

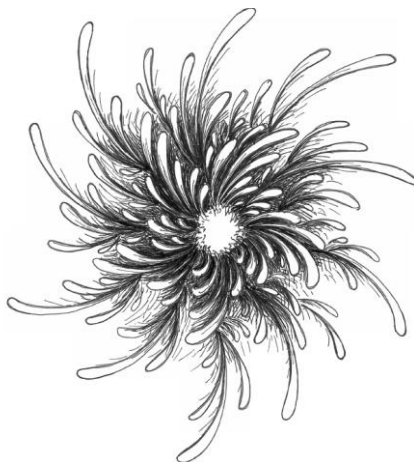
VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

VYBRANÉ KAPITOLY Z VETERINÁRNÍ
BAKTERIOLOGIE III

Grampozitivní bakterie



MVDr. Aneta Papoušková

MVDr. Martina Masaříková, PhD.

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

BRNO 2021

Tato skripta byla vytvořena s finanční podporou IVA VETUNI Brno.

Obsah

1. Anaerobní a fakultativně anaerobní koryneformní aktinomycety	5
1.1 Čeleď Actinomycetaceae	5
1.1.2 Rod <i>Actinobaculum</i>	7
1.1.3 Rod <i>Trueperella</i>	7
1.2 Čeleď Corynebacteriaceae	10
1.2.1 Rod <i>Corynebacterium</i>	10
1.3 Čeleď Propionibacteriaceae	13
2. Aerobní aktinomycety	14
2.1 Čeleď Nocardiaceae	14
2.1.1 Rod <i>Nocardia</i>	14
2.1.2 Rod <i>Rhodococcus</i> spp.	15
2.2 Čeleď Dermatophilaceae	18
2.2.1 Rod <i>Dermatophilus</i>	18
2.2.3 Rod <i>Streptomyces</i>	20
2.3 Rod <i>Mycobacterium</i>	21
2.3.1 Klasifikace	21
2.3.2 Výskyt	22
2.3.3 Klinické onemocnění	23
2.3.4 Patogeneze	27
2.3.5 Diagnostika	31
2.3.6 Terapie a profylaxe	35
3. Grampozitivní koky	38
3.1 Čeleď Micrococcaceae	38
3.2 Čeleď Staphylococcaceae	40
3.2.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	40
3.3 Čeleď Streptococcaceae	49
3.3.1 Rod <i>Streptococcus</i>	49
3.4 Čeleď Enterococcaceae a další grampozitivní kataláza-negativní bakterie	58
3.4.1 Rod <i>Enterococcus</i>	58
3.4.2 Rod <i>Melissococcus</i>	60
3.4.3 Rod <i>Lactococcus</i>	61
3.4.4 Další grampozitivní, kataláza-negativní koky	62
4. Pravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky	65
4.1 Čeleď Erysipelotrichaceae	65
4.1.1 Rod <i>Erysipelothrix</i>	65
4.2 Čeleď Listeriaceae	68

4.2.1 Rod <i>Listeria</i>	68
5. Aerobní sporulující tyčinky.....	72
5.1 Čeleď Bacillaceae a Paenibacillaceae	73
5.1.1 <i>Bacillus anthracis</i>	73
5.1.2 <i>B. cereus</i> a další oportunní druhy	77
5.1.3 Rod <i>Paenibacillus</i>	78
6. Anaerobní sporulující tyčinky	81
6.1 Čeleď Clostridiaceae a rod <i>Clostridium</i>	81
6.1.1 Obvyklý výskyt	82
6.1.2 Odběr vzorků a kultivační nároky	82
6.1.3 Identifikace klostridií	83
6.1.2 Neurotoxická klostridia	83
6.1.3 Klinické stavy způsobené histotoxickými klostridii.....	88
6.1.4 Enteropatogenní a enterotoxemii vyvolávající klostridie – <i>C. perfringens</i>	92
6.1.5 Další enteropatogenní klostridia.....	96
7. Bakterie mléčného kvašení.....	98
7.1 Výskyt	98
7.2 Významní zástupci LAB	99
7.2.1 Rod <i>Bifidobacterium</i>	99
7.2.2 Rod <i>Carnobacterium</i>	100
7.2.3 Rod <i>Enterococcus</i>	100
7.2.4 Rod <i>Lactobacillus</i>	100
7.2.5 Rod <i>Lactococcus</i> (mléčné streptokoky)	102
7.2.6 Rod <i>Pediococcus</i>	102
7.2.7 Rody <i>Leuconostoc</i> , <i>Weissella</i>	103
7.2.8 Rod <i>Streptococcus</i> (mléčné streptokoky).....	103
7.3 Laboratorní diagnostika LAB.....	103

1. Anaerobní a fakultativně anaerobní koryneformní aktinomyce

Grampozitivní bakterie tvoří dva hlavní kmene: kmen Actinobacteria a kmen Firmicutes. Kmen Actinobacteria se vyznačuje vysokým obsahem G+C bází v DNA. Bakterie z tohoto kmene se často nazývají aktinomyce a mnohé z nich mají vlastnosti svým způsobem blízké plísním; obvykle se jedná o nepravidelné, pleomorfní tyčinky nebo vláknité bakterie. Z několika tříd příslušících tomuto kmenu má pro nás význam pouze stejnojmenná třída Actinobacteria, zahrnující významné řády Propionibacteriales, Micrococcales, Corynebacteriales, Bifidobacteriales a Actinomycetales.

1.1 Čeleď Actinomycetaceae

Čeleď Actinomycetaceae z kmene a třídy Actinobacteria, řádu Actinomycetales a podřádu Actinomycinae zahrnuje veterinárně významné rody *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Actinobaculum* a *Trueperella*. Jedná se o anaerobní nebo fakultativně anaerobní nepohyblivé nesporulující grampozitivní tyčinky; jsou pleomorfní, mohou nabývat difteroidních, větvených až vláknitých forem. Tvoří součást běžné mikroflóry sliznic dutiny ústní, GIT, urogenitálního traktu a kůže, jimi způsobované infekce mají obvykle endogenní původ a jsou spojeny s tvorbou hnisavých až granulomatózních zánětlivých ložisek.

1.1.1 Rod *Actinomyces*

Bakterie rodu *Actinomyces* jsou morfologií i klinickým významem blízké rodu *Nocardia*, ale na rozdíl od nich jsou **fakultativně** nebo dokonce **obligátně anaerobní**. Jednotlivé buňky mají vzhled difteroidních nebo větvených tyčinek, uspořádaných v párech či trojicích jak písmena V nebo Y, v koloniích však tvoří zmeť vláken připomínající mycelia hub. Jejich výskyt je ubikvitární; najdeme je v půdě i jako **komenzální mikroflóru** sliznic. Jedná se o oportunní patogeny, které způsobují infekce často polymikrobiálního charakteru po průniku do privilegovaných, přirozeně sterilních míst např. v důsledku traumatu: infekce urogenitálního traktu po fekální kontaminaci, intraabdominální infekce po perforaci operačních ran a nejčastěji záněty tkání hlavy a krku po traumatech sliznice dutiny ústní, včetně postižení kostní tkáně a zubních lůžek (odontogenní abscesy).

Většina druhů aktinomycet nemá striktní hostitelskou specifitu. U člověka patří k nejčastěji izolovaným druhům *A. israelii*, *A. viscosus*, *A. turicensis*, *A. gerencseriae* aj. U skotu se setkáváme s *A. bovis*, u prasat nejčastěji s *A. suis* (*A. denticolens*). Z infekcí psů a koček bývají izolovány *A. viscosus* a *A. hordeovulneris*. Faciální abscesy králíků a hlodavců způsobují opět *A. israelii* a *A. viscosus*. K dalším běžným druhům patří *A. naeslundii*, *A. canis*, *A. meyeri*, *A. johnsonii*, *A. nasicola*, *A. ruminicola*, *A. odontolyticus* aj.

1.1.1.1 Patogenita

Aktinomykóza je **pyogranulomatózní zánět měkkých i tvrdých tkání**, při němž se tvoří abscesy a léze naplněné hnisem. Typická je přítomnost tzv. sírových granul v hnisu; při mikroskopickém vyšetření tyto žlutavé částice obsahují tzv. rozety neboli drúzy, rozetovitě uspořádané agregáty kyjovitých nebo větvených tyčinek obklopených polymorfonukleáry. Předpokladem vzniku infekce je trauma kůže nebo sliznice a průnik bakterií do hlubších tkání.

U člověka rozeznáváme orocervikofaciální, thorakální a abdominopelvicou formu aktinomykózy. Podobné schéma můžeme v podstatě aplikovat i u psů a koček a dalších druhů. **Orocervikofaciální forma** vzniká při průniku infekce sliznicemi dutiny ústní nebo hltanu, často v souvislosti se zubními problémy nebo průnikem cizího tělesa. Podobně **thorakální forma**, projevující se vznikem pyothoraxu nebo abscesů v plicích a hrudní stěně, může vzniknout traumatem hrudní stěny (rány po kousnutí, průnik cizího tělesa, např. osiny), ale také v důsledku aspirace orofaryngeálních sekretů, nebo může mít hematogenní původ. **Abdominopelvicá forma** vzniká při poškození orgánů dutiny břišní a pánevní (obv. chirurgické zákroky). Infekce se z primárních míst může šířit krví ve formě infekčních abscesů do sekundárních ložisek se vznikem endokarditidy, septické artritidy, jater, sleziny a dalších vnitřních orgánů. Vzácným, ale závažným důsledkem může být meningoencefalitida.

Další běžnou formou jsou kožní infekce s tvorbou podkožních abscesů opět po různých traumatech (kousnutí, průnik osiny). U koní zánět krčních mízních uzlin může imitovat hřiběci.

U prasnic se setkáváme s **aktinomykózou mléčné žlázy**, která vzniká v důsledku traumatizace struků sajícími selaty.

Specifickou podobu má **aktinomykóza skotu**. Souvisí nejčastěji s traumatizací orofaryngeální sliznice ostrými stébly, hřebíkem nebo jiným ostrým tělesem. Dochází k zánětu přilehlých měkkých tkání a kosti, především mandibuly. Osteomyelitida se projevuje odbouráváním normální kostní tkáně, která je nahrazována houbovitou, porézni strukturou vláknité kosti s kanálky vyplněnými hnisem. Čelist se výrazně deformuje. Postupně může dojít k fistulaci na povrch nebo dovnitř do dutiny ústní nebo hltanu. Stav je spojen s potížemi s příjmem potravy a dýcháním. Podobným způsobem probíhá i orocervikofaryngeální infekce člověka.

1.1.1.2 Patogeneze

Přítomnost bakterií v podkoží nebo orgánech vyvolává hnisavý zánět s přílivem neutrofilů. Důsledkem zánětu dochází k přestavbě tkáně a tvorbě abscesů. Shluky bakterií obklopené neutrofilů tvoří „sírová granula“ přítomná v hnisu, což je velmi specifickým znakem aktinomykózy (s něčím podobným se setkáváme i při aktinobacilóze skotu, jejímž původcem je *Actinobacillus lignieresii*; při níž však zpravidla nedochází k osteomyelitidě, zánět se omezuje na měkké tkáně).

O bakteriálních produktech podílejících se na vzniku onemocnění se ví poměrně málo. Patří k nim fimbrie typu 1, uplatňující se jako kolonizační faktory. V dutině ústní aktinomycety rostou ve formě biofilmu a tvoří součást zubního plaku. Produkce ureázy umožňuje udržení neutrálního pH. *Actinomyces* spp. není acidorezistentní a jejich buněčná stěna neobsahuje mykolové kyseliny, jiné složky buněčné stěny však zřejmě ovlivňují interakci s buňkami imunitního systému, vedoucí k specifické zánětlivé odpovědi.

1.1.1.3 Diagnostika

Aktinomycety hledáme v exsudátech či aspirátech ze suspektních lézí; jsou vhodnější než stěry. Mikroskopie „sírových granul“ může odhalit rozetovité struktury bakteriálních tyčinek a filament. Barvit můžeme dle Grama či Ziehl-Neelsenem (negativní). Kultivace probíhá v **anaerobních podmínkách**; většina aktinomycet je aerotolerantní, ale roste lépe při 10 % CO₂. Na krevním agaru pozorujeme po 48 hodinách **nehemolytické kolonie** s hladkou nebo hrubou konzistencí, které mají tendenci pevně lnout k médiu. **Katalázová zkouška je negativní**. K identifikaci lze použít biochemické testy určené pro anaerobní bakterie nebo hmotnostní spektrometrii.

1.1.1.4 Terapie

Aplikace antimikrobiálních látek, jako jsou peniciliny, makrolidy nebo doxycyklin, má význam jako podpůrná terapie při chirurgickém ošetření, zahrnujícím odstranění cizích těles, vyčištění a drénování rány. Podávání by mělo být dostatečně dlouhé, relapsy jsou totiž časté.

1.1.2 Rod *Actinobaculum*

Bakterie jsou štíhlé, pleomorfní striktně anaerobní nepohyblivé tyčinky, které tvoří součást mikroflóry urogenitálního traktu některých živočichů. *A. suis* (dříve *Eubacterium*) způsobuje **cystitidy a pyelonefritidy prasnic** často v období po porodu. Někdy je též asociováno s aborty. K predispozičním faktorům onemocnění patří hormonální nerovnováha (zvýšená hladina estrogenů), trauma porodních cest, stres a jiné oslabující faktory. Akutní zánět se projevuje horečkou a celkovými příznaky, moč bývá zakalená, s obsahem krve. Infekce může vést k renálnímu selhání. Kanci jsou často přenašeči, s bakteriemi asymptomaticky kolonizujícími předkožku.

K potvrzení diagnózy na základě kliniky provádíme **anaerobní kultivaci moči** (středního proudu). Po 48 hodinách pozorujeme nehemolytické kolonie s vyvýšeným lesklým středem a matným okrajem (jako sázené vejce). Organismus produkuje **ureázu** (zvýšené pH je předpokladem úspěšné kolonizace močových cest), fermentuje maltózu, ale ve většině dalších biochemických zkoušek nereaguje.

Lze se pokusit o léčbu peniciliny, cefalosporiny, makrolidy či doxycyklinem, ale většinou se k ní nepřístupuje, bývá málokdy úspěšná.

U člověka jsou popsány oportunní urogenitální patogeny *Actinobaculum* (dnes *Actinotignum*) *schaalii* a *A. massilense*, izolované v případech rekurentních cystitid, pyelonefritid a bakteriemií zejména u starších žen. Jejich význam je vzhledem k obtížnější kultivaci (anaerobní podmínky) pravděpodobně značně podceněn.

1.1.3 Rod *Trueperella*

Bakterie rodu *Trueperella* s nejvýznamnějším zástupcem *T. pyogenes* byly vyčleněny z rodu *Arcanobacterium*. Jsou to nepohyblivé pleomorfní grampozitivní kokobacily až krátké difteroidní tyčinky. Fermentují glukózu, rostou lépe při vyšší koncentraci CO₂ a katalázu neprodukují. Jsou fakultativně anaerobní, často je však najdeme ve smíšených infekcích s obligátními gramnegativními anaeroby, jako je např. *Fusobacterium* a *Prevotella*, ale izolovány bývají i klostridia či stafylokoky. *Trueperella* a *Arcanobacterium* spp. se vyskytují na sliznicích a podílí se na hnisavých infekcích různých tkání. *T. pyogenes* je nejvýznamnějším veterinárním patogenem, izolovaným zejména z hospodářských zvířat. *T. bernardiae* a *A. haemolyticum* jsou asociovány hlavně s člověkem (faryngitidy dětí, abscesy měkkých tkání, bakteriémie a endokarditidy).

1.1.3.1 Patogenita

T. pyogenes se podílí na všech možných **hnisavých infekcích**, vznikajících obvykle po průniku traumatizovanou kůží nebo sliznicí. Infekce se může šířit krví (pyémie) se vznikem sekundárních hnisavých ložisek. V postižených orgánech (kůže, mléčná žláza, plíce, játra, ledviny, děloha, varlata, klouby a kosti) se tvoří opouzdřené abscesy nebo empyémy.

U skotu patří k nejčastějším manifestacím mastitida, **endometritida** (s možným abortem) a **abscesy jater**. Zde bývá primárním etiologickým agens často *Fusobacterium necrophorum* a onemocnění bývá podmíněno nevhodnou dietou s vysokým podílem jádra, vedoucí k bachorové acidóze, ulceraci bachorové sliznice a průniku bakterií portálním oběhem do jater. Synergie těchto dvou patogenů se uplatňuje i u jiných infekcí.

Infekce mléčné žlázy *Trueperella* spp. bývá označována jako „**letní mastitida**“, protože se často objevuje u krav na pastvě nebo zasušených dojníc, což možná souvisí s výskytem hmyzu, který infekci přenáší. Infekce vzniká poraněním struků a mléčné žlázy, ale může také pocházet z dělohy. Má podobu závažné parenchymatózní mastitidy s výrazným otokem postižené čtvrti, mléku nepodobným páchnoucím sekretem a celkovými příznaky. Infekce se může rozšířit na klouby a často také vede k předčasnému porodu slabého telete nebo abortu.

Také u prasnic se setkáváme krátce po porodu se **septickou artritidou**, jež je pravděpodobně děložního původu.

1.1.3.2 Patogeneze

Virulence *T. pyogenes* je především spjata s produkcí toxinů a enzymů poškozující buňky a molekuly extracelulární matrix. **Adhezivní proteiny** skupiny MSCRAMM, zprostředkující vazbu k molekulám extracelulární matrix, jako je fibrinogen, fibronectin, elastin a kolagen, umožňují kolonizaci a perzistenci v tkáních. Příkladem je CbpA. Navíc *T. pyogenes* tvoří i fimbrie, což je u grampozitivních bakterií spíše raritou. Hlavním faktorem virulence je **pyolysin O (PLO)**, póry tvořící cholesterol-dependentní cytolyzin s hemolytickými, dermonekrotickými a letálními účinky, který se zásadním způsobem podílí na modulaci imunitní odpovědi a obraně vůči fagocytóze, což vede k akumulaci polymorfonukleárů a makrofágů v místě zánětu a masivnímu hnisavému procesu. Dále bakterie produkuje neuraminidázu, serinové proteázy (želatináza, kaseináza) a DNázu. Tyto enzymy by mohly hrát roli kolonizačních a invazivních faktorů a pomáhat zajišťovat přísun živin, uplatňují se při formaci biofilmu.

1.1.3.3 Diagnostika

Materiál z hnisavých lézí vyšetřujeme mikroskopicky na přítomnost baculatých grampozitivních tyčinek jednotlivě nebo v drobných shlucích a kultivujeme na krevním agaru nejlépe při 5 % CO₂. Kolonie jsou drobné, obklopené úzkou, ale ostrou **zónou hemolýzy** (produkce PLO). Rozlišujícím druhovým biochemickým znakem je fermentace xylózy a produkce β-glukuronidázy. Z mutitestů lze použít např. systém API Coryne. *T. pyogenes* nereaguje v žádné modifikaci CAMP-testu, na rozdíl od *A. haemolyticum*, které produkuje fosfolipázu D a tvoří reverzní CAMP reakci s *S. aureus*.

1.1.3.4 Terapie

Pro léčbu infekcí *T. pyogenes* je vhodné použití betalaktamových antibiotik, tetracyklinů, makrolidů nebo rifampicinu lokálně nebo systémově. Účinnost však může být snížena obtížným pronikáním antibiotik do místa zánětu, hnisavé a nekrotické léze musí být ošetřeny chirurgicky.

1.2 Čeleď Corynebacteriaceae

1.2.1 Rod *Corynebacterium*

Bakterie rodu *Corynebacterium* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní grampozitivní nespo-
rulující tyčinky typického **kyjovitého neboli „difteroidního“ tvaru**, podle něž dostaly své jméno (co-
ryne = ř. kyj). Do skupiny „koryneformních“ bakterií se volně řadí i další nepravidelné grampozitivní
tyčinky, které mohou nabývat podobného tvaru, např. *Trueperella*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*,
Propionibacterium nebo *Bifidobacterium*. *Corynebacterium* spp. patří do čeledi Corynebacteriaceae,
řádu Corynebacteriales z třídy a kmene Actinobacteria, jednoho z dominantních kmenů G⁺ bakterií
s vysokým podílem G+C bází.

Buněčná stěna korynebakterií, podobně jako u příbuzných čeledí Mycobacteriaceae a Nocardia-
ceae, se vyznačuje určitou mírou acididorezistence díky obsahu diaminoepimelové kyseliny a myko-
lových kyselin s kratšími řetězci (C22 – 36). Výjimku tvoří *C. amycolatum*. Jsou **nepohyblivé, pozitivní
v katalázové** a obvykle negativní v oxidázové zkoušce. Rod obsahuje fermentativní, oxidativní i bio-
chemicky nereaktivní druhy. Typické **baculaté, na konci kyjovité ztlustělé tyčinky** se uspořádávají do
párů, do tvaru písmene V nebo do krátkých **nepravidelných palisád**, popisovaných jako „čínská pís-
mena“. Tvoří kolonie husté, krémovité či sýrovité konzistence.

Přirozeným habitatem korynebakterií jsou sliznice (dutina ústní, nosohltan, zvukovod) a kůže
člověka i zvířat, vyskytují se i v prostředí. Některé nepatogenní druhy (*C. glutamicum*) našly využití
v potravinářství při zrání sýrů nebo jako zdroj glutamátu např. při výrobě sójové omáčky. Jiné patří
k významným oportunním nebo dokonce primárním patogenům člověka a zvířat.

1.2.1.1 Patogenita

Řada komenzálních druhů korynebakterií může způsobovat u svých hostitelů příležitostné in-
fekce. *C. amycolatum* je běžnýmobyvatelem kůže člověka a může oportunně způsobovat bakteriémie a
septické artritidy, *C. bovis* nacházíme na sliznici strukových kanálků vemene skotu. Oba druhy jsou
asociovány s mastitidou skotu a snadno se přenášejí například dojícím zařízením. *C. auriscanis* je často
izolováno při otitis externa psů. *C. kutscheri* obývá sliznice horních cest dýchacích a dutiny ústní labo-
ratorních hlodavců, jako jsou potkani, myši a křečci. U oslabených jedinců způsobuje dýchací a systé-
mové infekce, „pseudotuberkulózu“, se vznikem kaseózních a nekrotických uzlíků v plicích, játrech,
ledvinách, kloubech nebo kůži.

Skupina *C. renale* sestává ze tří druhů asociovaných s **infekcemi močového traktu skotu**, jako
je cystitida a pyelonefritida. Nejběžnější z nich je *C. renale*. *C. cystitidis* způsobuje často závažné he-
moragické cystitidy, spojené s ulcerací močového měchýře a progredující v pyelonefritidy. Naopak *C.*
pilosum způsobuje spíše mírné, nekomplikované infekce. Všechny tři druhy se vyskytují v dolních čás-
tech urogenitálního traktu jako komenzálové. Vznik onemocnění závisí na virulenci kmene a predispo-
zičních faktorech, umožňujících kolonizovat hlubší tkáň. U člověka způsobují urogenitální infekce
např. druhy *C. urealyticum* a *C. glucurolyticum*.

Největší význam ve veterinární medicíně *C. pseudotuberculosis*, fakultativně intracelulární pa-
togen primárně malých přežvýkavců. Pseudotuberkulózu neboli **kaseózní lymfadenitidu** charakterizuje
chronický pyogranulomatózní zánět superficiálních nebo hlubokých mizních uzlin. Přestože hlavní eko-
nomický význam má toto onemocnění ve velkých chovech ovcí, *C. pseudotuberculosis* se vyskytuje ve
dvou biotypech: první se zaměřuje na malé přežvýkavce, u nichž způsobuje výše popsanou kaseózní

lymfadenitidu. Druhý biotyp se odlišuje schopností redukovat nitráty a je asociován spíše s infekcemi skotu a koní, povrchovými i hlubokými abscesy a mastitidou. Specifickou manifestací zejména u koní je tzv. **ulcerativní lymfangitida**, projevující se ulceracemi, abscesy a otoky distálních částí končetin. K infekci dochází zpravidla důsledkem kožních oděrek a jiných traumat (například při stříži ovcí). Může však dojít i k inhalaci aerosolů a primární infekci plic. Zdrojem jsou nakažená zvířata a jimi kontaminované prostředí, šíření napomáhá i hmyz.

U člověka je nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu *C. diphtheriae*, původce **záškrtu**, známý produkcí tzv. difterického toxinu. Tento toxin je kódován bakteriofágem a vyskytuje se i u některých kmenů *C. ulcerans*. Naopak některé kmeny *C. diphtheriae* žádný toxin netvoří. Záškrt je nebezpečné onemocnění zejména dětí; vzniká při infekci horních cest dýchacích toxinogenním kmenem bakterie. Dochází k nekróze, edému a vzniku fibrinózních pseudomembrán pevně lpících na sliznici nosohltanu, jejichž vlivem může dojít až k obstrukci dýchacích cest a dušení. Kromě toho systémově vstřebaný toxin poškozuje myokard, játra a ledviny a ovlivňuje funkci periferních nervů. Jinou formou je kožní difterie se vznikem ulcerativních lézí. Tato forma je spojena se systémovým postižením méně často. Netoxinogenní kmeny způsobují méně závažná onemocnění, podobně jako jiné druhy korynebakterií: infekce ran, endokarditidy a jiné oportunní infekce. *C. ulcerans* může být izolováno z bovinních mastitid.

1.2.1.2 Patogeneze

Patogenita a virulence se liší nejen mezi jednotlivými druhy korynebakterií, ale i mezi kmeny v rámci jednoho druhu. Méně virulentní druhy/kmeny mají tendenci způsobovat spíše lokální infekce, se systémovým šířením pouze v případě výrazného oslabení obranných mechanismů. Vysoká virulence souvisí s produkcí specifických faktorů, zejména toxinů: **fosfolipáza D** (PLD) produkovaná *C. pseudotuberculosis* a *C. ulcerans* a **difterický toxin** *C. diphtheriae*, případně *C. ulcerans*. PLD je sfingomyelináza s dermonekrotickými a hemolytickými účinky; poškozuje makrofágy. Kromě toho způsobuje vazodilataci, což přispívá systémovému šíření bakterií. Difterický toxin je komplexní A-B toxin, složený z receptorové, transmembránové (B) a katalytické domény (A), která blokuje proteosyntézu (mechanismem ADP-ribosylace elongačního faktoru 2). Poškozuje různé typy buněk a vyznačuje se lokálním i systémovým účinkem.

Korynebakteria způsobující močové infekce (skupina *C. renale*) produkují **adheziny** (pili), které hrají ústřední roli při kolonizaci močových cest. Rozkladem močoviny enzymem **ureázou** vzniká amoniak, který přispívá k dráždění a zánětlivým změnám sliznice. Exoprotein **renalin** štěpí ceramid v membránách buněk a má hemolytické účinky potencované stafylokokovou sfingomyelinázou C (β toxin).

Klíčovým momentem patogeneze pseudotuberkulózy se vznikem pyogranulomů je intracelulární přežívání bakterií, k němuž přispívá zejména „voskovitá“ **buněčná stěna** s obsahem mykolových kyselin a dalších lipidů. Jednotlivé složky buněčné stěny nejen poskytují ochranu před destrukcí fagocytujícími buňkami, ale mají samy o sobě také toxické účinky.

Jak bylo již zmíněno, vstupní branou infekce jsou nejčastěji kožní traumata (případně dýchací trakt, urogenitální trakt aj.). Bakterie jsou z místa infekce zanášeny makrofágy do povrchových mizních uzlin a dále hlubokých mizních uzlin a vnitřních orgánů. Jelikož nejsou makrofágy efektivně destruovány, dochází k hromadění zánětlivých buněk a vzniku opouzdřených abscesů s kaseózním obsahem, jenž je, pokud dojde k otevření abscesu, zdrojem infekce pro další zvířata, případně i člověka (*C. pseudotuberculosis* má jistý zoonotický potenciál).

1.2.1.3 Diagnostika

Korynebakteria patří mezi kultivačně poměrně nenáročné bakterie. Dají se snadno izolovat z odebraných vzorků: hnisu a obsahu abscesů, moči, ušních výtěrů, mléka apod. Dobrou pomocnou diagnostickou metodu poskytuje mikroskopie; v nátěrech pozorujeme nepravidelné kyjovité G⁺ tyčinky v typickém uspořádání (dvojice, palisády, „čínská písmena“).

K izolaci používáme běžný agar s ovčí krví (aerobně, 37°C, 24 – 48 hodin). Korynebakteria vytvářejí poměrně malé kolonie, matné, zbarvené šedě, krémově až žlutě, s **voskovitou nebo mazlavou konzistencí** připomínající smetanový sýr. Zbarvení kolonií se liší mezi druhy; *C. cystitidis* je obvykle bílé, *C. renale* bledě žluté a *C. pilosum* výrazně žluté. *C. pseudotuberculosis* a *C. kutscheri* bývají bělavé až šedé a po několika dnech nabývají drobné konzistence. Kolem kolonií *C. pseudotuberculosis* a *C. ulcerans* vzniká úzká zóna úplné **hemolýzy** (souvisí s produkcí PLD). Hemolýzu můžeme pozorovat i u některých kmenů *C. kutscheri* a *C. diphtheriae*. V humánní medicíně se používají selektivní média obohacená sérem a solemi telluru (Loefflerův agar), na nichž korynebakteria tvoří šedé až černé kolonie.

K identifikaci se využívá řada biochemických testů (redukce nitrátů, štěpení eskulinu, produkce ureázy a hippurikázy) a multitestů (např. API Coryne) nebo hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. K rozlišení druhů skupiny *C. renale* slouží také hydrolýza kaseinu na mléčném agaru (pozitivní u *C. renale*) a hydrolýza Tween 80 (*C. cystitidis*). *C. pseudotuberculosis* a *C. renale* reagují v **CAMP testu** s *S. aureus* nebo *R. equi*. Zatímco interakce PLD s EQUI faktorem *R. equi* je synergická a vede k zvýraznění hemolýzy *C. pseudotuberculosis*, s betatoxinem *S. aureus* vzniká tzv. **reverzní CAMP** reakce – dochází k potlačení hemolýzy v místě styku kultivačních čar obou bakterií. *C. renale* (samo o sobě nehemolytické) vykazuje standardní pozitivní CAMP reakci s betatoxinem *S. aureus*.

Produkcí difterického toxinu lze detekovat sérologickými metodami, například jednoduchou imunoprecipitací, při níž pozorujeme vznik precipitační linie na agaru mezi místem inokulace testovaného kmene a diskem s antitoxinem.

1.2.1.4 Terapie a prevence

Antibiotická terapie pseudotuberkulózy nebývá efektivní; antibiotika, i když jsou účinná *in vitro*, nepronikají dovnitř abscesů. Peniciliny, erytromycin nebo rifampicin lze použít jako podpůrnou terapii chirurgického ošetření vnějších abscesů. V Austrálii a ve velkých chovech ovcí se používají rekombinantní antitoxinové vakcíny, které sice neposkytují stoprocentní ochranu, ale přispívají ke snížení ztrát. *C. bovis*, skupina *C. renale* a další zástupci bývají citlivé k široké škále látek, penicilinům, tetracyklinům, chinolonům a potencovaným sulfonamidům. Také případy záškrtu u člověka se léčí většinou penicilinem G, erytromycinem a rifampicinem. Vakcinace difterickým toxoidem je součástí standardního vakcinačního protokolu u dětí a bývá podávána v kombinaci s tetanovým a pertusovým toxoidem.

1.3 Čeleď Propionibacteriaceae

Zástupci čeledi Propionibacteriaceae z řádu Propionibacteriales tvoří vesměs součást přirozené slizniční mikroflóry člověka i zvířat. Čeleď je značně variabilní a zahrnuje tyčinky i koky s různým vztahem ke kyslíku. Vlastní propionibakteria, pojmenovaná podle schopnosti produkovat kyselinu propionovou, jsou anaerobní, ale aerotolerantní pleomorfní tyčinky. Některé druhy představují poměrně významné oportunní patogeny. *Propionibacterium acidifaciens* se může podílet na patogenezi zubního kazu. *P. avidum* způsobuje infekce kloubů v souvislosti s ortopedickými zákroky (aplikace kloubních náhrad). Nejznámějším zástupcem je *Cutibacterium acnes* (dříve *P. acnes*), obývající především ve vývodech sebaceózních žláz lidské kůže. Vyhovuje jí vysoká koncentrace mastných kyselin, které využívá jako zdroj energie. Při nadprodukci kožního mazu a ucpání vývodů žláz se bakterie přemnožují a vzniká zánět, do nějž se zapojují i jiné oportunní kožní patogeny, například koaguláza-negativní stafylokoky. Tato bakterie byla v souvislosti s akné popsána už v 19. století, ale uplatňuje se v širší škále oportunních infekcí, včetně infekcí kloubních náhrad, osteomyelitid a diskospondylitid, endoftalmitid a blefaritid.

2. Aerobní aktinomycety

V této kapitole popíšeme zástupce kmene Actinobacteria a řádu Actinomycetales, které v určitém stádiu růstu vykazují větvení nebo vláknité formy a mohou být částečně acidorezistentní díky obsahu mykolových kyselin a jiných lipidů v buněčné stěně: čeleď Nocardiaceae (která s čeleděmi Corynebacteriaceae a Mycobacteriaceae patří do podřádu Corynebacterinae) s rody *Nocardia* a *Rhodococcus*, čeleď Dermatophilaceae (podřád Micrococcinae) s rodem *Dermatophilus* a čeleď Streptomycetace (podřád Streptomycinae) s rodem *Streptomyces*.

2.1 Čeleď Nocardiaceae

2.1.1 Rod *Nocardia*

Nokardie jsou aerobní vláknité bakterie, které se vyskytují saprofytický ve vodách, půdě a tlejících materiálech a mohou příležitostně způsobovat lokální či diseminované pyogranulomatózní infekce. Tvoří dlouhá, tenká větvičící se filamenta s korálkovitou strukturou, někdy až fragmentovaná na řetízky připomínající streptokoky. Buněčná stěna obsahuje velké množství lipidů včetně mykolových kyselin s délkou mezi 46 – 66 uhlíky, podmiňující částečnou acidorezistenci, která se ovšem může kultivací ztrácet.

Většina klinicky relevantních izolátů bylo dříve řazeno ke komplexu *N. asteroides*, do 6 typů (I-VI) na základě unikátního profilu citlivosti k antimikrobiálním látkám. Molekulární analýza přinesla zásadní změny – původní komplex *N. asteroides* už nemá platnost a je dnes rozdělený na několik validních druhů: *N. abscessus* (typ I), komplex *N. brevicatena/paucivorans* (typ II), komplex *N. nova* (typ III), *N. wallacei* (typ IV), *N. farcinica* (typ V), komplex *N. cyriaciageorgica* (typ VI, dříve *N. asteroides sensu stricto*), aj. Nejvýznamnějšími původci plicních a diseminovaných infekcí se jeví *N. cyriaciageorgica* a *N. farcinica*, která je značně rezistentní například k cefalosporinům III. generace.

2.1.1.1 Patogenita a patogeneze

Nokardie jsou fakultativně intracelulární patogeny, složky buněčné stěny, do značné míry podobné mykobakteriím, jako je **kyselina diaminoepimelová (DAP)**, **arabinogalaktan** a **mykolové kyseliny**, ovlivňují interakci s makrofágy, inhibují fagolysosomální fúzi a spouští procesy vedoucí ke vzniku pyogranulomatózních lézí; hnisavé procesy převažují. Přežití v makrofázích dále napomáhají enzymy **kataláza** a **superoxiddismutáza**.

Nokardiózy jsou charakterizovány spíše **chronickým hnisavě-granulomatózním zánětem** v různých tkáních, nejčastěji traumatického původu. Rozeznáváme formy **kutánní**, **pulmonární** a **diseminované**. Kožní infekce mívají podobu abscesů, celulitid nebo tzv. **mycetomů**, připomínajících léze způsobované některými plísněmi. Lymfokutánní forma vzniká, když zánět zasáhne navíc regionální mízní uzlinu, která hnisá nebo nekrotizuje. Zdrojem infekce je prostředí. Méně často pronikají bakterie do organismu vdechnutím aerosolu. Podmínkou vzniku inhalační a především diseminované formy je imunosuprese; zejména oslabení buněčné složky imunity. Primární ložisko při inhalační infekci vzniká v plicích. Rentgenogram může odhalit masu, kterou lze zaměnit za plicní malignitu nebo za tuberkulózu. Pokud zánět eroduje cévy, dochází k hematogenní diseminaci infekce do sekundárních ložisek v játrech,

ledvinách, kostech a kloubech. Nokardie mají zvláštní afinitu k CNS, encefalitida a mozkový absces jsou sice naštěstí poměrně vzácné, ale vysoce závažné manifestace nokardiózy především u člověka.

U psů a koček se často setkáváme s nokardiózou ve formě **pneumonie a pleurálního empyému**, jež vznikají následkem penetrujícího poranění, např. pokousáním nebo ostrým předmětem (migrující osiny). Stejně běžné jsou kutánní a subkutánní abscesy a mycetomy, jeví se jako nehojící se vředovité rány. Zánět se může rozšířit do přilehlých kostí (osteomyelitida). U skotu bývá primárně postiženým orgánem mléčná žláza. Dále se, podobně jako u dalších hospodářských zvířat, mohou vyskytnout případy pneumonií, lymfadenitid a abortů spojených s placentitidou.

2.1.1.2 Diagnostika

Přímou mikroskopií vzorků (především efuze a aspiráty, případně stěry a otiskové preparáty) z postižených míst můžeme odhalit typické shluky vláken a drobných kokobacilárních forem, připomínající mycelia plísní. Bakterie vykazují variabilní acidorezistenci při barvení dle Ziehl-Neelsena. Diagnostika však musí být potvrzena přesnou identifikací bakterie. Kultivace je poměrně náročná, může trvat až dva týdny, než lze vyšetření ukončit. Při **aerobní atmosféře** a 37°C (rostou v širokém rozmezí teplot) na krevním agaru tvoří nokardie nejprve po 2 – 3 dnech hladké, různě **pigmentované kolonie** (bílé, žluté, oranžové až červené), jejichž povrch se popisuje jako voskovitý nebo, díky tvorbě tzv. vzdušných hyf, křídovitý nebo sametový. Později se kolonie stávají vrásčitými až granulárními s nepravidelnými okraji. Pevně lnou k povrchu média a je obtížné nabrat je kličkou. Vhodným selektivním médiem přímo pro nokardie je pufrovaný agar s kvasničným extraktem a aktivním uhlím (BCYE). Rostou i na médiích pro plísně (Sabouraudův agar) nebo mykobakteria (Loewenstein-Jensen).

Druhá identifikace nokardií může být poněkud obtížná. Původní komplex *N. asteroides* se rozlišoval dle citlivosti k antibiotikům na 6 různých vzorců rezistence. Toto členění je dnes již obsoletní. Z biochemických testů se k identifikaci nokardií tradičně používají testy hydrolýzy kaseinu, tyrosinu, xantinu a utilizace některých sacharidů (L-rhamnózy). Nokardie jsou **striktní aeroby, kataláza- a oxidáza-positivní**. Precizní druhová identifikace obvykle vyžaduje zapojení molekulárních metod, jako je sekvenování genu 16S RNA. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF může při určování izolátu selhat.

2.1.1.3 Terapie

Za lék volby na nokardiózu se považuje **sulfametoxazol-trimetoprim**, k němuž většina izolátů vykazovala citlivost; bohužel poslední dobou se objevuje rezistence čím dál častěji. Jako další možnost se nabízejí linezolid, amikacin, cefalosporiny 3. generace. Mastitida skotu je obtížně léčitelná, postižené zvíře navíc představuje zdroj infekce pro ostatní.

2.1.2 Rod *Rhodococcus* spp.

Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou nepohyblivé, značně pleomorfní grampozitivní, které se většinou jeví jako koky nebo krátké tyčinky, ale občas mohou tvořit i rozvětvená mycelia. Vyznačují se respiratorním metabolismem a rostou za aerobních nebo mikroaerofilních podmínek. Vyskytují se hojně

v prostředí, v půdě a ve vodě, a většina zástupců je předmětem výzkumu pro četné možnosti technologického využití, např. jako bioremediační organismy, rozkládající organické polutanty, nebo při zpracování fosilních paliv. Dva druhy mají význam jako patogeny: *R. fascians* napadá rostliny, *R. equi* je fakultativně intracelulárním původcem pyogranulomatózních infekcí u savců, zejména koní, ale také prasat, skotu, člověka a jiných druhů.

2.1.2.1 Patogenita

Patogenita a hostitelská specifita různých kmenů *R. equi* je do značné míry dána přítomností plazmidů, o kterých se ještě zmíníme podrobněji. *R. equi* je znám především jako původce **abscedujících bronchopneumonií hříbat** ve věku mezi 2 – 4 měsíci, což je doba poklesu kolostrálních protilátek. Hříbata se nakazí inhalací kontaminovaného prachu, proto také výskyt infekcí na postižených farmách obvykle kulminuje v suchých letních měsících. Zdrojem půdní kontaminace jsou sama infikovaná hříbata, která vylučují velké množství bakterií s faeces. V menší míře mohou být zdrojem i dospělí koně, případně jiní býložravci (bakterie kolonizují střeva a jejich růst podporuje vysoké množství těkavých mastných kyselin v hnoji). Některé farmy jsou postiženy endemickým výskytem virulentních kmenů *R. equi*, jinde se infekce objevuje jen sporadicky.

Pyogranulomatózní pneumonie hříbat bývá ve více než polovině případů doprovázena **extrapulmonárními lézemi**, které se mohou a nemusí klinicky projevit; např. průjmem při postižení střeva a abdominálních mízních uzlin (ulcerativní tyflokolitida, mezenterická lymfadenitida); méně často se nacházejí abscesy v ledvinách, játrech, kostech a jiných orgánech. Postižení plic může být subklinické až fatální a infekce často probíhá subakutně až chronicky, jako hnisavá pneumonie s postupnou tvorbou kaseózních plicních abscesů, jejichž případná ruptura vede ke vzniku fibrinózní pleuritidy (případně peritonitidy) a rozvoji septického šoku. Onemocnění doprovází nespecifické příznaky jako febrilie, apatie a ztížené dýchání, kašel nebo výtok však nemusí být přítomny. Poměrně často však dochází k autoimunitní polysynovitidě v důsledku ukládání imunokomplexů nejčastěji v hlezenním a kolenním kloubu. *R. equi* z hříběcích infekcí obvykle nese plazmid kódující protein VapA, považovaný za marker vysoké virulence.

U **prasat** způsobuje *R. equi* chronické **cervikální lymfadenitidy** se vznikem granulomatózních lézí na první pohled nerozlišitelných od mykobakterií (komplex *M. avium*). Nejčastěji bývají postiženy submaxilární mízní uzliny. Kmeny *R. equi* izolované z prasat jsou asociované s plazmidy kódujícími protein VapB a považují se za kmeny se střední virulencí. K infekci může dojít např. ingestí kontaminované podestýlky.

U skotu, koz a u někdy i člověka, psů, koček aj. dochází sporadicky k postižení různých mízních uzlin. Tyto izoláty vykazují obvykle nízkou virulenci a plazmidy jim buď úplně chybí, nebo nenesou geny pro proteiny Vap. Postiženy bývají retrofaryngeální, bronchiální i mediastinální mízní uzliny. Skot a prasata mohou představovat potenciální zdroj infekce pro člověka. Ohroženi jsou zejména imunokompromitovaní lidé (pacienti prodávající chemoterapii, pacienti s AIDS), u nichž dochází k nebezpečné plicní formě připomínající tuberkulózu.

2.1.2.2 Patogeneze

Rodokoky jsou adaptovány na přežívání v makrofázích. Naopak neutrofilů je účinně ničí. Při vstupu do organismu inhalační cestou jsou jejich primárním cílem alveolární makrofágy. V jiných případech dochází k primární interakci v mízních uzlinách. Oba případy vedou ke vzniku opouzdřených

pyogranulomatózních uzlíků a abscesů. Akutní léze se vyznačují větším podílem neutrofilů a větší tendencí kolikvovat, chronické jsou tužší. Při provalení abscesů se infekce může šířit do sekundárních ložisek v jiných orgánech nebo dochází k systémové zánětlivé odpovědi a septickému šoku.

Virulence *R. equi* je až pozoruhodně jednoznačně spjata s přítomností velkých plazmidů nesoucích geny pro **proteiny Vap** (virulence-associated proteins). Hříběcí izoláty, které vykazují nejvyšší virulenci, obvykle kódují povrchový protein **VapA**. Daný se nachází na tzv. ostrově patogenity spolu s dalšími geny *vap* (*vapC, D, G, E, H*). Exprese ostrova se spouští vnější teplotou (mezi 34 – 41°C) a nízkým pH a koreluje se schopností kmene přežít v makrofázích, ačkoli přesná funkce jednotlivých proteinů není dosud objasněna. Ostrov patogenity prasečích „středně virulentních“ kmenů má poněkud odlišnou strukturu a kóduje **VapB**, zatímco slabě virulentní a avirulentní izoláty z prostředí, infekcí přežvýkavců, člověka a dalších savců často plazmidy vůbec neobsahují nebo jim chybí ostrov patogenity. Plazmidy s *vapA* a *vapB* jsou vzájemně inkompatibilní, tyto dva geny se nikdy nenachází společně u jednoho kmene.

Ačkoli se zdá, že přítomnost proteinů Vap jsou rozhodující pro vysokou virulenci *R. equi*, skutečný fundament patogenity této bakterie představuje zřejmě buněčná stěna, která svým složením je velmi blízká buněčné stěně mykobakterií a také interakce s imunitním systémem při tvorbě typických pyogranulomatózních lézí je podobná. Spočívá ve **schopnosti bakterií přežít v makrofázích**, modulovat proces fagocytózy a tvorbu cytokinů. Buněčná stěna je tvořena peptidoglykanem, arabinogalaktanem a mykolovými kyselinami, které nejspíš fungují jako zhasiče reaktivních kyslíkových radikálů, a proto platí, že čím delší mají řetězce, tím jsou účinnější. Dále buněčná stěna obsahuje monomykolát a dimykolát trehalózy, kardiolipin a především **lipoarabinomanan (LAM)**. LAM *R. equi* se strukturálně částečně odlišuje od LAM mykobakterií a nokardií, obsahuje tzv. manóзовé čepičky a ovlivňuje způsob, jakým bude bakterie fagocytována, a produkci raných cytokinů. O osudu fagocytované bakterie rozhoduje z velké části to, jakým receptorem je fagocytóza zprostředkována; zatímco proces spuštěný receptorem FcR (fagocytóza zprostředkovaná protilátkami) vede k rychlé fagolysozomální fúzi a efektivní likvidaci bakterie produkty oxidativního vzplanutí, totéž se neděje, pokud jsou zapojeny komplementové a manóзовé receptory (CR, MR). LAM váže MBP (mannose-binding protein) a spouští tak lektinovou cestu aktivace komplementu a pohlcování bakterií interakcí s receptory, které neindukují dostatečně rychlý a efektivní proces likvidace, zahrnující maturaci fagozomu, oxidativní vzplanutí a produkci cytokinů IFN γ a IL-12, důležitých pro aktivaci specifické buněčné odpovědi. Důležitou roli protilátkami zprostředkované fagocytózy podporuje už fakt, že se onemocnění vyskytuje právě u hříbat v době poklesu hladiny mateřských protilátek.

