

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

VYBRANÉ KAPITOLY Z VETERINÁRNÍ  
BAKTERIOLOGIE II

Antimikrobiální rezistence

Gramnegativní bakterie



MVDr. Aneta Papoušková

MVDr. Martina Masaříková, PhD.

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

BRNO 2020

Tato skripta jsou financována z projektu IVA VFU Brno 2020 2020FVL/1240/05.

## Obsah

### ODDÍL 1 – ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY A REZISTENCE

1. Antibakteriální látky .....	8
1.1 Obecné souvislosti a definice .....	8
1.2 Rozdělení antibiotik .....	9
1.3 Hlavní skupiny antibiotik .....	12
1.3.1 Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny .....	12
1.3.2 Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií.....	17
1.3.3 Antibiotika působící na nukleové kyseliny.....	21
1.3.4 Antibiotika působící na ribozomy .....	24
1.3.5 Oxidačně působící antibiotika.....	30
1.3.6 Inhibitory syntézy kyseliny listové .....	31
2. Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám.....	37
2.1 Úvod do problematiky .....	37
2.2 Metody průkazu antibiotické rezistence .....	42
2.3 Mechanismy rezistence k nejvýznamnějším skupinám antibiotik .....	46
2.3.1 Mechanismy rezistence k beta-laktamům .....	46
2.3.2 Mechanismy rezistence ke glykopeptidům .....	50
2.3.3 Mechanismy rezistence k polymyxinům.....	50
2.3.4 Mechanismy rezistence k aminoglykosidům.....	51
2.3.5 Mechanismy rezistence k chinolonům .....	51
2.3.6 Mechanismy rezistence k rifamycinům.....	53
2.3.7 Mechanismy rezistence k makrolidům.....	53
2.3.8 Mechanismy rezistence k linkosamidům .....	54
2.3.9 Mechanismy rezistence k tetracyklinům .....	54
2.3.10 Mechanismy rezistence k amfenikolům .....	55
2.3.11 Mechanismy rezistence k pleuromutilinům.....	55
2.3.12 Mechanismy rezistence k nitroimidazolům a nitrofuránům .....	55
2.3.13 Mechanismy rezistence k sulfonamidům .....	55
2.4 Významné rezistentní bakterie .....	58
2.4.1 Meticilin-rezistentní stafylokoky .....	59
2.4.2 Vankomycin-rezistentní enterokoky .....	61
2.4.3 <i>Escherichia coli</i> ST131 .....	62

## ODDÍL 2 - SPECIÁLNÍ BAKTERIOLOGIE

1. Taxonomický přehled .....	65
2. Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky .....	75
2.1 Řád Enterobacterales .....	75
2.1.1 Výskyt.....	75
2.1.2 Patogenita .....	75
2.1.3 Diagnostika .....	76
2.1.4 Rod <i>Escherichia</i> .....	77
2.1.5 Rod <i>Salmonella</i> .....	83
2.1.6 Rod <i>Shigella</i> .....	90
2.1.7 Rod <i>Yersinia</i> .....	91
2.1.8 Rod <i>Klebsiella</i> .....	94
2.1.9 Rod <i>Proteus</i> .....	95
2.1.10 Další oportunní patogeny z řádu Enterobacterales .....	96
2.2 Čeleď Pasteurellaceae.....	98
2.2.1 Rod <i>Pasteurella</i> .....	98
2.2.2 Rody <i>Mannheimia</i> a <i>Bibersteinia</i> .....	101
2.2.3 Rod <i>Actinobacillus</i> .....	103
2.2.4 Rody <i>Haemophilus</i> a <i>Histophilus</i> .....	107
2.2.5 Další významní zástupci čeledi Pasteurellaceae .....	110
2.3 Čeleď Aeromonadaceae.....	112
2.3.1 Rod <i>Aeromonas</i> .....	112
2.4 Čeleď Vibrionaceae.....	114
2.4.1 Rod <i>Vibrio</i> .....	114
3. Gramnegativní aerobní tyčinky a koky.....	116
3.1 Čeleď Pseudomonadaceae .....	116
3.1.1 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	116
3.2 Čeleď Burkholderiaceae .....	119
3.2.1 Rod <i>Burkholderia</i> .....	119
3.3 Čeleď Francisellaceae.....	122
3.3.1 <i>Francisella tularensis</i> .....	122
3.4 Čeleď Alcaligenaceae.....	124
3.4.1 Rod <i>Alcaligenes</i> .....	124
3.4.2 Rod <i>Achromobacter</i> .....	124
3.4.3 Rod <i>Pelistega</i> .....	124

3.4.4	Rod <i>Bordetella</i> .....	124
3.4.5	Rod <i>Taylorella</i> .....	127
3.5	Čeleď Moraxellaceae.....	129
3.5.1	Rod <i>Acinetobacter</i> .....	129
3.5.2	Rod <i>Moraxella</i> .....	130
3.6	Čeleď Brucellaceae.....	132
3.6.1	Rod <i>Brucella</i> .....	132
3.7	Čeleď Bartonellaceae.....	135
3.7.1	Rod <i>Bartonella</i> .....	135
3.8	Čeleď Flavobacteriaceae.....	138
3.8.1	Rod <i>Capnocytophaga</i> .....	138
3.8.2	Rod <i>Flavobacterium</i> .....	139
3.8.3	Rod <i>Ornithobacterium</i> .....	140
3.8.4	Rod <i>Riemerella</i> .....	141
4.	Gramnegativní aerobní nebo mikroaerofilní spirálovitě zakřivené bakterie.....	142
4.1	Čeleď Campylobacteraceae.....	142
4.1.1	Rod <i>Campylobacter</i> .....	142
4.2	Čeleď Helicobacteraceae.....	145
4.2.1	Rod <i>Helicobacter</i> .....	145
4.3	Čeleď Desulfivibrionaceae.....	147
4.3.1	Rod <i>Lawsonia</i> .....	147
5.	Spirochety.....	149
5.1	Rod <i>Leptospira</i> .....	150
5.1.1	Obvyklý habitat.....	150
5.1.2	Druhy leptospir a jejich rozlišení.....	150
5.1.3	Epidemiologie.....	151
5.1.4	Klinické infekce.....	152
5.1.5	Patogeneze a patogenita.....	154
5.1.5	Diagnostika.....	155
5.1.6	Léčba a tlumení.....	156
5.1.7	Význam pro veřejné zdraví.....	156
5.2	Rod <i>Borrelia</i> .....	157
5.2.1	Obvyklý habitat.....	157
5.2.2	Rozlišení druhů borélií a klinické infekce.....	158
5.2.3	Epidemiologie.....	159

5.2.4 Patogeneze .....	159
5.2.5 Diagnostika .....	160
5.2.6 Léčba a kontrola.....	160
5.2.7 Význam pro veřejné zdraví.....	160
5.2.8 Spirochetóza ptáků.....	161
5.3 Rod <i>Brachyspira</i> .....	162
5.3.1 Klinické infekce .....	162
5.3.2 Patogeneze .....	162
5.3.3 Diagnostika.....	163
5.3.4 Léčba a tlumení.....	164
5.4 Rod <i>Treponema</i> .....	165
5.4.1 Klinické onemocnění a patogenita.....	165
5.4.2 Patogeneze .....	166
5.4.3 Diagnostika.....	167
5.4.4 Terapie a prevence .....	167
6. Gramnegativní anaerobní bakterie .....	168
6.1 Čeleď <i>Cardiobacteriaceae</i> .....	168
6.1.1 Rod <i>Dichelobacter</i> .....	168
6.2 Čeleď <i>Fusobacteriaceae</i> .....	169
6.2.1 Rod <i>Fusobacterium</i> .....	169
6.3 Čeleď <i>Bacteroidaceae</i> .....	171
6.3.1 Rod <i>Bacteroides</i> .....	171
6.4 Čeleď <i>Prevotellaceae</i> .....	172
6.4.1 Rod <i>Prevotella</i> .....	172
6.5 Čeleď <i>Porphyromonadaceae</i> .....	173
6.5.1 Rod <i>Porphyromonas</i> .....	173
7. Mollicutes.....	175
7.1 Čeleď <i>Mycoplasmataceae</i> .....	175
7.1.1 Výskyt .....	175
7.1.2 Patogenita .....	176
7.1.3 Patogeneze .....	179
7.1.4 Diagnostika.....	180
7.1.5 Terapie a prevence .....	181
8. Obligátně intracelulární bakterie .....	182
8.1 Čeleď <i>Rickettsiaceae</i> .....	182

8.1.1 Rod <i>Rickettsia</i> .....	182
8.2 Čeleď Anaplasmataceae .....	185
8.2.1 Rod <i>Anaplasma</i> , rod <i>Ehrlichia</i> .....	185
8.1.3 Rod <i>Neorickettsia</i> .....	187
8.1.4 Rod <i>Aegyptianella</i> .....	188
8.1.5 Rod <i>Wolbachia</i> .....	188
8.2 Čeleď Coxiellaceae .....	189
8.2.1 Rod <i>Coxiella</i> .....	189
8.3 Čeleď Chlamydiaceae .....	191
8.3.1 Patogenita .....	191
8.3.2 Patogeneze .....	193
8.3.3 Diagnostika.....	193
8.3.4 Terapie a prevence .....	193

# 1. Antibakteriální látky

## 1.1 Obecné souvislosti a definice

Látky, které poškozují či usmrcují bakterie, řadíme do širší rodiny preparátů s označením **antimikrobiální látky**, nebo též **antiinfektiva**, což jsou přípravky sloužící k prevenci a terapii onemocnění vyvolaných patogenními mikroorganismy. Z etymologického hlediska by se na úroveň pojmů antimikrobiální látka a antiinfektivum mohl postavit i termín **antibiotikum**, je totiž odvozen z řeckých slov *anti-* proti a *bios-* živý, nicméně se v tomto významu nepoužívá. Na základě toho, jaký cílový mikroorganismus antimikrobiální látky inhibují či inaktivují je rozdělujeme do několika základních skupin: **antivirotika**, jejichž cílovým organismem jsou viry, **antibiotika** využívaná k léčbě bakteriálních infekcí, **antimykotika** proti onemocnění způsobeným houbami a **antiparazitika** pro terapii infestací parazity.

Hlavní podmínkou medicínského využití antiinfektiv je jejich **selektivní toxicita**, tedy schopnost zabránit růstu, vývoji a množení cílového mikroorganismu bez poškození, nebo alespoň s minimální tolerovatelnou toxicitou pro hostitelský makroorganismus (člověka, zvíře). Antimikrobiální účinek sice vykazují také **antiseptika** a **dezinficiencia**, kvůli jejich toxicitě a odlišnému mechanismu účinku je však mezi antiinfektiva neřadíme. Na rozdíl od antibiotik totiž mohou poškozovat nejen buňky prokaryotické, ale i eukaryotické a jejich antimikrobiálního efektu je docíleno vlivy fyzikálně-chemickými, kdežto antibiotika poškozují mikroby především cestou ovlivnění jejich metabolismu.

Samotný pojem antibiotikum byl původně vyhrazen pro substance přírodního původu produkované mikroorganismy (bakteriemi či plísněmi), které v nízkých koncentracích vykazují antibakteriální efekt, aniž by poškozovaly buňky člověka a zvířat. Antibiotika, která byla chemicky modifikována, byla dříve označována za semisyntetická (např. oxacilin), molekuly s antibakteriálním účinkem připravované výhradně chemickou cestou (např. sulfonamidy, fluoroquinolony), získaly označení **chemoterapeutikum**. Desetiletí klinického využívání látek s antibakteriálním účinkem ukázalo, že jejich exaktní členění na antibiotika přirozeně se vyskytující, semisyntetická a plně syntetická, nemá valný praktický význam a že se pro všechny tyto substance vžil souhrnný výraz antibiotikum. Na druhé straně pojem chemoterapeutikum se dnes přednostně používá spíše pro látky využívané v léčbě nádorových onemocnění. Tento posun v terminologii podpořil v roce 2000 i Evropský výbor pro vyšetřování antimikrobiální citlivosti (**EUCAST** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) dokumentem s názvem „Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.“ Antibiotika jsou zde definována jako jednoduché substance biologického, semisyntetického nebo syntetického původu, které vykazují selektivní toxicitu proti bakteriím, a jsou tudíž potenciálně použitelné k léčbě infekcí. Mechanismus účinku některých skupin antibiotik však může zasahovat struktury či děje společné prokaryotickým i eukaryotickým buňkám, tyto substance proto není možné kvůli jejich toxicitě aplikovat celkově k léčbě systémových infekcí (např. některé polypeptidy). Lze je ovšem využívat v preparátech určených k lokálnímu ošetření, jako jsou třeba masti či oční a ušní kapky.

Mezi antibiotiky nacházíme také látky, které se vyznačují tzv. **pleiotropním účinkem**. To znamená, že kromě bakterií mají schopnost poškozovat i jiné skupiny mikroorganismů,



především parazity a houby. Na příklad nitroimidazoly, úzkospektrá baktericidní antibiotika působící na striktně anaerobně rostoucí bakterie, jsou využívána pro svůj antiprotozoární efekt zejména u trichomonád, giardií a améb. Potencované sulfonamidy potom mají nejenom širokospektrý antibakteriální účinek a účinek na některé jednobuněčné parazity (*Toxoplasma gondii*), působí však navíc i na některé houby (*Pneumocystis*, *Histoplasma*).

Vedle antibiotik s pleiotropním účinkem na mikroorganismy známe také antibiotika, která lze využít v léčbě různých neinfekčních stavů. Na příklad penicilin G je lékem volby při otravách člověka plodnicemi vyšší houby muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) a ve vysokých dávkách je schopen zabránit ireverzibilnímu poškození hepatocytů jejími toxiny, tzv. amatoxiny. U jiných antibiotik (např. daunorubicin, bleomycin) byla prokázána protinádorová aktivita, často však jde o substance natolik toxické, že je vyloučeno jejich použití v léčbě infekčních onemocnění. Dále byly úpravou molekul některých antibiotik vyvinuty léky se zcela odlišným účinkem, na příklad z erytromycinu byla odvozena některá imunosupresiva, ze sulfonamidů některá diuretika, antidiabetika a antivirotika.

## 1.2 Rozdělení antibiotik

K rozdělení antibiotik využíváme mnoho různých kritérií a členit je můžeme podle:

### a) Původu:

- přírodní
- semisyntetická
- syntetická, tzv. chemoterapeutika (dnes všechna pro lepší komunikaci mezi laboratořemi a klinickou praxí řadíme do jedné společné „rodiny“, viz výše)

### b) Cílového místa účinku:

- inhibitory syntézy buněčné stěny (např. beta-laktamy, glykopeptidy)
- antibiotika narušující buněčnou membránu (např. polymyxiny)
- inhibitory proteosyntézy
  - na 50S podjednotce ribozomů (např. makrolidy, azalidy, ketolidy, linkosamidy, chloramfenikol)
  - na 30S podjednotce ribozomů (např. tetracykliny, aminoglykosidy, pleuromutiliny)
- inhibitory syntézy kyseliny listové, tzv. antimetabolity (např. sulfonamidy, trimetoprim, ko-trimoxazol)
- inhibitory funkce nukleových kyselin
  - inhibitory DNA topoizomerázy (např. fluorochinolony, novobiocin)
  - inhibitory RNA polymerázy (např. rifamyciny)

- oxidačně působící antibiotika (např. nitroimidazoly, nitrofurany)

### c) Síly účinku:

- bakteriostatická antibiotika (např. tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, linkosamidy, sulfonamidy, trimetoprim, nitrofurany)
- baktericidní antibiotika (např. beta-laktamy, aminoglykosidy, polypeptidy, glykopeptidy, ansamyciny, ko-trimoxazol, nitroimidazoly, fluorochinolony)

Intenzita účinku antibiotik má několik stupňů a úzce souvisí s jejich koncentrací. Dle výsledného efektu na bakterie rozlišujeme účinek **subinhibiční** (minimální a reverzibilní poškození bakterií), **inhibiční** (zastavení množení) a **baktericidní** (ireverzibilní zničení bakterií). Z tohoto hlediska lze antibiotika rozlišovat na tzv. bakteriostatická a baktericidní, není to však rozdělení jednoznačné. I preparáty, které označujeme za bakteriostatická mohou mít při vyšších koncentracích schopnost mikroby usmrcovat, nebo jejich účinek závisí na bakteriích, proti nimž jsou použity (např. chloramfenikol a ko-trimoxazol jsou antibiotika bakteriostatická, některé bakterie ale zabíjí už v nízkých koncentracích). Jiné preparáty budou bakteriostatické vždy a ani při výrazném zvýšení jejich koncentrace baktericidie nedosáhnou.

K tomu, abychom mohli nejlépe rozhodnout o účinku antibiotika, byly definovány tři parametry: **minimální antibakteriální koncentrace** (Minimal Antibacterial Concentration – **MAC**), **minimální inhibiční koncentrace** (Minimal Inhibitory Concentration – **MIC**) a **minimální baktericidní koncentrace** (Minimal Bactericidal Concentration – **MBC**). MAC je nejnižší koncentrace antibiotika způsobující změny morfologie a/nebo chování bakterií, které souvisí s jejich infekčností a virulencí (např. schopnost adheze, produkce toxinů). Minimální inhibiční koncentrace je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika zabraňující růstu a množení bakterií a je to současně údaj, který je využíván v klinické diagnostice citlivosti antibiotik nejvíce. K jeho stanovení slouží laboratorní metody jako bujónová mikrodiluční metoda, agarová diluční metoda či testy s gradientem antibiotik (E-test, MIC test strip). Minimální baktericidní koncentrace je nejnižší koncentrace antibiotika usmrcující bakterie a její laboratorní určení je založeno na vyočkování média obsahujícího bakterie, které již byly po určitou dobu vystaveny různým koncentracím antibiotik.

K definitivnímu rozhodnutí, zda je antibiotikum bakteriostatické, či baktericidní, využíváme výše uvedených parametrů. Za baktericidní považujeme ta antibiotika, jejichž baktericidní účinek je dosažen už při dvoj- až čtyřnásobku hodnoty MIC (tzn. jejich poměr MBC/MIC je  $\leq 4$ ). Bakteriostatická antibiotika však k dosažení baktericidie musí nabýt mnohem vyšších koncentrací často přesahujících bezpečnou úroveň použití.

Pro účely léčby je potřeba zvážit především stav pacienta a průběh onemocnění. Klinický efekt bakteriostatických antibiotik nastupuje nejdříve za tři dny a po jejich vysazení se mikroby mohou začít znovu replikovat, proto je úspěch terapie založen na zásahu imunitního systému, kterému byl touto cestou poskytnut čas k aktivizaci. Naproti tomu baktericidní preparáty zabírají nejpozději do dvou dnů bez nutné součinnosti imunitních mechanismů, proto je upřednostňujeme při terapii závažných infekcí či při léčbě ohrožených skupin pacientů (mláďata, staří pacienti, imunokompromitovaní pacienti).

**d) Rozsahu (spektra) účinku:**

- úzkospektrá (např. antituberkulotika, spektinomycin)
- antibiotika se středním spektrem účinku (základní peniciliny)
- širokospektrá (např. tetracykliny, chloramfenikol, ko-trimoxazol, cefalosporiny a chinolony vyšších generací)

Hovoříme-li o spektru účinku antibiotik, máme na mysli seznam bakterií, proti nimž může být daná látka úspěšně použita. Preparáty poškozující pouze omezený počet druhů bakterií označujeme za antibiotika s úzkým spektrem účinku, tedy úzkospektrá (úzkospektrální). Do této skupiny řadíme například antituberkulotika, dále oxacilin (využívaný k léčbě stafylokoků a některých hemolytických streptokoků), některé glykopeptidy (aktivní jen proti určitým grampozitivům), či kolistin (proti gramnegativním fermentujícím a některým nefermentujícím tyčinkám). Pod střední spektrum účinku jsou řazeny látky, které inaktivují či inhibují větší rozsah mikrobů než antibiotika úzkospektrá, nelze je však použít bez výjimek. Takové klasické peniciliny jsou typickými představiteli této třídy – působí na všechny grampozitivní mikroby, gramnegativní koky a na mikroby spirálovitého tvaru, nemají však efekt proti většině gramnegativních tyčinek. Za středněspektrá antibiotika považujeme také ta s účinností převážně buď na grampozitivní bakterie (glykopeptidy, linkosamidy a makrolidy), hlavně proti gramnegativním tyčinkám zase nasazujeme aminoglykosidy nebo polypeptidy. Antibiotika se širokým spektrem účinku poškozují jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie, některá včetně anaerobů nebo mykoplazmat. Jsou to např. tetracykliny, chloramfenikol, potencované peniciliny a sulfonamidy, cefalosporiny vyšších generací nebo fluorochinolony.

e) **Chemické struktury:** (např. polypeptidová, glykopeptidová, beta-laktamová, makrocyclická, atd.)

**f) Rozpustnosti v různých prostředích:**

- hydrofilní
- lipofilní

**g) Způsobu podávání:**

- enterální versus parenterální
- celkově vs. lokálně podávaná

h) Podle **nejvýznamnější bakterie**, kterou mají poškodit (např. antistafylokoková, antipseudomonádová, antituberkulotika, atd.).

## 1.3 Hlavní skupiny antibiotik

K zařazení antibiotik do skupin jsme pro účely tohoto textu použili členění dle cílových struktur jejich účinku a následně dle jejich chemické struktury.

### 1.3.1 Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny

Antibiotika narušující tvorbu buněčné stěny se vyznačují minimální toxicitou, protože zabraňují syntéze peptidoglykanu, který je integrální součástí buněčné stěny jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií, eukaryotické buňky ho však postrádají. Vyznačují se baktericidním působením, buňka totiž s narušenou peptidoglykanovou vrstvou hyne v důsledku ruptury buněčné membrány, nebo kvůli aktivaci apoptózy. Podmínkou jejich baktericidního účinku je, aby byly cílové bakterie ve fázi růstu, kdy syntetizují stěnu, bakterie ve stacionární fázi růstu jsou vůči nim mnohem odolnější. To je jeden z důvodů, proč bychom se při kombinované léčbě různými skupinami antimikrobik měli vyvarovat současného podávání „stěnových antibiotik“ a bakteriostatických preparátů, dosáhli bychom totiž místo synergického efektu jejich vzájemného antagonismu. Pro baktericidní efekt a potřebu intenzivně se množící bakteriální populace jsou tato antibiotika vhodná k léčbě akutních infekcí, u chronických stavů jsou účinná méně.

Hlavními představiteli antibiotik inhibujících syntézu buněčné stěny jsou **beta-laktamy** a **glykopeptidy**. Beta-laktamy narušují tuto syntézu zablokováním funkce transpeptidáz (neboli penicilin vázajících proteinů, Penicillin-binding Proteins, **PBP**), což jsou enzymy vytvářející proteinové můstky mezi jednotlivými vrstvami peptidoglykanu. Glykopeptidy se zase vážou na volné konce pentapeptidových prekurzorů těchto proteinových můstků. Beta-laktamy tedy vstupují do aktivních míst enzymů, kdežto glykopeptidy se vážou na substrátové molekuly. Z toho lze také odvodit, že k poškození buněčné stěny je potřeba mnohem méně molekul beta-laktamových antibiotik než molekul glykopeptidů, ty totiž musí zablokovat mnohem větší množství pentapeptidových postranních řetězců. Nástup účinku glykopeptidů je proto také mnohem pomalejší, než nástup účinku beta-laktamů, jejich výhodou je ale zase mnohem obtížnější vznik rezistence.

#### 1.3.1.1 Beta-laktamy

Beta-laktamy je souhrnné označení pro skupinu látek, jejichž jádro tvoří čtyřčlenný beta-laktamový kruh stojící buď samostatně (u monobaktamů), nebo je fúzován s kruhem sekundárním (thiazolidinovým u penicilinů, dihydrothiazinovým u cefalosporinů, dihydropyrolovým u karbapenemů). Jsou to jedny z nejvýznamnějších a nejčastěji podávaných antibiotik, které zahrnují několik podskupin: **peniciliny**, **cefalosporiny**, **karbapenemy**, **monobaktamy** a **inhibitory beta-laktamázy**.

Antimikrobiální spektrum účinku není u beta-laktamů jednotné, liší se nejenom mezi hlavními podskupinami, ale i mezi jednotlivými látkami uvnitř stejných podskupin. Výsledný účinek se odvíjí od více faktorů, především od jejich schopnosti pronikat bakteriální stěnou jak

grampozitivních, tak gramnegativních bakterií. K vazbě na cílové transpeptidázy totiž dochází na vnějším povrchu bakteriální membrány, rozdílná schopnost penetrace přes bakteriální stěnu tedy ovlivňuje výsledné spektrum účinku různých beta-laktamů. Dále hraje roli to, k jakým typům transpeptidáz mají beta-laktamy afinitu, na množství peptidoglykanu v buněčné stěně různých grampozitivních i gramnegativních mikrobů a v neposlední řadě závisí na jejich odolnosti vůči bakteriálním beta-laktamázám.

Beta-laktamy patří mezi baktericidní antibiotika s účinkem závislým na čase, nikoliv na dosažené koncentraci, tzn. výsledný efekt se odvíjí od toho, po jakou dobu je v séru, či v infikované tkáni, udržena koncentrace překračující MIC patogenu. Dále se také vyznačují postantibiotickým efektem proti grampozitivním bakteriím, nikoliv vůči gramnegativům. Také ve farmakokinetických parametrech existují mezi jednotlivými beta-laktamy značné rozdíly, obecně ale platí, že jde o substance hydrofilního charakteru, a proto obtížně překonávají biologické bariéry. V nezanícených tkáních jsou schopny dosáhnout maximálně 20-60 % sérových hladin, nicméně při zánětu se toto procento zásadně zvyšuje. Průnik přes hematoencefalickou bariéru i placentu je až na výjimky malý, ale i ten je významně zvýšen zánětem. Beta-laktamy jsou distribuovány extracelulárně, nelze je tedy aplikovat na léčbu intracelulárních infekcí. Biologický poločas rozpadu se pohybuje od cca 30 minut u základních penicilinů a cefalosporinů první generace až po 48 hodin u depotních forem, např. amoxicilinu. Většina beta-laktamů je z těla vylučována ledvinami. Pro dosažení synergického účinku se beta-laktamy kombinují s aminoglykosidy, a to především pro léčbu enterokokových infekcí a léčbu endokarditid vyvolaných viridujícími streptokoky.

Toxicita této skupiny antibiotik je nízká, protože interagují se strukturami v eukaryotických buňkách nepřítomnými, na druhou stranu se však častěji u pacientů objevuje některá z forem alergických reakcí. Také nelze opominout možné biologické nežádoucí účinky léčby spočívající v alteraci přirozené střevní mikroflóry (proto je nutné vyvarovat se perorálnímu a někdy dokonce i parenterálnímu podání u býložravců) s navazující kolonizací střeva patogenními bakteriemi či kvasinkami. Až v život ohrožující stav může progredovat dysmikrobie s přemnožením *Clostridium difficile*, které u lidí způsobuje klostridiovou diarrhoe (CDAD, *Clostridium difficile* Associated Diarrhoea/Disease). Toto onemocnění je jedním z nejtěžších forem humánních nozokomiálních infekcí spojovaných s podáváním různých skupin antibiotik, zejména těch širokospektrých, ale známe jej také u některých druhů zvířat. Analogií je často infaustně probíhající pseudomembranózní kolitida, dříve známá pod pojmem kolitis X, u koní, připisovaná právě *Clostridium difficile* (u koní je však dáván do souvislosti spíše s podáváním linkomycinu).

#### **1.3.1.1.1 Peniciliny**

Peniciliny jsou historicky první antibiotika a jejich objev v roce 1928 je připisován Alexandru Flemingovi, přestože Francouzi tvrdí, že nesprávně. Podle nich penicilin ve skutečnosti objevil francouzský lékař Ernest Duchesne již koncem 19. století, no jeho práce však údajně upadla v zapomnění. Také Skot Fleming, přestože za penicilin obdržel spolu s vědci Howardem Walterem Floreyem a Ernstem Borisem Chainem v roce 1945 Nobelovu cenu, bojoval s neúspěchy. Sice si povšimnul, že je růst stafylokoků na misce kontaminované plísní inhibován a správně odvodil dalekosáhlé důsledky tohoto zjištění, selhal ale při izolaci dostatečně stabilního extraktu, který by mohl být využit v klinické léčbě. Toho dosáhli teprve v roce 1940 Florey a

Chain a bylo to právě včas, protože lidstvo stálo na pokraji druhé světové války. Zavedení penicilinu G do klinické léčby je považováno za počátek moderní antibiotické éry. Podle některých pramenů penicilin zachránil přes osmdesát milionů lidských životů.

Peniciliny mají společné jádro, liší se mezi sebou postranními řetězci připojenými k beta-laktamovému kruhu. Jsou převážně baktericidní, vyznačují se nízkou toxicitou a minimálními lékovými interakcemi. Členíme je do několika skupin s různým spektrem účinku. Jsou to: základní (přirozené) peniciliny, antistafylokokové peniciliny, peniciliny s rozšířeným spektrem (aminopeniciliny), protipseudomonádové peniciliny a ostatní (nezařazené) peniciliny.

**Tabulka č. 1: Rozdělení penicilinů a jejich spektrum účinku**

Skupina	Látka	Spektrum účinku
Základní peniciliny	<u>Benzylpenicilin</u> (penicilin G), prokain-penicilin, benzatin-penicilin, penetacilin, <i>benetamin-penicilin</i> , fenoxymetylpenicilin (penicilin V)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G+ bakterie neprodukující beta-laktamázy, především streptokoky, enterokoky, korynebakteria, <i>L. monocytogenes</i>, <i>E. rhusiopathiae</i>, <i>B. anthracis</i></li> <li>• G+ anaeroby, zejm. klostridia</li> <li>• G- anaeroby (<i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.)</li> <li>• G- koky (<i>Neisseria</i> spp.)</li> <li>• Spirochety (treponemy, borrelie, leptospiry)</li> </ul>
Antistafylokokové peniciliny	Meticilin, nafcilin, kloxacilin, dikloxacilin, flukloxacilin, <u>oxacilin</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stafylokoky včetně producentů beta-laktamázy, nikoliv MRSA</li> <li>• Beta-hemolytické streptokoky</li> </ul>
Aminopeniciliny	Ampicilin, <u>amoxicilin</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spektrum základních penicilinů</li> <li>• Citlivé G- bakterie (<i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.)</li> </ul>
Antipseudomonádové peniciliny	<u>Piperacilin</u> , tikarcilin, karbenicilin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spektrum ampicilinu</li> <li>• <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Serratia</i> spp.</li> <li>• Anaeroby vč. <i>Bacteroides fragilis</i></li> </ul>

Pozn.: kurzívou jsou vyznačeny látky určené výhradně pro veterinární použití, podtržené substance jsou charakteristickými reprezentanty dané skupiny.

### 1.3.1.1.2 Cefalosporiny

Cefalosporiny jsou chemické sloučeniny vzniklé fúzí beta-laktamového kruhu s dihydrothiazinovým kruhem, k tomuto jádru jsou potom připojeny různé postranní řetězce. Jsou to baktericidní preparáty, které mají oproti penicilinům větší stabilitu vůči účinku bakteriálních beta-laktamáz a mají spektrum účinku rozšířené i na gramnegativní bakterie. Některé cefalosporiny lze využít i na infekce vyvolané *P. aeruginosa* a MRSA, ne však na enterokoky, listerie a atypické bakterie. Dělí se do skupin, které jsou označovány jako generace, a to na základě spektra účinku a stability vůči beta-laktamázám.

**Tabulka č. 2: Rozdělení cefalosporinů a jejich spektrum účinku**

Cefalosporiny	Látka	Spektrum účinku
1. generace	Cefalotin, cefazolin, cefalexin, cefaklor, cefadroxil, <i>cefacetril</i> , cefapirin	<ul style="list-style-type: none"><li>• G+ bakterie, zejm. streptokoky a stafylokoky</li><li>• Citlivé vůči beta-laktamázám G- bakterií</li></ul>
2. generace	Cefuroxim, cefamandol Cefamyciny: cefoxitin, cefotetan	<ul style="list-style-type: none"><li>• Spektrum jako 1. generace</li><li>• Některé G- patogeny (čeled' Enterobacteriaceae s výjimkou rezistentních rodů <i>Enterobacter</i>, <i>Morganella</i>, <i>Serratia</i>)</li><li>• Neúčinkují na nefermentující tyčinky vč. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li><li>• Odolné k beta-laktamázám třídy A, ne však vůči ESBL</li></ul>
3. generace	Cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon, <i>ceftiofur</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Menší účinnost proti G+, oproti 1. a 2. generaci</li><li>• Výrazně účinnější na G-, některé i vč. <i>P. aeruginosa</i></li><li>• Vysoká odolnost vůči beta-laktamázám třídy A, ne však vůči ESBL</li></ul>
4. generace	Cefepim, cefpirom, <i>cefchinom</i> , <i>cefalonium</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nejširší spektrum účinku ze všech generací</li><li>• G+ bakterie stejně jako 1. generace</li><li>• G- bakterie i více než 3. generace</li><li>• Odolnost vůči AmpC beta-laktamázám</li></ul>
5. generace	Ceftarolin, ceftobiprol	<ul style="list-style-type: none"><li>• MRSA</li></ul>

Pozn.: kurzívou jsou vyznačeny látky určené výhradně pro veterinární použití, podtržené substance jsou charakteristickými reprezentanty dané skupiny.

