejich oblíbenou destinací supramamární mízní uzliny – tak totiž mohou být vylučovány mlékem, což představuje značné riziko i pro člověka. Zdá se, že v obou fázích má jako faktor virulence velký význam O polysacharid. V době, kdy jsou bakterie extracelulárně, brání opsonizaci a komplementové lýze. Pouze neopsonizované bakterie se úspěšně internalizují do makrofágů a indukují vznik brucelozomu účinkem efektorů T4SS.

Přímo prototypickým příkladem pomalu postupujících perzistentních infekcí s dlouhou asymptomatickou fází jsou mykobakteriální infekce. Extrémně silná voskovitá stěna chrání mykobakteria před nepříznivými vlivy prostředí včetně nízkého pH, zároveň však ztěžuje prostup živin, což zapříčiňuje pomalý růst. Různé komponenty buněčné stěny interagují s membránou fagozomu a ovlivňují jeho funkce.

Při primární infekci *M. tuberculosis* (poslouží za modelový příklad, protože je zdaleka nejprostudovanější) dochází u drtivé většiny jedinců k úspěšnému ohraničení infekce imunitním systémem. Jen u imunokompromitovaných jedinců, např. novorozenců, hrozí diseminovaná, tzv. miliární tuberkulóza, rychlá a fatální. Imunitní systém zpravidla omezí infekci v místě primárně infikovaného orgánu (v případě lidské, ale i bovinní tuberkulózy nejčastěji plic; u prasat a ptáků spíše střevo), nedosáhne však eliminace původce a následuje fáze latence, charakteristická nepřítomností klinických příznaků, ale detekovatelnou imunitní reakcí (pozitivní tuberkulinový test). Po různě dlouhé době (měsíce až roky) dochází – zpravidla důsledkem oslabení imunitního systému – k reaktivaci infekce. Bakterie se množí a šíří do dalších tkání.

V místě primárního „střetu“, tedy interakce mykobakterií s makrofágy, jsou produkovány cytokinové signály, lákající a stimulující imunitní i jiné buňky – T a B-lymfocyty, pojivové buňky aj. Mykobakteria jsou pohlcována makrofágy (fagocytóza zprostředkovaná receptorem), brání maturaci fagozomů a fagolysozomální fúzi a indukují vznik vakuol s příznivým pH. Th-lymfocyty však produkují IFN γ , který výrazně stimuluje schopnost makrofágů likvidovat mykobakteria. Obnovuje schopnost okyselení a aktivují inducibilní NO syntázu, produkující reaktivní dusíkové intermediáty. Ani mykobakteria nejsou schopna přežít v takto aktivovaných makrofázích. Zdá se, že aktivně snižují expresi MHC-II a ovlivňují prezentaci antigenů tak, aby na infikované buňky co nejméně upozorňovaly T-lymfocyty. Zároveň je produkce různých enzymů (methioninsulfoxidreduktáza, alkylhydroperoxidreduktáza, superoxidodismutáza, kataláza) chrání před toxickými účinky produktů metabolického vzplanutí. Ne všechny bakterie jsou stejně úspěšné, a tak v granulomu nacházíme jak neaktivované makrofágy s živými mykobakteriemi, mykobakteria uvolněná extracelulárně i aktivované makrofágy s bakteriemi již usmrcenými. Ty se organizují zejména na periferii granulomu spolu s velkými mnohояadernými buňkami. Neustávající cytokinové signály přitahují do místa infekce nové imunitní a pojivové buňky, dochází k jeho opouzdření a formaci typického granulomu. Takto může být infekce držena „na uzdě“ po velmi dlouhou dobu. O tom, jak se vlastně chovají mykobakteria uvnitř

makrofágů během latentní fáze – o jejich metabolické a replikační aktivitě – se ví velmi málo. Jakékoli narušení funkce imunitního systému, např. deplece CD4-T-lymfocytů důsledkem retroviróvé infekce, vede ke snížení aktivace makrofágů, množení mykobakterií a prolomení bariéry granulomu. Zajímavé je, že v udržení integrity granulomu se zdá hrát klíčovou roli prozánětlivý cytokin TNF. Snížení jeho koncentrace je následováno rozvolněním buněk tvořících stěnu granulomu a reaktivací infekce.

Můžeme tedy shrnout, že podstatou mykobakteriální perzistence je 1) invaze makrofágů, 2) inhibice maturace fagozomu a fagolyzozomální fúze, 3) rezistence k produktům metabolického vzplanutí a 4) interference s prezentací antigenů, což vede k omezení aktivace makrofágů.

Doporučená četba:

Rhen M., Eriksson S., Clemens M., Bergstrom S., Normark S.J. The basis of persistent bacterial infections. *TRENDS in Microbiology* 11,2 (2003): 80 – 86.

Price J.V., Vance R.E.. The Macrophage Paradox. *Immunity* 41 (2014): 685 – 693.

Tufariello J.M., Chan J., Flynn J. Latent Tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet Infectious Diseases* 3 (2003): 587 – 590.