V další fázi bakterie inhibují zrání fagozomu (za normálních okolností fagozomální membrána postupně mění svou strukturu, exprimuje jiné markery a získává schopnost fúzovat s lysozomy). Zde se pravděpodobně uplatňují především produkty ostrovů virulence Vap. Je jasné, že interakce mezi makrofágy a bakteriemi je velice dynamická a variabilní. Makrofágy se snaží zajistit acidifikaci fagozomu, jeho fúzi s lysozomem, produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku a expresi klíčových cytokinů; bakterie dělají vše pro to, aby jim v tom zabránily. Lipidové složky buněčné stěny, ale také enzym kataláza zajišťují značnou rezistenci rodokoků vůči produktům oxidativního vzplanutí a kyselému prostředí.

Rodokoky tvoří také **kapsulu**, jejíž role v patogenezi však není jednoznačná. Dále produkuje exoenzym **cholesteroxidázu**, tzv. equi faktor, který poškozují membránu hostitelských buněk a pomáhá uvolňovat živiny. Tento enzym se uplatňuje v diagnostice, neboť vykazuje CAMP reakci s fosfolipázou D a stafylokokovým betatoxinem.

2.1.2.3 Diagnostika

Při podezření na rodokokovou bronchopneumonii je nejlepší odebrat bronchoalveolární laváž nebo tracheální výplasek. Z odebraných vzorků lze přímo zhotovit cytologický preparát a pátrat po makrofázích s pohlcenými bakteriemi. Dále vzorky kultivujeme na krevním agaru 24 – 48 hodin za přístupu kyslíku; *R. equi* tvoří lesklé mukózní kolonie jako kapky mléka s růžovým nádechem. Sám o sobě netvoří hemolýzu, ale *equi* faktor interaguje v **CAMP testu** s fosfolipázou *D. C. pseudotuberculosis* nebo betatoxinem *S. aureus* za vzniku úplné hemolýzy. Stejným způsobem můžeme vyšetřovat vzorky abscesů a mizních uzlin. Izolace *R. equi* ze střevního obsahu je složitější, vyžaduje speciální média. Alternativně lze použít k přímé detekci testy PCR. *R. equi* **produkuje katalázu**, ureázu a nitrátreduktázu, sacharidy nevyužívá a je negativní na oxidázu.

2.1.2.4 Terapie

K léčbě rodokokové pneumonie hříbat se využívá kombinace **rifampicinu** s nějakým **makrolidem** – erythromycinem, azithromycinem, nejlépe však s klarithromycinem. Použití fluorochinolonů se nedoporučuje pro možné poškození chrupavek. Výše uvedená kombinace antibiotik může představovat určité nebezpečí pro matku hříběte – může způsobit disturbance dospělé střevní mikroflóry vedoucí až k fatální pseudomembranózní kolitidě způsobené *C. difficile*.

2.2 Čeleď Dermatophilaceae

2.2.1 Rod *Dermatophilus*

Dermatophilus congolensis, jediný významný zástupce rodu z čeledi Dermatophilaceae, podřádu Micrococcinae a řádu Actinomycetales, je bakterie ojedinelá svou morfologií a životním cyklem. Je to fakultativní anaerob, preferující vyšší koncentraci CO₂, který vytváří větvená vlákna, dělená podélnými a příčnými septy, takže vznikají balíčky s několika řadami kokoidních nebo kuboidních buněk. Ty se uvolňují z vláken a mohou přežít i v nepříznivých podmínkách. Stávají se pohyblivými zoospory, opatřenými bičíkem, které postupně klíčí v nová vlákna a cyklus se může opakovat.

D. congolensis je obligátním parazitem, v prostředí jako saprofyt neroste, a jeho výskyt je vázán především na kůži skotu, malých přežvýkavců a koní, kteří mohou být příležitostně zdrojem infekce pro jiné druhy včetně člověka. Vyskytuje se po celém světě, největší problém však představuje v tropických oblastech, zejména v Africe. Jeho růst výrazně podpoří teplé a vlhké prostředí, proto i v našich podmínkách dermatofilóza propuká zejména na podzim, v období intenzivních dešťů při ne zcela ideálních chovatelských podmínkách. V oblastech s mírným podnebím onemocnění postihuje ovce více než koně a skot.

2.2.1.1 Patogenita a patogenese

Dermatofilóza, dříve streptotrichóza, je nakažlivá **povrchová exsudativní kožní infekce**, která se přenáší kontaktem mezi zvířaty nebo i zprostředkovaně, například hmyzem a klíšťaty. Pohyblivé zoospory, přitahovány vyšší koncentrací CO₂, aktivně penetrují pokožku, zejména je-li macerována vlhkem či jinak porušena. Vnímavost souvisí zřejmě i s oslabením imunitního systému, citlivější jsou mladá

nebo stresovaná zvířata. Bakterie kolonizují chlupové folikuly, produkují fosfolipázy poškozující membrány buněk a proteolytické enzymy narušující mezibuněčné spoje. Hyfy prorůstají v úzkém kontaktu s keratinocyty a vyvolávají imunitní odpověď. Místo je rychle infiltrováno neutrofily. Dochází k exsudaci a šupinatění kůže, exsudát na povrchu zasychá a tvoří krusty kryjící zarudlou spodinu. Může se objevit hnisání a pustuly. Chlupy se lepí k sobě a lámou se. Bakterie mohou dlouhou dobu přežívat v odloupaných krustách a šupinkách. Typický klinický obraz může zastřít sekundární infekce oportunními bakteriemi. Chronická fáze se vyznačuje hyperkeratózou a bradavčitými lézemi akumulovanými k sobě a často pokrývajících velké plochy kůže.

Mezinárodní neoficiální názvy vyjadřují vzhled onemocnění a postiženou část těla. Například název „**lumpy wool**“ (něco jako sražená, hrudkovitá vlna) se používá, jsou-li postiženy oblasti pokryté vlnou u ovcí. Podobným lézím na hlavě a hřbetě u koní a skotu se říká „**rain scald**“ (dešťová opařenina). Postižení distálních částí končetin, související často se stáním na vlhkém, bahnitým podkladu, se nazývá „**greasy heel**“ u koní a „**strawberry footrot**“ u skotu a ovcí.

2.2.1.2 Diagnostika

Na vyšetření je nejvýhodnější odebrat krusty a šupinky pokožky, k odběru lze použít např. sterilní skalpel nebo kartáček na zuby. Odhalenou hnisavou spodinu otiskneme na sklíčko. Takto odebrané vzorky vyšetřujeme cytologicky, barvíme dle Grama nebo Giemsy. Pozorujeme velmi typické shluky hyf, složených z řetízků kokoidních buněk v několika řadách, které se rozpadají na jednotlivé koky. Je možno zhotovit též histologické preparáty.

Před kultivačním vyšetřením je vhodné vzorek specifickým způsobem zpracovat. Využíváme aktivní migrace zoospór do prostředí s vhodným poměrem kyslíku a oxidu uhličitého. Krusty a chlupy inkubujeme několik hodin při laboratorní teplotě ve fyziologickém roztoku. Zoospóry zatím stoupají k hladině. Posléze pipetou nebo kličkou odebíráme 10 – 20 µl z povrchové vrstvy a očkujeme na krevní agar. Po nejméně 48 hodinách (ale je nutno nechat několik dní, než vyšetření ukončíme) při 37°C a 5 – 10 % CO₂ lze pozorovat drobné šedé kolonie, pevně rostlé do média. Později získávají hrubý, vrásčitý vzhled a zbarvení do zlatova až oranžova. Jsou obklopené zónou úplné hemolýzy.

D. congolensis je pozitivní na katalázu, ale jinak je většina kmenů biochemicky dost inertní (výjimkou je produkce ureázy některými kmeny) a sacharolytická aktivita je poměrně nízká. Mikroskopický vzhled je většinou natolik typický, že stačí k identifikaci.

2.2.1.3 Terapie

V akutní fázi infekce často stačí zlepšení chovných podmínek a odstranění predispozičních faktorů k tomu, aby se zvířata uzdravila sama od sebe. Je však třeba dbát na to, že dermatofilóza je potenciálně zoonotická. Závažné případy a rozsáhlé léze je vhodné léčit antibiotiky (peniciliny, tetracykliny aj.). Vakcíny byly vyvinuty, ale běžně se nepoužívají.

2.2.3 Rod *Streptomyces*

Obrovské množství druhů rodu *Streptomyces* z čeledi Streptomycetaceae, podřádu Streptomycinae a řádu Actinomycetales se vyznačuje zvláštním klinickým významem, neboť obrazně řečeno stojí spíše na opačné straně barikády; jedná se totiž o nejvýznamnější přirozené producenty antibiotik. Jejich význam coby patogenů je malý, přestože příležitostně byly klinické infekce zaznamenány.

Streptomycety jsou aerobní grampozitivní vláknité bakterie s velmi charakteristickou strukturou připomínající plísně, za něž byly také dříve považovány (jedná se však o pravé prokaryotické organismy). Jejich větvené vegetativní hyfy, které vrůstají do substrátu, z něhož berou živiny, tvoří tzv. substrátové mycelium. Na druhé straně v určité fázi vývoje vytvářejí navíc tzv. vzdušné mycelium, na kterém vznikají řetízky a závitky kulovitých „spór“ (nejedná se endospory!). Streptomycety jsou nepohyblivé, ale dokážou se šířit právě rozsevem spór, z nichž vyrůstají nová mycelia.

Streptomycety jsou široce rozšířené v prostředí. Jejich původním habitatem jsou rostliny. Tato interakce je velmi starobylá; první streptomycety kolonizovaly rostliny asi před 500 miliony lety. Jejich mycelia vrůstají do pletiv odumřelých rostlin a enzymaticky napomáhají jejich rozkladu. Schopnost produkovat látky s antibiotickými a antifungálními účinky vznikla zřejmě jako zbraň k potlačení růstu konkurujících plísní. Prvním izolovaným antibiotikem streptomycet byl, jak jinak, streptomycin (*S. griseus*), použitý ve 40. letech k léčbě tuberkulózy. Od té doby bylo ze streptomycet izolováno úctyhodné množství dalších antibiotik, jako je například chloramfenikol (*S. venezuelae*), fosfomycin a neomycin (*S. fradiae*), linkomycin (*S. lincolnensis*), tetracyklin (*S. rimosus*, *S. aureofaciens*), kyselina klavulanová (*S. clavuligorus*), ale i antimykotik – amfotericin B (*S. nodosus*) a natamycin (*S. natalensis*), antiparazitik – ivermektin (*S. avermitilis*), a cytostatik – např. bleomycin (*S. verticillus*).

Některé druhy mohou způsobovat onemocnění rostlin a vzácně jsou zaznamenány i příležitostné infekce savců, převážně v podobě aktinomycetomů; např. *S. albus* a *S. somaliensis* však byly asociovány s případy pneumonií a keratitidy u člověka.

Streptomycety jsou velmi často izolovány v běžných laboratorních podmínkách jako kontaminanty z prostředí bez klinického významu. K růstu však samy preferují teplotu kolem 30°C. Často si všimneme okrouhlých kolonií s nejprve hladkým povrchem a tuhou, voskovitou strukturou, pevně vrostlých do média, takže nejdou dobře nabrat kličkou. Za vhodných podmínek kolonie tvoří vzdušná mycelia a jejich povrch se zvrásňuje, získává sametový až prašný vzhled. V této fázi jsou také produkovány sekundární metabolity, jako jsou antibiotika. Mohou se tvořit i pigmenty. V mikroskopu pozorujeme složitě propletená vlákna, někdy můžeme zaznamenat i typické řetízkovatění při tvorbě spór (na vegetativním myceliu se spóry tvoří jen ojedinele). Buněčná stěna obsahuje kyselinu L-diaminoepimelovou, ale ne mykolové kyseliny. Streptomycety jsou aerobní organismy s oxidativním typem metabolismu. Produkují katalázu a redukují nitráty, rozkládají želatinu a kasein, škrob, eskulin a některé další molekuly. Identifikace hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF bývá často neúspěšná.

2.3 Rod *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* je jediným zástupcem čeledi Mycobacteriaceae z řádu Actinomycetales, třídy a kmene Actinobacteria. Jsou to aerobní nepohyblivé bakterie se zvláštní stavbou buněčné stěny, která rozhoduje o řadě specifických vlastností mykobakterií. Morfologicky jsou to štíhlé, lehce zahnuté nebo rovné tyčinky (0,2 – 0,6 x 1 – 10 µm), které se mohou větvit a často je můžeme pozorovat uspořádané ve shlucích a propletených změtích, které mohou poněkud připomínat plísňové mycelium. Odtud také pochází pojmenování. Silná, jakoby voskovitá buněčná stěna mykobakterií špatně přijímá Gramovo barvivo. Mykobakteria jsou modelovým zástupcem skupiny zvané „**mycolata**“, kam můžeme zahrnout také rody *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* a *Gordonia*, které vykazují částečnou nebo úplnou acidorezistenci díky obsahu mykolových kyselin v buněčné stěně. **Mykolové kyseliny** jsou α -alkyl- β -hydroxy-mastné kyseliny, přičemž délka jejich řetězců koreluje se schopností odolávat odbarvení kyselým alkoholem (acidoalkoholorezistenci). Mykolové kyseliny mykobakterií dosahují délky 70 – 90 C, zatímco u jiných „mykolat“ je to méně (*Corynebacterium* 22 – 36 C, *Rhodococcus* 34 – 54, *Nocardia* 50 – 62 C atd.).

Tato zvláštní buněčná stěna s vysokým obsahem lipidů (některé její složky budou popsány podrobněji) má několik zásadních implikací pro ekologii, patogenezí a možnosti diagnostiky. Zaprvé je to již zmíněná **acido(alkoholo)rezistence**, tedy značná odolnost vůči účinkům kyselin, která se projevuje schopností zadržet barvivo při odbarvování kyselým alkoholem a využívá se diagnosticky při barvení dle Ziehl-Neelsena. Acidorezistence se může lišit mezi druhy a také v různých fázích růstu. Buněčná stěna poskytuje mykobakteriím, ať už se jedná o saprofytické nebo parazitické druhy, také značnou odolnost ve vnějším prostředí: k UV záření, relativně vysokým teplotám (snesou 60°C až 30 minut) a také k řadě běžných antiseptik, jako je chlorhexidin nebo kvarterní amoniové soli. Vhodné jsou naopak alkoholy, formalínové páry nebo kyselina peroctová, ale i jejich účinnost může být snížena, jsou-li mykobakteria skryta v hlenu či jiném materiálu.

Buněčná stěna mykobakterií a specificky jednotlivé její složky interagují s buňkami imunitního systému, modulují jejich chování a produkci cytokinů a hrají tedy klíčovou roli v patogenezí mykobakterií. Mykobakteria jsou adaptována na dlouhodobou perzistenci v makrofázích a vyvolávají tak u svých hostitelů obvykle chronická progresivní onemocnění. Neméně důležitým důsledkem silné buněčné stěny je z diagnostického hlediska výrazně pomalý růst patogenních mykobakterií. Přenos živin a dalších molekul přes buněčnou stěnu je náročný a vyžaduje speciální transportní systémy.

2.3.1 Klasifikace

Rychlost růstu je důležitým znakem, podle kterého rozlišujeme skupinu **rychle rostoucích** (mají generační čas do 6 hodin, kolonie se při kultivaci *in vitro* objevují za méně než 7 dní) a **pomalou rostoucí** mykobakteria (vyžadují týdny až měsíce). Mezi rychle rostoucí mykobakteria patří obecně saprofytické, málo patogenní druhy, např. *M. smegmatis*, *M. fortuitum* a *M. chelonae/M. abscessus*. Naproti tomu klinicky významné skupiny, jako je komplex *M. tuberculosis*, komplex *M. avium*, *M. marinum*, *M. ulcerans* a *M. leprae* rostou pomalu. Generační čas *M. tuberculosis* je 24 hodin a *M. leprae* (rostoucí pouze intracelulárně) vykazuje vůbec nejdelší generační čas ze všech známých bakterií – může trvat až 14 dní.

Jiným pomocným znakem, na němž je založena tzv. **Runyonova klasifikace netuberkulózních mykobakterií** (tj., jiných než MTC), je produkce pigmentů koloniemi na pevném médiu. Rozlišujeme **nechromogenní** druhy, které pigmenty neprodukují, především důležité patogeny MAC a *M. ulcerans*. Jedná se o Runyonovu skupinu III. Do skupiny I patří **fotochromogenní** druhy, které produkují většinou žluté až oranžové karotenoidní pigmenty pouze za přístupu světla (např. *M. marinum*, *M. kansasii*), zatímco **skotochromogeny** skupiny II (jako je *M. scrofulaceum*) tvoří pigmentované kolonie i bez

účinku světla. Tyto první tři skupiny zahrnují pomalu rostoucí mykobakteria. Stranou stojí Runonova skupina IV, do níž patří **rychle rostoucí druhy** (viz výše). Ty většinou pigment netvoří.

Nejpodstatnější pro rozdělování mykobakterií je ovšem klinické a epidemiologické hledisko. Zcela obecně a nepřiliš přesně můžeme rozlišovat mezi **druhy saprofytickými**, jejichž primárním rezervoárem je prostředí (např. rychle rostoucí druhy, *M. kansasii*, *M. intracellulare*) a **obligátně parazitickými**, jež samostatně v prostředí nerostou a jsou adaptovány primárně na určité hostitelské druhy (MTC, *M. marinum*, *M. avium* ssp. *avium* nebo *paratuberculosis*). Nejběžněji používaná klasifikace vychází z humánní medicíny a je založena na významu jednotlivých skupin pro člověka. Významem na prvním místě stojí **tuberkulózní mykobakteria**, tedy komplex *M. tuberculosis* (MTC), zahrnující *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, který je původcem „typických“ tuberkulózních změn člověka a jiných savců. Stranou stojí *M. leprae*, obligátní intracelulární patogen a původce lepry člověka. Zbytek pomalu rostoucích mykobakterií je zahrnut ve skupině tzv. **netuberkulózních mykobakterií (NTM)**, jinak též **atypických**. To je velice různorodá skupina, obsahující jak obligátně patogenní, tak saprofytické druhy. Především se jedná o komplex *M. avium* (MAC; zahrnuje *M. avium* se 4 poddruhy, ssp. *avium*, ssp. *hominissuis*, ssp. *paratuberculosis*, a ssp. *silvaticum*; dále se sem přiřazuje *M. intracellulare*, *M. chimeara*, *M. colombiense*), *M. kansasii*, *M. marinum* a *M. ulcerans*. Dále můžeme jmenovat *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. genaviense*, *M. bohemicum*, *M. scrofulaceum* a mnohé další. Jejich společným znakem je, že u člověka jsou asociovány s „atypickými“ infekcemi, jako jsou ulcerující kožní léze a krční lymfadenitidy. U zvláště imunosuprimovaných lidí jsou však příčinou vážných infekcí plicních, střevních a systémových. Spíše na okraji klinického zájmu pak stojí rychle rostoucí saprofytická mykobakteria (RGM, rapid-growing mycobacteria), která se uplatňují při závažné imunosupresi jako oportunní původci infekcí kůže, měkkých i tvrdých tkání, vzácně i diseminovaných forem s postižením např. CNS.

2.3.2 Výskyt

Rychle rostoucí a mnohá netuberkulózní pomalu rostoucí mykobakteria, jako je *M. avium* ssp. *hominissuis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. ulcerans* aj. jsou rozšířena široce v prostředí a rostou saprofytický v nejrůznějších nikách; ve vodě, v půdě, v asociaci s živými organismy. Vyhovuje jim mírná kyselost a slanost, některé, např. *M. marinum*, preferují vysoké koncentrace solí. Hydrofobicita buněčné stěny je ve vodním prostředí výhodou a navíc umožňuje snadnou disperzi ve formě aerosolu. Environmentální mykobakteria s oblibou tvoří biofilmy na vlhkých površích s vysokým odparem. Nacházíme je v přírodních vodních zdrojích, jako jsou jezera a prameny, ale také v rozvodech pitné a napájecí vody a vodních zdrojích v domácnosti a v nemocnicích, kde mohou být zdrojem nosokomiálních mykobakterií. Biofilm ve sprechové hlavici se považuje za obzvlášť rizikový pro vznik plicních infekcí imunosuprimovaných lidí (např. pacienti s HIV nebo po chemoterapii). Chlorování pitné vody ve 2. polovině 20. století mělo také vliv na prevalenci jednotlivých druhů; v jeho důsledku například *M. avium*, značně rezistentní vůči chlorovým sloučeninám, téměř vytlačilo *M. scrofulaceum*, v minulosti hlavního původce dětských krčních lymfadenitid (krtic).

Kromě vody nacházíme netuberkulózní mykobakteria i v hlíně, v prachu, mechu a nejrůznějších materiálech, které se používají jako podestýlka pro domácí zvířata, např. rašelině. Ingesce těchto materiálů se považuje za zdroj mykobakterií zejména u prasat.

Přes jejich relativně nevyhraněné hostitelské spektrum se netuberkulózní mykobakteria nepovažují v pravém smyslu za zoonotické patogeny, ale jejich význam je v tomto ohledu možná podceňován. Byly zaznamenány případy infekce člověka *M. avium*, jejichž zdrojem byla drůbež nebo drůbeží produkty. Kmeny izolované z prasat jsou navíc velmi podobné lidským izolátům – prase potenciálně

významným zdrojem netuberkulózních mykobakterií, zejména *M. avium* a *M. intracellulare*, pro člověka. Vzácně mohou takové riziko představovat i domácí mazlíčci, imunosuprimovaní psi a kočky s chronickými diseminovanými infekcemi. Mykobakteria (zejména *M. marinum*, *M. chelonae*, ale i *M. avium*) také rostou v asociaci s různými vodními živočichy, jako jsou mušle a korýši, a často způsobují infekce vodních obratlovců. Právě akvarijní rybičky bývají zdrojem kožních infekcí *M. marinum* na rukou chovatelů, kteří se nakazí při manipulaci s kontaminovanou vodou a čištění akvária.

Z evolučního hlediska je velice významná interakce mykobakterií s vodními a půdními amébami (*Acanthamoeba* spp., *Echinamoeba* spp., *Vermamoeba* spp. aj.). Tito prvoci se běžně krmí bakteriemi a rychle rostoucími mykobakteriemi. Některá mykobakteria jsou však odolná; nechají se sice spolknout, ale nenechají se strávit a místo toho si z buňky vytvoří bezpečný úkryt; améba spláče nad výdělkem. Mykobakteria se potom nalézají i v cystách améb. Pozoruhodné je, že právě odolná mykobakteria, schopná přežít v amébách, vykazují vyšší virulenci pro obratlovce (kuřecí a myší modely) a také rezistenci k antibiotikům. Tak prakticky nepatogenní *M. smegmatis* je úspěšně amébami stráveno, zatímco *M. avium*, *M. fortuitum* a další perzistují. Podobně jako u *Legionella* spp. předpokládáme, že právě adaptace na améby je podkladem schopnosti mykobakterií invadovat makrofágy a manipulovat s jejich funkcemi, což je právě leitmotivem patogeneze všech mykobakteriálních infekcí.

Na okraj poznamenejme, že tato ubikvitární environmentální mykobakteria se vyvíjela po tisíce let v úzké interakci se zvířaty i s člověkem a jejich vliv nemusí být nutně pouze škodlivý. Naopak, tzv. hygienická teorie předpokládá, že nárůst autoimunitních onemocnění a alergií v rozvinutých zemích během 20. století souvisí se zavedením někdy až přehnaných hygienických návyků, které zbavují imunitní systém impulzů nezbytných pro zdravý vývoj imunitního systému. Takto „necvičený“ imunitní systém má tendenci k dysregulaci. Škodlivý je proto jak extrémní infekční tlak v nevhodných životních podmínkách, jak je tomu v mnohých rozvojových zemích, tak i nedostatek infekčního tlaku.

S poněkud jinou situací se setkáváme v případě obligátně „parazitických“ druhů mykobakterií, v první řadě tedy komplexu *M. tuberculosis* (MTC) a *M. leprae*. Tyto bakterie jsou sice odolné ve vnějším prostředí a můžeme se s nimi setkat v nejrůznějších materiálech podobně jako s NTM, ale nejsou to saprofyty, primárním zdrojem kontaminace je hostitelský organismus: lidé v případě *M. tuberculosis* a *M. africanum*, skot a jiná zvířata (například jezevci) u *M. bovis*, kozy u *M. caprae*, tuleni u *M. pinnipedii*, hraboši u *M. microti*. Mezidruhový přenos je možný, ale různé druhy vykazují různou míru vnímavosti. *M. leprae* je extrémní případ, jehož přirozeným hostitelem je člověk a jen málo jiných savců je vnímavých k této infekci – v první řadě je to pásovec devítipásý, který se používá jako experimentální organismus. Mezi obligátní patogeny můžeme ovšem řadit *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, jež je původcem onemocnění přežvýkavců, a pravděpodobně i *M. avium* ssp. *avium*, kde lze předpokládat ptačí hostitele jako primární zdroj.

2.3.3 Klinické onemocnění

Tuberkulóza je progresivní onemocnění obvykle s dlouhou inkubační dobou (měsíce až roky) a chronickým průběhem, charakterizované vznikem typických granulomatózních lézí v postižených orgánech. Léze mohou mít difúzní charakter, „typická“ tuberkulóza se však vyznačuje vznikem uzlíků, tuberkulů, což jsou vlastně vazivově opouzdřená místa specifického zánětu, složená z vrstev imunitních buněk (makrofágů, lymfocytů) obklopujících nekrotický střed s živými i mrtvými makrofágy a bakteriemi. Tuberkly mají poměrně specifický makroskopický vzhled i mikroskopickou strukturu, mohou se však značně lišit podle druhu hostitele i vyvolávajícího agens; k zaznamenávaným rozdílům patří např. přítomnost epiteloidních a mnohojaderných Langhansových buněk nebo přítomnost kaseózní nekrózy a kalcifikací, které nacházíme v dobře rozlišených tuberklech v případech tuberkulózy skotu či člověka, ale které naopak chybí obvykle u prasat, ptáků, koček aj., kde bývají uzlíky méně strukturované

2.3.3.1 Tuberkulóza člověka a skotu (MTC)

M. tuberculosis a *M. africanum* (endemické v Africe) jsou primárním patogeny člověka, který je však vnímavý i k *M. bovis* a jiným druhům MTC, primárně infikujících zvířata. **Tuberkulóza člověka**, souchotiny neboli úbytě provází lidstvo po celé dějiny a dodnes patří celosvětově k infekcím s nejvyšší mortalitou; každoročně si vybere více než milion obětí. Odhaduje se, že je nakažena přibližně třetina lidské populace, přičemž aktivní infekci si vyvine 5 – 10 % nakažených – vyšší riziko je u lidí podvyživených nebo imunosuprimovaných. Počty aktivních případů masivně narostly společně s epidemií HIV, incidence se zvyšuje úměrně s růstem populace. Největší riziko představuje tuberkulóza v rozvojových zemích s nízkou životní úrovní, v oblastech postižených chudobou. V Evropě zaznamenala svůj vrchol v 19. století, zřejmě také v souvislosti s průmyslovou revolucí, která nutila chudší vrstvy dělnické stěhovat se do měst. Těsné tmavé příbytky, nízká hygienická úroveň, špatná výživa, nejistota a strach z budoucnosti tvořili ideální podmínky pro přenos a rozvoj onemocnění; souchotiny se však nevyhýbaly ani vyšším společenským vrstvám, ani umělcům, a zanechaly výraznou stopu v literatuře i výtvarném umění. Během 20. století, ruku v ruce s všeobecným zlepšením životní úrovně a zavedením očkování vakcínou BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), ale také pasterace mléka, tuberkulóza z rozvinutých zemí Evropy a Ameriky zdánlivě vymizela, lépe řečeno ustoupila do pozadí. Tento trend se však může kdykoli zvrátit; v posledních desetiletích incidence tuberkulózy v Evropě opět výrazně narůstá.

Tuberkulóza u člověka je obvykle chronické onemocnění s plíživým rozvojem. Inkubační doba (přesněji doba od nakažení po aktivaci infekce) je velmi dlouhá, může jít o měsíce až roky. Výjimkou je primárně generalizovaná miliární tuberkulóza, ke které dochází u novorozenců a výrazně oslabených jedinců. Tuberkulóza je poměrně málo nakažlivá; nakažení a rozvoj infekce výrazně závisí na vnějších a vnitřních podmínkách (extrémní infekční tlak, oslabení). Hlavní cesta infekce je aerogenní a primárně napadeným orgánem jsou nejčastěji plíce, kde vznikají kaseózní ložiska a kavitace. Při rozvinuté infekci mohou vznikat sekundární extrapulmonární ložiska např. v hrtanu, trávicím traktu, kostech a kloubech, mozku, na serózech a v parenchymatózních orgánech. Primární extrapulmonární léze při typické tuberkulóze vznikají spíše vzácně. K příznakům progresu patří hubnutí, slabost, dlouhodobá subfebrilie, noční pocení, bolest na hrudi a kašel, nejprve suchý, později s výhozem, produkující velké množství infekčního sputa a aerosolizací bakterií. Provalení kaseózních uzlíků do bronchů vede k rozvoji kaseózní pneumonie s rychlým fatálním průběhem, tzv. rychlým souchotím (*phthisis gallopanis*). V pokročilých stádiích se objevuje chrlení krve. Příznaky doprovázející extrapulmonární léze se liší podle postiženého orgánu – např. průjmy (GIT) nebo ochrnutí (tuberkulóza páteře) aj.

Skot je hlavním hostitelem *M. bovis*. Tento druh má však širší hostitelské spektrum, zahrnující další přežvýkavce, psi a kočky, volně žijící zvířata, ale také prasata a lidi. V některých zemích (Velká Británie) je jeho hlavním přírodním rezervoárem jezevec. Skot je však stejně vnímavý i k *M. tuberculosis*. Dříve představoval tuberkulózní skot pro člověka velké nebezpečí; v současnosti je tomu v našich podmínkách spíš naopak, zdrojem sporadických infekcí skotu je velmi často nakažený ošetřující personál.

Tuberkulóza skotu se velmi podobá onemocnění člověka, jedná se o především **aerogenní infekci s pomalým rozvojem, hubnutím, chřadnutím a vlhkým kašlem**, při němž nakažení jedinci kontaminují prostředí **infekčním sputem**. **Extrapulmonární ložiska** vznikají častěji, s variabilní symptomatologií a vylučováním agens jinými cestami. Při **tuberkulóze mléčné žlázy** se bakterie vylučují mlékem, což může být zdrojem infekce telat a bylo to jedním z důvodů zavedení standardní pasterizace mléka. V současné době je tuberkulóza skotu a jiných chovaných přežvýkavců pečlivě monitorována, díky čemuž se objevují jen sporadické případy.

U malých přežvýkavců probíhá tuberkulóza stejně jako u skotu, ale jsou rezistentní k *M. tuberculosis*.

2.3.3.2 Tuberkulóza prasat, ptáků a dalších zvířat (MTC, NTM)

Prasata jsou vnímavá k *M. bovis* i *M. tuberculosis*, častěji se však u nich setkáváme s druhem z komplexu *M. avium*, především *M. avium* ssp. *avium* a *hominissuis* a *M. intracellulare*, jejichž zdrojem je **prostředí, voda, podestýlka (piliny, rašelina)**. Méně často může k infekci dojít i kontaktem s nakaženým personálem nebo jinými hospodářskými zvířaty, případně při zkrmování zbytků. K nakažení dochází obvykle **alimentárně** a primární léze vznikají v průběhu trávicího traktu obvykle s postižením **mandibulárních** nebo **mezenteriálních mizních uzlin**. Diseminované infekce jsou spíše vzácné a léze jsou většinou zaznamenány až po porážce. Granulomy v mizních uzlinách jsou mikroskopicky málo strukturované a neobsahují kaseózní nebo kalcifikovaný střed. V podstatě stejné léze vznikají při infekci *R. equi*, jehož zdrojem také bývá půda. Předpokládá se, že prasata mohou být zdrojem obou agens pro člověka.

Psi a kočky jsou značně vnímaví k *M. bovis*, méně *M. tuberculosis* a NTM, ale přesto je pro ně kontakt s nakaženým majitelem jedním z hlavních zdrojů infekce. Dalším zdrojem je skot a jiná hospodářská a volně žijící zvířata, např. hlodavci. Především u koček bývá primárně postižen alimentární trakt, ale infekce může postihovat pleuru, peritoneum, plíce, meningy aj. Časté jsou také kožní formy. Typickým příkladem je *M. lepraemurium*, které způsobuje tzv. **lepru koček**. Nejedná se o lepru v pravém slova smyslu tak, jak ji známe u člověka. *M. lepraemurium* patří mezi NTM a jeho primárním hostitelem jsou hlodavci. Lepra koček je ulceronodulární zánět kůže, podkoží a mizních uzlin, který připomíná lepru v tom, že postihuje hlavně končetiny a histologicky můžeme rozlišit dvě formy: tuberkulózní (paucibacilární) a lepromatózní (difúzní léze s velkým množstvím bakterií).

Tuberkulóza je velmi vzácná u koní, častěji bývají popisovány alimentární infekce *M. avium* ssp. *hominissuis*. Naopak běžná je tuberkulóza u volně žijících a zoo zvířat, ať už se jedná o přežvýkavce (bizoni, buvolí, antilopy, velbloudi), šelmy (kojoti, mývali, lišky, jezevci) a jiná zvířata. Stejně jako člověk trpí i ostatní primáti primárně *M. tuberculosis* a *M. bovis*, infekce NTM jsou podmíněny imunosupresí. Tuleni a jiní mořští savci jsou vnímaví k *M. pinnipedii*, druhu příbuznému *M. bovis* adaptovanému na tyto druhy zvířat.

Významnou kapitolou je **ptačí tuberkulóza**. Druhem primárně adaptovaným na ptáky je *M. avium* ssp. *avium*. K ostatním poddruhům *M. avium* a příbuznému *M. intracellulare* jsou vnímaví méně (*M. a. hominissuis* je více adaptováno na savce, *M. a. paratuberculosis* infikuje přežvýkavce – viz níže; primárním hostitelem *M. a. silvaticum* je pravděpodobně holub hřivnáč). Předpokládá se, že vnímavé jsou všechny ptačí druhy s výjimkou papoušků. Nejcitlivější jsou domácí a volně žijící hrabaví, ale také vrabci, naopak vodní drůbež a holubi jsou poměrně rezistentní. Nakažená hejna a jimi kontaminované prostředí je potenciálním zdrojem infekcí jiných zvířat a „atypických“ infekcí (mykobakterióz) imunosuprimovaných lidí. *M. avium* bylo izolováno i z vajec. Vzhledem k dlouhé inkubační době a chronickému průběhu se tuberkulóza prakticky nevyskytuje v komerčních chovech, kde drůbež nežije dostatečně dlouhou dobu. Naopak problém může představovat u drůbeže na dvorku, zejména není-li chována v optimálních podmínkách a má-li kontakt s volně žijícím ptactvem. *M. avium* napadá přednostně **alimentární trakt** a primární léze vznikají ve **střevní stěně**, postupně zachvacují **játra, slezinu, kostní dřev** a další orgány. Onemocnění se kromě chřadnutí dlouho nemusí výrazně projevit, v rozvinutých stádiích může dojít k náhlému úhynu při ruptuře orgánů nebo paralýze křídel či končetin. Jinak se postupně rozvíjí kachexie s nespecifickými příznaky, jako je průjem, dyspnoe, pokles snášky. V orgánech nacházíme většinou mnohočetné uzlíky šedobílé nebo šedožluté barvy, tuhé, ale bez kalcifikace, strukturou připomínající nádory jako při Markově chorobě nebo aviární leukóze.

Tuberkulóza ryb je významné a celosvětově rozšířené onemocnění různých druhů chovaných v akváriích a akvakulturách, jehož původcem je *M. marinum* a některá další NTM preferující nižší teplotu (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*). Z ryb a dalších vodních živočichů však bylo izolováno i mnoho jiných druhů NTM. Vznik onemocnění je možný u volně žijících ryb, ale podmínky pro jeho rozvoj nacházíme hlavně v intenzivních chovech – vyšší teplota vody, organické znečištění, vysoká koncentrace ryb, nižší pH a stres vedoucí k oslabení imunitního systému podporují šíření virulentních kmenů atd. Jako u jiných živočichů je i tuberkulóza ryb chronické onemocnění charakterizované chřadnutím a vznikem granulomatózních lézí v postižených tkáních. Navenek se projevuje **hubnutím, změnou zbarvení, ztrátou šupin a kožními ulceracemi**. S podobnými problémy se setkáváme i u obojživelníků. Kontaminovaná voda a sedimenty mohou být zdrojem kontaminace kožních oděrek na rukou akvaristů při čištění akvárií. Jiným zdrojem mohou být i plavecké bazény nevalné hygienické úrovně.

3.3.3.4 Atypické mykobakterií a lepra člověka (NTM, *M. leprae*)

Infekce netuberkulózními druhy mykobakterií (tzv. **atypické infekce** neboli **mykobakteriízy**) jsou významné ve veterinární medicíně v tom smyslu, že primárními hostiteli nebo možnými zdroji těchto druhů jsou často zvířata a preventivní opatření, jako tuberkulinace skotu nebo kontrola tuberkulózních lézí v rámci veterinárních prohlídek na jatkách, je součástí běžné praxe. NTM představují největší nebezpečí pro lidi se závažnou imunosupresí (pacienti s HIV, leukémií, diabetem, cystickou fibrózou, po chemoterapii nebo transplantaci), u nichž způsobují závažné plicní, alimentární a diseminované infekce. U imunokompetentních lidí mohou vznikat lokalizované infekce kůže a mizních uzlin, případně dalších měkkých i tvrdých tkání, nejčastěji v souvislosti s traumaty nebo chirurgickými zákroky. V minulosti byly u dětí kolem 5 let velmi běžné tzv. krlice, granulomatózní zánět krčních mizních uzlin. K infekci dochází inhalací infekčního aerosolu, alimentárně nebo kontaminací kožních oděrek, traumat a chirurgických ran. Z nejvýznamnějších původců jmenujme MAC (*M.a. avium* a *hominissuis*, *M. intracellulare*), *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. chelonae/abscessus*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, jejichž zdrojem je v různé míře vodní prostředí, vodní živočichové, hlína, hospodářská a volně žijící zvířata (viz výše).

Lepra, malomocenství nebo Hanssenova choroba je onemocnění charakterizované chronickým granulomatózním zánětem kůže a svaloviny s destrukcí periferních nervů, způsobované vysoce specifickým lidským patogenem *M. leprae*. Tento druh se v průběhu tzv. reduktivní evoluce zbavil celé řady genů a adaptoval se cele na intracelulární niku; je obligátně intracelulární a v prostředí se samostatně nevyskytuje. Rostou extrémně pomalu, mají nejdelsí generační čas ze všech známých bakterií (až 14 dní), proto i inkubační doba je dlouhá – až 10 let. Kromě člověka je jen málo živočišných druhů vnímavých k infekci; v první řadě je to pásovec devítipásý, který se používá v experimentech, a někteří hlodavci. *M. leprae* přežívá v makrofázích, ale jejich hlavním cílem jsou Schwannovy buňky. Důsledkem je přerušení komunikace Schwannových buněk s neuronálními axony a jejich demyelinizace. Při lepře se rozeznávají 2 základní typy lézí: a) forma tuberkulózní, která je znakem efektivní buněčné imunity a schopnosti lokalizovat a omezit infekční proces; projevuje se tvorbou ztlustělých červeně lemovaných plaků a nodulů na kůži a ztrátou citlivosti k bolesti a teplotním vjemům, b) forma lepromatózní, při níž disregulace imunitní odpovědi vede k difúznímu infekčnímu procesu, který zasahuje obličej (nos, oči) a kosti, dochází k deformacím tváře a akrálních částí těla, může dojít i ke ztrátě článků prstů. Histologicky je lepromatózní forma charakteristická velkým množstvím bakterií uspořádaných v svazečcích a palisádách. V současnosti se lepra vyskytuje v Jižní Americe, Africe, Indii, Tanzánii aj.

Významem na třetím místě stojí u člověka *M. ulcerans*, vyskytující se na africkém kontinentě, kde je původcem tzv. **burulských vředů**. Původně nebolestivý kožní nodulus se mění v rozsáhlou otevřenou lézi, zasahující často hluboko do tkáně. Onemocnění není nakažlivé, zdrojem je v endemických oblastech zřejmě voda.

2.3.3.5 Paratuberkulóza přežvýkavců (Johneho choroba)

M. avium ssp. *paratuberculosis* je primárně adaptováno na přežvýkavce, u nichž způsobuje **chronické progresivní onemocnění trávicího traktu**. Zdrojem infekce jsou **asymptomatictí nosiči**. K infekci dochází alimentárně pozřením materiálů kontaminovaných výkaly, ale také mléka nebo kolostra. Předpokládá se i možnost infekce *in utero*. Zdaleka ne u všech nakažených se vyvine klinické onemocnění (odhaduje se jen asi 5 % klinických forem); nejcitlivější jsou telata asi do 1 měsíce věku. Inkubační doba je však velmi dlouhá a onemocnění se tedy může projevit až za rok či déle. Granulomatózní zánět ve střevní stěně vede postupně k ztluštění a **gyrifikaci střevní sliznice** s rozvojem **malabsorpčního syndromu**, postižená zvířata hubnou a trpí chronickým průjmem, často s příměsí krve. U malých přežvýkavců se často objevuje kachexie bez průjmu.

Existuje teorie, že *M. avium* ssp. *paratuberculosis* hraje jistou roli při vzniku Crohnovy choroby člověka, spíše však jako spouštěč imunopatologického procesu než přímé kauzální agens. Řada poznatků tuto teorii podporuje (např. zlepšení stavu pacientů po aplikaci antituberkulotik), ale přesná úloha této bakterie v patogenezi tohoto onemocnění objasněna nebyla.

2.3.4 Patogeneze

2.3.4.1 Mykobakteriální faktory virulence

Mykobakteria se vyznačují silnou, značně nepropustnou buněčnou stěnou s velkým množstvím látek charakteru lipidů, glykolipidů a peptidoglykolipidů (souhrnně se někdy používá pojem **mykosidy**). Komponenty buněčné stěny nejen poskytují mechanickou ochranu, ale také interagují s buňkami imunitního systému, umožňují dlouhodobou perzistenci v makrofázích a přispívají k rozvoji specifického granulomatózního zánětu. Mnohé z nich jsou společné pro všechny druhy mykobakterií. **Obligátně patogenní druhy se však vyznačují pomalejším růstem, vysokou adaptací na své hostitelské druhy a vyšší schopností perzistovat v makrofázích**. Vrchol tohoto adaptačního procesu zřejmě představuje *M. leprae*, které se redukcí genetické výbavy stalo obligátně intracelulárním patogenem.

Mykobakteria v podstatě nemají faktory virulence v pravém slova smyslu. Více než u jiných původců zde platí, že onemocnění je výsledkem souhry faktorů daných mikroorganismem, hostitelem a prostředím, jak potvrzují také pokusy na králících: infikujeme-li dvě skupiny králíků stejným virulentním kmenem TBC, smrtelné onemocnění se rozvine u skupiny, kterou budeme chovat v kleci (vysoká koncentrace, nízká hygiena, nedostatečná výživa, nedostatek světla, sociální stres), zatímco ve skupině chované v přirozených venkovních podmínkách se příznaky pravděpodobně neobjeví vůbec nebo jen u některých jedinců. Ke genům asociovaným s virulencí mykobakterií patří takové, které 1) jsou zapojeny v metabolismu mastných kyselin, 2) kódují složky buněčné stěny, 3) kódují sekreční systémy, 4) kódují enzymy a jiné molekuly chránící před účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku, 5) kódují další produkty zapojené v inhibici maturace fagozomu a modulaci imunitních funkcí, 6) regulují expresi těchto faktorů.

Buněčná stěna tvoří až 40 % buněčné hmoty a poskytuje mechanickou ochranu před vlivy vnějšího prostředí. Cytoplasmatickou membránu a vrstvu peptidoglykanu kryje další vrstva heteropolysacharidu arabinogalaktanu, skrze nějž se vážou dlouhé řetězce mykolových kyselin. **Mykolové kyseliny** jsou „vosky“, mastné kyseliny se dvěma až devadesátiuhlíkovými řetězci, kovalentně připojené

k arabinogalaktanu. Jsou zodpovědné za hydrofobicitu a nízkou propustnost buněčné stěny, podílejí se na formaci biofilmu. Jejich syntézu, transport a správnou lokalizaci zajišťují systémy FASI a FASII, které jsou cílem některých tuberkulostatik (např. izoniazid). Další komponenty jsou vmezeřeny mezi tyto vrstvy: lipoarabinomanan (LAM) a lipomanan (LM), monomykolát (TMM) a dimykolát trehalózy (TDM, tzv. „cord factor“), další glykolipidy, sulfolipidy a proteiny. Kromě toho zde najdeme speciální transportní systémy, zprostředkující obousměrný pohyb molekul přes cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu. Umožňují transport jednotlivých složek buněčné stěny včetně důležitých faktorů virulence a hrají také roli v rezistenci k antibiotikům. Jedná se jednak o systém TAT (twin-arginin transporter) v cytoplasmatické membráně a dále několik typů systémů ESX (jinak též sekreční systém typu VII, T7SS), který je znám specificky pouze u mykobakterií.