#### **1.3.1.1.3 Monobaktamy**

Jde o méně používanou skupinu beta-laktamů odlišující se od ostatních tím, že jejich beta-laktamový kruh není konjugován s další kruhovou strukturou. Jediným zástupcem je antibiotikum s úzkým spektrem **aztreonam**. Jeho spektrum účinku zahrnuje pouze gramnegativní bakterie (nikoliv však anaerobní), zejména neisserie, hemofily, enterobakterie a pseudomonády (i když s menším efektem, než mají ceftazidim či karbapenemy). Odolává beta-laktamázám třídy B a do jisté míry i tříd A a D. Je však inaktivován širokospektrými serinovými beta-laktamázami (ESBL, AmpC, serinové karbapenemázy). Je určen k intravenózní aplikaci.

#### **1.3.1.1.4. Karbapenemy**

Karbapenemy se v rámci beta-laktamů vyznačují největší účinností, nejširším spektrem a jsou také nejodolnější vůči působení serinových beta-laktamáz. Působí na grampozitivní i gramnegativní mikroby včetně většiny kmenů produkujících beta-laktamázy a dále na anaeroby. Jsou jako rezervní antibiotika vyhrazeny pro léčbu život ohrožujících infekcí člověka způsobených gramnegativními bakteriemi či s polymikrobiální etiologií. Pro veterinární účely by tedy měly být využívány jen výjimečně. Nepůsobí na MRSA, *Enterococcus faecium*, mykoplazmata a chlamydie. Účinnost vůči mykobakteriím je variabilní. V současnosti jejich používání ohrožuje zvyšující se nárůst nozokomiálních patogenů produkujících tzv. karbapenemázy. V České republice jsou dostupné pouze přípravky **imipenem**, **meropenem** a **ertapenem**, v jiných zemích navíc i **doripenem** a **faropenem**.

#### **1.3.1.1.5 Inhibitory beta-laktamáz**

Do této skupiny jsou řazeny látky, které mají obdobnou chemickou strukturu jako molekula penicilinu, a proto jsou schopny nevratné vazby do aktivního místa bakteriálních beta-laktamáz. Patří sem preparáty **kyselina klavulanová**, **sulbactam** a **tazobactam**, které samy o sobě vykazují jen minimální antimikrobiální aktivitu. Jejich přídavek k penicilinovému či cefalosporinovému antibiotiku však může zásadně rozšířit jejich spektrum právě o bakterie, které se díky produkci beta-laktamáz staly vůči těmto beta-laktamům rezistentní. Obvyklé kombinace jsou kyselina klavulanová a amoxicilin (**ko-amoxicilin**), ampicilin a sulbactam (**ko-ampicilin**) a piperacilin a tazobactam (**ko-piperacilin**).

#### ***1.3.1.2 Glykopeptidy***

Glykopeptidy jsou baktericidní antibiotika, která inhibují syntézu buněčné stěny vazbou na koncovou část pentapeptidových prekurzorů peptidových řetězců příčně stabilizujících polysacharidová vlákna tvořená opakujícím se motivem molekul N-acetyl-glukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové. Chemicky jde o sacharidy napojené na peptidový kruh, odtud jejich název. Vyznačují se převážně (pomalým) baktericidním účinkem proti většině grampozitivních bakterií, a to jak aerobně rostoucích, tak anaerobů. Gramnegativní mikroby (s výjimkou



některých neisserií) jsou vůči nim přirozeně rezistentní, glykopeptidy totiž kvůli velikosti své molekuly neproniknou jejich membránou. Glykopeptidy jsou hydrofilní a prostupují do většiny prokrvených tkání. Velikost jejich molekuly dále nedovoluje prostupu do intracelulárního prostoru, při perorálním podání se zase nevstřebávají do systémového oběhu, a naopak při intravenózní aplikaci nepronikají do střeva. Systémového účinku je tedy dosaženo pouze intravenózním podáním (intramuskulárně se pro nadměrnou bolestivost v místě vpichu neaplikují). Také účinek glykopeptidů, podobně jako beta-laktamům je závislý na čase, po který se udržují nad hodnotami MIC patogenů. Kombinovat je lze s beta-laktamy, aminoglykosidy a rifampicinem.

Hlavním benefitem glykopeptidů je jejich účinnost proti stafylokokům včetně MRSA. Jsou také aktivní vůči většině izolátů druhu *Enterococcus faecalis*, mnohem méně vůči *E. faecium*, kde vykazují pouze bakteriostatický efekt. Baktericidie však může být proti *E. faecium* navozena synergií s aminoglykosidy. Citlivé jsou dále streptokoky, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Rhodococcus equi*, *Lactobacillus acidophilus*, nikoliv však ostatní laktobacily. Z grampozitivních anaerobů se vyzdvihuje zejména účinek proti *C. difficile*. Přirozeně rezistentní je *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je vankomycin, méně často je aplikován teikoplanin. Dříve byly ve výkrmu prasat a brojlerů používány i látky, které jsou svou strukturou řazeny také mezi glykopeptidy, a to avoparcin a avilamycin. V Evropské unii bylo používání antibiotik ke stimulaci produkce u zvířat zakázáno k 1.1. 2006. K tomuto zákazu vedlo zjištění o možné selekci vankomycin rezistentních *E. faecalis* a *E. faecium* ve střevě drůbeže a prasat, kterým byl právě podáván avoparcin. Kromě obav z možnosti zavlečení vankomycin rezistentních enterokoků do potravního řetězce člověka se skloňovalo také riziko přenosu genů rezistence proti vankomycinu (geny *van*) na kmeny *S. aureus*, zejména na MRSA. Již v roce 1996 byl totiž v Japonsku poprvé izolován *S. aureus* s intermediální citlivostí vůči vankomycinu a dal tak název obávané skupině stafylokoků (Glycopeptide-intermediate *S. aureus*, **GISA**).

Vankomycin řadíme společně s karbapenemy a cefalosporiny vyšších generací mezi tzv. rezervní antibiotika, vyčleněná pro léčbu nejtěžších případů onemocnění, které odolávají léčbě ostatními antibiotiky. V případě vankomycinu to jsou hlavně infekce grampozitivními mikroby rezistentními na beta-laktamová antibiotika. Z toho důvodu by měl být ve veterinární léčbě používán jen výjimečně, popisováno je jeho použití jako léku poslední volby u hříbat s infekcemi vyvolanými *R. equi* rezistentními k erytromycinu a rifampinu.

### 1.3.2 Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií

Vnější (cytoplazmatickou) membránu bakterií tvoří lipidová dvojvrstva s integrovanými proteiny. U grampozitivů naléhá zevnitř na buněčnou stěnu, u gramnegativů je takto označována vnitřní lipidová dvojvrstva. Její funkce je jednak bariérová, navíc jsou v ní u aerobů umístěny enzymy dýchacího řetězce. Protože se struktura cytoplazmatické membrány bakterií podobá struktuře cytoplazmatické membrány eukaryotních buněk a navzdory tomu, že zde nejsou umístěny enzymy spojené s dýchacím řetězce, jde o látky pro člověka a zvířata výrazně toxické. Z toho důvodu lze některé z nich aplikovat pouze topicky formou kapek, mastí, či při

výplachu ran. Je mezi nimi ale několik ne tolik rizikových, ty lze podávat i systémově (kolistin, daptomycin). Vzhledem k probíhajícím oxidačně-redukčním dějům na membráně aerobních bakterií působí membránová antibiotika především proti nim, u anaerobů je energie získávána prostřednictvím reakcí odehrávajících se v cytoplazmě.

Antibiotika této skupiny působí baktericidně s rychlým nástupem účinku a ten je dokonce rychlejší, než účinek beta-laktamů (natož glykopeptidů). Při zásahu do struktury cytoplazmatické membrány se totiž buňka rozpadá dříve, než když jsou narušeny mechanismy sloužící ke stavbě či obnově buněčné stěny. Není přitom nutné, aby šlo o bakterie ve fázi množení. Čím více molekul antibiotika bakterii napadne, tím je poškození vnější membrány fatálnější, z toho vyplývá, že účinek této skupiny antibiotik je závislý na jejich koncentraci. Pokud přesto bakterie poškození přežije, k reparaci cytoplazmatické membrány potřebuje čas na vykonání nezbytných oprav, což se manifestuje značným postantibiotickým efektem „membránových“ antibiotik. Další charakteristikou je špatné překonávání biologických bariér. Při perorálním podání se ze střeva nevstřebávají a pro dosažení systémového účinku se musí podávat parenterálně. Nelze je použít ani k léčbě intracelulárních bakterií.

### 1.3.2.1 Cyklické lipopeptidy

Cyklické lipopeptidy jsou z chemického hlediska peptidy tvořené až 15 aminokyselinami, část z nich tvoří kruh a zbytek ocas s připojenou lipidovou částí. Řadíme mezi ně původní vysoce toxická antibiotika určená pouze k lokálnímu podání (**bacitracin**), polymyxinová antibiotika **kolistin** a **polymyxin B** a moderní lipoproteiny **daptomycin** a **surotomycin**. Polymyxiny jsou známy již od 40. let dvacátého století, kdy byly získány z půdní bakterie *Bacillus polymyxa* (dnes *Paenibacillus polymyxa*). O čtyřicet let později bylo objeveno další antibiotikum produkované bakterií *Streptomyces roseosporus* se strukturou velmi podobnou polymyxinům a pojmenováno daptomycin. Dnes jsou známy i další preparáty se strukturou cyklických lipopeptidů bez antibakteriálního efektu, zato s účinkem antimykotickým (echinokandin B), nebo dokonce látky připravované pro využití v zemědělství k ochraně rostlin proti plísním.

Volné aminoskupiny propůjčují **polymyxinům** schopnosti kationických detergentů, které rozrušují fosfolipidovou vrstvu cytoplazmatické membrány. Jejich spektrum se omezuje pouze na gramnegativní bakterie, zejména na *E. coli*, *Salmonella* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus* spp., včetně *Pseudomonas aeruginosa*, nejsou však efektivní v léčbě infekcí způsobených rodem *Proteus* a nižší účinnost mají na rody *Morganella*, *Burkholderia*, *Providencia*, *Serratia*. Grampozitivní bakterie jsou přirozeně rezistentní. Jejich širšímu klinickému uplatnění brání výrazná nefrotoxicita a neurotoxicita.

Z polymyxinů je známým zástupcem především **kolistin**. V humánní medicíně byl v polovině minulého století hlavním antibiotikem určeným k léčbě pseudomonádových infekcí, následný objev cefalosporinů 3. a 4. generace a fluorochinolonů ho vytěsnil takřka až na okraj zapomnění. Nárůst multirezistence u gramnegativů však vedl k jeho renesanci. Dnes opět získal statut rezervního antibiotika pro účely léčby těžkých infekcí člověka. Spektrum jeho účinku zahrnuje gramnegativní aerobně rostoucí bacily, nikoliv však gramnegativní koky, grampozitivní bakterie, anaeroby, mikroaerofily, spirochety, mykoplazmata ani další intracelulárně žijící bakterie. Ve veterinární medicíně je používán k perorální terapii střevních infekcí vyvolaných

*E. coli* a salmonelami. Lokálně je aplikován k léčbě mastitid dojnic spojených s *E. coli*, v kombinaci s dalšími látkami je součástí ušních kapek a je vhodný zejména proti chronickým zánětům zevního ucha způsobeným pseudomonádami.

Další významný zástupce polymyxinů, **polymyxin B** je výhradně používán pouze lokálně, k léčbě otitis externa, očních či vaginálních infekcí, kdy bývá v topických preparátech často kombinován s neomycinem a bacitracinem.

### 1.3.2.2 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou antibiotika vyznačující se dvojitým účinkem na bakteriální buňky. Již dlouho je známo, že inhibují proteosyntézu na 30S podjednotce ribozomu, navíc jsou ale schopny poškodit buněčnou membránu bakterií. Aby se aminoglykosidy mohly vůbec do blízkosti ribozomů dostat, potřebují nejprve proniknout přes cytoplazmatickou membránu, její poškození tedy předchází inhibici proteosyntézy a je zřejmě i pro celý antimikrobiální efekt významnější. Aminoglykosidy totiž, na rozdíl od jiných antibiotik narušujících proteosyntézu, nemají efekt bakteriostatický, nýbrž baktericidní. I z tohoto důvodu jsou aminoglykosidy zařazeny v tomto textu do kapitoly k látkám narušujícím buněčnou membránu.

Aminoglykosidy mají původ v bakteriích dvou rodů: *Streptomyces* a *Micromonospora*, proto nesou látky izolované ze streptomycet koncovku -mycin (streptomycin, kanamycin), kdežto z mikromonospor -micin (gentamicin, netilmicin).

Aminoglykosidy jsou tvořeny aminocyklitolovým kruhem, který se glykosidickou vazbou pojí na cukry. Výjimku představuje **spektinomycin** tvořený pouze aminocyklitolem, proto ho v některých literárních zdrojích mezi aminoglykosidy nezařazují. Při fyziologickém pH mají pozitivní náboj, což jim propůjčuje afinitu k záporně nabitým fosfátovým skupinám nacházejícím se v buněčné membráně (fosfolipidy, lipopolysacharidy), či v nukleových kyselinách (mRNA, rRNA). Aminoglykosidy ke svému průchodu přes zevní membránu gramnegativních bakterií využívají právě vazbu na fosfolipidy a negativně nabité bílkoviny a současně vytěsňují vápenaté a hořečnaté kationty. Tím v zevní membráně vznikají póry, kterými antibiotika pronikají do periplazmatického prostoru. K dalšímu postupu přes vnitřní membránu gramnegativů využívají aminoglykosidy aerobní transportní systémy bakterie, tím se vysvětluje jejich neúčinnost na anaeroby. Na ribozomech potom tato antibiotika zasahují již do iniciální fáze proteosyntézy, kdy narušují čtení informace z mRNA, blokují přesun tRNA s navázaným peptidovým řetězcem, a navíc později zpřičinují chybné čtení mRNA.

Baktericidní efekt aminoglykosidů nastupuje rychleji než u beta-laktamů i glykopeptidů. Jsou to antibiotika s účinkem závislým na koncentraci a ten je nejlepší při dosažení koncentrací přesahujících MIC šest- až desetkrát, na úspěch terapie pak nemá vliv množství inokula. Aminoglykosidy se také vyznačují postantibiotickým efektem u gramnegativních bakterií, u grampozitivních bakterií, vůči kterým mají účinnost, je zanedbatelný. Protože mají charakter polykationtů, účinek na cílové struktury vyžaduje mírně zásadité pH, v kyselém prostředí selhávají. Největší aktivitou se vyznačuje **amikacin**, dále **gentamicin**, **neomycin**, nejmenší pak má **streptomycin**. Mnoho zástupců aminoglykosidů je kontraindikováno pro použití u potravních zvířat.

Aminoglykosidy se nevstřebávají ze zažívacího traktu. Dříve se používaly k selektivní dekontaminaci střeva před chirurgickými zákroky, od této indikace se však již upustilo. Nejčastěji se tato antibiotika podávají intravenózně, nebo intramuskulárně. Vylučovány jsou ledvinami. Pro svoji hydrofilní povahu dosahují terapeutických koncentrací zejména v extracelulární tekutině. Do buněk pronikají velmi omezeně, výjimku představují tubulární buňky ledvin a buňky vnitřního ucha, což vysvětluje jejich nefrotoxicitu a ototoxicitu. Zatímco je poškození ledvin po vysazení antibiotik reparováno, poškození sluchu bývá nevratné.

Spektrum účinku aminoglykosidů zahrnuje především gramnegativní aerobní tyčinky, včetně pseudomonád. Z grampozitivů poškozují pouze stafylokoky a variabilně mykobakteria. Jsou neefektivní v léčbě anaerobů, metabolicky neaktivních bakterií a také v léčbě infekcí způsobených intracelulárními bakteriemi. Přestože je nelze použít v monoterapii enterokokových ani streptokokových infekcí, v kombinaci s beta-laktamy či glykopeptidy je dosaženo synergického účinku.

Mezi nejvýznamnější zástupce aminoglykosidů patří gentamicin. Spektrum jeho účinku zahrnuje enterobakterie *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia marcescens* a další. Z ostatních gramnegativů mají dobrou citlivost *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter jejuni*, *Moraxella bovis*, *T. equigenitalis* a další. Nižší citlivost je potom u hemofilů, pasterel, aktinobacilů a *P. aeruginosa*. Z grampozitivů jsou citlivé *S. aureus* a *S. intermedius*. Ve veterinární medicíně je používán k léčbě kolibacilóz hospodářských druhů zvířat a při infekcích respiračního a vylučovacího systému. Protože má gentamicin významnou roli v kontrole závažných stavů člověka (proti pseudomonádovým infekcím se kombinuje s antipseudomonádovými beta-laktamy, proti enterokokovým a streptokokovým endokarditidám se kombinuje s peniciliny či glykopeptidy, proti listeriovým infekcím se kombinuje s ampicilinem), mělo by být jeho použití u zvířat podmíněno zjištěním původce onemocnění a potvrzením jeho citlivosti k aminoglykosidům.

Veterinární aminoglykosid **apramycin** působí pouze na gramnegativní bakterie. Frekvence výskytu rezistencí je velmi podobná, jako u gentamicinu. Je využíván ve formě premixu k prevenci a terapii průjmů telat, selat a drůbeže vyvolaných *E. coli*.

**Tabulka č. 3: Rozdělení aminoglykosidů a jejich spektrum účinku**

Aminoglykosidy	Látka	Spektrum účinku a použití
I. streptomycinové	<u>Streptomycin</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Užší spektrum účinku</li> <li>• <i>Yersinia</i> spp., <i>Leptospira</i> spp., <i>Brucella</i> spp., <i>Trueperella</i> spp., <i>R. equi</i></li> <li>• Mykobakterie vč. <i>M. tuberculosis</i></li> <li>• Až 90 % původně citlivých enterobakterií je rezistentních</li> <li>• V humánní medicíně jde o záložní antituberkulotikum</li> </ul>
IIa. neomycinové	<u>Neomycin</u> , paromomycin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Moraxella bovis</i>, <i>T. equigenitalis</i>, <i>B. bronchiseptica</i></li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>R. equi</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. intermedius</i></li> <li>• Koli-enteritidy, mastitidy</li> <li>• Neomycin lokálně v mastech s bacitracinem</li> </ul>
IIb. kanamycinové	<u>Kanamycin</u> , <u>amikacin</u> , tobramycin, <u>apramycin</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterobacteriaceae</li> <li>• <i>Campylobacter jejuni</i>, <i>Moraxella bovis</i>, <i>T. equigenitalis</i>, <i>B. bronchiseptica</i></li> <li>• Méně <i>S. aureus</i>, <i>S. intermedius</i></li> <li>• NE streptokoky, pseudomonády</li> </ul>
IIc. gentamicinové	<u>Gentamicin</u> , isepamicin, netilmicin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterobacteriaceae</li> <li>• <i>Campylobacter jejuni</i>, <i>Moraxella bovis</i>, <i>T. equigenitalis</i>, <i>B. bronchiseptica</i></li> <li>• <i>S. aureus</i>, <i>S. intermedius</i></li> <li>• Méně hemofily, pasterely, aktinobacily, pseudomonády</li> <li>• Enterokoky, streptokoky POUZE V KOMBINACÍCH</li> </ul>

Pozn.: kurzívou jsou vyznačeny látky určené výhradně pro veterinární použití, podtržené substance jsou charakteristickými reprezentanty dané skupiny.

### 1.3.3 Antibiotika působící na nukleové kyseliny

K poškození nukleové kyseliny používají antibiotika různé přístupy. Jedním z nich je **inhibice bakteriálních topoizomeráz**, což jsou enzymy odpovídající za rozbalování a sbalování DNA. Topoizomerázy I a III zavínají či rozvíjejí molekulu DNA vždy jen o jednu otáčku a to tak, že nejprve přeruší jedno vlákno dvoušroubovice, které nakonec zase spojí. Topoizomeráza II (synonymum **DNA-gyráza**) umí přestříhnout obě vlákna současně, čímž ovlivňuje DNA ve stavu superšroubovice. DNA-gyráza je jediná z topoizomeráz, která umí sbalit DNA tak, aby se vtěsnila do buňky a uplatňuje se prakticky při veškerých procesech odehrávajících se na DNA, při transkripci genů i při jejich opravách. Topoizomeráza IV přerušuje také obě vlákna dvoušroubovice, uplatňuje se pak zejména při oddělování dceřiných molekul po syntéze nové DNA během množení buněk. Mezi inhibitory topoizomeráz řadíme **chinolonová** antibiotika, ale také řadu preparátů s cytostatickým efektem, které mají své uplatnění v léčbě nádorových onemocnění (doxorubicin). Inhibitory topoizomeráz mají baktericidní účinek, kromě toho, že bakteriím zabrání DNA využít, ji navíc zablokují ve stavu mnohočetného přerušování vlákna na více místech současně, což způsobí buněčnou smrt.

Inhibitory RNA-polymerázy jsou další skupinou látek ovlivňujících molekulu DNA, avšak odlišným mechanismem než inhibicí topoizomeráz, narušují totiž proces transkripce DNA do mRNA inhibicí enzymu RNA-polymerázy. Také tyto preparáty mají baktericidní

účinek, protože při přepisu musí být DNA nejen rozbalena, ale i přerušena, čímž je náchylnější k poškození. Mezi inhibitory RNA-polymerázy řadíme **rifamyciny**.

Obě skupiny látek se vyznačují dobrým průnikem přes biologické bariéry, protože se potřebují dostat celou buňkou až k DNA, takže mají schopnost dobrého prostupu do tkání i buněk. Lze je tedy nasadit při léčbě infekcí ve špatně dostupných tělesných kompartmentech, nebo taky při terapii infekcí způsobených intracelulárními patogeny. Dále je pro ně charakteristická nízká toxicita. Jistou nevýhodou však je rychlý rozvoj a šíření rezistence, napadají totiž struktury, které mají pro bakterie životní význam.

### **1.3.3.1 Chinolony**

Chinolony jsou látky, které byly syntetizovány na počátku šedesátých let minulého století a v kontextu původu jde tedy o chemoterapeutika. Prvním vyrobeným chinolonem byla kyselina nalidixová, která ale měla pouze úzké spektrum účinku a její klinická použitelnost se omezovala jen na terapii močových infekcí. V osmdesátých letech byla molekula chinolonů modifikována připojením atomu fluoru, čímž došlo nejenom k rozšíření antimikrobiálního účinku, ale také ke zlepšení farmakokinetických parametrů (a dosažení systémového účinku). Vznikla tedy skupina nových, účinných preparátů – fluorochinolonů s prvním zástupcem flumechinem.

Dnes máme k dispozici celou řadu látek, které členíme dle různých parametrů do 3-4 generací. Jejich společným mechanismem je inhibice DNA-gyrázy a topoizomerázy IV. Gyráza je cílem účinku chinolonů především v případě gramnegativních bakterií, u grampozitivů chinolony poškozují především topoizomerázu IV. Fluorochinolony se vyznačují rychle nastupujícím baktericidním účinkem jak na množící se bakterie, tak na buňky ve stacionární fázi, intenzita účinku je však nižší, než jako je tomu u antibiotik narušujících buněčnou membránu. Jeho velikost závisí na koncentraci, nikoliv na čase bez závislosti na množství mikrobů v ložisku a mají krátký postantibiotický efekt.

Většina chinolonů je velmi dobře vstřebávána z trávicího traktu a velmi dobře také pronikají do tkání. Nejvyšších koncentrací dosahují v prostatě, plicích a ledvinách. Jejich toxicita není vysoká, nedoporučuje se však jejich podávání u mladých jedinců, kde mohou poškozovat kloubní chrupavky.

Spektrum účinku se mezi generacemi liší, zahrnuje však především gramnegativní bakterie, vyšší generace jsou už širokospektré s rozšířeným účinkem i na některé grampozitivity a anaeroby, viz tabulku č. 4.

Před nasazením chinolonů pro účely léčby zvířat je třeba dbát pravidel pro použití antimikrobik s indikačním omezením (správná diagnostika původce, vyšetření citlivosti, použití na léčbu klinických stavů, které měly slabou odezvu, nebo se očekává slabá odezva na ostatní skupiny antibiotik). Veterinární chinolon enrofloxacin je využíván především k léčbě infekcí trávicího, urogenitálního a respiračního systému. Doporučuje se nepodávat štěňatům a koťatům mladším jednoho roku. Marbofloxacin se u malých zvířat podává k léčbě kožních infekcí, respiračních a močových cest, u skotu a prasat k terapii respiračních infekcí, u prasnic s MMA

syndromem, telatům s koli-enteritidami. Orbifloxacin je injekční chinolon pro psy a kočky. Sarafloxacin slouží k medikaci vody při léčbě kuřecích brojlerů a krůt.

**Tabulka č. 4: Rozdělení chinolonů a jejich spektrum účinku**

Generace	Látka	Spektrum účinku a použití
I.	<u>Kys. nalidixová</u> , kys. oxolinová, kys. pipemidová <u>flumechin</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Užší spektrum účinku</li> <li>• <i>E. coli</i>, neisserie, hemofily</li> </ul>
II.	Norfloxacin, <u>ciprofloxacin</u> , ofloxacin, levofloxacin, <i>enrofloxacin</i> , <i>marbofloxacin</i> , <i>danofloxacin</i> , <i>orbifloxacin</i> , <i>sarafloxacin</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gramnegativy, zejména:</li> <li>• Enterobacteriaceae, neisserie, hemofily, pasterely, aktinobacily, aeromonády</li> <li>• <i>P. aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i></li> <li>• Stafylokoky, streptokoky, korynebakteria, listerie, <i>C. perfringens</i></li> <li>• Chlamydie a mykoplazmata</li> <li>• Mykobakterie</li> </ul>
III.	Moxifloxacin, temafloxacin, trovafloxacin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jako II. generace, navíc:</li> <li>• Další grampozitivy</li> <li>• Některé anaeroby</li> </ul>

Pozn.: kurzívou jsou vyznačeny látky určené výhradně pro veterinární použití, podtržené substance jsou charakteristickými reprezentanty dané skupiny.

### 1.3.3.1 Ansamyciny

Ansamyciny jsou skupinou látek, z nichž pro léčbu bakteriálních onemocnění jsou nejvyužívanější tzv. **rifamyciny**, baktericidní antibiotika inhibující aktivitu DNA-polymerázy. Pojmenování ansamyciny vychází z jejich chemické struktury – předponou ansa-, se rozumí překlenující oblouk, tedy motiv, vinoucí se napříč molekulou. Další látky z této skupiny bez antibakteriálního účinku našly uplatnění v onkologii či léčbě diabetické retinopatie. Klinicky nejvýznamnější zástupci jsou **rifampicin**, **rifabutin** a **rifaximin**.

Jak bylo zmíněno výše, rifamyciny se vyznačují baktericidní aktivitou s účinkem závislým na koncentraci látky a vyznačují se dlouhým postantibiotickým efektem, u *M. tuberculosis* je to až 75 hodin. I rifamyciny dobře překonávají biologické bariéry, umí penetrovat i do

biofilmů. Jejich vstřebávání z GITu je variabilní, ale rifaximin se ze střeva nevstřebává vůbec. Toxicita je nízká, často však vyvolávají lékové interakce (zejména rifampicin), protože indukují tvorbu jaterních mikrozomálních enzymů skupiny P-450, což obvykle rezultuje ve snížení účinku těchto léků.

Spektrum rifamycinů je široké, zahrnuje především grampozitivní bakterie, mykobakterie, různé intracelulárně rostoucí bakterie a některé anaeroby. Z gramnegativů jej lze použít proti neisseriím, moraxelám, hemofilům, bordetelám, pasterelám, helikobakterům, franciselám a legionelám. Nepůsobí na enterobakterie (s výjimkou rifaximinu), jejichž odolnost souvisí s omezením penetrace jejich stěnou. Rifamyciny se vyznačují pleiotropním účinkem, inhibují plasmodium a filarie, omezeně účinkují také na retroviry (nebyly však zavedeny do léčby HIV) a některé mykotické organismy (aspergily, blastomycety, histoplasmata, sacharomycety).

I když se rifamyciny vyznačují širokým spektrem účinku, v humánní medicíně jsou až na výjimky vyhrazeny pro léčbu tuberkulózy a lepry (a tudíž jsou paradoxně řazeny mezi antibiotika úzkospektrá, autoři však mají na mysli úzké spektrum využití, nikoliv účinku). Vzhledem ke snadnému vzniku rezistence, a to dokonce i v průběhu léčby, se musejí podávat v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Zvláštní postavení má rifaximin, který se nevstřebává z GITu, a proto slouží k terapii střevních infekcí. Ve veterinární medicíně je rifaximin používán lokálně zejména k léčbě mastitid, či v intrauterinních tabletách pro léčbu endometritid.

### 1.3.4 Antibiotika působící na ribozomy

Ribozomy bakterií se skládají ze dvou podjednotek: menší, 30S a větší, 50S. Na menší podjednotce dochází ke čtení informace z mediátorové RNA (mRNA). Je to proces, při kterém se ribozom po tomto vlákně posouvá a ke každé trojici bází na mRNA (kodon) připojí odpovídající antikodon transferové RNA (tRNA). Transferová RNA má na konci protilehlém k antikodonu umístěnu aminokyselinu. Větší podjednotka potom zajišťuje spojování aminokyselin nesených na tRNA do jednoho peptidového řetězce. Bakteriální ribozomy a proteosyntézu narušuje celá řada skupin antimikrobiálních látek. Jsou to zejména: **makrolidy, linkosamidy, aminoglykosidy, tetracykliny, amfenikoly** a **pleuromutiliny**. Některé z těchto skupin inhibují proteosyntézu stejným způsobem a na stejném místě ribozomu (makrolidy, linkosamidy, chloramfenikol), ty potom nelze při léčbě kombinovat, protože by došlo k vzájemnému antagonismu.

#### 1.3.4.1 Makrolidy, azalidy a ketolidy

Pojmenování **makrolidy** vychází z chemické struktury těchto molekul, jde totiž o makrocyclické laktony. Jedním z původně objevených makrolidů byl **erytromycin** (následovaly **pikromycin, oleandomycin, spiramycin**), jehož semisyntetické deriváty (označované za 2. generaci makrolidů, **klaritromycin, roxitromycin**) vznikly po změně v postranních skupinách. Dalšími zásahy do makrolidového kruhu byly připraveny ketolidy a azalidy, které jsou stále mnoha prameny řazeny k makrolidům. **Azalidy (azitromycin, tulatromycin)** získaly oproti makrolidům vyšší aktivitu vůči některým gramnegativům a navíc schopnost kumulace



v lymfatických tkáních doprovázenou značným prodloužením biologického poločasu rozpadu. **Ketolidy (telitromycin, solitromycin)** zase mají vyšší odolnost v kyselém pH a také proti mechanismům rezistence spočívajícím v metylaci ribozomů či v aktivním odčerpání z buňky.

Všechny makrolidy (včetně azalidů a ketolidů) inhibují proteosyntézu vazbou na větší podjednotku ribozomu, kde zamezují posouvání tRNA a přirůstání nových peptidových řetězců. Jejich účinek je bakteriostatický a závisí na délce působení antibiotika. Dále mají schopnost dobrého průniku do buněk a tkání a vylučují se také na povrch sliznic. Jejich koncentrace v neutrofilech a makrofázích je mnohonásobně vyšší než v séru, díky tomu dokážou výborně usmrcovat fagocytované bakterie a současně zvyšují svou koncentraci v místě zánětu díky bílým krvinkám, které s nimi do tohoto místa připutují. Makrolidy jsou lipofilní a k jejich vylučování dochází játry a žlučí, přičemž je část látky metabolizovaná na jaterních cytochROMEch. U většiny z nich byl pozorován enterohepatální oběh.

Spektrum účinku makrolidů zahrnuje většinu grampozitivních bakterií, včetně těch s anaerobních, z gramnegativů především kultivačně náročné druhy (kampylobaktery, helikobaktery, legionely, bordetely). Dále také mykoplazmata a chlamydie, bakterie spirálovitého tvaru, a dokonce některá mykobakteria. U mnoha z výše uvedených druhů se postupem času rozvinula rezistence, přirozenou rezistenci vykazují zástupci čeledi Enterobacteriaceae a nefeřmentující tyčinky (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*). Primárně rezistentní je i *Enterococcus faecalis*.

Makrolidy jsou používány k léčbě respiračních infekcí bakteriálního původu a urogenitálních infekcí, protože jsou však bakteriostatická a poměrně slabá svým účinkem, není vhodná jejich aplikace pro řešení vážných stavů. Dle stoupající účinnosti proti respiračním patogenům je můžeme seřadit takto: spiramycin, azitromycin, roxitromycin, erytromycin, klaritromycin a nejučinnější telitromycin. Při řadě indikací (lymská borelióza, chlamydiové infekce) se spíše upřednostňují antibiotika tetracyklinová.

Veterinární antibiotikum **tylosin** se pro svou schopnost koncentrace v plicích, kůži a mléčné žláze využívá při léčbě pneumonií, zejména pokud jsou vyvolána mykoplazmaty, a k terapii mastitid. Dále byl často díky schopnosti intracelulární koncentrace aplikován proti *Lawsonia intracellularis* u prasat. U psů má při pneumoniích postavení léku druhé volby. Další veterinární makrolid **tilmikosin** je možné jednorázově i opakovaně aplikovat při respiračních infekcích mladého skotu, prasat a také k terapii infekcí *Mycoplasma gallisepticum* a *M. synoviae* v chovech drůbeže. Veterinární zástupce azalidů, **tulatromycin**, má své využití také hlavně při léčbě infekcí dýchacích cest. U skotu především vyvolaných *Mannheimia haemolytica* či *Pasteurella multocida*, u prasat vyvolaných *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *P. multocida* či *Mycoplasma hyopneumoniae*.