3.7 Další faktory související s virulencí

3.7.1 Regulace exprese faktorů virulence

Tvorba různých faktorů virulence, kterými je bakteriální patogen vybaven, je energeticky náročný proces. Bakterie si nemohou dovolit produkovat naráz všechny možné proteiny, které kódují, jen tak „pro všechny případy“. Určité faktory nacházejí uplatnění jen v určitém prostředí nebo v určité fázi infekce, jindy mohou být dokonce na obtíž. Proto musí jejich exprese podléhat regulačním systémům, které zajistí, že se žádoucí geny zapnou právě ve správný okamžik. Bakterie se nepohybují v prostředí jen tak naslepo. Naopak musí velice citlivě monitorovat okolní podmínky a reagovat na každou změnu. Regulační systémy jsou jakousi nervovou soustavou bakterií, která na základě vnějších impulsů chemické a fyzikální povahy (pH, teplota, dostupnost živin, koncentrace iontů či kyslíku) mění genovou expresi a tím i chování bakterie. Tak například *Yersinia* spp. vykazuje pohyblivost pouze při teplotě kolem 22°C; naopak při teplotě těla tvoří T3SS a další faktory virulence. Také při tvorbě biofilmu v určité fázi bakterie přestávají tvořit nepotřebné bičíky a produkují exopolysacharid. Různé regulační systémy vytvářejí složitě provázanou síť, takže jeden operon podléhá často vlivu více systémů a naopak jeden systém ovlivňuje řadu různých genů.

Regulační systémy můžeme členit do několika základních skupin. Jednu z nejznámějších představují tzv. **dvoukomponentové systémy**. Sestávají ze dvou složek: senzoru a regulátoru. Senzor má extracelulární doménu, která určitým způsobem vnímá podmínky vnějšího prostředí, a intracelulární doménu, která funguje jako histidinkináza, tedy enzym, který v odpověď na daný signál fosforyluje a tím aktivuje regulátor. Ten potom ovlivňuje – inhibuje nebo aktivuje – transkripci určitého genu. Dvoukomponentové systémy se často uplatňují v regulaci virulence u známých patogenů. Tak například systém **PhoP/PhoQ** blokuje tvorbu řady faktorů virulence (mimo jiné produkty) u příbuzných bakterií *Salmonella* spp. a *E. coli*, nachází-li se bakterie ve vnějším prostředí. Při vstupu do buňky aktivuje produkty potřebné pro intracelulární přežívání a naopak potlačí ty, které se uplatňují v iniciálním stádiu invaze. **GacS/GacA** *Pseudomonas aeruginosa* spouští geny zajišťující přechod z planktonní formy ve formu sesilní při tvorbě biofilmu.

Skupina transkripčního regulátoru AraC. Tento nepříliš zvučný název označuje regulační proteiny se specifickým strukturním motivem, kterým se vážou na DNA. Schopnost vazby je pravděpodobně ovlivněna teplotou. Jsou pojmenovány podle proteinu AraC *E. coli*, jenž reguluje metabolismus arabinózy. Do této skupiny patří například **LcrF** *Yersinia* spp., zajišťující expresi proteinů Yop – důležitých faktorů virulence, modifikujících funkce makrofágů – při tělesné teplotě 37°C.

Jiným proteinem, který se za určitých podmínek váže k DNA, je **Fur**, regulátor genů ovlivňujících metabolismus železa. Je-li železo přítomno v dostupné formě, Fur je schopen se vázat a blokovat genovou transkripci. Železo je důležitým růstovým faktorem, a přestože

se nejedná o faktor virulence v pravém slova smyslu, efektivní využívání tohoto prvku z prostředí je významným znakem patogenů.

Genovou transkripci ovlivňuje také **stupeň nadšroubovicového vinutí DNA**. I to se může měnit v závislosti na vnějších podmínkách, zejména teplotě. Je známo, že stupeň svinutí ovlivňuje tvorbu různých typů adhezínů a invazinů u řady patogenů.

Alternativní σ (sigma) faktory. Tzv. σ faktory se uplatňují v iniciaci genové transkripce, zajišťují vazbu RNA polymerázy k promotorům. Bakterie jsou zpravidla vybaveny řadou různých σ faktorů, jedním hlavním, který zajišťuje transkripci základních, životně důležitých genů, a několika alternativními. Ty se uplatňují v reakci na různé změny podmínek – např. teplotní stres, nedostatek železa nebo hladovění – a spouštějí expresi produktů potřebných v daných podmínkách. σ faktory jsou navíc inhibovány anti- σ faktory a dokonce jsou známy i anti-anti- σ faktory, což jen dokazuje, jak jsou regulační mechanismy bakterií mimořádně subtilní.

Quorum sensing. Ani bakterie nemohou žít každá sama pro sebe. Vytvářejí společenství, jehož činnost musí být řízena právě tak jako lidská společnost. Bakteriální buňky pracují na společném díle a asociální chování není tolerováno. Je zřejmé, že taková koordinace je závislá na velmi sofistikovaných „sdělovacích prostředcích“. Uvnitř bakteriální komunity probíhá čilá komunikace. Jazyk bakterií je založen ovšem převážně na chemických signálech. Je zajímavé, že – jak se zdá – jinou chemickou „řeč“ používají bakterie jednoho druhu mezi sebou a jiné signály se uplatňují v komunikaci s „cizinci“ – jako jistá univerzální mezidruhová řeč.

Quorum sensing (QS) je způsob, jakým se bakterie informují o hustotě populace. Jde tedy o jakési sčítání lidu. Určité geny jsou totiž zapínány teprve tehdy, když bakterie dosáhnou určitého množství. Poprvé byl tento systém popsán u mořských druhů vibrií, které po dosažení určitého množství počínají světélkovat. Principem QS je produkce chemických látek – tzv. autoinduktorů, které mohou být detekovány teprve v určité koncentraci a které ovlivňují expresi cílových genů. Pro vytvoření kritické koncentrace autoinduktoru je potřeba dostatečného množství bakteriálních buněk.

U gramnegativních bakterií se jako autoinduktory uplatňují tzv. N-acylhomoserinové laktony (AHL); grampozitivní bakterie využívají peptidy. Autoinduktory zpravidla buď aktivují cytoplasmatické receptory, které se pak vážou k promotorům a indukují/inhibují genovou transkripci, nebo vážou senzorové proteiny dvoukomponentových systémů.