Lipoarabinomanan je pravděpodobně klíčová molekula interakce s imunitním systémem od fáze vstupu bakterií do buněk přes inhibici fagolyzozomální fúze po ovlivnění cytokinové exprese. Interaguje s receptory makrofágů a zajišťuje fagocytózu mykobakterií preferovaným způsobem přes manózoový nebo komplementový receptor. Vmezeřuje se do membrány fagozomu a inhibuje jeho maturaci a schopnost splynout s lyzozomem. Tlumí expresi cytokinů důležitých pro aktivaci efektivní anti-mykobakteriální imunitní odpovědi, jako je IL-6 a IL-12, naopak vyvolává produkci TNF α a IL-10 a přispívá tak k „rozladění“ imunity. Ovlivňuje též schopnost makrofágů prezentovat antigen na molekule MHC-II CD4 T-lymfocytům a snižuje odpovídavost makrofágů na signály IFN γ , čímž brání jejich aktivaci. Tlumí též účinky volných radikálů.

Dimykolát trehalózy, TDM zvaný „cord“ faktor je diester mykolové kyseliny s trehalózou. Je považován za hlavní molekulu zodpovědnou za fenomén zvaný v anglické literatuře „cording“, který vykazují některá mykobakteria, když rostou v tekutých médiích – buňky se zachycují do sebe a vytvářejí dlouhé spletené a zakroucené svazky (jako zvlněné kadeře vlasů). Tento fenomén se zdá korelovat s virulencí a souvisí též s růstem kmene v hrubé fázi. Je typický pro MTC, na druhou stranu se ale objevuje někdy i u nepatogenních druhů jako *M. smegmatis*.

Další komplexní lipidy buněčné stěny jsou zapojeny v inhibici a modulaci imunitních procesů: **sulfolipidy, fenolglykolipidy (PGL)** a **phthioceroldimykcerozát (PDIM)**. PGL1 *M. leprae* je mimo jiné zodpovědný za demyelinizaci neuronových axonů.

Buněčná stěna kromě lipidů obsahuje i velké množství proteinů a lipoproteinů, které jsou součástí systémů pro transport nutrientů a stavebních komponent a jsou zapojeny v interakci s hostitelským organismem. Například **lipoglykoprotein LpqH** (tzv. 19kDa protein) patří k hlavním antigenním determinantám povrchu mykobakterií, reaguje s receptory TLR-2 a indukuje buněčnou imunitní odpověď. **Sekreční systémy ESX (T7SS)** jsou specializované molekulární komplexy zajišťující transport efektorových proteinů přes buněčný obal mykobakterií. Podobné systémy se nacházejí i u jiných aktinomycet se silnou hydrofobní buněčnou stěnou, např. streptomycet či korynebakterií. Je známo pět typů těchto systémů (**ESX-1 až 5**), ne u všech je však objasněna jejich funkce a význam pro virulenci, ačkoli je zřejmé, že pro plnou virulenci jsou důležité. Například **ESX-1**, secernující efektorový protein **ESAT-6**, je kódován na jednom z lokusů známých jako *regions of difference* (RD1), jímž se plně virulentní referenční kmen *M. tuberculosis* liší od atenuovaného kmene BCG. ESX-1 se zdá být zapojen v disrupci membrán a buněčné lýze, ale také zřejmě zajišťuje konjugaci, přenos genetické informace mezi bakteriemi. **ESX-5** je znám pouze u pomalu rostoucích mykobakterií, jeho substrátem jsou tzv. **PE a PPE proteiny**. Jelikož substráty sekrečních systémů jsou imunogenní a zdají se být zásadní pro virulenci mykobakterií, představují potenciální cíle vakcín.

Vedle fagolyzozomární fúze je produkce reaktivních forem dusíku hlavním baktericidním mechanismem aktivovaných makrofágů. Mykobakteria jsou vybavena **enzymy** a **antioxidanty**, které je chrání před toxickými účinky produktů metabolického vzplanutí v aktivovaných makrofázích a umožňují jim tak únik z jejich dosahu. Patří k nim **kataláza, superoxidodismutáza, alkylhydroxyperoxidáza**

C (AhpC, patří mezi tzv. peroxiredoxiny) a **mykothiol** (obdoba glutathionu). AhpC například redukuje vysoce toxický peroxyinitrit na nitrit.

Asi jediným faktorem virulence v úzkém slova smyslu známým u mykobakterií je cytotoxin *M. ulcerans*, **mykolakton**. Je to makrolidová molekula kódovaná na plazmidu, která přispívá k tvorbě ulcerací (burulské vředy) a inhibici imunitní odpovědi. Je znám též u některých kmenů *M. marinum*.

2.3.4.2 Interakce s imunitním systémem

Ústředním dějem mykobakteriální infekce, ať už mluvíme o tuberkulózních či netuberkulózních druzích, je interakce mykobakterií s imunitním systémem, specifická zánětlivá reakce s formací granulomu a perzistence mykobakterií uvnitř makrofágů. Výrazněji než u jakékoli jiné infekce je zde ilustrováno pravidlo, že průběh infekčního onemocnění závisí na interakci tří činitelů, totiž **faktorů daných mikroorganizmem** (virulence), **faktorů daných hostitelem** (komorbidity, imunitní status ovlivněný genetickou dispozicí i okamžitými podmínkami) a **faktorů vnějšího prostředí** (životní podmínky), faktorů, které se pochopitelně v čase mění. Tyto interakce jsou extrémně komplexní. Většina imunitních mechanismů má ambivalentní roli, ve správné míře a ve správném čase přispívají v obraně, vychýleny z rovnováhy se naopak podílejí na zhoršení stavu; jejich účinek lze posuzovat jen v celkovém kontextu. Proto i zjednodušené tvrzení, že podkladem progresivního onemocnění je nedostatek buněčné Th1 a převaha neefektivní Th2 imunitní odpovědi, může být zavádějící; jedná se spíše o selhání regulace obou těchto směrů.

Imunita při mykobakteriální infekci nastupuje obecně pomaleji než v případě jiných fakultativně intracelulárních bakterií, např. salmonel. To lze vysvětlit jak pomalým růstem mykobakterií, tak jejich interferencí s prezentací antigenu. Velmi opožděný nástup imunity ve fázi prvního setkání organismu s infektem umožní masivní infekci regionální mízní uzliny a přes ni průnik do krve, což vede k šíření velkého množství mykobakterií v krevním oběhu a **primární diseminované infekci**, tzv. **miliární tuberkulóze** se vznikem drobných granulomů prakticky ve všech orgánech včetně CNS. K této formě jsou náchylní novorozenci a osoby se závažnou imunosupresí; bývá obvykle fatální. U většiny nakažených se však infekce ve fázi primárního nakažení zastaví, nehledě na cestu vstupu. V případě MTC je nejčastěji inhalační a primární cíl představují **alveolární makrofágy**. Netuberkulózní mykobakteria s oblibou vstupují perorálně a k primární interakci dochází v průběhu trávicího traktu s afekcí **krčních** nebo **mezenterálních mízních uzlin**. Též *M. avium* ssp. *paratuberculosis* primárně interaguje s **M buňkami střeva**. *M. marinum* a různá environmentální mykobakteria často infikují kůži či operační rány.

V místě vstupu infekce dochází k zánětlivé reakci, kterou nazýváme **primární afekt**; některá mykobakteria jdou dendritickými buňkami zanášeny do mízních uzlin, kde vzniká další léze; kombinací primárního afektu se zasaženou mízní uzlinou nazýváme **primární komplex**. K průniku do krve přes mízní uzlinu dochází pouze omezeně, imunitní systém je u zdravých jedinců včas mobilizován a zánětlivý proces je sekvestrován vzniklým granulomem v primárně infikovaném orgánu. Nastává **latentní fáze**, během níž však dochází k dynamické komunikaci mezi infektem a imunitním systémem. Vznik granulomu je podmíněn efektivní buněčnou imunitní odpovědí typu Th1, kdy především vlivem cytokinů IL-2 a IL-12 při prezentaci antigenu na molekule MHC-II se naivní Th lymfocyty diferencují na populaci Th1 a produkují mimo jiné klíčový cytokin IFN γ antimykobakteriální odpovědi, který aktivuje makrofágy a potencuje jejich baktericidní schopnosti.

Později dochází také k tvorbě protilátek vlivem Th2 lymfocytů, diferencujících se účinkem IL-4, IL-5 a IL-13. Tato imunitní odpověď se všeobecně nepovažuje za protektivní, naopak někdy (v nesprávném poměru k Th1) je označována za škodlivou. Neutralizační protilátky však pravděpodobně pomáhají chránit před diseminací infekce v krvi a jejich přítomnost je znakem určité rezistence.

Po určité době latence, která může trvat měsíce až roky, dochází k **aktivaci infekce**. Při kontinuálním infekčním tlaku může dojít k opakované infekci. Zda se ve skutečnosti jedná o pravou reaktivaci nebo reinfekci, zůstává kontroverzní. Tak či tak, toto stádium se nazývá **postprimární fáze**. Aktivní infekci si vyvíjí asi 10 % nakažených TBC, zatímco u paratuberkulózy skotu je to ještě o něco méně. Imunitní systém není nadále schopen udržet integritu granulomu a omezovat šíření infekce; mykobakteria se začínají množit a pronikat vně granulomu na okolní tkáň. Na rozdíl od primární fáze málokdy dochází k celkové diseminaci krví. Bakterie se šíří spíše přímým přestupem – např. na serózy, polykáním infekčního sputa do střeva a podobně.

2.3.4.3 Interakce s makrofágy a vznik granulomu

Mykobakteria jsou **fakultativně intracelulární bakterie, adaptované na perzistenci v makrofázích a odolnost vůči fagocytóze**. V místě vstupu do organismu se setkávají s regionálními makrofágy a dalšími antigen-prezentujícími buňkami. APC pak putují do mízních uzlin, aby aktivovaly T lymfocyty (tzv. „priming“). Aktivované CD-4 a CD-8 T lymfocyty se zase vydávají do místa zánětu. Nezanedbatelnou roli během akutní fáze hrají také neutrofilové, přivolané chemokinem IL-8, není však znám mechanismus, kterým proti mykobakteriím zasahují – pravděpodobně se jedná o tzv. NETs, neutrofilní extracelulární pastě, kdy jsou bakterie chytány do chromatinových „sítí“ a likvidovány.

Cílem mykobakterií je schovat se v makrofázích, aniž by je aktivovaly. Interakce s různými receptory (NOD, NLR, TLR, CR, FcR aj.) vede k buněčné signalizaci a spuštění baktericidních mechanismů, jako je maturace fagozomu, fúze s lysozomem, okyselení a aktivace hydrolytických enzymů a baktericidních peptidů, aktivace inducibilní NO-syntázy (NOS2) s produkcí reaktivních forem dusíku (RNI). **Lipoarabinomanan a další povrchové molekuly mykobakterií zprostředkují primárně vstup přes receptory, které makrofágy aktivují málo**, především manózoový receptor (MR) a komplementový receptor CR. Takto je fagocytovaným bakteriím poskytnut dostatečný čas na to, aby ovlivnily další procesy: **zabránily „zrání“ membrány fagozomu, tím zabránily jeho splynutí s lysozomem a zastavily jeho okyselení**. Dále ovlivňují různými způsoby komunikaci infikovaných makrofágů s dalšími imunitními buňkami, zejména Th lymfocyty: **ovlivňují různé expresi tlumivých (IL-10) i prozánětlivých cytokinů**, jako je TNF α (hraje roli v udržení integrity granulomu), IL-6 (časný prozánětlivý cytokin) a IL-12 (klíčový cytokin Th1 odpovědi), a **snižují expresi MHC-II**. Jak již bylo řečeno, CD4 T lymfocyty pod IL-12 při prezentaci antigenu na MHC-II produkují IFN γ , který je klíčovým cytokinem pro aktivaci makrofágů. Aktivované makrofágy (také označované M1) rychle mobilizují všechny své energetické rezervy k produkci cytokinů, fagolysozomární fúzi a metabolickému vzplanutí. Přestože mykobakteria disponují řadou antioxidantů, které je chrání před účinkem volných radikálů, v takto aktivovaných makrofázích dlouho nepřežívají. Naopak pod vlivem cytokinů Th2 odpovědi (IL-4, IL-13) tzv. **alternativně aktivované makrofágy (M2)** zvyšují oxidativní metabolismus a poskytují prostředí velice vhodné pro perzistenci a množení intracelulárních bakterií. (Tento mechanismus imunitní odpovědi je nejspíš určen k reparaci a hojení tkáně např. při invazi parazity. Zde je výrazem dysregulace.) Mykobakteria dále brání apoptóze infikovaných makrofágů snížením exprese receptorů pro TNF α a pro Fas ligand cytotoxických T lymfocytů.

2.3.4.4 Latence a reaktivace

Takto v místě infekce dochází k boji mezi imunitou a bakteriemi, přičemž ani jedna strana nezískává jednoznačnou převahu. Kontinuální cytokinová signalizace přivolává další a další monocyty a lymfocyty, v okolí proliferují fibroblasty a tvoří se granulom. V jeho středu nacházíme směs živých a mrtvých makrofágů a živých i usmrcených bakterií. U typických tuberkulů rozeznáváme **kaseifikační**

nekrózu, často s **kalcifikací**, granulomy vyvolané *M. avium* a jinými NTM bývají méně organizované. Střed lemují vrstvy živých **aktivovaných makrofágů**, které se často řadí vedle sebe jako tzv. **epitelioidní buňky** nebo splývají do obrovských mnohojaderných útvarů (**Langhansovy buňky**), a vrstvy **lymfocytů**. Celý uzlík bývá v pozdější fázi **opouzdřen vazivem**. Granulom tedy představuje efektivní způsob, jak zastavit infekci, ale zároveň slouží jako rezervoár mykobakterií a zdroj reaktivace infekce. Není jasné, jak se mykobakteria chovají během latentní fáze uvnitř granulomu, zda se množí nebo se nacházejí v jakési dormanci, zda se vyskytují převážně intracelulárně nebo extracelulárně, jak jsou metabolicky aktivní.

Právě tak není objasněno, jaké okolnosti či jejich souhra vedou ke ztrátě kontroly nad infekcí a její reaktivaci. Není ani dokázáno, zda skutečně v granulomu přežívá po tak dlouhou dobu dostatek bakterií a zda spouštěčem progresivní fáze onemocnění není reinfekce, která se odehrává za úplně jiné imunitní situace než v primární fázi. Tzv. dynamická hypotéza předpokládá, že během latentní fáze dochází ke kontinuálnímu uvolňování mykobakterií z granulomu a permanentní **endogenní reinfekci**. Riziko vzniku aktivní infekce je vysoké v případě trvajících infekčního tlaku, což naznačuje, že spouštěčem může být i opakované **exogenní reinfekce**.

Selhání kontrolních mechanismů vede k množení mykobakterií. Tak působí především deplece CD4 T lymfocytů aktivujících makrofágy, jak dokazuje vysoká vnímavost HIV pacientů. V udržení integrity granulomu hraje zásadní roli TNF α ; jeho neutralizace (při léčbě některých autoimunit) vede k aktivaci infekce. Na druhou stranu ve vysoké koncentraci nebo v kombinaci s vysokou hladinou IL-4 vede k nekrotizaci lézí a zhoršení choroby, je také zodpovědný za typickou kachexii doprovázející onemocnění. Je to tedy další příklad ambivalence, kdy určitý imunitní mechanismus může být protektivní nebo destruktivní v závislosti na množství a na kontextu. Aktivní infekci exacerbuje také léčba glukokortikoidy. Glukokortikoidy jsou stresové hormony, pravděpodobně zodpovědné za imunosupresivní účinek chronického stresu. Lze tedy říci, že narušení jemné rovnováhy imunitního systému vedoucí k progresi onemocnění může souviset s mnoha rozličnými faktory, včetně stáří, koinfekce, jiného onemocnění, výživy i psychického stavu.

2.3.5 Diagnostika

Diagnostika tuberkulózy i mykobakterií člověka a domácích zvířat se opírá o kulturační vyšetření, které je velmi zdlouhavé, s následnou identifikací původce dnes již převážně molekulárními metodami. Přímá mikroskopická detekce nebo přímá detekce DNA představují rychlejší alternativu, problémem je však nízká citlivost, respektive nedostupnost, proto kultivace zůstává zlatým standardem.

2.3.5.1 Vzorky

Sputum je nejčastěji využívaný vzorek při podezření na plicní tuberkulózu u člověka. A zvířat se obvykle preferují spíše **laváže** a **aspiráty** z dýchacích cest (plicní formy), dále aspiráty abscesů, **biopsáty granulomů**, kožních ulcerací, zvětšených mízních uzlin; cerebrospinální tekutina a kostní dřev; **mléko** (tuberkulóza vemene), **faeces** a **rektální seškraby** (střešní formy, paratuberkulóza). Posmrtně odebíráme celé změněné orgány, zejména mízní uzliny. Důležité je, že stěry běžně používané pro bakteriologické vyšetření se považují za zcela nevhodné, neboť při nich zachytíme pouze minimum intracelulárních a hydrofóbních mykobakterií.

2.3.5.2 Přímá mikroskopie

Přímá mikroskopie poskytuje v případě pozitivního výsledku rychlou informaci o stavu pacienta, než jsou známy výsledky kultivačního vyšetření. Nevýhodou je nízká citlivost – spolehlivé je teprve při koncentraci asi 10^6 bakterií/ml vzorku. Nejčastěji provádíme otiskové preparáty odebraných orgánů a lézí, případně roztěry bioptátů a aspirátů. Základním postupem je klasické **barvení na acidorezistenci dle Ziehl-Neelsena**, při němž využíváme schopnosti mykobakteriální stěny podržet barvivo (koncentrovaný karbolfuchsin) při odbarvování kyselým alkoholem. V prvním kroku fixovaný preparát převrstvíme koncentrovaným karbolfuchsinem. Sklíčko s barvivem držíme nad plamenem kahanu. Dříve než se začne vařit, sklíčko stáhneme, při čemž dojde k výstupu páry. To opakujeme třikrát (barvivo se nesmí přiškvařit). Tato procedura zajišťuje, že vlivem tepla barvivo vstoupí do buněčné stěny mykobakterií. Posléze preparát odbarvujeme roztokem kyseliny (1% HCl) a alkoholu (70% ethanol), dokud se vymývá barvivo. Okolí se krátce (v řádu desítek sekund) dobarví kontrastně metylenovou modří nebo malachitovou zelení. Po zaschnutí prohlédneme dlouho a důkladně celý preparát a hledáme červeně zbarvené jemné štíhlé tyčinky, často ve svazečcích či nepravidelných shlucích, na modrém nebo zeleném pozadí. Záchyt malého množství acidorezistentních tyčinek ve výkalech či seškrabech střeva je nutno interpretovat opatrně, neboť se zde mohou vyskytovat přirozeně různá environmentální mykobakteria; vypovídající je teprve masivní záchyt. Naopak i malé množství mykobakterií v otiskových preparátech mizních uzlin apod. je signifikantní.

Souběžně s barvením acidorezistenci se obvykle provádí **fluorescenční barvení auraminem-rhodaminem** nebo podobným nespecifickým fluorochromem, který se váže na mykolové kyseliny. Po primárním barvení (15 minut) se opět využívá odbarvení kyselým alkoholem a okolí se dobarvuje manganistanem draselným. Preparát se pozoruje pod fluorescenčním mikroskopem, acidorezistentní tyčinky žlutě až oranžově svítí.

Užitečné je též histologické vyšetření, které odhalí specifickou zánětlivou reakci tkáně.

2.3.5.3 Přímá detekce DNA

Metody amplifikace nukleových kyselin (NAAT – nucleic acid amplification test) umožňují rychlou identifikaci včetně odlišení MTC a NTM, zejména v případě pozitivní mikroskopie, a následně nasazení terapie, jsou však poměrně drahé a ve veterinární medicíně zatím nenacházejí využití. Existuje řada schválených metod, často principiálně jsou založeny na real-time PCR. Mnohé z nich umožňují zároveň detekci mutací spojených s rezistencí k rifampicinu a dalším terapeutikům.

2.3.5.4 Zpracování vzorku na kultivaci

Specifikou patogenních mykobakterií je extrémně dlouhá doba růstu, během níž by i při použití selektivních médií přerůstaly kontaminující mikroflórou. Odebírané vzorky jsou navíc často nesterilní. Prvním krokem kultivačního vyšetření je proto **dekontaminace vzorku**. Někdy, především vyšetřuje-li se sputum, je nutné navíc „ztekucení“ vzorku, to znamená rozpuštění hlenu, který chrání kontaminanty a zadržuje mykobakteria, různými mukolytickými činidly. Doporučuje se např. N-acetylcystein, dithiothreitol, benzakoniumchlorid (Zephiran) a různé enzymy. Mukolyticky působí i NaOH. Při dekontaminaci se využívá relativní rezistence mykobakterií vůči kyselinám i zásadám. Vzorek se homogenizuje a vystavuje cca čtyřnásobnému množství 3 – 6% roztoku kyseliny sírové nebo chlorovodíkové po dobu 15 minut, posléze se neutralizuje příslušným množstvím 4% NaOH a odstředí se 15 minut při nízkých otáčkách. Kultivuje se sediment.

2.3.5.5 Izolace

Kultivační vyšetření je zlatým standardem diagnostiky, jeho citlivost je výrazně vyšší než u přímé mikroskopie (10 – 100 buněk/ml). Mykobakteria jsou **aerobní**, půdy se inkubují v atmosféře s 5 – 10 % CO₂ standardně při 37°C. Některé druhy (*M. marinum*, *M. ulcerans*) preferují nižší teplotu kolem 25 - 30°C, naopak jiným vyhovuje teplota vyšší (*M. xenopi*, 45°C). Inkubace musí trvat **nejméně 8 týdnů**, než je možné vyšetření uzavřít jako negativní, ačkoli i pomalu rostoucí druhy vyrůstají již po 1 měsíci a kolonie rychle rostoucích mykobakterií se objevují během několika dnů.

Mykobakteria vyžadují speciální obohacená média. Jejich základním požadavkem je dostatek fosfolipidů, které se obvykle dodávají přídatkem žloutku. Jednotlivé druhy se navíc v nárocích na živiny liší. *M. tuberculosis*, stejně jako mnohá NTM, vyžadují přítomnost glycerolu, který naopak působí inhibičně *M. bovis*. Růst *M. bovis* podporuje pyruvát sodný. Proto se doporučuje inokulovat zároveň médium s glycerolem i bez glycerolu. Pro potlačení růstu kontaminant se přidávají antibiotické a antimykotické suplementy (chloramfenikol, polymyxin B, linkomycin, kyselina nalidixová, cykloheximid, amfotericin B, malachitová zeleň). V indikovaných případech (vyšetření mízních uzlin prasat) se vyplatí zároveň inokulovat běžná média pro možnou přítomnost *R. equi*.

M. avium ssp. *paratuberculosis* vyžaduje přídavek mykobaktinu, sideroforu, který se získává extrakcí z *M. phlei*.

Původní a dosud nejběžnější pevná média pro mykobakteria jsou **vaječné půdy**, k nimž patří **Löwenstein-Jensen** a **Herrold**. Ty jsou jednak přirozeným zdrojem lecitinu, jednak vydrží déle než agarová média, což je při dlouhodobé kultivaci výhodou. **Agarové půdy** (např. Middlebrook 7H11) mají lépe definované složení, ale rychleji vysychají. Pevné půdy jsou nality našikmo ve zkumavkách nebo kultivačních lahvičkách opatřených víčkem, očkuje se povrch šikminy.

Tekuté půdy (Middlebrook 7H9, Dubos Tween Albumen) nacházejí využití zejména v biochemických a fenotypických testy. **Fluorescenční tekutá média** (MGIT, mycobacterium growth indicator tube) se používá v automatizovaných systémech, jež umožňují podstatně rychlejší detekci růstu mykobakterií. Rostoucí mykobakteria spotřebovávají kyslík, který působí jako zhášeč fluorescence.

M. lepraemurium na běžných médiích určených pro mykobakteria neroste a vyžaduje speciální půdy. Izolace je však tak náročná, že se obvykle neprovádí a diagnostika se opírá o mikroskopický nález.

2.3.5.6 Identifikace

Po příslušné době inkubace vyrůstají na pevných půdách kolonie, jejichž morfologie může napomoci předběžné identifikaci. Jde především o **pigmentaci**, **velikost** a **konzistenci** (strukturu) kolonií. Pigmentace slouží k rozlišení NTM (žlutý až oranžový pigment se objevuje sám od sebe, po vystavení kolonie světlu, anebo chybí). Druhy komplexu *M. tuberculosis* pigmenty neprodukují, kolonie jsou matně bělavé, naředlé nebo nažloutlé, a s výjimkou *M. canetti* tvoří hrubé kolonie. *M. tuberculosis* roste bujně na médiu s glycerolem a jeho kolonie jsou hrubé, suché a kožovité. *M. bovis* má drobné kolonie a na médiu s glycerolem roste špatně. *M. avium* je rovněž nepigmentované a kolonie mohou být hrubé nebo hladké, vlhké a lesklé, s okrouhlým okrajem. *M. avium* ssp. *paratuberculosis* tvoří drobné bezbarvé hladké kolonie, které časem hrubnou, na Herroldově médiu suplementovaném mykobaktinem.

K biochemickým testům sloužícím k identifikaci patří **produkce ureázy, deaminace pyrazinamidu, redukce nitrátů** (*M. tuberculosis* a *M. kansasii*), **produkce niacinu** (*M. tuberculosis*), **tolerance 5 % NaCl** (*M. chelonae*, *M. fortuitum*), **hydrolýza Tween 80, produkce katalázy** (obvykle pozitivní).

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF umožňuje identifikaci komplexu, nikoli však druhu. Přistupuje se proto převážně k molekulárním metodám (PCR, fingerprintové metody, sekvenování apod.), které poskytnou další užitečné údaje z hlediska charakterizace kmene a epidemiologie.

2.3.5.7 Testování antibiotické citlivosti

Citlivost k antibiotikům se tradičně testovala agarovou metodou, založenou na počítání kolonií na médiích s příslušnou látkou a bez ní. Tato metoda je ovšem pracná a časově náročná. Rychlejší výsledky nabízejí většinou automatizované bujónové metody prováděné v mikrotitračních destičkách s řadou testovaných antibiotik, při nichž se růst měří radiometricky nebo fluorescenčně. Čím dál častěji se využívá detekce známých mutací PCR nebo sekvenováním.

2.3.5.8 Alergenodiagnostika a sérologie

Tuberkulóza skotu je od roku 1968 považována v ČR za utlumenou nákazu, k jejímuž zavlečení do chovu dochází jen výjimečně, nařizen je však pečlivý monitoring, založený na tzv. **tuberkulinaci**. Jedná se o zjištění hypersenzitivní reakce po intradermální aplikaci roztoku druhově nespécifických složek z *M. bovis*, tzv. PPD (purified protein derivative), u nás dostupný pod názvem Bovitubal. Zvířata, která se setkala s infekcí MTC, reagují hypersenzitivní reakcí IV. typu (oddálený typ hypersenzitivity, v podstatě buněčná imunitní reakce popsána výše). Zkouška se provádí pravidelně dle nařízení veterinární správy: místo aplikace (obv. na krku) se vyholí, kutimetrem se změří tloušťka kožní rasy a aplikuje se intradermálně 0,1 ml přípravku. Reakci posuzujeme za 72 hodin. Zesílení kožní rasy o více než 4 mm značí pozitivní reakci, rozdíl 2 – 4 mm se považuje za dubiózní. Test indukuje dočasnou desenzitizaci (anergii), takže opakování je možné teprve za 42 dní (stanoveno metodikou Státní veterinární správy). Falešně pozitivní reakce mohou být způsobeny zkříženou reakcí na netuberkulózní mykobakteria (v těchto případech může pomoci následná simultánní aplikace PPD z *M. avium* a posouzení obou reakcí, ovšem až po uplynutí 42 dnů), naopak falešně negativní bývá test u zvířat v rané fázi infekce nebo ve velmi pokročilých stádiích – tzv. anergentů, u nichž velké množství antigenů utlumilo hypersenzitivní reakci.

Tuberkulinace se může běžně provádět také u prasat a drůbeže. Používá se PPD z *M. avium* (Avitubal). U prasat se často přistupuje k simultánní aplikaci zároveň s PPD *M. bovis*. Totéž lze využít i u malých přežvýkavců, koní, psů, nebo i člověka, pokud nebyl očkovan. Koním a kozám se přípravek aplikuje stejně jako skotu na krku, u ovcí, prasat a psů využíváme dorzální plochu ušní boltce, kdežto u drůbeže lalůčky. Reakce se posuzuje za 48 hodin (72 hodin u skotu).

Poznámka: Robert Koch původně popsal v roce 1890 tuberkulin jako možné terapeutikum a prováděl pokusy na morčatech a lidech s *lupus vulgaris* (kožní tuberkulóza). Tito jedinci reagovali na injekci tuberkulinu do jiného místa zánětem a nekrózou primárních lézí, které se odlučovaly. Robert Koch to považoval za pozitivní jev, který brání rozšíření infekce do mízních uzlin. Bohužel u pacientů s pokročilou plicní tuberkulózou je efekt přesně opačný; dochází k reaktivaci infekce.

Sérologické testy detekující protilátky nejsou pro běžnou diagnostiku prakticky použitelné, neboť jsou málo citlivé a značně nespécifické. Výjimkou je tzv. **interferonový test**, založený na principu ELISA nebo ELISpot. Tento test detekuje hladinu INF γ , klíčového cytokinu buněčné imunitní odpovědi.

K nejučinnějším induktorům IFN γ patří sekreční antigen 6 (ESAT-6), který chybí u mnoha netuberkulózních mykobakterií, považuje se za specifitější než tuberkulinace.

Sérologie se naopak využívá v monitoringu paratuberkulózy v chovech skotu (ELISA, reakce vazby komplementu) u starších zvířat, ačkoli i zde je značné riziko falešně pozitivních nebo negativních výsledků. Kultivační vyšetření je však značně náročné a musí se provádět opakovaně a na větším množství vzorků, má-li odhalit asymptomatické nosiče. Alternativou je alergenodiagnostika, aplikace PPD z *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, tzv. **johninu**, která se provádí podobně jako tuberkulinace.

2.3.6 Terapie a profylaxe

Hovoříme-li o terapii tuberkulózy, pohybujeme se v oblasti humánní medicíny. U hospodářských zvířat, která mohou být zdrojem infekce pro člověka a u nichž se provádí pravidelný monitoring, terapie prakticky nepřichází v úvahu. I u domácích mazlíčků je možnost terapie spíše teoretická. Při rozvoji generalizované infekce bývá totiž už pozdě a tato zvířata představují riziko pro své okolí.

Totéž platí o paratuberkulóze; nakažená zvířata musí být ze stáda odstraněna.

Kožní a jiné formy infekce, u nichž se nepředpokládá významná nakažlivost, jako je například kočičí lepra, lze léčit kombinací chirurgického ošetření a antimikrobiální terapie (klofazimin, fluorochinolony, klarithromycin, doxycyklin aj.). Tradiční kombinaci léčiv při léčbě lepry člověka představuje rifampicin, klofazimin (Lampren) a dapson (diaminodifenylsulfon).

Terapie humánní tuberkulózy je velice obtížná a nese s sebou řadu rizik. Je nutné dodržovat přísný režim dlouhodobého podávání kombinace několika antituberkulotik, má-li být účinná, což je v rozvojových zemích nesnadné zajistit. Nedodržení režimu vede k rekurenci onemocnění a rozvoji rezistence. Řada používaných látek je toxických a jejich dlouhodobé intenzivní podávání se neblaze popisuje na funkci jater a jiných orgánů. Základem je šestiměsíční podávání izoniazidu a rifampicinu, v prvních dvou měsících ještě v kombinaci s pyrazinamidem a ethambutolem/streptomycinem (tzv. antituberkulotika první linie). V případě neúčinnosti nebo nepoužitelnosti přicházejí v úvahu látky druhé linie, k nimž patří fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin), aminoglykosidy (amikacin, kanamycin), polypeptidy (capreomycin, viomycin, enviomycin), cykloserin aj. K tzv. látkám třetí linie patří podpůrná terapeutika, jejichž účinnost je slabá nebo není spolehlivě prokázána, např. vitamin D.

Situaci komplikuje stále častější výskyt multirezistentních (MDR) a extenzivně rezistentních (XDR) kmenů. MDR kmeny vykazují rezistenci k základním terapeutikům, tj. rifampicinu a izoniazidu, XDR kmeny navíc k fluorochinolonom a některým dalším látkám druhé linie. Pojem totálně rezistentní kmeny (TDR) hovoří sám za sebe. Takové kmeny byly již identifikovány v asijských i evropských zemích.

Ještě v nedávných dobách se evropská populace plošně vakcinovala tzv. **vakcínou BCG** (*Bacillus Calmette-Guérin*). V současnosti je vakcinace vyhrazena pro děti ze sociálních skupin, u nichž se odhaduje zvýšené riziko nákazy. BCG je kmen *M. bovis*, který jeho objevitelé pasážovali v laboratorních podmínkách mezi lety 1908 a 1924. Během 231 pasáží došlo k delecí lokusu RD1 a dalším změnám vedoucím k výrazné atenuaci kmene. Přestože během let byly zkonstruovány další, modernější vakcíny, včetně subjednotkových a DNA vakcín, kmen BCG se stále považuje za nejučinnější, navíc je velmi bezpečný. Je určen k ochraně dětí před fatální generalizovanou tuberkulózou. Protektivní účinek se vytrácí během 10 – 20 let a účinnost podávání u dospělých je předmětem diskuzí, co se také odráží v odhadu účinnosti: 0 – 80 %. V podstatě to znamená, že účinnost záleží na okolnostech. Komplexní charakter imunitní odpovědi je důvodem, proč jsou výsledky tak rozporuplné. Jelikož řada imunogenních determinant je společná pro všechny druhy mykobakterií, existuje hypotéza, že zde hraje roli předchozí

expozice mykobakteriím z prostředí, jež poskytuje částečnou imunitu a nedovoluje patřičné pomnožení vakcinačního kmene. Novorozenci, jimž je BCG vakcína primárně určena, žádnou interferující imunitu nemají a vakcinace je u nich velmi účinná a bezpečná.

Tabulka 1 Klasifikace vybraných zástupců *Mycobacterium spp.*

Skupina	Zástupce	Hostitel	Klinický význam
Pomalů rostoucí - Komplex <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Ho, primáti, Ca, Bo, Su, papoušci Celosvětově	TBC
	<i>M. canetti</i>	Ho, východní Afrika	TBC
	<i>M. africanum</i>	Ho, západní Afrika	TBC
	<i>M. bovis</i>	Bo, volně žijící Ru, Ho, jezevec, Su, Fe aj. savci	TBC
	<i>M. microti</i>	Hraboš, někdy jiní savci (Fe, velbloudi)	TBC
	<i>M. caprae</i>	Cap, Bo	TBC
	<i>M. pinnipedii</i>	Tuleni, lachtani, někdy jiní savci	TBC
Pomalů rostoucí – fotochromogenní (Runyon I)	<i>M. kansasii</i>	Ho, Bo, volně žijící Ru, Su	Mykobakteriomy (kúže, plíce, MU)
	<i>M. simiae</i>	Ho, primáti	Mykobakteriomy (plíce, MU)
	<i>M. marinum</i>	Mořské a akvarijní ryby, obojživelníci, vodní savci, Ho	TBC ryb a obojživelníků Kožní infekce
	<i>M. vaccae</i>	Saprofyt	-
Pomalů rostoucí – skotochromogenní (Runyon II)	<i>M. scrofulaceum</i>	Su, Ru, Ho	Mykobakteriomy (MU)
Pomalů rostoucí – nechromogenní (Runyon III)	<i>M. avium ssp. avium</i>	Ptáci Ho, Su aj. savci	Ptačí TBC Mykobakteriomy (MU, plíce, střevo...)
	<i>M. avium ssp. hominis-suis</i>	Ho, Su	Mykobakteriomy (MU, plíce, střevo...)
	<i>M. avium ssp. silvaticum</i>	Ptáci (savci?)	TBC (mykobakteriomy)
	<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i>	Ru	Paratuberkulóza
	<i>M. intracellulare</i>	Ptáci Ho, Ru, Su, primáti Saprofyt	TBC Mykobakteriomy (MU, plíce, střevo...)
	<i>M. ulcerans</i>	Ho, Fe	Noduloulcerální kožní léze
	<i>M. xenopi</i>	Ho, Fe, žáby	Noduloulcerální kožní léze
	<i>M. lepraemurium</i>	Fe, hlodavci	Noduloulcerální kožní léze
Rychle rostoucí (Runyon IV)	<i>M. chelonae/M. abscessus</i>	Ryby Želvy Ho, Bo, Fe, Su	Diseminované infekce Plíce MU, disem. infekce
	<i>M. fortuitum</i>	Ho, Bo, Fe, Ca, Su, saprofyt	MU, mléčná žláza, kúže, diseminované infekce
	<i>M. phlei</i>	Saprofyt	Vzácně kožní léze
	<i>M. smegmatis</i>	Saprofyt	Vzácně kožní léze, mastitidy

Nezařazené	<i>M. leprae</i>	Ho (pásovec)	Lepra
------------	------------------	--------------	-------

Tabulka 2 Vnímavost hostitelských druhů k patogenním mykobakteriím

+++ - vysoká vnímavost (typický hostitel), ++ - značná vnímavost, + - vnímavost (oportunně), - - nízká nebo žádná vnímavost

Hostitel	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>
Ho (primáti)	+++	++	+
Bo	++	+++	+
Cap. Ov	-	+++	+
Su	+	++	+
Eq	-	++	++
Ca	++	++	+
Fe	++	++	+
Drůbež	-	-	+++
Kanáři	++	-	+++
Papoušci	++	-	-

3. Grampozitivní koky

3.1 Čeleď Micrococcaceae

Čeleď Micrococcaceae patří ke klinicky méně významným skupinám bakterií. Taxonomicky spadá do řádu Micrococcales kmene Actinobacteria. Zahrnuje aerobní nebo fakultativně anaerobní koky, které se vyskytují v prostředí a na živých organismech jako komenzálové. Některé druhy byly popsány v souvislosti s oportunními infekcemi imunokompromitovaných jedinců.

Titulní rod této čeledi, *Micrococcus*, patří mezi typické **komenzály kůže**, najdeme ho ale i běžně v prostředí. Jedná se o obligátně aerobní nepohyblivé koky, velké 0,5 až 3 μm, které vytváří typické **tetrády a kuboidní balíčky**. Jsou pozitivní na **katalázu a oxidázu**. Snáší dobře slané prostředí a podílí se na rozkladu aromatických složek potu. V souvislosti s oportunními infekcemi (bakteriémie, septická artritida, endokarditida) jsou izolovány vysloveně výjimečně a můžeme je považovat za nepatogenní mikroflóru kožních stěrů. Rostou snadno za aerobních podmínek na běžných médiích, ale i na manitolovém slaném agaru. Podobně jako stafylokoky tvoří poměrně velké **hladké pigmentované kolonie**, které se ale liší **vypouklým profilem**. Nejčastěji se setkáváme s jasně žlutými koloniemi *M. luteus*. *M. roseus* tvoří pigment narůžovělý, *M. lylae* krémový. Od stafylokoků je dále snadno odlišíme pozitivní oxidázou.

Druhým významným rodem je *Kocuria* spp., pojmenovaná po brněnském mikrobiologu Miroslavu Kocurovi, bývalém předsedovi Československé společnosti mikrobiologické. Také to jsou drobné nepohyblivé bakterie kokovitého tvaru, uspořádané v tetradách a balíčcích, můžeme však pozorovat i páry, krátké řetízky nebo nepravidelné hrozníčky. Na rozdíl od mikrokoků jsou negativní na oxidázu. Jsou aerobní, ale některé druhy nebo kmeny jsou schopny růst i bez kyslíku. Patří k běžným bakteriím **prostředí** (půda, voda), některé najdeme na kůži a sliznicích savců. Často kontaminují potraviny, např. mléko či kuřecí maso, a v potravinářských podnicích často tvoří smíšené biofilmy s *L. monocytogenes*. Někdy je však jejich přítomnost dokonce žádoucí – podílí se např. na vyzrání suchých salámů italského typu. Některé druhy byly asociovány s nosokomiálními infekcemi, zejména močového traktu (tvoří biofilmy v katetrech). Na běžných médiích tvoří různé **pigmentované nehemolytické kolonie** a dříve byly často zaměňovány za stafylokoky, ačkoli kolonie jsou mnohem drobnější.

K. rosea tvoří typický růžový pigment. Jejím zdrojem je půda a voda a patří mezi **oportunní močové patogeny**, podobně jako *K. kristinae*, jejímž primárním rezervoárem je pravděpodobně lidská kůže a sliznice dutiny ústní. Ta tvoří bledě zbarvené kolonie. Žlutě pigmentovaná *K. varians* se vyskytuje na kůži i v prostředí a byla asociována hlavně s očními infekcemi (endoftalmitidy). *K. rhizophila* se také může podílet na infekcích, především se ale používá v potravinářství jako standard při testování antibiotických reziduí (je citlivá k penicilinu).

Rothia spp. jsou **nepohyblivé tyčinky** preferující **aerobní prostředí**. Mnohé z nich jsou součástí **orální mikroflóry** savců a ptáků a sporadicky vyvolávají oportunní infekce. *R. dentocariosa* bývá izolována ze zubních kazů, ale může způsobit i systémovou infekci, jako je bakteriémie a endokarditida. Podobně i opouzdřená *R. mucilaginoso*, která se při průniku z míst přirozeného výskytu podílí na infekcích spojených s biofilmem (především plicních nebo systémových). Je pro ni typická rezistence k chinolonovým chemoterapeutikům. *R. nasimurium*, původně izolovaná u myši, je typickým orofaryngeálním komenzálem psů. Bývá také izolována i z dýchacích cest papoušků, ale zpráv o jejím klinickém významu je málo.

Dalším zajímavým zástupcem je i rod *Arthrobacter* (ř. arthros – kloub), pojmenovaný podle zvláštního způsobu dělení; tzv. „snapping“ neboli lusknutí, kdy dochází k praskání buněčné stěny

v místě jakýchsi kloubů. Typicky roste jako tyčinka v exponenciální fázi růstu, zatímco ve fázi stacionární nabývá podoby koku. Nemá klinický význam, komerčně se využívá při produkci glutamátu.

3.2 Čeleď Staphylococcaceae

Čeleď Staphylococcaceae patří do řádu Bacillales, třídy Bacilli a kmene Firmicutes.

3.2.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky velikosti 0,5 – 1,5 μm , typicky uspořádané v nepravidelných **shlucích a hroznech** (Staphylos v řecké mytologii byl synem boha vína Dionýsa). Jsou **nepohyblivé, fakultativně anaerobní** a většinou využívají sacharidy **fermentativně**. Fermentaci sacharidů lze použít k druhové identifikaci. Typickým znakem je **pozitivní katalázová** a **negativní oxidázová zkouška**, kterými je lze obvykle odlišit od streptokoků a mikrokoků. Dalším typickým znakem je přirozená rezistence k bacitracinu, rezistence k žlučovým solím a značná **halotolerance** (růst až při 10 % NaCl).

Interakce stafylokoků s hostitelskými organismy sahá od asymptomatické kolonizace přes povrchové infekce až k invazivním systémovým infekcím. Záleží při tom na druhu bakterie, virulenci kmene (produkci toxinů a dalších faktorů virulence), ale také na zdravotním stavu a imunitním statutu hostitele; za určitých okolností, zejména při poškození přirozených bariér, mohou všechny druhy stafylokoků způsobit závažné onemocnění.

Je známo přibližně 40 druhů stafylokoků, které řadíme k 11 geneticky příbuzným skupinám: např. skupina *S. aureus*, skupina *S. hyicus-intermedius*, skupina *S. epidermidis*, skupina *S. saprophyticus* a další. Z hlediska klinické praxe se však lépe uplatňuje jednoduché dělení na tzv. **koaguláza-pozitivní (CoPS)** a **koaguláza-negativní (CoNS) stafylokoky**, podle produkce tzv. **volné koagulázy**, enzymu, který způsobuje srážení králičí plazmy. Koaguláza-pozitivní stafylokoky jsou považovány za typické patogeny, vyznačující se produkcí velkého množství faktorů virulence, zatímco koaguláza-negativní druhy jsou oportunními patogeny, které se v infekci uplatní pouze při závažném porušení obranných bariér. CoPS představují druhy *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* (variabilní reakce), *S. lutrae* a *S. schleiferi* ssp. *coagulans*. Dělení dle produkce koagulázy není stoprocentně přesné, vyskytují se kmeny, které dané schéma nedodržují (některé kmeny *S. aureus* plazmu nekoagulují, některé kmeny *S. chromogenes* naopak ano). V rozlišování CoNS se uplatňuje zkouška s novobiocinem: *S. saprophyticus* je přirozeně rezistentní, zatímco *S. epidermidis* citlivý.

Příbuzný rod *Macroccocus*, vyznačující se velkými sférickými buňkami (1 – 2,5 μm), nemá z klinického hlediska větší význam.

3.2.1.1 Výskyt

Stafylokoky jsou součástí běžné **mikroflóry kůže a sliznic**. V prostředí se přirozeně nevyskytují, zdrojem kontaminace jsou hostitelské organismy. K nejběžněji kolonizovaným místům patří nosní sliznice, dále perineum, podpaží, vlasové folikuly aj. Zatímco značná část populace napříč hostitelskými druhy se vyznačuje dlouhodobým nosičstvím CoPS, kolonizace koaguláza-negativními druhy je téměř stoprocentní. CoNS také snadněji kolonizují různá místa na těle. Jak CoPS, tak CoNS vykazují značnou afinitu k určitým hostitelským druhům; tak například přirozeným hostitelem *S. aureus* je zřejmě člověk, běžně bývá izolován též z drůbeže, prasat a koní, ale u psů bývá nacházen minimálně (příčemž primárním zdrojem je zřejmě opět člověk). Naopak psi, kočky, ale i koně a další zvířata jsou hostiteli jiného koaguláza-pozitivního druhu, *S. pseudintermedius*. *S. pseudintermedius* byl v nedávné době vydělen z druhu *S. intermedius*, přičemž se předpokládá, že většina izolátů původně identifikovaných jako *S.*

intermedius byl ve skutečnosti tento druh. Hostitelem *S. hyicus* je prase, ale též skot a drůbež. Podobnou hostitelskou afinitu nacházíme u CoNS: člověk je běžně kolonizován druhy *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, zatímco u zvířat nalézáme častěji *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. felis* (kočka), *S. devriesei* (skot), *S. gallinarum* (drůbež) aj.