**Tabulka č. 5: Rozdělení makrolidových a příbuzných antibiotik**

Skupina	Laktonový kruh	Látka
Makrolidy	12členný	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metymycin</li> </ul>

	14členný	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erytromycin</li> <li>• Pikromycin</li> <li>• Oleandromycin</li> <li>• Klaritromycin</li> <li>• Roxitromycin</li> </ul>
	16členný	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spiramycin</li> <li>• Josamycin</li> <li>• Tylosin</li> <li>• Tilmikosin</li> </ul>
Azalidy	15členný	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azitromycin</li> <li>• Tulatromycin</li> </ul>
Ketolidy	14členný	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telitromycin</li> <li>• Cetromycin</li> <li>• Solitromycin</li> </ul>

Pozn.: kurzívou jsou vyznačeny látky určené výhradně pro veterinární použití

#### 1.3.4.2 Linkosamidy

Skupinu linkosamidů představují látky **linkomycin** a jeho semisyntetické deriváty **klindamycin** a **pirlimycin**, poslední ze jmenovaných je využíván pouze pro veterinární účely. Chemickou strukturu linkosamidů tvoří aminocukr, k němuž je peptidickou vazbou připojená aminokyselina. Linkosamidy jsou další ze skupin antibiotik inhibujících proteosyntézu, což dělájí zábranou přirůstání nového peptidového řetězce na ribozomu.

Jsou to bakteriostatická antibiotika s účinkem závislým dle některých literárních prací na koncentraci, dle jiných na délce podávání, účinek celé skupiny pak zesiluje alkalické a anaerobní prostředí. Farmakokinetické vlastnosti se u jednotlivými linkosamidů značně liší, spektrum účinku je zato u všech linkosamidů velmi podobné, ale u jednotlivých preparátů se odlišuje svou razancí. Je úzké, výhradně orientované na grampozitivní mikroby a grampozitivní i gramnegativní anaeroby. Dobře citlivé jsou z grampozitivů zejména pyogenní hemolytické streptokoky, koaguláza-pozitivní stafylokoky, bacily, *E. rhusiopathiae*, *Nocardia* spp., *Corynebacterium* spp., *Trueperella pyogenes*. Z anaerobů jsou citlivé *C. perfringens* a *septicum* (*C. difficile* je citlivé jen na klindamycin), ale také gramnegativní anaeroby *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas*. Dobrou citlivost má i *Campylobacter* spp. Vyšší výskyt rezistence je pozorován u *Brachyspira hyodysenteriae* a *B. pilosicoli*. Většina gramnegativů je přirozeně rezistentních, jejich zevní membrána totiž linkosamidům neumožňuje prostoupit do nitra buňky. Z grampozitivních bakterií jsou rezistentní enterokoky, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *C. difficile* (rezistence k linkomycinu)

Linkomycin se po perorálním podání velmi špatně vstřebává, proto je aplikován převážně parenterálně. Vylučován z těla je především ledvinami, mnohem méně trusem/stolicí. Toxicita linkomycinu je závislá na druhu, u člověka je velmi malá, bohužel se však po jeho použití vyskytuje ve zvýšené míře negativní ovlivnění přirozené střevní mikroflóry, která svým oslabením dává šanci k přemnožení rezistentním anaerobům v čele s *C. difficile*. To může vést k rozvoji pseudomembranózní kolitidy s velmi vážným, někdy dokonce infaustním, průběhem. U lidí je tento stav označován za postantibiotickou kolitidu (CDAD, *Clostridium difficile* Associated Diarrhoea/Disease), v jejíž etiologii se kromě linkomycinu uplatňují především širokospektrá antibiotika. U zvířat hrozí postexpoziční rozvoj pseudomembranózní kolitidy a fatálních průjmů hlavně u koní, králíků a dalších býložravců. Současně se popisuje vysoká toxicita pro ovce, králíky, morčata a křečky. Linkomycin se ve veterinární medicíně používá k léčbě stafylokokových mastitid u skotu rezistentních k penicilinu, dále v kombinaci se spektinomycinem proti respiračním onemocněním vyvolaným mykoplazmaty a anaeroby, či ve formě spreje k léčbě infekcí paznehtů a kopyt způsobených gramnegativními anaeroby. Koncentruje se v kostech, proto je indikován k léčbě osteomyelitid vyvolaných citlivými mikroby.

Klindamycin je oproti linkomycinu 2-8x účinnější, zejména se to týká účinnosti proti anaerobům (včetně *C. difficile*) Vyznačuje se pleiotrofním účinkem i proti protozím, konkrétně proti *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, babéziím a plazmodiím. Klindamycin má schopnost i při subinhibičních koncentracích narušovat proteosyntézu citlivých bakterií, a dokonce jim znemožňuje exprimovat určité faktory asociované s virulencí, jako jsou tvorba toxinů, pouzdra či adherence na různé povrchy. Podobně, jako to bylo popsáno u makrolidů, také klindamycin se umí koncentrovat ve fagocytujících buňkách, kde inhibuje přeživší fagocytované bakterie a současně zvyšuje svou koncentraci v místě zánětu. Oproti linkomycinu se také lépe vstřebává z trávicího systému, je metabolizován v játrech a vylučován z těla z větší části stolicí/trusem, z menší močí. Klindamycin je veterinárně využíván převážně pro léčbu psů a koček k řešení infekcí dutiny ústní, ran, abscesů, pyémií a zejména osteomyelitid a dermatitid vyvolaných *S. pseudintermedius* a anaeroby.

Pirlimycin se podává v intramammárních preparátech při mastitidách vyvolaných gram-pozitivními bakteriemi.

### 1.3.4.3 Tetracykliny

Název této skupiny je odvozen od chemické struktury, která je tvořena čtyřmi lineárně fúzovanými aromatickými kruhy. Tetracykliny reverzibilně narušují proteosyntézu vazbou na 30S podjednotku bakteriálních ribozomů v místě, kde se za normálních okolností připojují molekuly tRNA, které přináší aminokyseliny k syntéze nových peptidů. Při jejich přestupu do buňky se uplatňují systémy aktivního transportu závislé na dodávce energie.

Tetracykliny jsou jedny z nejdříve objevených antibiotik, chlortetracyklin byl izolován ze *Streptomyces aureofaciens* již v roce 1945 a brzy poté následoval objev oxytetracyklinu. Tyto substance posloužily pro přípravu semisyntetických derivátů, z nichž první byl tetracyklin. **Chlortetracyklin, oxytetracyklin a tetracyklin** jsou označovány za první generaci tetracyklinů. V šedesátých letech minulého století byl z oxytetracyklinu připraven **doxycyklin** a veterinární preparát **minocyklin**, které řadíme do druhé generace tetracyklinů. Druhá generace

látka má shodné spektrum citlivých bakterií jako generace první, jejich benefitem je však vyšší účinnost a delší biologický poločas rozpadu. V roce 2005 začala distribuce nového tetracyklinového antibiotika **tigecyklinu** (třetí generace), který má schopnost odolat mechanismům rezistence běžným vůči preparátům z prvních dvou generací.

Tetracykliny jsou širokospektrá antibiotika s bakteriostatickým účinkem, který je závislý na době působení a vyznačují se dlouhým poločasem rozpadu. Zajímavé je, že u nich byl prokázán i protizánětlivý efekt. Jsou to antibiotika lipofilní, která snadno prostupují biologickými bariérami. Protože pronikají do většiny tkání i buněk včetně epitelu různých sliznic, jsou indikovány k léčbě intracelulárních infekcí a onemocnění slizničních systémů. Po perorálním podání se z trávicího traktu dobře vstřebávají. Jsou částečně metabolizovány a vylučují se ledvinami, žlučí i střevem. Při delší či opakované aplikaci se ukládají v kostech a zubech, proto jsou kontraindikovány u mláďat, u dětí dokonce až do osmi let. Tyto látky se vyznačují značným množstvím negativních účinků – narušení vývoje zubní skloviny s charakteristickým zabarvením a porucha tvorby kostí již byla uvedena výše. Dále mohou způsobit různé gastrointestinální obtíže včetně dysmikrobie rezultující v přemnožení kvasinek nejen ve střevě, ale i v dutině ústní či vagíně. Nelze opominout ani jejich potenciální hepatotoxicitu a nefrotoxicitu.

Spektrum účinku tetracyklinů je široké, zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie, některé anaeroby, atypické bakterie (chlamydie, mykoplazmata), rickettsie, spirochety, mykobakterie, nokardie a také některé prvoky (*Plasmodium*). Přirozeně rezistentní jsou *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp. a *Stenotrophomonas* spp. Tigecyklin je účinný navíc na multirezistentní kmeny významných bakteriálních druhů, jako jsou MRSA, VRE (vankomycin rezistentní enterokoky), ESBL pozitivní enterobakterie či multirezistentní *Acinetobacter baumannii*.

Jako jedny z nejdříve objevených antibiotik, navíc širokospektrých, byly už od svého objevu či syntézy natolik intenzivně využívány, (dokonce kdysi i jako růstové stimulatory v zemědělství), že se tetracyklinová rezistence stala jednou z nejčastěji prokazovaných u bakterií vůbec. Proto je dnes v podstatě nelze nasadit bez předchozího průkazu citlivosti.

Pro veterinární účely je využíván zejména doxycyklin, a to k terapii respiračních, gastrointestinálních infekcí, dermatitid a metritid u hospodářských i malých zvířat a drůbeže. Velké uplatnění má v terapii intracelulárních a atypických patogenů.

#### ***1.3.4.4 Amfenikoly***

Amfenikoly jsou látky s bakteriostatickým účinkem, které patří k nejdéle známým antibiotikům a jsou odvozené z jedné aminokyseliny, jejich struktura je proto jednoduchá. Hlavním představitelem skupiny amfenikolů je **chloramfenikol**, který se skládá z benzenového jádra a k němu připojené nitroskupiny. Brzy po zavedení chloramfenikolu do léčby infekcí člověka byla zjištěna jeho možná myelotoxicita a to vedlo k zásadnímu omezení použití výhradně na případy, kdy není možná jiná alternativa a u každého pacienta jsou důkladně zváženy přínosy a rizika jeho podání.

Amfenikoly se reverzibilně vážou na 50S podjednotku ribozomu a tím brání připojení nově přichozích molekul tRNA nesoucích aminokyseliny pro syntézu nových peptidů. Účinek

je vyšší u metabolicky aktivních bakterií. Jako další antibiotika s inhibicí proteosyntézy jsou bakteriostatická, nicméně u chloramfenikolu platí, že na některé bakterie mohou působit i baktericidně (neisserie, hemofily, streptokoky). Molekula chloramfenikolu je malá a lipofilní, takže snadno prostupuje přirozenými bariérami i do buněk, dobře také proniká do oka. V játrech dochází k jeho metabolizaci, vylučován je potom ledvinami. Vedle chloramfenikolu je dalším zástupcem této skupiny **florfenikol**, který je využíván výhradně pro veterinární účely.

U chloramfenikolu se popisuje celá řada nežádoucích účinků a toxicit. Zahrnují gastrointestinální obtíže, dysmikrobii, neuropatie a nejzávažnější je potom postižení hematopoetického systému, které může být reverzibilní, ale bohužel i nevratné.

Spektrum účinku chloramfenikolu je obzvláště široké, vedle grampozitivů a gramnegativů je citlivá i většina anaerobů, spirochet a atypických bakterií. Primární rezistenci vykazují *Serratia marcescens*, pseudomonády, acinetobaktery, burkholderie, mykobakterie a nokardie. Klinické použití v humánní medicíně je kvůli potenciální myelotoxicitě omezeno na závažné infekce, které nelze léčit bezpečnějším způsobem a zahrnuje léčbu břišního tyfu, septických forem salmonelózy, těžké formy hemofilových infekcí, pertuse, hnisavých meningitid a cerebri-tid. Dále může být podán k řešení polymikrobiálních infekcí, nebo těžko přístupných abscesů. Vzhledem k délce jeho využívání je široce rozšířená také rezistence k chloramfenikolu, geny kódující tuto rezistenci jsou potom nečastěji neneseny společně s dalšími geny rezistence, např. proti tetracyklinům, makrolidům, či sulfonamidům, na genových kazetách integronů. Tím je také umožněno jejich společné předávání cestou horizontálního přenosu. Z toho vyplývá nutnost laboratorního stanovení citlivosti před zahájením terapie.

Kvůli nebezpečí kontaminace potravního řetězce člověka se chloramfenikol nepoužívá k terapii potravních zvířat. Jeho nasazení je indikováno u psů k léčbě sekundárních bakteriálních infekcí doprovázejících psinku nebo laryngotracheitidu, či při těžkých infekcích oka. Je součástí řady preparátů k lokálnímu použití, např. u otitid.

Spektrum citlivých bakterií florfenikolu je ve srovnání s chloramfenikolem širší, ale nižší citlivost vykazují enterobakterie. Používá se pro léčbu respiračních onemocnění a keratokonjunktivitidy skotu a respiračních infekcí prasat. Významné postavení má v léčbě infekcí ryb, zejména furunkulózy, kde se podává v medikovaném krmivu.

#### **1.3.4.5 Pleuromutiliny**

Pleuromutiliny jsou semisyntetické deriváty produktů houby druhu *Pleurotus mutilis*. Jde primárně o veterinární antibiotika **tiamulin** (používá se od roku 1979) a **valnemulin** (od roku 1999), k léčbě infekcí člověka byl vyvinut až v roce 2007 preparát **retapamulin**, který je však určen pouze pro lokální použití v mastech proti kožním infekcím. Pleuromutiliny jsou tricyklické diterpeny lišící se mezi sebou dle typu postranního řetězce. Inhibují proteosyntézu inaktivací enzymu peptidyl-transferázy, která na velké podjednotce ribozomu zajišťuje přirůstání nového peptidového řetězce. Jejich účinek je bakteriostatický. Jsou to malé lipofilní molekuly, které se dobře vstřebávají z trávicího traktu. Jsou metabolizovány v játrech a z těla vylučovány ledvinami a žlučí. Jejich toxicita je velmi nízká, u býložravců by však mohly způsobit vážné poškození střevní mikroflóry, a proto je pro ně kontraindikován.

Spektrum účinku zahrnuje především mykoplazmata a anaerobní bakterie, ale i některé G<sup>-</sup> a G<sup>+</sup> mikroby. Dobrou citlivost mají anaeroby *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens*. Z mykoplazmat jsou to *M. gallisepticum*, *agalactiae* a *M. hyopneumoniae*. Z gramnegativů jsou citlivé leptospiry, sníženou citlivost vykazují *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* a *M. haemolytica*. Z grampozitivů dobře reagují *Streptococcus suis* a *E. rhusiopathiae*. Rezistentní jsou enterobakterie, *B. bronchiseptica* a *Clostridium septicum*.

Konkrétně jsou pleuromutiliny používány k léčbě mykoplasmových infekcí u drůbeže, enzootické pneumonie, dyzentérie, spirochetózy kolonu a proliferativní enteropatie prasat. K dispozici jsou v injekční formě pro intramuskulární podání, ale také pro perorální aplikaci formou medikovaného krmiva či vody.

### 1.3.5 Oxidačně působící antibiotika

Mezi oxidačně působící antibiotika řadíme **nitroimidazoly**, **nitrofurany** a **nitrothiazoly**. Jejich účinek je totožný a je založen na jejich přeměně v nestabilní radikály, které potom poškozují buněčné struktury schopné odevzdat elektron či proton. To jsou obvykle různé enzymy, ale i nukleové kyseliny. Z hlediska účinku je důležitá jejich chemická struktura: jsou to jednoduché heterocyklické sloučeniny s připojenou nitroskupinou, která je právě příjemcem jednoho či dvou elektronů, čímž se z ní stává nestabilní radikál. Oxidačně působící antibiotika jsou proléčiva, na aktivní látku se mění až po vstupu do buňky vlivem bakteriálních reduktáz. Některé vzniklé radikály se vyznačují vysokou afinitou především k DNA, což antibiotiku zaručuje rychlý baktericidní efekt (nitroimidazoly). Pro oxidačně působící antibiotika má zcela zásadní vliv přítomnost kyslíku, který je silným příjemcem elektronů, takže „vychytává“ volné elektrony nutné pro přeměnu proléčiva v aktivní formu léčiva. Z toho tedy vyplývá, že tato antibiotika účinkují pouze na anaerobní bakterie, některé látky však mají spektrum rozšířeno i o mikroaerofily a určité prvoky.

#### 1.3.5.1 Nitroimidazoly

Objev nitroimidazolů se datuje do 50. let minulého století a vzešel z potřeby léčby především přenosné infekce vyvolané bičenkou poševní *Trichomonas vaginalis*. Chemickou úpravou prvního nitroimidazolu azomycinu vznikl v roce 1959 **metronidazol**, který byl však dlouho využíván výhradně jako antiprotozoikum, k jeho zavedení do léčby bakteriálních infekcí došlo až v sedmdesátých letech zřejmě pro své úzké spektrum účinku. Metronidazol je v humánní medicíně jediným aktuálně registrovaným nitroimidazolem, pro veterinární účely jsou k dispozici i další látky, např. **ornidazol**.

Metronidazol má malou lipofilní molekulu, což mu usnadňuje vstup do buňky volnou difúzí. Po své redukci na vysoce aktivní nitroso-radikál, ke které vyžaduje silně anaerobní prostředí, ireverzibilně poškozuje chromatin, čímž je navozena buněčná smrt. K aktivaci proléčiva může dojít i u některých mikroaerofilních bakterií (helikobaktery) NADPH nitroreduktázou, podobným způsobem účinkují tyto látky i u prvoků. Nitroimidazoly jsou tedy látky

s baktericidním účinkem, který je dokonce rychlejší než účinek fluorochinolonů a závisí na dosažené koncentraci v buňce. Snadno proniká přes různé biologické bariéry, do tkání i sliznic, velmi dobře se vstřebává po perorálním podání, prostupuje i hemato-encefalickou bariérou, placentou a do mateřského mléka. Dokáže se koncentrovat v buňkách žaludeční sliznice, což je užitečné při boji s helikobaktery. Podobně účinkuje proti klostridiím ve střevě. Metronidazol je metabolizován v játrech, k jeho vyloučení z těla dochází převážně močí. Nitroimidazoly jsou potenciálně neurotoxické a je skloňována i jejich suspektní – byť neprokázaná kancerogenita.

Spektrum účinku metronidazolu je omezeno na anaerobní bakterie, z gramnegativních to jsou především rody *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Bilophila*, *Gardnerella*, k citlivým gramnegativům patří i *Helicobacter*. Z gramnegativních bakterií jsou to hlavně klostridia včetně *C. difficile* (v léčbě CDAD má spolu s vankomycinem výsadní postavení). Rezistentní jsou však streptokoky, aktinomycey, bifidobakteria a laktobacily. Dále je účinným antiprotozoikem.

Metronidazol se v monoterapii používá spíše pro svůj antiprotozoární efekt či při CDAD. Ostatní indikace zahrnují především smíšené infekce s grampozitivním nebo gramnegativním původcem, potom se kombinuje s látkou účinnou na danou populaci, a to nejčastěji s beta-laktamy a aminoglykosidy. Ve veterinární medicíně je zakázáno jeho využití v léčbě potravních zvířat. Aplikuje se pro řešení střevních anaerobních či protozoárních infekcí zejména u malých zvířat. Ornidazol se potom využívá hlavně k terapii (sportovních) holubů.

### 1.3.5.2 Nitrofurany

Mechanismus účinku nitrofuranů je velmi podobný účinku nitroimidazolů. Aktivní radikály nitrofuranů však vedle nukleových kyselin bakterií vážně poškozují i jejich ribozomy a enzymy katalyzující pro buňku nezbytné procesy. Nitrofurany jsou látky, jejichž podání má spoustu nevýhod, i přesto jsou ale v určitých indikacích využívány. Vysvětlení je prosté: neobyčejná odolnost vůči vzniku a šíření rezistence, a to i přes jejich historii jako stimulantů růstu v zemědělství. Jejich zákaz jako potravinových aditiv pro hospodářská zvířata v roce 1995 vzešel z obav možného karcinogenního účinku na člověka. Hlavní zástupci této skupiny jsou **nitrofurantoin**, **nifuroxazid** a **nifuratel**.

Spektrum účinku nitrofuranů zahrnuje kromě anaerobů i fakultativně anaerobní či mikroaerofilní bakterie jako jsou stafylokoky, streptokoky, enterokoky a některé enterobakterie (*E. coli*, salmonely, shigely, klebsiey), *H. pylori*. Rezistence je pozorována u rodů *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*. Nemají antiprotozoární účinek.

Nejvýznamnější zástupce nitrofuranů, nitrofurantoin, je vzhledem ke svým inoptimálním farmakokinetickým vlastnostem použitelný v podstatě výhradně k léčbě močových infekcí vyvolaných výše uvedenými citlivými bakteriemi. Stejně tak je i u malých zvířat využíván při infekcích močového ústrojí.

### 1.3.6 Inhibitory syntézy kyseliny listové

Mechanismus účinku některých antibiotik spočívá v narušení určitých, pro bakterie nezbytných, metabolických drah. Jednou takovou možností je inhibice syntézy kyseliny listové a jejích derivátů. Kyselina tetrahydrolistová bakteriím slouží jako koenzym, který přenáší mezi různými molekulami metylové, metenylové či formylové skupiny, což je nezbytné pro syntézu či degradaci některých aminokyselin, pro syntézu nukleotidů či molekul ATP, GTP a cAMP.

Bakterie obvykle syntetizují kyselinu tetrahydrolistovou postupnými kroky, které zahrnují sloučení bicycklického pterinu a kyseliny para-aminobenzoové (PABA) za vzniku kyseliny dihydropteroové. Tento krok je katalyzován enzymem dihydropteroát-syntetázou. Poté je ke kyselině dihydropteroové připojen glutamát, čímž vzniká kyselina dihydrolistová, která se na konec přijetím dvou elektronů mění na kyselinu tetrahydrolistovou.

Mezi inhibitory syntézy kyseliny listové řadíme **sulfonamidy** a **diaminopyrimidiny**.

Sulfonamidy působí jako kompetitivní inhibitory PABA, jejíž molekule se podobají, což jim umožňuje vazbu do aktivního místa enzymu dihydropteroát-syntetázy a bránit vzniku kyseliny dihydropteroové. Dále jsou schopny, ale velmi omezeně, bránit transformaci kyseliny dihydropteroové na kyselinu tetrahydrolistovou. Diaminopyrimidiny zahrnují antibiotika **trimetoprim**, antiparazitika pyrimetamin a cytostatika metotrexát. Tyto látky inhibují enzym dihydrofolát-reduktázu, protože napodobují pterinovou část molekuly kys. tetrahydrolistové.

**Sulfonamidy** jsou jedny z vůbec nejstarších látek, které byly použity k léčbě systémových bakteriálních infekcí. Nejde o přírodní produkty, ale látky plně syntetické, jsou to tedy původní chemoterapeutika. První sulfonamid (**sulfanylamid**) byl vytvořen již v roce 1908, aniž by byla odhalena jeho účinnost proti mikroorganismům, to až roku 1932 informoval německý lékař Gerhard Domagk o antibakteriálním působení látky sulfachrysoidinu, který byl o několik let později zaveden do klinické praxe pod názvem Prontosil. Brzy poté se dospělo k poznání, že Prontosil je vlastně proléčivem, které se v organismu aktivuje právě na sulfanylamid. Následovala intenzivní snaha o syntézu dalších sulfonamidů, některé z nich jsou používány i dnes.

Sulfonamidy zahrnují velké množství látek, které se kvůli své rozdílné chemické struktuře odlišují především svými farmakokinetickými vlastnostmi. Z toho důvodu je pro jejich řazení do skupin zohledňována hlavně vstřebatelnost z trávicího traktu, takže sulfonamidy můžeme dělit na ty s dobrou absorpcí z GITu (a tedy i se systémovým účinkem), na sulfonamidy, které po perorální aplikaci vstřebány nejsou a na sulfonamidy využívané k topické léčbě. Sulfonamidy se systémovým účinkem se dále odlišují na základě rychlosti jejich eliminace, a tedy na krátkodobě působící (podávané v 6-8hodinových intervalech), střednědobě působící (12hodinový interval podání) a dlouhodobě působící (24hodinový interval). Zvláštní případ potom představuje sulfadoxin aj., který je profylakticky a terapeuticky využíván proti malárii. Jeho biologický poločas rozpadu je 6 dní.

Antibakteriální účinek mají sulfonamidy statický, pomalu nastupující a závisící na délce podání. Postantibiotický efekt nemají.

Spektrum citlivých mikroorganismů je široké a zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie včetně některých hub a protozoí. Je potřeba zohlednit zásadní význam přítomnosti/nepřítomnosti PABA v růstovém médiu, což může zkreslit výsledky laboratorního stanovení citlivosti. Na druhou stranu při jejím nedostatku v bakteriologické půdě se mikrob může jevit vůči



sulfonamidům citlivý, ale v podmínkách *in vivo* je rezistentní, protože umí čerpat kyselinu listovou z okolního prostředí. Nepotencované sulfonamidy mají dobrou účinnost vůči grampozitivním bakteriím, zejména kokům. Z tyčinek na *Bacillus* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *L. monocytogenes*, *Nocardia* spp. Z gramnegativů jsou citlivé brucele a chlamydie. Vzhledem k velkému rozšíření získané rezistence je před jejich nasazením potřeba vyšetřit citlivost zejména u stafylokoků, enterokoků, enterobakterií a pasterel. Často rezistentní bývají také klostridia. Přírozenou rezistenci popisujeme u kampylobakterů, spirochet, *P. aeruginosa* u mykoplazmat, mykobakterií, ricketsií a anaplasmat. K citlivým protozoím řadíme *Pneumocystis carinii*, *T. gondii* a *Cryptosporidium* spp.

Konkrétní využití ve veterinární medicíně zahrnuje především léčbu močových infekcí a kolitid u malých i hospodářských zvířat. Nejčastěji jsou ovšem sulfonamidy používány k prevenci a terapii kokcidiózy drůbeže a králíků.

**Trimetoprim** se příliš nepoužívá k monoterapii, své nezastupitelné místo má ale v kombinaci se sulfonamidy, potom hovoříme o tzv. potencovaných sulfonamidech, z nichž nejznámější je kombinace sulfametoxazolu s trimetoprimem (**ko-trimoxazol**). Potencováním sulfonamidů je dosaženo nejenom rozšíření jejich spektra, takže výše uvedené bakterie v kategorii variabilně citlivých vůči samotným sulfonamidům jsou dobře citlivé (Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae). Ko-trimoxazol má ale také vůči řadě mikrobů účinek baktericidní, nikoliv bakteriostatický, jako je tomu u samotných sulfonamidů. Další kombinace sulfonamidů s diaziny zahrnují např.: sulfadiazin a trimetoprim (ko-trimazin), sulfafurazol a trimetoprim, sulfamerazin a trimetoprim, sulfadimidin a trimetoprim, sulfachlorpyridazin a trimetoprim, sulfadimidin a diaverdin atd.

Konkrétní využití potencovaných sulfonamidů zahrnuje infekce GITu, respiračního a urogenitálního traktu především u mláďat malých i hospodářských zvířat a kokcidiózy drůbeže a králíků. Některé kombinace lze využít k medikaci krmiva určeného rybám.

**Tabulka č. 6: Rozdělení sulfonamidů**

Místo účinku	Trvání účinku	Látka
Systémový účinek	Krátkodobé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfadimidin</li> <li>• Sulfoxazol</li> <li>• Sulfapyridin</li> <li>• Sulfanilamid</li> <li>• Sulfasalazin</li> </ul>
	Střednědobé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfametoxazol</li> <li>• Sulfadiazin</li> </ul>
	Dlouhodobé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfametyldiazin</li> <li>• Sulametyldiazin</li> </ul>

	Velmi dlouhé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfadoxin</li> </ul>
GIT		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfaguanidin</li> <li>• Ftalylsulfathiazol</li> <li>• Sulfasalazin</li> </ul>
Lokální účinek		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfathiazol</li> <li>• Argent-sulfadiazin</li> </ul>

## Seznam použité literatury:

- Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Intern J Antimicrob Agents* 2000; 16: 5-15.
- Beneš J. *Antibiotika, systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018.
- Beneš J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009.
- Beneš J. Počátky antibiotické éry a některé důsledky pro dnešní dobu. *Klin Mikrobiol Inf Léč* 2012; 18 (5): 142-9.
- Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, et al. Colistin; an update on the antibiotics of the 21<sup>st</sup> century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10 (8): 917-34.
- Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (5): 327-41.
- CLSI: <https://clsi.org/standards/>.
- Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 (1): 160-201.
- Goering RV, Dockrell HM, Zuckerman M, a kol. *Mimsova Lékařská mikrobiologie, 5. vydání*. Praha: Triton, 2016.
- Jindrák V, Hedlová D, Urbášková P a kol. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha: Mladá fronta a.s., 2014.
- Kacířová I, Grundmann M. Terapeutické monitorování vankomycinu v rutinní klinické praxi. *Vnitř Léč* 2014; 60 (10): 846-51.
- Kacířová I, Grundmann M. Terapeutické monitorování amikacinu a gentamicinu v rutinní klinické praxi. *Vnitř Léč* 2015; 61 (1): 33-41.
- Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23 (4): 791-815.
- Lochmann O. *Stručný průvodce léčbou antibiotiky a chemoterapeutiky, 2. vydání*. Praha: Comdes, 1998.
- Modr Z. *Antibiotika a chemoterapeutika. Stručný přehled pro praxi*. Praha: Lek Pharma, 1995.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32 (2): 234-58.
- Sechser T. Farmakokinetika pro lékaře. Část I. *Remedia* 1991; (1) 5-6:227-9.
- Sechser T. Farmakokinetika pro lékaře. Část II – Clearance. *Remedia* 1992; 2 (1) 42-6.
- Sharma KK, Sangraula H, Mediratta PK. Some new concepts in antibacterial drug therapy. *Ind J Pharmacol* 2002; 34: 390-6.

- Stevens DL. The role of vancomycin in the treatment paradigm. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (Suppl 1): S51-7.
- Subkomise pro antibiotickou politiku ČLS JEP (SKAP). Makrolidy a azalidy. *Prakt lék* 2016; 96 (4): 166-78.
- Šimůnek J, Smola J. *Antibiotika, sulfonamidy a chinolony ve veterinární medicíně*. Tišnov: LAST Steinhauser, 1998.
- Štefan M. *Antibiotika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2019.
- Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. *Aktuálně registrované VLP*. <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-ulp/seznam-ulp/aktualne-registrovane-ulp>
- Votava M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001.
- Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GK. Subinhibitory antimicrobial concentrations: A review of in vitro and in vivo data. *Can J Infect Dis* 1992; 3 (4): 193-201.

## 2. Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám

### 2.1 Úvod do problematiky

Antimikrobiální rezistence je jedním z nejzávažnějších jevů, které negativně ovlivňují zdraví lidské populace, a proto je studium epidemiologie a prevalence rezistentních mikroorganismů středem zájmu mikrobiologů po celém světě. Všeobecně přijímaným názorem je, že se na vzniku a šíření antimikrobiální rezistence podepsalo neuvážené používání antibiotik jak pro účely humánní, tak veterinární medicíny společně s jejich využíváním jako stimulantů růstu hospodářských zvířat. Celosvětové zvyšování morbidity a mortality v důsledku infekčních onemocnění, vyvolaných rezistentními či dokonce multirezistentními mikroorganismy, rezultovalo v zavedení mezinárodních opatření k omezení šíření tohoto nebezpečného fenoménu. Konkrétní kroky sestávaly zejména ve formulaci a prosazení nových preskripčních strategií ke snížení výskytu rezistencí v nemocničních prostředích. Na území Evropské Unie bylo dále od roku 2006 zakázáno používání antibiotických stimulantů růstu hospodářských zvířat v zemědělství.

Objev antibiotik byl zcela nepochybně jedním z historicky nejvýznamnějších momentů dvacátého století. Mnohem větším překvapením se však ukázala až „zázračná“ schopnost mikroorganismů bránit se účinkům těchto látek pestrou paletou obranných mechanismů. Dokonce první zprávy o výskytu rezistentních bakterií byly zveřejněny brzy po objevení penicilinu. Už Alexander Fleming v roce 1946 (sic!) uvedl: “There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by in some way acquiring fastness.” Nicméně tato první varování byla ignorována, na léčbu infekcí způsobených rezistentními bakteriemi byla jednoduše použita antibiotika jiná, nově vyvinutá.

Nadměrné i nesprávné používání antibiotik od počátků jejich existence poskytlo bakteriím jedinečnou možnost zapojit jejich neobyčejně bohatou genetickou kapacitu k zajištění odolnosti vůči takřka veškerým skupinám antimikrobiálních substancí, které kdy byly zavedeny do klinické humánní a veterinární praxe, nebo které byly využity pro účely zemědělství. Celou řadu látek s antimikrobiálním účinkem, které byly v minulosti efektivně používány k léčbě infekcí, tak nelze v současnosti použít v důsledku přenosu rezistence mezi bakteriemi horizontálním transferem genů nebo kvůli rezistenci vzniklé spontánní mutací.

V kontextu aktuálních informací je takřka nemožné si představit možnost kompletní obnovy inhibičního účinku dnes známých antibiotik na mikroorganismy. Také je stále obtížnější a v neposlední řadě ekonomicky nevýhodnější vyvíjet nové substance, vůči kterým vznikají rezistence se stále větší rychlostí. Někteří autoři se domnívají, že klíčem k obnovení možnosti úspěšné terapeutické aplikace antibiotik, je pochopení role environmentálního mikrobiomu na vzniku a uchování fenoménu bakteriální rezistence.