QS hraje esenciální roli při formaci biofilmu, ale uplatňuje se i v regulaci virulence všeobecně. Např. je na QS založen *agr* systém *S. aureus*, ovládající několik desítek genů včetně faktorů virulence. Obecně se zdá, že aktivace *agr* vede ke snížení tvorby adhezínů a naopak spouští produkci toxinů a dalších agresivních faktorů, měnících dosud neškodného slizničního kolonizátora v invazivního patogena. Jiným známým příkladem jsou *las* a *rhl* systémy *P. aeruginosa* (pojmenované podle elastázy, respektive rhamnolipidu). Gen *lasI* kóduje enzym, který produkuje signální molekulu (AHL). Ta váže transkripční aktivátor LasR, který dimerizuje, váže se k promotoru a aktivuje expresi kýžených genů pro elastázu, ale i další faktory virulence (alkalická proteáza, superoxiddismutáza, pyocyanin, exotoxin A aj.). Systém *rhl* funguje v podstatě stejně. Porušení zmíněných systému vede k tvorbě abnormálního biofilmu.

Kromě své signalizační funkce mohou autoinduktory hrát i jiné role, například v kompetici mezi odlišnými druhy či dokonce kmeny. Tyto molekuly mohou například zároveň rušit signálů jiných druhů/kmenů. Mohou také mít přímé antibakteriální účinky. Příkladem je nisin *Lactococcus lactis* nebo subtilin *Bacillus subtilis*, které nacházejí uplatnění i v potravinářství či medicíně.

Doporučená četba

Finlay B.B., Falkow S. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61,2 (1997): 136 – 169.

Antunes L.C.M., Ferreira R.B.R., Buckner M.M.C., Finlay B.B. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156 (2010): 2271 – 2282.

3.7.2 Biofilm

S biofilmem se setkáváme běžně – ve špatně čištěném bazénku, na odkapávači nádobí nebo na rukojeti zubního kartáčku, který stál příliš dlouho ve skleničce. Bakterie se v prostředí mohou vyskytovat buď ve volné, tzv. **planktonní formě**, nebo se usazují na různých površích, obklopují se převážně polysacharidovou substancí – slizem – a výrazně mění své chování. Je známo, že tyto **sesilní formy** mají jiné vlastnosti a exprimují jiné geny než formy planktonní. Biofilm je velmi odolná struktura a má obrovský význam v přírodě i v nejrůznějších technologiích. Teprve poměrně nedávno byl ale rozpoznán jeho význam v medicíně. Extrémní rezistence některých typů infekcí k léčbě se dá vysvětlit právě tím, že bakterie rostou ve formě biofilmu, kde jsou výrazně odolnější než ve formě planktonní. Není ovšem snadné si přiznat, že bakterie nečiní rozdíly mezi myslící bytostí a kdejakým rezavým potrubím.

Biofilm tedy můžeme definovat jako bakteriální komunitu usedlou na určitém povrchu a obklopenou polysacharidovou substancí. V závislosti na vnějších okolnostech může mít různou tloušťku a druhové složení – existují biofilmy **jednodruhové**, mnohem častěji se ale setkáváme se **smíšenými**. Polysacharidy jsou zpravidla základní složkou extracelulární substance, obsahuje však i jiné látky – proteiny, lipidy, nukleové kyseliny apod. Je elastická a dodává biofilmu mechanickou odolnost. Vlivem proudění se mohou na povrchu vytvářet výběžky nebo se dokonce kusy odtrhávat – tím také lze zanést infekci na vzdálená místa v organismu. **Extracelulární polysacharidová substance** (EPS) poskytuje oporu bakteriálním buňkám, jedná se o jakési lešení, v němž se buňky usazují.

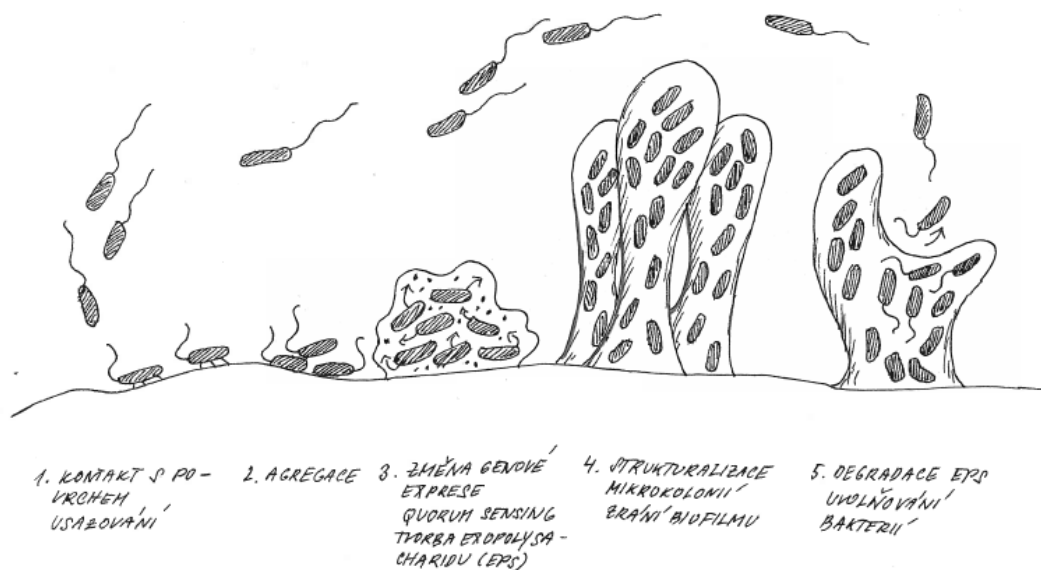
Biofilm není jednolitá, kompaktní hmota; vytváří specifickou trojrozměrnou strukturu. Základní stavební jednotkou je tzv. **mikrokolonie**, drobná bakteriální komunita obklopená EPS. Často mají tvar připomínající věž nebo houbu, rozšiřující se směrem k povrchu. Tyto bakteriální sloupce jsou odděleny systémem kanálků naplněných tekutinou, kudy jsou přiváděny potřebné živiny. Dovnitř mikrokolonie potom pronikají difúzí a drobnými póry. V různých vrstvách biofilmu se mění podmínky, směrem do hloubky