Z epidemiologického hlediska je zásadní zjištění, že populace stafylokoků je výrazně klonální. Specifické virulentní klonální linie, které získaly určitý set faktorů virulence a rezistence (především **kmeny rezistentní k meticilinu, tzv. MRSA**), asociované často s určitou komunitou a určitým typem onemocnění, mají tendenci přicházet v jakýchsi epidemických vlnách, kdy na jistém území po jistý čas získávají převahu nad jinými klonálními liniemi. Žádný vysloveně pandemický kmen zatím nebyl popsán. Předmětem epidemiologického monitoringu jsou především kmeny MRSA. Původní nikou těchto kmenů byly nemocnice – typické nosokomiální kmeny se označují **HA-MRSA** (healthcare-associated) -, kde ohrožovaly imunokompromitované a jinak oslabené pacienty. V době poměrně nedávne však byl zaznamenán nárůst infekcí MRSA bez souvislosti s hospitalizací, způsobených značně specifickými, vysoce virulentními kmeny **CA-MRSA** (community-associated/acquired). Ty mají tendenci způsobovat závažné invazivní infekce i u jedinců jinak zdravých; může se jednat pouze o folikulitidy a kožní abscesy, ale také nekrotizující pneumonie a fasciitidy. Tyto klonální linie obvykle produkují leukocidin a další toxiny (viz dále) a většinou bývají citlivé k ostatním antibiotikům, zatímco HA-MRSA bývají multirezistentní. Příkladem CA-MRSA je hypervirulentní kmen amerického původu USA300 (ST8), v Evropě je to zejména ST80. Je jasné, že tyto kmeny se s hospitalizovanými lidmi dostávají do prostředí nemocnic a hranice mezi CA-MRSA a HA-MRSA se zastírá. Pro veterináře mají ovšem zvláštní význam zoonotické kmeny *S. aureus* adaptované na hospodářská zvířata. V Evropě je to především ST398, za jehož hlavní rezervoár se považují prasata, ale vyskytuje se i u koní, skotu nebo drůbeže.

3.2.1.2 Patogenita

3.2.1.2.1 Koaguláza-pozitivní stafylokoky

Převážně lidský patogen *S. aureus* je ze všech stafylokoků nejlépe prostudován, je takřikajíc modelovou grampozitivní bakterií, ale mnohé z jeho charakteristik platí podobně i pro ostatní CoPS, zejména *S. pseudintermedius*. CoPS jsou schopni dlouhodobě kolonizovat predilekční místa svých hostitelů zcela asymptoticky, ovšem se zvýšeným rizikem vzniku povrchové či závažné systémové infekce.

Nejběžnější jsou stafylokokové **kožní infekce** různého charakteru; folikulitidy, pyodermie, celulitidy, infekce ran a spálenin. U králíků typické pododermatitidy a podkožní abscesy. *S. aureus* izolujeme zejména z člověka, koní, prasat, drůbeže nebo králíků, zatímco u psů a koček se setkáváme častěji s druhem *S. pseudintermedius*. Mezidruhový přenos je však běžný.

Koně hospitalizovaní na klinikách jsou často ohroženi endemickými rezistentními kmeny stafylokoků, způsobujícími těžko léčitelné **infekce operačních ran**. Kromě toho jsou častými původci metritid. Podobně jako u lidí, infekce ran, intravenózních katetrů a různých chirurgických implantátů může vést k systémové diseminaci infekce se vznikem **endokarditidy, pneumonie, septické artritidy a osteomyelitidy** či **tromboflebitidy**.

Osteomyelitida může vznikat hematogenním rozšířením z jiného místa infekce nebo přímým průnikem v důsledku traumatu, např. otevřenými zlomeninami. Bakterie a neutrofilové se hromadí v kostních kanálcích a brání krevní, což může vést k nekróze a vzniku kostních sekvestrů. I stafylokoková pneumonie může být původu hematogenního, nebo se jedná o bronchopneumonii. Pneumonie způsobené stafylokoky nejsou běžné, ale obvykle závažné. Extrémně ohroženou kategorií u člověka jsou dlou-

hodobě ležící polymorbidní pacienti, ale i mimo nemocnice se můžeme setkat s těžkými **nekrotizujícími pneumoniemi** jako komplikací např. chřipkové infekce, které způsobují některé velmi virulentní linie (typicky CA-MRSA produkující tzv. Pantonův-Valentinův leukocidin).

Prakticky totéž platí pro infekce psů a koček. *S. pseudintermedius* je zde také častým původcem **otitid** a **cystitid**.

Stafylokokóza drůbeže se projevuje omfalitidou a zánětem žloutkového váčku, septikemií, artritidou a osteomyelitidou a kožními infekcemi, zejména tzv. „bumblefoot“, zánětem chodidlové plochy běháků.

S. aureus je jedním z nejvýznamnějších původců **kontagiózních mastitid** u dojnic. Zdrojem infekce není náhodná kontaminace z prostředí, ale přenos z jedince na jedince, nejčastěji prostřednictvím dojících zařízení. Průběh může být mírný nebo subklinický, ale výjimkou nejsou ani těžké gangrézní mastitidy s poškozením celkového zdravotního stavu. Akutní zánět může přejít do chronicity, léčba bývá obtížná a rekurence častá; *S. aureus* je zodpovědný za tak podstatné produkční ztráty, že se často k léčbě ani nepřistupuje.

Kmeny *S. hyicus* produkující exfoliativní toxin způsobují tzv. **exfoliativní epidermitidu selat**. Netoxinogenní i toxinogenní kmeny běžně kolonizují kůži dospělých prasat, která jsou zdrojem infekce pro selata. Spouštěčem infekce je kožní poranění, způsobené například souboji mezi selaty. Poškození svrchní vrstvy epidermis exfoliativním toxinem vede ke zvýšené exsudaci, jež začíná obvykle na hlavě a šíří se po celém těle. Exsudát zasychá a vytváří hnědavé krusty. Malá selata hynou důsledkem dehydratace.

U člověka se setkáváme s podobným stavem, tzv. **syndromem opařené kůže**, který vzniká u novorozenců a silně imunosuprimovaných jedinců a je též spjat s produkcí exfoliatinů. Typické je zarudnutí a slupování velkých ploch pokožky (tzv. Nikolského příznak).

Další dva syndromy jsou také asociovány s produkcí specifických toxinů: syndrom toxického šoku a **otravy z potravin**. K otravám dochází při kontaminaci potravin kmenem *S. aureus* produkujícím některý z enterotoxinů, nejčastěji typ A. Zejména bývají kontaminovány lahůdkové potraviny, jako je šunka, saláty, zmrzlina, které necháváme stát delší dobu při teplotě vyšší než chladničkové, čímž umožníme pomnožení bakterií a produkci toxinů. Jelikož tyto toxiny jsou termostabilní, ani následná tepelná úprava již nepomůže. Nástup příznaků po otravě je rychlý, přibližně za šest hodin se objevuje průjem, zvracení a silné bolesti hlavy.

Syndrom toxického šoku je sice poměrně vzácným, zato extrémně nebezpečným stavem, který může vzniknout v souvislosti s jakoukoli masivnější stafylokokovou infekcí, např. pneumonií nebo infekcí rány. Původně byl popsán ve 20. letech po smrti řady dětí očkovaných kontaminovanou vakcínou. V 80. letech docházelo k případům toxického šoku u menstrujících žen – důvodem bylo pomnožení bakterie v hygienických tamponích (současné hygienické pomůcky obsahují méně rizikové materiály, ale přesto je třeba dodržovat doporučenou dobu zavedení). Toxický šok s horečkou, poklesem krevního tlaku a erytematózní vyrážky po celém těle nastupuje velmi rychle. Hypotenze vede k multiorgánovému selhání.

3.2.1.2.2 Koaguláza-negativní stafylokoky

CoNS zvolily méně agresivní životní strategii; kolonizují hostitelské druhy s vysokou prevalencí a samy od sebe klinické onemocnění nezpůsobují; jako patogeny se uplatní jen v případě závažného oslabení obranyschopnosti hostitele. V humánní medicíně patří mezi typické nosokomiální patogeny. Snadno kolonizují zejména cizí tělesa, jako např. venózní a močové katetry, umělé chlopně, kloubní náhrady a jiné chirurgické implantáty, kde rostou ve formě biofilmu. V dalším stádiu se z biofilmu mohou uvolňovat septické tromby s následkem valvulární endokarditidy, septické tromboflebitidy

apod. CoNS jsou častými původci peritonitidy při peritoneální dialýze a septikémie, pneumonie nebo meningitidy předčasně narozených dětí nebo závažně imunosuprimovaných pacientů. Kromě toho *S. saprophyticus* je druhým nejčastějším původcem (po *E. coli*) **zánětů močových cest** u žen.

Ve veterinární medicíně mají CoNS význam při infekcích operačních ran. U skotu bývají často izolovány z případů **mastitid**. Ty bývají častěji mírné až subklinické. Nejčastěji se zde uplatňuje *S. chromogenes*, dále *S. simulans*, *S. xylosus* aj. Při izolaci typických lidských kolonizátorů (např. *S. epidermidis*) se dá předpokládat, že zdrojem byl člověk.

Z klinického a epidemiologického hlediska je velmi významné zjištění, že rezistence k metocilinu je mezi CoNS ještě častější než u CoPS. CoNS tak mohou hrát roli jako rezervoár a zdroj genů rezistence pro druhy způsobující vážné infekce.

3.2.1.3 Faktory virulence

S. aureus je pozoruhodně přizpůsobivou bakterií, která dovede k okamžiku „přepnout“ a z mírumilovného kolonizátora sliznic se stává ničivý agresor – a naopak. Toto schizofrenní chování je ve skutečnosti pečlivě řízeno řadou regulačních systémů, které spouští a vypínají expresi faktorů virulence, které podle situace umožňují bakteriím tvorbu biofilmu, dlouhodobou povrchovou kolonizaci, uvolnění z biofilmu, invazivní infekci s poškozením hostitelských buněk a extracelulární matrix, modulaci imunitní odpovědi a intracelulární přežívání a perzistentní infekci ve formě tzv. SCV (small colony variant). Jednotlivé faktory virulence účinkují ve vzájemné shodě, uplatňují se v různých stádiích infekce a zasahují obranné systémy hostitele na různých úrovních. Dá se předpokládat, že agresiny typu superantigenů, způsobující závažné, často smrtelné systémové reakce, mají ještě jinou roli, protože úhyn hostitelského organismu nepředstavuje pro bakterii žádnou evoluční výhodu. Stav typu syndromu toxického šoku lze považovat z hlediska bakterie i hostitele za fatální nedopatření.

Faktory virulence stafylokoků si můžeme pro zjednodušení rozdělit na povrchové molekuly, které slouží většinou jako adheziny nebo k interakci s imunitním systémem, exoenzymy a exotoxiny. Buněčná stěna stafylokoků obsahuje **peptidoglykan** a **lipoteichovou kyselinu**, které patří mezi molekuly rozpoznávané buňkami imunitního systému a spouštějící produkci cytokinů. Společně vyvolávají příznaky toxického šoku. Některé kmeny stafylokoků produkují **kapsulární polysacharidy**. Kromě toho mnohé stafylokoky produkují také polymer N-acetylglukosaminu zvaný **polysacharidový intercelulární antigen (PIA)**, kódovaný lokusem *ica*, který hraje roli v agregaci buněk při formaci biofilmu. Lokus *ica* je častý u velmi virulentních kmenů, ačkoli i negativní kmeny jsou schopny tvořit biofilm.

Stafylokoky tvoří velkou skupinu povrchových **adhezínů**, zvaných **MSCRAMMs** (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), zprostředkujících vazbu k různým molekulám extracelulární matrix, jako je fibronectin, laminin, vitronektin nebo kolagen. Jsou důležité pro kolonizaci různých tkání a tvorbu biofilmu. Příkladem může být **Bap** (protein asociovaný s biofilmem) nebo **Bbp**, který váže kostní sialoprotein a má význam při patogenezi osteomyelitidy, ale také tzv. **vázaná koaguláza** (clumping factor) A a B, potencující tvorbu fibrinových sraženin kolem bakterie. Patří sem i protein vázající von Willebrandův faktor (**vWbp**), který účinkuje v součinnosti s volnou koagulázou. Nejznámějším příkladem je stafylokokový **protein A**. Zde však vzniká jistý zmatek v nomenklatuře, protože *S. aureus* produkuje celou řadu podobných proteinů, které mohou vázat fibronectin a další bílkoviny extracelulární matrix. Nejznámější funkcí stafylokokového proteinu A (SpA), kódovaného genem *spa*, je vazba Fc konce imunoglobulinů G, čímž poskytuje bakterii silnou ochranu před fagocytózou a aktivací komplementu (Fc konec IgG je ligandem receptorů fagocytujících buněk). Jeho modulační účinky na imunitní systém jsou však zřejmě mnohem širší. Je schopen vázat i Fab konce různých imunoglobulinů včetně receptorů B lymfocytů; funguje jako jejich superantigen (viz níže) a brání efektivní protilátkové odpovědi.

S. aureus produkuje další povrchové proteiny, které přímo modulují funkce imunitního systému. Je to například tzv. **SCIN** – stafylokokový inhibitor komplementu, který blokuje jak klasickou, tak alternativní cestu aktivace tohoto systému, nebo protein inhibující chemotaxi – **CHIPS**. Ten blokuje receptory neutrofilů pro chemotaktiny, konkrétně C5a složku komplementu.

Mezi exoenzymy je na prvním místě třeba zmínit **volnou koagulázu**. Tento enzym vazbou k trombinu (v součinnosti s výše zmíněným vWbp) vytváří tzv. stafylostrombin, který konvertuje fibrinogen na fibrin. Fibrinové sraženiny kolem bakteriální buňky jí poskytují ochranu před fagocytózou a komplementem. Enzym **stafylokináza** (fibrinolyzin) fibrinové sraženiny naopak štěpí.

Stafylokoky netvoří bičíky ani jiné prostředky aktivního pohybu. Přesto se dokážou šířit napačenou tkání a přesouvat se z místa na místo. V tom jim pomáhají tzv. spreading faktory, většinou enzymy, štěpící složky extracelulární matrix a fungující v součinnosti s adheziny. Mezi ně patří především **hyaluronidáza** a množství proteáz (**proteáza V8**, **aureolyzin**, **stafopain** aj.). Jejich primární funkcí je získávání živin, avšak mohou štěpit také imunoglobuliny a jiné molekuly imunitního systému; mají tedy i funkci obrannou. Kolonizaci míst s množstvím mazových žláz napomáhá enzym **lipáza**.

Virulence stafylokoků je do značné míry dána produkcí **toxinů**. Ty mají jednak charakter cytotoxinů a hemolyzinů (stafylokokový α toxin, β toxin, γ toxin a PVL, σ toxin a fenol-solubilní modulin) a jednak tzv. superantigenů (exfoliativní toxiny, enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku).

Toxin α je nejsilnější hemolyzin (projevuje se úplnou hemolýzou na krevním agaru). Vytváří póry v buněčných membránách, což vede k efluxu draselných a influxu sodných iontů a lýze buňky. Kromě erytrocytů poškozují i bílé krvinky, endotel nebo hepatocyty. Přisuzuje se mu ještě další, nepřímá funkce; aktivací proteáz štěpících E-cadherin mezibuněčných spojů umožňuje aktivní průnik bakterie epiteliálními bariérami. **Toxin β** je **sfigomyelináza**, hydrolyzující membránové fosfolipidy a způsobující částečnou hemolýzu na krevním agaru. **Toxin γ** je jedním ze stafylokokových bikomponentních **leukotoxinů**. Jedná se o toxiny složené ze dvou proteinových podjednotek, které podobně jako α toxin vytvářejí póry v membránách a působí zejména proto neutrofilům a jiným fagocytům. γ toxin je produkován skoro vždy a má hemolytickou aktivitu; naproti tomu tzv. **Pantonův-Valentinův leukocidin** není hemolyzinem a jeho produkce je typická jen pro některé specifické kmeny, zejména pro tzv. CA-MRSA (community-acquired) asociované s případy nekrotizujících pneumonií. **σ toxin** je jedním z tzv. **fenol-solubilních modulinů** (PSM α , PSM β a σ toxin). Jsou to malé peptidy s funkcí detergentů, poškozující membrány řady buněk včetně neutrofilů. Pomáhají též rozpouštět biofilm a vysoká míra exprese je typická pro nejvirulentnější kmeny.

Exfoliativní toxiny (ET) jsou proteázy štěpící desmozomální junkce keratinocytů, které drží pohromadě stratum granulosum a stratum spinosum epidermis. Jejich účinkem dochází k tvorbě puchýřů a ke slupování svrchní vrstvy kůže. Exfoliatiny produkované *S. hyicus* štěpí selektivně porcinní desmoglein a pouze toxinogenní kmeny jsou schopny vyvolat exsudativní epidermitidu, ET A a B. *S. aureus* jsou zodpovědné za vznik syndromu opařené kůže u člověka a podobný toxin byl identifikován i u *S. pseudintermedius* v souvislosti s pyodermií psů. Nová zjištění jim přisuzují i funkci superantigenů.

Superantigeny neboli pyrogenní toxiny jsou molekuly, které zprostředkují vazbu variabilních domén receptorů T-lymfocytů s molekulou MHC-II, vyvolávající tak nespecifickou polyklonální aktivaci T-lymfocytů. Nepřiměřená a necílená imunitní odpověď s masivní produkcí prozánětlivých cytokinů vede k projevům toxického šoku. Nejznámějším stafylokokovým superantigenem je **TSST-1** (toxin syndromu toxického šoku) *S. aureus*, nicméně stejným způsobem účinkují též stafylokokové enterotoxiny, pokud se dostanou do cirkulace. **Enterotoxiny** jsou zodpovědné za otravy z potravin, ale mechanismus jejich účinku na trávicí trakt není objasněn; vyvolávají zánětlivou odpověď a stimulují mastocyty, což je pravděpodobně příčinou emeze. Enterotoxiny (A – X) a enterotoxinům podobné toxiny byly identifikovány u *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, vzácně i u různých CoNS. Produkce toxinů je závislá na vnějších podmínkách a hustotě bakteriální populace; je potřeba určitého času na pomnožení

bakterií v kontaminované potravíně nebo infikované tkáni, aerobní atmosféry a neutrálního pH. Při vzniku toxického šoku se superantigeny vstřebávají do cirkulace. Enterotoxiny jsou rezistentní k trávicím enzymům a nelze je odstranit tepelnou úpravou.

Jak již bylo řečeno, tak široký arzenál různých faktorů virulence, často i s protichůdnou funkcí, vyžaduje sofistikované řízení v reflexi měnících se podmínek okolí. Bylo identifikováno velké množství **regulátorů**, které řídí spouštění různých funkčních skupin faktorů virulence v různých stádiích infekce, spolupracují spolu a vytváří provázanou regulační síť. Známy systém **Agr** (accessory gene regulator) je jenom jedním z nich. Je to systém *quorum sensing*, který po dosažení denzity populace spouští expresi faktorů nutných pro získání živin a únik imunitnímu systému, zejména různé cytolyzinů a hydrolytických toxinů, zatímco exprese kolonizačních faktorů je spíše tlumena. Obrazně řečeno v atmosféře existenční tísně tak bakterie přepínají na drsnější a invazivnější životní strategii. Extrémně vysoká exprese tohoto systému je také typická pro hypervirulentní klony *S. aureus*. V optimálních podmínkách jsou signální molekuly tohoto systému vychytávány a jeho funkce inhibována.

S vysokou virulencí mohou být asociovány i některé méně nápadné determinanty, které ovlivňují adaptivitu svých nositelů. Tzv. **ACME** (arginin catabolic mobile element) je genomický ostrov s řadou metabolických funkcí, které v důsledku zvyšují schopnost kolonizovat různá místa na těle, perzistenci na kůži a rezistenci k nespecifické imunitní odpovědi, čímž napomáhá snadnějšímu šíření z jedince na jedince. Tento element má původ u koaguláza-negativního *S. epidermidis*, ale přenos na *S. aureus* dal vznik například hypervirulentnímu epidemickému kmeni USA300.

3.2.1.4 Patogeneze

Zdrojem stafylokoků jsou přechodní nebo trvalí nosiči. CoPS mají tendenci **kolonizovat** určitá místa na těle, především nosní sliznici a nosohltan, zatímco nika CoNS je méně specifická. Předpokladem **invazivní infekce** jsou kompromitované epiteliální bariéry důsledkem traumatu nebo zavedením katetrů a implantátů, toxinogenní CoPS jsou však schopny do jisté míry samy aktivně penetrovat neporušenou sliznici nebo kůži. Role exfoliativních toxinů v této souvislosti je zřejmá, nicméně také α toxin způsobuje narušování mezibuněčných spojů, neboť aktivuje proteázy, které štěpí E-cadherin. Hyaluronidáza, proteázy a další enzymy a adheziny (MSCRAMM) napomáhají pohybu extracelulární matricí.

V dalším stádiu infekce musí bakterie vypořádat s útokem imunitního systému a s nedostatkem živin, obsadit a ustálit se v nově dobytém „území“. Produkují toxiny (hemolyziny, leukotoxiny), které poškozují buňky imunitního systému, brání se fagocytóze vyvazováním a štěpením imunoglobulinů a opsoninových složek komplementu. Účinkem koagulázy se bakterie obklopují fibrinovými sraženinami, které brání přístupu fagocytů i složkám komplementu. Fagocytovaným buňkám umožňují toxiny únik z fagozomu do cytoplazmy; superoxidodismutáza a žlutý pigment stafyloxantin je chrání před účinkem kyslíkových radikálů. Běžným výsledkem tohoto boje je **formace abscesu**. V centru se nachází živé bakteriální buňky, obklopené množstvím nekrotických i živých fagocytů. Zbytky nekrotických buněk se mění v lepkavý hnis. Protože se bakterie množí, uvnitř abscesu brzy začíná být těsno a nedostatek živin; o to víc jsou produkovány proteázy a cytolyziny, které pomáhají získat živiny z poškozených buněk. Nebezpečí představují i systémově vstřebávané toxiny. Výsledkem může být únik bakterií a rozšíření zánětu do okolí, prolomení abscesu, uvolnění septických trombů do cirkulace a systémová diseminace zánětu, nebo často zdánlivé vítězství imunitního systému, vstřebání abscesu, případně „remíza“, přechod do chronicity.

Stafylokoky často obsazují neživé (např. katetry), ale i živé povrchy (nosní sliznice při chronické rhinitidě, srdeční chlopně) ve formě **biofilmu**. Iniciální roli zde hrají opět adheziny MSCRAMM, zatímco exopolysacharid PIA, extracelulární DNA a další molekuly tvoří základ biofilmové matrice. Kanálky přivádějící vodu a živiny se tvoří účinkem fenol-solubilních modulinů a proteáz.

Stafylokokové infekce nezřídka přecházejí do chronicity. Předpokládá se, že principem **perzistence** je „přepnutí“ fenotypu, vznik tzv. SCV (small colony variants). SCV jsou buňky s redukováným metabolismem, které neprodukují cytolyziny, ale exprimují hodně adhezinů, především proteiny vázající fibronektin (FnBPs). Dochází k utlumení systému Agr. Tyto varianty vyvolávají minimální imunitní odezvu a nachází se převážně intracelulárně, přičemž internalizací zipovým mechanismem zprostředkují nejspíš právě zmíněné FnBPs. Jsou-li bakterie kultivovány v tomto stádiu, tvoří velice drobné kolonie na pevném médiu, odtud jejich jméno. Při změně podmínek jsou však schopny velice rychle „přepnout“ zpět na plně virulentní variantu a snadno dochází k relapsu onemocnění.

3.2.1.5 Diagnostika

Diagnostika stafylokokových infekcí je obvykle nekomplikovaná, ačkoli význam nálezu musí být interpretován s ohledem na místo izolace a klinické příznaky, neboť nosičství i toxinogenních CoPS je běžné. Vhodné vzorky závisí na typu infekce: stěry kůže a kožních lézí, stěry operačních ran, výtěry z ucha, moč, děložní výtěry, mléko, kloubní, pleurální punktáty, plicní výplašky, obsah abscesů aj. Někdy je užitečné provést orientační přímé mikroskopické vyšetření; velké množství nepravidelných shluků grampozitivních koků podpoří výsledek kultivačního vyšetření. Klinické vzorky většinou kultivujeme standardně na **běžných médiích, za přístupu kyslíku při 37°C**. Obvykle už po 24 hodinách pozorujeme **okrouhlé, poměrně velké kolonie (3 – 5 mm) s plochým profilem, typicky hladké a pigmentované**. Barva kolonií nabývá různých odstínů podle druhu a kmene od porcelánově bílé (typická pro *S. hyicus*) přes nažloutlou, našedlou, kávovou po tlumeně oranžovou (často *S. aureus*). Hemolýza je různá; až na výjimky nebývá u CoNS, naopak CoPS jako *S. aureus* a *S. pseudintermedius* často produkují několik typů hemolyzinů, takže kolem kolonií lze pozorovat **dvě i více hemolytických zón (úplné i neúplné)**. Masivní nárůst takových kolonií i ve smíšené kultuře lze považovat za signifikantní nález; ojedinělé kolonie vyžadují opatrnější interpretaci.

V některých případech je indikováno použití selektivně-diagnostických médií, jako je **manitolový slaný agar** nebo **Baird-Parker agar**. Můžeme také využít halotolerance bakterií k pomnožení vzorku ve **slaném bujónu**. Média pro stafylokoky obsahují 7,5 – 10 % NaCl. Tato koncentrace tlumí růst většiny ostatních bakterií. Selektivní kultivace nachází uplatnění především při kultivaci vzorků z potravin; při vyšetřování otrav stafylokokovými enterotoxiny je však nutno brát v potaz, že bakterie v potravině už nemusí být přítomny. Manitolový slaný agar slouží k detekci fermentace manitolu (např. *S. aureus*), která se projevuje zežloutnutím média. Při růstu negativních druhů se růžová barva média nemění. Baird-Parker agar obsahuje vaječný žloutek, kvasničný extrakt, pyruvát sodný a teluricitan. *S. aureus* na něm tvoří typické černé kolonie obklopené zónou projasnění.

Při kultivaci vzorků mléka na diagnostiku původců mastitid přímo v terénu se velmi často uplatňují **chromogenní média**. Nejvýhodnější jsou misky se třemi různými médii, selektivní pro stafylokoky, streptokoky a enterokoky a pro gramnegativy. Chromogenní médium pro stafylokoky inhibuje růst dalších dvou skupin a umožňuje orientační určení druhu podle barvy kolonie. Předběžnou diagnózu je však nutno potvrdit klasickým laboratorním vyšetřením.

Výsledek kultivačního vyšetření můžeme doplnit pomocnými testy, jako je katalázová a oxidázová zkouška (s výjimkami K⁺, O⁻), koagulázový test, test rezistence k novobiocinu u CoNS. Biochemické multitesty a hmotnostní spektrometrie umožní definitivní druhovou identifikaci.

Produkcí **volné koagulázy** (pro rozdělení CoPS a CoNS) zjišťujeme tzv. **zkumavkovým testem**. Testovanou kulturou inokulujeme králičí plazmu ve zkumavce a inkubujeme při 37°C. Během 4 – 24 hodin by mělo dojít ke sražení a ztuhnutí plazmy. Je ovšem důležité provádět časté pravidelné kontroly, protože po určité době dochází opět ke ztekucení vlivem hydrolytických enzymů a pozitivní reakce by nemusela být zaznamenána. **Skličkovým testem** zjišťujeme přítomnost tzv. **vázané koagulázy**

(clumping faktoru). Tento test je jednodušší, do kapky PBS na sklíčku nanese se kličkou kolonii testovaného kmene, přidáme kapku králičí nebo lidské plazmy a během několika sekund pozorujeme sražení směsi.

Kultivační nález stafylokoků je automaticky následován vyšetřením citlivosti k antibiotikům. Kromě běžně používaných látek je třeba otestovat také „antistafylokokové“ betalaktamy pro záchyt kmenů rezistentních k meticilinu (MRSA/MRSP/MRCoNS atd.). Místo meticilinu se v testech dříve používal oxacilin, dnes se preferuje použití cefoxitinu; rezistence k tomuto cefalosporinu indikuje meticilin-rezistentní kmen.

Epidemiologický monitoring, zejména při záchytu meticilin-rezistentních kmenů, vyžaduje podrobnější charakterizaci. Dříve se používala tzv. fágová typizace. Podle citlivosti či rezistence k setu 23 různých bakteriofágů byl testovaný kmen označen jako určitý fagotyp. Tato metoda je dnes nahrazována efektivnějšími molekulárními metodami. Základem je určení sekvenčního typu metodou MLST (multi-locus sequence typing). Užitečnými pomocnými metodami je např. typizace genů pro protein A (*spa* typing) a operonu *agr* (biotypy *agr* I, II, III, IV jsou do značné míry asociovány s určitými syndromy). Při charakterizaci MRSA se uplatňuje určení typu SCC*mec* (staphylococcal chromosome cassette), mobilního genetického elementu nesoucího rezistenci k meticilinu. Existuje 13 typů SCC*mec*.

3.2.1.6 Terapie

Problematika antibiotické rezistence stafylokoků je obsáhlé téma. Prokáže-li se tedy jakýkoli druh stafylokoků jako původce infekce, testy citlivosti musí být provedeny zcela samozřejmě. Jako antibiotika první volby lze zvážit běžné látky širokospektrální nebo s primárním spektrem účinku proti gram pozitivním bakteriím, jako jsou tetracykliny, potencionované sulfonamidy, betalaktamy a linkosamidy. Rezistence k jednoduchým penicilinům je však dnes tak rozšířená, že je lze předem pokládat za neúčinné a zvažovat účinnější varianty, jako jsou **aminopeniciliny potencionované kyselinou klavulanovou, cefalosporiny nižších generací** (cefalotin) nebo „antistafylokokové“ **peniciliny** jako je meticilin, oxacilin nebo kloxacilin. Poslední jmenované jsou účinné i vůči kmenům, které produkují betalaktamázy. **Kmeny MRSA** (respektive MRSP, MRCoNS atd.), nesoucí gen *mecA* nebo jinou variantu genu pro **alternativní protein vázající penicilin (PBP2)**, jsou **rezistentní prakticky ke všem betalaktamovým antibiotikům včetně karbapenemů**. Další látky s účinkem na buněčnou stěnu, glykopeptidy (vancomycin), jsou s ohledem na nebezpečí vzniku částečné rezistence (VISA) vyhrazeny pro kritické případy humánních infekcí, kdy se podávají parenterálně. **Linkomycin** a zejména silnější **klindamycin** se používají pro léčbu stafylokokových osteomyelitid a abscesů u psů a koček, neboť dobře pronikají do kostí a do míst zánětu, je zde však riziko nepříznivého ovlivnění rovnováhy střevní mikroflóry a vzniku pseudomembranózní kolitidy, jak je známo u lidí. Z toho důvodu by se neměly používat u býložravců. Z amidoglykosidů přichází v úvahu prakticky jen gentamicin, přičemž citlivost musí být potvrzena. Také rezistence k tetracyklinům je velmi rozšířená; látka třetí generace tigecyklin je však doporučován na léčbu infekcí MRSA. Rezistence k tetracyklinům je typická u LA-MRSA ST398 a kmenů HA-MRSA, které bývají obvykle multirezistentní, na rozdíl od typických CA-MRSA, které kromě SCC*mec* další determinanty rezistence většinou neobsahují.

Volba antimikrobika by tedy měla postupovat přibližně takto: v první řadě ověřit citlivost k základním penicilinům, poté postupovat k antistafylokokovým penicilinům a v případě rezistence zvažovat linkosamidy. Teprve při infekci multirezistentním kmenem MRSA přicházejí v úvahu nové látky, jako je **tigecyklin, daptomycin** nebo **linezolid**.

Tabulka 3 Význam jednotlivých druhů *Staphylococcus spp.* u různých hostitelů

Hostitel	Původce	Onemocnění
Psi, kočky	<i>S. pseudintermedius</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. felis</i> aj.)	Pyodermie, abscesy, infekce ran, otitidy, osteomyelitidy, močové infekce
Koně	<i>S. aureus</i> , <i>S. pseudintermedius</i>	Infekce ran, dermatitidy, septické artritidy, abscesy
Prasata	<i>S. aureus</i> , <i>S. pseudintermedius</i> <i>S. hyicus</i>	Infekce ran, dermatitidy, septické artritidy Exsudativní epidermitis
Skot	<i>S. aureus</i> , koaguláza-negativní stafylokoky	Mastitidy, metritidy, abscesy, dermatitidy, septické artritidy
Drůbež	<i>S. aureus</i>	Omfalitidy, septické artritidy, dermatitidy
Králíci	<i>S. aureus</i>	Podkožní abscesy, pododermatitidy, metritidy, mastitidy

3.3 Čeleď Streptococcaceae

Čeleď Streptococcaceae řadíme do řádu Lactobacillales třídy Bacilli kmene Firmicutes.

3.3.1 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* je nejvýznamnějším zástupcem čeledi Streptococcaceae z řádu Lactobacillales, který zahrnuje **grampozitivní bakterie vyznačující se negativní katalázovou reakcí**. Mnohé z nich se řadí mezi tzv. **LAB (lactic acid bacteria)**, bakterie produkující laktát jako hlavní produkt nebo jeden z produktů fermentace cukrů. Kataláza-negativním grampozitivním kokům s okrajovým klinickým významem se bude věnovat samostatná kapitola.

Streptokoky jsou sférické, někdy ovoidní grampozitivní koky, měřící v průměru 1 µm, které se typicky dělí pouze v jedné rovině – mají tedy tendenci vytvářet **páry až řetízky**, na rozdíl od stafylokoků, tvořících nepravidelné shluky. Delší řetízky pozorujeme zejména v tekutých médiích, jako je např. mléko. Streptokoky jsou **nepohyblivé**, mají obligátně **fermentativní typ metabolismu** a řadí se mezi **fakultativní anaeroby**, přestože vyšší koncentrace CO₂ často podpoří růst mnohých druhů. Hlavním produktem fermentace sacharidů je laktát. Zásadním odlišovacím znakem od stafylokoků je zmíněná negativní katalázová reakce. (Výjimkou je kataláza-pozitivní druh *S. didelphis*, izolovaný z vačice.)

3.3.1.1 Klasifikace

Klasifikace streptokoků je poměrně komplikovaná a vychází z historické tradice; opírá se o morfologické znaky, klinický význam a sérologii.

Podle typu hemolýzy rozlišujeme skupinu **betahemolytických streptokoků** a **alfahemolytických (viridujících)/nehemolytických streptokoků**. Dřívější biologické členění znalo 5 skupin: **1) pyogenní**; **2) orální**; 3) mléčné (dnes *Lactococcus* spp.); 4) enterální (dnes *Enterococcus* spp.) a 5) anaerobní. Většina zástupců z posledních tří skupin je dnes zahrnuta v samostatných rodech či dokonce čeledích. První dvě skupiny do jisté míry splývají s předchozím členěním dle hemolýzy. Tak hovoříme o **pyogenních betahemolytických streptokokcích**, které zahrnují většinu nejvýznamnějších patogenů, a **orálních/viridujících streptokokcích**, z nichž většina představuje komenzály sliznic s oportunní patogenitou. Setkáváme se ovšem s výjimkami, např. některé pyogenní streptokoky produkují variabilní hemolýzu podle poddruhu nebo kmene (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*). *S. pneumoniae* (známý pneumokok) je typicky viridující a je velmi těžko odlišitelný od nepatogenních orálních druhů.

Sérologické členění se opírá o přítomnost **skupinového polysacharidového antigenu** a **kyseliny teichoové** v buněčné stěně a rozpoznává **20 skupin dle Lancefieldové** (nazvaných podle mikrobioložky Rebecky Lancefieldové), značených velkými písmeny A – V (některá písmena jsou vynechána). Sérotypizace se dnes provádí latexovou aglutinací. Některé druhy mohou tvořit různé antigeny, některým naopak tento antigen chybí. Historicky se klasifikace vztahuje na širší spektrum příbuzných grampozitivních koků, než je rod *Streptococcus* v dnešním smyslu – proto zahrnuje i laktokoky, enterokoky a některé další rody.

3.3.1.2 Výskyt

Streptokoky jsou typickými obyvateli sliznic **dutiny ústní a trávicího traktu, horních cest dýchacích a pohlavních orgánů**. Na kůži se vyskytují pouze přechodně. Jsou poměrně citlivé ve vnějším prostředí, zejména k vyschnutí. Zdrojem infekcí patogenními streptokoky je především fenomén **asymptomatického nosičství** (na tonzilách, v porodních cestách apod.).

Orální streptokoky patří k typické ústní mikroflóře a jejich role je ambivalentní. Vysoké počty zejména *S. mutans* jsou asociovány se zubním kazem, naopak *S. dentisani* působí protektivně jako ústní probiotikum. *S. salivarius* v kombinaci s laktobacily může omezit nosičství *S. pyogenes*, produkuje totiž bakteriociny, které omezují jeho růst.

3.3.1.3 Patogenita

3.3.1.3.1 Skupina pyogenních streptokoků

Modelovým příkladem pyogenních hemolytických streptokoků je *S. pyogenes*. Je to humánní patogen se skutečně širokým záběrem, od nekomplikovaných infekcí horních cest dýchacích a kůže po invazivní infekce doprovázené toxickým šokem a autoimunitními poruchami. S asymptomatickou kolonizací hltanu se setkáváme jen asi u 5 % dospělé populace, 30 – 70 % dětí. Právě u dětí způsobuje běžně **akutní tonzilitidu**, doprovázenou celkovými příznaky a čepy na mandlích. Při prvním setkání s tímto patogenem se může vyvinout tzv. **spálou** se vznikem charakteristické vyrážky. Dnes díky penicilinu tato onemocnění probíhají ve většině případů v akutní fázi bez komplikací, dříve bývala spála často smrtelná. I po nekomplikované tonzilitidě či faryngitidě však hrozí nebezpečí **autoimunitních komplikací** (tzv. sterilní následky, když již patogen nemusí být v organismu přítomen) ve formě revmatické horečky (s postižením srdečních chlopní a pohybového aparátu) a glomerulonefritidy.

Kromě toho je *S. pyogenes* běžným původcem **kožních zánětů** (impetigo, celulitis), **zánětů středního ucha**, ve vážných případech též **seps**e a **nekrotizující fasciitidy**. Tyto invazivní infekce jsou obvykle spojeny se sérologickými typy MT1 a MT3 (typ povrchového M proteinu). Také hnisavé kožní infekce způsobují jiné kmeny než angíny. Je zajímavé, že následkem kožních infekcí může vzniknout glomerulonefritida, nikoli však revmatická horečka. Dříve velmi obávaná **puerperální seps**e (tzv. horečka omladnic) vznikala následkem nehygienicky vedeného porodu. Právě její příčinu zkoumal „otec asepsy“, maďarský lékař Ignác Semmelweis. Velmi nebezpečnou akutní komplikací zejména invazivních forem infekcí (např. fasciitida, masivní infekce poškozené kůže aj.) je streptokokový syndrom toxického šoku, spojený s produkcí superantigenů.

S. agalactiae je patogenem člověka a skotu; u **skotu** je jedním z nejvýznamnějších původců **kontagiózní mastitidy** a v mléčné žláze působí jako primární patogen. Identifikace infikovaných jedinců a jejich odstranění ze stáda je proto nezbytným předpokladem ozdravení. Streptokoková mastitida má spíše chronický průběh s občasnými akutními fázemi a může vést k postupné involuci vemene a agalaktii. U **člověka** se *S. agalactiae* nachází jako komenzál GIT a vaginální sliznice. Odhaduje se, že je kolonizováno 10 – 30 % zdravých dospělých. U kolonizovaných matek vzniká nebezpečná infekce novorozence – *S. agalactiae* je totiž hlavním původcem **neonatálních sepsí, meningitid a pneumonií** v prvním týdnu života. Provádí se proto preventivní vyšetření. Důležité je, že infekce skotu a člověka způsobují odlišné kmeny a *S. agalactiae* proto není považován za zoonotický patogen. Na základě kapsulárního antigenu odlišujeme 9 sérotypů *S. agalactiae*.

Zatímco *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* se skupinovým antigenem C je spojován zejména s **mastitidami skotu**, druhý poddruh, ssp. *equisimilis* se vyznačuje vyšší virulencí u širokého spektra hostitelů. Různé kmeny mohou produkovat antigeny C, G nebo L a některé dokonce získaly rekombinací

antigen A jako *S. pyogenes*; způsobují velice podobné **invazivní infekce**, ba dokonce byly popsány stejné autoimunitní následky. U zvířat se setkáváme zejména s **metritidou u koní, artritidou a endokarditidou u prasat a neonatálními infekcemi a pneumoniemi štěňat a koťat**.

Také *S. equi* má dva poddruhy; ssp. *equi* je primárním patogenem koní, způsobující tzv. **hřiběcí** (angl. strangles), ssp. *zooepidemicus* je velmi běžným oportunním patogenem spojeným s širokou škálou **hnisavých infekcí**, jako je **bronchopneumonie a pleuritida, lymfadenitida, mastitida, metritida, hnisavá artritida, nefritida a sepse** novorozenců, u široké škály hostitelů. Kromě koní se s ním setkáváme u prasat, skotu a malých přežvýkavců, drůbeže, někdy i u psů či morčat.

S. equi ssp. *equi* je naproti tomu striktně adaptován na koňovité, u nichž kolonizuje a infikuje horní cesty dýchací a vzdušné vaky. **Hřiběcí, nakažlivá rhinofaryngitida**, se nejčastěji projevuje u hříbat od třetího měsíce věku výtokem z nozder s horečkou a typickým otokem mandibulárních mizních uzlin. Dochází k hnisání a abscedaci mizních uzlin, které se mohou provalit ven nebo do vzdušného vaku. V některých případech také dochází k pyogenní diseminaci a vzniku metastatických abscesů v orgánech, např. v dutině břišní, plicích nebo mozku (tzv. maligní hřiběcí neboli bastard strangles). U starších či částečně imunizovaných koní probíhá infekce mírněji jako serózní zánět horních cest dýchacích. Po vyzdravení vzniká často dlouhodobé asymptomatické nosičství na sliznici vzdušného vaku. Takoví jedinci jsou hlavními šířiteli infekce.

Podobně jako *S. pyogenes* u lidí, je i *S. equi* ssp. *equi* asociován s rizikem vzniku autoimunitních postinfekčních komplikací; v tomto případě se jedná o tzv. **hemoragickou purpuru**, hypersenzitivní reakci III. typu (imunokomplexovou), která se přibližně 3 týdny po infekci projevuje horečkou, podkožními otoky a hemoragiemi sliznic.

S. porcinius je dalším pyogenním streptokokem, způsobující **nakažlivou cervikální lymfadenitidu u selat** především v poodstavovém období. Jedná se o jakousi prasečí formu hřiběcí.

S. canis je sledovaným patogenem psů i koček, neboť způsobuje **aborty** a nebezpečné **neonatální invazivní infekce**. Kolonizuje orofaryngeální, anální a genitální sliznici dospělých zvířat. Epizootické aborty a infertilita v chovu bývaly popisovány příležitostně v minulosti, zřejmě spojeny s určitými virulentními kmeny. Tzv. juvenilní streptokokóza s hnisavou mandibulární lymfadenitidou vzniká v poodstavovém období při poklesu mateřských protilátek. *S. canis* byl spojen taktéž s **nekrotizující fasciitidou** a jinými infekcemi měkkých tkání, doprovázenými syndromem toxického šoku. *S. canis* je příležitostně izolován jako patogen člověka (případy bakteriemií, močových a jiných oportunních infekcí).

S. iniae a *S. hongkongensis* jsou **patogeny ryb**. *S. iniae* je invazivní patogen, způsobující v akvakulturách pstruhů, tilapií a jiných ryb epizootická vzplanutí **septikemie s poškozením CNS**, projevující se exophthalmem, nervovými příznaky (poruchy plavání, dorzální rigidita). Může dojít k zoonotickému přenosu na lidi manipulující s rybami, s rizikem vzniku endokarditid, meningitid a septických artritid. Patogen pravděpodobně proniká přes kožní oděrky.

3.3.1.3.2 Alfahemolytické, orální a další streptokoky

Mezi velkým množstvím tzv. **nepyogenních streptokoků**, z nichž většina je komenzály sliznic s oportunní patogenitou, rozlišujeme několik genetických skupin: skupina *S. mitis*, kam patří mimo jiné také *S. pneumoniae*, skupina *S. mutans*, skupina *S. salivarius* a skupina *S. anginosus*. Obývají sliznice zejména dutiny ústní, orofaryngu a genitálií. Druhy skupiny *S. bovis* (*S. gallolyticus*, *S. equinus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis*) exprimují skupinový antigen D a obývají trávicí trakt člověka, drůbeže, skotu a jiných zvířat. Svým významem zvláště stojí druhy *S. suis*, *S. uberis* a *S. parauberis* a *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae, tzv. pneumokok, je nejběžnějším původcem komunitních (tedy – nikoli nosokomiálních) **pneumonií u člověka**. Způsobuje také **otitis media** a **meningitidy** dětí i dospělých a **aborty** či poškození plodu u žen. Asymptomatická kolonizace horních cest dýchacích především u dětí je častá (až 60 %). *S. pneumoniae* je označován za specifický humánní patogen, což není zcela přesné, protože jsou dokumentovány respirační infekce koní, psů a laboratorních hlodavců, pravděpodobně specifickými klony. Chybí mu specifický skupinový antigen dle Lancefieldové, sérologické rozlišení je dáno kapsulárními typy a kyselinou teichoovou (tzv. substance C).

Další druhy skupiny *S. mitis* (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. infantis*) způsobují oportunní infekce imunokompromitovaných jedinců (**pneumonie, endokarditidy, sepse**). *S. mutans* je obzvláště asociován také se **zubním kazem**. Rizikovými faktory jsou například malignity, ale i zubařské zákroky, umožňující průnik většího množství orálních bakterií do krve. Podobný klinický význam má i skupina *S. bovis*, zejména *S. gallolyticus* ssp. *gallolyticus*, poměrně častý původce endokarditid.