Za zvláště alarmující je považováno šíření bakterií rezistentních k antibiotikům vyčleněným pro léčbu život ohrožujících infekcí člověka, jako jsou beta-laktamy (zejména cefalosporiny vyšších generací a karbapenemy) a fluorované chinolony. Selektivní tlak vyvolaný nadužíváním a nesprávným podáváním těchto významných skupin antibiotik vedl v posledních dvaceti letech k rozšíření například bakterií produkujících širokospektré beta-laktamázy

(**ESBL**; Extended-spectrum Beta-lactamases) a bakterií s plazmidově kódovanými geny rezistence k chinolonům (**PMQR** geny; Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes). Recentní publikace informují už i o společném přenosu genů kódujících širokospektré beta-laktamázy a PMQR genů. Tato kombinaci genů rezistence byla prokázána dokonce u *E. coli* izolovaných z masa, což poukazuje na možnost kontaminace potravního řetězce člověka.

U mnoha bakterií pozorujeme odolnost vůči některým skupinám či jednotlivým antimikrobiálním látkám, které mají základ v morfologických či fyziologických vlastnostech mikroba. Tento jev označujeme za **přirozenou (inherentní) rezistenci**. Klasicky uváděným příkladem je přirozená rezistence mykoplazmat vůči beta-laktamům (a dalším stěnovým antibiotikům), mykoplazmata tvoří buněčnou stěnu, podstatou jejich rezistence je tedy absence cílové struktury. Dalšími příklady jsou rezistence gram pozitivů ke kolistinu pro absenci zevní buněčné membrány, rezistence anaerobů k aminoglykosidům (absence aerobních transportních systémů), rezistence gram negativů ke glykopeptidům kvůli velikosti jejich molekuly atd. Mezi případy inherentní rezistence lze řadit i přirozenou produkci některých beta-laktamáz, nebo zabránění vstupu antibiotika do bakterie či také aktivní odčerpání antimikrobik z buněk přirozeně se vyskytujícími efluxními pumpami. Výčet přirozených rezistencí u jednotlivých skupin/druhů bakterií uvádí na svých webových stránkách Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (**ECDC**, European Center on Disease Prevention and Control).

Rezistenci, kterou si bakterie vyvinuly až po kontaktu s antibiotikem, označujeme za **rezistenci získanou**. **Mechanismy rezistence**, které mikroby využívají proti antibiotikům, mohou spočívat buď v působení na danou substanci, nebo je jejich podstatou ovlivnění cílových struktur, na které antibiotika účinkují.

- **Tvorba inaktivujících enzymů.** Bakterie využívají inaktivující enzymy dvěma možnými způsoby. Za prvé, enzymy molekuly antibiotika štěpí (typicky beta-laktamázy), nebo naruší jeho aktivitu připojením postranních skupin (acetylace, adenylace, fosforylace aminoglykosidů). Tento způsob rezistence je mezi patogenními bakteriemi značně rozšířen, k docílení výsledku totiž stačí produkovat i malé množství enzymu, které zvládne poškodit i velké množství molekul antibiotika. Produkce inaktivujících enzymů je doménou takřka výhradně gramnegativních bakterií, což úzce souvisí se stavbou jejich stěny. K přenosu tohoto typu odolnosti dochází poměrně snadno, protože inaktivující enzymy mohou být často kódovány pouze jedním genem. Nevýhodou tohoto mechanismu rezistence je jeho zranitelnost, některé enzymy lze totiž snadno poškodit podáním falešných substrátů, které zablokují jejich aktivní místo. Takto fungují např. inhibitory beta-laktamáz, které se samy vyznačují jen minimálním antimikrobiálním účinkem, ale ovlivňují právě činnost těchto enzymů.
- **Zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu (čili omezení vstupu do buňky).** Zamezení přístupu antibiotikům k místu jejich účinku je možné na více úrovních, první překážku může představovat už pouzdro či hlen (u bakterií formujících biofilm). Dále lze bránit vstupu prostřednictvím zevní membrány, která je přítomna pouze u gramnegativních bakterií a obsahuje poriny, jimiž dochází k výměně molekul s vnějším prostředím a které také využívají některé antimikrobiální substance k penetraci do nitra bakterie. Změnou vlastností určitých porinů mikroby vstupu antibiotika zabrání (velmi rozšířené u pseudomonád). Tato změna však může nakonec pro bakterie představovat

nevýhodu, pokud touto cestou přijímají různé substráty nezbytné pro jejich metabolismus. Klony bakterií s tímto mechanismem účinku mohou být oproti jiným klonům znevýhodněny, což zdůvodňuje, proč (a pro svoji komplexnost) se tento druh rezistence tolik nešíří. Také cytoplazmatická membrána může figurovat jako překážka, zejména pro ty látky, které využívají k jejímu překonání aktivních transportních systémů bakterie. Mikrob může práci těchto systémů omezit či ukončit, což ale vyžaduje, aby tyto systémy nezajišťovaly životně důležité procesy.

- **Změna (modifikace) cílového místa.** Modifikací vlastních struktur, kde dochází k vazbě antibiotika, bakterie účinně zabrání svému poškození. Takto bakterie transformují třeba enzymy, ribozomy, prekurzory peptidoglykanu nebo stavební prvky buněčné membrány. Metylace ribozomů byla popsána u streptokoků, čímž je zabráněno vazbě a účinku makrolidů, linkosamidů a streptograminu. Bodové mutace genů pro topoizomerázu zase některým mikrobům uděluje rezistenci k fluorochinolonům. Jde-li o drobné modifikace v bakteriální morfologii způsobené jednoduchou mutací kódujícího genu, je tento mechanismus snadno horizontálně přenosný. Pokud však mikrob pozmění nějaký komplexní děj, např. metabolickou dráhu, je tento jev v populaci bakterií přenosný jen obtížně.
- **Aktivní transport antibiotika z buňky.** Bakterie mají ve své výbavě různé typy systémů, kterými z buňky aktivně odstraňují škodlivé metabolity a toxiny. Jsou tedy schopny touto cestou eliminovat také proniknuvší antimikrobiální substance. Efluxních pump bakterie rády využívají k odčerpání chinolonů, tetracyklinů či makrolidů. Ochrana bakterií touto cestou však není stoprocentní, pumpy obvykle nedokážou odstranit veškerá antibiotika a jejich účinnost je limitovaná. Známe celkem pět různých skupin efluxních systémů, které označujeme jako rodiny: **ABC** (ATP-binding Cassette Superfamily), **MATE** (Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family), **MFS** (Major Facilitator Superfamily), **SMR** (Small Multidrug Resistance Family) a **RND** (Resistance/Nodulation/Division Superfamily). Grampozitivy nejčastěji využívají systémy MATE a MFS, gramnegativy zase RND. Podobně jako je to s poriny, i při modifikaci aktivního transportu pro eliminaci antibiotik jsou rezistentní klony bakterií v nevýhodném postavení. Zmizí-li selekční tlak, mikrob se tohoto mechanismu může zbavit.
- **Zapojení alternativní metabolické dráhy.** Dojde-li účinkem antibiotik k zablokování nějaké významné metabolické dráhy, mohou si bakterie vytvořit dráhu jinou a tuto blokádu obejít. Typickým příkladem je schopnost enterokoků, kterým sulfonamidy zabrání syntetizovat kyselinu tetrahydrolistovou, naučit se jejímu čerpání z okolního prostředí.
- **Vytvoření nadbytku cílových míst.** Některé bakterie umí prostřednictvím mutace regulátorových genů tvořit nadbytek určitých produktů, např. enzymů, které jsou účinkem antibiotik inaktivovány. Zesílení peptidoglykanové vrstvy stafylokoků je zase podstatou jejich intermediální citlivosti k vankomycinu. Alternativou jsou tzv. molekulární

mimikry, kterými bakterie nastraží past na antibiotika a skutečné cílové struktury tak zůstávají ochráněny (produkce zvláštních peptidů imitujících molekulu DNA u mykobakterií umožňující rezistenci k fluorochinolonům).

Všechny výše uvedené mechanismy jsou pochopitelně podmíněné geneticky a jsou-li pro bakterie výhodné, mikroby mají snahu tyto genetické informace uchovat a předávat následujícím generacím, hovoříme tedy o **klonálním šíření** neboli o **přenosu vertikálním**. Bakterie si ale mohou geny přenášet také mezi sebou navzájem, a to dokonce mezi buňkami patřícími do různých klonů, druhů, rodů nebo i vyšších taxonomických jednotek, což potom označujeme za **přenos horizontální**.

Horizontální přenos genetické informace může proběhnout třemi základními způsoby, jsou to **transformace, transdukce a konjugace**.

- **Transformací** rozumíme čerpání DNA z bezprostředního okolí bakterie, zdrojem jsou obvykle jiné uhynulé mikroorganismy a není podmínkou příslušnost ke stejnému druhu. Bakterie získávají touto cestou stavební materiál pro syntézu nové vlastní DNA.
- **Transdukce** je proces přenosu fragmentů DNA mezi bakteriemi prostřednictvím bakteriálních virů, tzv. bakteriofágů. Velikost transdukované informace závisí na velikosti jednotlivých bakteriofágů.
- **Konjugace** je potom přímý přenos genetické informace mezi dvěma buňkami, donorovou a recipientní za pomoci tzv. sex pilusů, specializovaných výběžků cytoplazmy. Tento proces chápeme jako analogii pohlavního rozmnožování na bakteriální úrovni.

Horizontálním přenosem dochází k předávání tzv. **mobilních genetických elementů**, kam řadíme **plazmidy, transpozony, integrony a genové kazety**.

- **Plazmidy** jsou malé cirkulární úseky DNA, obvykle lokalizované extrachromozomálně volně v cytoplasmě buněk. Často jsou přítomny ve více kopiích a nesou jeden či několik genů pro mikroba zbytných, ale kódujících vlastnosti udělující mu určité výhody, např. právě schopnost rezistence či virulence. Jsou schopny autonomní replikace nezávislé na centrálním chromozomu a jejich velikost je různá, v rozmezí 1-400 tisíců párů bází. U některých plazmidů popisujeme jev zvaný inkompatibilita, který označuje nemožnost současné existence dvou podobných plazmidů v jedné buňce. Vysvětlení spočívá v tom, že plazmidy stejné skupiny inkompatibility využívají ke své replikaci totožný mechanismus kontroly replikace. Jinak je také můžeme označit za plazmidy replikačně omezené, potom existují v buňce v jedné kopii, známé jsou ale také plazmidy tzv. replikačně neomezené, ty pak mohou být v buňce přítomny v mnoha kopiích. Nejznámější typy plazmidů jsou: F-plazmidy (fertilní, umožňující konjugaci), R-plazmidy (nesoucí geny rezistence), Col-plazmidy (kódující tvorbu bakteriocinů kolicinů), degradativní plazmidy (kódující schopnost biologické degradace určitých substrátů), plazmidy asociované s virulencí a další.



- **Transpozony** představují nestabilní sekvence DNA, které mají schopnost se vyštěpit ze své pozice, přemístit se na jiné místo a tam se opět do DNA začlenit. V některých literárních zdrojích jsou uváděny pod pojmem „skákájící“ geny. Transpozony se nestěhují pouze uvnitř chromozomální DNA, umí se pohybovat i mezi chromozomem a plazmidy. Dojde-li však k jejich transpozici z plazmidu do chromozomu, zůstávají trvalou součástí genomu bakterie. Jejich velikost se pohybuje v řádů stovek až desítek tisíc párů bází a podle velikosti je dělíme na **složené transpozony**, **inzerční sekvence** a **Tn3 elementy**. Jejich pohyb napříč genomem bakterie umožňuje enzym transpozáza. Složené transpozony jsou vlastně dvě inzerční sekvence, mezi nimiž je lokalizována další DNA, často obsahující geny rezistence. Tímto je vlastně původně nepohyblivé části nukleové kyseliny (např. s geny rezistence či virulence) udělena schopnost pohybu. Inzerční sekvence jsou úseky DNA, které tvoří pouze gen pro transpozázu ohraničený po obou koncích krátkými identickými sekvencemi, tzv. obrácenými koncovými repeticemi. Tn3 elementy jsou potom větší úseky DNA nesoucí geny pro transpozázu a revolvázu a gen pro rezistenci k beta-laktamům (*bla*).
- **Integrony a genové kazety**. Genové kazety představují nejmenší mobilní genetické elementy, které však nejsou schopny vlastního přenosu, a navíc postrádají promotor nutný pro expresi genů, které jsou na nich umístěny. Tato exprese je potom možná až po jejich začlenění do integronu, což je větší úsek DNA, který kromě promotoru nese gen pro integrázu, což je enzym umožňující právě začlenění genových kazet do struktury integronu. V současnosti je známo celkem pět různých tříd integronů, které členíme dle typu integráz a genových kazet.

Vzhledem k tomu, že horizontálním přenosem může dojít k předání genů rezistence napříč bakteriálním spektrem, ne pouze z mateřské generace bakterií na dceřinou, jde o jev mnohem nebezpečnější, než představuje šíření klonální. O tom, jak rychle proniká daný typ rezistence do bakteriální populace rozhoduje mimo jiné i to, jak složitě je kódován. Pro některé mechanismy rezistence stačí bakterii vlastnit pouze jediný gen, např. pro produkci inaktivujícího enzymu, pro jiné musí mít mikrob takových genů mnohem více (kódování celé metabolické dráhy), což pro něj představuje větší energetickou zátěž, jež ho může znevýhodnit vůči jiným klonům svého druhu. Z toho vyplývá, že jednoduše kódované rezistence budou přenášeny snadněji, častěji a rychleji než ty náročnější. Ani jednodušší mechanismy rezistence ale nemusí pro bakterii automaticky znamenat jednoznačný benefit. Exprese takového genu totiž postrádá regulační mechanismy (regulační geny) a mikrob ho může tvořit v nadbytku, což pro něj opět představuje větší energetickou zátěž. Bakterie se naučily tento problém řešit různě. Jedna možnost spočívá ve společném přenosu genů rezistence s geny regulačními. To vede k tzv. **inducibilní rezistenci**, takže k aktivaci genu dochází až v prostředí obsahujícím dané antibiotikum (tzv. induktor), jinak se gen nepřepisuje. Bakterie může ale zvolit i možnost lokalizace genů rezistence na plazmidech, kde sice budou exprimovány trvale (**rezistence konstitutivní**), v případě potřeby je však mikrob může odstranit.

Velké riziko pro zdraví člověka a zvířat představuje zejména fenomén **multirezistence**, **extenzivní rezistence** a **panrezistence**. Bakterie si totiž vypěstovaly schopnost sdružovat geny rezistence pohromadě vedle sebe na molekule DNA (tedy do genových kazet) a tyto úseky také

společně přenášet. Multirezistence (**MDR**, Multidrug Resistance) je definována jako necitlivost k nejméně jednomu antibiotiku ze tří a více skupin. Extenzivní rezistence (**XDR**, Extensive Drug Resistance) znamená necitlivost nejméně k jedné látce ze všech skupin antibiotik (až na jednu či dvě skupiny). Panrezistenci (**PDR**, Pandrug Resistance) potom rozumíme necitlivost ke všem substancím ze všech skupin antibiotik.

## 2.2 Metody průkazu antibiotické rezistence

Jednou z neoddiskutovatelných podmínek pro dodržení správné antibiotické praxe je cílená antibiotická léčba, tedy nasazení účinného antibiotika proti citlivému mikroorganismu. Narůstající rezistence, jak je celosvětově pozorována, je však důkazem nerespektování této zásady. Stanovení citlivosti bakterií je obzvláště důležité u původců charakteristických sníženou citlivostí, a hlavně u původců nozokomiálních infekcí, kde je nasazení antimikrobiální terapie bez předchozí identifikace citlivosti hrubou chybou. Dalším pochybením se jeví být aplikace antibiotik se širokým spektrem účinku při takových infekcích, kde lze s úspěchem podat antimikrobika úzkospektrá či nižších generací. Podávání antibiotik při nekomplikovaných infekcích virové etiologie je potom už jen dokladem absolutního nepochopení fenoménu antibiotické rezistence.

Vzhledem k tomu, že u řady bakterií víme, k jakým substancím jsou přirozeně rezistentní, nebo naopak vůči kterým látkám se vyznačují spolehlivou citlivostí, můžeme u nich i bez laboratorního vyšetření citlivosti vědět, která látka bude klinicky účinná a která nikoliv. Takovým příkladem je třeba dobrá citlivost řady streptokoků k penicilinu, nebo rezistence gram pozitivů ke kolistinu. Na druhou stranu se u mnoha dalších bakterií bez stanovení citlivosti neobejdeme kvůli masivnímu rozšíření získané rezistence (tetracykliny, makrolidy). Je tedy zřejmé, jak je důležitá správná identifikace původce onemocnění následovaná laboratorním průkazem jeho citlivosti k antibiotikům. V neposlední řadě je dále nutná správná interpretace dosažených výsledků.

Pro účely klinické léčby je obvykle citlivost identifikována na základě posouzení fenotypu rezistence. Identifikace genů rezistence metodou PCR, eventuálně podrobnější analýza genomu původce celogenomovým sekvenováním, je využívána zejména pro účely epidemiologických analýz či jako součást výzkumných aktivit.

Vyšetření citlivosti mikroorganismů je možné provést různými postupy, jejichž podstatou je zjištění schopnosti růstu bakteriální kultury v přítomnosti antibiotické substance. Všechny metodiky jsou vypracovány, upravovány a aktualizovány nadnárodními i národními autoritami, jako jsou **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute), **EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), **NRL SZÚ** (Národní referenční laboratoř pro antibiotika Státního zdravotního ústavu), a **NRL SVS ČR** (Národní referenční laboratoř pro antimikrobiální rezistenci Státní veterinární správy České republiky).

V rutinní praxi mikrobiologických laboratoří se užívají metody identifikující citlivost dobře kultivovatelných bakterií semikvantitativně **diskovým difúzním testem** (DDT), který řadíme mezi tzv. **metody difúzní**. Citlivost či rezistence je stanovena na základě inhibice růstu mikroba v okolí disků nasycených konkrétními antibiotickými substancemi, kdy u citlivé kultury dochází kolem disku s účinnou látkou k vytvoření inhibiční zóny. Při dodržení postupů

uvedených v metodikách laboratorních autorit, které ošetřují kvalitu kultivačního média, velikost inokula a kultivační podmínky, lze z průměrů inhibičních zón odvodit míru citlivosti vyšetřovaného mikroorganismu. Konkrétní údaje s průměry inhibičních zón, které jsou podkladem pro zařazení do jednotlivých kategorií citlivosti, udávají metodické návody CLSI a EUCAST.

U obtížně kultivovatelných bakterií, anaerobů či bakterií se specifickými kultivačními nároky, nebo tam, kde je vyžadováno citlivost přesně kvantifikovat, se volí k identifikaci citlivosti mikroorganismů tzv. metody **diluční**. Jejich výstupem je určení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnižší koncentrace antibiotika (mg/l, µg/ml), která účinně inhibuje růst bakteriální kultury v podmínkách *in vitro*. Pokud je laboratorně stanovená hodnota MIC vyšší, než je koncentrace teoreticky dosahovaná v jednotlivých tělesných kompartmentech po podání tohoto antibiotika v terapeutické dávce, je logicky mikroorganismus k této látce rezistentní. Existuje několik variant dilučních přístupů, zejména metoda zředování antibiotika v agaru (**agarová diluční metoda**) či metoda zředování antibiotika v bujónu (**diluční mikrometoda**), která je považována za zlatý standard pro stanovení MIC. Při této metodě je test prováděn v jamkách mikrotitrační destičky, kde je do živného bujónu přidávána testovaná substance tak, že tvoří řadu klesajících koncentrací. Medikované médium je následně zaočkováno standardizovaným inokulem testované kultury. Po inkubaci je odečtena MIC v jamce s nejnižší koncentrací antibiotika, která zabránila vzniku zákalu, tedy růstu mikroorganismu. Protože se v jamce s inhibovaným růstem kultury mohou nacházet bakterie nedostatečně devitalizované, lze stanovit dodatečně minimální baktericidní koncentraci (MBC). Ta je odečtena po vyočkování jamek s inhibicí růstu na živný agar. K vyšetření MIC lze také použít **test s gradientem antibiotika** (např. E-test), kdy se na agarovou plotnu s inokulem vyšetřovaného mikroorganismu klade proužek papíru, který je nasycen vzrůstající koncentrací jednoho antibiotika.

Některé (komerční) diagnostické laboratoře disponují **automatizovanými systémy**, které umožňují stanovit MIC antibiotika v řádu několika hodin po odběru vzorků.

Pro **cílený průkaz rezistence** u významných skupin mikroorganismů byly zavedeny další postupy, jejichž podstatou je modifikace výše uvedených metod. Jinak řečeno, určitou modifikací, či rozšířením difúzních a dilučních metod lze identifikovat významné fenotypy rezistence, jakými jsou například ESBL či AmpC fenotyp. V případě těchto fenotypů totiž mohou klasické metody stanovení citlivosti (DDT, bujónový mikrodiluční test) selhat. Pro základní screening producentů ESBL lze díky inhibici jejich hydrolytického účinku kyselinou klavulanovou využít výsledky vyšetření citlivosti diskovým difúzním testem, nebo hodnoty MIC indikátorových beta-laktamových antibiotik. Suspektním producentem ESBL je izolát (platí pro vybrané enterobakterie včetně *E. coli*), u nějž alespoň jedna indikátorová substance spadá do hodnot odpovídajících rezistenci.

Ke confirmaci potenciálních producentů ESBL lze využít metodu s názvem **Double Disc Synergy Test (DDST)**, kdy je využíváno vzniku deformovaných inhibičních zón mezi antibiotickými disky s cefalosporiny (aztreonamem) a diskem s amoxicilinem potencovaným kyselinou klavulanovou. Vlastní test vyžaduje použití Mueller-Hintonova agaru a vzdálenost mezi disky by měla být v rozsahu 20-30 mm mezi středy. Příprava inokula pro potřeby DDST odpovídá postupu při diskovém difúzním testu. ESBL pozitivní bakterie se vyznačují zvětšením inhibiční zóny specifického tvaru (zátká od sektu) na straně sousedící s ko-amoxicilinovým

diskem. Za producenta ESBL je považován izolát s deformací inhibiční zóny kolem alespoň jednoho z indikátorových antibiotik (aztreonam, cefotaxim, ceftazidim), viz obrázek č.1.

**Obrázek č.1: Double disc synergy test s izolátem *E. coli* původem z racka. Pozitivní výsledek nasvědčující produkci širokospektrých beta-laktamáz.**



**Zdroj:** MVDr. Masaříková, zhotoveno 3.5.2017

Další možností potvrzení potenciálních producentů ESBL je tzv. **Konfirmační metoda CLSI**, kdy se výsledku dosáhne porovnáním průměrů inhibičních zón vytvořených okolo disků s určitým cefalosporinem a okolo disku obsahujícího kombinaci totožného cefalosporinu potencionovaného kyselinou klavulanovou (např. ceftazidim a ceftazidim s kyselinou klavulanovou) na povrchu inokulovaného Mueller-Hintonova agaru. Izolát je identifikován jako producent ESBL tehdy, přesáhne-li rozdíl průměru inhibiční zóny s potencionovaným cefalosporinem průměr inhibiční zóny s prostým cefalosporinem alespoň o pět milimetrů.

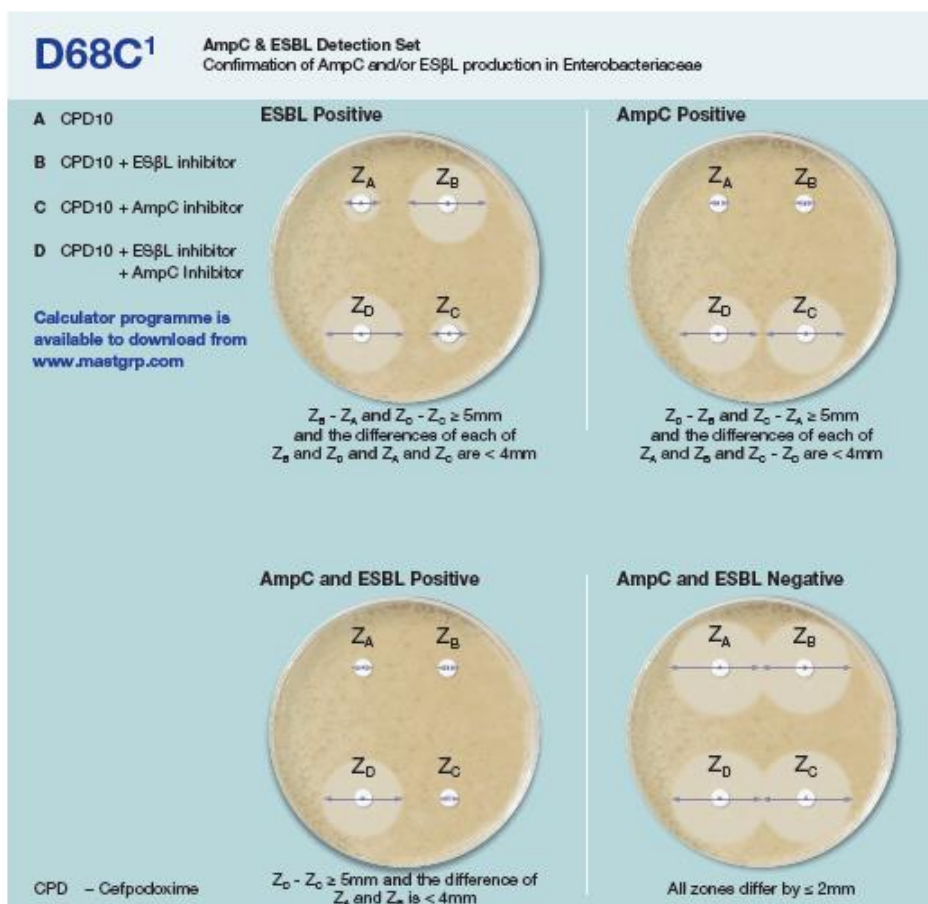
Vedle diagnostikování producentů širokospektrých beta-laktamáz je velmi důležitý také screening producentů beta-laktamáz typu AmpC. Nicméně velkou komplikací správné laboratorní diagnózy je *in vitro* citlivost inducibilních producentů AmpC beta-laktamáz k cefalosporinům III. generace. Jedním z možných řešení je modifikace DDST za použití **silných induktorů AmpC beta-laktamáz**, jimiž jsou kys. klavulanová, imipenem či cefoxitin. Tato indukce je charakteristická antagonismem mezi diskem s induktorem a diskem s cefalosporiny III. generace, což se projeví deformací inhibiční zóny v podobě jejího zúžení do podoby písmene D na přivrácené straně substrátového disku s cefalosporinem III. generace.

Pokud enterobakterie produkují AmpC a současně i ESBL, může zůstat ESBL fenotyp skryt. Pro průkaz ESBL je tedy nutno produkci AmpC inhibovat. Toho lze dosáhnout na příklad použitím Mueller-Hintonova agaru s přidáním oxacilinu v koncentraci 128 mg/l a dále postupovat jako při tradičním DDST, nebo lze srovnat průměr inhibičních zón s průměrem

inhibičních zón na Mueller-Hintonova agaru bez přídavku oxacilinu. Pokud je průměr zón větší na agaru s oxacilinem, jde o společnou produkci ESBL i AmpC beta-laktamáz.

Identifikace koproducentů ESBL a AmpC beta-laktamáz mezi bakteriemi čeledi Enterobacteriaceae je možná také prostřednictvím komerčně dostupných diagnostických souprav, které jsou jednoduše použitelné i v podmínkách řadových diagnostických laboratoří. Jednou z těchto souprav je tzv. Mastdisc™ combi ESBL & AmpC Detection Disc Set, kde jsou výsledky odečteny na základě komparace šířek inhibičních zón v okolí antibiotických disků obsahujících samotný cefpodoxim a disků nasycených cefpodoximem společně s inhibitory producentů ESBL či/a AmpC enzymů. Disky jsou kladeny na Mueller-Hintonova agar inokulovaný vyšetřovaným kmenem připraveným shodně s diskovým difúzním testem a odečítány po 24-hodinové inkubaci. Interpretaci výsledků dokumentuje obrázek č.2.

**Obrázek č.2: Interpretace výsledků dosažených diagnostickou soupravou Mastdisc™ combi ESBL & AmpC Detection Disc Set**



**Zdroj:** Mastgroup Ltd., VB. Dostupné z: [http://www.mastgrp.com/catalogue\\_products\\_full-details.asp?SubProduct\\_Type=12066&cat=1&product=D68C](http://www.mastgrp.com/catalogue_products_full-details.asp?SubProduct_Type=12066&cat=1&product=D68C)

## 2.3 Mechanismy rezistence k nejvýznamnějším skupinám antibiotik

Rezistence bakterií je ve své podstatě odpovědí na chování antibiotik a úzce souvisí se způsobem jejich vstupu do buňky a jaké struktury ohrožují. Mikroorganismus se většinou neomezuje pouze na jeden mechanismu rezistence, obvykle jich uplatňuje několik současně.

### 2.3.1 Mechanismy rezistence k beta-laktamům

Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům se uskutečňuje několika mechanismy: **omezením jejich vstupu do buňky, aktivním odčerpáváním antibiotika z buňky, modifikací cílových struktur a enzymatickým štěpením**. Tyto mechanismy se mohou u bakterií vyskytovat jak přirozeně, tak si je mohou osvojit horizontální akvizicí od jiných mikroorganismů.

Na prvním místě četnosti je rozhodně produkce inhibujících enzymů, tzv. beta-laktamáz, ty jsou však doménou takřka pouze gramnegativních bakterií, z grampozitivů byla jejich produkce popsána pouze u stafylokoků. Tvorba beta-laktamáz je pro gramnegativní bakterie díky stavbě jejich stěny výhodná, mohou totiž prostřednictvím zevní membrány tyto enzymy uzavřít v periplazmatickém prostoru (kde dochází k vazbě beta-laktamů na transpeptidázy), takže jednak neunikají mimo buňku, a navíc je k optimálnímu efektu nepotřebují tvořit v nijak velkém množství.

Gramnegativní bakterie dále mohou modifikovat poriny inkorporované do zevní membrány, což omezí, nebo dokonce zabráni vstupu antimikrobika do nitra buňky. I toto je mechanismus, který kvůli absenci zevní membrány nemohou využívat grampozitivní mikroorganismy. Odčerpávání beta-laktamů z buňky efluxními pumpami probíhá u obou skupin bakterií, jen za zapojení poněkud odlišných rodin efluxních systémů: gramnegativní bakterie nejčastěji využívají systémy RND, grampozitivní zase upřednostňují rodiny MATE a MFS. Modifikace cíle, kdy mikroby pozmění strukturu svých transpeptidáz, tzv. Penicillin-binding proteins (PBP), je charakteristická hlavně pro grampozitivní bakterie, různé mikroby pak pozměňují různé skupiny PBP (např. MRSA syntetizují tzv. PBP2a).

Protože je produkce beta-laktamáz jedním z nejrozšířenějších mechanismů rezistence vůbec a jejich horizontální šíření přerostlo v globální problém, věnujeme jim v této kapitole více prostoru.

Rezistence k beta-laktamům na základě produkce beta-laktamáz je typická především pro bakterie z čeledi Enterobacteriaceae. Původ beta-laktamáz se připisuje některým gramnegativním bakteriím (zejména *Enterobacter cloacae*), u nichž byly tyto enzymy chromozomálně kódovány a představovaly ochranu před antimikrobiálními látkami charakteru beta-laktamů produkovaných půdními bakteriemi. **Chromozomální beta-laktamázy** jsou i v současnosti příčinou rezistence k širokospektrým beta-laktamům a jsou popisovány mimo enterobakterie především u pseudomonád. Z epidemiologického hlediska ale představují stále rostoucí problém hlavně **plazmidově kódované beta-laktamázy**. Záchyť první z nich byl zdokumentován již v roce 1963; název **TEM-1** byl pak odvozen od počátečních písmen jména řekyně Temonierý, z jejíž krve byla izolována *E. coli* rezistentní k ampicilinu. Od tohoto data došlo vlivem

masivního používání ampicilinu k celosvětovému rozšíření TEM-1; v 70. letech se společně s nově popsányými beta-laktamázi **TEM-2** (mutanta TEM-1) a **SHV-1** staly nejčastěji prokazovanými enzymy v rámci čeledi Enterobacteriaceae, zejména mezi nozokomiálními patogeny. Pro mnoho původců nemocničních nákaz byla charakteristická multirezistence kódovaná geny pro TEM-1, TEM-2 či SHV-1 beta-laktamázy, které byly lokalizovány na plazmidech. Není bez zajímavosti, že tyto enzymy zůstaly relativně v nezměněné podobě po dobu dvaceti let. V osmdesátých letech, kdy byla zavedena třetí generace cefalosporinů za účelem překonání hydrolytické aktivity TEM-1, TEM-2 a SHV-1, se tato situace rapidně změnila. V Německu byly popsány u tří izolátů *Klebsiella pneumoniae* a jednoho izolátu *Serratia marcescens* první širokospektré beta-laktamázy (**ESBL**, Extended-Spectrum Beta-Lactamases). Konkrétně se jednalo o mutantu beta-laktamázy SHV-1 s účinkem na širokospektré cefalosporiny, která byla pojmenována **SHV-2**. V současnosti jsou ESBL definovány jako enzymy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny (s výjimkou cefamycinů) a monobaktamy. Nehydrolyzují karbapenemy a jejich účinek je inhibován kyselinou klavulanovou. Také ESBL pozitivní enterobakterie se velmi rychle rozšířily a jsou izolovány po celém světě zejména z nemocničního prostředí. Aktuálně se popisuje více než 220 TEM a 190 různých SHV beta-laktamáz. V rámci skupiny ESBL pozitivních enterobakterií se dnes nejčastěji vyskytují tzv. **CTX-M** beta-laktamázy kódované *bla*<sub>CTX-M</sub> geny, jejichž schopnost šíření je některými autory označována jako pandemická. Jak vypovídá jejich označení, substrátem, který neúčinněji hydrolyzují, je cefotaxim. V současnosti je známo více než 170 různých variant *bla*<sub>CTX-M</sub> genů, jež vykazují značnou míru druhové specifity a regionální příslušnosti.