ubývá kyslíku a hromadí se zplodiny metabolismu. V hloubce silného biofilmu proto najdeme jiné bakteriální druhy, tolerující anaerobní prostředí, zatímco striktní aeroby typu pseudomonád se uplatňují blízko povrchu.

Jak se vlastně biofilm tvoří? Impuls k přechodu v sesilní formu dávají podmínky prostředí. U stafylokoků se za klíčové považuje snížená koncentrace kyslíku a železa a zvýšená osmolalita. Iniciálním krokem formace biofilmu je adheze volných bakterií na povrch. Bakterie vybavené bičíky nebo fimbriemi typu IV se nejprve pohybují v těsném kontaktu s povrchem a hledají místo vhodné k **usazení**. Když ho naleznou, usazují se napevno, při čemž nacházejí uplatnění různé typy adhezínů podle charakteru povrchu; abiotický povrch vyžaduje obvykle jiné molekuly než živá tkáň. Například u *E. coli* byla s biofilmem asociována tvorba zvláštních amyloidních kudrlinkovitých vláken – curli, které slouží k přichycování k molekulám extracelulární matrix typu fibronektinu, podobně jako adheziny typu MSCRAMM grampozitivních koků.

Jakmile se bakterie usadí, začíná se tvořit mikrokolonie. Dochází k intenzivní komunikaci bakterií a mění se genová exprese. Je inhibována produkce flagelinu a adhezínů, uplatňujících se v iniciální fázi, ale i například O polysacharidu – sníží se tak negativní náboj a tím odpudivé síly mezi buňkami. Bakteriální buňky **agregují**. U stafylokoků je hlavní molekulou zodpovědnou za agregaci buněk tzv. PIA (polysacharidový intercelulární adhezín). V následující fázi biofilm **maturuje** – nabývá své charakteristické trojrozměrné struktury mikrokolonií obklopených kanálky. Není zcela přesně známo, jakým způsobem k tomu dochází, ale pravděpodobně se uplatňují molekuly, které fungují jako surfaktanty, snižující povrchové napětí.

Bakterie v biofilmu mění výrazně svou metabolickou aktivitu, nemnoží se a energii investují do výstavby polysacharidového lešení, v němž zůstávají v podstatě uvězněny. Postupem času dochází ke změně podmínek, například vlivem nedostatku živin nebo nahromaděním toxických metabolitů, a bakterie jsou nuceny své hnízdo opustit, tj. přejít opět do planktonní formy. Uvolňují se z biofilmu pomocí různých enzymů, štěpících EPS: k tomu účelu může posloužit alginátlyáza *P. aeruginosa*, exopolysacharidlyáza *P. fluorescens*, hyaluronidáza aj.). Polysacharid nezůstane nevyužit; bakterie ho metabolizují a vezmou si zpět, co do něj vložily. Snědí si tak doslova střechu nad hlavou.



Obrázek 8 Fáze tvorby biofilmu (podle Gupta et al., 2016).

Formace biofilmu vyžaduje přesnou koordinaci. Změna planktonní formy v sesilní je podmíněna výraznou změnou genové exprese, při čemž se uplatňují různé **regulační systémy** – dvoukomponentové systémy, alternativní sigma faktory a především quorum sensing. V mnohohodnovém biofilmu také dochází k mezidruhové kompetici a rušení signálů jiných bakteriálních druhů – tím se například vysvětluje, proč v plicních infekcích zpravidla po určité době vítězí pseudomonády nad stafylokoky.

Jednou z nejvýznamnějších bakterií, která způsobuje infekce asociované s biofilmem, je *Pseudomonas aeruginosa*. Způsobuje infekce ran a močových cest, rhinitidy, otitidy, infekce očí a pneumonie – u člověka zejména ty spojené s cystickou fibrózou. V první fázi formace biofilmu se uplatňují **fimbrie typu IV**, jimi zprostředkovaná adheze a zároveň „trhavý“ pohyb. Pseudomonády syntetizují nejméně tři typy polysacharidové substance: **alginát**, která dodává koloniím mukoidní vzhled a je typický zejména pro izoláty z případů cystické fibrózy, **Psl** (polysacharide synthesis locus) a **Pel** (pelikula; uplatňuje se v biofilmu tvořeném na rozhraní vzduchu a kapaliny). Zároveň s produkcí polysacharidů se v druhé fázi formace biofilmu spouští i produkce velkého množství faktorů virulence – exotoxin A, rhamnolipid (s funkcí surfaktantu a hemolyzinu), toxiny spojené s T3SS, elastáza, alkalická proteáza a další. V regulaci tohoto procesu se uplatňují dva zmíněné systémy quorum sensing, **las** a **rhl**., alternativní sigma faktor σ^{22} , který snižuje produkci flagelinu. Dvoukomponentový systém **GacS/GacA** se uplatňuje nepřímo, prostřednictvím aktivace **las** a **rhl**.