Zástupci skupiny *S. anginosus* se vyznačují úplnou hemolýzou na krevním agaru. Patří však mezi komenzály člověka, příležitostně izolované z mozkových abscesů a peritonitid. Od ostatních beta-hemolytických streptokoků se liší velmi drobnými koloniemi (do 0,5 mm).

S. suis je heterogenní druh, poměrně blízký pyogenním streptokokům, a velmi významný **patogen prasat se zoonotickým potenciálem**. Způsobuje **pneumonie, meningoencefalitidy, artritidy, sepse a endokarditidy prasat**, sporadicky je izolován i u jiných druhů zvířat. Rozeznáváme 35 kapsulárních sérotypů (nověji 29, další sérotypy jsou vyřazovány jako samostatné druhy *S. suis*-like), přičemž některé z nich (např. sérotypy 2 a 14) jsou vysoce rizikové zoonotické patogeny, vyvolávající podobné invazivní infekce u lidí v kontaktu s prasaty. Sérotypy se liší také virulencí a geografickou distribucí. *S. suis* běžně asymptomaticky kolonizuje tonzily zdravých prasat. Vznik a průběh onemocnění ovlivňuje mnoho faktorů, nejčastěji se však streptokokóza projevuje v podstavovém věku. K příznakům patří horečka, kulhání a zduření kloubů, respirační a především výrazné nervové příznaky (opistotonus, plovací pohyby, tonicko-klonické křeče, parézy aj.).

S. uberis a blízké příbuzný *S. parauberis* jsou velmi běžné bakterie izolované z **mastitid**. Na rozdíl od *S. agalactiae* nepatří mezi typické kontagiózní původce, naopak jsou poměrně odolné v prostředí, kolonizují tonzily a GIT, vyskytují se v hnoji a snadno tak kontaminují vmeno. Jejich význam narůstá u starších a zasušených krav.

3.3.1.4 Faktory virulence

Pyogenní streptokoky exprimují širokou škálu faktorů virulence. U všech skupin streptokoků však najdeme především různé typy **adhezínů**. Tzv. **MSCRAMM, molekuly vázající proteiny extracelulární matrix**, umožňují kolonizaci predispozičních tkání, jako jsou tonzily, ústní dutin, srdeční chlopně nebo strukový kanálek. Imunogenní molekuly mohou spouštět autoimunitní reakce. Imunogenní vlastnosti mají i jednotlivé strukturálně odlišné typy **skupinových polysacharidů buněčné stěny** a **kyselina teichoová** (skupina D). Mnohé druhy exprimují polysacharidovou kapsulu, která kromě adhezivních vlastností chrání bakterie před účinky imunitního systému. Vedle Lancefieldové schématu, rozlišujícího skupinové antigeny, může být sérologická typizace u jednotlivých druhů streptokoků založena na rozpoznávání kapsulárních a jiných povrchových antigenů (např. M protein *S. pyogenes*).

M protein *S. pyogenes* a podobné povrchové proteiny, které nacházíme u *S. dysgalactiae*, *S. equi* ssp. *equi* a *S. canis*, je šroubovicová molekula na povrchu buněčné stěny, která váže fibrinogen a IgG, má antifagocytární účinky a funguje jako kolonizační faktor. M protein *S. pyogenes* je sérologicky

variabilní; uplatňuje se v typizaci kmenů. Obzvláště významná je jeho role při vzniku postinfekčních autoimunitních komplikací.

K dalším příkladům streptokokových adhezínů patří **protein F** (vázející fibrinogen) *S. pyogenes*, **PsaA** (pneumokokový povrchový adhezín) *S. pneumoniae* a *S. equi*, umožňující kolonizaci dýchacích cest, **protein G** *S. dysgalactiae* aj.

Charakteristickým znakem *S. pyogenes* a *S. equi* je produkce **kapsuly z kyseliny hyaluronové**, zodpovědné za mukózní vzhled kolonií. Zatímco *S. equi* ssp. *equi* produkuje kapsulu konstitutivně, u poddruhu *zoepidemicus* se často pasážováním ztrácí nebo chybí vůbec. Hyaluronát je přirozenou součástí hostitelských tkání, funguje tedy jako „mimikry“; je špatně rozpoznatelný pro buňky a molekuly imunitního systému. Kapsuly *S. agalactiae*, *S. suis* a *S. pneumoniae* jsou tvořeny jinými polysacharidy.

S funkcí adhezínů úzce souvisí účinek některých enzymů, které štěpí proteiny extracelulární matrix nebo spouští koagulační kaskádu, usnadňující invazi do tkání a únik před imunitním systémem. Přispívají k hnisavým procesům a vzniku abscesů. K nim patří různé **proteázy**, **kolagenáza**, **hyaluronidáza**, **neuraminidáza** a streptokináza. **Streptokináza** je enzym, který konvertuje plasminogen na plasmin, a tak způsobuje degradaci fibrinových sraženin. **C5a peptidáza** štěpí danou složku komplementu. **Deoxyribonukleázy** štěpí uvolněnou nukleovou kyselinu a umožňují tak únik z tzv. neutrofilových extracelulárních pastí. DNáza B je imunogenní a protilátky proti ní se zjišťují diagnosticky.

Většina pyogenních druhů se vyznačuje výraznou hemolýzou, za niž jsou zodpovědné toxiny s hemolytickou aktivitou, oxygen-labilní **streptolyzin O** a oxygen-stabilní **streptolyzin S**. Streptolyzin S způsobuje širokou zónu úplné hemolýzy. Je velmi potentním cytotoxinem, poškozující řadu nejen krevních buněk, a tak hraje významnou roli v patogenezi invazivních infekcí. Mimo jiné působí kardiotoxicky. Betahemolytický účinek streptolyzinu O (zvaný **pneumolyzin** nebo **suilyzin** u *S. pneumoniae*, respektive *S. suis*) může být pozorován pouze za anaerobních podmínek. Váže cholesterol buněčných membrán a způsobuje vznik pórů. Na rozdíl od streptolyzinu S je imunogenní. Protilátky proti němu mohou být využity v diagnostice postinfekčních imunopatologických následků.

S. agalactiae produkuje tzv. **CAMP faktor**, protein vázející ceramid, který má cytotoxické účinky a váže Fc oblast protilátek. Z diagnostického hlediska má význam jeho interakce se sfingomyelinázou (betatoxinem) *S. aureus*, ústící v potenciaci hemolýzy. Látky podobné CAMP faktoru jsou známy i *S. canis* a některých kmenů *S. uberis* (tzv. *uberis* faktor)

Tzv. streptokokový syndrom toxického šoku je spojen především se závažnými formami infekcí měkkých tkání, např. nekrotizující fasciitidou. Je způsoben tzv. **streptokokovými pyrogenními toxiny (SPE)** s účinkem superantigenů, produkovanými některými kmeny streptokoků skupiny A (*S. pyogenes*, některé kmeny *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*), ale podobné toxiny jsou popisovány i u zvířecích patogenů, především *S. equi* ssp. *equi* a ssp. *zoepidemicus*. Virulentní kmeny *S. canis* také způsobují nekrotizující fasciitidou a syndrom toxického šoku, pyrogenní toxin *S. canis* však nebyl identifikován. U *S. pyogenes* byla popsána již celá řada pyrogenních toxinů a superantigenů, nejznámější jsou však **SpeA**, **SpeB** a **SpeC**. Superantigeny zprostředkují vazbu molekuly MHC-II s variabilním řetězcem T-lymfocytů, čímž spouští jejich masivní nespecifickou aktivaci. Pyrogenní toxiny souvisí se vznikem vyrážky při spále a systémovými příznaky při toxickém šoku, jako je hypotenze, vyrážka a multiorgánové selhání. SpeB není superantigenem, jedná se o cysteinovou proteázu asociovanou s poškozením tkání při invazivních infekcích. Pyrogenní toxiny *S. equi* ssp. *equi* a ssp. *zoepidemicus* byly pojmenovány **SeeI**, **SeeL** a **SeeM**, respektive **SzeF**, **SzeN** a **SzeP**.

3.3.1.5 Patogeneze

Streptokoky efektivně kolonizují predilekční místa a specificky adherují k epitelu tonzilární tkáně, dýchacích cest, strukového kanálku nebo kůže. Enzymy a toxiny přispívají k poškození a invazi hlouběji do tkáně. Bakterie se vážou k proteinům extracelulární matrix a degradují je, zároveň je kapsula či jiné povrchové molekuly včetně M proteinu účinně brání proti fagocytóze a účinkům komplementu. Výsledkem je **hnisavý proces**. Hnisavé tromby se mohou uvolňovat do krve a tvořit metastázy. V krvi streptokoky dále reagují s imunitním systémem, spouští koagulační kaskádu a imunopatologické reakce, jako je toxický šok.

K nepříjemným, často fatálním komplikacím pyogenních streptokokových infekcí patří **imunopatologické následky**. I nekomplikovaná streptokoková faryngitida může vést ke vzniku **glomerulonefritidy** nebo **revmatické horečky**, charakterizované zánětlivým poškozením kloubů (artritida), srdce (myokarditida), CNS (chorea) a kůže (erythema marginatum a podkožní noduly). Glomerulonefritida nastává též následkem kožních infekcí *S. pyogenes*. Jejich patogenese není dosud přesně objasněna, v úvahu přichází několik možných mechanismů či jejich kombinace. Typickým následkem hřiběcí (*S. equi* ssp. *equi*) je tzv. **purpura hemorrhagica**, s projevy poškození endotelu, otoky a hemoragiemi, následkem depozice imunokomplexů. Hypersenzitivita III. typu (imunokomplexová) pravděpodobně hraje roli i při vzniku glomerulonefritidy. Jiným možným mechanismem je ukládání různých bakteriálních proteinů v glomerulech a přímá aktivace komplementu a zkřížená imunologická reakce mezi určitými typy M proteinu a antigeny glomerulů, v důsledku čehož dojde k senzitivaci imunitního systému vůči vlastním tkáním. Také přímé poškození tkání streptokokovými toxiny a enzymy může vést k jejich alteraci, takže imunitní systém na ně začne reagovat. Tyto imunopatologie se ovšem projevují jen u malého procenta postižených; individuální citlivost je pravděpodobně dána geneticky.

Streptokoky proniknuvší do cirkulace snadno **adherují na odhalené molekuly extracelulární matrix**, například v místě **poškozeného endotelu** nebo fibrinových sraženin. Pyogenní i orální streptokoky, zejména druhy obzvláště asociované se vznikem endokarditid, silně aktivují bradykininový systém a koagulační kaskádu. Adherují na odhalený kolagen valvulárního endotelu a spouští zánětlivou reakci.

Streptokoková mastitida může mít akutní průběh, často však přechází do chronicity. *S. agalactiae* a další původci mastitid **kolonizují strukový kanálek** a sekreční epitel; zřídka pronikají hlouběji do tkáně. Zánět vede k nahromadění fibrinových sraženin, ucpaní vývodných kanálků a postupné **involuci sekreční tkáně**. Výsledkem je agalaktie.

3.3.1.6 Diagnostika

Streptokoky mimo své přirozené slizniční prostředí jsou poměrně labilní, především k vyschnutí. To je třeba mít na paměti při odběru vzorků – stěry je nutno vždy odebírat do transportního média. Stěry mandlí, HCD, vaginální či rektální sliznice mohou sloužit nejen k detekci infekce, ale také asymptomatického nosičství (např. *S. pyogenes*, *S. suis*). Například preventivní vyšetření budoucích matek na přítomnost *S. agalactiae* je silně doporučeno. Nosičství *S. equi* ssp. *equi* ve vzdušných vacích lze zjišťovat endoskopicky odebranými vzorky. K dalším vhodným vzorkům patří **punktáty lézí, výplašky dýchacích cest, mléko, krev, cerebrospinální tekutina** apod.

Vzorky lze orientačně vyšetřovat přímo mikroskopicky. Zejména v tekutých médiích, například mléce nebo hnisu z abscesů při hřiběcí, mají streptokoky tendenci vytvářet dlouhé řetízky a jsou snadněji detekovatelné. Naopak *S. pneumoniae* se typicky jeví jako pár lancetovitých (kopíčkovitých) koků. Někdy mají streptokoky sklon ztrácet grampozitivitu.

Základem spolehlivé diagnostiky je tradičně kultivační vyšetření. Většina streptokoků roste bez problému za běžných podmínek na obohaceném médiu, např. **krevním agaru**, jejich poměrně nenápadné kolonie se ale někdy mohou ztrácet ve směsi rychleji rostoucích bakteriálních kontaminant. Mnohé druhy, především viridující, preferují zvýšenou tenzi CO₂ a rostou dobře anaerobně.

Při zpracování hlenovitých vzorků je vhodné použít látky se ztekucujícím účinkem, např. N-acetylcystein. Takový postup zvyšuje záchytnost; platí to zejména při kultivaci *S. pneumoniae* ze sputa.

K selektivní izolaci streptokoků může sloužit **agar s kolistinem a kyselinou nalidixovou (CNA)** nebo **Edwardsův agar**, používaný zejména pro kultivaci mléka při diagnostice mastitid.

Kolonie streptokoků jsou **šedé, bezbarvé až průsvitné a spíše drobné**, okolo 1 mm po 24 – 48 hodinách, ale mohou být větší. Kolonie *S. canis* mají často tuhou, suchou konzistenci, lze je posunovat kličkou po agaru a těžko se rozpouštějí. Důležitým rozpoznávacím znakem je **hemolýza**, díky níž lze izolát na první pohled orientačně zařadit do dvou hlavních skupin. Někdy je to však zrádné, ne vždy pyogenní druhy jsou zároveň betahemolytické. Jiným výrazným znakem některých pyogenních streptokoků (*S. equi* ssp. *equi*, *S. pyogenes*) je nápadné pouzdro z kyseliny hyaluronové, zodpovědné za **mukózní vzhled** kolonií. *S. equi* ssp. *zooepidemicus* je při primokultivaci také nejčastěji mukózní.

Přítomnost hyaluronátového pouzdra lze snadno prokázat **dekapsulačním testem**. Testovaný kmen streptokoka se inokuluje kolmo na kultivační čáru laboratorního kmene *S. aureus*, produkujícího enzym hyaluronidázu. V místě styku dojde k nápadnému poklesu hlenovité kultivační čáry streptokoka díky vymizení pouzdra.

Zatímco humánní kmeny *S. agalactiae* a *S. dysgalactiae* jsou obvykle betahemolytické, mastitidní kmeny mají často hemolýzu nekonzistentní a těžko se rozlišují od *S. uberis* a *S. parauberis*. Jistou pomůckou může být **CAMP test**. *S. agalactiae*, produkující tzv. CAMP faktor, reaguje pozitivně. *S. dysgalactiae* (oba poddruhy), nehledě na způsobovanou hemolýzu, nijak nereagují. Jistá část kmenů *S. uberis* produkuje látku podobnou CAMP faktoru a může reagovat pozitivně. Principem testu je **synergické působení dvou látek s hemolytickou aktivitou**, produkovanými dvěma bakteriálními kmeny, projevující **zvýrazněním hemolýzy** (může jít o vznik hemolýzy tam, kde normálně nevzniká, jsou-li kmeny kultivovány samostatně; zintenzivnění částečné hemolýzy na úplnou; rozšíření užší zóny úplné hemolýzy apod.). V tomto případě CAMP faktor reaguje s betatoxinem *S. aureus*, způsobujícího částečnou hemolýzu. Bakterie jsou na sebe kultivovány kolmo stejně jako u výše popsaného dekapsulačního testu. V místě styku inokulačních čar vzniká oblast úplné hemolýzy typického tvaru šípkové hlavičky.

Kromě hmotnostní spektrometrie slouží k rodové a druhové identifikaci suspektních kolonií řada biochemických a jiných pomocných testů. Streptokoky jsou **negativní na katalázu a oxidázu**, což je především odlišuje od stafylokoků. Rozlišení streptokoků od enterokoků může být větším problémem. Hlavním rozlišovacím testem je hydrolyza eskulinu nebo kultivace na žluč-eskulinovém agaru (viz enterokoky), v případě streptokoků negativní.

V identifikaci *S. pyogenes* se uplatňují dva testy: **citlivost k antibiotiku bacitracinu** a tzv. **PYR test**. Ten detekuje přítomnost enzymu pyrrolidonyl arylamidázy, způsobující zčervenání činidla v testovacím disku (enzym je přítomen u *S. pyogenes*, *S. porcinus*, ale také enterokoků, aerokoků a jiných podobných bakterií).

Rozlišení *S. pneumoniae* od běžných orálních viridujících streptokoků může být také oříšek. Charakteristická **centrální deprese kolonií** nevzniká vždy. Uplatňuje se proto tzv. **optochinový test**: *S. pneumoniae* je k této látce citlivý a kolem jím napuštěného disku na agaru vzniká inhibiční zóna.

Komerční biochemické multitesty zaměřené na streptokoky a enterokoky jsou pochopitelně také dostupné.

3.3.1.7 Léčba

Streptokoky obecně vykazují konzistentně dobrou citlivost k **penicilinu G**, který je antibiotikem první volby a často se nasazuje empiricky. Nabízí se řada alternativ (ampicilin, cefalosporiny, chloramfenikol, potencované sulfonamidy, fluorochinolony), ale je vždy vhodné provést testy citlivosti.

Tabulka 4 Charakteristika nejdůležitějších druhů streptokoků

Druh	Antigen dle Lancefeldové	Hemolýza	Hostitel	Klinický význam	Významné faktory virulence	Zvláštní diagnostické znaky
<i>S. pyogenes</i>	A	β	Ho	Tonzilitida, respirační infekce, revmatická horečka a glomerulonefritida, kožní hnisavé infekce, puerperální sepse, nekrotizující fasciitida, syndrom toxického šoku	M protein a další adheziny Kapsula (kys. hyaluronová) Pyrogenní exotoxiny Spe Streptolyzin S, O Streptokináza Proteázy, DNáza, hyaluronidáza aj.	M fáze Citlivost k bacitracinu PYR test +
<i>S. agalactiae</i>	B	α, β, γ	Ho, Bo	Neonatální sepse (Ho), mastitida	Kapsula Povrchové proteiny CAMP faktor Hyaluronidáza Proteáza Csp	CAMP test + Hydrolyzá hipurátu sodného
<i>S. equi ssp. equi</i>	C	β	Eq	Hřiběcí, hemoragická purpura	Kapsula (kys. hyaluronová) M protein Povrchové proteiny Streptokináza Streptolyzin S Pyrogenní exotoxiny Proteázy	M fáze
<i>S. equi ssp. zooepidemicus</i>	C	β	Eq, Bo, Su, Ho	Hnisavé infekce, septikemie	Kapsula (kys. hyaluronová) Povrchové proteiny Streptolyzin S Streptokináza Proteázy	M fáze (ne vždy)
<i>S. dysgalactiae ssp. equisimilis</i>	A, C, G, L	β	Ho, Eq, Bo, Su, Ca, Fe	Hnisavé a invazivní infekce (podobné <i>S. pyogenes</i>); artritida prasat	Protein G aj. povrchové proteiny M-like proteiny Streptokináza Hyaluronidáza Streptolyzin O a S	
<i>S. dysgalactiae ssp. dysgalactiae</i>	C	α, β, γ	Eq, Bo, Su, Ho	Hnisavé infekce, mastitida	Protein G aj. povrchové proteiny M-like proteiny Streptokináza Hyaluronidáza	
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, -	β	Su	Krční lymfadenitida	M protein Streptokináza	CAMP test +
<i>S. canis</i>	G	β	Ca, Fe	Neonatální sepse, mastitida, nekrotizující fasciitida	M protein Streptolyzin O	

<i>S. iniae</i>	-	β	Ryby	Meningoencefalitida	Kapsula M-like protein Povrchové proteiny Streptolyzin S	
<i>S. pneumoniae</i>	-	α (viridace)	Ho aj. primáti, Eq, laboratorní hlodavci	Respirační infekce	Kapsula Povrchové proteiny Proteázy Neuraminidáza Pneumolyzin	Viridující kolonie s centrální depresí Citlivost k optochinu
<i>S. suis</i>	D, R, S, T	α (viridace)	Su (Ho)	Meningitida, pneumonie, artritida, septicemie	Kapsula Povrchové proteiny Suilyzin	
<i>S. uberis</i> , <i>S. paruberis</i>	?	α, γ	Bo	Mastitida	Povrchové proteiny Hyaluronidáza Kaseinový receptor Uberis faktor	Některé kmeny <i>S. uberis</i> CAMP test +

3.4 Čeleď Enterococcaceae a další grampozitivní kataláza-negativní bakterie

3.4.1 Rod *Enterococcus*

Až do roku 1984 představovaly enterokoky sérologickou skupinu D streptokoků, lišící se řadou výlučných vlastností. Posléze získaly na základě molekulární analýzy samostatný rod a dokonce čeleď. Čeleď Enterococcaceae v současnosti zahrnuje rod *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Vagococcus* a *Tetragenococcus*. Jsou to grampozitivní koky, někdy ovoidního tvaru, tvořící **páry až krátké řetízky**, a jsou **negativní na katalázu**. Stejně jako streptokoky jsou **obligátně fermentativní** (chybí jim cytochromový systém) a patří mezi **bakterie produkující laktát (LAB)**.

Enterokoky se od streptokoků liší především vyšší odolností a habitatem. Jsou typickými obyvateli **střevního traktu**, přestože proporce jejich zastoupení se odvíjí od mnoha faktorů, jako je věk, dieta, antibiotická terapie atd. Slouží jako indikátory fekální kontaminace prostředí, kde mohou dlouhou dobu perzistovat i za nepříznivých podmínek. Tolerují mnohé běžně používané dezinfekční prostředky. Rostou v rozmezí **10 – 45°C** v přítomnosti **6,5 % NaCl** a dokonce při **pH 9,6** a jsou **rezistentní k žlučovým solím**, což slouží důležité znaky při selektivní kultivaci.

S výjimkou některých druhů jsou nepohyblivé; *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* a *E. massiliensis* tvoří bičík. *E. casseliflavus* tvoří žlutý pigment.

Kyselina teichoová v buněčné stěně je identifikována jako skupinový antigen D.

Enterococcus spp. fermentuje glukózu s produkcí laktátu; patří mezi kyselinomléčné bakterie (LAB). Protože tolerují široké rozmezí pH a vysoké koncentrace solí, uplatňují se při fermentačních procesech v sýrech a salámech. Produkují bakteriociny a mají slibný potenciál coby probiotika. Jejich využití je však vzhledem k jistým rizikům předmětem diskuzí.

3.4.1.1 Patogenita

Je známo přes 40 druhů enterokoků, z nichž většina má význam jako komenzálové s oportunní patogenitou. Z klinického hlediska je nejvýznamnějším druhem *E. faecalis*, zodpovědný až za 90 % klinických případů, následován *E. faecium* (5 – 10 %) a dalšími minoritními druhy (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. hirae* aj.). Případy infekcí *E. faecium*, neboť tento druh je častěji asociován s multirezistencí a zejména rezistencí k vankomycinu. Antibiotická rezistence přispívá k fitness bakterií a koreluje s virulencí. **Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE)** patří mezi nejvýznamnější nosokomiální patogeny. Díky již zmíněné rezistenci v prostředí se obtížně likvidují a dlouhodobě přežívají na nejrůznějších površích; někdy může být nemocniční prostředí doslova zamořeno. S oblibou tvoří biofilm v katetrech a různých přístrojích.

Enterokoky způsobují problémy, pokud kontaminují tkáň mimo střevní trakt. Jsou to třetí nejčastější původci **infekcí močového traktu**. S oblibou **infikují rány, žlučové cesty, endokard**, způsobují **bakteriémie**. U psů a koček se poměrně často izolují z **ušních zánětů**.

Také tzv. **streptokokóza ptáků** je kromě *S. equi* ssp. *zooepidemicus* častěji způsobovaná různými druhy enterokoků (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*). Jedná se o významné sekundární patogeny drůbeže i exotického ptactva, zodpovědné za **záněty žlučových váčků mláďat, reprodukčního traktu samic** a za **akutní septikémie** a **endokarditidy** s vysokou mortalitou.

E. hirae, *E. durans* a *E. villorum* byly asociovány s případy **průjmů** různých druhů **domácích zvířat**, zejména jejich mláďat (drůbež, prasata, přežvýkavci, psi, koně aj.).

Zcela zvláštní pozornost si zaslouží **vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE)** jako jedny z nejvýznamnějších **nosokomiálních patogenů**. Jejich původ je pravděpodobně spjat s používáním avoparcinu (látky ze stejné skupiny jako vankomycin) coby růstového stimulantu, faktem však je, že VRE se úspěšně šíří i dlouho poté, co bylo používání antibiotik tímto způsobem zakázáno.

3.4.1.2 Patogeneze

U enterokoků je známo málo faktorů virulence v pravém slova smyslu, jejich úspěch coby patogenů spočívá spíše v odolnosti a **schopnosti perzistovat v prostředí a kolonizovat různé tkáně**. **Adheziny Esp** (*Enterococcus* surface protein), **Ace** (adhesion to collagen of *E. faecalis*), **AS** (aggregation substance) aj., **kapsula a polysacharidy buněčné stěny**, různé **proteázy, želatináza, hyaluronidáza** přispívají ke kolonizaci různých povrchů a invazi tkání a formaci **biofilmu**. Právě biofilm, tvořený v katech, močových cestách, na umělých i přirozených chlopních apod. hraje velmi významnou roli. Secernovaný **cytotoxin/hemolyzin (CylA)** je zodpovědný za výraznou hemolýzu některých virulentních izolátů.

Ani u druhů sporadicky asociovaných s průjmy (např. *E. durans*) nebyl identifikován žádný enterotoxin ani zvláštní poškození sliznice jiným způsobem. Adherence bakterií zřejmě nějakým způsobem narušuje absorpční procesy na mikroklcích.

3.4.1.3 Diagnostika

Enterokoky jsou běžně izolovány z velké plejády vzorků jako fekální a environmentální kontaminanty; jako původce infekcí je hledáme nejčastěji v **krvi, moči, kloubních punktátech**, případně **ušních výtěrech, stěrech ran** apod.

Zásadní je odlišení enterokoků od jiných kataláza-negativních grampozitivních rodů, v první řadě viridujících streptokoků, jejichž kolonie mají podobnou morfolonii. Při standardních podmínkách kultivace tvoří **drobné bezbarvé** (někdy žluté pigmentované, př. *E. casseliflavus*, *E. plantarum*) **kolonie bez hemolýzy** nebo s **částečnou hemolýzou**. Výjimečně bývají některé kmeny *E. faecalis* a *E. durans* betahemolytické.

Enterococcus spp. je možné druhově identifikovat v komerčních multitestech společně se streptokoky. K jednoduchým samostatným testům patří schopnost **hydrolýzy eskulinu** nebo **růst na žluč-eskulinovém agaru**. *Enterococcus* spp. je na rozdíl od streptokoků rezistentní k žlučovým solím, a proto na tomto médiu roste. Rozklad eskulinu na černý produkt eskuletin se projeví zhnědnutím až zčernáním média v okolí kolonií (se stejnou reakcí se setkáme u listerií).

Enterokoky reagují pozitivně v **PYR testu** stejně jako *S. pyogenes*. K odlišení enterokoků a jim příbuzných rodů od některých dalších kataláza-negativních G⁺ koků, jako je *Leuconostoc* nebo *Aerococcus*, slouží tzv. **LAP test** (přítomnost enzymu leucin-aminopeptidázy).

Při selektivní kultivaci je možno využít značné odolnosti enterokoků k různým extrémním podmínkám a zejména řadě antibiotik. Pro izolaci VRE lze použít například bujón BHI s přidávkou vankomycinu nebo jedno z komerčních **chromogenních pevných médií** (CHROMagar VRE aj.).

3.4.1.4 Terapie

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k řadě antimikrobiálních látek, především betalaktamům a aminoglykosidům. Kombinace těchto dvou skupin však bývá účinná a často se používá: například **gentamicin s penicilinem** nebo **ampicilinem**. K léčbě infekcí močových cest se doporučuje **amoxicilin-klavulanát, chloramfenikol** či **tetracykliny**, zatímco účinnost potencovaných sulfonamidů *in vivo* je s otazníkem. Enterokoky však často získávají rezistenci k jmenovaným antibiotikům (tetracyklinům, chloramfenikolu, chinolonům aj.). Multirezistentní kmeny se výrazně častěji vyskytují u druhu *E. faecium*; také VRE jsou asociovány primárně s tímto druhem. K léčbě infekcí VRE jsou určeny vyhrazené látky, jako je **linezolid, daptomycin, quinupristin-dalfopristin**.

3.4.2 Rod *Melissococcus*

Rod *Melissococcus* z čeledi Enterococcaceae řádu Lactobacillales zahrnuje jeden významný druh, *M. plutonius*, který je původcem tzv. hniloby včelího plodu. Jedná se **anaerobní až mikroaerofilní kokus lancetovitého tvaru** (jako kopíčko), tvořící **páry až řetězky**. Za přítomnosti kyslíku nabývá spíše tyčinkovitého tvaru. Tvoří **kopulovité až prstencovité kolonie**, bílé nebo transparentní. Mnoho vlastností, včetně virulence a afinity k různým druhům včel (*A. mellifera*, *A. cerana*) se liší mezi kmeny. Pro kmenovou typizaci se používá metoda MLST, která odlišuje vysoce agresivní „atypické“ kmeny, např. CC12.

Význam **hniloby včelího plodu** (anglicky European foulbrood) je u nás v současnosti poněkud upozaděn ve srovnání s morem včelího plodu (American foulbrood). *M. plutonius* je primárním původcem této infekce. Vyskytuje se ve **výkalech dospělých včel** a přežívá dlouho v prostředí. Dostává se do medu a spolu s **potravou infikuje larvy**. Infekce se může ve včelstvu vyskytovat i **bezpříznakově**, za předpokladu, že se vytvoří jakási rovnováha – hyne-li málo larev, včely je stačí hygienicky odstraňovat a nedochází ke ztrátám; onemocnění může naplno propuknout při **změně podmínek** či jakémkoli stresu. Záleží také na virulenci kmene, klimatu, dostatku potravy. I nadbytek potravy přispívá k rozvoji onemocnění, protože včely krmí i nakažené larvy a infekce se může snadněji rozšířit na celé včelstvo.

Bakterie se množí v mezenteronu larev, až ucpávají celou dutinu, ale neinvadují tkáň lary. Hypertrofická matrix se rozpadá, larva zaostává v růstu nebo hyne ještě před zavíčováním – natahuje se, žlutne až hnědne, později vysychá. **Příškvár nelpí v buňce** jako u moru, lze jej snadno vyjmout. Později nakažené larvy mohou přežít do dospělosti a stávají se přenašeči. Příznakem rozvinuté infekce je mezerovitost plodu.

Kromě *M. plutonius* se na rozvoji onemocnění podílejí další, tzv. sekundární bakterie, např. *Achromobacter eurydice*, *Enterococcus faecalis* a *Paenibacillus alvei*. *P. alvei* jako aerobní bakterie roste teprve na uhynulých larvách a způsobuje zatuchlý zápach.

Příznaky onemocnění pomohou odhalit pravidelné prohlídky včelstev. K potvrzení diagnózy slouží izolace původce ze střeva larev na speciálních médiích, PCR nebo ELISA na detekci antigenu. Léčba nezabraňuje návratu onemocnění, je proto nařízena likvidace nakažených včelstev.

3.4.3 Rod *Lactococcus*

Laktokoky jsou typické kyselinomléčné bakterie (LAB, lactic acid bacteria), které za standardních podmínek zkvašují glukózu **homofermentativně** – to znamená, že jediný hlavní produkt je laktát. Mají proto význam jako startovací kultury v mléčném průmyslu. Patří do čeledi Streptococcaceae a podobně jako streptokoky jsou to **fakultativně anaerobní, kataláza-negativní nepohyblivé koky, tvořící páry a řetízky, někdy i nepravidelné shluky**. Nejlépe rostou při teplotě 20 – 30°C, rostou i při 10°C, ale nikoli 45°C. Tolerují pH nad 4,5 a koncentraci solí 2 – 4 %, jsou tedy relativně halotolerantní. *Lactococcus garvieae* vykazuje dokonce skoro stejnou toleranci k pH, teplotě, NaCl a žlučovým solím jako enterokoky.

Vyskytují se běžně v prostředí, asociované s rostlinami a živočichy, zejména rybami, hmyzem, ale i savci; důležitým habitatem laktokoků je syrové a fermentované mléko. Objevitelem rodu byl Joseph Lister, který roku 1873 izoloval *Bacillus lactis* právě z mléka. Dosud bylo popsáno asi dvacet druhů, některé rozdělené na poddruhy po nedávných změnách v taxonomii: *L. lactis* ssp. *lactis* a *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. cremoris* ssp. *cremoris* a ssp. *tractae*, *L. hircilactis*, *L. plantarum*, *L. piscium*, *L. garvieae*, *L. kimchii*, *L. insecticola*, *L. fujiensis*, *L. raffinolactis* aj.

Laktokoky mají obzvláštní význam v potravinovém průmyslu jako **startovací mlékárenské kultury**. Uplatňují se při výrobě různých druhů sýrů, podmáslí a kysané smetany. Použitá kultura ovlivňuje vlastnosti konečného produktu; kromě produkce laktátu jsou důležité i aromatické látky (aldehydy, ketony, alkoholy) a exopolysacharidy, ovlivňující vůni a chuť, respektive konzistenci produktu. Kultuřám *L. lactis* ssp. *lactis* nebo *L. cremoris* ssp. *cremoris* vděčíme za potěšení, které nám přináší čedar, eidam, camembert, roquefort a mnoho dalších sýrů. Tyto kultury produkují také **bakteriocin nisin**, který potlačuje růst jiných bakterií (způsobuje vznik pórů v buněčné stěně grampozitivů), a tak funguje jako přírodní konzervant.

Na druhé straně stojí klinický význam laktokoků. Většina druhů, včetně těch průmyslově využívaných, lze považovat za **oportunní patogeny člověka a zvířat**, izolované příležitostně z infekcí ran, močových cest a endokarditid. Naproti tomu *L. garvieae* a *L. piscium* jsou význačné **patogeny ryb**. *L. piscium* byl izolován z infekcí lososovitých ryb, nicméně v současnosti přitahuje spíše pozornost jako bioprotektivní kultura, která může být použita k potlačení kažení různých balených živočišných produktů (např. mořských plodů), ke kterému dochází vlivem jiných psychrotrofních bakterií.

L. garvieae byl popsán v souvislosti s **mastitidami skotu**, především však je to nebezpečný původce **hemoragické septikémie ryb (laktokokózy)**, zodpovědný za velké ztráty v sladkovodních a slanovodních akvakulturách, nejčastěji u pstruha duhového. Vznik onemocnění je, nepřekvapivě, ovlivněn faktory prostředí (špatná hygiena, nedostatek kyslíku, hromadění amoniaku). Bakterie poškozují endotel, dochází k extravazaci, hemoragiím ve vnitřních orgánech a ascitu. Dalším faktorem virulence je kapsula – enkapsulované sérotypy mají vyšší virulenci. Byly zaznamenány také infekce člověka, vždy v souvislosti s jinými vážnými zdravotními potížemi.

Laktokoky jsou poměrně náročné a k růstu vyžadují **obohacená média**, například komplexní krevní agar. Lze použít ale i média určená pro laktobacily, např. **MRS agar** (De Man, Rogoza, Sharpe), s pH 5,9 a 2 % glukózy, a další speciální média. Lépe rostou za **mikroaerofilních až anaerobních podmínek**. Kolonie jsou malé, průsvitné, bělavé, hladké, okrouhlé. Mohou mít slabou částečnou hemolýzu.

3.4.4 Další grampozitivní, kataláza-negativní koky

V této kapitole se krátce zmíníme o různých rodech, které podobně jako streptokoky a enterokoky mají negativní katalázovou reakci a při běžné diagnostice bývají za výše uvedené rody často zaměňovány. Jsou považovány za oportunní patogeny s okrajovým klinickým významem, ale právě kvůli obtížím s identifikací býval možná jejich výskyt výrazně podhodnocen. Bývají nejčastěji izolovány z invazivních infekcí asociovaných s různými komorbiditami, chirurgickými zákroky či jinými predispozičními faktory. V mnoha případech je obtížné rozhodnout, do jaké míry přispívá izolát k danému patologickému stavu či zda se jedná spíše o náhodný nálezn. Taxonomicky zůstaneme většinou v rámci řádu Lactobacillales, v čeledích Aerococcaceae (rody *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Facklamia*, *Globicatella*), Carnobacteriaceae (*Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Granulicatella*), Enterococcaceae (*Vagococcus*, *Tetragenococcus*), Lactobacillaceae (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weisella*). Rod *Gemella* patří do řádu Bacillales (čeleď Sporolactobacillaceae). Rody *Helcococcus*, *Anaerococcus* (třída Tissierelia) a *Peptostreptococcus* (třída Clostridia) stojí taxonomicky úplně stranou.

Vagokoky patří mezi LAB, mohou být pohyblivé a jejich odlišení od enterokoků je problematické. *V. salmoninarum* je považován za patogen pstruha duhového, *V. lutrae* a *V. fessus* byly izolovány z vodních savců. Modelovým druhem je *V. fluvialis*, používaný jako probiotikum v akvakultuře a izolovaný také z tonzil a různých lézí zdravých i nemocných domácích zvířat a vzácně asociovaný s infekcemi proleženin a bakteriemií u lidí.

Tetragenococcus spp. je halotolerantní LAB, tvořící tetrády a podílející se na kvašení slaných produktů (sója, tresčí játra). Patogenní působení není známo.

Rody *Abiotrophia* a *Granulicatella* byly dříve společně řazeny do skupiny tzv. **nutričně variantních streptokoků**. Jak napovídají některá druhová jména (*A. defectiva*, *A. adiacens*), tyto bakterie nejsou schopné tvořit některé esenciální živiny (cystein, pyridoxin) a potřebují je mít suplementovány v růstovém médiu; z toho důvodu vykazují tzv. satelitismus, jejich drobné, někdy slabě hemolytické kolonie rostou v blízkosti jiných bakterií, např. *S. aureus*. Preferují vyšší tenzi CO₂. Jsou to běžní **komenzálové dutiny ústní, trávicího a urogenitálního traktu**. V dutině ústní se podílí na vzniku zubního plaku. Narušená bariéra sliznic v dutině ústní umožňuje průnik bakterií do cirkulace, vedoucí ke vzniku **infekční endokarditidy**.

Také **aerokoky** jsou součástí **orální a urogenitální mikroflóry**. Vyskytují se běžně i v prostředí. Navzdory jménu jsou to fakultativní anaeroby nebo mikroaerofily, podobně jako streptokokům jim chybí cytochromový systém. Jsou nepohyblivé a typicky tvoří tetrády, shluky nebo páry, na krevním agaru pozorujeme drobné, neprůhledné kolonie většinou s výraznou viridací.

A. viridans, *A. sanguinicola* a především *A. urinae* bývají asociovány z **močovými infekcemi**, někdy také bakteriemiemi, endokarditidami a dalšími invazivními infekcemi zejména u starších pacientů nebo dětí. *A. viridans* bývá nezářídka izolován z **mastitidního mléka**. Kauzalita však nebyla zatím definitivně potvrzena. Některé kmeny *A. viridans* však prokazatelně způsobují tzv. **gafkémii, fatální chorobu humrů**. Bakterie napadají srdce a hepatopankreas, odčerpávají energetické zásoby, infekce progreduje v septikémii. Projevuje se letargií, růžovým zbarvením ventrální strany těla a hynutím. Onemocnění je enzootické v Maine, u divokých populací amerických humrů, nebezpečné je však pro komerčně chované humry, zejména pokud jsou chováni v nevhodných životních podmínkách (špatná hygiena, přeplnění nádrží, vysoká teplota vody).

Aerococcus spp. je v textech citlivosti často výrazně rezistentní, *A. urinae* bývá rezistentní k potencovaným sulfonamidům. V terapii se doporučuje kombinace betalaktamů s aminoglykosidy.

Viridující kolonie tvoří také *Globicatella sanguinis*, vzácný původce meningitid, osteomyelitid a septikemií u starších hospitalizovaných pacientů. *Facklamia* spp. (*F. hominis*, *F. languida*, *F. ignava*)

je dalším možná podceňovaným patogenem, zodpovědným za invazivní infekce spojené s komorbidity. Bývá rezistentní k betalaktamům, klindamycinu a potencovaným sulfonamidům.

Alloiococcus otitis je jediným zástupcem svého rodu. Spolu s *Turicella otitidis* (dříve *Corynebacterium*) je často izolován z *otitis media* u dětí, ale pravděpodobně se jedná o sekundární agens, přispívající patogenezi pouze nepřímo.

Carnobacterium je grampozitivní tyčinka ze skupiny kyselinomléčných bakterií. Zahrnuje některé pohyblivé druhy (*C. mobile*), většina zástupců je psychrofilní a rostou při teplotách pod bodem mrazu, tolerují také vysoký tlak. Vyskytují se proto v nejrůznějším prostředí: v mořských hlubinách a arktickém permafrostu, ale i v mořských živočiších a mléčných a masných produktech. *C. maltaromaticum* (dříve *piscicola*) bylo považováno za patogen ryb, ale v současnosti nejsou doklady o klinickém významu karnobakterií. *C. maltaromaticum*, *C. divergens* aj. mohou způsobovat kažení rozmrzlých mořských plodů a masa, ale také se používají jako přírodní konzervans, potlačující růst *Listeria monocytogenes*.

Leuconostoc spp. z čeledi Lactobacillaceae je nepohyblivý kokus, tvořící páry až řetízky, který patří mezi **heterofermentativní kyselinomléčné bakterie**. To znamená, že vedle laktátu se při kvašení cukrů tvoří výrazně i další látky, acetát, ethanol, oxid uhličitý a diacetyl. Konvertují sacharózu na dextran. *Leuconostoc* spp. se přirozeně vyskytuje na rostlinném materiálu a významně se podílí na kvašení mléčných, masných a především rostlinných produktů, jako je kyselé zelí, okurky, olivy, fermentovaný čaj, kombucha a víno. *Leuconostoc* spp. preferuje mikroaerofilní atmosféru a teplotu 20 – 25°C a je přirozeně rezistentní k vankomycinu. Druh *L. carnosum* je anaerobní, psychrofilní a podílí se na kažení baleného masa, ale zároveň produkcí bakteriocinů zastavuje růst jiných nežádoucích bakterií (*L. monocytogenes*) a mlže být za správných podmínek použit jako biokonzervant. Infekce asociované s izolací *Leuconostoc* spp. byly sice popsány, ale tak vzácně, že jej zřejmě lze považovat za nepatogenní bakterii.

Stejný habitat je typický i pro rody *Weissella* a *Pediococcus*. *W. cibaria* a *W. confusa* se používají jako probiotika a jsou jen vzácně asociovány s infekcemi. *Pediococcus* spp. je stejně jako *Leuconostoc* heterofermentativní LAB produkující diacetyl při kvašení zelí, okurek, vín, salámů aj. Diacetyl dodává produktům (ne vždy žádoucí) máselnou příchuť (například podmásli nebo vínu Chardonnay) a používá se uměle na dochucení margarínu. *Pediococcus* se přidává také do siláží. Je značně halotolerantní.

Lactobacillus spp. je nesporulující anaerobní, ale aerotolerantní tyčinka, která obývá především sliznice dutiny ústní, GIT a volete ptáků, je také dominantním druhem poševní mikroflóry. Je homofermentativní a citlivý k vankomycinu. Patogenní význam laktobacilů je zastíněn jejich významem coby probiotik a kvasných kultur, kterému je věnována samostatná kapitola (viz níže). *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. paracasei*, případně jiné běžně využívané druhy (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* aj.) bývají příležitostně izolovány z případů infekčních endokarditid starších pacientů. Za hlavní znak určující patogenní potenciál kmene je považována schopnost agregovat krevní destičky.

Gemella morbillorum je nepohyblivý fakultativně anaerobní kokus, obývající sliznice dutiny ústní, nosohltanu a GIT, a prokázaný **oportunní původce** nezřídka závažných infekcí, jako jsou **endokarditidy, meningitidy, nefritidy a abscesy vnitřních orgánů**. Často se vyskytuje v zubním plaku a dutina ústní bývá obvyklou vstupní branou infekce, zejména po dentistických zákrocích. Může jí být i střevo (kolorektální karcinom) a jiné sliznice. Podobný význam mají i *G. haemolysans*, *G. sanguinis* a další zástupci. *Gemella* spp. preferuje mikroaerofilní prostředí při kultivaci a bývá rezistentní k penicilinu.

Peptostreptokoky jsou pomalu rostoucí anaerobní nebo mikroaerofilní pohyblivé koky tvořící řetízky. Hýbou se pomocí cilií. Podle současné taxonomie patří do čeledi Peptostreptococcaceae, řádu Eubacteriales a třídy Clostridia (stejně jako *Clostridiodes difficile*) – netvoří však endospory! Druhy jako *P. anaerobius*, *P. vaginalis*, *P. asaccharolyticus*, *P. harei*, *P. canis* aj. se vyskytují jako **komenzálové dutiny ústní, trávicího a urogenitálního traktu**. Jsou to **oportunní patogeny**, uplatňující se

zejména ve **smíšených anaerobních infekcích**, jako jsou **nekrotizující pneumonie, endometritidy, hluboké infekce a abscesy měkkých tkání a vnitřních orgánů**. V kombinaci se *S. pyogenes* a *S. aureus* vyvolávají tzv. **streptokokovou anaerobní myonekrózu**, která má podobný, i když pomalejší průběh jako klostridiová myonekróza. Anaerobní invazivní infekce jsou obvykle spojeny s predispozičními faktory, jako je hluboké či rozsáhlé trauma, malignity, diabetes, cizí tělesa a závažná imunosuprese. Pro správnou diagnostiku je nutný anaerobní odběr a prodloužená doba kultivace, s pomnožením při hemokultivaci. K terapii se používají betalaktamová antibiotika.

Peptostreptococcus spp. je jedním z představitelů **skupiny grampozitivních anaerobních koků** (GPAC, Gram-positive anaerobic cocci). K dalším zástupcům s poněkud menším klinickým významem patří rody *Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Murdochiella*, *Parvimonas* a *Peptoniphilus*, všechny z čeledi Peptoniphilaceae. Jsou **striktně anaerobní** a některé jsou asacharolytické (*Peptoniphilus*), jiné naopak cukry využívají (hlavním produktem metabolismu je butyrát). Tvoří součást přirozené gastrointestinální a urogenitální mikroflóry. Klinicky mohou způsobovat především **anaerobní pelvické infekce (ovariální abscesy) a infekce hlubokých ran**.