Kromě odlišné molekulární struktury se od ESBL liší další klinicky významná skupina beta-laktamáz, označovaná jako **AmpC**, svojí schopností hydrolyzovat cefamyciny, necitlivostí k inhibitorům beta-laktamáz a neschopností inaktivovat některé cefalosporiny IV. generace, zejména cefepim. Původně, v osmdesátých letech, byly prokazovány pouze **inherentní AmpC beta-laktamázy**, tedy AmpC beta-laktamázy kódované chromozomálně, a to např. u *Acinetobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., *Yersinia enterocolitica*, atd. Chromozomálně kódované AmpC beta-laktamázy mohou být produkovány tzv. konstitutivně; tento typ produkce je snadno detekovatelný běžnými metodami ke stanovení citlivosti bakterií, problém ale představují chromozomálně kódované AmpC beta-laktamázy s tzv. produkcí inducibilní. Inducibilní je nicméně bohužel většina AmpC enzymů, k jejich expresi tedy dochází výhradně za přítomnosti induktorů. Tyto kmeny jsou v podmínkách *in vitro* k cefalosporinům III. generace citlivé a k jejich identifikaci je nutné provést doplňková vyšetření, na příklad modifikovaný diskový test za použití silného induktoru AmpC beta-laktamáz, jako jsou cefoxitin či imipenem. Nebezpečnost inducibilních AmpC beta-laktamáz nespočívá pouze v jejich obtížné diagnostice, ale i v možnosti jejich ireverzibilní přeměny na produkci konstitutivní, k čemuž může dojít mutací v jejich regulačním systému.

Plazmidově vázaná beta-laktamáza shodná s AmpC enzymem inherentně kódovaným u *E. coli* byla poprvé popsána v roce 1976 u druhu *Proteus mirabilis*. K prvnímu potvrzení horizontálního přenosu rezistence k cefamycinům i oxyiminocefalosporinům z *K. pneumoniae* na *E. coli* došlo v roce 1989, odpovědný enzym byl pojmenován **CMY-1** díky jeho cefamycinázové aktivitě. Na široké paletě plazmidově vázaných enzymů typu AmpC lze najít takové, které vykazují vysoký stupeň homologie s inherentními AmpC beta-laktamázi konkrétních bakteriálních druhů, což napomáhá objasnění jejich fylogenetického původu. Na příklad enzymy **ACT-1** a **MIR-1** jsou velmi podobné chromozomálním beta-laktamázi *Enterobacter*

*cloacae*, **CMY-2**, **CMY-4** a **LAT-1** enzymům *Citrobacter freundii*, nebo **DHA-1** a **DHA-2** beta-laktamázáz druhu *Morganella morganii*. Z epidemiologického hlediska je důležité, že se plazmidově vázané beta-laktamázy třídy C nejčastěji vyskytují u izolátů *K. pneumoniae* a také u dalších přirozeně negativních druhů, jako jsou *K. oxytoca*, salmonely a *P. mirabilis* a to nejen u humánních klinických izolátů, ale i u izolátů animálního původu a byl potvrzen i jejich přenos ze zvířat na člověka. Celosvětově nejrozšířenějším enzymem typu AmpC neseným na plazmidu je enzym CMY-2.

Existence mnoha variant beta-laktamázáz vedla k nutnosti jejich klasifikace a třídění. Kritérií pro začlenění do jednotlivých skupin je více, konkrétně je zohledněno umístění genu (chromozom či plazmid), citlivost k inhibitorům beta-laktamázáz a v neposlední řadě substrátová specifita. Hlavní dvě klasifikační schémata jsou schéma dle Amblera a dle Bushové-Jacoby-Medeirose. První z nich třídí beta-laktamázy na základě sekvence aminokyselin, druhé vychází z hydrolytického spektra a citlivosti k inhibitorům beta-laktamázáz. Ambler zařazuje do třídy A především původní, plazmidově kódované beta-laktamázy produkované enterobakteriemi TEM-1, 2 a SHV-1 společně s jejich širokospektrými mutantami a CTX-M ESBL. Třída B zahrnuje metalo-beta-laktamázy účinně inaktivující karbapenemy - např. **IMI** a **VIM**, třída C potom chromozomálně i plazmidově kódované beta-laktamázy typu AmpC. Do třídy D Ambler začlenil **OXA** beta-laktamázy.

Bushová-Jacoby-Medeiros řadí do první skupiny cefalosporinázy, které nejsou dobře inhibovány kyselinou klavulanovou, většinou kódované chromozomálně. Některé potom odpovídají AmpC beta-laktamázáz třídy C dle Amblera. Do druhé skupiny Bushová řadí penicilinázy, cefalosporinázy a širokospektré beta-laktamázy inaktivovatelné beta-laktamázázovými inhibitory řadící se do molekulárních tříd A či D, do třetí skupiny metalo-beta-laktamázy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy, nikoli aztreonam, které jsou jen slabě inhibovány beta-laktamázázovými inhibitory, ale dobře jejich účinek potlačuje EDTA a další chelataující látky. Do poslední skupiny jsou zařazeny penicilinázy, které nejsou inhibovány kys. klavulanovou.

U některých bakterií byla diagnostikována koprodukce více typů beta-laktamázáz současně, společně s CTX-M beta-laktamázázami byla popsána produkce na příklad non-ESBL třídy A beta-laktamázáz (TEM-1, SHV-1), třídy D beta-laktamázáz (OXA), anebo třídy C (AmpC).

Zdaleka nejzávažnějším typem rezistence u gramnegativních bakterií je rezistence ke karbapenemům. Karbapenemy se v rámci skupiny beta-laktamových antibiotik vyznačují nejširším spektrem účinku, devitalizují grampozitivní i gramnegativní bakterie i anaeroby včetně *Bacteroides fragilis*. Nelze je však použít k léčbě infekcí vyvolaných meticilin-rezistentními kmeny *Staphylococcus aureus*, ani *Stenotrophomonas maltophilia*. Jsou definitivně nejvíce upřednostňovanými antibiotiky pro léčbu závažných infekcí člověka způsobených multirezistentními bakteriemi, zejména gramnegativními patogeny. Pro širší svého účinku jsou také nasazovány k terapii život ohrožujících infekcí člověka s polymikrobiální etiologií. Konkrétněji, jsou podávány zejména pacientům v intenzivní péči, často také pacientům dlouhodobě hospitalizovaným, u nichž došlo ke kolonizaci nozokomiálními kmeny, jež nezdědky vykazují schopnost multirezistence. Přestože jsou tato léčiva indikačně omezena, recentní vědecké publikace informují o globálním šíření rezistence ke karbapenemům. Z epidemiologického hlediska je nejvýznamnějším mechanismem rezistence produkce karbapenemáz a to kvůli potenciálu rychlého globálního rozšíření prostřednictvím epidemicky úspěšných klonů.



Na základě rozdílů v jejich chemické struktuře rozlišujeme dvě skupiny karbapenemáz, které se liší hydrolytickým mechanismem ve svém aktivním místě. Serinové karbapenemázy zde mají umístěn serin, metalo-beta-laktamázy potom kovový iont (nejčastěji zinek), který je donorem molekuly vody při hydrolyze amidové vazby beta-laktamového antibiotika. Karbapenemázy, podobně jako jiné beta-laktamázy, zařazujeme do jednotlivých kategorií dle Amblera či Bushové. Serinové karbapenemázy jsou dle Amblera řazeny do tříd A (**KPC, GES, SME, IMI** a **NMC**), nebo D, kam náleží OXA beta-laktamázy a to např. OXA-48, OXA-162 či OXA-181. Metalo-beta-laktamázy se zástupci **VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, SPM, AIM, KMH, DIM** či **TMB** potom dle Amblera spadají do třídy B. Enterobakterie se schopností tvořit karbapenemázy produkují nejčastěji tyto typy enzymů: KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), NDM (New Dehli metallo-beta-lactamase), VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase), IMP (Imipenemase metallo-beta-lactamase), nebo **OXA-48** (Oxacillinase-48).

Většina serinových karbapenemáz třídy A vykazuje substrátovou specifitu k penicilinům, cefalosporinům, karbapenemům i monobaktamům a jejich účinek je (slabě) inhibován kyselinou klavulanovou či kyselinou 3-aminofenylboritou. První serinovou karbapenemázou z amblerovy třídy A, která byla popsána, byla beta-laktamáza izolovaná z bakterie *Serratia marcescens* ve Velké Británii v roce 1990 kódovaná genem *bla<sub>SME-1</sub>*. Brzy následoval objev dalších karbapenemáz třídy A kódovaných geny: *bla<sub>IMI/NMC</sub>*, *bla<sub>GES-2</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SFC-1</sub>* a *bla<sub>SHV-38</sub>*. Enzymy typu KPC, na rozdíl od ostatních serinových karbapenemáz, účinně inhibují efekt karbapenemů bez nutnosti přidružené tvorby širokospektrých beta-laktamáz či změn v permeabilitě buněčné membrány mikroorganismu.

Do Amblerovy třídy D jsou zahrnuty beta-laktamázy, které jsou díky své schopnosti hydrolyzovat oxacilin (a kloxacilin) nazývány oxacilinázami a jsou jen slabě inhibovány inhibitory beta-laktamáz. Třída D se vyznačuje velkou pestrostí, protože zahrnuje enzymy, které jsou si podobné jen z maximálně třiceti procent, což vysvětluje také jejich rozdílnou substrátovou specifitu. Některé z těchto beta-laktamáz inaktivují karbapenemy a jsou proto označovány za beta-laktamázy třídy D hydrolyzující karbapenemy. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je oxacilináza OXA-48, která byla popsána u *K. pneumoniae* izolované v roce 2001 v Turecku. OXA-48 byla po mnoho let prokazována pouze v Turecku, odkud se rozšířila do zemí Středního východu a Severní Afriky. V současnosti je sporadicky izolována i v Evropě, obvykle z bakterií čeledi Enterobacteriaceae. OXA-48 se vyznačuje rezistencí k penicilinům a karbapenemům (zejména k imipenemu), nikoli k širokospektrým cefalosporinům. Po identifikaci OXA-48 následovaly práce informující o existenci variant tohoto enzymu, u nichž substituce, byť jen jediné aminokyseliny, vedla ke změně substrátové specifity. Na příklad OXA-163, lišící se ve čtyřech aminokyselinách, hydrolyzuje širokospektré cefalosporiny, ale pouze slabě karbapenemy.

Metallo-beta-laktamázy se od serinových karbapenemáz amblerových tříd A a D neliší pouze aktivním místem, ale také substrátovou specifitou a citlivostí k inhibitorům. Vůči kyselině klavulanové a ostatním inhibitorům beta-laktamáz jsou odolné, nikoli však vůči účinku chelatujících látek, jako jsou kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA) či dipikolinová (DPA). Jejich hydrolytická aktivita zahrnuje v podstatě všechna beta-laktamová antibiotika s výjimkou monobaktamů. První popsanou transferabilní metalo-beta-laktamázou byla **IMP-1**, prokázaná u bakterie *P. aeruginosa* v Japonsku, v současnosti je jednou z nejčastějších metalo-beta-laktamáz i u enterobakterií. Další z často se vyskytujících metalo-beta-laktamáz je **NDM**. Vůbec první popis tohoto enzymu byl uskutečněn roku 2009 u bakterie *K. pneumoniae*

rezistentní ke karbapenemům, která byla izolována z klinicky probíhající infekce vylučovacího systému švédského občana indického původu s historií cestování do Nového Dillí. Pojmenování této nové varianty metalo-beta-laktamáz vyvolalo u indických mikrobiologů i veřejnosti vlnu nesouhlasu, nicméně z výsledků následujících epidemiologických studií vyplynulo, že se NDM metalo-beta-laktamázy skutečně vyznačují endemickým výskytem v určitých částech Asie a jen sporadicky figurují v etiologii onemocnění lokalizovaných i mimo asijský kontinent. NDM metalo-beta-laktamázy jsou obvykle nalézány u *K. pneumoniae*, v menší míře u *E. coli* a u salmonel dokonce jen velmi výjimečně. Jak napovídá již její název „Verona integron-encoded metalo-beta-lactamase“, je tato karbapenemáza frekventně prokazována v Itálii.

### 2.3.2 Mechanismy rezistence ke glykopeptidům

Glykopeptidy mají poměrně velkou molekulu a to jim brání v prostupu zevní membránou gramnegativních bakterií, které jsou tedy vůči nim přirozeně rezistentní. Získaná rezistence je potom u grampozitivů zajištěna dvěma způsoby: zesílením buněčné stěny, ve které jsou navíc zmnoženy pentapeptidové řetězce. Ty potom vyvazují glykopeptidy aniž by jim dovolily proniknout ke svému cíli na vnitřní straně buněčné stěny. Tento model rezistence používají zejména stafylokoky. U vankomycin rezistentních enterokoků (**VRE**) pozorujeme mechanismus v podobě modifikace cílové struktury: koncové části pentapeptidů, cíl glykopeptidů, jsou pozměněny z D-ala-D-ala na D-ala-D-ser aj. Vankomycin ztrácí touto náhradou k cílovému místu afinitu.

Přestože byly glykopeptidy dlouho považovány za odolné vůči rezistenci, v osmdesátých letech minulého století byly poprvé ojediněle zachyceny bakterie rezistentní k vankomycinu, nejprve *S. epidermidis*, poté enterokoky. O desetiletí později byly již pravidelně izolovány zlaté stafylokoky s intermediální citlivostí (VISA) a o dalších deset let později už i zcela k vankomycinu rezistentní *S. aureus* (VRSA). Odborná veřejnost považuje za příčinu vzniku VRE a jejich rozšíření do lidské populace v Evropě používání avoparcinu jako růstového stimulantu u hospodářských zvířat. Tato praxe byla zcela zakázána na celém území Evropské unie v roce 1996. Ve Spojených státech amerických se zase za důvod vzniku a rozšíření VRE považuje frekventní využívání tohoto preparátu k léčbě infekcí člověka.

### 2.3.3 Mechanismy rezistence k polymyxinům

Účinek polymyxinů spočívá v interakci jejich kationické části s negativně nabitými fosfátovými skupinami lipopolysacharidu, který je hlavní součástí zevní membrány gramnegativních bakterií. Současně se lipidová část molekuly polymyxinů váže na lipidovou komponentu membrány. Výsledkem obou procesů je narušení integrity zevní membrány, což je následováno stejným procesem i na vnitřní membráně gramnegativů. Bakterie odolávají ničujícímu účinku těchto látek tím, že pozmění právě strukturu lipopolysacharidu tak, aby snížily jeho negativní náboj. To je podstatou přirozené rezistence u *Proteus mirabilis* a *Burkholderia cepacia*, které mají fosfátové skupiny lipopolysacharidu nahrazeny etanolaminem či aminoarabinózou. Další variantou je snížení až zastavení exprese lipopolysacharidu, produkce pouzdra a eflux.

První zprávy o získané rezistenci byly publikovány až kolem roku 2010 (sic!), do té doby se mělo za to, že je rezistence k polymyxinům kódována pouze chromosomálně. V roce 2015 byl ale v Číně popsán izolát *E. coli* nesoucí gen pro rezistenci k polymyxinům (*mcr-1*) na plazmidu. Bylo zjištěno, že rezistence ke kolistinu je právě z těch, která může být kódována jediným genem (navíc neseným na plazmidu), což současně znamená, že se také velmi snadno šíří. V současnosti je fenotyp kolistinové rezistence popisován z mnoha zemí světa a ví se, že rezervoárem genu *mcr* jsou hospodářská zvířata, především prasata. Kolistin totiž byl a je poměrně intenzivně využíván pro kontrolu kolinfekcí zvířat, kdežto v humánní medicíně stál pro svou vysokou toxicitu dlouho na okraji zájmu lékařů. To se ovšem zásadně změnilo s narůstáním rezistence k cefalosporinům vyšších generací, karbapenemům a fluorochinolonům a se šířením multirezistentních kmenů gramnegativních bakterií. Kolistin se totiž pro řadu indikací (zejména těžké stavy vyvolané *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) stal lékem volby, i proto je rezistence k němu středem zájmu mikrobiologů po celém světě.

### 2.3.4 Mechanismy rezistence k aminoglykosidům

U aminoglykosidů popisujeme čtyři možné mechanismy rezistence, z nichž nejčastějším je enzymatická inaktivace molekuly antibiotika. Dalšími jsou zamezení vstupu do bakterie snížením exprese porinů, aktivní odčerpávání efluxními pumpami, a nejméně častá je potom modifikace cílového místa účinku aminoglykosidu na ribozomu, jak to lze pozorovat např. u *M. tuberculosis*.

Enzymy inaktivující aminoglykosidy jsou acetyltransferázy, nukleotidyltransferázy a fosfotransferázy. Mají odlišný způsob účinku, než je tomu u beta-laktamáz, ty totiž beta-laktamový kruh štěpí, kdežto výše uvedené enzymy aminoglykosid inaktivují připojením acetylové či adenylové skupiny nebo fosfátu. Výsledkem je změna náboje antibiotika a tím ztráta afinity k cílovým strukturám. Inaktivující enzymy jsou jednoduše kódovány snadno přenositelnými geny, i proto je tento typ rezistence tak častý, u některých bakterií byla zjištěna dokonce produkce více enzymů současně.

### 2.3.5 Mechanismy rezistence k chinolonům

Snížená citlivost k chinolonům je zřídka podložena pouze jedním mechanismem rezistence, výsledný fenotyp obvykle vzniká spíše jejich kombinací. Rezistence k chinolonům může být podložena jednak chromozomálně, potom je přenášena vertikálně, a/nebo plazmidově **PMQR** (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance) geny s možností přenosu horizontálního. Před objevem PMQR genů byly za příčinu rezistence k chinolonům považovány výhradně chromozomálně kódované změny v primární struktuře topoizomeráz II společně se strukturálními změnami buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, vedoucí ke snížení vstupu antibiotik do buňky (absencí porinů) či k jejich aktivnímu odčerpávání z cytoplazmy efluxními pumpami.

Geny pro DNA gyrázu a topoizomerázu IV jsou označovány jako *gyr* a *par*. Oblasti na těchto genech, kde jsou mutace lokalizovány nejčastěji a pokud jsou přítomny, resultují ve

fenotypově vyjádřenou rezistenci k chinolonům, se označují zkratkou **QRDR** – Quinolone Resistance Determining Regions. Míra rezistence je přímo úměrná množství mutací v oblasti QRDR. Mutacemi je změněna primární struktura topoizomeráz, což znesnadňuje vazbu antibiotika na vazebné místo, tudíž lze hovořit o mechanismu rezistence formou přemostění cíle (změny vazebného místa).

Strukturální změny buněčné stěny a cytoplazmatické membrány mohou být u některých bakterií, vedle *E. coli* a salmonel na příklad u rodů *Shigella*, *Klebsiella* či *Enterobacter*, podmíněny tzv. **MAR fenotypem** (Multiple Antibiotic Resistance) chromozomálně kódovaným *mar* operonem, který představuje mechanismus nespecifické rezistence k několika nepříbuzným skupinám antimikrobiálních látek, jako jsou beta-laktamy, chinolony, tetracykliny, amfenikoly a ansamyciny. Dále bakterii uděluje schopnost odolávat účinku organických rozpouštědel, některých dezinficiens či látek vyvolávajících oxidativní stres.

Kvůli riziku rychlého šíření prostřednictvím mobilních genetických elementů je bedlivě sledován výskyt zejména na plasmidech kódovaných determinant rezistence k chinolonům – PMQR. Ty jsou reprezentovány několika různými mechanismy: **Qnr** proteiny, **acetyltransferázou AAC(6′)-Ib-cr** a efluxními pumpami **QepA** a **OqxAB**.

Qnr proteiny (quinolone resistance) blokují účinek chinolonů na bakteriální DNA gyrázu a jsou kódovány geny *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* a *qnrVC*. Protektivní účinek Qnr proteinů pravděpodobně spočívá ve schopnosti vyvázání molekuly chinolonu z komplexu DNA-topoizomeráza II-chinolon, což vede k obnově rozštěpeného řetězce DNA. Z historického pohledu byl prvním popsáným *qnr* genem gen *qnrA*, který byl současně také prvním popsáným genem rezistence k chinolonům s horizontálním přenosem, a to prostřednictvím plasmidu s označením pMG252 u druhu *K. pneumoniae* izolovaného v Alabamě.

Klíčovou roli v enzymatické modifikaci chinolonů hraje varianta cr aminoglykosidové acetyltransferázy, AAC(6′)-Ib-cr, která inaktivuje přenosem acetylové skupiny z acetyl-CoA kromě aminoglykosidů amikacinu, kanamycinu a tobramycinu také ciprofloxacín a norfloxacín. Poprvé byla popsána na *E. coli*, přičemž její účinek je úzce spjat s chemickou strukturou jednotlivých fluorochinolonů. AAC(6′)-Ib-cr je totiž schopna acetylovat pouze ty fluorochinolonové molekuly, jež vykazují substituci N-piperazinyly, tedy ciprofloxacín a norfloxacín. Je kódována plasmidově přenášeným genem *aac(6′)-Ib-cr*, který byl mimo jiné identifikován na shodných plasmidech či integronech s geny *qnr*, nicméně oproti proteinům Qnr zvyšuje MIC chinolonů o něco méně. Cr varianta se od původní acetyltransferázy odlišuje zejména dvěma bodovými mutacemi v kodónech 102 (Trp102Arg) a 179 (Asp179Tyr). Mutovaná aminoglykosidová acetyltransferáza AAC(6′)-Ib-cr má pozměněnou substrátovou specifitu, její účinnost vůči aminoglykosidům je nižší, za to je ale rozšířena právě o ciprofloxacín a norfloxacín. Gen *aac(6′)-Ib-cr* je součástí kaset různých integronů, nejvýznamnější však může být jeho asociace s IncF11 plasmidem exprimujícím CTX-M-15 ESBL, který se masivně rozšířil po celém světě. Aktuálně existuje řada informací o jeho společném přenosu s dalšími PMQR geny, jako jsou *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2*, *qepA* a/nebo s beta-laktamázami CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-24, DHA-1, SHV-12 či KPC-2.

Přestože jsou efluxní pumpy figurující v rezistenci vůči chinolonům kódovány spíše chromozomálně, existují i efluxní systémy (QepA a OqxAB), jejichž geny jsou přenášeny prostřednictvím plasmidů. QepA (Quinolone efflux pump), skládající se z celkem čtrnácti transmembránových segmentů a 511 aminokyselinových zbytků, se řadí do MFS rodiny efluxních

pump, OqxAB začleňujeme do rodiny RND. Zatímco QepA z buňky odstraňuje hydrofilní ciprofloxacin a norfloxacin, OqxAB díky svojí nespecifitě dokáže z buňky „vypumpovat“ navíc i kyselinu nalidixovou, flumechin a dokonce chloramfenikol a trimetoprim. Pumpy jsou kódovány geny *qepA* a dvojicí genů lokalizovaných na totožném operonu s označením *oqxA* a *oqxB*. Gen *qepA* byl poprvé popsán na pHPA plazmidu *E. coli* izolované z moči pacienta hospitalizovaného v japonské nemocnici a tento plazmid vedle rezistence k chinolonům kódoval také rezistenci k aminoglykosidům a širokospektrým beta-laktamům. OqxAB byl popsán na plazmidu pOLA52 *E. coli* izolované z chlévské mrvy a umožnil bakterii navíc rezistenci k chloramfenikolu.

Ačkoli PMQR elementy zajišťují bakteriím pouze nízkou hladinu rezistence k chinolonům, pokud dojde k výskytu dvou a více těchto determinant u jednoho mikroorganismu, dochází k aditivnímu efektu, jehož praktickým dopadem je zvýšení minimální inhibiční koncentrace nad úroveň klinického breakpointu.

### 2.3.6 Mechanismy rezistence k rifamycinům

U enterobakterií a nefermentujících tyčinek se setkáváme s přirozenou rezistencí k rifamycinům, která má podstatu v omezení průniku těchto látek buněčnou stěnou.

Velkým problémem při použití rifamycinů je snadný vznik získané rezistence, a to dokonce už v průběhu léčby samotné. Příčinou je mutace genu kódujícího beta-podjednotku DNA-polymerázy, což snižuje afinitu antibiotika k této podjednotce. Při klinickém použití (především při léčbě tuberkulózy) je tedy zcela vyloučena monoterapie a rifamyciny jsou podávány současně s jedním či více dalšími preparáty. To však neplatí pro rifaximin, který se nevstřebává ze střeva a je určen k léčbě střevních infekcí.

Ojedinele byl popsán i výskyt rezistence prostřednictvím ribosylace rifamycinů, nebo zabráněním vstupu antibiotika do buňky.

### 2.3.7 Mechanismy rezistence k makrolidům

Mechanismy získané rezistence proti makrolidům zahrnují modifikaci cílového místa účinku, aktivní eflux a inaktivaci antibiotika.

Modifikace cílového místa je nejvíce frekventovanou formou odolnosti bakterií k makrolidům a konkrétně je zprostředkována metylací 23S rRNA na velké podjednotce ribozomu enzymem ribozomální metylázou. Vede ke zkřížené rezistenci vůči linkosamidům a streptograminu B, a proto je označována za MLS<sub>B</sub> rezistenci. Velmi snadno se šíří, protože je kódována jediným genem pro metylující enzym, gen nese název *erm* (erythromycin resistance methylase) a má přibližně 30 variant, např. *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*. MLS<sub>B</sub> rezistence může být konstitutivní, nebo indukibilní. Při konstitutivní rezistenci je gen exprimován stále a bakterie je tedy také současně rezistentní ke všem třem skupinám látek. Při rezistenci indukibilní se gen přepíše jen v přítomnosti induktoru, kterým jsou makrolidy se čtrnáctičlenným laktonovým

kruhem a azalidy, nikoliv však makrolidy se šestnáctičlenným kruhem, ketolidy ani linkosamidy. Průkaz indukibilního typu rezistence v praxi znamená, že pro léčbu lze použít spiramycin, tylosin, tilmikosin, telitromycin či klindamycin, nikoliv však klaritromycin, roxitromycin, azitromycin či tulatromycin. Při konstitutivní rezistenci neúčinkují ani všechny makrolidy, ani linkosamidy.

Efluxní systémy odčerpávající makrolidy z bakterií jsou kódovány různými geny, gen *mef(A)* byl nalezen na transpozonu streptokoků, dá se tedy očekávat jeho šíření horizontálním přenosem. Eflux makrolidů je obvykle indukibilní a kromě makrolidů v užším slova smyslu jsou odčerpávány i azalidy a streptograminy, nikoliv však ketolidy a linkosamidy.

Další možností je inaktivace makrolidů různými typy modifikujících enzymů, což pozorujeme hlavně u enterobakterií.

### 2.3.8 Mechanismy rezistence k linkosamidům

Získaná rezistence k linkosamidům zahrnuje modifikaci cílového místa účinku a jejich enzymatickou inaktivaci.

K modifikaci cíle dochází především na 23S rRNA velké podjednotky ribozomu enzymy ribozomálními metylázami, jak bylo popsáno v kapitole 2.3.7. Méně častá je bodová mutace genu pro enzym peptidyl-transferázu, který odpovídá za posun nově vznikajícího řetězce peptidů na ribozomu. Substitucí jedné aminokyseliny ve struktuře peptidyl-transferázy může být snížena její afinita k antibiotikům.

Inaktivace antibiotika enzymy nastává prostřednictvím nukleotidyltransferáz, které k antibiotiku připojí nukleotid, čímž jeho molekulu inaktivují. Tento typ rezistence je znám u některých stafylokoků, *Streptococcus agalactiae* či *Bacteroides fragilis*. Nukleotidyltransferázy jsou kódovány geny s označením *lin*, kterých existuje více variant, např. *linA*, *linB*, atd.

### 2.3.9 Mechanismy rezistence k tetracyklinům

Nejčastějším mechanismem rezistence k tetracyklinům je jejich aktivní odčerpávání z buňky efluxními pumpami kódovanými geny *tet* a *otr* a je společný gramnegativním i gram pozitivním bakteriím. Mnoho *tet* a *otr* genů je nalézáno na plasmidech, proto je také tento typ rezistence tolik rozšířen. Rezistence k tetracyklinům je často hlášena u enterobakterií i dalších střevních mikrobů jako jsou kampylobaktery a helikobaktery. Nejúčinnější je aktivní eflux tetracyklinů první generace, u druhé generace je už účinek efluxních pump podstatně menší a tetracykliny třetí generace již jimi nejsou vůbec ovlivněny. Některé z těchto pump však umí odčerpávat nejen tetracykliny, ale i další látky, to potom vede k fenotypu multirezistence.

Dalším způsobem, kterým se bakterie brání účinkům tetracyklinů, je ochrana ribozomů prostřednictvím speciálních proteinů. Pouze tetracykliny třetí generace tento mechanismus rezistence překonávají. Ostatní mechanismy rezistence jsou vzácné a mohou zahrnovat enzymatickou inaktivaci antibiotika či snížení exprese porinů.

### 2.3.10 Mechanismy rezistence k amfenikolům

Mechanismy rezistence k chloramfenikolu zahrnují jejich enzymatickou inaktivaci, sníženou permeabilitu buněčné stěny, nebo aktivní eflux. Enzymatické pozměnění molekuly amfenikolů je zdaleka nejčastější a je katalyzováno chloramfenikol-acetyltransferázami, zkráceně CATs, které kódují geny *cat* (existuje vícero variant). *Cat* geny mohou být neseny jak na chromozomu, tak na plazmidech a jejich exprese je buď konstitutivní, tedy stálá, nebo inducibilní, tedy nastává až po setkání s látkou, která jejich tvorbu vyprovokuje.

Rezistenci vlivem snížené permeability buněčné stěny a aktivním odčerpáváním se vyskytuje především u pseudomonád a acinetobakterů.

### 2.3.11 Mechanismy rezistence k pleuromutilinům

Rezistence k pleuromutilinům bakterie dosahují dvěma způsoby, především přemostěním cílové struktury, tedy enzymu peptidyl-transferázy na 50S podjednotce ribozomu, nebo zvýšeným odčerpáváním antibiotika z buňky prostřednictvím různých efluxních pump.

U mykoplazmat pozorujeme zkříženou rezistenci s makrolidy (tylosinem) a linkosamidů, u *B. hyodysenteriae* dochází v posledních letech k nárůstu výskytu rezistentních kmenů.

### 2.3.12 Mechanismy rezistence k nitroimidazolům a nitrofuránům

Rezistence vůči antibiotikům s oxidačním účinkem je oproti jiným skupinám antimikrobik neobyčejně nízká. Vysvětlení spočívá v tom, že redukci nitroimidazolů a nitrofuránů na aktivní molekuly zprostředkovávají bakteriální enzymy nezbytné pro bazální metabolismus buňky, a proto je bakterie v rámci své ochrany nemohou tak snadno vyřadit či obejít.

U anaerobů nejčastěji léčených prostřednictvím oxidačně působících léčiv (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *C. difficile*) bylo popsáno několik mechanismů rezistence, které mají svou podstatu v omezení aktivity redukujících enzymů (oxidoreduktáz, nitroreduktáz), jež katalyzují redukci proléčiv nitroimidazolů a nitrofuránů. Dalším mechanismem rezistence je produkce enzymů katalyzujících přeměnu těchto látek na aminy. Tento proces je kódován geny s označením *nim* (*nimA-nimF*).

Dalším možným mechanismem rezistence vůči nitroimidazolům a nitrofuránům je vytvoření alternativní metabolické dráhy, nebo omezení průniku látek buněčnou stěnou.

### 2.3.13 Mechanismy rezistence k sulfonamidům

Přirozenou rezistenci k sulfonamidům vykazují pseudomonády, které zamezují vstupu antibiotika do nitra buňky poriny a zároveň zapojují efluxní pumpy. Enterokoky zase umí

využívat kyselinu listovou z okolního prostředí. Mykobakterie, mykoplazmata, spirochety a většina anaerobů jsou přirozeně rezistentní také, zřejmě díky jejich dlouhé generační době, kvůli níž nemají tak velkou potřebu kyseliny listové, a navíc si ji mohou opatřit jinými alternativními drahami.

Získaná rezistence u bakterií (a některých prvoků) vzniká mutací v genech pro dihydropteroát-syntetázu či dihydrofolát-reduktázu a může být plazmidově přenášena, jak to pozorujeme zejména u enterobakterií. Další způsob, jak odolat účinku sulfonamidů spočívá u některých bakterií v nadprodukci kyseliny paraaminobenzoové.