Jako příklad grampozitivní bakterie, komplikující infekce tvorbou biofilmu, poslouží *Staphylococcus* spp. Biofilm tvoří jak koaguláza-pozitivní patogeny *S. aureus* a *S. intermedius*, tak i oportunní patogeny jako *S. epidermidis*. Také stafylokoky infikují operační rány, popáleniny a vředy, způsobují hnisavé infekce různých orgánů a jsou častými původci osteomyelitid. Stejně jako pseudomonády jsou i stafylokoky typické častou multi-rezistencí k téměř všem skupinám použitelných antibiotik, což činí případné infekce prakticky nevléčitelnými. V regulaci syntézy biofilmu a asociovaných faktorů virulence

se uplatňuje zejména quorum sensing, tzv. **agr systém**. V době, kdy je denzita populace ještě nízká, bakterie syntetizují adheziny a usazují se na površích. Se vzrůstající hustotou osídlení se spouští *agr* systém, který jejich syntézu potlačuje a naopak spouští tvorbu polysacharidu a dalších substancí uplatňujících se ve výstavbě biofilmu. Později zase řídí rozklad biofilmové substance a uvolnění bakterií.

Jaké vlastně poskytuje biofilm výhody? Je jich mnoho a uplatňují se alternativně jak ve vnějším prostředí, tak v hostitelském organismu. Polysacharidová matrix poskytuje bakteriím mechanickou ochranu a stejně jako brání přístupu bakteriofágům nebo dravým amébám, tak v organismu zadržuje protilátky, složky komplementu a fagocytující buňky. Právě bezmocná, neefektivně se vybíjející imunitní odpověď na rozhraní biofilmu je často zdrojem většího poškození tkáně než vlastní bakterie. Biofilm je podstatou mnoha úporných perzistentních infekcí. Buňky v biofilmu jsou, jak se udává, asi tisíckrát odolnější k účinkům antimikrobiálních látek než buňky volné. Tak lze vysvětlit záhadu, proč některé infekce nereagují na léčbu antibiotiky, k nimž vykazují citlivost *in vitro*. Čím je to však způsobeno? Pouhé ztížené pronikání antimikrobiálních látek do biofilmu nemůže vysvětlit takové zvýšení rezistence. Některá antibiotika se mohou vázat ke složkám exopolysacharidu a ztrácet účinnost; jiná, např. aminoglykosidy, účinkují pouze za aerobních podmínek, které v hlubších vrstvách nejsou; také změna pH a toxické metabolity je mohou inaktivovat. Pravou podstatou snížené citlivosti je ale pravděpodobně sama změna fenotypu bakterií uvnitř biofilmu. Buňky mají sníženou metabolickou aktivitu a nerostou; propustnost jejich membrány také může být snižena. Betalaktamy jsou příkladem antibiotik, které účinkují jen na množící se buňky.

Medicínský význam biofilmu byl vlastně doceněn teprve nedávno. Patogeny byly studovány *in vitro* a zapomínalo se, že bakterie v biofilmu a vůbec terénní kmeny mají zcela odlišné vlastnosti. Laboratorní kmeny, kterým po generace podstrojujeme nejvybranější živná média, totiž nemají k tvorbě biofilmu důvod a mohou tuto schopnost ztratit.

Biofilm se snadno tvoří na všech cizorodých površích – venózních a močových katetrech, různých náhradách a implantátech a také na šicím materiálu. Infekce stehů může být příčinou nezhojení **operační rány**. Pseudomonády rostou s oblibou také na kontaktních čočkách. Navíc tyto prostředky se používají především v nemocnicích, tedy v prostředí, kde hrozí infekce oslabených jedinců vysoce rezistentními kmeny – tzv. nosokomiálními infekty. Uplatňují se zde notoricky známí původci jako *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *Proteus mirabilis*, ale i méně známé oportunní patogeny jako například *Acinetobacter baumannii* nebo *Burkholderia cepacia*. Biofilm může být zdrojem **septikémie** nebo hnisavých infekcí ve vzdálených orgánech. Typickými infekcemi komplikovanými přítomností biofilmu jsou infekce **močových cest**, ale také **pneumonie**, u člověka zejména spojené s cystickou fibrózou.

Bakterie intermitentně přítomné v krevním oběhu (zdrojem bývá především dutina ústní nebo střevo a jedná se často o grampozitivní koky) se mohou zachycovat na srdečních chlopních, zejména je-li endotel porušen a odhaleny struktury, na něž se mohou vázat (fibronektin, kolagen apod.). Vzniká tak chronická **endokarditida** s tvorbou tzv. vegetací. Krevní oběh nebo trauma bývá zdrojem **osteomyelitid**. Predilekčním místem jsou metafázy

dlouhých kostí. I zde se zejména stafylokoky vážou k proteinům extracelulární matrix. Do místa migrují imunitní buňky, vzniká zánět s hromaděním hnisu, který brání přívodu krve, a dochází k devitalizaci kosti.

Příkladem biofilmu, s nímž se potýkají každodenně i jedinci jinak zdraví, je **zubní plak**. Dutina ústní poskytuje velikou variabilitu odlišného mikroprostředí, a tak se tu setkáme s fakultativními anaeroby (např. orální streptokoky), ale také velkým množstvím anaerobů. Většina přítomných bakteriálních druhů žádné poškození nezpůsobuje. Periodontální patogeny ovlivňují druhové složení biofilmu a způsobují dysbalanci ústní mikroflóry. Svými produkty poškozují pojivové tkáně a vyvolávají zánětlivou odpověď, která je potom další příčinou poškození. Rozvolnění konektivní tkáně umožňuje bakteriím pronikat hlouběji a situace se zhoršuje. Typickými periodontálními patogeny člověka jsou *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* či spirochéta *Treponema denticola*. *P. gingivalis* produkuje biofilm a tzv. gingipainy charakteru proteáz, jež degradují kolagen a další složky pojiva, stejně jako složky komplementu a receptory imunitních buněk. Slouží také k uvolnění hemu, jež bakterie váže a získává tak železo. Je zdrojem černého zbarvení zubního plaku.