Helcococcus spp. patří do téže čeledi Peptoniphilaceae, ale je to **fakultativní anaerob**. Jméno pochází z řeckého helcos – rána. Prvním popsáným druhem byl *H. kunzii*, tvořící součást kožní mikroflóry člověka. Bývá izolován z **ran především na dolních končetinách** (predispozicí je proto hlavně diabetes mellitus), ač není jasné, zda je to jen sekundární kolonizátor, či přispívá rozvoji infekce. Často doprovází například *S. aureus*. Lze jej snadno zaměnit za *Aerococcus* spp. (grampozitivní koky v párech i hloučcích, drobné transparentní nehemolytické nebo slabě hemolytické kolonie, PYR test pozitivní, LAP test negativní).

Pozornost si zaslouhuje další a poslední druh, *H. ovis*, nejdříve izolovaný v souvislosti s **valvulární endokarditidou u skotu**, častěji však asociován s infekcemi dýchacího traktu hospodářských zvířat, zejména **hnisavou bronchopneumonií a pleuritidou ovcí a koz**, u nichž by mohl potenciálně představovat primární patogen.

4. Pravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky

4.1 Čeleď Erysipelotrichaceae

Čeleď Erysipelotrichaceae patří do řádu Erysipelotrichales a třídy Erysipelotrichia, která tvoří významnou součást střevní mikroflóry.

4.1.1 Rod *Erysipelothrix*

Rod *Erysipelothrix* náleží k čeledi Erysipelotrichaceae a jeho nejvýznamnějším zástupcem je druh *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *E. rhusiopathiae* je saprofytem a epifytem tonzil a střeva zdravých prasat a dalších zvířat, může však figurovat i jako potenciální patogen vyvolávající červenku prasat a krůt. Ojedinelé také způsobuje onemocnění ovcí a jiných domestikovaných zvířat. Má zoonotický potenciál, k infekci dochází zejména u lidí, kteří jsou při vykonávání svého povolání v úzkém kontaktu se zvířaty či opakovaně manipulují s vepřovým, drůbežím či rybím masem.

Druh *E. rhusiopathiae* zahrnuje nesporulující fakultativně anaerobní grampozitivní nepohyblivé tyčinky. Jsou kataláza- i oxidáza-negativní, koaguláza-pozitivní, tolerují přítomnost vyšších koncentrací solí až do 8,5 % a rostou v rozmezí teplot 5 - 42 °C a pH 6,7 - 9,2. Všechny kmeny tvoří sirovodík a štěpí glukózu bez tvorby plynu. Bakterie jsou schopny růstu na univerzálních médiích, při kultivaci na agarech s přidavkem ovčí krve potom můžeme pozorovat drobné nehemolytické kolonie tvaru „kapky rosy“ kolem nichž vzniká během 48 hodin neúplná hemolýza. Izoláty získané od zvířat v akutní fázi infekce formují hladké konvexní kolonie s průměrem kolem 2 mm a pravidelnými okraji, ve fázi chronické kolonie drsné, které jsou větší, ploché a s nepravidelnými okraji. V mikroskopickém preparátu připraveném z kolonií ve fázi S pak pozorujeme drobné krátké tyčinky o velikosti 0,2 – 0,4 x 0,8 – 2,5 µm, z kolonií ve fázi R krátká vlákna. Druh *E. rhusiopathiae* je antigenně nejednotný, na základě výsledků precipitačních reakcí s termostabilním peptidoglykanem buněčné stěny mikroba bylo identifikováno 26 různých sérotypů.

4.1.1.1 Klasifikace

Z *E. rhusiopathiae* bylo vyčleněno několik sérotypů, které se staly základem nového druhu *E. tonsillarum*, mezidruhové odlišnosti byly potvrzeny prostřednictvím molekulárně genetických metod, např. DNA-DNA hybridizace. Jak jeho název naznačuje, je tento nový druh často izolován z tkání tonzil, zejména prasat, kde se chová jako saprofyt a epifyt, pouze u psů může figurovat v etiologii endokarditid.

4.1.1.2 Rozšíření

E. rhusiopathiae je ubikvitárně rozšířeným mikroblem nacházeným především ve vnějším prostředí a dále v organismech řady druhů savců, ptáků i ryb. Právě organismy zvířat jsou zdrojem této bakterie pro vnější prostředí, je známo, že až 50 % klinicky zdravých prasat má tonzily kolonizované touto bakterií, která je průběžně vylučována z těla společně s fecés a oronazálním sekretem. *E. rhusiopathiae* byla dále izolována z ovcí, hovězího dobytka, koní, psů, koček, drůbeže a až z 50 dalších druhů

volně žijících savců a přes 30 druhů divokých ptáků. *E. rhusiopathiae* se nachází také ve slizové vrstvě pokrývající povrch těla zdravých ryb a měkkýšů. V půdě a povrchové vodě může tento mikroorganismus za optimálních podmínek přežít až 35 dnů.

U oslabených jedinců však může *E. rhusiopathiae* vyvolat onemocnění, které u prasat probíhá ve třech formách, akutní, subakutní a chronické. Podle tmavě červených rhomboidních skvrn na kůži získalo název červenka. Nemocní jedinci potom masivně vylučují bakterii všemi sekrety a exkrety. U ovcí a krůt způsobuje *E. rhusiopathiae* septikémie nebo chronické polyartritidy. Ojediněle byla také izolována z infekcí různých orgánů psů, volně žijících hlodavců a ptáků. U člověka se nejčastěji setkáváme s lokální kožní lézí nazývanou erysipeloid, což je nehnisavá, ostře ohraničená celulitida doprovázená regionální lymfangoitidou a artritidou přilehlého kloubu. U imunokompromitovaných lidí může infekce generalizovat v sepsi a endokarditidy.

4.1.1.3 Patogenita a klinické projevy

Infekce *E. rhusiopathiae* s klinickými projevy onemocnění postihují prasata, krůty a ovce, vzácně drůbež. Další zvířata onemocní pouze vzácně. K přenosu infekce s rozvojem onemocnění může dojít také u člověka.

U prasat onemocnění, které nese označení **červenka**, probíhá v několika formách: v **akutní (septikemické)**, **subakutní (kožní)**, nebo **chronické**, konkrétní podoba nemoci pak závisí na stavu hostitelského organismu, virulenci původce a faktorech prostředí, ve kterém je zvíře chováno. Selata jsou chráněna mateřskými protilátkami přibližně do tří měsíců věku, jedinci nad 3 roky jsou obvykle imunní vůči původci na základě aktivní imunizace nízkou virulentními kmeny nacházejícími se v prostředí. Propuknutí onemocnění často následuje po vystavení stresovým noxám, jako jsou odstav, transport či suboptimální zoohygienické podmínky. **Septikémie** se rozvine po dvou až třech dnech inkubace, některá prasata hynou bezpříznakově, jiná trpí vysokou horečkou, apatií a anorexií, i v těchto případech je mortalita vysoká. U březích samic dochází k abortům. **Subakutní formu** provází mírnější febrilie i celkové příznaky a nižší mortalita. Na kůži lze pozorovat charakteristické erytematózní změny formující se do tvaru kosočtverce, které buď během týdne resoluují, nebo dojde k jejich nekrotizaci. U starších zvířat se častěji setkáváme s **artritidami** doprovázenými kulháním až nechotou k pohybu, *E. rhusiopathiae* je jednou z nejčastějších příčin nesupurativních zánětlivých kloubních změn identifikovaných při jatečném zpracování vepřového masa. Vzácnějším projevem doprovázejícím chronický průběh červenky je **vegetativní endokarditida** s formací trombotických mas na mitrální chlopní. Postižení jedinci mohou být asymptomatictí, ale může se u nich rozvinout kongestivní srdeční selhání či náhle uhynou po větší fyzické zátěži, nebo vlivem gravidity.

Onemocnění krůt je nejčastěji doprovázeno **náhlými úhyny** dospělých jedinců bez rozvoje klinických příznaků. Šíření nemoci je pomalé, přetrvává však v hejnu několik týdnů až měsíců. Pokud nedojde k perakutnímu úhynu, akutní průběh se vyznačuje apatií, ataxií, anorexií se snížením přírůstků hmotnosti a anemizací, nebo naopak cyanózou kožních přívěsků. Chronický průběh je typický vznikem **artritid** a **endokarditid**. Mortalita může dosáhnout až 50 procent a nemocní ptáci obvykle uhynou. Patoanatomické příznaky zahrnují změny odpovídající septikémii – celkové překrvení, krváceniny na perikardu, dále zvětšení jater a sleziny, hemoragickou enteritidu a u chronických forem také artritidy a vegetativní endokarditidu.

U ovcí se můžeme setkat s **non-supurativními artritidami** jehňat, u nichž došlo k průniku patogena do organismu pupečním pahýlem po porodu, nebo kastrovní ranou, eventuálně kupírovaným ocasem. Starší jehňata a dospělé ovce mohou trpět **laminitidami** či kožními **celulitidami**, v případě infekce poškozenou rohovinou paznehtů, nebo poraněné kůže. **Valvulární endokarditidy a pneumonie** byly popsány také u bahnic.

4.1.1.4 Patogeneze

K infekci dochází především perorálně kontaminovanou vodou či potravou, méně často bakterie pronikají do organismu poraněnou kůží, nebo přes nosní sliznici. Jedním z faktorů virulence, kterými je mikrob vybaven, je **kapsula**, která jej účinně chrání před ingescí fagocytujícími buňkami, eventuelně umožňuje přežití, a dokonce replikaci ve fagolysozomech makrofágů. K primární replikaci patogena dochází v tonzilách a lymfatickém aparátu gastrointestinálního systému. Schopnost produkovat **neuraminidázu** úzce koreluje s virulencí *E. rhusiopathiae*, protože slouží k adhezi a průniku do endoteliálních buněk. Řada dalších povrchových proteinů mikroba slouží k vazbě na různé tkáně a formaci biofilmu. **Hyaluronidáza** zase napomáhá diseminaci bakterie napříč hostitelským organismem. Při septikemické formě onemocnění dochází k edematizaci endotelu, adhezi monocytů na stěnu cév a formaci hyalिनových mikrotrombů. Při chronickém průběhu mikroby hematogenní cestou napadají synoviální membrány kloubů a srdeční chlopně, čímž dochází k jejich poškození.

4.1.1.5 Diagnostika

Anamnestické údaje o chybějící vakcinaci a přítomnost patognomických kožních změn vedou k rychlému stanovení pracovní diagnózy. V případech jiných forem onemocnění a pro účely potvrzení správnosti diagnózy se lze pokusit o izolaci a identifikaci původce. Odebíranými vzorky jsou potom **krev pro hemokultivaci** či sekční materiál z **parenchymatózních orgánů, tonzil, endokardu a kloubů** uhynulých zvířat. Materiál následně zpracujeme pro přímou mikroskopii obarvených otiskových preparátů, kde lze pozorovat jednotlivé drobné grampozitivní tyčinky či u chronických forem vlákna. Vzorky dále kultivujeme na masopeptonový krevní agar (MPKA), kultivaci může předcházet selektivní pomnožení v bujónu s krystalovou violetí, azidem sodným, fenolem a kanamycinem. Po 24 – 48 hodinové inkubaci za aerobních podmínek a při 37 °C vidíme **drobné kolonie vzhledu kapek rosy**. Definitivní identifikaci nejsnadněji potvrdíme MALDI TOF hmotnostní spektrometrií, přítomnost bakteriální DNA původce prokážeme i polymerázovou řetězovou reakcí, která je však oproti předchozí metodě náročnější na provedení a čas.

4.1.1.6 Prevence a terapie

Rozšíření původce ve vnějším prostředí společně s vysokým procentem nosičství u prasat a dalších druhů zvířat je důvodem pro plošnou vakcinaci zvířat v chovech prasat. K dispozici jsou komerční preparáty na bázi jak atenuovaných, tak inaktivovaných vakcín, očkují se prasničky před porodem (inaktivovanými vakcínami kvůli riziku abortu) i selata po odstavu a také kanci určení k chovu po dvanáctém týdnu věku. Vedle aktivní imunoprevence se zařazují také zoohygienická opatření vedoucí k vylepšení mikro- i makroklimatu stájí a důkladná asanace prostředí.

E. rhusiopathiae je citlivá k účinku antimikrobiálních látek ze skupiny penicilinů, po laboratorním ověření lze použít antibiotika tetracyklinová. Terapie antibiotiky je však účinná pouze v časných fázích onemocnění, léčba chronických forem se jeví být neefektivní.

4.2 Čeled' Listeriaceae

Čeled' Listeriaceae z řádu Bacillales, třídy Bacilli a kmene Firmicutes je zastoupena pouze dvěma rody: *Listeria* a *Brochothrix*. Obojí jsou drobné grampozitivní tyčinky, neopouzdržené a neschopné tvořit spóry. Jsou to fakultativní anaeroby pozitivní na katalázu a negativní na oxidázu. Jsou velmi rozšířené v prostředí (faeces, odpadní vody, vegetace, tlející materiály) a s oblibou kontaminují potraviny či krmiva. Na rozdíl od listerií není u *Brochothrix* spp. znám žádný vyloženě patogenní zástupce, může však způsobovat kažení potravin.

4.2.1 Rod *Listeria*

Tato malá grampozitivní tyčinka byla pojmenována po lordu Listerovi, významném průkopníkovi na poli chirurgické aseptiky a antiseptiky. Rod *Listeria* zahrnuje 26 druhů (*aquatica*, *booriae*, *cornellensis*, *cossartiae*, *costaricensis*, *denitrificans*, *farberi*, *fleishmannii*, *floridensis*, *goaensis*, *grandensis*, *grayi*, *immobilis*, *innocua*, *ivanovii*, *marthii*, *monocytogenes*, *murrayi*, *newyorkensis*, *portnoyi*, *riparia*, *rocourtiae*, *rustica*, *seeligeri*, *thailandensis*, *valentina*, *weihenstephanensis* a *welshimeri*), jako původci onemocnění zvířat figurují pouze dva z nich: ***L. monocytogenes*** a mnohem méně často také ***L. ivanovii***. *L. monocytogenes* je etiologickým agens onemocnění mnoha druhů zvířat po celém světě, poprvé byla izolována z laboratorních králíků se septikémií a monocytózou, odtud druhový název. Nejčastěji však onemocnění vyvolává u přežvýkavců, především u ovcí, kterým způsobuje meningoencefalitidy, aborty a metritidy, mastitidy a generalizované infekce jehňat. Také pro člověka představuje největší riziko druh *monocytogenes*, výjimečně se v etiologii listerióz uplatní *L. ivanovii*, ostatní druhy mají v humánní medicíně význam pouze okrajový. *L. monocytogenes* má zoonotický potenciál a je jedním z nejvýznamnějších původců alimentárních infekcí člověka.

L. monocytogenes je tak drobná tyčinka, do 2 µm délky, že je v řadě literárních pramenů označována za kokobacilus. Je to kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, fakultativní anaerob, který se vyznačuje pohyblivostí, ovšem za teplot nepřesahujících 25 °C. Umí růst a množit se v širokém rozmezí teplot 4 °C až 45 °C a toleruje pH mezi 5,5 a 9,6. Také kultivačně je listerie nenáročná, navíc snáší koncentrace soli vyšší než stafylokoky i přítomnost žlučových solí. Je to intracelulární parazit, což je nutné zohlednit jak v rámci diagnostiky při přípravě vzorků, tak v terapii. Na agaru s ovčí krví tvoří po 24 hodinové inkubaci za aerobních podmínek při 37 °C drobné hladké nepigmentované kolonie.

4.2.1.1 Rozšíření

Listerie jsou ubikvitární mikroorganismy, environmentální saprofyty i saprofyty a epifyty trávicího ústrojí zvířat a člověka. Ve vnějším prostředí se všechny listerie snadno replikují i přežívají a lze je nalézt na rostlinách, ve vodních tocích, ale i v odpadních vodách. Jejich zdrojem je trus zdravých zvířat, především savců, byly však izolovány dokonce z ptáků a ryb. Potenciálně patogenní druhy *L. monocytogenes* a *L. ivanovii* pak mohou vyvolat u člověka a zvířat onemocnění listeriózu. Ne všechna citlivá zvířata a člověk však po infekci onemocní, ohrožení jsou především jedinci s narušenou imunitou, mláďata a březí samice/těhotné ženy. Významnou roli v onemocnění hraje především velikost infekční dávky. K propuknutí listeriózy u nejcitlivějších zvířat, přežvýkavců, dochází zejména v zimním období v souvislosti s příjmem silážovaného krmiva. Zejména svrchní vrstvy siláže totiž nemusí vždy dosáhnout natolik nízkého pH, které by znemožnilo listeriím se množit.

4.2.1.2 Patogenita a klinické projevy

Infekce *L. monocytogenes* byla zaznamenána u více než čtyřiceti druhů domestikovaných i divoce žijících zvířat, *L. ivanovii* způsobuje pouze sporadicky aborty u ovcí.

U přežvýkavců s klinickou formou listeriózy v podobě **meningoencefalitidy** se onemocnění rozvine po inkubační době mezi 14 až 40 dny za neurologických příznaků zahrnujících nejistou chůzi, pohyb v kruhu, naklonění krku na stranu, potřásání hlavou eventuálně ochrnutí. Přítomna může být také unilaterální faciální paralýza se slinotokem a poklesem víčka a ušního boltce. V prvních dnech lze zaznamenat zvýšenou tělesnou teplotu. U ovcí a koz dochází k ulehnutí a úhynu již několik dní po projevení se prvních příznaků, u skotu nastává úhyn za delší časový úsek. Neléčení jedinci vždy hynou. U březích samic infikovaných v první polovině březosti nastávají aborty do dvanácti dnů po infekci bez dalších známek systémového postižení, nakazí-li se až v druhé polovině březosti, rodí se mrtvá, či málo životná mláďata hynoucí za příznaků sepsy. Listerie jsou potom vylučovány mlékem postižených zvířat. Septikemická forma se rozvíjí po 2 – 3 dnech inkubace nejčastěji i jehňat, ačkoliv byla zaznamenána i u březích bahnic. Nemocné zvíře trpí vysokou teplotou, apatií, nechutenstvím, tachypnoí a během jednoho až dvou dnů hyne.

Do organismu člověka proniká listerie ponejvíce **alimentární cestou**, nakazit se také mohou lidé profesionálně zacházející se zvířaty. Z hlediska alimentárního přenosu jsou díky všudypřítomnosti původce rizikové takřka všechny potraviny, jsou však přece jen potraviny rizikovější. Patří sem mléčné výrobky, zejména zrající sýry, protože listerie jednak mohou být již ve vstupní surovině, mléce, navíc dostanou čas na pomnožení a nevadí jim ani chladničkové teploty, ani vyšší koncentrace solí v surovině, mikrob dokonce někdy snese i pasterizaci. Velkou skupinu dále představují veškeré potraviny, které jsou složitě technologicky zpracovávány, listerie se totiž rády drží ve zbytcích vody uvnitř linek, kde je pokrm vyráběn. Člověka by svádělo svalit vinu na nejrůznější „hotovky“, tedy jídla, jež po rozbalení mohou putovat rovnou na talíř či na lahůdkové saláty navršené v chlazených pultech do velkých pyramid a několik dní čekající na svého zákazníka, nebo na dlouho zrající fermentované výrobky, potraviny v aspiku, atd. Zcela bezpečná ale bohužel není ani čerstvá zelenina (nedostatečně omytá), která může být listeriem kontaminována již na polích. Díky státním institucím, které dozorují zdravotní nezávadnost potravin, jsou nicméně případy alimentárních listerióz člověka ojedinělé. Obezřetné by přesto měly být především těhotné ženy, u nichž by mohla infekce listeriem poškodit plod, a vyvarovat se zejména konzumace zrajících sýrů. Také u člověka infekce probíhá především bezpříznakově, onemocnění se potom rozvíjí především u ohrožených skupin s patologicky či fyziologicky potlačenou obranyschopností (těhotné ženy, děti, starci). Listeriόza u nich může nabýt podoby související s cestou přenosu infekce, tedy **respirační**, případně **infekce ran**, ale také **meningitidy**, či po přímé expozici **infekce oka**. Nejzávažnější průběh mají **infekce novorozenců** nakažených již v děloze či během porodu, u nichž dochází k rozvoji **sepsy** s vysokou mortalitou.

4.2.1.3 Patogeneze

Po uplynutí jednoho až čtyř týdnů inkubační doby se u náchylnějších zvířat rozvine onemocnění, které může rezultovat v **septikémii** (zejména u mláďat), **meningoencefalitidu**, **postižení pohlavního aparátu březích jedinců** (abortus, metritida), **mastitidu** či endoftalmitidu. Branou infekce je obvykle trávicí trakt, k nákaze však může vzácněji dojít i respirační cestou aerosolem, nebo narušenou kůží (infekce ran) či spojivkou. Nervové formy listeriόzy pravděpodobně navazují na průnik původce do organismu narušenou gingivou při výměně či poranění zubů. Nejběžněji, tedy po ingesci, se listerie replikuje v enterocytech a buňkách Peyerových plaků, přičemž napadá a přežívá nejen v nefagocytujících buňkách, ale i ve fagocytech, jejichž prostřednictvím se následně šíří hematogenně či lymfou do různých

predilekčních míst. Po intracelulární replikaci proniká z buňky do buňky, aniž by se vystavila humorálním faktorům hostitelského imunitního systému. Intracelulární přežívání listerii umožňují různé faktory asociované s virulencí, jako jsou **internaliny InIA a InIB**, napomáhající také vlastní adhezi a invadování do hostitelských buněk, a také hemolyzin **listeriolysin O**, díky kterému mohou tyto bakterie uniknout z fagozomů fagocytujících buněk. Predilekční místa listerií jsou nervový systém, březí děloha, či systémový oběh a parenchymatózní orgány při septikemické formě mláďat. Po přímém kontaktu infikovaného materiálu se spojivkou se může rozvinout hluboký zánět oka. K rozvoji listeriózy do klinické formy u březích zvířat (těhotných žen) pravděpodobně napomáhá snížená obranyschopnost zprostředkovaná buněčnou imunitou, která je fyziologickým důsledkem pokročilé fáze březosti (gravidity).

4.2.1.4 Diagnostika

Vhodný vzorek pro mikrobiologické vyšetření musí reflektovat klinickou formu onemocnění. Při meningoencefalitidách odebíráme **mozek** a **prodlouženou míchu**, u abortů a metritid **placentu**, **amniovou tekutinu**, **obsah slezu plodu**, či výtěr z dělohy. Při septikemické formě vyšetřujeme **parenchymatózní orgány**, u mastitid **mléko**. Nesmíme opomenout, že vyšetřovaným vzorkem mohou být i **vzorky z prostředí, vzorky krmiva a potravin**.

Diagnostický proces lze zahájit přímou mikroskopií otiskového preparátu tkání, kde po obarvení hledáme grampozitivní tyčinky v palisádovém uspořádání, tedy podélnými osami k sobě. Pro kulturační vyšetření orgánů a tkání je nutné materiál nejprve homogenizovat kvůli intracelulárnímu uložení mikroba. Listerie jsou kulturačně nenáročné a dobře rostou i na univerzálních bakteriologických půdách. Na krevních agaroch jsou kolonie *L. monocytogenes* **drobné, nepigmentované, někdy s náznakem hemolýzy** a lze je zaměnit s enterokoky, některými streptokoky či korynebakterií. Enterokoky a streptokoky můžeme nicméně od listerií odlišit katalázovým testem, korynebakteria zase za pomoci **žlučeskulinových půd**. Dříve, před zavedením sofistikovanějších přístrojových metod, se k rozlišení *L. monocytogenes* od ostatních druhů listerií využíval hojně **CAMP test**, v němž se sledovala jejich hemolytická interakce s cholesteroxidázou bakterie *Rhodococcus equi* a hemolyziny *Staphylococcus aureus*. Identifikaci listerií si také můžeme usnadnit prostřednictvím komerčně dostupných selektivních agarů, které zabrání růstu jiných bakterií. Aktuálně jsou na trhu k dispozici i půdy chromogenní, které umožní přímou diferenciaci *L. monocytogenes* od ostatních listerií na základě typického zbarvení. K takovým patří např. ALOA (Ottaviani a Agosti), využívaný zejména při vyšetřování potravin, na němž listerie tvoří tyrkysově zbarvené kolonie. Půda PALCAM je dalším příkladem mnoha selektivně diagnostických médií určených pro diagnostiku listerií. Naočkované agary inkubujeme aerobně 24 – 48 hodin při 37 °C. Získané kultury je nutno definitivně identifikovat, lze využít mikroskopický průkaz (grampozitivní tyčinky) společně s biochemickými testy, nebo PCR, nebo nejlépe MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

Krmivo, potraviny a vzorky prostředí je vhodné před vlastní kultivací selektivně pomnožit na příklad v bujonech obsahujících akriřavin a kyselinu nalidixovou, či ve Fraserově bujónu. Při analýze vysoce kontaminovaných vzorků lze zařadit i dlouhodobou, několik týdnů trvající, kultivaci v selektivních bujonech a následně na selektivních agaroch při chladničkových teplotách.

4.2.1.5 Prevence a terapie

Protože neexistuje specifická imunoprofylaxe, v prevenci onemocnění zvířat hrají hlavní roli zoohygienická i zootechnická opatření. Ta by měla spočívat v eliminaci možných zdrojů nákazy, tedy v produkci kvalitního silážovaného krmiva, boji proti hlodavcům a udržování optimální kondice chovaných jedinců.

Nemocná zvířata bez léčby hynou, ta by tedy měla být postavena především na aplikaci účinných antimikrobiálních látek, lékem volby jsou aminopeniciliny, jejich nevýhodou je však špatný průnik do buněk.

5. Aerobní sporující tyčinky

Většina grampozitivních tyčinek schopných tzv. sporulace za přítomnosti kyslíku se řadí do čeledi Bacillaceae, řádu Bacillales, třídy Bacilli a kmene Firmicutes. K nejvýznamnějším rodům pak patří *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Geobacillus* spp. aj. Kromě toho mají tuto vlastnost i zástupci jiných, méně významných čeledí: Alicyclobacillaceae (bez klinického významu), Paenibacillaceae (zahrnující významné hmyzí patogeny), Pasteuriaceae (parazité nematod), Caryophanaceae (Planococcaceae), Sporolactobacillaceae a Thermoactinomycetaceae (zástupci těchto čeledí se liší morfologií, vztahem ke kyslíku, reakcí na Gramovo barvení i schopností sporulace, ale vesměs nemají klinický význam; např. poslední jmenovaná čeleď zahrnuje filamentózní bakterie produkující vzdušná mycelia i pravé endospóry).

Sporulací se míní proces tvorby **endospory**, velmi odolného metabolicky neaktivního stádia, které se za určitých okolností tvoří uvnitř vegetativní buňky (sporangia) a po jejím odumření přežívá v prostředí i za extrémně nepříznivých podmínek. Nejedná se o způsob rozmnožování (jako v případě hub a jiných eukaryot, kde hovoříme o pravých sporách). Liší se též od tzv. exospor produkovaných např. filamentózními aktinomycetami, které vznikají diferenciací celé buněčné stěny a nevyznačují se takovou odolností.

K tvorbě endospor dochází obecně za nepříznivých podmínek, především při nedostatku živin na konci exponenciální fáze růstu a během stacionární fáze. V regulaci hraje roli *quorum sensing*. Během procesu dochází k desikaci a obalení DNA a ribozomů vápenatou solí kyseliny dipikolinové a několika proteinovými vrstvami, což činí endosporu odolnou vůči vyschnutí, vysokým teplotám, radiaci a většině běžných dezinfekcí. Endospory takto mohou přežít až desítky let, dokud nedojde k aktivaci. Sporulace trvá 24 – 48 hodin.

Endosporu tvoří **jádro** (protoplast), obsahující především DNA a chromatinu podobné proteiny SASP (small acid-soluble proteins, chrání DNA před UV zářením), ribozomy a enzymy. Jádro je stabilizováno dipikolinátem vápenatým, který tvoří až 20 % váhy celé endospory a je zejména zodpovědný za termorezistenci. Jádro je obdáno fosfolipidovou **vnitřní membránou** a **kůrou** (kortexem) z modifikovaného peptidoglykanu, **vnější membránou** a **vnitřní a vnější pláštěvou vrstvou**. Plášť tvoří proteiny bohaté na cystein, stabilizované velkým množstvím disulfidických můstků, a je hlavní ochrannou vrstvou, poskytující odolnost vůči dezinfekcím, enzymům a predátorským prvokům. Vnější vrstvu poté představuje tzv. **exosporium**, tvořené bazální membránou a vrstvou hustých „vlásků“, filament glykoproteinu BclA. BclA je v kontaktu s vnějším prostředím, interaguje s imunitním systémem a váže receptory makrofágů. Další složky umožňují pravděpodobně adhezi endospor k epiteliálním buňkám a proteinům extracelulární matrix.

Likvidace endospor je náročný, někdy prakticky nemožný úkol. Nejefektivnější je sterilizace v autoklávu (121°C min. 15 minut), účinné je i suché teplo (150°C po 60 minut), ale nikoli prostý var (ten naopak spíše vede k aktivaci spor). Také běžné dezinfekční prostředky na bázi alkoholů, fenolů a kvarterních amoniových solí nejsou dostatečné. Lepší účinnost mají chlorové a oxidační preparáty a etylenoxid, avšak při delší době působení.

Určité, dosud ne zcela známé signály vedou k aktivaci endospory. Dochází k tzv. **germinaci**, při níž se endospora přeměňuje opět na vegetativní metabolicky aktivní buňku a ztrácí svou odolnost. Jako spouštěče se uplatňují některé molekuly (germinanty), jako jsou nukleosidy a aminokyseliny, které se vážou na specifické receptory. Je to poměrně rychlý (několik hodin) a nevratný proces, během něž je jádro rehydratováno, dipikolinát vápenatý uvolněn, proteiny SASP rozloženy.

5.1 Čeled' Bacillaceae a Paenibacillaceae

Zástupci čeledi Bacillaceae jsou mohutné **aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky** s grampozitivní strukturou buněčné stěny, přestože někteří vykazují Gram-variabilní nebo gramnegativní reakci. Většina je pohyblivá pomocí peritrichních bičíků. Patří k ubikvitárním saprofytům prostředí; těžko vymyslet místo, odkud nebyly izolovány. Různé druhy rostou v širokém rozmezí teplot, pH a koncentrace solí. Najdeme je jako součást přirozené mikroflóry živých organismů, v aridní půdě, kompostech, sedimentech, sladké i slané vodě, v potravinách i v extrémních prostředích, jako jsou horké prameny. Kromě nejvýznamnějšího rodu *Bacillus* sem patří např. halotolerantní *Filobacillus* a *Halobacillus* nebo termofilní *Geobacillus* spp. *G. stearothermophilus* má optimum růstu 55°C a používá se jako indikátor účinnosti sterilizace. Kromě toho se podílí na kažení konzerv.

Z fylogenetického hlediska rozeznáváme **skupinu *B. cereus***, kam spadá především *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* a *B. mycoides*, a **skupinu *B. subtilis***, zahrnující *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. coagulans*.

V podstatě jediným **obligátním patogenem** mezi bacily je *B. anthracis*, původce antraxu. Významem na druhém místě je *B. cereus*, **oportunní patogen** běžně izolovaný z prostředí a GIT a původce infekcí/intoxikací z potravin. Také tzv. **půdní bacily**, např. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides* aj. mohou být příležitostně izolovány v souvislosti s oportunními infekcemi člověka a zvířat, mají však velký význam v jiných oblastech. Používají se v zemědělství i v potravinářství a jiném průmyslu k produkci enzymů, jako jsou amylázy a proteázy (např. subtilisin, serinová proteáza přidávaná do detergentních pracích prostředků), a antimikrobiálních látek, jako je bacitracin (*B. subtilis*). Modelovým druhem je *B. subtilis*, tzv. senný bacilus, který patří mezi první cíleně použitá probiotika: v Africe Erwina Rommela během operací v Severní Africe jako léčba a prevence šířící se úplavice. Armádní lékaři si totiž všimli, že místní beduíni používali k tomu účelu velbloudí trus, který obsahoval velké množství spor *B. subtilis*.

Různí zástupci čeledi Bacillaceae a Paenibacillaceae se jako významní půdní saprofyty podílejí na degradaci organického materiálu a cirkulaci makroprvků v prostředí. Rozkládají celulózu, hemicelulózu a pektin; mnohé mají chitinolytickou aktivitu. Tvoří biofilmy na rostlinách a chrání je před plísněmi, bakteriemi a hmyzími škůdci. Jsou využívány jako přírodní insekticidy a fungicidy. *B. thuringiensis* je patogenem hmyzu a je využíván jako biopesticid např. v Africe k likvidaci moskytů. Některé mají denitrifikační aktivitu a podílejí se na čištění vod a degradaci organických polutantů, jiné jsou součástí rhizosféry a uplatňují se jako vazači vzdušného dusíku (především č. Paenibacillaceae).

Čeled' Paenibacillaceae zahrnuje především rody *Paenibacillus* a *Brevibacillus*. „Paeni“ znamená skoro, jsou to tedy „skorobacily“. Najdeme je, jak bylo řečeno, jako nitrogenfixační bakterie v rhizosféře i jako biofilmy na rostlinách, kde vykazují insekticidní a fungicidní aktivitu. Produkují antimikrobiální látky polymyxin a kolistin (*P. polymyxa*). Mnozí zástupci se vyznačují velice komplexními koloniemi, v nichž jsou buňky organizovány do zvláštních větvených a vířivých struktur (*P. vortex*, *P. dendriiformis*). *P. larvae* a *P. alvei* jsou významnými patogeny hmyzích larev.

5.1.1 *Bacillus anthracis*

B. anthracis je **fakultativně anaerobní sporulující grampozitivní tyčinka**. Na rozdíl od většiny ostatních bacilů je **nepohyblivý**. Jeho buňky jsou poměrně robustní, obdélníkovité s ostrými konci, a typicky se řadí za sebou do **řetízků**. Spory, pokud jsou přítomny, nepřesahují tloušťku buňky a nemění její tvar. V podmínkách zvýšené tenze CO₂ (v kultuře nebo *in vivo*) produkuje **pouzdro** z kyseliny poly-D-gama-glutamové. Je **pozitivní na katalázu i oxidázu**.

5.1.1.1 Patogenita

Antrax je primárně **onemocnění býložravců se septickým, často fatálním průběhem**, ale také vysoce nebezpečná **zoonóza** a spory *B. anthracis* jsou vedeny na seznamu potenciálních bioteroristických zbraní. Přežvýkavci jsou k infekci nejvnímavější, na druhém místě jsou koně. Prasata, psi a kočky jsou méně vnímaví a k fatálnímu průběhu u nich dochází zřídka. Člověk je značně vnímavý, ale velmi záleží na cestě infekce.

Zdrojem antraxových spor pro přežvýkavce a další býložravce jsou na prvním místě **pastviny**; za určitých okolností spory perzistující v půdě kontaminují píci. Roli zde hrají zřejmě klimatické podmínky a další faktory. Sekundárním zdrojem mohou být zvířecí produkty, například masokostní moučka, a odpad ze zpracovatelských podniků může opět kontaminovat pastviny. V enzooticky zamořených oblastech dochází periodicky k hromadným nákazám, jinde se infekce vyskytuje sporadicky. Zvířata se nakazí zpravidla **ingescí spor**. Průběh onemocnění po uplynutí několikadenní inkubační doby bývá velmi rychlý, až fulminantní. Rychle se objevují **septické příznaky** s vysokou horečkou a kolapsem zvířete, **překrvením sliznic a výměty krve** z tělesných otvorů. K patologickému obrazu patří zvětšená překrvená slezina a absence *rigor mortis*. Krev bývá typicky nesrážlivá.

U **koní** se onemocnění může projevovat kolikovými příznaky.

Prasata a masožravci se mohou nakazit pozřením mršín nebo produktů z nakažených zvířat. Infekce zůstává zpravidla lokálně omezena v oblasti hltanu a přilehlých mízních uzlin; vzniká **nekrotická faryngitida** a lymfadenitida. Vzniknuvší otok však může být příčinou zdušení zvířete.

U **člověka** rozeznáváme několik forem infekce podle cesty vstupu. Zdaleka nejběžnější (více než 95 % případů) připadá na tzv. **kožní antrax** neboli uhlák (což je doslovný překlad slova anthrax). Existují domněnky, že právě kožní antrax měl být jednou z deseti ran egyptských; šestou ranou byly vředy, navazující na pobití stád dobytčím morem. K nakažení dojde průnikem spor porušenou kůží při manipulaci s produkty nakažených zvířat, především kožkami. V daném místě vzniká pustula až vředovitá léze, měnící se v černý příškvár. I tato forma je nebezpečná s možnými komplikacemi způsobenými lokálním edémem nebo septikémií. Vzácná **alimentární forma** se projevuje postižením hltanu nebo střev, s otokem krku a dysfágií, respektive krvavým průjmem a masivním ascitem. Dochází k ní pravděpodobně ingescí vegetativních buněk v nedostatečně tepelně upraveném mase. Mortalita může být až 100%. Nejobávanější je naštěstí vzácná **forma inhalační**, vznikající vdechnutím spor. Také ona bývá často fatální i při adekvátní léčbě. Po několika dnech inkubace jsou pozorovány nespecifické celkové příznaky, horečka, bolest na hrudi, zvracení, dyspnoe, a změny na rentgenogramu zahrnující rozšíření mediastina a pleurální efuzi. Velmi vzácně byly popsány případy injekčního antraxu, k nimž došlo u uživatelů drog.

5.1.1.2 Faktory virulence

Robert Koch na příkladu antraxu demonstroval pravidla svých postulátů. *B. anthracis* je skutečně jednoznačným primárním patogenem a jeho virulence je spjata s **dvěma plazmidy, pXO1 a pXO2**. Plazmid pXO1 nese geny pro binární toxiny *B. anthracis*, letální a edematózní toxin, a jejich aktivátor AtxA. Plazmid pXO2 pak kóduje produkty kapsuly a její aktivátor, AcpA.

Binární toxiny sestávají z vlastní aktivní komponenty, z letálního (LF), respektive edematózního faktoru (EF) a tzv. **protektivního antigenu** (PA). PA umožňuje vazbu k receptorům cílových buněk a formuje transmembránový kanál, kterým aktivní složka prostupuje do cytosolu. **Letální faktor** je

zinková metaloproteáza štěpící určité enzymy buněčných signálních drah, tzv. MAPK kinázy (kinázy mitogenem aktivovaných proteinových kináz), čímž dochází k přerušení buněčné signalizace a apoptóze buňky. Primárními cílovými buňkami jsou nejspíš makrofágy, ale LF působí na různé typy epitelových a endotelových buněk, vyvolává vaskulární kolaps, extravazaci, edém a šok. Účinky edematózního toxinu jsou v podstatě obdobné. **Edematózní faktor** je však kalmodulin-dependentní adenylátcykláza a buněčná signalizace je narušena zvýšením hladiny cAMP. Edematózní toxin vyvolává bradykardii, hemoragie a inhibuje srážení krve.

Produkt druhého plazmidu, **kapsula** z polymeru kyseliny glutamové, slouží jako ochrana před fagocytózou. Atenuovaný vakcinační kmen postrádá právě tento plazmid. Kapsula je pod regulačním vlivem proteinu AcpA a je exprimována zejména *in vivo*. Kromě toho se na povrchu nachází též proteinová **S-vrstva** (z proteinů EA-1 a Sap), která přispívá k ochraně buňky před komplementem.

Kromě těchto hlavních faktorů přispívají k virulenci i některé chromozomální produkty. Proteáza InhA (imunitní inhibitor A) štěpí proteiny extracelulární matrix a antimikrobiální peptidy. *B. anthracis* dále tvoří tři typy fosfolipázy C a hemolytický arthrolyzin O, jehož exprese je však tak nízká, že se při kultivaci hemolýzou neprojevuje. Cytolyziny poškozují imunitní buňky a umožňují únik bakterií z fagozomů do cytoplazmy.

5.1.1.3 Patogeneze

Ve většině případů a u většiny forem infekce pronikají do organismu spory a jsou fagocytovány makrofágy a dendritickými buňkami, které je zanášejí do regionálních mízních uzlin. Vazbu a pohlcení spor zprostředkuje interakce receptoru s proteinem exosporia BclA. Uvnitř fagozomu spory germinují, produkují toxiny a unikají do cytoplazmy a posléze ven z buňky. Z mízních uzlin se bakterie šíří do dalších lymfatických orgánů (slezina) a do cirkulace; množí se v krevním oběhu. Bakteriémie a produkce toxinů vede k celkovým septickým příznakům a cirkulačnímu šoku.

5.1.1.4 Diagnostika

Při úhynu zvířete vyvolávajícím podezření na antrax je třeba mít na paměti, že kadaver je zdrojem vysoce rezistentních spor, jejichž likvidaci je velice obtížné zajistit. Proto není možné provádět pitvu za běžných podmínek na farmě, ale pouze v prostředí umožňující dokonalou dekontaminaci. Manipulaci s tělem je třeba provádět v ochranných pomůckách a při odběru vzorků dbát zvýšené opatrnosti. Samotná dezinfekce rukou běžnými, např. alkoholovými prostředky je považována za neúčinnou! Doporučuje se důkladné mytí rukou mýdlem. Vzorky se zasílají do laboratoře s patřičnou úrovní biologické bezpečnosti.

K vhodným vzorkům patří krev a různé tkáně, např. slezina. *In vivo* je možno odebírat biopsie a stěry lézí. Pro přímý sérologický průkaz se standardně odebírá tkáň ušního boltce.

Nejjednodušším diagnostickým postupem je v první řadě přímý mikroskopický průkaz, prováděný barvením krevních nátěrů a roztěrů tkání dle Grama nebo speciálním barvením na pouzdra dle McFadyena (30 – 60 s barvení v polychromatickém barvivu s metylenovou modří po fixaci nátěru absolutním alkoholem). V čerstvých vzorcích pozorujeme řetízky opouzdřených obdélníkovitých vegetativních buněk. Spory obvykle nejsou přítomny. Kontaminující druhy bacilů lze odlišit právě absencí pouzdra.

Kadavery rychle podléhají zkáze a *B. anthracis* přerůstá hnilobnými bakteriemi. Ve starších kadaverech nemusí být už vegetativní buňky detekovatelné, zato jsou ale přítomny spory. Je vhodné přistoupit ke kultivačnímu průkazu. Potenciálně kontaminované vzorky je vhodné ošetřit přibližně desetiminutovým zahřátím na 65°C, které zároveň aktivuje germinaci spor. Kultivace probíhá za normálních **aerobních podmínek na běžných médiích**, chceme-li však podnítit tvorbu pouzdra, je nutno použít médium obohacené sérem a bikarbonátem při zvýšené koncentraci CO₂. Kolonie *B. anthracis* mají unikátní vzhled a velmi se podobají koloniím *B. cereus*, od nichž se liší především **absencí hemolýzy** (jen vzácně se vyskytují hemolytické kmeny). Kolonie jsou po 24 – 48 hodinách bělavé nebo šedé, nízké a široké, okrouhlé až splývající, mají matný, zrnitý povrch, tuhou konzistenci a snížený kořenovitý nebo vláknitý okraj, pro nějž se kolonie přirovnávají ke „*caput medusae*“, hlavě bájných Gorgony s hady místo vlasů. Je-li produkováno pouzdro, jsou kolonie mukózní.

Buňky za kultivačních podmínek běžně sporulují a spory je pak možno pozorovat mikroskopicky jako prázdná, neobarvená místa při barvení Gramem, nebo je možno použít speciální **barvení na spory** dle **Wirtz-Conclinové** nebo **Schaeffer-Fultona**. Principem je obarvení spory malachitovou zelení a kontrastní dobarvení vegetativní buňky karbolfuchsinem. Teplem fixovaný preparát převrstvený malachitovou zelení přidržíme nad kahanem třikrát do výstupu par (teplo umožňuje vstup barviva do spory), poté opláchneme a dobarvíme pozadí.

Identifikaci *B. anthracis*, vedle morfologie kolonií, umožňuje několik testů. Patří k nim průkaz citlivosti k určitému druhu bakteriofága a dále citlivosti většiny kmenů k penicilinu, prováděný tzv. **perlovým testem**; v přítomnosti penicilinu v kultivačním médiu dochází k zakulacování buněk, které pak připomínají šňůry perel. *B. anthracis* je na rozdíl od *B. cereus* a dalších kontaminujících druhů **nepo-hyblivý**, má jen slabou lecitinázovou aktivitu na žloutkovém agaru a chybí mu schopnost rychlého ztekucení želatiny ve zkumavce.

PCR a další molekulární metody umožňují jednak přímý průkaz *B. anthracis* ze vzorku, jednak definitivní potvrzení virulence kmene detekcí virulenčních plazmidů. V některých případech se používá biologický pokus.

Dalším běžně užívaným diagnostickým testem je sérologická detekce solubilního antigenu precipitací ve zkumavce, tzv. **Ascoliho reakce**. Jako vzorek slouží filtrovaný vývar z tkáňového homogonátu, obvykle se používá část ušního boltece. Ve zkumavce se roztokem opatrně převrství králičí antisérum, obsahující protilátky. V zóně ekvivalence na rozhraní obou vrstev vzniká kružnicovitý precipitát. Test má řadu výhod, ale jeho specifita je nízká.

5.1.1.5 Terapie a prevence

U *B. anthracis* se obvykle nesetkáváme s problémem antimikrobiální rezistence, průběh infekce je však často tak rychlý, že terapie přichází pozdě. Vše záleží na rychlé diagnóze a nasazení antibiotik (penicilin, amoxicilin, doxycyklin, případně fluorochinolony), někdy v kombinaci s hyperimunním sérem. *B. anthracis* je rezistentní k vyšším generacím cefalosporinů díky inducibilním betalaktamázám.

V ohrožených oblastech je vhodné zvířata i lidi vakcinovat. Tradiční **Sterneův vakcinační kmen** postrádá plazmid pXO₂, chybí mu tedy kapsula, ale je stále schopen produkce toxinů.

Při výskytu antraxu je nařízena bezpečná likvidace uhynulých zvířat a dalších materiálů a dezinfekce prostředí (např. kyselina peroctová).