## Seznam použité literatury:

- Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* 2006; 9 (5): 461-5.
- Andersson DI, Hughes D. Antibiotics resistance and its costs: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010; 8 (4): 260-71.
- Beneš J. *Antibiotika, systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018.
- Beneš J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009.
- Beneš J. Počátky antibiotické éry a některé důsledky pro dnešní dobu. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 2012; 18 (5): 142-9.
- CLSI: <https://clsi.org/standards/>.
- Goering RV, Dockrell HM, Zuckerman M, a kol. *Mimsova Lékařská mikrobiologie, 5. vydání*. Praha: Triton, 2016.
- Hernando-Amado S, Sanz-García F, Blanco P, et al. Fitness costs associated with the acquisition of antibiotics resistance. *Essays Biochem* 2017; 61 (1): 37-48.
- Jindrák V, Hedlová D, Urbášková P a kol. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha: Mladá fronta a.s., 2014.
- Lie J, Xie S, Ahmed S, et al. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. *Front Pharmacol* 2017; 8: 364.
- Lochmann O. *Stručný průvodce léčbou antibiotiky a chemoterapeutiky, 2. vydání*. Praha: Comdes, 1998.
- Modr Z. *Antibiotika a chemoterapeutika. Stručný přehled pro praxi*. Praha: Lek Pharma, 1995.
- Perron GG, Hall AR, Buckling A. Hypermutability and compensatory adaptation in antibiotic-resistant bacteria. *Am Nat* 2010; 176 (3): 303-11.
- Sechser T. Farmakokinetika pro lékaře. Část I. *Remedia* 1991; (1) 5-6:227-9.
- Sechser T. Farmakokinetika pro lékaře. Část II – Clearance. *Remedia* 1992; 2 (1) 42-6.
- Šimůnek J, Smola J. *Antibiotika, sulfonamidy a chinolony ve veterinární medicíně*. Tišnov: LAST Steinhauser, 1998.
- Štefan M. *Antibiotika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2019.
- Votava M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001.
- WHO: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xrd-tb-faq/en/>

## 2.4 Významné rezistentní bakterie

Rezistence k antimikrobiálním látkám je jedna z nejvýznamnějších hrozeb současného zdravotnictví. Riziko vzniku rezistence se týká více či méně každé bakteriální infekce u pacientů všech druhů a jakéhokoli věku. Rezistence k antimikrobiálním látkám nevzniká jen tak z ničeho – tento potenciál je dán plasticitou genomu bakterií, jejich evoluční adaptibilitou. Schopnost získávat rezistenci k látkám, které je poškozují, je jejich přirozeností. Proto neexistuje žádné definitivní řešení tohoto problému; čím více budeme používat antimikrobiální látky, tím budou bakterie rezistentnější. Na druhou stranu v nepřítomnosti selekčního tlaku nemají bakterie žádný důvod „vláčet s sebou“ zbytečné genetické determinanty pro všechny případy; proces získávání antimikrobiální rezistence a šíření multirezistentních kmenů může být výrazně omezen racionálním používáním antimikrobiálních látek a zodpovědným chováním nejen zdravotníků a zemědělců, ale všech, kdo s těmito látkami nakládají. Bohužel veřejné povědomí o problému antimikrobiální rezistence je dosud velmi vágní; je to hrozba, která zůstává do značné míry skrytá každodenní pozornosti. Není to epidemie zřejmá na první pohled jako „černá smrt“, přesto má však na svědomí sta tisíce životů každý rok.

Zabijáky v tomto případě bývají často zdánlivě nevinné komenzální a environmentální bakterie a lidé umírají v důsledku infekcí, které se zpočátku mohou zdát banální, ale které se ukážou refrakterní na léčbu. Tato smrt zůstává skryta očím veřejnosti za zdmi zdravotnických zařízení, kde kosí oslabené pacienty, léčící se často s docela jinými problémy. Tzv. „nosokomiální infekce“ znamená doslova infekce získaná v nemocnici. Úzce však souvisí právě s problematikou rezistence. Nemocnice a jiná zdravotnická zařízení (zejména jednotky intenzivní péče) představují prostředí s vysokým selekčním tlakem, v němž jsou zároveň akumulováni vysoce vnímaví jedinci. V důsledku intenzivního používání antimikrobik a dezinfekčních látek se v tomto prostředí udržují právě jen nejrezistentnější bakterie, které snadno kolonizují kůži a sliznice pacientů i personálu, prostředí a nejrůznější zdravotnické pomůcky. Nástroje k invazivním zákrokům, jako jsou katetry, endoskopy, kloubní náhrady a podobně, usnadňují jejich přenos a infekci vnitřních orgánů; pacienti s kompromitovanými bariérami, imunosuprimovaní, staří nebo jinak oslabení představují snadnou oběť. Jedná se tedy o oportunní infekce, nejčastěji infekce operačních ran, močového traktu a pneumonie, osteomyelitidy, bakteriémie s důsledkem septického šoku, endokarditidy a meningitidy. K vysoce nebezpečným nosokomiálním patogenům člověka (ale i zvířat!) patří v současnosti *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, VRE (enterokoky rezistentní k vankomycinu), MRSA (stafylokoky rezistentní k meticilinu), *E. coli*, ale také řada dalších environmentálních oportunních patogenů: např. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. aj. Obrovský problém představuje také narůstající rezistence mykobakterií, komplikující již tak dost obtížnou léčbu tuberkulózy.

Výskyt vysoce rezistentního bakteriálního kmene může být lokálním problémem – nikdy by však za něj neměl být *a priori* považován. Nemusí se týkat jen nemocnic; vysoce rezistentní epidemické nebo pandemické klony se často rychle šíří i v komunitách. Rezervoárem rezistentních bakterií – nebo jen genetických determinant rezistence – mohou být volně žijící živočichové, ale také zemědělská půda, odpadní voda a vůbec prostředí, které je soustavně kontaminováno rezidui antimikrobiálních látek. V tomto prostředí dochází snadno ke kontaminaci rezervoárových živočichů; příkladem může být nosičství rezistentních klonů salmonel mezi racky, hledajícími potravu na skládkách. Problematika antimikrobiální rezistence má globální

charakter. Proto sotva může překvapit, že některé vysoce úspěšné rezistentní patogeny se rozšířily doslova po celém světě; jde o epidemii v pravém smyslu toho slova. Tyto „epidemické multirezistentní patogeny“ splňují obvykle několik kritérií: vyskytují se globálně, jsou asociovány s rezistencí k významným terapeutickým látkám, jsou schopny úspěšně a dlouhodobě kolonizovat své hostitele a efektivně se šířit a způsobují závažné infekce, ať už v důsledku zvýšené virulence, nemožnosti léčby nebo perzistence a rekurence onemocnění. Obecně lze říci, že vysoká rezistence nemusí nijak korelovat se zvýšenou virulencí; úspěch těchto kmenů zajišťuje spíše vyšší „fitness“, schopnost přerůst konkurující bakteriální kmeny v kolonizovaném prostředí.

### 2.4.1 Meticilin-rezistentní stafylokoky

Meticilin-rezistentní stafylokoky (nebo lépe česky prostě stafylokoky rezistentní k meticilinu) jsou běžně známy pod zkratkou MRSA (meticilin-rezistentní *S. aureus*), neboť *S. aureus* je nejdůležitějším patogenem člověka. Ve veterinární medicíně jsou však stejně významné i tzv. rezistentní kmeny *S. pseudintermedius* (MRSP), který je mnohem častější u psů a koček, a opomenuty by neměly být ani tzv. MRCNS – meticilin-rezistentní koaguláza-negativní stafylokoky, které mohou jednak figurovat samy jako oportunní patogeny a zároveň mohou představovat rezervoár genů rezistence pro obecně virulentnější koaguláza-positivní druhy.

Stafylokoky rezistentní k penicilinu se objevily hned po jeho uvedení ve 40. letech, a právě tak rychlý byl vývoj rezistence k „antistafylokokovým“ izoxazolylpenicilinům, jako je oxacilin, kloxacilin nebo meticilin, které se vyznačují vysokou stabilitou ke stafylokokovým betalaktamázám a které byly zavedeny v 60. letech. Původně byl jejich výskyt úzce vázán na nemocniční prostředí, později (asi od 90. let) se začaly šířit také mezi veřejností. Proto dnes rozeznáváme tzv. HA-MRSA (*health-care-associated*) vázané na nemocnice a CA-MRSA (*community-associated*) šířící se v populaci bez vazby na nemocnice.

MRSA způsobují stejné infekce jako citlivé kmeny – hnisavé infekce kůže a měkkých tkání, nosokomiální bakteriémie, pneumonie a osteomyelitidy. Podobně MRSP jsou u psů a koček asociovány hlavně s pyodermiemi, ale také otitidami, močovými infekcemi a osteomyelitidami. Koaguláza-negativní stafylokoky, jako *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, u zvířat zejména *S. sciuri*, *S. schleiferi* ssp. *schleiferi*, *S. felis*, se obecně považují za málo patogenní komenzální mikroflóru, ale příležitostně se mohou podílet na vzniku hnisavých kožních a močových infekcí. Jsou také častými původci mastitid, ačkoli u těchto infekcí není rezistence k meticilinu tak běžná. Přestože jednotlivé druhy vykazují primární vazbu na určitého hostitele, snadno překračují hostitelskou bariéru. Infekce *S. pseudintermedius* člověka, respektive *S. aureus* u psa či kočky jsou stejně závažné, ale zdá se, že kolonizace není tak efektivní a dlouhodobá – pes, respektive člověk je pravděpodobně ve většině případů primárním zdrojem.

Kolonizace kůže a sliznic skoro vždy předchází vzniku infekce a infikující kmen bývá většinou identický s kolonizujícím kmenem. Kolonizace nemusí vést nutně k infekci, ale jedinci kolonizovaní MRSA mají podstatně vyšší riziko vývoje infekce. Stafylokoky (které jsou velmi rezistentní k vyschnutí a tolerují vysokou koncentraci soli) s oblibou kolonizují kůži, především perineum, podpaží, okolí nozder a nosní předsíň, a také sliznici nosohltanu. K přenosu

dochází snadno přímým kontaktem i nepřímo kontaminovanými předměty. Kolonizace může být přechodná, cca třetina lidské populace je kolonizována stafylokoky trvale; v asi 1,5% případů se jedná o MRSA, ale data se mohou lišit, v některých komunitách jsou čísla podstatně vyšší. Pravděpodobnost kolonizace MRSA zvyšuje kontakt s nemocničním prostředím. Prevalence MRSA, MRSP a MRCNS u zvířat se také liší podle oblasti. U koní a prasat jsou MRSA častější než MRSP; prasata se dokonce považují za hlavní rezervoár MRSA ST398. Nosokomiální infekce MRSA je závažným problémem koňských klinik. MRCNS jsou všeobecně prevalentnější než koaguláza-pozitivní druhy.

Podstatou rezistence k meticilinu je produkce odlišného penicilin-vázajícího proteinu, tzv. transpeptidázy, enzymu zodpovědného za tvorbu příčných můstků v peptidoglykanové vrstvě. Gen *mecA* kóduje tzv. PBP2a, což je varianta tohoto enzymu s velice nízkou afinitou ke všem skupinám betalaktamových antibiotik. Gen *mecA* je součástí mobilního genetického elementu SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome). Tento element obsahuje inzerční sekvence umožňující vložení dalších genů rezistence, a opět další mohou nést jiné mobilní elementy. Proto jsou MRSA kmeny často multirezistentní; setkáváme se s rezistencí k tetracyklínům, aminoglykosidům, potencovaným sulfonamidům, fluorochinolonům, makrolidům a klindamycinu a také různým dezinfekcím.

Omezené možnosti léčby jsou hlavním důvodem, proč jsou infekce MRSA tak nebezpečné. Jinak nejsou MRSA v zásadě virulentnější než jejich citlivé protějšky. Na rozdíl např. od *E. coli* ST131 se zatím nevyskytl žádný dominantní pandemický klon, který by si získal celosvětovou převahu. Spíše jsou různé ST (sekvenční typy, rozlišované metodou *multilocus sequence typing*) asociovány s epidemiemi v určité době v určité oblasti. Například v Evropě nyní převažuje MRSA ST80, zatímco ve Spojených Státech je to hlavně ST8. Určitou výjimku tvořil epidemický kmen USA300 právě z ST8, který byl zřejmě agresivnější a invazivnější než jiné MRSA a rozšířil se rychle po celých Spojených Státech.

Každý kmen stafylokoků izolovaný z místa infekce je nutné testovat na citlivost k antimikrobikům. V *in vitro* testech se místo meticilinu používá oxacilin nebo cefoxitin; rezistence k těmto látkám indikuje rezistenci k meticilinu. Bez ohledu na další výsledky je nutno u těchto kmenů předpokládat rezistenci na všechna betalaktamová antibiotika a nenasazovat je v terapii. Velmi dobrou látkou zejména k léčbě stafylokokových osteomyelitid je klindamycin, avšak pokud *in vitro* testy ukazují sníženou citlivost k makrolidům (např. erytromycinu), je třeba předpokládat vývoj rezistence ke klindamycinu i během terapie. Také chinolony jsou málo vhodné, i u nich dochází rychle k vývoji rezistence. Vankomycin (glykopeptidové antibiotikum) je pak vyhrazeno striktně pro použití u člověka. Proto je někdy velmi obtížné najít použitelnou a dostupnou léčivou látku. K novým léčivům doporučovaným na tyto infekce patří tigecyklin a linezolid.

Rezistence k vankomycinu a dalším glykopeptidům není u stafylokoků naštěstí běžná. Většinou se setkáváme s tzv. VISA – vankomycin-intermediárními kmeny, které mají sníženou citlivost. U těchto kmenů v přítomnosti kontinuálního selekčního tlaku (v prostředí, kde je používán vankomycin), dochází k dlouhodobé kumulaci mutací vedoucích k postupnému zvyšování MIC (minimální inhibiční koncentrace, nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, které musí být v tkáni dosaženo, aby byl potlačen růst daného bakteriálního kmene). Naproti tomu tzv. VRSA kmeny s vysokou rezistencí k vankomycinu vznikají, pokud dojde k přenosu plazmidově kódovaného genu *vanA* z vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE). K tomu

naštěstí nedochází příliš často, protože enterokoky nejeví ochotu sdílet své plazmidy s jinými bakteriálními druhy.

## 2.4.2 Vankomycin-rezistentní enterokoky

Enterokoky patří k nejběžnějším nosokomiálním patogenům. Jsou nejčastější příčinou bakteriemií s následkem endokarditidy a infekcí močového traktu. Jsou součástí střevní mikrobioty a vykazují mimořádnou rezistenci vůči různým environmentálním vlivům; lze je izolovat ze všech možných povrchů v nemocničním prostředí. Prostředí je hlavním zdrojem rezistentních kmenů (více než endogenní mikrobiota), ale použití antibiotik, zejména opakované použití různých látek, poskytuje enterokokům selekční výhodu a výrazně zvyšuje jejich zastoupení ve střevě. Lidé, ale i zvířata, vracející se z jednotek intenzivní péče, si s sebou často odnášejí obrovskou „nálož“ rezistentních kmenů, které mohou perzistovat týdny, ba měsíce. Z asi 30 známých druhů enterokoků nejčastěji je s infekcemi asociován *E. faecalis*; *E. faecium* však snadněji získává rezistenci a většina VRE je právě *E. faecium*.

Šíření VRE v nemocnicích je hlášeno od 80. let. Zatímco v USA byl výskyt vázán primárně na nemocnice, v Evropě hrál pravděpodobně hlavní roli jiný zdroj: hospodářská zvířata, u nichž byl používán avoparcin, látka ze skupiny glykopeptidů, jako růstový stimulant. Bakterie, které si v důsledku selekčního tlaku avoparcinu vyvinuly zkříženou rezistenci k vankomycinu, kolonizovaly člověka. Díky ko-selekcí s jinými geny rezistence se udržely v animální populaci i poté, co byl avoparcin a posléze všechny antibiotické růstové stimulanty zakázány.

Enterokoky jsou přirozeně málo citlivé k betalaktamům a nízkým dávkám aminoglykosidů. Mutací dochází ke zvýšené produkci PBP5 (proteinu vázajícího penicilin) s nízkou afinitou k betalaktamům. Rezistence k aminoglykosidům je dána nízkou propustností buněčné stěny a zvyšuje se, pokud je podpořena produkcí plazmidově kódovaných modifikujících enzymů. Na druhou stranu je-li citlivost pouze snižena, vykazují betalaktamy a aminoglykosidy dobrý synergistický efekt; betalaktamy umožňují lepší pronikání aminoglykosidů buněčnou stěnou.

Rezistence k vankomycinu je získaná, spjatá s plazmidy nesoucími geny *vanA* nebo *vanB*, méně často jiné varianty (*vanE*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*). Jedna z těchto variant se vždy nachází v klastru (shluku) s dalšími geny, nezbytnými pro vznik rezistence: *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*. Účinkem produktů těchto genů dochází ke změně konkrétního kroku syntézy peptidoglykanu, který je cílem glykopeptidových antibiotik. Vankomycin a další glykopeptidy se váží k molekule D-Ala-D-Ala, která vzniká spojením dvou alaninů enzymem ligázou. D-Ala-D-Ala s UDP-N-acetylmuramyltripeptidem tvoří pentapeptid, který je inkorporován do peptidoglykanu v procesu tzv. transglykosylace (následuje transpeptidace, tedy tvorba příčných můstků, která je cílem betalaktamových antibiotik). VanA a VanB jsou ligázy a společně s dalšími Van proteiny zajišťují, že místo D-Ala-D-Ala vzniká molekula D-Ala-D-Lac, k níž se vankomycin a další glykopeptidy vážou velmi špatně.

U některých kmenů VRE dokonce došlo k pozoruhodnému paradoxu: místo rezistence si vyvinuly doslova závislost na vankomycinu. Tyto kmeny ztratily schopnost tvořit peptidoglykan normálním způsobem a potřebují přítomnost vankomycinu k indukci exprese VanA, zajišťujícího syntézu peptidoglykanu přes D-Ala-D-Lac.

Možnosti léčby infekcí VRE jsou dost omezené. Některé enterokoky rezistentní k vancomycinu mohou být stále relativně citlivé k teikoplaninu (zejména je-li přítomen jiný protein než VanA), ale nelze na to spoléhat. Enterokoky jsou běžně rezistentní k makrolidům, klindamycinu i fluorochinolonům. Obecně se doporučuje použití linezolidu nebo tigecyklinu. Nitrofurantoin je vhodný na infekce močového traktu.

### 2.4.3 *Escherichia coli* ST131

*E. coli*, zejména shigatoxigenní kmeny (STEC), vešla do obecného povědomí jako příčina nebezpečných průjemových onemocnění, avšak častěji se s ní setkáváme jako s původcem tzv. extraintestinálních infekcí. ExPEC (extraintestinální patogenní *E. coli*) patří vedle *P. aeruginosa* k nejčastějším gramnegativním nosokomiálním patogenům, asociovaným s širokou škálou od infekcí měkkých tkání po septikémie a meningitidy. Kromě toho je také nejběžnějším původcem infekcí močového traktu bez vazby na nemocnice. Zdrojem těchto infekcí bývá vlastní střevní mikroflóra. Vzhledem ke genetické plasticitě tohoto bakteriálního druhu a oportunnímu charakteru extraintestinálních infekcí jsou izoláty z nich skutečně velice variabilní, s různými kombinacemi genů virulence i rezistence. Navzdory tomu některé kmeny nebo klonální linie (klonem rozumíme soubor populaci odvozenou asexuálním dělením z původně jediné buňky) dokázaly kolonizovat hostitele a přenášet se úspěšněji než jiné, rozšiřivše se po celém světě. Tyto tzv. pandemické klonální linie se liší virulencí, mírou i typem rezistence. K pandemickým liniím humánních ExPEC, způsobujících septikémie, meningitidy a infekce močového traktu, patří například sekvenční typy ST69, ST73, ST95, ST393, ST648 a zejména ST131. (Sekvenční typ je určován metodou MLST, sekvenováním několika „housekeeping“ genů, zajišťujících základní metabolické pochody. Tato metoda slouží ke studiu příbuznosti izolátů a fylogenetické struktury bakteriální populace.) Zde se zaměříme na ST131, protože tato klonální linie představuje unikátní ukázkou vysoce úspěšného patogenu, spojujícího antibiotickou rezistenci se značnou virulencí.

Infekce spojené s *E. coli* ST131, vykazující rezistenci k fluorochinolonům a produkující širokospektrální betalaktamázy, byly zaznamenány po roce 2000. První případy se objevily u cestujících z Indie, brzy však tuto asociaci ztratily a rozšířily se po celém světě, a to jak v nemocnicích, tak především v běžné populaci. Nejedná se tedy o typický nosokomiální infek. Naopak, zatímco v nemocnicích se setkáváme s celou řadou oportunně patogenních kmenů *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* aj., mimo nemocnice hraje ST131 hlavní roli – je zodpovědná za většinu močových infekcí rezistentních k fluorochinolonům a více než polovinu infekcí spojených s produkcí ESBL. Snadno se přenáší v rámci různých komunit, například mezi členy domácnosti (včetně domácích mazlíčků) nebo v domovech pro seniory. Právě senioři představují skupinu se zvýšeným rizikem infekcí močového traktu. Infekce ST131 jsou spojené se značnou virulencí, oproti jiným klonálním liniím je zde vyšší riziko vývoje pyelonefritidy (tedy napadení vyšších částí močového aparátu) a bakteriémie (systémové infekce). Kupodivu u ST131 nenacházíme nejtypičtější geny virulence ExPEC, jako jsou P fimbrie a CNF1.

Klonální linie ST131 není homogenní, zahrnuje několik sublinií. Oproti prvnímu pozorování se ukázalo, že většina ST131 neprodukuje ESBL a ne všechny jsou rezistentní k fluorochinolonům. Tyto vlastnosti byly získány postupně mutacemi a přenosem plazmidů. U

člověka se nejčastěji setkáváme se sublinií H30 (podle typu fimbriálního adhezinu FimH). Kmeny ze sublinie H30 mohou být citlivé k fluorochinolonům a neprodukovat ESBL (FQS, ESBL-), rezistentní k fluorochinolonům (H30-R; FQR, ESBL-) nebo rezistentní k fluorochinolonům a navíc producenti ESBL (H30-Rx; FQR, ESBL+). Sublinie H22 a H35 bývají obvykle obě FQR a ESBL+.

Rezistence k fluorochinolonům vzniká obvykle v důsledku mutace genů *gyrA* a *parC* pro DNA gyrázu, respektive topoizomerázu, často ještě v kombinaci s plazmidovým genem *aac(6')-Ib-cr*, zodpovědným za sníženou citlivost k fluorochinolonům a rezistenci k aminoglykosidům amikacinu a tobramycinu. Kromě toho je běžná rezistence k tetracyklinům a potencovaným sulfonamidům. Rezistenci k vyšším generacím betalaktamových antibiotik získaly některé kmeny přijetím plazmidů kódujících ESBL, nejčastěji typu CTX-M-15. Již tato kombinace nechává velmi omezený výběr použitelných terapeutik; obzvláštní obavy proto vzbuzuje možnost rozšíření rezistence ke karbapenemům (zaznamenána produkce karbapenemáz typu NDM a OXA-48) a kolistinu (geny *mcr*).

Fakt, že ST131, zejména sublinie H30, je primárně adaptována na člověka, neznamená, že se tato problematika netýká také veterinárních lékařů. Kromě toho, že multirezistentní uropatogenní *E. coli* se stále častěji objevují také u psů, představují zvířata, jak hospodářská, tak i domácí mazlíčci, možný rezervoár ST131 pro člověka. Bylo zjištěno, že sublinie H22 asymptoticky kolonizuje střevo drůbeže a stále více se spekuluje, že drůbeží produkty mohou být zdrojem i různých jiných kmenů ExPEC pro člověka. ST131 se velmi dobře přenáší mezi členy domácnosti včetně psů a koček. Kolonizace střeva může být asymptomatická, anebo, v přítomnosti určitých predispozičních faktorů, předchází vzniku infekce. Význam ST131 spočívá tedy a) v relativně vysoké virulenci, vedoucí k vyššímu riziku vzniku pyelonefritidy a s ní asociované septikémie; b) rezistenci k antimikrobikům běžně používaným na léčbu urogenitálních infekcí, zejména aminoglykosidů, potencovaných sulfonamidů a fluorochinolonů; častá je také produkce širokospektrých betalaktamáz; c) vysoce efektivní kolonizaci a přenosu mezi lidmi, ale i zvířaty, vedoucí k celosvětovému rozšíření této klonální linie.

Doporučená četba:

Raza T., Ullah S.R., Mehmood K., Andleeb S. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc.* 2018 May;68(5):768-772.

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Oct;13(4):686-707.

Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Apr;17(4):203-218.

Mathers A.J., Peirano G., Pitout J.D. *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv Appl Microbiol.* 2015;90:109-54.





## 1. Taxonomický přehled

Systematický přehled medicínsky významných bakterií může být koncipován čistě taxonomicky nebo může být pro potřeby bakteriologické diagnostiky zjednodušen na využití pouze základních fenotypových znaků, jako jsou tvar buňky, barvitelnost (Grama, Z-N), tvorba spor, vztah ke kyslíku a případně další znaky. V učebnicích veterinární i lékařské mikrobiologie se kapitoly speciální bakteriologie historicky člení tímto druhým jednodušším způsobem podle fenotypových znaků. Toto členění bylo zvoleno i v tomto učebním textu. Přesto by měl student získat přehled o taxonomii bakterií, která je založena na výsledcích získaných metodami molekulární biologie. Takový přehled dává tabulka č. 1.

Kmen	Třída	Řád	Čeleď	Rod	Druh
Actinobacteria (actinomy- cety)	Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. bovis</i>
					<i>C. diphtheriae</i>
					<i>C. kutscheri</i>
					<i>C. pilosum</i>
					<i>C. pseudotuberculosis</i>
					<i>C. renale</i> a další
			Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>	<i>D. congolensis</i>
			Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>
					<i>M. roseus</i> a další
				<i>Kocuria</i>	<i>K. flava</i> a další
			<i>Renibacterium</i>	<i>R. salmoninarum</i>	
			Micromonospora- ceae	<i>Micromonospora</i>	producenti aminoglykosidů
			Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. africanum</i>
					<i>M. avium</i> susp. <i>avium</i>
					<i>M. avium</i> susp. <i>paratuberculosis</i>
					<i>M. bovis</i>
					<i>M. bohemicum</i>
					<i>M. caprae</i>
					<i>M. intracellulare</i>
					<i>M. leprae</i>
					<i>M. lepraemuris</i>
					<i>M. marinum</i>
					<i>M. microti</i>
<i>M. pinnipedii</i>					
<i>M. kansasii</i>					
<i>M. suricattae</i>					
<i>M. tuberculosis</i>					
Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	<i>N. asteroides</i> a další			
	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. equi</i> a další			

			Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i> a další
			Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	asi 550 druhů
Bacterioidetes	Bacterioidetes	Bacteriodales	Bacteriodaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i>
					<i>B. thetaiotaomicron</i>
		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>F. psychrophilum</i>
					<i>F. columnare</i>
				<i>Ornithobacterium</i>	<i>O. rhinotracheale</i>
Chlamydiae	Chlamydiae	Chlamydiales	Chlamydiaceae	<i>Chlamydia</i>	<i>Ch. pecorum</i>
					<i>Ch. muridarum</i>
					<i>Ch. suis</i>
					<i>Ch. trachomatis</i>
					<i>Ch. abortus</i>
					<i>Ch. caviae</i>
					<i>Ch. felis</i>
					<i>Ch. pneumoniae</i>
<i>Ch. psittaci</i>					
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i>
					<i>B. cereus</i>
					<i>B. mycooides</i>
					<i>B. subtilis</i> a další
			Listeriaceae	<i>Listeria</i>	<i>L. grayi</i>
					<i>L. ivanovii</i>
					<i>L. innocua</i>
					<i>L. monocytogenes</i>
					<i>L. seeligeri</i>
			<i>Brochothrix</i>	<i>B. thermosphacta</i>	
		Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. alvei</i>	

				<i>P. larvae</i>	
				<i>P. polymyxa</i> (polymyxiny)	
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	
				<i>S. delphini</i>	
				<i>S. epidermidis</i>	
				<i>S. felis</i>	
				<i>S. gallinarum</i>	
				<i>S. hyicus</i>	
				<i>S. intermedius</i>	
				<i>S. pseudintermedius</i>	
		Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>E. faecalis</i>	
					<i>E. faecium</i>
					<i>E. gallinarum</i>
					<i>E. moraviensis</i>
					<i>E. hirae</i> a 46 dalších
				<i>Melissococcus</i>	<i>M. plutonius</i>
			Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
				<i>Lactococcus</i>	<i>L. piscium</i>
					<i>L. garvieae</i>
				<i>Streptococcus</i>	<i>S. agalactiae</i>
			<i>S. canis</i>		
			<i>S. dysgalactiae</i>		
			<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>		
			<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>		
			<i>S. iniae</i>		
			<i>S. pneumoniae</i>		
			<i>S. porcinus</i>		
			<i>S. pyogenes</i>		
			<i>S. suis</i>		
				<i>S. uberis</i> a 81 dalších druhů	
Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i>	
				<i>C. chauvoei</i>	

					<i>C. colinum</i>	
					<i>C. histolyticum</i>	
					<i>C. novyi</i>	
					<i>C. piliforme</i>	
					<i>C. septicum</i>	
					<i>C. soledellii</i>	
					<i>C. tetani</i>	
			Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>	<i>F. prausnitzii</i>	
	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelothrix</i>	<i>E. rhusiopathiae</i>	
					<i>E. tonsillarum</i>	
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. necrophorum</i>	
			Leptotrichiaceae	<i>Streptobacillus</i>	<i>S. moniliformis</i>	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i>	<i>A. bovis</i>	
					<i>A. caudatum</i>	
					<i>A. centrale</i>	
					<i>A. marginale</i>	
					<i>A. ovis</i>	
					<i>A. phagocytophilum</i>	
			<i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i>		
			<i>Neorickettsia</i>	<i>N. risticii</i>		
				<i>N. elokominica</i>		
			Rickettsiaceae	<i>Rickettsia</i>	<i>Orientia</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
					<i>R. rickettsii</i>	
					<i>R. conori</i>	
					<i>R. sibirica</i>	
					<i>R. felis</i>	
		<i>R. japonica</i>				
		<i>R. prowazekii</i>				
		<i>R. typhi</i> a další				
Rhizobiales	Bartonellaceae	<i>Bartonella</i>	<i>B. henselae</i> a 10 dalších			
	Brucellaceae	<i>Brucella</i>	<i>B. abortus</i>			
				<i>B. canis</i>		

				<i>B. ceti</i>	
				<i>B. inopinata</i>	
				<i>B. melitensis</i>	
				<i>B. microti</i>	
				<i>B. neotomae</i>	
				<i>B. ovis</i>	
				<i>B. papionis</i>	
				<i>B. pinnipedialis</i>	
				<i>B. suis</i>	
				<i>B. vulpis</i>	
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i>	
			<i>Bordetella</i>	<i>B. avium</i>	
				<i>B. bronchiseptica</i>	
				<i>B. pertussis</i>	
		<i>Pelistega</i>	<i>P. europaea</i>		
		<i>Taylorella</i>	<i>T. equigenitalis</i>		
			<i>T. asinigenitalis</i>		
		Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	
<i>B. mallei</i>					
<i>B. pseudomallei</i> a 29 dalších					
Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>A. bestiarum</i>	
				<i>A. caviae</i>	
				<i>A. hydrophila</i>	
				<i>A. media</i>	
				<i>A. salmonicida</i>	
	<i>A. veronii</i> a další				
	Enterobacterales	Budviciaceae			<i>Budvicia</i>
					<i>Leminorella</i>
					<i>Pragia</i>
		Enterobacteriaceae			
<i>Cronobacter</i>					
<i>Enterobacter</i>					
				15 druhů	
				<i>C. sakazakii</i> a 6 dalších druhů	
				<i>E. cloaceae</i> a 21 dalších druhů	

--

		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> a 4 další druhy
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> a další druhy
		<i>Salmonella</i>	<i>S. bongori</i> <i>S. enterica</i> s 6 poddruhy
		<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> <i>S. boydii</i> , <i>S. flexnerii</i> , <i>S. sonnei</i>
	Hafniaceae	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. ictalurii</i> <i>E. tarda</i>
	Morganellaceae	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
		<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
	Yersiniaceae	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>S. rubidea</i>
		<i>Yersinia</i>	<i>Y. aldovae</i>
			<i>Y. enterocolitica</i>
			<i>Y. pestis</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. ruckeri</i> a 15 dalších druhů			
nejasné zařazení	<i>Plesiomonas</i>	<i>P. shigelloides</i>	
Legionellales	Legionellaceae	<i>Legionella</i>	<i>L. pneumophila</i> a 65 dalších druhů
	Coxiellaceae	<i>Coxiella</i>	<i>C. burnetii</i>
Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Actinobacillus</i>	<i>A. equuli</i>
			<i>A. pleuropneumoniae</i>
			<i>A. suis</i>
		<i>Avibacterium</i>	<i>A. avium</i>
			<i>A. gallinarum</i>
			<i>A. paragallinarum</i>
		<i>Bibersteinia</i>	<i>B. trehalosi</i>
		<i>Gallibacterium</i>	<i>G. anatis</i>
			<i>G. salpingitidis</i>
		<i>Glaesserella</i>	<i>G. parasuis</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>H. ducreyi</i>		
	<i>H. felis</i>		

				<i>H. haemoglobinophilus</i>
				<i>H. influenzae</i>
				<i>H. paracuniculus</i>
				<i>H. piscium</i>
			<i>Histophilus</i>	<i>H. somni</i>
			<i>Mannheimia</i>	<i>M. haemolytica</i>
			<i>Pasteurella</i>	<i>P. anatis</i>
				<i>P. canis</i>
				<i>P. gallicida</i>
				<i>P. multocida</i>
				<i>P. pneumotropica</i> a další
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i> a 56 dalších druhů
			<i>Moraxella</i>	<i>M. bovis</i> <i>M. canis, M. caprae, M. catarrhalis</i> <i>M. cuniculi, M. equi, M. porci</i> a další
		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
				<i>P. putida</i>
				<i>P. stutzeri</i> a řada dalších druhů
	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i>
				<i>V. metchnikovii</i>
				<i>V. parahaemolyticus</i>
Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Lawsonia</i>	<i>L. intacellularis</i>
Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	<i>A. butzleri</i> a další
			<i>Campylobacter</i>	<i>C. coli</i>
				<i>C. fetus</i>
				<i>C. jejuni</i>
				<i>C. upsaliensis</i>
		Helicobacteraceae	<i>Helicobacter</i>	<i>H. anseris, H. canis</i>
				<i>H. felis, H. pullorum</i>
<i>H. suis, H. rodentium</i>				
<i>H. pylori</i>				



Spirochaetes	Spirochaetia	Brachyspirales	Brachyspiraceae	<i>Brachyspira</i>	<i>B. aalborgi</i>
					<i>B. hyodysenteriae</i>
					<i>B. hamptoni</i>
					<i>B. innocens, B. intermedia</i>
					<i>B. pilosicoli</i>
		<i>B. suianatina</i>			
		Leptospirales	Leptospiraceae	<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans</i>
					řada druhů (sérotypy)
		Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Borrelia</i>	<i>B. burgdorferi sensu lato</i>
<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i>				
	<i>T. pallidum</i>				
	<i>T. paraluisuniculi</i>				
<i>T. paraluisleporis</i>					
Tenericutes	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Acholeplasma</i>	<i>A. laidlawii</i>
		Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma</i>	<i>M. agalactiae</i>
					<i>M. bovis</i>
					<i>M. capricolum</i>
					<i>M. gallisepticum</i>
					<i>M. hyopneumoniae</i>
					<i>M. haemofelis, M. haemocanis,</i>
					<i>M. haemosuis, M. meleagridis,</i>
					<i>M. mycoides, M. synoviae a další</i>
				<i>Ureaplasma</i>	<i>U. felinum, U. canigenitalium,</i>
<i>U. cati</i>					



## 2. Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky

### 2.1 Řád Enterobacterales

Řád Enterobacterales třídy Gammaproteobacteria je z klinického hlediska jednou z nejvýznamnějších skupin gramnegativních bakterií a zahrnuje v současnosti již přes třicet rodů a více než sto druhů v několika čeledích. Na prvním místě je čeleď Enterobacteriaceae, do níž řadíme nejvýznamnější patogeny, a dále čeledi Yersiniaceae, Morganellaceae, Hafniaceae a Budviciaceae. Enterobakterie charakterizuje řada společných vlastností. Jedná se o rovné gramnegativní tyčinky délky cca 0,6 – 6  $\mu\text{m}$ . Významnou složkou buněčné stěny je lipopolysacharid (LPS), který je antigenní determinantou a zároveň faktorem virulence. Většina zástupců je pohyblivá a exprimuje peritrichální bičíky. Jsou fakultativně anaerobní, typicky pozitivní v katalázové a negativní v oxidázové zkoušce. Obvykle redukují nitráty na nitrity v procesu tzv. anaerobní respirace, zvyšujícím metabolickou efektivitu v anaerobním prostředí. Preferují fermentativní využití glukózy a řady dalších cukrů, což může posloužit k rozlišení jednotlivých druhů. Důležitým rozlišujícím znakem je fermentace laktózy, pozitivní u tzv. koliformních bakterií.