Doporučená četba:

Costerton J.W. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents 11 (1999): 217 – 221.

Watnick P., Kolter R. Biofilm, City of Microbes. Journal of Bacteriology, 182 (2000): 2675 – 2679.

Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. Archives in Microbiology 198 (2016): 1 – 15.

3.8 Genetické základy virulence bakterií

Baktérie interagující s vyššími organismy včetně hospodářských zvířat se běžně označují jako komenzální, symbiotické nebo patogenní. Toto rozdělení je sice učebnicové a usnadňuje orientaci v dané problematice, ve skutečnosti ale není nic striktně dané. Trávicí trakt zdravých selata nebo kuřat je běžně osídlen *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile*, přestože jsou tyto bakterie jasným příkladem patogenů. Osídlení kůže u zcela zdravých jedinců kmeny *Staphylococcus aureus* je naprosto normální, a přesto se tato bakterie řadí mezi patogenní. Každý člověk, kráva, prase nebo kuře má ve své střevní mikroflóře *E. coli*, což jsou v naprosté většině komenzální bakterie. A přesto se najdou podskupiny vysoce virulentních *E. coli*. V některých případech lze hranici mezi virulentní a avirulentní formou daného bakteriálního druhu snadno vymezit přítomností konkrétního genu. To jsou však spíše výjimečné případy. Daleko častěji je hranice mezi patogenním a komenzálním chováním nejasná a zamlžená a k negativním projevům kolonizace (infekce) dochází až po současném výskytu několika odlišných parametrů.

3.8.1 Zdroje genetické variability, mutace a rekombinace

Genetická informace všech živých buněk a virů je uložena v nukleových kyselinách. U všech buněk schopných samostatné existence je genetická informace uložena v DNA. Nukleové kyseliny však nejsou absolutně stabilní v čase. Při replikaci dochází k chybám s frekvencí 10^{-9} . Tato frekvence říká, že při replikaci DNA připadá na 10^9 správně zařazených nukleotidů dle sekvence v komplementárním řetězci jeden chybně zařazený. Dále se odhaduje, že v každé lidské buňce dojde denně k odlomení asi 5000 purinových bazí ze struktury DNA, anebo k 100 deaminacím cytosinu, při kterých vzniká uracil. Frekvence výskytu mutací se zvyšuje i externími faktory jako je např. UV světlo, γ -záření nebo různé chemické mutageny. To vše vede ke změnám v genetické informaci. Ačkoli jsou mutace v nukleových kyselinách prezentovány často jako skutečnost škodlivá pro existenci živých buněk, nízká míra mutací je nezbytná pro zachování evoluce. Mutace v uvedených frekvencích jsou pro živé systémy přijatelné a současně nezbytné právě proto, aby se nově vzniklí jedinci podobali svým rodičům, ale aby byl zachován i prostor pro další vývoj. Např. pro vznik rezistence k fluorochinolonům u *E. coli* stačí jedna konkrétní bodová mutace v genu pro gyrázu, po které se prostorová struktura proteinu kódovaná tímto genem změní natolik, že se na něj již nemůžou fluorochinolony účinkovat. Taková varianta *E. coli* se jeví jako rezistentní k fluorochinolonům. Pokud by při multiplikaci mikroorganismů nedocházelo k mutacím v nízké frekvenci, jakýkoli výskyt fluorochinolonů by vedl k okamžité eliminaci dané populace. Protože však dochází k spontánním bodovým mutacím, i v případě výskytu fluorochinolonů dokáží některé bakterie odolat jejich účinku a zajistit přežití dané populace do budoucna. To umožňuje živým organismům i bakteriím stále se přizpůsobovat měnícímu se prostředí a postupně se adaptovat na nová

prostředí. Na stejném principu se však mohou postupně vyvíjet i nové, virulentnější, ale i méně virulentní varianty bakterií a virů.

Jakmile je v průběhu evoluce zafixována v určité populaci nová mutace (varianta genu), může se takový gen dál šířit mezi jednotlivými bakteriemi v mikrobiálních populacích procesy popsanými v odstavci níže. Pokud se DNA z donorové bakteriální buňky objeví v cytoplazmě recipientní buňky, může být procesy rekombinace natrvalo začleněna do genomu recipienta. Procesy genetické rekombinace tak vedou k dalšímu urychlení evoluce a selekce nových bakteriálních a virových klonů v průběhu evoluce.

Zdroje genetické variability
Spontánní bodové mutace
Horizontální šíření genů s následným začleněním cizorodé DNA do chromozómu recipientní bakterie rekombinací

3.8.2 Horizontální šíření genů

Přenos genů z jedné bakterie do druhé se může uskutečnit konjugací, transformací a transdukcí.

Přímý přenos DNA z jedné bakteriální buňky do druhé se nazývá **konjugace**. Tento přenos genů je podmíněn přítomností plazmidů, které kódují povrchové struktury (pili, jednotné číslo pilus), kterými se donorová bakterie přichytí k recipientní bakteriální buňce a DNA plazmidu je přenesena dutinou uvnitř pilů. Pili tak fungují jako kontaktní struktura a současně jako dutý kanálek pro přenos plazmidové DNA. Během konjugativního přenosu je přenášená DNA chráněná a nikdy neopustí intracelulární prostor.