5.1.2 *B. cereus* a další oportunní druhy

B. cereus, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mycooides*, *B. pumilus*, *B. circulans* a další druhy bacilů patří k naprosto běžné mikroflóře prostředí, kůže i trávicího traktu a často se objevují ve vzorcích jako kontaminanty. Přesto mohou být příležitostně způsobovat oportunní infekce lokálního i systémového charakteru, zejména infekce oka a ran, mastitidy skotu a někdy i aborty, septikémie, endokarditidy či močové infekce. Vedle toho je *B. cereus* důležitým původcem infekcí nebo intoxikací z potravin. *B. thuringiensis* infikuje blanokřídlý a dvoukřídlý hmyz a motýly.

5.1.2.1 Patogenita a patogeneze

B. cereus snadno kontaminuje různé druhy potravin a vzhledem k termorezistenci spor způsobuje kažení i sterilovaných produktů. Kromě toho je asociován s dvěma typy onemocnění z potravin: intoxikací, tzv. **emetickým syndromem**, a pravou alimentární infekcí, tzv. **průjmovým syndromem**. Za první zmíněný syndrom je zodpovědný termostabilní toxin **cereulid**, kódovaný plazmidem a působící pravděpodobně na zakončení *n. vagus* v žaludku. Toxin zůstává účinný i po tepelné úpravě kontaminované potraviny a za velmi krátkou dobu (několik hodin) vyvolává nevolnost a zvracení. Onemocnění je velmi často spojeno s konzumací rýže či těstovin připravených ve velkém množství dopředu, což umožňuje germinaci spor a tvorbu toxinu. To je běžné zejména v asijských bistroch, proto je onemocnění někdy nazýváno syndromem čínské restaurace.

Zdrojem alimentární infekce bývají také potraviny rostlinného původu (vařená zelenina, brambory), ale i masné či mléčné výrobky, obsahující vegetativní buňky. Předpokladem je obvykle předchozí tepelná úprava a delší skladování potraviny, umožňující germinaci spor a pomnožení bakterií na vysokou koncentraci. Ve střevě je pak produkováno několik typů enterotoxinů, které jsou citlivé k vysoké teplotě i nízkému pH žaludku a které poškozují membrány enterocytů. Nejdůležitější jsou tzv. **nehemolytický enterotoxin (Nhe)** a **hemolyzin BL (HBL)**. Kmeny produkující **cytotoxin K (CytK)**, který je zodpovědný za krvavou nekrotickou enteritidu, bývají dnes považovány za druh *B. cytotoxigenus*. Inkubační doba je přibližně 12 hodin a příznaky nevolnosti a vodnatého průjmu přetrvávají přibližně jeden den.

B. cereus produkuje dále **fosfolipázu C** (lecitinázu), několik dalších typů hemolyzinů, amylázu a různé proteázy, jejichž účinek se projevuje při kažení potravin.

Vyskytují se také kmeny *B. cereus* (biovar *athracis*), které exprimují plazmidy pXO1 a pXO2 – vyvolávají onemocnění shodné s antraxem.

Také u jiných druhů bacilů byly zjištěny produkty s cytotoxickými účinky, uplatňující se zřejmě při příležitostných infekcích – například **lichenysin A** (*B. licheniformis*) nebo **pumilacidin** (*B. pumilus*). Jedná se o cytotoxické cyklické lipopeptidy.

Hlavními faktory virulence *B. thuringiensis* jsou proteinové toxiny Cry, tzv. **δ-endotoxiny**, které se formují při sporulaci jako kuboidní parasporální krystaly.

5.1.2.2 Diagnostika

Oportunně patogenní bacily jsou striktně aerobní nebo fakultativně anaerobní a rostou snadno na běžných médiích za standardních podmínek. Jsou poměrně dobře rozpoznatelné podle velkých plochých nebo bizarně tvarovaných kolonií. Kolonie *B. cereus*, *B. thuringiensis* a *B. mycooides* jsou podobné

B. anthracis, jsou ploché a přisedlé s **rhizoidními až filamentózními okraji** (*caput medusae*) a **matným povrchem**. Zejména *B. mycoides* tvoří velmi rozsáhlé, vlasovité kolonie. Konzistence je máslovitá až hrubá. Obvykle jsou obklopeny výraznou zónou **úplné hemolýzy**. Kolonie zástupců skupiny *B. subtilis* mají velice variabilní vzhled, bývají zpočátku lesklé, později matné a vrásčité, nepravidelné, někdy tvoří **lišejníkovité nebo membranózní struktury** („bubliny“) naplněné hlenovitou matrix, které posléze vysychají. Hemolýza může být přítomna.

Kromě krevního agaru je možno využít speciální selektivně-diagnostická média, např. tzv. **PEMBA** (polymyxin B-egg yolk-mannitol-bromthymol blue agar). *B. cereus* a *B. thuringiensis* tvoří jasně modré kolonie se zónou precipitace, zatímco skupina *B. subtilis* roste žlutě a precipitát netvoří. Na podobném principu je založen i **MYP agar** (mannitol-yolk-polymyxin B), kde je indikátorem fenolová červeně a *B. cereus* tvoří růžové kolonie obklopené precipitátem.

Mikroskopicky pozorujeme grampozitivní tyčinky 0,5 – 1,5 x 1,5 – 8 µm s hranatými nebo zaoblenými konci, jednotlivě nebo v řetízích, s oválnými nebo cylindrickými sporama, které buňku nedistendují a jsou umístěny centrálně, subterminálně až terminálně. U *B. thuringiensis* lze po několika dnech pozorovat parasporální krystaly. V kulturách dochází k rychlé degradaci peptidoglykanu a po určitém čase se mohou buňky jevit gramnegativní.

Na rozdíl od *B. anthracis* jsou všechny druhy s výjimkou *B. mycoides* pohyblivé a všechny jsou rezistentní k penicilinu. *B. cereus*, *B. mycoides* a *B. thuringiensis* mají výraznou lecitinázovou aktivitu, projevující se zónou precipitace agaru s vaječným žlutkem, a zkapalňují želatinu.

5.1.2.3 Terapie

Oportunně patogenní bacily obvykle produkují **betalaktamázy**, proto je vhodné vyhnout se betalaktamovým antibiotikům a citlivost jiných látek ověřit *in vitro*. Obvykle účinné jsou např. fluorochinolony, gentamicin, chloramfenikol, erythromycin. V naléhavých případech systémových infekcí člověka se přistupuje k intravenózní aplikaci vyhrazených přípravků, např. vankomycinu.

5.1.3 Rod *Paenibacillus*

Rod *Paenibacillus*, jak jméno napovídá, je velmi podobný rodu *Bacillus*, z něhož byl vydělen. Jedná se o **aerobní nebo fakultativně anaerobní sporující tyčinky**, které najdeme v hlíně, ve vodě, na rostlinách a v rhizosféře, kde se uplatňují jako vazači dusíku. Mají grampozitivní strukturu buněčné stěny, ale často s tendencí barvit se gramlabilně až gramnegativně. Spory často lehce zduřují sporangia se zaoblenými konci. Jsou pohyblivé a na pevném povrchu vykazují tzv. **plazivý typ pohybu**. Některé druhy na základě *quorum sensing* tvoří komplexní kolonie organizované do specifických rozvětvených a vířivě zatočených struktur (*P. vortex*, *P. dendritiformis*). Takto rostoucí kolonie jsou chráněny surfaktanty a jsou velmi rezistentní. Zároveň produkují látky potlačující růst jiných bakterií. Producent antibiotika kolistinu *P. polymyxa* také tvoří látky s funkcí surfaktantů a v současnosti je zkoumána možnost jeho využití proti biofilmům patogenních bakterií (*P. aeruginosa*, *S. aureus* aj.). Paenibacily nacházejí využití zejména v zemědělství jako biopesticidy chránící rostliny i bioremediační organismy (rozklad PAH aj.).

Jen výjimečně jsou zástupci rodu *Paenibacillus* asociovány s oportunními infekcemi savců, mají však velký význam jako patogeny hmyzu – v pozitivním smyslu, pokud se uplatňují jako **bioinsekticidy**, v negativním, pokud napadají např. včelstva. *P. alvei* byl například izolován z plicních abscesů, *P. vulneris* z nekrotické rány. I další druhy bývají popisovány v souvislosti s bakteriemi, infekcemi protetických implantátů a jinými typickými oportunními infekcemi.

P. alvei patří mezi tzv. sekundární patogeny, které se uplatňují při hnilobě včelího plodu, jejímž původcem je *Melissococcus plutonius*.

Nejvýznamnějším patogenem z hlediska veterinární medicíny je *P. larvae*, původce **moru včelího plodu**, který je i jednou z nejobávanějších včelích nákaz vůbec.

5.1.3.1 Patogenita a patogeneze

Mor včelího plodu je destruktivní a v současnosti značně rozšířené onemocnění včelstev. Spory *P. larvae* jsou pozřeny včelími larvami do tří dnů věku s potravou. Nejvnímavější jsou larvy do 24 hodin. Naopak dospělé včely jsou vůči infekci rezistentní, ale spory se u nich shromažďují v hltanových žlázách, vylučujících mateří kašičku. Spory germinují ve střevě larev a produkují **proteázy a chitinázy** (zejm. protein PICBP49), které poškozují hypertrofickou matrix (ochranná proteinová vrstva střeva). V tomto stádiu se infekce ještě neprojevuje. Teprve zavičkování larev šestého dne věku je signálem pro **invazi bakterií přes poškozenou matrix a střevní epitel do tkání larvy**. Jednotlivé genotypy využívají k invazi odlišné mechanismy; uplatňuje se např. adhezivní protein S-vrstvy SplA a binární toxiny Plx. Postupně dochází k úplnému rozkladu tkání larvy, která se mění v gelovitou hmotu připomínající karamel a později vysychá na **černý „příškar“**. Uhynulé larvy jsou zdrojem velkého množství spor, které dospělé včely přenášejí do dalších částí úlu a mohou se šířit i na včelstva v okolí (nářadí, zlodějské včely apod.). K prvním příznakům patří mezerovitost plodu a typický zatuchlý zápach. Rozkládající se larvy mají vazkou strukturu a táhnou se na špejli jako karamel. Seschlé příškvary pevně lpí v buňkách.

5.1.3.2 Diagnostika

Při podezření na výskyt moru včelího plodu je povinností včelaře zaslat vzorky plástů do akreditované laboratoře (státní veterinární ústavy, Výzkumný ústav včelařský). Kromě toho se provádí pravidelné preventivní vyšetření měli, medu a jiných materiálů.

Jako orientační vyšetření lze využít přímé mikroskopie materiálu barveného dle Grama nebo barvením na spory. Základním postupem je ovšem kultivace, i když je poměrně náročná, a čím dál více nacházejí využití molekulární metody, zejména sekvenování. Kromě toho existuje řada pomocných rychlých testů: například tzv. **Holstův mléčný test** prokazuje přítomnost proteáz produkovaných *P. larvae* (při inkubaci rozmělněných larev s roztokem sušeného mléka dochází k projasnění).

Při kultivaci se používají speciální obohacená média, např. **BHI agar, PLA** (*P. larvae* agar), **MYPPN agar**, který obsahuje kvasničný extrakt, pyruvát sodný, fosforečnan draselný, kyselinu nalidixovou a další složky. Kyselina nalidixová slouží k inhibici růstu *P. alvei*. Roztok vyšetřovaného materiálu se nejprve zahřívá na teplotu 80 – 100°C, aby došlo k devitalizaci nesporelujících kontaminantů a aktivaci spor. Kultivace vyžaduje několik dní (2 – 3) při 34 – 36°C v aerobních podmínkách. Morfologie kolonií velmi závisí na použitém kultivačním médiu. K identifikaci dnes slouží převážně molekulární metody (PCR, qPCR detekující gen 16S RNA a sekvenování).

5.1.3.3 Prevence

Vzhledem k nebezpečnosti nákazy není možné nakažená včelstva léčit; při potvrzení diagnózy je nařízena jejich likvidace. Materiály, jež není možno dezinfikovat, se spalují, ostatní lze ošetřit účinnými dezinfekčními přípravky (chlorové preparáty, etylenoxid).

6. Anaerobní sporulující tyčinky

6.1 Čeleď Clostridiaceae a rod *Clostridium*

Čeleď Clostridiaceae patří do řádu Clostridiales a třídy Clostridia kmene Firmicutes a v současné době prodělává zásadní taxonomické změny. Molekulární analýza totiž prokázala, že tradiční rod *Clostridium* není monofyletická skupina, a proto se přistoupilo ke změnám v nomenklatuře.

Řád Clostridiales zahrnuje další čeledi, které tvoří významnou součást střevní a ruminální mikroflóry, např. Ruminococcaceae (*Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*), Peptostreptococcaceae (Peptostreptococcus spp., *Filifactor* spp., *Clostridioides* spp. aj.), Lachnospiraceae (*Anaerostipes* spp. aj.). Vesměs se jedná o obligátně anaerobní, výrazně fermentativní bakterie, z nichž některé tvoří spóry a byly dříve řazeny k rodu *Clostridium*.

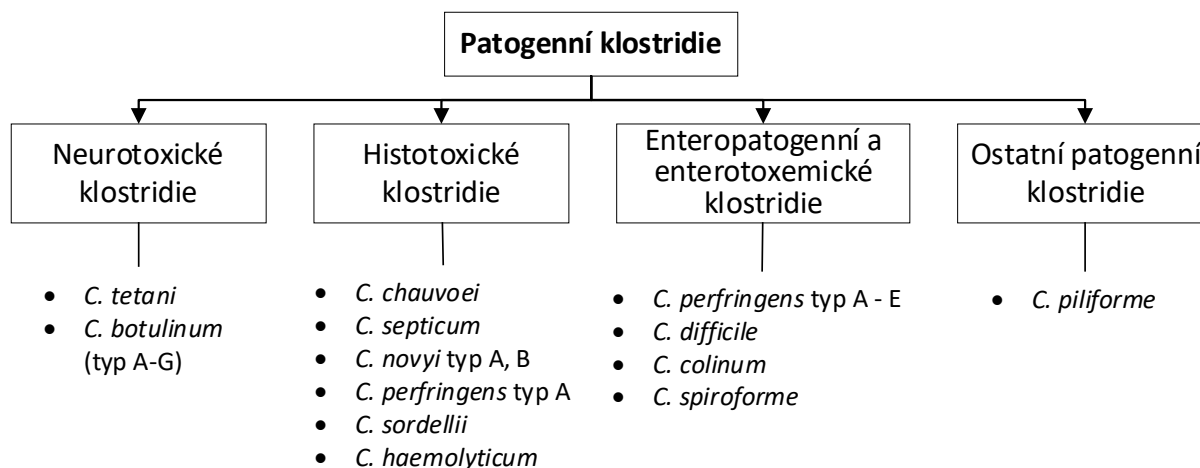
Klostridia jsou grampozitivní, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, většinou **polyblivé** díky peritrichně umístěným bičíkům. Pro svůj růst vyžadují převážně obohacená média, ve kterých se projevuje jejich fermentační typ metabolismu. Jsou negativní na oxidázu a katalázu. Klostridia jsou schopna vytvářet dormantní metabolicky neaktivní **endospory**, které obvykle **deformují tvar mateřských buněk**. Velikost, tvar a umístění endospor lze využít k diferenciaci některých druhů. I když většina patogenních druhů klostridií jsou **striktní anaeroby**, některé jsou poměrně **aerotolerantní**, jako např. *C. perfringens*. Klostridia jsou celosvětově rozšířené, ale určité druhy se mohou vyskytovat endemicky jen v určitých zeměpisných oblastech.

Přestože existuje více než 150 validně popsanych druhů klostridií, pouze méně než 20 je považováno za patogenní. Nedávné změny v nomenklatuře vybraných druhů jsou uvedeny v tabulce č.5. V tomto učebním textu budeme užívat původní názvy patogenních druhů z důvodu návaznosti na starší učební texty v jiných předmětech.

Tabulka 5 Změny názvů některých patogenních klostridií

Původní název	Aktuální název
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Hathewayia histolytica</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Paeniclostridium sordellii</i>

Patogenní druhy mohou být řazeny do čtyř kategorií, tři na základě aktivity jejich toxinů a postižených tkání hostitele a čtvrtá zahrnuje patogeny s menším významem (viz schéma níže).



Clostridium tetani a *C. botulinum*, tzv. **neurotoxická klostridia**, ovlivňují nervosvalové funkce, aniž by navodily pozorovatelné poškození tkání. Naproti tomu **histotoxická klostridia** produkují relativně lokalizované léze v tkáních, jako jsou svaly, pojivové tkáně a játra, a mohou tak následně způsobit toxémii. *Clostridium perfringens* typy A až E, zástupci třetí skupiny, vyvolávají **zánětlivé změny v gastrointestinálním traktu** provázené průnikem toxinů do krevního oběhu, tzv. **enterotoxémií**. Klostridia ve čtvrté skupině jsou původci sporadických infekcí různých druhů zvířat.

6.1.1 Obvyklý výskyt

Klostridia jsou **saprofyté**, kteří se přirozeně nacházejí v půdě, sladké vodě nebo mořských sedimentech s vhodně nízkým redoxním potenciálem. Jiné jsou součástí normální mikrobioty střeva zvířat a člověka, po náhodné translokaci spor přes stěnu střeva může v hypoxickém prostředí nekrotické tkáně, např. v zhmožděné svalové tkáni nebo v játrech, dojít k vyklíčení spor a rozvoji infekčního procesu.

6.1.2 Odběr vzorků a kultivační nároky

Pro zajištění přežití většinou striktně anaerobních klostridií, je třeba pro odběr, transport a zpracování vzorků použít speciální postup, který zahrnuje ochranu vzorku před atmosférickým kyslíkem nejlépe ve vhodném transportním médiu. Pokud nejsou vzorky odebrány z živých nebo čerstvě uhynulých zvířat, mohou klostridie během posmrtných změn rychle prostoupit ze střeva do tkání viscerálních orgánů, což vede k potížím s interpretací laboratorních výsledků. Kousky tkání nebo tekutiny z postižených zvířat by měly být vloženy do anaerobního transportního média a co nejrychleji přepraveny do laboratoře, a tam kultivovány do vhodných médií. Pro kultivaci většiny patogenních klostridií je vhodný krevní agar obohacený o **kvasnicový extrakt, vitamín K a hemin**. Kultivační média by měla být před použitím čerstvě připravena nebo před použitím uchovávána v anaerobní atmosféře, aby se zajistil jejich **nízký oxidoredukční potenciál**. Naočkovaná média se inkubují v anaerobních nádobách nebo boxech, které většinou obsahují atmosféru s 5 až 10 % vodíku, dusík a oxid uhličitý, který podporuje růst určitých druhů. Některé klostridie ve formě vegetativních buněk nemusí přežít vystavení vzdušnému kyslíku déle než 15 minut.

6.1.3 Identifikace klostridií

Laboratorní postupy pro identifikaci většiny klostridií zahrnují hodnocení morfologie kolonií, biochemické aktivity, metody neutralizace specifických toxinů a určení profilu organických kyselin v růstových médiích chromatografickými metodami. Z toho hodnocení morfologie kolonií má pro rozlišení druhů klostridií jen omezenou hodnotu. Nicméně **kolonie *C. perfringens* jsou obklopeny velmi charakteristickou dvojitou zónou hemolýzy**. Pro identifikaci na základě biochemické aktivity jsou dnes k dispozici komerční sady mikrotestů, např. API. Specifické toxiny lze v případě potřeby prokázat a identifikovat ve vzorcích zmnožených tělních tekutin nebo ve střevním obsahu. K tomu slouží neutralizačními testy na laboratorních hlodavcích, především na myších. Fluoresceinem značené specifické protilátky lze použít pro rychlou identifikaci histotoxických klostridií **přímou imunofluorescencí** přímo v otiscích ze změněných tkání. Pro průkaz toxinů mohou být použity **sérologické metody na principu ELISA**. Polymerázovou řetězovou reakci (**PCR**) lze použít k detekci genů kódujících produkci toxinů a tato metoda může např. u izolátů *C. botulinum* nahradit **neutralizační testy na laboratorních myších**. Biologické testy jsou však v případě průkazu některých toxinů zatím nenahraditelné.

Techniky na principu PCR a přímá imunofluorescence jsou pro jejich rychlost a možnost identifikovat histotoxické klostridie ve změněných tkáních využívány častěji. Multiplexní PCR, která je založena na průkazu variability genu pro flagelin, umožňuje rozlišit v jedné reakci *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. novyi* typy A a B a *C. septicum*.

6.1.2 Neurotoxická klostridia

Klinické stavy způsobené neurotoxickými klostridii, *C. tetani* a *C. botulinum*, jsou vyvolány účinkem silných neurotoxinů. Neurotoxin *C. tetani*, **tetanospasmin**, je produkován při množení původce ve zhmožděné a hypoxické tkáni, kam byly v důsledku **kontaminovaného poranění** zaneseny jeho spory z kontaminovaného prostředí. Toxin se absorbuje a působí na synaptické spoje v místě infikovaného poranění a následně i na místech vzdálených od místa produkce toxinu. Naproti tomu neurotoxin *C. botulinum*, **botulotoxin** (z latinského botulus, tzv. klobásový jed), je obvykle produkován původcem, který se množí v **rozkládající se organické hmotě**, nebo za anaerobních podmínek v kontaminovaných **konzervách** nebo polokonzervách masa nebo zeleniny. Pokud se toxin dostane do gastrointestinálního traktu člověka nebo zvířat, tak se vstřebává do krevního oběhu a celkově ovlivňuje fungování neuromuskulárních spojů. Některé typické projevy neurotoxinů *C. tetani* a *C. botulinum* jsou uvedeny v tabulce č. 6. Toxiny *C. tetani* a *C. botulinum* mají podobnou strukturu i funkci. Rozdílné klinické příznaky pozorované u tetanu a botulismu lze vysvětlit rozdílným místem působení jejich toxinů.

Tabulka 6 Neurotoxiny *C. tetani* a *C. botulinum*

Vlastnosti neurotoxinu	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
Místo produkce	Hluboká rána	Kadavery, konzervy, rozkládající se vegetace
Lokalizace genů regulujících produkci	Plazmidy	Chromozom, plazmidy profágy
Antigenní typ	Jeden antigenní typ	Sedm antigenních typů (A-G)

<i>Mechanismus působení</i>	Blokování přenosu inhibičních signálů na nervosvalové ploténce	Inhibice neuromuskulárního přenosu
<i>Klinický projev</i>	Svalové křeče	Svalová paralýza

6.1.2.1 Tetanus

Tetanus je akutní, potenciálně smrtelná intoxikace, která postihuje mnoho druhů zvířat včetně člověka. Druhovú vnímavost k toxinům se však značně liší. Koně a lidé jsou vysoce vnímaví, přežvýkavci a prasata středně silně a masožravci jsou poměrně odolní. Drůbež je k účinku tetanotoxinu rezistentní. Původce, *Clostridium tetani* je štíhlá, anaerobní, grampozitivní tyčinka. Vytváří kulovité endospory na konci mateřské buňky (*sporangium*) s charakteristickým zduřením ve tvaru paličky na buben (*plectridium*). Tyto endospory jsou odolné vůči účinku různých chemikálií a varu. Úplná jejich devitalizace nastává až autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. *Clostridium tetani* při kultivaci na agarech s 1,5 až 2 % agarové řasy nevytváří izolované kolonie, ale jeho **růst je plazivý** a na krevním agaru v důsledku tvorby **tetanolysinu** vytváří **hemolýzu**. Podle antigenní různorodosti bičíkových antigenů lze rozlišit deset sérologických typů *C. tetani*. Neurotoxin, **tetanospasmin**, je antigenně jednotný bez ohledu na sérotyp. Protilátky indukované neurotoxinem kteréhokoliv ze sérotypů neutralizují neurotoxiny produkované ostatními sérotypy. Infekce nastává, když jsou endospory zaneseny do traumatizované tkáně, například z půdy, hnoje nebo výkalů. Mezi běžná případy infekce patří hluboké rány u koní, kastrace a stříž u ovcí, odřeniny spojené s dystokií u krav a ovcí, a infekce pupeční tkáně u všech novorozenech mláďat vnímavých druhů zvířat. Přítomnost nekrotické tkáně, cizích těles a kontaminujících fakultativních anaerobů v ranách mohou vytvořit vhodné anaerobní podmínky, při kterých mohou spory *C. tetani* klíčit. Vegetativní formy množících se klostridií v nekrotických tkáních produkují silně účinný tetanospasmin, který je zodpovědný za klinické příznaky tetanu.

6.1.2.1.1 Patogeneze

Strukturálně se tetanový toxin skládá ze dvou řetězců spojených disulfidovým můstkem. Lehký řetězec představuje toxickou část a těžký řetězec je zodpovědný za vazbu na receptory a internalizaci toxinu. Tento neurotoxin se nevratně váže na gangliosidové receptory na zakončeních motorických neuronů a proniká do cytosolu nervových buněk, kde blokuje presynaptický přenos inhibičních signálů hydrolýzou vezikul obsahujících neurotransmitery. Průnik tetanospasminu přes membrány je podobný jako je u botulotoxinu, první fragment toxinu vytvoří póry v membráně, druhý fragment pak proniká do buňky. Toxin tak inhibuje uvolňování inhibičních neurotransmiterů glycinu a GABA, tím klesá práh dráždivosti motoneuronů a rozvíjí se obraz tonicko-klonických křečí. Ve vysokých koncentracích může tetanický toxin působit jako botulotoxin, tedy inhibici uvolňování acetylcholinu na cholinergních synapsích.

6.1.2.1.2 Klinické příznaky

Inkubační doba tetanu je obvykle mezi 5 a 10 dny, ale může se prodloužit až na 3 týdny. Pokud se rozvoj klinických příznaků opozdí, rána v místě infekce se může zahojit a tento stav se pak označuje jako latentní tetanus. Klinické účinky neurotoxinu jsou u všech domácích zvířat podobné. Povaha a závažnost klinických příznaků však závisí na anatomickém místě kde se klostridie množí, na množství produkovaného toxinu a vnímavosti hostitele. Rány na hlavě nebo v její blízkosti jsou obvykle spojeny s kratší inkubační dobou a zvýšenou tendencí ke generalizovanému tetanu. Lokalizovaný tetanus, který

obvykle postihuje méně vnímavé druhy, jako jsou psi, se prezentuje jako ztuhlost a křeče svalů v blízkosti místa poranění. Klinické příznaky zahrnují **svalovou ztuhlost, lokalizované křeče, změněnou srdeční a respirační frekvenci, dysfagii a změněnou mimiku**. Jen mírné hmatové nebo sluchové podněty mohou vyvolat tonické stahy svalů. Křeč maseterů vede ke kontraktuře čelistí, tzv. *trismus*. Pokud se přidá křeč mimických svalů rozvíjí se *risus sardonicus* (krutý či zlomyslný úsměv). U koní všeobecné svalové napětí může vyústit v typický postoj – do široka roztažené přední nohy a natažená hlava dopředu a dolů. Zvířata, která se zotaví z tetanu, nejsou nutně imunní, protože množství toxinu, které může vyvolat klinické onemocnění, je obvykle pod prahovou hodnotou potřebnou ke stimulaci tvorby neutralizačních protilátek.

6.1.2.1.3 Diagnostické postupy

Diagnóza tetanu je obvykle presumptivní a je založena na klinických příznacích a anamnéze nedávného traumatu u neočkovaných zvířat. Je nezbytné odlišení tetanu od otravy strychninem, zejména u psů. **Přímé roztěry materiálu z lézí** barvené podle Grama mohou odhalit charakteristické sporulující tyčinky *C. tetani*. Kultivační vyšetření nekrotické tkáně z inkriminované rány bývá často neúspěšné. Techniky založené na **PCR**, včetně real-time PCR detekující geny pro neurotoxin, mohou být také využity při stanovení laboratorní diagnózy onemocnění. K prokázání cirkulujícího neurotoxinu lze využít krevní sérum postižených zvířat, a to **biologickým pokusem** na laboratorních myších.

6.1.2.1.4 Léčba

K neutralizaci nenavázaného toxinu je třeba okamžitě podat **antitoxin**, buď intravenózně, nebo do subarachnoidálního prostoru ve třech po sobě následujících dnech. Vakcína ve formě toxoidu může být podána subkutánně k podpoře aktivní imunitní odpovědi i u zvířat, která dostala antitoxin. Vysoké dávky penicilinu se podávají intramuskulárně nebo intravenózně k potlačení množení vegetativních buněk *C. tetani* produkujících toxiny v infikované ráně. Součástí léčebného postupu je chirurgická toaleta ran spojená s odstraněním cizích těles, následným výplachem peroxidem vodíku, čímž se vytvoří aerobní podmínky, které pomáhají inhibovat množení původce v místě poranění. Tento postup léčby je mimořádně důležitý. Postižená zvířata by měla být umístěna v tichém a tmavém prostředí. Substituční terapie tekutinami, sedativy, myorelaxancii a intenzivní péče doplňuje terapeutické postupy.

6.1.2.1.4 Profylaxe

Ohrožená hospodářská zvířata by měla být běžně vakcinovaná tetanickým **toxoidem**. U koní je žádoucí rychlé chirurgické ošetření ran. Neočkovaným zvířatům, která utrpěla hluboké rány nebo jsou před chirurgickým zákrokem, by měl být podáván antitoxin (hyperimunní sérum). Tato pasivní ochrana trvá obvykle asi 3 týdny.

6.1.2.2 Botulismus

Botulismus je závažná, potenciálně smrtelná intoxikace obvykle navozená **požitím předem vytvořeného toxinu**. *Clostridium botulinum* je anaerobní grampozitivní tyčinka, která tvoří oválné subterminálně lokalizované endospory, které se vyskytují v půdě a vodním prostředí po celém světě. Je rozlišováno celkem sedm typů *C. botulinum* (A, B, C, D, E, F, G) a to na základě antigenních vlastností jimi produkováných toxinů.

Neurotoxiny *C. botulinum*, které se inaktivují až po dvacetiminutovém varu, vyvolávají podobné klinické příznaky, ale liší se svou antigenní povahou a účinností. Některé typy *C. botulinum* jsou

omezeny na určité zeměpisné oblasti. Ke klíčení endospor a množení vegetativních buněk spojených s produkcí toxinů dochází za anaerobních podmínek, jako jsou např. kazící se jatečně opracovaná těla zvířat, kadávery zvířat, rozkládající se rostlinné zbytky a kontaminované konzervované potraviny. **Toxiko-infekční botulismus**, méně častá forma onemocnění zvířat, se objevuje, když spory klíčí v ranách nebo ve střevním traktu. Střevní toxicko-infekční botulismus byl zaznamenán u hřibat, kuřecích brojlerů a krůt. Tato forma onemocnění má svůj význam i u uživatelů nelegálních drog v souvislosti s použitím kontaminovaných injekčních jehel. Spory *C. botulinum*, které jsou neúmyslně zaneseny do podkoží injekcí, v hypoxické tkáni vyklíčí a produkují toxin.

Většinu případů botulismu u domácích zvířat způsobuje *Clostridium botulinum* typ C a D. Ohniska botulismu se vyskytují nejčastěji u **vodních ptáků, skotu, koní, ovcí, norků, drůbeže a chovaných ryb**. Prasata a psi jsou vůči neurotoxinům relativně odolní a botulismus je vzácný také u koček. Botulismus koní a přežvýkavců souvisí s nekvalitní siláží, senáží nebo senem, které obsahuje kadavery hlodavců. Kontaminované syrové maso a jatečné odpady bývají zdrojem toxinu pro masožravce. Vodní ptáci a vodní drůbež se může intoxikovat požitáním mrtvých bezobratlých a červů, kteří vstřebali toxin z bahna v mělkých vodách vodních nádrží. Obvyklé zdroje toxinů *C. botulinum* typů A-G pro citlivé druhy jsou shrnuty v tabulce č. 7.

Tabulka 7 Přehled nejčastějších zdrojů botulotoxinů a vnímaví hostitelé

Toxin	Nejčastější zdroje	Vnímaví hostitelé
Typ A	Maso, konzervy a polokonzervy	Člověk
	Toxiko-infekce	Děti
	Maso, kadávery, půda	Norci, psi, prasata, skot
Typ B	Maso, konzervy a polokonzervy	Člověk
	Toxiko-infekce	Děti
	Toxiko-infekce, konzervovaná píče	Hřibata, dospělý koně, skot
Typ C	Uhynulý zooplankton (bezobratlí), červi, hnilobí vegetace, mršiny drůbeže	Vodní ptactvo, vodní drůbež, bažanti, hrabavá drůbež
	Hluboká drůbeží podestýlka, balené seno, senáž, siláž s mršinami hlodavců	Skot, ovce, koně
	Kazící se maso, zejména drůbeží	Psi, norci, lvi, opice
Typ D	Krmivo kontaminovaná mršinami hlodavců	Skot, ovce, koně

Typ E	Uhynulý zooplankton (bezobratlí), rybníční bahno	Konzumní ryby
	Ryby	Rybožraví ptáci, člověk
Typ F	Maso, ryby	Člověk
Typ G	Půdou kontaminované potraviny	Člověk (Argentina)

6.1.2.2.1 Patogeneze

Neurotoxiny *C. botulinum* jsou neúčinnějšími známými biologickými toxiny. Jedna minimální letální dávka, která postačí k usmrcení myši, odpovídá 10 pg botulotoxinu typu A. Přitom se podprahové dávky toxinu mohou tzv. sčítat. Toxin preformovaný v potravinách a následně absorbovaný z gastrointestinálního traktu cirkuluje v krevním oběhu a působí na neuromuskulární spojení cholinergních nervů a na periferní autonomní synapse. Jeho struktura a způsob účinku jsou podobné jako u tetanového toxinu. Těžký řetězec zprostředkovává vazbu na receptory na nervových zakončeních. Lehký řetězec či toxická část vstupuje do cytosolu buňky endocytózou. Intoxikace botulotoxinem vede k blokadě neuromuskulárních plotének periferního nervového systému tím, že **pozastavuje syntézu a uvolňování neuromediátoru acetylcholinu, což vede k svalové paralýze**. Ke smrti dochází v důsledku ochrnutí dýchacích svalů. Rozdíl mezi účinkem tetanotoxinu a botulotoxinu je způsoben jejich různými místy působení. Tetanový toxin putuje nervovým axonem do ventrálního rohu míšního, zatímco botulotoxin zůstává v neuromuskulárním spojení.

Požívané spory *C. botulinum* se obvykle vylučují výkaly. U toxiko-infekčního botulismu však klíčení spor ve střevě vede k produkci toxinů vegetativními buňkami. Faktory, které predisponují k toxiko-infekčnímu botulismu, nejsou dosud známy. Syndrom třesoucích se hříbat je forma toxiko-infekčního botulismu u hříbat do věku 2 měsíců. Je připisován vlivu stresu na klisnu, který vede ke zvýšení hladiny kortikosteroidů v mléce. Klinické příznaky botulismu, které se rozvíjejí 3 až 17 dní po požití toxinu, jsou podobné u všech druhů. **Rozšířené zorničky, suché sliznice, snížené slinění, ochablost jazyka a dysfagie jsou první příznaky intoxikace hospodářských zvířat**. Po nekoordinovanosti pohybu následuje paralýza a ochablost. **Paralýza dýchacích svalů** nutí postižené zvíře k břišním dýcháním. Tělesná teplota zůstává normální. Úmrtí může nastat během několika dnů od vzniku klinických příznaků. U ptáků dochází k postupné paralýze, která zpočátku postihuje nohy a křídla. Paralýza šíjových svalů je patrná pouze u dlouhokrkých druhů.

6.1.2.2.2 Diagnostické postupy

Klinické příznaky a anamnéza mohou usnadnit určení botulismu jako příčiny onemocnění s neurologickými projevy. Exaktní potvrzení botulismu však vyžaduje **prokázání toxinu v séru postižených zvířat**. Tradiční metodou průkazu toxinu je aplikace vyšetřovaného materiálu laboratorním myším. Po intraperitoneálním podání upraveného vzorku se rozvine charakteristický vzhled „vosího pasu“, což je důsledek břišního dýchání po ochrnutí dýchacích svalů. Sérum odebrané z uhynulých zvířat není vhodné pro očkování myším. **Biologická zkouška na myších** je stále jedinou uznávanou metodou pro potvrzení botulismu, a to kvůli vysoké citlivosti, přestože je metoda nákladná a její kompletní provedení trvá až 4 dny. Touto metodou je botulotoxin vzácně detekován i v krevním séru intoxikovaného skotu. Dalším možným vzorkem, který lze odebrat z čerstvých kadaverů skotu, je **mražený obsah GIT**. Včasné zamražení je nutné, aby se předešlo množení *C. botulinum* a falešně pozitivnímu nálezu toxinů ve vzorcích. Identifikace toxinu přímo v krmivech může mít význam při epidemiologických studiích.

Detekce genů pro toxin *C. botulinum* metodou **PCR** mají pro diagnostiku jen pomocný význam. Imunologické metody využívající techniku **ELISA** nebo **chemiluminiscenční testy** jsou sice citlivé, ale citlivost těchto testů se nevyrovná citlivosti biologické zkoušky na myších.

Typizace izolátů *C. botulinum* lze provádět řadou molekulárních typizačních technik.

Pokud je k dispozici polyvalentní antisérum, tak je účinné při neutralizaci nevázaného toxinu v časně fázi onemocnění. Náklady a dostupnost omezují rozsah, v jakém lze tento postup terapeuticky využít. Při intravenózním podání mohou být účinná léčiva, jako je tetraethylamid a guanidin-hydrochlorid, která podporují uvolňování aktivátorů v neuromuskulárních spojích. Mírně postižená zvířata se často zotavují v průběhu týdnů i bez léčby. Terapeutický postup by měla doplňovat dobrá chovatelská péče. Vzhledem k tomu, že buněčná patogeneze botulismu je blíže objasněna, zejména vazebný mechanismus toxinu, mohou být v budoucnu vyvinuta i nová účinná antidota.

6.1.2.2.3 Profylaxe

Vakcinace skotu toxoidem bývá indikována v endemických oblastech v Jižní Africe a Austrálii. Doporučuje se rutinní vakcinace na farmách chovaných norků a lišek.

6.1.3 Klinické stavy způsobené histotoxickými klostridii

Histotoxická klostridia vyvolávají u domácích zvířat celou řadu samostatně označovaných onemocnění (tabulka 8). Exotoxiny produkované množícími se klostridii vyvolávají jak lokální nekrózu tkání, tak mají také systémové účinky, které mohou vést ke smrti postižených zvířat. Některé histotoxická klostridia jsou **přítomny v tkáních jako latentní spory**, které mohou náhle za vhodných podmínek vyklíčit a vyvolat specifická klinická onemocnění. Mezi ně patří *C. chauvoei* a příležitostně *C. septicum*, postihující svalovou tkáň; dále *C. novyi* typ B a *C. haemolyticum*, uplatňující se v tkáni jater. Histotoxické klostridie se také dostávají do kontaminovaných ran, často začínají jako smíšené infekce, ze kterých se rozvine maligní edém a plynová gangréna. Mezi inkriminované původce uvedených infekčních stavů patří *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* typ A, *C. perfringens* typ A, občas také *C. sordellii*. Abomasitida způsobená *C. septicum* u ovcí (braxy) je příkladem specifického lokálního onemocnění.

6.1.3.1 Obvyklý výskyt

Endospory histotoxických klostridií jsou široce rozšířeny v životním prostředí a mohou přetrvávat v půdě po dlouhou dobu. Endospory konkrétních druhů se často vyskytují v určitých lokalitách a v přesně definovaných zeměpisných oblastech.

6.1.3.2 Patogeneze

Endogenní infekce. Je pravděpodobné, že většina požitých endospor se vylučuje výkaly, ale některé mohou prostoupit stěnu střeva a krevním oběhem jsou zaneseny do tkání, kde zůstávají bez účinku (latence). Aktivace inaktivních spor ve svalech nebo játrech vede k rozvoji endogenních infekcí, které zahrnují „black leg“, infekční nekrotickou hepatitidu a bacilární hemoglobinurii. Konkrétní sled souvislostí, které vedou k distribuci endospor ve tkáních, je nejasný. Spory pocházející z lumina střeva

mohou být transportovány do tkání také ve fagocytech. Poranění tkáně nebo její zhmždění vede ke snížení koncentrace kyslíku (hypoxie), které je nutné pro klíčení spor a množení vegetativní formy klostridií. Lokální nekróza způsobená exotoxiny pak umožňuje další množení původce v tkáních spojené s šířením nekrotizujícího procesu.

Tabulka 8 Histotoxická klostridia a choroby jimi způsobované

Druh a typ klostridia	Hlavní toxiny	Hostitel	Onemocnění
<i>C. perfringens</i> typ A	Alfa, theta	Člověk, zvířata	Plynová flegmóza (sněť)
<i>C. septicum</i>	Alfa	Skot, ovce	Maligní edém, snětivý zánět slezu (braxy)
<i>C. chauvoei</i>	Alfa, beta	Skot, ovce	Sněť šelestivá (blackleg)
<i>C. novyi</i> typ A a B	Alfa, beta	Ovce, kozy	Plynatá sněť, nekrotický zánět jater
<i>C. haemolyticum</i>	Beta	Skot, ojedinele ovce	Bacilární hemoglobinurie
<i>P. (C.) sordellii</i>	Alfa, beta	Skot, ovce, koně	Myonekróza, abomasitis

Exogenní infekce. Maligní edém a plynatá sněť, jsou výsledkem zanesení klostridií do ran. Anaerobní prostředí v nekrotické tkáni napomáhají vytvářet u smíšených infekcí fakultativními anaeroby. Rozšíření lokální destrukce tkáně je výsledkem produkce exotoxinů. Generalizované klinické příznaky u exogenních i endogenních klostridiových infekcí se projevují jako toxémie. Hlavní toxiny produkované histotoxickými klostridii a jejich biologické aktivity jsou uvedeny v tabulce č. 9. V mnoha případech jsou toxiny, které mají podobnou strukturu a funkci, produkovány různými druhy histotoxických klostridií, ačkoliv nomenklatura není u jednotlivých druhů konzistentní, α toxin jednoho druhu nemusí být nutně stejný toxin jako α toxin jiného druhu. α a β toxiny *C. sordellii*, α toxin *C. novyi* a α a β toxiny *C. difficile* (enteropatogenní *Clostridium*, dnes *Clostridioides*) patří do skupiny strukturně a funkčně příbuzných exotoxinů známých jako hlavní klostridiové cytotoxiny. Tyto toxiny jsou enzymy, které inaktivují nízkomolekulární proteiny. To narušuje cytoskelet, což vede k otevření mezibuněčných spojů a buněčné smrti. Toxin α *C. chauvoei* je hemolysin tvořící póry podobně jako letální toxin α *C. septicum* a α toxin *C. perfringens* A je fosfolipáza.

Tabulka 9 Hlavní toxiny produkované histotoxickými klostridii a jejich biologická aktivita

Druh a typ klostridia	Toxin	Biologická aktivita
<i>C. chauvoei</i>	α	Hemolyzin (ke kyslíku stabilní) s letálním a nekrotizujícím účinkem
	β	Deoxyribonukleáza
	γ	Hyaluronidáza
	δ	Hemolyzin (ke kyslíku labilní)
<i>C. septicum</i>	α	Letální, hemolytický a nekrotizující účinek
	β	Deoxyribonukleáza, leukocidín
	γ	Hyaluronidáza
	δ	Hemolyzin (ke kyslíku labilní)
<i>C. novyi</i> typ A	α	Cytotoxin s nekrotizujícím a letálním účinkem
<i>C. perfringens</i> typ A	α	Fosfolipáza s hemolytickým, nekrotizujícím a letálním účinkem
	θ (theta)	Perfringolyzin O, cytolyzin
	NetB	Nejasný význam, faktor virulence kmenů působící nekrotickou enteritis kuřat
<i>P. (C.) sordellii</i>	α	Lecitináza s hemolytickým účinkem
	β	Cytotoxin s letálním účinkem
<i>C. novyi</i> typ B	α	Cytotoxin s letálním a nekrotizujícím účinkem
	β	Lecitináza s hemolytickým, nekrotizujícím a letálním účinkem
<i>C. haemolyticum</i>	β	Fosfolipáza C s hemolytickým, nekrotizujícím a letálním účinkem

6.1.3.3 Klinické infekce

Klinické infekce vyvolané histotoxickými klostridii zahrnují „black leg“, maligní edém, plynovou gangrénu, „braxy“, infekční nekrotickou hepatitidu a bacilární hemoglobinurii. Pokud nejsou zavedeny vhodné vakcinační programy, tak tyto chorobné stavy mají tendenci se na některých farmách opakovaně vyskytovat. Histotoxické klostridiové infekce by měly být brány v úvahu zejména pokud náhle uhynou jednotlivá zvířata. Výrazné postmortální změny mohou naznačovat, že se jedná o tyto infekce.

Sněť šelestivá (Blackleg) je akutní onemocnění skotu a ovcí způsobené *C. chauvoei* a vyskytuje se po celém světě. U skotu je nejčastější u mladých prospívajících zvířat ve věku od 3 měsíců do 2 let a infekce je obvykle **endogenní**, kdy se latentní spory ve svalu aktivují v důsledku traumatického poranění. Toto onemocnění může postihnout také ovce v jakémkoliv stáří a v mnoha případech se jedná

o exogenní infekce, kdy vstupní branou jsou kožní rány. U skotu i ovcí se rozvíjí gangrenózní celulitida a myozitida způsobená exotoxiny produkovanými množícími se klostridii. Infekce obvykle vede k rychlému úhynu. Často jsou postiženy gluteální svaly končetin, svaly hřbetu a krku. Poškození kosterního svalstva se projevuje kulháním, otoky a krepitací v důsledku nahromadění plynu v podkoží. Léze ve svalech jazyka a hrdla mohou vyvolat dušnost. Léze v myokardu a bráničních pilířích mohou způsobit náhlou smrt bez předchozích příznaků. Přímá imunofluorescence otiskových preparátů nebo techniky PCR ze vzorků z typických lézí jsou rychlé a citlivé diagnostické metody potvrzující tuto infekci.

Maligní edém a plynová gangréna jsou **exogenní infekce** nekrotizující měkké tkáně. Tyto stavy nejčastěji vyvolává *C. septicum* (maligní edém) a *C. perfringens* typ A (plynová gangréna). *C. novyi* typ A, *C. chauvoei* a vzácně *C. sordellii* se mohou uplatnit samostatně, nebo ve spojení s jinými druhy klostridií. Další aerobní a anaerobní oportunní původci mohou být v lézích také přítomni. Infekce se může rozvinout jako následek kontaminace ran, poranění při těžkém porodu nebo v místě vpichu injekce s olejovitou složkou (vakcíny). Hypoxie tkáně spojená s traumatem poskytuje nízký redoxní potenciál, alkalické pH a produkty proteinového rozkladu potřebné pro množení klostridií.