#### 2.1.1 Výskyt

Enterobakterie se běžně vyskytují v půdě, jiní, jak název čeledi napovídá, žijí v střevním traktu člověka a zvířat jako komenzálové a do prostředí se dostávají fekální kontaminací. Výjimku tvoří některé obligátní patogeny člověka a zvířat, adaptované striktně na parazitický způsob života (např. hostitelsky specifické sérotypy salmonel).

#### 2.1.2 Patogenita

Přestože většina enterobakterií patří mezi běžnou environmentální a komenzální mikroflóru, čeleď zahrnuje i tak notorické patogeny, jako jsou původci lidského moru nebo břišního tyfu. Avšak i mnozí komenzálové vykazují oportunní patogenitu a bývají příležitostně izolovány z infekcí mimo střevní trakt; mohou kontaminovat rány, infikovat přirozeně sterilní místa (děloha, močové cesty, plíce), po masivním průniku do cirkulace mohou být příčinou sepse. Významnou roli zde hraje právě lipopolysacharid, který, uvolněn následkem lýzy bakteriální buňky, působí jako stimulátor systémové zánětlivé odpovědi, vedoucí k septikemickému šoku.

V klinické a diagnostické praxi se setkáváme s několika významnými patogeny, které během evoluce získaly řadu specifických faktorů virulence, umožňujících způsobovat gastrointestinální, ale i závažné systémové infekce u různých hostitelských druhů. K takovým patogenům patří rody *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* a *Yersinia*. S oportunními infekcemi bývají často asociovány rody *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* a *Cronobacter*, v některých specifických případech se setkáváme např. s rody *Morganella*, *Providentia*, *Edwardsiella*,

*Hafnia*, zatímco rody *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Pantoea* aj. mají význam především jako kontaminující mikroflóra. Někteří environmentální zástupci jsou patogeny rostlin (*Erwinia* spp.), jiné nebyly dosud asociovány s žádným onemocněním (např. naše „domácí“ bakterie *Pragia* spp. a *Budvicia aquatica* z čeledi Budviciaceae).

Kromě **lipopolysacharidu** (endotoxinu) jsou mezi enterobakteriemi rozšířené další faktory virulence, umožňující oportunně patogenní životní styl. Patří mezi ně **polysacharidová kapsula** a různé **fimbriální** a **afimbriální adheziny**, díky nimž může bakterie kolonizovat nové povrchy. Jelikož lipopolysacharid, kapsula, bičík i fimbrie (označované jako **antigeny O, K, H** a **F**) jsou imunogenní struktury, vysoká antigenní variabilita, případně schopnost fázové variace představuje pro bakterii velkou výhodu. Dále je pro jejich přežití ve vnitřním prostředí naprosto esenciální schopnost efektivně vázat železo a konkurovat tak vazebným proteinům hostitelského organismu. Mezi různými zástupci čeledi Enterobacteriaceae je rozšířen katecholátový siderofor **enterobactin** i další **siderofory (aerobactin, salmochelin, yersiniabactin)**.

### 2.1.3 Diagnostika

Všeobecně vzato, zástupce čeledi Enterobacteriaceae a příbuzných čeledí od sebe nelze rozlišit mikroskopicky ani na úrovni rodu, avšak snadno se kultivují a díky své biochemické aktivitě se dají i dobře identifikovat komerčními biochemickými multitesty. Interpretace výsledků však může být ošemetná. Vzhledem k ubikvitárnímu výskytu environmentálních rodů je nezbytně nutné zabránit kontaminaci vzorků. Čistá kultura izolovaná z přirozeně sterilního vzorku (např. hluboký děložní stěr nebo moč odebraná cystocentézou) představuje jednoznačný výsledek. Z přirozeně kontaminovaného vzorku (rektální výtěr) obvykle získáme smíšenou kulturu, v níž je velice obtížné identifikovat skutečného původce. Je proto nezbytné přistoupit k podrobnější charakterizaci izolovaných druhů (například sérotypizaci), nebo již zpočátku zvolit speciální kultivační postup k selekci určitých patogenů.

Enterobakterie většinou rychle rostou na krevním agaru za standardních podmínek (**aerobní atmosféra, 37°C, 24 hodin**). Nejvhodnějším selektivně-diagnostickým médiem pro enterobakterie je **MacConkey agar (MCA)**. Toto médium využívá žlučové soli jako selektivní složku, potlačující růst většiny grampozitivních bakterií i mnohé gramnegativy, zatímco enterobakterie jsou vůči jejich účinku rezistentní. Běžný MacConkey obsahuje jako substrát laktózu a umožňuje tak odlišení laktóza-pozitivních zástupců (zejména *Escherichia coli*). Fermentací laktózy dojde k okyselení média a indikátor (neutrální červeně) zbarví kolonie a někdy i jejich okolí jasně růžově. Alternativou MacConkeyova média je **Endo agar**, na němž bakterie fermentující laktózu vytvářejí kolonie s kovově zeleným leskem, zatímco laktóza-negativní rody jsou, stejně jako na MacConkeyi, bezbarvé. **Simmonsův citrátový agar** umožňuje rozpoznat rody schopné využívat citrát jako jediný zdroj uhlíku. Tento proces doprovází zvýšení pH, vedoucí ke změně barvy média ze zelené na modrou. **Agar s brilantovou zelení (BG)** a **xylóza-lyzin-deoxycholátový agar (XLD)** jsou příklady médií určených k selektivní izolaci salmonel. V současnosti jsou k dispozici i mnohá komerční chromogenní média, umožňující rychlou identifikaci kýžených rodů, které na nich rostou v charakteristicky zbarvených koloniích.

Jednotlivé biochemické testy sloužící k určení jednotlivých druhů v rámci čeledi, jako například zkouška na indol, ureázu, Voges-Proskauerova zkouška a test s metylčervení, jakož i

fermentace různých sacharidů, dnes nahradily **komerční multitesty** prováděné v mikrozku-mavkách. **TSI agar** (triple sugar iron) detekuje fermentaci glukózy (s nebo bez produkce plynu) a laktózy nebo sacharózy spolu s produkcí sirovodíku. Rychlejší a přesnější alternativu před-stavuje identifikace druhů **hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF**.

Za určitých okolností je nutno sáhnout k podrobnější charakterizaci izolovaného kmene v rámci druhu. To se týká především významných patogenů, jako je *Salmonella* spp. a *E. coli*, u nichž se často nelze obejít bez **určení sérotypu** obvykle skličkovou aglutinací. Sérotyp určuje na prvním místě tzv. somatický O antigen, vlastně imunogenní část lipopolysacharidu, a bičí-kový antigen H, někdy také kapsulární (K) a fimbriální (F) antigeny. V některých případech je nutná detekce různých genů asociovaných s virulencí molekulárními metodami. Vzhledem k rozšířené antimikrobiální rezistenci u enterobakterií obecně a zejména výskytu významných multirezistentních linií některých patogenů by mělo být testování citlivosti k antimikrobikům samozřejmostí.

#### 2.1.4 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* zahrnuje několik druhů, z nichž zdaleka nejznámějším je *Escherichia coli*. Tento druh se stal modelovým organismem v mikrobiologii, první bakterii, jejíž genom byl kompletně sekvenován, a lze říci, že je nejprostudovanější bakterií vůbec. Přesto – nebo právě proto – je zřejmé, že se o ní stále ví příliš málo.

*E. coli* je rovná gramnegativní pohyblivá tyčinka. Je typickým obyvatelem intestinál-ního traktu člověka a většiny zvířat. Kmeny, jejichž zdrojem je prostředí, matka a případně další přítomní jedinci, kolonizují střevo již v prvních hodinách života a po ustálení rovnováhy střevní mikroflóry perzistují po celý život jedince. V průběhu života se ve střevě přechodně objevují i další, tzv. transientní kmeny, které však střevo již obvykle efektivně nekolonizují. Ačkoli je pravděpodobně nejprevalentnějším gramnegativním fakultativním anaerobem, tvoří relativně nízké procento střevní mikroflóry (cca 0,1 % u člověka). Většina kmenů efektivně zkvašuje laktózu a produkuje indol. Naopak neprodukuje ureázu ani sirovodík a neroste na Simmonsově citrátovém médiu.

Další druhy rodu *Escherichia* – *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* – se liší biochemickou aktivitou a patogenním potenciálem. *E. albertii* je nepohyblivá, fermentuje manitol, nikoli však laktózu. Byla asociována s gastroenteritidou u lidí. *E. fergussonii* je poten-ciálním původcem extraintestinálních infekcí, jako je septikémie a infekce močového traktu. *E. hermannii* a *E. vulneris* byly příležitostně izolovány z ran.

*E. coli* je extrémně variabilní bakterií. Zahrnuje komenzální kmeny s velmi nízkým pa-togenním potenciálem, kmeny asociované s řadou extraintestinálních onemocnění a kmeny způsobující různými mechanismy gastrointestinální onemocnění. Z tohoto hlediska hovoříme o tzv. patotypech; **patotyp** způsobuje specifický klinický syndrom definovaným mechanis-mem, pro nějž je vybaven konkrétními faktory virulence. Ty bývají velice často kódovány tzv. akcesorním genomem (na rozdíl od základního – core – genomu, zajišťujícím základní životní funkce bakterie), jež tvoří např. plasmidy nebo geny, které jsou na chromozomu umístěny spo-lečně v logických funkčních jednotkách – tzv. ostrovech patogenity (PAIs). Strukturální ana-lýza PAIs prozrazuje, že vznikly integrací nějakého mobilního genetického elementu do

chromozomu, např. plazmidu nebo fága. Tak například enterotoxiny ETEC bývají kódovány transmisibilními plazmidy, zatímco geny pro shigatoxiny se dostaly do genomu temperovaným fágem. Tzv. LEE (*locus of enterocyte effacement*) kóduje celý komplex genů asociovaný se vznikem typických lézí enteropatogenních *E. coli*. Také virulence uropatogenních a aviárních patogenních *E. coli* bývá spojena s přítomností chromozomálních či plazmidových ostrovů patogenity.

*E. coli* lze charakterizovat a klasifikovat z nejrůznějších hledisek. Nejnověji se uplatňují molekulární metody včetně celogenomového sekvenování. Rozlišování tzv. sekvenčních typů (ST) umožňuje sledovat šíření různých patogenních linií v různých populacích a má velký význam z hlediska epidemiologického. V klinické diagnostice se stále uplatňuje sérotypizace. Plný profil vzniká kombinací jednoho z více než 170 O antigenů určujícím séroskupinu s bičíkovým antigenem H, doplňkově ještě s kapsulárním K a fimbriálními F antigeny.

#### **2.1.4.1 Patogenita a patogeneze**

S infekcemi *E. coli* se setkáváme u všech druhů zvířat. V mnoha případech se jedná o oportunní infekce různých tkání. V obecném povědomí je však *E. coli* častěji spojena s průjmovými onemocněními, nezářídka s vážnými důsledky. Pro zjednodušení je vhodné rozdělit si populaci *E. coli* na tři skupiny: komenzální kmeny, kmeny s extraintestinální patogenitou (ExPEC) a intestinální patogenní *E. coli* (IPEC).

##### **2.1.4.1.1 Extraintestinální patogenní *E. coli***

Komenzální *E. coli* v pravém slova smyslu kolonizují střevo a nezpůsobují žádné klinické onemocnění. Mnohé z nich však nejsou bez patogenního potenciálu. Kmeny vybavené faktory virulence, které jim umožňují za určitých okolností invadovat vnitřní prostředí a přežít v daných podmínkách, kolonizují přechodně nebo trvale střevo asymptomatických nosičů. Zdrojem infekce je potom nejčastěji vlastní střevní mikroflóra jedince, která se dostane „kam nemá“, do cirkulace a do míst přirozeně sterilních. K tomu může dojít vnější kontaminací ran či ascendentní infekcí dutých orgánů, například urogenitálního traktu či mléčné žlázy. Mechanické narušení integrity střeva, ale i silná imunosuprese umožňuje přímý přestup přes střevní stěnu do cirkulace.

V rámci ExPEC rozeznáváme několik subtypů: **uropatogenní *E. coli* (UPEC)**, kmeny asociované s **neonatální meningitidou (NMEC)**, **septikemické (SePEC)** a **aviární patogenní (APEC)**. *E. coli* bývá izolována z reprodukčního traktu jako původce metritidy a pyometry. Kontaminuje rány a způsobuje hnisavé infekce podkoží. Jako sekundární patogen může způsobovat hnisavé bronchopneumonie. Hematogenním přenosem napadá klouby a kosti. Mimoto je i důležitým environmentálním původcem mastitidy.

**Septikemické *E. coli*** představují nejméně definovanou skupinu. Septikemie je stav systémové zánětlivé odpovědi na přítomnost bakterií v krvi (bakteriémie). Septikemie může vzniknout prakticky z jakékoli masivní lokalizované infekce či přestupem ze střeva v jakémkoli věku, avšak zdaleka nejohroženější skupinou jsou novorozenci – děti, štěňata a mláďata

hospodářských zvířat. Zásadním predispozičním faktorem je nízký nebo opožděný příjem kolostra. U hypogamaglobulinemických telat či hříbat přestupuje *E. coli* sliznici GIT nebo proniká nezhojeným pupkem. Vzniká bakteriémie, jejímž výsledkem je v případě akutního až perakutního průběhu septikemický šok s rychlou depresí, poklesem tělesné teploty, konvulzemi a kómatem. Prolongovaný průběh vede k lokalizaci infekce do kloubů, mozkových plen či jiných orgánů. Vzniká hnisavá polyartritida, pneumonie nebo meningitida. Patogeneze vzniku septikemie a meningitidy u lidských novorozenců (kmeny NMEC) není dosud zcela objasněna, klíčovým momentem zde však je vysoká bakteriémie, která u dospělých zpravidla nevzniká a která umožňuje přestup bakterií přes hematoencefalickou bariéru.

Ať už je cesta vstupu do cirkulace jakákoli, invazivní septikemické kmeny bývají oproti obyčejným komenzálům vybaveny faktory, jež umožňují přežití ve vnitřním prostředí. Jedná se především o protektivní faktory, chránící bakterie před účinkem komplementu a fagocytózy. K nim patří určité typy **O polysacharidu** (např. O78) a **kapsuly** (zejména K1), maskující a mechanicky chránící bakteriální povrch, a také **povrchové proteiny** interferující s komplementem (Iss, TraT aj.). Septikemické kmeny bývají vybaveny až zdánlivým nadbytkem různých **sideroforů**, jako je např. aerobactin. Schopnost „těžit“ životně důležité železo z velmi chudého prostředí je nezbytným předpokladem pomnožení v cirkulaci. Není dosud zcela jasné, jakou roli hraje v patogenезi schopnost invaze do buněk, prokázaná aspoň u některých kmenů. NMEC pravděpodobně přestupují hematoencefalickou bariéru transcelulárně. K faktorům umožňujícím integraci zipovým mechanismem patří zřejmě CNF-1 (**cytotoxický nekrotizující faktor**), ovlivňující buněčný cytoskeleton.

**Uropatogenní *E. coli*** jsou nejvýznamnějšími původci infekcí močového traktu člověka, ale i psů, a nezdědka lidé sdílejí patogenní kmeny se svými mazlíčky. Zdrojem infekce bývá vlastní perineální mikroflóra, pronikající ascendentně močovou trubicí. Samice jsou pochopitelně predisponovány více než samci, rizikové faktory představují například katetrizace nebo různé poruchy mikce.

Virulentní UPEC nesou často řadu PAIs, kódující různé siderofory, toxiny a kolonizační a protektivní faktory. Zatímco **fimbrie F1** umožňují v iniciálních stádiích infekce vazbu k uroplakinu přechodného epitelu, vysoce virulentní kmeny asociované s pyelonefritidou kódují obvykle **fimbrie P** (F11) nebo mají schopnost změnit exprimovaný typ fimbrií (fázová variace). Bakterie exprimující P fimbrie jsou mnohem rezistentnější k fagocytóze. Kromě nich se uplatňují další fimbrie a afimbriální adheziny (fimbrie S, F1C, Dr, curli, afimbriální adheziny Afa). Pevná adheze k uroepitelu je kritickým krokem infekce, neboť bakterie jsou neustále vyplavovány z močových cest proudem moči. K toxinům, které přispívají k poškození uroepitelu a ledvin, patří **hemolyzin  $\alpha$** , **vakuolizující autotransportérový toxin Vat** a **CNF1**. Zdá se, že určitá část bakterií také invaduje hlubší vrstvy přechodného epitelu, kde vytváří klidové intracelulární rezervoáry, jež mohou být zdrojem rekurentních infekcí.

Mezi urogenitální koliinfekce patří také metritidy a pyometry časté především u klisen a fen. I tyto kmeny často nesou podobné geny jako UPEC. Vznik těchto infekcí je silně svázán s fází pohlavního cyklu (vysoké hladiny imunosupresivního progesteronu v metestru, cystická hyperplazie endometria apod.), s hygienou umělé inseminace apod.

**APEC**, původci kolibacilózy ptáků, jsou mimořádně variabilním patotypem. Především kolibacilóza domácí drůbeže zahrnuje řadu poměrně rozličných infekcí, jako je omfalitida a infekce žloutkového váčku u čerstvě vylíhlých kuřat, respirační infekce u brojlerů a salpingitidy a žloutkové peritonitidy nosnic. Nejzávažnějším projevem u všech kategorií je taktéž septikémie. Na rozdíl od savců (kde vzniká často přestupem z GIT) je její původ převážně respirační, ptáci se infikují vdechnutím kontaminovaného prachu, přičemž velkou roli hrají environmentální a imunosupresivní faktory, jako je stres, stájové plyny a virová či mykoplasmová ko-infekce. Akutní infekce může proběhnout jako hemoragická septikémie s náhlým úhynem, nejčastěji však vzniká polyserositida s fibrinózními nálepy na vzdušných vacích, perikardu a játrech. Infekce může přes vzdušné vaky přestoupit také na vaječníky, ale u starších vysokoprodukčních nosnic bývá vejcovod infikován ascendentně. Peritonitida vzniká rozšířením infekce do tělní dutiny, často je spojena s fibrinózními masami ucpávajícími vejcovod a volným žloutkem v dutině tělní.

Variabilita izolátů asociovaných s kolibacilózou napovídá, že v některých případech se jedná o vyloženě oportunní infekci, zatímco v jiných jsou na vině vysoce virulentní kmeny APEC. Ty se od komenzálů liší řadou faktorů virulence, mnohé z nich nesených na plasmidech typu ColV, které se také považují za typický znak APEC. Podobně jako u jiných extraintestinálních infekcí se zde uplatňují **fimbriální a afimbriální adheziny** (fimbrie F1, termosenzitivní hemagglutinin Tsh), **siderofory** (aerobactin), **protektiny** (Iss, OmpT) aj. Virulentní APEC často patří mezi séroskupiny O1, O2 a O78.

*E. coli* může infikovat rány a kožní traumata, způsobovat hnisavé záněty podkoží a uplatňuje se i jako sekundární původce bronchopneumonií. Mimoto je významným environmentálním původcem mastitid (zdrojem je fekální znečištění prostředí). I v tomto případě se zřejmě jedná o vyloženě oportunní infekci, protože žádný specifický patotyp asociovaný s mastitidami nebyl prokázán, ačkoli některé kmeny jsou zřejmě lépe adaptované k infekci než jiné.

#### **2.1.4.1.2 Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)**

Střevní patotypy *E. coli* tvoří mnohem lépe definované skupiny než ExPEC: jejich patogenita je většinou jednoznačně spjata s přítomností určitých faktorů virulence, respektive jejich kombinace. I tak je variabilita kmenů napadajících různé hostitele v různém věku vysoká. Enterotoxigenní kmeny způsobují vodnaté průjmy především u mláďat hospodářských zvířat v prvním týdnu života a po odstavu. Setkáváme se s nimi však i u psů. Bakterie kontaminující prostředí jsou pozřeny, kolonizují střevo specifickými **fimbriálními adheziny** a produkují **toxiny**, jež ovlivňují funkci iontových kanálů na enterocytech. Influx elektrolytů do lumina střeva vede k sekrečnímu průjmu a dehydrataci, zejména u malých selat a telat často s následkem smrti.

Klíčovým momentem patogeneze je vazba bakterií ke specifickým receptorům ve střevě. Přítomnost či nepřítomnost těchto receptorů určuje citlivost, respektive věkovou či druhovou rezistenci k jednotlivým kmenům ETEC. Tak zatímco kmeny exprimující fimbrie **F4** kolonizují střevo jak novorozených selat, tak odstávčat, ale nikoli jiných druhů, **F5** (K99)-pozitivní kmeny způsobují průjmy u neonatálních selat, telat a jehňat. Dále se u ETEC vyskytují fimbrie **F6** (neonatální selata), **F18** (odstávčata; F18 jsou často spojeny s shigatoxigenními kmeny způsobujícími edémovou chorobu – viz níže) a **F41** (novorozená selata, telata a jehňata).



Po úspěšné kolonizaci produkují ETEC jeden nebo více typů enterotoxinů: **termolabilní**, vysoce imunogenní **LT** a nízkomolekulární **termostabilní STa** a **STb**, někdy také **EAST-1** (původně identifikovaný u tzv. enteroagregativních *E. coli* u lidí). Bez ohledu na přesný mechanismus na molekulární úrovni působí všechny tyto toxiny podobně: indukují sekreci iontů do střeva a vodnatý průjem. Také zde lze zaznamenat různou citlivost různých hostitelům k danému toxinu a u jednotlivých kategorií se setkáváme nejčastěji s konkrétní kombinací faktorů virulence; tak například nejčastějším „virotypem“ u novorozených selat je F4:LT:STa. Kmeny napadající novorozená zvířata bývají obvykle nehemolytické, u starších zvířat často produkují hemolyziny.

#### **2.1.4.1.3 Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)**

Kmeny, které označujeme jako enteropatogenní, bývají spojeny s průjmy zejména u štěňat, selat a králíků a také u dětí. Patogeneze těchto průjmů je zcela odlišná od ETEC a dosud není plně objasněna. EPEC patří mezi kmeny způsobující tzv. *attaching and effacing* léze střevní sliznice (AEEC), doslovně se na ni „připojí a oholí“ ji. Připojení nezprostředkují fimbrie, ale afimbriální adhezín intimin. **Intimin** je kódován na chromozomálním PAI, tzv. **LEE** (*locus of enterocyte effacement*). Spolu s intiminem se zde nacházejí geny pro komponenty sekrečního systému typu 3 (**T3SS**), který slouží k transportu efektorů přes membránu enterocyty. S působky, které indukují přestavbu aktinového cytoskeletu a vymizení mikrokvlků, je přenášen i **Tir**, receptor pro intimin, který je integrován do membrány enterocyty. Po vazbě intiminu na svůj receptor dochází k pevné „intimní“ adhezi bakterie na „podstavce“ vytvořené membránou enterocyty. „Oholené“ enterocyty samozřejmě nemohou plnit svou vstřebávací funkci a dochází k malabsorpci. Předpokládá se však, že bakterie musí střevní sliznici poškozovat ještě jiným způsobem. Kromě intiminu se uplatňují další adheziny, které zprostředkují iniciální vazbu na enterocyt a které se mezi různými kmeny liší, např. tzv. **Bfp** (bundle-forming pilus typu IV) u lidských a **AF/R1**, **AF/R2** a **Ral** u králíčích kmenů.

EPEC způsobují podstavové průjmy selat. Predispozicí, jako u mnoha jiných onemocnění, je stres, dietní změna a imunosuprese. U králíků jsou EPEC významnými enteropatogeny (tzv. REPEC). Infekce vzniká v návaznosti na různé predispoziční faktory (kokcidióza, dietní chyba, chladový a jiný stres) má vysokou mortalitu zejména u sajících králíčat.

#### **2.4.1.1.4 Shigatoxigenní *E. coli* (STEC)**

Produkce **shigatoxinů Stx** definuje shigatoxigenní *E. coli*. Shigatoxiny jsou známy také jako verotoxiny (poškození VERO buněk) a patří mezi toxiny inhibující proteosyntézu. Shigatoxiny jsou homologní toxinům *Shigella dysenteriae*, původce lidské úplavice, a tvoří dvě skupiny: Stx1 a Stx2. Se závažnými infekcemi u člověka jsou spojeny kmeny produkující **Stx2a**, **Stx2b**, **Stx2c** a **Stx2d**. Tyto toxiny jsou zpravidla kódované temperovanými lambda fagy. Naopak **Stx2e** je velmi specificky spjat s edémovou chorobou prasat.

Většina STEC adhezuje ke střevní sliznici výše popsaným způsobem závislým na intiminu, patří tedy mezi AEEC. Takové kmeny nazýváme také enterohemoragické, EHEC, neboť způsobují často velmi závažné krvavé průjmy u člověka a někdy také psů a dalších zvířat. Neméně závažné jsou však důsledky vstřebání toxinů ze střeva a jejich systémového působení (tzv. toxémie). Shigatoxiny poškozují zejména cévní výstelku.

Nejvýznamnějším rezervoárem STEC jsou přežvýkavci, kteří jsou často asymptomatickými nosiči. Zdrojem infekce pak může být špatně upravené kontaminované hovězí maso nebo mléko. Častým zdrojem je však také sekundárně (např. na poli) kontaminovaná zelenina, ovoce a voda. Protože infekční dávka je velice nízká (cca 50 buněk), infekce se šíří i kontaktem s nakaženými lidmi a se zvířecími nosiči. Příznaky u většiny nakažených jsou horečka, zvracení a krvavý průjem. Méně často se projevuje systémový účinek toxinů, tzv. HUS (hemolyticko-uremický syndrom), kdy dochází v důsledku poškození cév a mikroangiopatické hemolytické anémie k závažnému poškození ledvin. HUS v návaznosti na krvavý průjem byl zaznamenán i u psů, ačkoli psi mohou být i asymptomatickými nosiči.

STEC bývají spojeny s omezeným počtem sérotypů, z nichž nejznámější je jistě O157:H7. Tzv. „velkou pětku“ sérotypů tvoří O157, O26, O103, O111 a O145. Velkou epidemií, která v roce 2011 zasáhla s neblahými důsledky zejména Německo, byla způsobena sérotypem O104:H4.

Zvláštní skupinou STEC jsou původci tzv. **edémové choroby prasat** (EDEC). Zdrojem infekce je prostředí a krmivo kontaminované asymptomatickými nosiči, postižena bývají odstávčata, typicky nejlépe prospívající jedinci z vrhu. V patogenezi hraje roli kombinace predispozičních faktorů, s odstavem spojený stres, dietní změna a ztráta laktogenní imunity a také nízká acidita žaludečního prostředí u jedinců přijímajících velké dávky krmiva. Na rozdíl od EHEC tyto kmeny obvykle exprimují **fimbrie F18ab**, nikoli intimin. Receptory pro tyto fimbrie se nachází ve zvýšené míře právě u odstávčat. Kmeny EDEC často produkují  **$\alpha$  hemolysin**, a jsou proto hemolytické.

Pokud EDEC neprodukují ještě další faktory virulence (např. enterotoxiny), způsobují ve vlastním střevě jen nenápadné změny a onemocnění je výsledkem systémového působení Stx2e (toxémie). Poškození cév vede k trombotizaci, hemoragiím a transudaci se vznikem edémů v orgánech a podkoží. Nejnápadnější je edém na čele a očních víčkách. Edém mozku způsobuje nervové příznaky podobné otravě solí.

#### **2.1.4.2 Diagnostika**

Druh vzorků odebíraných na kultivační vyšetření závisí samozřejmě na druhu infekce. V každém případě platí zásada maximální sterility odběru s cílem zabránit kontaminaci vzorku. Vhodnými vzorky při urogenitálních infekcích jsou moč odebraná cystocentézou či hluboký děložní stěr. Původce septikemie můžeme hledat ve stěrech vnitřních orgánů čerstvě uhynulých či utracených jedinců (nejméně kontaminovaným orgánem bývá mozek či kostní dřev). Enterální patogeny hledáme v rektálních výtěrech.

Mezi média vhodná pro kultivaci *E. coli* patří zejména MacConkey agar a Endo agar. Kolonie s typickou morfologií (jasně růžové kolonie obklopené precipitátem) je vhodné subkultivovat na krevní agar, kde můžeme sledovat hemolytickou aktivitu kmene. *E. coli* vytváří na krevním agaru okrouhlé lehce vypouklé kolonie asi 2 mm široké. Hemolýza či mukózní růst se objevuje u některých kmenů. Suspektní kolonie lze identifikovat biochemickými testy či hmotnostní spektrometrií. Je třeba dát si pozor na občasný výskyt laktóza negativních kmenů.

Zatímco pro průkaz extraintestinální infekce stačí obvykle izolace *E. coli* z nekontaminovaného vzorku (ideálně v čisté kultuře), potenciální původce enterálních infekcí je vždy nutné dále identifikovat. Velmi vhodný je průkaz typických genů virulence (geny pro enterotoxiny, fimbrie, shigatoxiny apod.) metodou PCR. Klasickou metodou je sérotypizace. Nejčastěji se provádí sklíčková aglutinace na průkaz typických O antigenů nebo fimbrií. Uplatnění nachází především při určování kmenů ETEC.

K monitoringu výskytu EHEC O157:H7, která je na rozdíl od většiny *E. coli* sorbitol-negativní, lze využít variantu MacConkeyova agaru, v němž je laktóza nahrazena právě sorbitolem. O157:H7 na něm vytváří bezbarvé kolonie. Chceme-li selektivně izolovat *E. coli* určité séroskupiny (např. „velkou pětku“ STEC), nabízí se metoda imunomagnetické separace, sloužící ke koncentraci kýžených sérotypů z pomnožovacího média.

### 2.1.4.3 Terapie a prevence

Základem terapie průjemových onemocnění u mladých zvířat je doplnění tekutin a elektrolytů. Použití antibiotik je kontroverzní a zejména u hospodářských zvířat, kde se podávají plošně, podléhá stále výraznějším omezením. Léčba probíhajících extraintestinálních onemocnění se obvykle bez použití antimikrobik neobejde. Za lék volby na močové infekce psů se nejčastěji považuje amoxicilin-klavulanát nebo potencované sulfonamidy. Gentamicin je obvykle účinný, má však řadu nežádoucích účinků. K použití látek s indikačním omezením, jako jsou cefalosporiny 3. generace, fluorochinolony a kolistin („záchranné“ antibiotikum na koliinfekce), by se mělo přistupovat s maximální zodpovědností. Vzhledem k narůstajícímu výskytu multirezistentních kmenů včetně producentů ESBL musí být každé nasazení antimikrobik doprovázeno testováním citlivosti!