Bakterie mohou přijímat DNA i ze svého okolí. Tento přenos genů se označuje jako **transformace**. V tomto případě bakterie zachytávají fragmenty DNA přítomné v jejich okolí, která pochází z mrtvých a degradovaných bakterií. Při transformaci je tedy DNA vystavena extracelulárnímu prostředí, ve kterém může být degradována a proto je účinnost přenosu genetického materiálu mezi bakteriemi přirozených mikrobiálních společenstev pomocí transformace relativně málo účinná.

Třetím způsobem přenosu genů mezi bakteriemi je **transdukcce**. Transdukcce je závislá na přítomnosti bakteriálních virů - bakteriofágů. Bakteriofágy infikují bakteriální buňky, které slouží pro jejich pomnožení. Množení fágů většinou vede k lyzi bakteriální buňky a uvolnění fágů do prostředí. V průběhu sestavování nových fágových částic se však výjimečně může do kapsidu vznikajícího fága chybně začlenit nikoli fágová DNA, ale DNA z lyzované bakterie. Protože adheze bakteriofága na povrch bakterií a následná injekce DNA z fágové částice do cytoplazmy bakterie je závislá jen na proteinech tvořících fágovou částici, fágová částice s bakteriální DNA původem z právě lyzované bakterie (která se nedobrovolně stala donorem DNA) může tuto DNA injikovat do recipientní bakteriální buňky. Protože injikovaná DNA je

bakteriálního původu, nespustí se infekční lytický proces pomnožení bakteriofága, ale naopak může dojít k integraci injikované bakteriální DNA do genómu recipientní bakterie rekombinací.

Horizontální šíření genů	
Konjugace	přenos plazmidové DNA z jedné bakteriální buňky
Transformace	příjem fragmentů volné DNA z prostředí
Transdukce	přenos DNA z donorové do recipientní bakterie pomocí bakteriofágů

3.8.3 Plazmidy

Plazmidy jsou obvykle malé kruhové molekuly dvouřetězcové DNA, které se replikují nezávisle na chromozómu a kódují funkce pro bakteriální buňku postradatelné. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 1 500 až 200 000 bp. Plazmidy se velmi často spojují s šířením rezistencí na antibiotika. Plazmidy však u mnoha bakterií, např. u enterotoxigenních *E. coli* nebo salmonel, kódují i vlastnosti přímo spojené s virulencí. V případě *E. coli* plazmidy kódují geny pro termolabilní (LT) nebo termostabilní (STa, STb) enterotoxiny a fimbrie (např. K88). U salmonel náležících k sérovarům Enteritidis nebo Typhimurium plazmidy přenášejí geny zvyšující virulenci těchto serovarů (*spv* geny, Salmonella plasmid virulence) nebo rezistenci k účinku komplementu v séru hostitele (gen *rck*, resistance to complement killing).

3.8.4 Transpozóny

Transpozóny jsou sekvence nukleových kyselin schopné přemístění z jednoho místa v genómu na jiné. K tomuto přemístění, transpozici, jsou nezbytné dva faktory:

- i) enzym, který tuto transpozici katalyzuje (transpozáza)
- ii) krátké sekvence na obou koncích transpozónu, které jsou rozpoznávány transpozázou a které definují oba konce transpozónu.

Nejjednodušší transpozóny, které mají pouze tuto základní strukturu, se nazývají inzerční elementy (IS elements). Velmi často se však mezi repeticemi vymezujícími konce transpozónu vyskytují i jiné geny než gen pro transpozázu. Často je pozorováno, že součástí transpozónů jsou geny pro rezistence k antibiotikům. Transpozón Tn3 např. přenáší rezistenci k ampicilínu, Tn5 rezistenci ke kanamycinu a Tn10 rezistenci k tetracyklinu. Ačkoli některé transpozóny mají preferenci k integraci do určitého místa v genómu, pro většinu transpozónů platí, že jejich inserce je víceméně náhodná. Po inserci do nového místa vzniká nová kombinace sekvencí. Inserce transpozónu do funkčního genu většinou vede k inaktivaci jeho funkce. V některých případech však náhodně může po začlenění transpozónu do nového místa dojít ke vzniku sekvence, která dává smysl a umožňuje expresi nového proteinu, který může ovlivnit chování dané bakterie.

Transpozóny mohou měnit svým vlastním přičiněním svou lokalizaci uvnitř bakteriální buňky, nejsou však schopny samostatného přenosu z jedné bakterie do druhé. Transpozóny se mohou přenést z jedné bakteriální buňky do druhé např. transdukci. Častější způsob přenosu transpozónu z jedné bakteriální buňky do druhé je ovšem pomocí konjugativních plazmidů. Protože přesunování transpozónu je opravdu náhodné, mohou se začlenit i do konjugativního plazmidu. V tu chvíli se transpozón stává součástí konjugativního plazmidu, kterým se může přenést do recipientní buňky konjugací. Po ukončení konjugativního přenosu může dojít k excizi transpozónu z plazmidu a k jeho integraci do chromozómu recipientní buňky.

3.8.5 Integrony

Integrony samy o sobě nejsou mobilní sekvence DNA a nemohou se tedy přemísťovat v genómu nebo se přenášet do potenciální recipientní buňky. Integron však může měnit svou vlastní strukturu přijímáním či ztrácením genů a ovlivňovat tak chování bakteriální buňky, ve které se vyskytuje. Nejznámější integrony třídy I obsahují gen pro integrázu *intI*, místo připojení (attachment site, *attI*) a gen kódující rezistenci k sulfonamidům. Mezi gen pro integrázu a gen pro rezistenci k sulfonamidům se za katalytické účasti integrázy mohou vkládat další geny a struktura integronu tak může postupně narůstat. Do stejného integronu může být postupně vloženo několik různých genů bez vzájemného ovlivnění. Integrony se tedy liší velikostí, počtem a pořadím vložených genových kazet. Velmi často se jako součást integronů vyskytují geny pro rezistence k antibiotikům a např. u *Salmonella* Typhimurium byly detekovány integrony, které obsahovaly pouze gen *aadA2* nebo integrony, u nichž byl za gen *aadA2* integrován ještě gen *bla_{OXA}*. Obecně však se o integronů mohou začleňovat libovolné geny včetně takových, které ovlivňují virulenci.