Maligní edém se projevuje jako celulitida s minimální snětí a tvorbou plynů. Zřetelnými klinickými znaky jsou otok tkání způsobený edémem. Generalizované příznaky toxémie zahrnují depresi a vyčerpání. Při rozsáhlých lézích může rychle následovat smrt. Plynová gangréna je charakterizována rozsáhlou bakteriální invazí do poškozené svalové tkáně. Produkce plynu je klinicky zjištělná jako subkutánní krepitace. Klinické znaky toxémie u plynové gangrény jsou podobné těm, které se vyskytují u maligního edému.

U beranů se obdobná infekce poranění hlavy způsobené bojem nazývá **bighead**, „**velká hlava**“. Dochází k edematóznímu otoku podkožních tkání hlavy, krku a hrudníku. Smrt může být rychlá. Klinické příznaky jsou připisovány nekrotizujícímu α toxinu *C. novyi* typ A.

Zánět slezu (abomasitis, „Braxy“) ovcí, je způsobena exotoxiny *C. septicum*. Onemocnění se vyskytuje v zimě v období silných mrazů nebo přívalů sněhu. Bylo zaznamenáno v některých částech severní Evropy a příležitostně i jinde ve světě. Patogeneze je vysvětlována jako následek pozření zmrzlého krmiva, které způsobí lokální nekrózu sliznice abomasu, což usnadní invazi *C. septicum*.

Průběh onemocnění je rychlý a většina zvířat umírá bez předchozích příznaků. Anorexie, deprese a horečka se mohou projevit bezprostředně před smrtí. *Clostridium septicum* může být prokázáno ve vzorcích z lézí ve sliznici slezu technikou přímé imunofluorescence.

Infekční nekrotická hepatitida je akutní onemocnění, které postihuje ovce a příležitostně skot. U koní a prasat byly popsány jen vzácné případy. Nekróza je způsobena exotoxiny *C. novyi* typ B, které se množí v jaterní tkáni v důsledku poškození a zanesení infekce migrujícím parazitem *Fasciola hepatica* nebo jinými migrujícími parazity. Úmrtí je rychlé bez předchozích příznaků a nemoc vyžaduje odlišení od akutní fasciolózy. Výraz „černá nemoc“ se vztahuje na tmavé zabarvení kůže způsobené výraznou žilní kongescí podkožních tkání pozorovanou při postmortálním vyšetření. Přímou imunofluorescencí lze použít k prokázání *C. novyi* typ B ve vzorcích z jaterních lézí.

Bacilární hemoglobinurie se vyskytuje především u skotu a příležitostně u ovcí. Při této endogenní infekci spory *C. haemolyticum* perzistují v játrech, pravděpodobně v Kupfferových buňkách. Stejně jako u infekční nekrotické hepatitidy je hlavním faktorem, který usnadňuje klíčení spor a následné množení klostridií, migrace motolic. Alfa toxin a fosfolipáza produkovaná vegetativními buňkami původce, způsobuje kromě nekrózy tkáně jater také intravaskulární hemolýzu. Hemoglobinurie, hlavní klinický rys onemocnění, je důsledkem rozsáhlé destrukce červených krvinek. Původce může být prokázán ve vzorcích z jaterních lézí technikou přímé imunofluorescence.

6.1.3.4 Diagnostické postupy

Histotoxická klostridia, která vyvolávají tyto infekce mohou být prokazovány technikou přímé imunofluorescence. *Clostridium perfringens* se kultivuje v anaerobní atmosféře na krevním agaru při 37 °C po dobu 48 hodin. Kolonie *C. perfringens* typ A mají průměr až 5 mm, jsou kruhové, ploché, šedivé a obklopené zónou dvojité hemolýzy. S kulturou *Streptococcus agalactiae* dává *C. perfringens* pozitivní výsledek v CAMP testu. CAMP faktor uvolněný *S. agalactiae* zvyšuje částečnou hemolýzu produkovanou α toxinem *C. perfringens*. Charakter hemolýzy je podobný jako u reakce *S. agalactiae* s β hemolysinem *Staphylococcus aureus*. Pro identifikaci histotoxických druhů klostridií v tkáních byly vyvinuty techniky PCR.

6.1.3.4 Léčba a profylaxe

Vzhledem k tomu, že patogeneze onemocnění způsobených histotoxickými klostridii je podobná, jsou postupy pro jejich léčbu a kontrolu rovněž podobné. I když je léčba obvykle neúčinná, penicilin nebo širokospektrá antibiotika podávaná zvířatům v rané fázi onemocnění mohou být účinné. Nejúčinnější metodou prevence těchto onemocnění je vakcinace, obvykle **bakterinovými a toxoidovými vakcínami** s různými adjuvancií. Na některých farmách mohou být zapotřebí vícesložkové vakcíny, které navozují ochranu proti několika patogenním druhům klostridií. Zvířata by měla být vakcinována ve věku 3 měsíců a přibližně o 3 týdny později by měla být provedena revakcinace. Doporučuje se pak každoroční revakcinace.

6.1.4 Enteropatogenní a enterotoxemii vyvolávající klostridie – *C. perfringens*

Klostridia, která způsobují enterotoxemii a enteropatie, se množí ve střevním traktu a uvolňují při tom toxiny, které mají lokální i generalizované účinky. Patogenní kmeny těchto klostridií se mohou vyskytovat ve střevní mikroflóře zvířat, ale vyvolávají onemocnění pouze za definovaných okolností. ***Clostridium perfringens* typ A, B, C a D** má u domácích zvířat zvláštní význam. Faktory, které predisponují k množení klostridií ve střevě zahrnují nevhodné metody chovu, náhlé změny krmení a vlivy prostředí. Mnoho onemocnění způsobených těmito bakteriemi lze tedy považovat za multifaktoriální a prevence zahrnuje vhodná chovatelská opatření.

6.1.4.1 Obvyklý výskyt

Clostridium perfringens se nachází v půdě, ve výkalech a ve střevě zvířat a lidí. Spory *Clostridium perfringens* typ B, C a D mohou přežívat v půdě po dobu několika měsíců. *Clostridium perfringens* typ A, které tvoří součást normální střevní flóry, je široce rozšířené i v půdě.

6.1.4.2 Patogeneze a patogenita

Clostridium perfringens typ A až E produkuje řadu antigenně odlišných exotoxinů, které způsobují lokální a systémové změny pod obrazem enterotoxemie. Produkuje čtyři hlavní toxiny, **alfa (α)**,

beta (β), epsilon (ε) a iota (ι); produkce se liší u každého typu *C. perfringens* a určuje specifický klinický syndrom. Toxiny produkované *C. perfringens* typ A až E, jejich biologické aktivity a související onemocnění jsou uvedeny v tabulce č.10. Popsána byla i řada dalších toxinů, z nichž některé mohou zvýšit virulenci. Mezi ně patří **hemolyziny, kolagenáza, perfringolysin O, β2 toxin a hyaluronidáza**. Navíc enterotoxin, který má cytotoxické vlastnosti, je produkován všemi kmeny a je důležitý při střevních formě onemocnění. Relativní význam různých toxinů, který je znám pouze u některých typů *C. perfringens*, je uveden v tabulce 10. Ačkoli je α toxin produkován všemi typy *C. perfringens*, je známo, že hraje významnou roli v rozvoji plynové gangrény, ale jeho role jako faktoru virulence u kmenů typu A je méně jasná. Některé studie nekrotické enteritidy kuřat dokonce naznačují, že tento toxin není základem patogenním faktorem.

Tabulka 10 Nemoci způsobené jednotlivými typy *C. perfringens* a jejich hlavní toxiny

<i>C. perfringens</i> typ	Toxiny	Onemocnění
A	Alfa	Nekrotická enteritida kuřat, nekrotizující enterokolitida selat, hemoragická gastroenteritida psů
B	Alfa, beta, epsilon	Dyzentérie jehňat, hemoragická enteritida telat a hříbat
C	Alfa, beta, enterotoxin	Hemoragická enteritida novorozených selat, jahňat, telat a hříbat; fatální enterotoxémie dospělých ovcí, koz a skotu ve výkrmu; nekrotická enteritida kuřat
D	Alfa, epsilon	„pulpy kidney“ ovcí, enterotoxémie telat, dospělých koz a kůzlat
E	Alfa, iota	Hemoragická enteritis telat, enteritida králíků

6.1.4.3 Klinické infekce

Ačkoliv je *C. perfringens* typ A primárně spojováno s **plynovou gangrénou u lidí a domácích zvířat** a s **intoxikacemi z jídla u lidí**, je také původcem **nekrotizující enterokolitidy u selat, nekrotické enteritidy brojlerových kuřat, hemoragické gastroenteritidy psů a slepého střeva s kolonem (typhlocolitis) u koní**. *Clostridium perfringens* typ E způsobuje **enteritidu králíků** a příležitostně hemoragickou enteritidu telat. U ovcí *C. perfringens* typy B, C a D způsobují dyzenterii jehňat a onemocnění ledvin. *Clostridium perfringens* typ A a C způsobují hemoragickou enteritidu novorozených selat. U jiných druhů jsou popisována srovnatelná onemocnění.

Dyzentérie jehňat. Toto onemocnění mladých jehňat způsobené *C. perfringens* typ B bylo hlášeno v některých částech Evropy a Jihoafrické republiky. Morbidita v ohniscích dyzentérie jehňat může být až 30 % při vysoké úmrtnosti. Postižená jehňata, obvykle v prvním týdnu života, mohou vykazovat břišní distenzi, bolest a krví potřísněné výkaly. Vysoká citlivost této věkové skupiny je přičítána absenci

mikrobiální diverzity a nízké proteolytické aktivitě ve střevě mláďat. Beta toxin je extrémně citlivý na účinek trypsinu, ale při jeho nízké aktivitě si zachovává svou účinnost a vyvolá onemocnění. Naproti tomu epsilon toxin, který je také produkován *C. perfringens* typ B, vyžaduje pro aktivaci trypsinem. Při postmortálním vyšetření je zjišťována rozsáhlá hemoragická enteritida s oblastmi vředovitých změn. Zvýšená propustnost kapilár vyvolaná toxinem vede k hromadění tekutiny v peritoneální dutině a v osrdečniku.

Postižení ledvin (Pulpy kidney). Toto onemocnění, způsobené *C. perfringens* **typ D**, se vyskytuje u ovcí na celém světě. Tento stav je také popisován jako onemocnění spojené s překrměním zrninami nebo mladou pastvou. Požití nadměrného množství krmiva vede k pasáži částečně strávené potravy z bachoru do střeva. Vysoký obsah škrobu v částečně stráveném krmivu je vhodným substrátem pro rychlé množení klostridií. Přitom se tvoří prototoxin, který je aktivován proteolytickými enzymy ve střevě, což vede k toxemii a rozvoji klinických příznaků.

Běžně se vyskytuje u jehňat ve věku od 3 do 10 týdnů. Průběh onemocnění je obvykle rychlý a jehňata jsou často bez předchozí kliniky nalezena mrtvá. Klinické příznaky zahrnují otupělost, opistotonus, křeče a terminální kóma. Při subakutním onemocnění mohou být zjišťovány příznaky postižení centrálního nervového systému. V pozdějších stádiích nemoci může být zřejmé nadýmání. Při všech formách onemocnění se zjišťuje hyperglykémie a glykosurie. Postižené dospělé ovce, které přežily několik dní, mohou vykazovat průjem a vrávorání. Při akutním onemocnění mohou být jedinými postmortálními nálezy rozptýlené hyperemické oblasti ve střevech a hromadění tekutiny v osrdečniku. Typický postmortálním nálezem je rychlá autolýza ledvin spojená s měknutím pulpy. Projev subakutních účinků epsilon toxinu na cévní systém, je charakterizován symetrickými hemoragickými lézemi v bazálních gangliích a středním mozku.

Infekce *Clostridium perfringens* typ C způsobuje **akutní enterotoxémii dospělých ovcí** ve vymezených zeměpisných oblastech v Anglii. Onemocnění, které se vyskytuje u ovcí na pastvě, se projevuje náhlými úhyny, i když některá zvířata mohou být nalezena v terminálních křečích. V patogenezi onemocnění hraje hlavní roli β toxin. Nálezy po porážce zahrnují ulceraci jejunu, hyperemii v tenkém střevě a nahromadění tekutiny v dutině břišní spolu s překrvením peritoneálních cév a petechiálním krvácením.

Hemoragická enteritida u selat. Tato perakutní enterotoxemie způsobená *C. perfringens* **typ C** je celosvětově popisována u novorozených selat. Úmrtnost postihuje celé vrhy až do 80 %. Zdrojem infekce jsou výkaly prasnice. Predispozičním faktorem může být špatná zoohygiena chovu. Klinický průběh onemocnění je rychlý, smrt nastává do 24 hodin. Imunohistochemické studie ukázaly, že vazba β toxinu na endoteliální buňky cév se objevuje ihned v počátku onemocnění, a to může vyvolat cévní nekrózu, která přispívá k pozorovaným patologickým lézím. U starších selat do 2 týdnů stáří, která mohou být občas také postižena, se rozvine chronická forma onemocnění. Klinické příznaky zahrnují otupělost, anorexii, krví zbarvené výkaly a perianální hyperemii. Při postmortálním vyšetření je zjišťována krví zbarvený obsah střeva a nekróza střevní sliznice. Léze se obvykle nacházejí v ileu, slepém střevě a tlustém střevě. Nadbytek serózně krvavé tekutiny je přítomen v dutině břišní a hrudní. Kmeny *C. perfringens* typ A způsobují méně závažnou nekrotizující enterokolitida u sajčích a čerstvě odstavených selat.

Nekrotická enteritida kura domácího. Nekrotická enteritida způsobená *C. perfringens* **typ A**, a méně často kmeny **typu C**, se běžně vyskytuje u 2 až 5 týdnů starých brojlerových kuřat chovaných na podestýlce a u 7 až 12 týdnů starých krůt. Jedná se o akutní enterotoxemii charakterizovanou náhlým nástupem a vysokou mortalitou. *Post mortem* se zjišťují ve sliznici tenkého střeva nekrotické oblasti. K rozvoji onemocnění predisponují náhlé změny krmiva, snížená motilita střeva a poškození sliznice způsobené kokcidiemi a jinými střevními patogeny. Mortalita u ptáků infikovaných současně druhy *Eimeria* je o 25 % vyšší než u jedinců infikovaných pouze klostridiemi.

Význam nekrotické enteritidy v drůbežářském průmyslu EU v posledních letech vzrostl, a to kvůli zá-
kazu používání antimikrobiálních růstových stimulatorů. Za důležitý faktor virulence je považován
toxin NetB a α toxin má jen menší význam.

Enterotoxémie způsobené *C. perfringens* typ B byly zaznamenány u novorozených hříbat, telat
a dospělých koz. U těchto druhů tento stav rychle končí fatálně s nálezem hemoragické enteritidy.
Clostridium perfringens typ C je spojován s onemocněním skotu při výkrmu. U telat, jehňat a hříbat
způsobuje *C. perfringens* typ C infekce provázené akutní enterotoxémií a hemoragickou enteritidou,
která se patoanatomickým nálezem podobá infekcím novorozených selat. U kůzlat a dospělých koz se
vyskytují enterotoxémie způsobená *C. perfringens* typ D.

6.1.4.4 Diagnostické postupy

Náhlá úmrtí ve skupinách neočkovaných zvířat na farmách, kde byla dříve zaznamenána oh-
niska klostridiové enterotoxémie, mohou nasvědčovat infekcím způsobeným *C. perfringens* typ B, C
nebo D. U čerstvě uhynulých zvířat bývají postmortální nálezy charakteristické. Přítomnost fokální sy-
metrické encefalomalacie svědčí o zapojení *C. perfringens* typ D. Typické pro klostridiovou enteroto-
xémií jsou mikroskopické nálezy vysokého počtu grampozitivních tyčinek v tamponových střezech ze
sliznice nebo roztěrech z obsahu tenkého střeva čerstvě uhynulých zvířat. Izolace *C. perfringens* typ B
a C z takových vzorků, zejména v čisté kultuře, tuto diagnózu podporuje. Jako alternativa k **testům
neutralizace toxinů *in vivo*** může být použita **PCR** detekující příslušné geny charakteristické pro daný
typ *C. perfringens*. Při postižení ledvin je typickým nálezem glykosurie. Testy neutralizace toxinů na
laboratorních myších a morčatech mohou s konečnou platností identifikovat toxiny *C. perfringens* pří-
tomné ve střevním obsahu čerstvě uhynulých zvířat. Vzhledem k labilitě některých z těchto toxinů,
zejména β toxinu, se nemusí jejich přítomnost ve střevním obsahu při klostridiové enterotoxémii nutně
prokázat. Za tímto účelem se vyšetřuje supernatant z odstředěného obsahu ilea. Do vzorku supernatantu
se přidávají antitoxiny specifické pro každý typ *C. perfringens*, čímž vzniknou tři dílčí vzorky. Jako
pozitivní kontrola slouží vzorek supernatantu s přidaným fyziologickým roztokem. Aby proběhla ne-
utralizace toxinů, je každá směs před intravenózní aplikací myším nebo intradermální injekcí morčatům
uchovávána při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Obvykle se aplikuje myším 0,3 ml vzorku a 0,2 ml
morčatům. Výsledná neutralizace pozorovaná v testech na myších nebo morčatech udává specifický typ
C. perfringens, který byl původcem enterotoxemie.

Jako alternativa k testům *in vivo* k prokázání toxinu ve střevním obsahu může být použita
ELISA. Citlivost a specifická ELISA testu se blíží citlivosti a specifčnosti testů *in vivo*. Citlivost
metod ELISA je často dokonce vyšší než citlivost metod *in vivo*, což může vést při absenci jiných dia-
gnostických ukazatelů k chybné diagnóze. ELISA testy totiž dokáží detekovat nízké hladiny toxinu ve
střevním obsahu i u zdravých zvířat.

6.1.4.5 Léčba a profylaxe

V některých případech může mít význam podání **hyperimunního séra**, pokud je dostupné.
Vzhledem k akutní povaze onemocnění je léčba antibiotiky obecně neúčinná. Hlavním profylaktickým
opatřením je očkování. Bahnice by měly být očkovány toxoidem 6 týdnů před bahněním, aby byla za-
jištěna pasivní ochrana jehňat do 8 týdnů stáří. Bahnice, které jsou očkovány poprvé, by měly dostat dvě
dávky vakcíny s odstupem jednoho měsíce. Doporučuje se každoroční revakcinace. V rámci prevence
postižení ledvin by měla být jehňata před dosažením věku 2 měsíců očkována toxoidem a za 1 měsíc by

měla být revakcinována. Je třeba se vyhnout náhlým změnám ve složení krmiva a dalším faktorům predisponujícím k enterotoxemii.

6.1.5 Další enteropatogenní klostridia

6.1.5.1 *Clostridioides (dříve Clostridium) difficile*

Infekce *C. difficile* jsou popisovány u **psů s chronickým průjmem** a u případů **hemoragické enterokolitidy novorozených hříbat**. Onemocnění hříbat se může objevit i při absenci předchozí antimikrobiální léčby, ale onemocnění u jiných druhů zvířat a u lidí je obvykle spojeno s **předchozí antimikrobiální léčbou**, která potlačuje normální mikroflóru ve střevě a je neúčinná na spory klostridií. Ty následně vyklíčí a množící se *C. difficile* uvolňuje toxiny, které způsobí průjem. Nosičství *C. difficile* u lidí i zvířat je poměrně běžné; normálně je ale množení této bakterie potlačováno zdravou mikroflórou. Proto problémy vznikají po antimikrobiální léčbě, u lidí zejména u hospitalizovaných pacientů (spory toxinogenních kmenů v prostředí nemocnic je téměř nemožné zlikvidovat). *C. difficile* je přirozeně rezistentní ke klindamycinu, rizikové jsou také širokospektrální aminopeniciliny, cefalosporiny a fluorochinolony. Charakteristika kmenů *C. difficile* je tradičně založena na tzv. ribotypizaci. Nozokomiální infekce vyvolané kmeny některých ribotypů mají velký význam v zdravotní péči a v poslední době nabývají na významu také u koní a u novorozených selat. *Clostridioides difficile* produkuje dva hlavní toxiny, A a B, oba patří do skupiny klostridiových cytotoxinů. **Toxin A je enterotoxin a B je silný cytotoxin**. Oba narušují cytoskelet enterocytů. *Clostridioides difficile* a jeho toxiny mohou být detekovány i ve výkalech zdravých zvířat, proto některé aspekty patogeneze onemocnění zůstávají stále nejasné. Diagnóza je založena na prokázání toxinu ve výkalech testy na principu **ELISA**. Pro člověka jsou k dispozici komerční soupravy ELISA, ale jejich vhodnost pro testování vzorků ze zvířat nebyla zatím důkladně vyhodnocena. Prevence průjmu spojeného s *C. difficile* je založena na správné preskripční praxi antimikrobik, zmírnění stresu a důkladném čištění a dezinfekci chovatelského zařízení. K léčbě je indikován především metronidazol.

6.1.5.2 *Clostridium colinum*

Tento druh klostridia bývá izolován v souvislosti s enteritidou křepelek, kuřat, krůt, bažantů a tetřevů. Úmrtnost se může u citlivých křepelek blížit 100 %, ale u kuřat je obvykle nižší než 10 %. Při postmortálním vyšetření jsou přítomny ulcerace střeva a v některých případech nekróza jater.

6.1.5.3 *Clostridium spiroforme*

Mikrob s charakteristicky stočenou bakteriální buňkou je spojován s případy spontánní enteritidy a enteritidy vyvolané použitím antimikrobik u králíků. Tento stav podobný enterotoxemii může být pro králíky fatální již během 48 hodin. K predispozičním faktorům patří perorální podávání antimikrobik a dieta s nízkým obsahem vlákniny. Antibiotická léčba nepříznivě ovlivňuje střevní mikroflóru králíka, která je složena převážně z grampozitivních bakterií. Toxin uvolňovaný *C. spiroforme* je neutralizován antitoxinem proti toxinu *C. perfringens* typ E a to díky strukturální podobnosti toxinů obou druhů. Je to binární toxin s cytolytickou aktivitou a je kódován geny *sas* a *sbs*. Byly popsány testy PCR pro průkaz tohoto původce i jeho genů kódujících toxiny.

6.1.5.4 *Clostridium piliforme*

Tento sporotvorný, vláknitý a svojí povahou intracelulární patogen je atypickým členem skupiny patogenních klostridií. Nebyl kultivován na umělých médiích a roste pouze v tkáňové kultuře nebo na kuřecích embryích. Ačkoli se původně nazýval *Bacillus piliformis*, sekvenování DNA prokázalo jeho vztah ke klostridiím. Zdrojem infekce je obvykle infikované zvíře. Infekce vyvolaná *C. piliforme*, známá spíše jako **Tyzzerova choroba**, se projevuje těžkou **nekrózou jater**. Tyto infekce byly původně popsány u myši a dalších laboratorních zvířat. Sporadicky se může vyskytnout u hříbat a vzácně u telat, psů a koček. K infekci je predisponuje stres nebo imunosuprese. Postižená hříbata jsou obvykle mladší 6 týdnů a u mnoha z nich se pouze zjistí kóma a náhlý úhyn. Po perorální infekci nastává inkubační doba, která trvá až 7 dní. Klinické příznaky zahrnují depresi, anorexii, horečku, žloutenku a průjem. Hepatomegalie s rozsáhlými oblastmi nekrózy jaterní tkáně jsou hlavním postmortálním nálezem. Laboratorní diagnostika je založena na histologickém průkazu původce v hepatocytech technikou impregnace stříbrem podle Warthin-Starry. Byly popsány i techniky detekce založené na PCR. Vzhledem k akutní povaze onemocnění není obvykle možné včas zahájit specifickou léčbu.

7. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (lactic acid bacteria, LAB), jsou skupinou fylogeneticky různorodých, ale metabolicky dosti podobných bakterií. Tyto bakterie hrají důležitou roli při fermentaci potravin a krmiv, kde přispívají k jejich delší údržnosti a některé jejich kmeny mají také pozitivní vliv na zdraví lidí a zvířat. Tato různorodá skupina **grampozitivních nesporelujících anaerobních nebo fakultativně anaerobních koků nebo tyčinek produkuje kyselinu mléčnou jako jeden z hlavních produktů metabolismu sacharidů**. Bakterie mléčného kvašení mohou být charakterizovány buď jako homofermentativní nebo hetero-fermentativní, a to na základě konečného produktu fermentace. **Homofermentativní** kmeny produkují kyselinu mléčnou jako hlavní produkt fermentace glukózy. Tyto kmeny tvoří enzym aldolázu, která štěpí glukózu přímo na kyselinu mléčnou. Navíc se může jednat o různé izomery kyseliny mléčné, pravotočivou (D), levotočivou (L) nebo racemickou (DL). **Heterofermentativní** kmeny fermentují glukózu na několik produktů, vedle kyseliny mléčné to jsou oxid uhličitý, kyselina octová a etanol. K tomu využívají alternativní cestu přeměny šesti uhlíkových cukrů (hexóz) a pěti uhlíkových cukrů (pentóz) enzymem fosfoketolázou.

7.1 Výskyt

LAB se nacházejí na místech, kde jsou dostupné sacharidové substráty. Patří sem rovněž různé druhy potravin (mléko, maso, pivo, víno, ovocné šťávy, kynuté těsto, nakládaná zelenina), krmiva (siláž), půda a odpadní voda. U lidí a zvířat LAB najdeme v dutině ústní, v gastrointestinálním a pohlavním traktu.

LAB se tradičně využívají jako startovací kultury při výrobě mléčných výrobků jako jsou acidofilní mléka, jogurt, podmáslí, tvaroh, tvrdé a měkké sýry (Tabulka č.). Podílejí se také na zrání některých masných výrobků a konzervaci zeleniny. Mezi tyto produkty např. patří fermentované masné výrobky (Lovecký salám, Poličan, Uherák, Chorizo aj.), kvašená zelenina (okurky, kysané zelí, kimchi, pickles).

Z pohledu taxonomie se LAB řadí do dvou odlišných kmenů bakterií, Firmicutes a Actinobacteria. Většina z nich patří do kmene Firmicutes, řádu Lactobacillales a rodů *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Kmen Actinobacteria zahrnuje pouze druhy rodu *Bifidobacterium*. Větší význam mají především rody *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Weissella*.

Tabulka 11 LAB jako složky startovacích kultur pro fermentované mléčné výrobky

Typ produktu	Složení startovací kultury
Typ sýra bez tvorby ok (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 až 98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2 až 5%
Tvaroh, fermentovaná mléka, druhy sýrů s málo popř. s malými oky (např. Eidam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 %; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5 %; nebo <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85 až 90 %; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3 %; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%

Máslo, fermentovaná mléka, podmásílí, druhy sýrů s kulatými oky (např. Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70 až 75 %; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. " <i>diacetylactis</i> ", 15 až 20 %; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2 až 5 %
Kefír	Kefírová zrna obsahující kvasinky fermentující laktózu (např. <i>Candida kefir</i>), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Amasi je kyselé kravské mléko, které tradičně pijí obyvatelé Zuluů, Jižní Afrika	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> a <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>Pseudoplantarum</i>
Chhurpi je tvarohový fermentovaný výrobek z kravského nebo jačího mléka, Nepál	Byly izolovány <i>Lb. bifermantans</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> a <i>E. faecium</i>
Kumys se vyrábí z kobyliho mléka, které bylo přirozeně fermentováno LAB a kvasinkami	LAB zahrnující 4 druhy <i>Enterococcus</i> , 45 druhů nebo poddruhů <i>Lactobacillus</i> , 4 druhy <i>Lactococcus</i> , 4 druhy <i>Leuconostoc</i> , 2 druhy <i>Streptococcus</i> a 3 druhy <i>Weissella</i>
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Smetanová kultura	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Cremoris</i>
Jogurtová kultura	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>

7.2 Významní zástupci LAB

7.2.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakteria jsou jako jediná z LAB příslušníky kmene Actinobacteria. Tyto grampozitivní, nepohyblivé a často se větvící anaerobní bakterie patří do samostatného řádu Bifidobacteriales a čeledě Bifidobacteriaceae. Přirozeně se vyskytují v gastrointestinálním traktu, pochvě a ústní dutině savců, včetně lidí.

Před 70 léty byly všechny bifidobakterie souhrnně označovány jako „*Lactobacillus bifidus*“. Dnes tento rod zahrnuje již 86 validně popsanych druhů. Bifidobakteria se pravidelně vyskytují v tlustém střevě lidí a zvířat a byly izolovány také z batoru a výkalového vaku včely medonosné. U lidí převažují druhy *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. adolescentis*, zatímco ze zvířat bývá často izolován druh *B. animalis*. Bifidobakteria jsou téměř ideální probiotické bakterie, protože to jsou typicky střevní mikroorganismy, u kterých jsou navíc doloženy prokazatelné pozitivní efekty na zdravotní stav lidí a zvířat. Tyto přínosy jsou obdobné jako u jiných LAB (viz. rod *Lactobacillus*), zahrnují ochranu proti patogenům, modulaci imunitního systému hostitele, tvorba vitamínů (riboflavin - vitamín B2). Určitým problémem pro jejich uplatnění jako probiotik je jejich citlivost na vnější podmínky, neboť se jedná o

striktně anaerobní bakterie. V současnosti se bifidobakteria používají k výrobě fermentovaných mlék, samostatně nebo v kombinaci s jinými bakteriemi mléčného kvašení.

7.2.2 Rod *Carnobacterium*

Tyto bakterie byly vyčleněny jako skupina „atypických laktobacilů“ opakovaně izolovaných z vakuově baleného a chlazeného masa. Karnobakteria se vyskytují v potravinách včetně mléčných výrobků a mají potenciál být využity jako ochranné kultury, zejména pokud produkují bakteriociny. V této souvislosti byla například prokázána inhibice patogenních kmenů *Listeria monocytogenes*.

7.2.3 Rod *Enterococcus*

Enterokoky jsou považovány za složku přirozené střevní mikrobioty člověka a zvířata, v některých situacích se mohou uplatňovat jako oportunní patogeny. Příznivé vlastnosti enterokoků vedly k jejich použití do startovacích kultur při produkci určitých druhů sýrů. *Enterococcus faecium* se podílí na počáteční fázi fermentačního procesu při přípravě siláží. Další užitečnou vlastností některých kmenů enterokoků je produkce bakteriocinů působících proti jiným enterokokům, listeriím a klostridiím. Proto se některé kmeny enterokoků používají jako probiotika k prevenci nebo k podpůrné léčbě střevních infekcí lidí a zvířat. Probiotické kmeny enterokoků našly uplatnění hlavně v krmivech pro prasata a drůbež. Jako probiotika pro zvířata a člověka jsou využívány vybrané kmeny druhů *E. faecalis* a *E. faecium*.

7.2.4 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní kataláza-negativní bakterie, které netvoří spory. Morfologie buněk je většinou tyčinkovitého tvaru. Jsou běžně přítomné v různých prostředích a obvykle nejsou patogenní. U lidí a zvířat jsou hlavní součástí mikrobioty gastrointestinálního traktu a vagíny, kde udržují kyselé pH. Mnoho druhů se v přírodě také účastní rozkladu rostlinných zbytků. Některé laktobacily se uplatňují při výrobě jogurtu, sýrů, kvašené zeleniny, piva, vína, a dalších typů fermentovaných (kvašených) potravin.

Rod *Lactobacillus*, poprvé popsán již v roce 1901, se v posledních desetiletích velmi rychle rozšířil co do počtu popsáných druhů. Rod donedávna obsahoval více než 250 druhů. Celogenomové analýzy však ukázaly, že někteří zástupci rodu jsou fylogeneticky blíže příbuzní se zástupci jiných rodů, např. *Pediococcus*, *Fructobacillus*, *Paralactobacillus* a *Leuconostoc*. To naznačilo potřebu hlubší taxonomické reorganizace, což vedlo k vytvoření 23 nových rodů a redukci počtu druhů původního rodu *Lactobacillus* na pouhých 38, které jsou blíže příbuzné původnímu druhu *Lactobacillus delbrueckii*.

Laktobacily stejně jako jim blíže příbuzné rody LAB osídlují stanoviště bohatá na pohotově dostupné živiny, jako jsou potraviny, krmiva, půda, rostlinné zbytky, sliznice zvířat a lidí. Laktobacily jsou využívány k průmyslové produkci čisté kyseliny mléčné, ze které se syntetizují bioplasty a biopolymery. V potravinářství slouží k produkci fermentovaných potravin, vylepšují jejich strukturu a prodlužují jejich skladovatelnost. Některé kmeny laktobacilů jsou produkovány za účelem využití jako probiotika.

7.2.4.1 *Laktobacily u zvířat*

Laktobacily adherují na epitelální buňky sliznic a vykazují druhovou specifitu pro zvířecího hostitele. Tak např. kmeny laktobacilů pocházející z žaludku hlodavců nepřilnou k buňkám získaným z volete ptáků, a naopak. Laktobacily kolonizují vrstevnatý epitel ve voleti ptáků a tvoří podstatnou složku mikrobioty tenkého střeva většiny obratlovců. U přežvýkavců se počty laktobacilů v bachoru liší podle věku zvířat a složení krmiva. Nadměrné hromadění kyseliny mléčné v bachoru vede ke stavu známému jako „akutní bachorová acidóza“, která je doprovázena nechutenstvím a v nejtěžších případech končí i smrtí zvířete. Na této poruše trávení se významnou měrou podílejí laktobacily, a to pokud je krmná dávka bohatá na lehce stravitelné sacharidy. Přirozeně se laktobacily (*Lactobacillus plantarum*) vyskytují v silážované píce.

7.2.4.2 *Účinek laktobacilů na hostitele*

Laktobacily jako součást normální mikrobioty trávicího traktu ovlivňují svého hostitele, modifikují biochemické, fyziologické a imunologické pochody. Důležitou funkcí laktobacilů je schopnost interferovat s kolonizací střevního traktu exogenními mikroorganismy, včetně patogenů. Tuto funkci vystihují pojmy jako kompetitivní exkluze, bakteriální antagonismus, bakteriální interference nebo kolonizační rezistence. Žádoucí převaha laktobacilů v tenkém střevě tak pomáhá předcházet vzniku a rozvoji život ohrožujících průjmových stavů zejména u mladých zvířat vystavených infekcím střevními patogeny.

7.2.4.3 *Laktobacily a zdraví*

Přítomnost laktobacilů v trávicím traktu je historicky považována pro hostitele za prospěšnou. Na začátku posledního století, Ilja Iljič Mečnikov (1845–1916) uvedl, že k procesu stárnutí jedince přispívají toxické látky produkované střevní mikroflórou. Jedná se zejména o proteolytické mikroby degradující bílkoviny na škodlivý amoniak, aminy a indol. Naopak příznivý účinek mají laktobacily, které štěpí sacharidy. Do jaké míry laktobacily kolonizující střevo přispívají ke zdraví člověka je však stále hypotetické. Mečnikov předpokládal, že proteolytické mikroby ve střevě by mohly být nahrazeny právě laktobacily a dalšími LAB. Tento předpoklad byl založen na pozorování, že rolníci z východní Evropy, z nichž někteří byli zjevně dlouhověcí, konzumovali ve větší míře kysané mléčné výrobky.

I bez trvalé kolonizace střeva, laktobacily ve stravě prospívají zdraví spotřebitelů zejména těmito způsoby: (1) Mléčné výrobky obsahující LAB, včetně laktobacilů, jsou lépe snášeny osobami s intolerancí k laktóze, protože bakteriální betagalaktosidáza podporuje hydrolýzu laktózy v tenkém střevě. (2) Potraviny a přípravky obsahující laktobacily jsou účinné při léčbě průjmu různých etiologie. (3) Laktobacily působí na imunitní systém hostitele. Tyto efekty zahrnují modulaci exprese cytokinů, stimulaci fagocytózy leukocyty periferní krve. Fyziologický význam této imunomodulace však nebyl ve všech případech přesvědčivě prokázán. Působení laktobacilů je druhově a kmenově specifické a jejich imunomodulační účinek je závislý na jejich počtech v gastrointestinálním traktu. (4) Produkty obsahující laktobacily vykazují antikarcinogenní účinky a byli úspěšně používány k léčbě a prevenci atopického ekzému. Tyto efekty jsou považovány za zprostředkované, alespoň částečně prostřednictvím laktobacily indukovaného posílení imunitní odpovědi. (5) Laktobacily snižují prokarcinogenní enzymy ve stolici a mají potenciál vázat a degradovat karcinogeny. Například se podílejí na dekonjugaci toxických žlučových kyselin v tenkém střevě.

Laktobacily jako součást tradiční lidské stravy nebo probiotická terapie mohou ovlivnit homeostázu mezi střevní mikrobiotou a hostitelem, ale jejich mechanismus působení v prevenci nebo i léčbě některých onemocnění zůstává ještě objasnit.

7.2.4.4 Ovlivnění složení mikrobioty

Do určité míry složení mikrobioty střeva a zvýšení počtů laktobacilů lze ovlivnit konzumací prebiotik, jako jsou fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy. Tato koncepce má za cíl dosáhnout změny ve složení mikrobioty střeva přidáním sacharidů, které nejsou využívány v tenkém střevě a stávají se substráty pro LAB v tlustém střevě, kde je dosaženo prospěšného snížení pH.

7.2.5 Rod *Lactococcus* (mléčné streptokoky)

První studie laktokoků byly učiněny Josephem Listerem (Lister, 1873), který se pokoušel dokázat Pasteurovu teorii bakteriální fermentace. Ve svých pokusech experimentoval s vařeným mlékem jako živnou půdou a náhodou získal první čistou bakteriální kulturu, kterou nazval *Bacterium lactis*. Později byla přejmenována na *Streptococcus lactis* a dnes se nazývá *Lactococcus lactis*. Kromě *L. lactis*, rod zahrnuje druhy *L. garvieae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* a *L. piscium*. Laktokoky jsou homofermentativní bakterie mléčného kvašení. Během jejich růstu v mléce dochází k přeměně laktózy na levotočivou (L) kyselinu mléčnou. Tím se liší od pediokoků, kteří štěpí laktózu na DL kyselinu mléčnou; a leukonostoků, kteří štěpí laktózu na D kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, CO₂ a etanol. Laktokoky mohou vytvářet bakteriociny, z nich nejznámější je nisin, který je produkován některými kmeny *L. lactis*. Nisin je průmyslově vyráběn a využívá se v potravinářském průmyslu jako konzervační složka, která potlačuje v růstu grampozitivní bakterie.

Lactococcus lactis a jeho poddruhy *lactis* a *cremoris* se vyskytují v syrovém mléce, v dojicím zařízení, na kůži a ve slinách skotu. V mlékárenském prostředí jsou laktokoky hojné v syrovém mléce, v syrovátce a odpadních vodách z mlékáren. Rovněž druhy *Lactococcus garvieae* a *L. raffinolactis* jsou zjišťovány ve stejných typech vzorků.

Lactococcus garvieae byl prokázán jako původce laktokokózy ryb. Ve vzácných případech byl *L. lactis* izolován z případů infekce močových cest, ran a z případů endokarditid člověka. Obdobné infekce mohou vyvolat i jiné LAB.

7.2.6 Rod *Pediococcus*

Význam pediokoků se neodráží pouze v jejich pozitivní úloze při fermentaci mnoha potravin, ale také při znehodnocení některých potravin, zejména piva. I když jsou přítomné pouze v malých počtech v přirozených rostlinných substrátech spolu s dalšími LAB, tak se pediokoky často ve větším počtu podílejí na fermentaci právě rostlinných materiálů, jako je siláž, kysané zelí, kvašené okurky, olivy a další. Maso a masné výrobky jim také poskytují příznivý růstový substrát a některé kmeny *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*, se využívají při zrání polosuchých uzenin nebo podobných produktů.

Role pediokoků při fermentaci mléčných výrobků není tak důležitá jako mají *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* nebo některé kmeny z rodů *Leuconostoc* nebo *Lactobacillus*. Pediokoky obvykle patří mezi nestartovací bakterie mléčného kvašení. Jedná se pouze o náhodné bakterie, které

pocházejí z prostředí stájí a následně kontaminují mléko nebo tvaroh. Tím pádem představují pouze malou část celkových počtů LAB v sýrech, kde se množí až během jejich zrání.

7.2.7 Rody *Leuconostoc*, *Weissella*

Díky jejich společným fyziologickým vlastnostem, většina zástupců rodů *Leuconostoc* a *Weissella* je dobře přizpůsobena potravinovým substrátům, a to jak rostlinného, tak i živočišného původu. Sdílejí stejná místa přirozeného výskytu s jinými LAB, zejména s laktobacily a pediokoky. Obvykle se podílejí na fermentaci potravin v raných fázích, kde se uplatňují zejména *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a *W. paramesenteroides*. Leuconostoky jsou grampozitivní koky, vyskytující se v párech a řetězcích, a tvoří při fermentaci glukózy D kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Zástupci rodu se běžně vyskytují na povrchu ovoce, zeleniny a v mléčných produktech, proto se uplatňují při fermentaci mléčných výrobků, kvašení zeleniny a nakládání masa.

Leuconostoky jsou heterofermentativní, ale na rozdíl od LAB produkují D laktát a nejsou schopny hydrolyzovat arginin, a tak se netvoří amoniak. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* hraje důležitou roli při požadované tvorbě plynu v sýrech, jako je např. Gouda a Eidam, kde představuje asi 5 % z typické startovací kultury ve srovnání s 2-3 % pro sýr Tilsit. Je známo, že leuconostoky se uplatňují i při „spontánní fermentaci“ některých tradičních mléčných výrobků, při výrobě palmového vína a mléčném kvašení zeleninových směsí (pickles).

7.2.8 Rod *Streptococcus* (mléčné streptokoky)

Ačkoli rod *Streptococcus* zahrnuje z medicínského pohledu především patogenní druhy (viz. Kapitola 3.3), tak pro potravinářský průmysl má velký význam nepatogenní druh *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* jako jedna z nejpoužívanějších bakterií v mlékárenském průmyslu.

S. salivarius subsp. *thermophilus* je běžnou součástí jogurtové kultury a některých a sýrů. Využívá se například při výrobě sýrů se sníženým obsahem tuku a přitom s podobnými vlastnostmi jako běžný plnotučný sýr. Bakteriemi produkované exopolysacharidy dodávají sýru se sníženým obsahem tuku texturu a chuť jako u běžného sýra. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* je v jogurtové kultuře tradičně kombinován s *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus helveticus* nebo *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Během fermentace *S. salivarius* subsp. *thermophilus* se jako vedlejší produkt tvoří také kyselina mravenčí, která synergicky podporuje růst laktobacilů. V těchto mléčných výrobcích se rychle štěpí laktóza na kyselinu mléčnou, proto jogurty mohou konzumovat i lidé s intolerancí k mléčnému cukru.

Protože čerstvý jogurt obsahuje 10^8 KTJ těchto bakterií v jednom gramu, tak se jedná o nejpoužívanější probiotikum ve výživě člověka.

7.3 Laboratorní diagnostika LAB

Někteří zástupci LAB se mohou uplatnit jako sporadiční původci oportunních infekcí člověka zvířat (enterokoky, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus garvieae*). Jedná se tedy spíše o nahodilé nálezy kultur druhů vyrůstajících na masopeptonovém krevním agaru nebo na jiných neselektivních živných agaroch za aerobních, mikroaerofilních a anaerobních podmínek inkubace.

Cílená izolace LAB vyžaduje přípravu speciálních kultivačních médií a jejich inkubaci ve vhodné atmosféře. Jak bylo uvedeno, bakterie mléčného kvašení zahrnují heterogenní skupinu mikroorganismů, proto neexistuje žádné univerzální selektivní médium pro jejich kultivaci. Lze však využít dobře známá média pro laktobacily a modifikovat je změnou hodnoty pH, koncentrací inhibičních činidel, inkubační doby, složením atmosféry a teploty. K izolaci laktobacilů lze využít selektivní kultivační médium **De Man, Rogosa a Sharpe agar**, které obsahuje octan sodný, který potlačuje růst mnoha konkurenčních bakterií. Kromě laktobacilů na něm vyrůstají zástupci rodů *Leuconostoc* a *Pediococcus*.

Bývá nutné vybrat média pro speciální oblasti použití, např. mléko a mléčné výrobky, maso a masné výrobky. Obecně vhodná jako selektivní média pro bakterie mléčného kvašení jsou média na principu uvedeného **MRS agaru**, upravené na nižší pH (např. 5,7) s přidáním inhibitoru (např. kyselina sorbová) nebo modifikované **Rogosa medium** se zvýšeným pH (např. 6,2). **Médium LaS** (laktobacily-kyselina sorbová) (pH 5,0) inkubované po dobu alespoň 48 hodin je také vhodné, ale neumožní izolovat enterokoky. To lze kompenzovat paralelně používaným speciálním enterokokovým médiem. Pro definované skupiny bakterií mléčného kvašení, jako jsou mléčné streptokoky, bakterie jogurtové kultury a bifidobakteria se používají speciální média, a to především za účelem kontroly kvality mléčných výrobků, kdy je prověřována koncentrace živých bakterií mléčného kvašení deklarovaná na obalech. Například pro selektivní stanovení počtu bifidobakterií v mléčných výrobcích lze použít Columbia agar doplněný chloridem lithným a propionátem sodným a MRS agar obohacený neomycinem, paromomycinem, kyselinou nalidixovou a chloridem lithným.

Doporučená literatura:

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. 2011. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Wiley-Blackwell. 536 pp.

Markey, B., Leonard, F.C., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier, 901 pp.

McVey, D.S., Chengappa, M.M., Kennedy, M.K. 2013. Veterinary Microbiology. Wiley-Blackwell, 629 pp.

Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer G., Thoen C.O. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Wiley-Blackwell, 643 pp.

Bauerfeind, R., Von Graevenitz, A., Kimming, P., Schiefer, H.G., Schwartz, T.F., Slenczka, W., Zahner, H. 2016. Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans. ASM Press, 532 pp.

Votava, M. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: NEPTUN, Březová 18, 637 00 Brno, 2003. 495 s.

Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2002) Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Edition, The McGraw-Hill Companies. 1147 pp.