3.8.6 Bakteriofágy

Bakteriofágy byly původně popisovány jako infekční částice lyzující bakterie (odtud i jejich název bakterio – fágie, ten, co se živí bakteriemi). Některé bakteriofágy však dokáží přepínat mezi dvěma stavy – **lytickým cyklem**, kdy dochází k pomnožení fága a destrukci bakteriální buňky, a **lyzogením cyklem**, při kterém se bakteriofág začlení do chromozómu infikované bakterie a potlačí veškeré své lytické funkce. Integrovaný bakteriofág se označuje jako profág a při dělení bakterie zůstává ve všech dceřiných buňkách zintegrován do chromozómu a šíří se dál spolu s množící se bakterií. Ve stresových situacích se mohou jeho lytické funkce aktivovat a např. než bakteriální buňka zhyne po ozáření UV světlem, dokáže se

v lytickém cyklu pomnožit a vytvořit novou populaci fágových částic. Integrované profágy přitom poskytují infikovaným buňkám ochranu před superinfekcí tímtož fágem např. expresí jednoho ze svých genů, který modifikuje bakteriální protein, který je receptorem pro daného fága. Externí bakteriofágové částice stejného typu se tak nemohou vázat na receptorový protein a nemohou infikovat a degradovat bakterii s integrovaným profágem. Některé bakteriofágy

schopné integrace však dokáží ovlivnit i virulenci své hostitelské buňky, zvýšit tak jejich fitness po infekci hostitele a zvýšit tak pravděpodobnost úspěšné infekce a pomnožení patogenní bakterie a s ní i integrovaného profága. Některé bakteriofágy *Salmonella enterica* kódují *sopE* gen, jehož produkt usnadňuje salmonelám invazi do epiteliálních buněk. Integrované profágy běžně kódují toxiny, kterými bezprostředně zvyšují virulenci svých hostitelských bakteriálních buněk. Mezi toxiny kódované integrovanými profágy patří *stx1* a *stx2* verotoxiny *E. coli*, pertussis toxin *Bordetella pertussis*, botulotoxin *Clostridium botulinum*, diftera toxin *Corynebacterium diphtheriae*, exfoliativní toxin *Staphylococcus aureus*, pyrogenní exotoxin *Streptococcus pyogenes* nebo cholera toxin *Vibrio cholerae*. Bakteriofágy tak mimo šíření genů napříč bakteriálními populace transdukcí mohou šířit i zcela konkrétní jednotlivé geny okamžitě zvyšující virulenci infikované bakteriální buňky.

Bakteriofágy ovlivňující virulenci bakterií po integraci do jejich chromozomu	
Bakteriofág <i>Salmonella enterica</i>	<i>sopE</i> gen usnadňující salmonelám invazi do epiteliálních buněk
<i>E. coli</i>	<i>stx1</i> a <i>stx2</i> verotoxiny
<i>Bordetella pertussis</i>	Pertussis toxin
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulotoxin
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diftera toxin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Exfoliativní toxin
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Pyrogenní exotoxin
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera toxin

3.8.7 Ostrovy patogenity

Specifickým příkladem DNA, která se do genómu určité bakterie dostala relativně nedávno v průběhu evoluce, jsou ostrovy patogenity (pathogenicity islands). Jedná se o sestavu více než jednoho genů, které výrazným způsobem zvyšují virulenci dané bakterie. Tyto bloky genů se dají identifikovat porovnáním genomů blízkce příbuzných bakterií. U avirulentní formy celá skupina genů chybí, zatímco u virulentních forem jsou tyto geny vloženy vždy do stejného místa v chromozómu. Ostrovy patogenity byly popsány u patogenních *E. coli*, různých serovarů *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* nebo *Vibrio cholerae* (vše gramnegativní bakterie). Ostrovy patogenity se vyskytují i u grampozitivních bakterií jako je *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* nebo *Clostridium difficile*.

V genomu konkrétní bakterie se může vyskytovat i více různých ostrovů patogenity. Běžně cirkulující kmeny *Salmonella Enteritidis* obsahují 5 různých ostrovů patogenity označo-

vané jako SPI1-5, **Salmonella Pathogenicity Island**. Nejmenší z nich, SPI5 se sestává z pouhých 5 genů, dva největší SPI1 a SPI2 se každý sestávají ze 40 různých genů. Geny lokalizované na SPI1 umožňují salmonelám invazi do epitelálních buněk střevního epitelu, kde jsou salmonely chráněny před aktivitou leukocytů a celého imunitního systému. Po intracelulární lokalizaci salmonely snižuje aktivitu genů lokalizovaných na ostrově patogenity SPI1 a místo toho zvýší expresi genů lokalizovaných na ostrově patogenity SPI2. Tyto geny, správně jimi kódované proteiny, pak tlumí imunitní reakce hostitelských buněk a umožňují salmonelám relativně dlouho přežít uvnitř infikovaných buněk jako intracelulární patogen.

Nejběžnější ostrovy patogenity u <i>Salmonella enterica</i> a jejich hlavní funkce	
SPI1	invaze do epitelálních buněk
SPI2	intracelulární přežívání salmonel
SPI3	intracelulární přežívání salmonel
SPI4	adheze k buňkám střevního epitelu
SPI5	invaze do epitelálních buněk