Zejména pro chovatele hospodářských zvířat je schůdnější variantou předcházet infekcím vakcinací zvířat. Ne vždy je to však možné. Vakcíny proti extraintestinálním koliinfekcím (typicky kolibacilóza drůbeže) mají při nejlepší vůli pouze částečný účinek. Na vině je vysoká variabilita původců. Lépe lze ochránit novorozená selata a telata proti enterotoxigenním infekcím imunizací matek před porodem. Vakcíny obsahují kombinaci imunogenního termolabilního toxinu s významnými F antigeny. Možná je i imunizace selat proti edémové chorobě.

### 2.1.5 Rod *Salmonella*

*Salmonella* spp. je pravidelná gramnegativní, většinou pohyblivá enterobakterie, která nezkvašuje laktózu a produkuje sirovodík. Zatímco u savců způsobuje různě závažné enterokolitidy až septikemická „tyfoidní“ onemocnění, jejími přirozenými hostiteli se zdají být původně ptáci a plazi, kteří bývají často asymptomaticky kolonizováni.

Rozlišujeme pouze dva druhy: *S. enterica* a *S. bongori*. *S. enterica* zahrnuje šest poddruhů: subspecies *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) a *indica* (VI). Až na výjimky je však v infekcích implikována *S. enterica* ssp. *enterica*. Přesto je *Salmonella* ssp. vysoce variabilní co do patogenního působení u různých hostitelů. Mnohem praktičtější se proto ukázala být klasifikace na základě sérotypizace na základě tzv. Kauffmann-

Whiteova schémata: somatický O antigen určuje séroskupinu, H antigeny (často exprimované ve dvou fázích) daný sérovar. V současnosti rozeznáváme více než 2500 sérovarů *Salmonella* spp. Pro zjednodušení se běžně uvádí pouze název sérovaru (správně by neměl být kurzívou) a vynechává se druh a poddruh, např. *Salmonella* Typhi nebo *S. Montevideo*. Jednotlivé sérovary se odlišují hostitelskou specifitou i způsobovaným onemocněním, a proto je právě označení sérovaru zásadnější než druh a poddruh.

### 2.1.5.1 Patogenita

Salmonely mohou být spojeny s asymptomatickým nosičstvím – běžná je kolonizace střeva ptáků včetně domácí drůbeže; často jsou izolovány i jako povrchová mikroflóra plazů. Určité sérovary pak způsobují u různých hostitelských druhů různý typ onemocnění. Obecně vzato můžeme rozeznávat dva „patotypy“, spojené s odlišnými syndromy. Toto rozdělení je úzce spjato s hostitelskou specifitou jednotlivých sérovarů. Tak rozeznáváme hostitelsky specifické neboli **hostitelsky adaptované sérovary**, které se evolučně přizpůsobily právě na daný hostitelský druh, u něhož mají tendenci způsobovat závažné celkové onemocnění, „tyfus“. Prototypem jsou sérovary **Typhi** u člověka a **Gallinarum** u drůbeže, řadíme sem také sérovar **Choleraesuis** prasete. Naopak hostitelsky nespecifické nebo **neadaptované sérovary** jako **Enteritidis** nebo **Typhimurium** mají obecně nižší patogenní potenciál a široké hostitelské spektrum. Infekce dospělých imunokompetentních zvířat bývá omezena na střevo (někdy na plíce) a jen výjimečně vede k septikemii. Typickým projevem infekce je enterokolitida, známá „salmonelóza“ získaná z potravin. Oproti hostitelsky adaptovaným sérovarům tyto salmonely mnohem lépe kolonizují střevo. Asymptomatictí nosiči se stávají zdrojem infekce. Epidemiologicky nejzávažnějším rezervoárem infekce pro člověka je právě drůbež.

Někdy můžeme rozeznávat ještě třetí patotyp, který bývá obvykle počítán k hostitelsky adaptovaným, vykazuje však oproti „tyfovým“ sérovarům poněkud nižší virulenci (septikemické onemocnění především u mladých zvířat), zato vyšší afinitu k pohlavním orgánům. Jsou proto více než jiné sérovary spojeny s **reprodukčními poruchami**: aborty u savců, poruchami snášky u drůbeže. Sem bychom řadili sérovary **Abortusequi** (koně), **Abortusovis** (ovce), **Dublin** (skot) a **Pullorum** (drůbež).

Toto rozdělení nelze brát zcela dogmaticky. Za skutečně hostitelsky specifické lze brát snad jen *S. Typhi* a *S. Gallinarum/Pullorum*. Ostatní vykazují různý stupeň hostitelské specifity s určitou virulencí i pro jiné hostitele. Například typická neadaptovaná *S. Typhimurium* spojená s enterokolitidami člověka a domácích zvířat způsobuje – jak ostatně název napovídá – septikemické onemocnění, „tyfus“ u myší.

#### 2.1.5.1.1 Hostitelsky adaptované sérovary

Z více než dvou tisíc známých sérovarů salmonel se pouze několik v evoluci specializovalo jako obligátní patogeny určitých hostitelů, způsobující závažné celkové onemocnění charakteru septikemie u zcela zdravých, imunokompetentních dospělých jedinců. V angličtině se takové onemocnění označuje jako „typhoid fever“ nebo „enteric fever“, tedy tyfu-podobná nebo střevní horečka. V češtině se pro onemocnění člověka vžil název **břišní tyfus** (na rozdíl od skvrnitého tyfu, způsobovaného *Rickettsia prowazekii*!). Infekce je obvykle feko-orální,

získaná z kontaminované vody nebo potravin, přičemž zdrojem nemoci jsou nemocní nebo perzistentně infikovaní jedinci. Tyto sérovary obecně špatně kolonizují střevo, ale jak bude ještě řeč dále, mohou perzistovat v přilehlé lymfatické tkáni a být periodicky vylučovány střevem nebo reprodukčním traktem.

**S. Typhi** je výlučně lidským patogenem bez zvířecího rezervoáru. Břišní tyfus neboli hlavnička je závažné horečnaté onemocnění, jehož výskyt je celosvětově spjat se zhoršenými hygienickými podmínkami. Převažují celkové příznaky endotoxického šoku včetně hepatosplenomegalie, vyrážky a poruch cirkulace a primární afekce střeva nemusí být ani patrná – častější je zácpa než průjem. Prvním příznakem je silná bolest hlavy, odtud lidový název hlavnička. Průběh může komplikovat bronchopneumonie, encefalitida, peritonitida aj. Také infekce **S. Choleraesuis** u prasat je pravidelně spojena s bronchopneumonií, zatímco průjem může a nemusí být přítomen. Možný je i přenos aerogenní cestou. Březí prasnice obvykle zmetají. Infekce **S. Dublin** dospělého skotu se projevují silnými průjmy, vysokou horečkou a aborty.

Prototypem hostitelsky adaptované salmonely u zvířat je sérovar **Gallinarum/Pullorum**. Jedná se o shodný sérovar – který je výjimečný i tím, že neexprimuje žádné H antigeny, je tudíž nepohyblivý – ale dva odlišné biovary, které se liší biochemicky i patogenitou. *S. Gallinarum* způsobuje tzv. **tyf drůbeže** (kura domácího a krůt). Postihuje stejnou měrou mláďata i dospělé jedince. Onemocnění je provázeno celkovými septikemickými příznaky (pokles příjmu vody, pokles snášky, načepýření, cyanóza, apatie) a postižením mnoha orgánů, s typickými změnami zejména na játrech, srdci a vaječnicích. Naproti tomu *S. Pullorum* vyvolává aparentní celkové onemocnění s vysokou mortalitou pouze u kuřat přibližně do 3 týdnů věku – tzv. **bílou úplavici** (název vychází od průjmovitého trusu s velkým množstvím urátů). Přeživší a jedinci infikovaní v dospělosti se mohou stát asymptomatickými nosiči. V šíření salmonel má zásadní význam jejich afinita k reprodukčnímu aparátu, jež umožňuje vertikální přenos vejcem. Nosičství bývá spojeno s poruchami snášky a degenerací vaječníků.

#### 2.1.5.1.2 Hostitelsky neadaptované sérovary

Většina zbývajících sérovarů jsou „generalisté“, schopné způsobit méně závažné onemocnění u různých druhů hostitelů. Střevo dospělých jedinců – především to platí pro drůbež, ale i některé savce, např. prasata – bývá často kolonizováno asymptomaticky. Takoví jedinci bývají často zdrojem infekce nejen pro mláďata, ale i pro člověka, především vstupují-li jejich produkty do potravního řetězce. Přes široké hostitelské spektrum obvykle u určitých hostitelů převažuje omezené množství nejčastějších sérovarů. Význam má i geografická distribuce.

Neadaptované sérovary způsobují klasické „salmonelózy“, zoonotické infekce zpravidla omezené na střevo, ačkoli septikemický průběh není vyloučen u velmi mladých, geriatrických či jinak oslabených jedinců. Člověk se obvykle nakazí pozřením kontaminované potravy; vzhledem k poměrně vysoké infekční dávce (cca  $10^5$  CFU, ale může se značně lišit podle okolností – záleží např. na věku a zdravotním stavu hostitele nebo na obsahu tuku v kontaminované potravine; čím vyšší, tím nižší infekční dávka) většinou pouze hrubé porušení hygieny vede k přímé infekci. Může nicméně dojít k přenosu infekce z nemocného jedince na další členy domácnosti. Zdrojem bývají i domácí zvířata. Potraviny mohou být kontaminovány primárně, jedná-li se o tkáň a produkty infikovaných jedinců (maso, mléko, vejce) bez dostatečné tepelné úpravy; možná je i sekundární nepřímá kontaminace, bezpečné proto nejsou ani jiné než živočišné produkty, např. saláty, zelenina apod. Zásadním rizikovým faktorem je nedostatečná

tepelná úprava (rychlé smažení nebo grilování) a nesprávné skladování potravin při vyšších teplotách, které umožňuje původně malému množství bakterií namnožit se na plnou infekční dávku.

Salmonelóza se projevuje enterokolitidou s vysokou horečkou, nevolností nebo zvracením, průjmem obvykle bez příměsi krve. Také u dospělých koní je salmonelóza příčinou vodnatého průjmu. Naopak u hospodářských zvířat postihuje převážně mláďata: telata cca do 6 týdnů, selata do 12 týdnů věku. U novorozenců může být salmonela původcem septikémie podobně jako třeba *E. coli*. Zdrojem nakažení je prostředí a krmivo kontaminované nosiči (často to může být matka). V případě stresu či jiného oslabení obranyschopnosti může onemocnění vypuknout i u dosud asymptomatického nosiče. Salmonely jsou přítomny i v dutině ústní a údajně byl zaznamenán přenos mezi telaty „dudlíky“ s mléčnou výživou. Salmonelózy hospodářských zvířat jsou asociovány nejčastěji se sérovarem Typhimurium. U člověka je na prvním místě *S. Enteritidis* (asi 40% infekcí), *S. Typhimurium* je na druhém místě a následují sérovary Newport, Infantis, Virchow, Hadar a Agona.

Tytéž zoonotické sérovary se s vysokou prevalencí vyskytují také u drůbeže, u níž se takové infekce označují jako „**paratyf**“. Jedná se především o tzv. „vysoce invazivní“ sérovary Enteritidis a Typhimurium. Klinické celkové onemocnění způsobují jen u kuřat do 3 dnů věku. Zdrojem nakažení je vertikální přenos, následovaný horizontálním šířením mezi vylíhlými kuřaty. Raná kolonizace střeva kuřete invazivními sérovary bývá zdrojem celoživotního nosičství; kolonizaci ovlivňuje stupeň vytrálosti imunitního systému střeva a přítomnost, respektive absence přirozené střevní mikroflóry komerčně produkovaných kuřat. Epidemiologicky nejrizikovější je nosičství u dospělých nosnic, jež jsou zdrojem infekce pro násadová vejce a tím celou produkční pyramidu. Vejce mohou být kontaminována vnějším fekálním znečištěním skořápky, u salmonel má však zásadní význam i přímý transovariální přenos.

### 2.1.5.2 Patogeneze

Salmonela je typickým fakultativně intracelulárním patogenem. Patogeneze salmonelových infekcí (nehledě na patotyp) má dva ústřední momenty: 1) invaze buněk střevní sliznice; 2) přežití a perzistence v makrofázích. Ne náhodou jsou tyto schopnosti kódovány dvěma hlavními ostrovy patogenity – hlavní funkcí **SPI-1** (*Salmonella pathogenicity island*) je zajištění invaze, **SPI-2** kóduje geny potřebné k intracelulárnímu přežití. Je popsána ještě celá řada dalších SPI (SPI-1 – 17), nesoucí další determinanty související s virulencí a podílející se na zmíněných dějích.

Salmonely invadují enterocyty a zejména M-buňky, které jsou součástí epitelu asociovaného s lymfatickými folikuly střevní sliznice – slouží k vychytávání antigenů ze střevního lumina a jejich předávání přilehlé lymfatické tkáni (Peyerovým plakům) k dalšímu zpracování. Jak již bylo řečeno, hlavní podíl na invazi mají produkty SPI-1, což je chromozomální blok genů kódujících sekreční systém třetího typu (**T3SS-1**) a některé jeho efektorové proteiny (jiné jsou kódovány mimo tento PAI). Kromě nich je zde ještě kódován transportní systém pro železo, SitABCD. T3SS je transmembránový molekulární agregát připomínající vzhledem i funkcí injekci. Slouží k transportu proteinů s různými účinky přes membránu invadované buňky a spouští se při těsném kontaktu buňky a bakterie. Efektory **Sip** a **Sop** (SipA, SipC,

SopA, SopB, SopD, SopE1, SopE2 aj.) různými mechanismy zasahují různé buněčné funkce, ale především ovlivňují přestavbu aktinových vláken a membránové procesy. Aktivace ústředních regulačních proteinů RhoGTPáz vede v důsledku k lamelizaci membrány, vychlípení pseudopodií, obklopujících a pohlcujících bakteriálních buňku, která je tak internalizována uvnitř membránového váčku – fagozomu. Tým proces vede také k rozvolnění a destabilizaci mezibuněčných spojů, narušení střevní epiteliální bariéry a indukci zánětu. SopB ovlivňuje signální dráhy ke zvýšení efluxu elektrolytů z buňky, což přispívá ke vzniku průjmu. Invadované buňky podléhají apoptóze, salmonely pronikají do lamina propria, kde jsou jejich povrchové struktury (LPS, bičíky) rozpoznávány buňkami přirozené imunity. Do místa zánětu migrují polymorfonukleáry a makrofágy. Fagocyty na jedné straně likvidují bakterie, na druhé straně přispívají ke vzniku hnisavě-fibrinózního zánětu. Takto poškozená sliznice je potom mnohem dostupnější pro další bakterie. Existuje dokonce názor, že bakterie invadující sliznici v první linii se chovají „altruisticky“, rozbíjí bariéru a zatímco samy převážně hynou, ulehčují tak invazi svým „druhům ve zbrani.“

Hlavní funkcí produktů SPI-2 je zajištění přežití v makrofázích. Ačkoli tuto vlastnost mají všechny patogenní salmonely, přežití a perzistence v makrofázích je klíčový krok především při vzniku systémové infekce. Hraje roli jak v iniciálních stádiích infekce, tak později, během nosičství. Salmonely možná využívají infikované makrofágy k pohodlnému transportu po organismu, zejména do mezenteriálních mízních uzlin, sleziny a jater. Význam tohoto procesu se však někdy zpochybňuje. Po vzniku imunity se salmonely (zejména „tyfoidní“ sérovary) lokalizují v makrofázích v těchto orgánech, v nichž dlouhodobě perzistují. Za ne zcela objasněných okolností, zřejmě vlivem imunitního oslabení, se takto „schované“ salmonely periodicky uvolňují a dostávají se do střeva, případně do reprodukčního traktu, kudy jsou vylučovány. Například v případě *S. Pullorum* je asymptomatické nosičství ve slezině a játrech u nosičů narušeno nástupem snášky, provázeným hormonálními změnami vedoucími k potlačení funkce T-lymfocytů, což umožňuje salmonelám pomnožení a šíření do vaječníků (transportem v makrofázích?). Perzistence v makrofázích vzniká zpravidla následkem systémové infekce (nemusí však být omezena na hostitelsky adaptované sérovary!). Dlouhodobé vylučování salmonel po střevní infekci je zapříčiněno kolonizací střeva.

Bližší k tomu, co se děje se salmonelou uvnitř buňky. Salmonely se pomnožují uvnitř buněk střevní sliznice a později v makrofázích, kde čelí mnoha obranným mechanismům. Jak bylo řečeno, ústřední roli zde hrají produkty SPI-2. Také tento PAI kóduje sekreční systém třetího typu (**T3SS-2**) a jeho efekторы. Po pohlcení bakterie se fagozom acidifikuje; právě pokles pH se považuje za signál pro spuštění exprese T3SS-2. Efekторы transportované do cytoplasmy řídí další modifikace fagozomu, zpomalují jeho další acidifikaci, brání kontaktu s NADPH-oxidázou a NO-syntázou, enzymy zajišťujícími metabolické vzplanutí. Fagozom se smršťuje na tzv. **SCV** (*Salmonella-containing vacuole*) a vytváří dlouhé filamentózní výběžky, jimiž se přichycuje k mikrotubulům. Vakuola se posunuje buňkou do blízkosti Golgiho aparátu. Otázkou zůstává, za jakých okolností dochází k indukci apoptózy a úniku salmonel z makrofágů a kdy je naopak využívají k pomnožení a perzistenci.

Akutní fáze infekce je pravděpodobně provázena únikem salmonel, při systémové diseminaci se zřejmě nacházejí jak v makrofázích, tak i extracelulárně, přičemž využívají řadu faktorů virulence k obraně před imunitním systémem. Uplatnění tu může nacházet **kapsulární antigen Vi**, kódovaný SPI-7. Další ostrovy patogenity kódují faktory virulence s různou funkcí – **fimbriální adheziny**, **regulační systémy**, **siderofory** jako **enterobactin**, **salmochelin** i

**yersiniabactin.** Invazivní sérovary (Gallinarum/Pullorum, Choleraesuis, Enteritidis, Typhimurium) většinou nesou velké nekonjugativní plazmidy s **geny *spv*** (*Salmonella plasmid virulence*), podílejícími se na rozvoji generalizovaného onemocnění.

### 2.1.5.3 Diagnostika

Salmonely se izolují ze vzorků faeces, rektálních výtěrů, v případě systémové infekce z krve a orgánů (slezina, kostní dřeň). Jejich výskyt se pravidelně monitoruje v prostředí produkčních provozů; odebírají se směsné vzorky z podlahy v chovných zařízeních, stěry jatečných těl na jatkách a podobně. Při výskytu nákazy se hledají v kontaminovaných potravinách a krmivu.

Postup vyšetření je standardizován a zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků. Celé vyšetření proto trvá minimálně týden. Prvním krokem je 1) **pomnožení vzorku v neselektivním tekutém médiu** – pufrované peptonové vodě – při standardních podmínkách (37°C, cca 18 hodin). Následuje 2) **selektivní pomnožení**. Používá se bujón dle Rappaport-Vassiliadise inkubovaný 24 hodin při 42°C; polotuhá varianta nalitá v destičkách dovoluje detekci pohybu, který se projeví vznikem mléčného zákalu v původně tyrkysově modrém médiu. Jinou možností je Mueller-Kauffmanův tetrathionátový bujón aj. Dalším krokem je 3) **vyočkování na selektivní pevné půdy**. Základním selektivně diagnostickým médiem pro izolaci salmonel je XLD agar (xyulóza-lyzin-desoxycholát), na němž očekáváme červené (laktóza-negativní) kolonie s černajícími středy (produkce sirovodíku). Černání mohou způsobovat také *Proteus* spp. a *Citrobacter* spp. Laktóza-pozitivní rody způsobují žloutnutí média. Dále lze využít agar s briliantovou zelení (BGA); L- bakterie zde opět rostou červeně, koliformy jsou převážně potlačeny a jejich případný růst se projevuje žloutnutím (acidifikací) média. Velmi užitečný je též chromogenní Rambachův agar; na šedavém médiu tvoří salmonely červené kolonie, koliformy rostou modře a *Proteus* spp. a pseudomonády jsou nažloutlé. Na desoxycholát-citrátovém agaru (DCA) a Salmonella-Shigella agaru (SSA) jsou salmonely opět černavé na žlutém podkladu (*Shigella* spp. je bezbarvá). Rostou samozřejmě i na klasickém MacConkeyi (bezbarvé). Kolonie s typickou morfológií je vhodné subkultivovat. Na krevním agaru tvoří salmonely bílé, okrouhlé ploché kolonie bez hemolýzy.

**Konfirmace** 4) se provádí biochemickými testy nebo MALDI-TOF. Tyto metody však nejsou schopny určit sérovar, proto pro úplnou diagnostiku je nutno pokračovat 5) **sérotypizací**. Přítomné O a H antigeny určujeme systematickou sklíčkovou aglutinací. Určitou komplikací může být exprese dvou fází bičíkového antigenu; určení druhé fáze vyžaduje vysycení první fáze antigenu inkubací v polotuhém médiu se specifickým antisérem (volné zůstanou pouze buňky exprimující druhou fází). Některé salmonely jsou monofázické (např. některé kmeny *S. Typhimurium*).

K podrobnější charakterizaci se donedávna používala tzv. fágová typizace, na jejímž základě se rozlišují fagotypy (PT nebo také DT). Fagotypizace je dnes nahrazována spíše molekulárními metodami, ale označení fagotypů do značné míry přetrvává.



#### 2.1.5.4 Terapie a prevence

Antibiotická terapie střevních salmonelóz člověka a domácích zvířat se považuje za kontroverzní – údajně prodlužuje následné vylučování. Uchylujeme se k ní pouze v závažných, život ohrožujících případech. Základem terapie je rehydratace organismu. Jako u všech průjmových onemocnění provázených horečkou jsou striktně kontraindikovány přípravky zpomalující střevní peristaltiku.

Zejména *S. Typhimurium* má tendenci k zvýšené antibiotické rezistenci. Známa je *S. Typhimurium* DT104, epidemická pentarezistentní linie s chromozomálně kódovanou rezistencí k ampicilinu, amfenikolům, streptomycinu, sulfonamidům a tetracyklinu.

Prevence vzniku salmonelóz se opírá o hygienická opatření, monitoring výskytu salmonel v potravinách a produkčních provozech a různé strategie, jak snížit nosičství u zvířat, zejména drůbeže, a tím i kontaminaci potravinového řetězce. Tzv. národní program pro tlumení výskytu salmonel v chovech drůbeže je založen na pravidelném odběru a vyšetřování směsných vzorků u všech kategorií kura a krůt, vždy několikrát během každého turnusu, a dále vakcinaci vybraných kategorií, především nosnic, proti *S. Enteritidis*. Standardně se vakcinují rodičovské chovy a produkční chovy nosnic, základem je živá vakcína podávaná hromadným způsobem, revakcinace je možná inaktivovanou parenterální vakcínou. Díky této strategii se podařilo výrazně snížit prevalenci sledovaných sérovarů salmonel u drůbeže a tím i riziko infekce člověka. Sérologická kontrola pomáhá udržet chovy prosté hostitelsky adaptovaných sérovarů.

Riziko infekce z potravin se sice díky intervenčním strategiím snížilo, ale nadále zůstává nezanedbatelné. Dodržování hygienických pravidel při nakládání s potravinami, při styku s nakaženými či potenciálními nosiči infekce zůstává imperativem. Je vhodné potraviny důkladně balit, dodržovat podmínky skladování, před přípravou potravin si pečlivě mýt ruce, dbát na dokonalou tepelnou úpravu. Ani po tepelné úpravě nenechávat potraviny delší dobu stát při pokojové teplotě. Vyvarovat se křížové kontaminace potravin (riziková místa jsou například dřez, kuchyňská linka a lednička). Zvířata představují potenciální zdroj infekce zejména pro malé děti; například plazi jsou velice riziková mazlíčci.

Tabulka 2. Významné sérovary *Salmonella* spp. u různých hostitelských druhů

Hostitel	Druh	Onemocnění
Člověk	<i>S. Typhi</i>	Břišní tyfus – závažné horečnaté onemocnění
	<i>S. Paratyphi</i> A, B	Paratyfus – onemocnění podobné břišnímu tyfu, obvykle mírnější průběh
	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Hadar</i> , <i>S. Virchow</i>	Salmonelózy – enterokolitidy získané z potravin
Skot	<i>S. Dublin</i>	Průjmy, bronchopneumonie, aborty
	<i>S. Typhimurium</i>	Průjmy, bronchopneumonie telat 2 – 6 týdnů Septikémie hypogamaglobulinemických telat
Prase	<i>S. Choleraesuis</i>	Septikémie, bronchopneumonie, aborty
	<i>S. Typhimurium</i>	Enterokolitidy selat 6 – 12 týdnů
Drůbež	<i>S. Gallinarum</i> <i>S. Pullorum</i>	Tyfus drůbeže – septikémie dospělé drůbeže Pulorová nákaza (bílá úplavice) kuřat, poruchy snášky

	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Hadar</i> , <i>S. Agona</i> , <i>S. Heidelberg</i> aj.	Paratyfus drůbeže, asymptomatické nosičství, septikemie čerstvě vylíhlých kuřat
	<i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	Arizonóza krůt (septikemie)

### 2.1.6 Rod *Shigella*

Ačkoli je *Shigella* spp. tradičně chápána jako samostatný rod, genetická analýza ukazuje, že spíše se jedná o fylogenetickou podskupinu *E. coli*, blízce příbuznou tzv. EIEC (enteroinvazivní *E. coli*). Také například EHEC O157:H7 je fylogeneticky bližší *S. dysenteriae* než komenzálním *E. coli*. EIEC a *Shigella* spp. mají obdobné biochemické vlastnosti a způsobují stejné onemocnění shodným mechanismem – tzv. bacilární dyzenterii (úplavici) člověka dalších primátů.

*Shigella* spp. zahrnuje 4 druhy: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. Jsou nepohyblivé, netvoří bičíky, ani kapsulu. Nefermentují laktózu ani netvoří indol (čímž se liší od jiných *E. coli*) a netvoří sirovodík (rozdíl oproti salmonelám). Sérotypizace se opírá o určení O-antigenu.

#### 2.1.6.1 Patogenita

*Shigella* spp. je primárním patogenem člověka, člověk je také hlavním rezervoárem a zdrojem kontaminace odpadních vod, ačkoli nakazit se mohou i jiní primáti. Největší riziko představují právě kontaminované vody v endemických oblastech s nízkou úrovní hygieny. Infekční dávka je velice malá.

Pojem **dyzenterie** se vztahuje k zánětu tlustého střeva s profuzním, obvykle krvavým průjmem. Je-li navíc produkován shigatoxin, může docházet k hemolyticko-uremickému syndromu podobně jako při infekci STEC.

#### 2.1.6.2 Patogeneze

*Shigella* spp. a EIEC invadují střevní sliznici přes M-buňky. Ústředním faktorem virulence je **sekreční systém typu III** a jeho efektory, tzv. **Ipa** proteiny (*invasive plasmid antigens*), kódované plazmidem. Ipa indukují pohlcení bakterie a její únik z fagozomu do cytoplasmy. Bakterie pak invadují přilehlé enterocyty z bazolaterální strany a šíří se sliznicí. Šíření umožňuje polymerizace cytoskeletálního aktinu, indukovaná jinou skupinou plasmidově kódovaných proteinů – tzv. **Ics** (*intracellular spread*). *S. dysenteriae* jediná navíc ještě produkuje shigatoxin, závažně poškozující cévní endotel.

### 2.1.6.3 Diagnostika

Postupuje se v zásadě jako při enterálních koliinfekcích. Na MCA jsou kolonie bezbarvé. Lze použít také Salmonella-Shigella agar (většina médií určených pro salmonely je příliš inhibiční).

### 2.1.7 Rod *Yersinia*

Druhy rodu *Yersinia* byly původně označovány jako *Pasteurella* spp., než byly definitivně přerazeny do řádu Enterobacterales s vlastní čeledí Yersiniaceae. Jedná se o drobné gram-negativní kokocyčky, vykazující tendenci k bipolární tince. Jsou pohyblivé (s výjimkou *Y. pestis*) a nejvýraznější motilitu a nejlepší růst vykazují při teplotě 25°C. Rostou však v širokém rozmezí teplot přibližně mezi 4 – 40°C – pomalu se množí tedy i v chladničce.

Jako všechny enterobakterie jsou yersinie pozitivní na katalázu, negativní na oxidázu a fermentují glukózu bez vzniku plynu. Nefermentují laktózu.

Z přibližně dvaceti druhů *Yersinia* spp. mají zejména 3 význam jako původci zoonotických onemocnění zvířat a člověka: *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* s převážně enterální patogenitou a *Y. pestis*, původce nechvalně proslulé černé smrti. *Y. ruckeri* způsobuje septicemické onemocnění lososovitých ryb.

#### 2.1.7.1 Patogenita

*Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* způsobují enterální infekce spojené s mezenterální lymfadenitidou a někdy septikémií domácích zvířat a člověka. Zatímco zdrojem *Y. pseudotuberculosis* jsou především volně žijící hlodavci a ptáci, významným rezervoárem *Y. enterocolitica* je domácí prase, u něž tento druh často asymptomaticky kolonizuje sliznici nosohltanu. Bakterie přežívají v půdě, vodě i na povrchu potravin. Člověk a zvířata se nakazí požitím kontaminovaného, špatně tepelně upraveného masa, mléka, ovoce i zeleniny. *Y. enterocolitica* zahrnuje několik biotypů a řadu sérotypů, z nichž jen některé, zejména 4/O:3, 2/O:5, 2/O:9, jsou spojeny s onemocněním člověka, psů a domácích přežvýkavců, u nichž vyvolávají různě závažnou enterokolitidu, vzácně diseminovanou infekci. Příznaky zahrnují zvracení, horečku, průjem někdy s příměsí krve nebo hlenu. Lymfadenitida mlže simulovat příznaky apendicitidy.

Je známo přes 20 sérotypů *Y. pseudotuberculosis*, nejčastěji se vyskytují sérotypy O:1a, O:1b, O:2a, O:2b, O:3. *Y. pseudotuberculosis* jen zřídka napadá člověka a onemocnění je obvykle spojeno s imunosupresí. Způsobuje mezenterální lymfadenitidu a enterokolitidu u ptáků (včetně drůbeže), volně žijících hlodavců a zajíců. U hospodářských zvířat, zejména přežvýkavců, je infekce příležitostně spojena s aborty a mastitidou. Také *Y. pseudotuberculosis* může diseminovat z primárního místa infekce do jater a sleziny, u březích zvířat do placenty. V napadených orgánech vznikají nekrotické až abscedující uzlíky. Průběh může být fulminantní i chronický s dlouhodobými průjmy a hubnutím.

*Y. pestis* jako původce lidského moru vstoupila do historie i do našeho povědomí natolik, že máme tendenci považovat ji za vyloženě lidský patogen. Ve skutečnosti tato nákaza za běžných okolností prodělává sylvatický cyklus mezi volně žijícími hlodavci a jejich blechami a člověk je spíše náhodný hostitel. Z historie jsou známy tři velké pandemie lidského moru: tzv. justiniánský mor, který v 6. století našeho letopočtu těžce zasáhl Východořímskou říši, tzv. černou smrt, která pustošila Evropu od 14. století až do raného novověku a již v první fázi podlehlá údajně třetina evropské populace, a tzv. třetí pandemii, která vypukla v 19. století v Číně.

Na rozdíl od enterálních druhů se *Y. pestis* nepřenáší perorálně (nebo jen zcela výjimečně). Přenos realizují blechy volně žijících a synantropních hlodavců, především *Xenopsylla cheopis*. Bakterie se v infikované bleše namnoží do takové míry, že jejich masa ucpává proventrikulus a nutí blechu regurgitovat celou infekční dávku bakterií do nového hostitele, na němž se krmí. U běžných blech psů a koček rodu *Ctenocephalides* k ucpání nedochází, a proto tyto blechy mor účinně nešíří. Zasažením regionálních mízních uzlin vzniká nejtypičtější forma moru, tzv. bubonická. Zvětšené, bolestivé mízní uzliny (bubony) doprovází vysoká horečka, bolesti hlavy a silná nevolnost. Systémové šíření vede k závažnější formě septikemické. Krváceniny, trombotizace a gangrény akrálních částí těla jsou příčinou černých skvrn, které daly jméno středověké pandemii. Při zasažení plic vzniká nejnebezpečnější forma pneumonická. Ta má nejen nejvyšší smrtnost, ale umožňuje také přímé šíření infekce z jedince na jedince. Kromě člověka a hlodavců jsou k moru vnímaví mnozí masožravci, kteří se mohou nakazit také pozřením infikovaného materiálu. Z domácích zvířat jsou vnímavé především kočky.

### 2.1.7.2 Patogeneze

Výrazným znakem yersiniových infekcí je jejich afinita k lymfatické tkáni. *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* invadují Peyerovy plaky cestou přes M buňky střevní sliznice a mohou se šířit do mezenterálních mízních uzlin a dalších orgánů. *Y. pestis* napadá primárně regionální mízní uzliny. Yersinie se často označují za fakultativně intracelulární patogeny, přestože se většinou nalézají v organismu extracelulárně. Disponují však mechanismy, jimiž se účinně brání likvidaci ve fagocytech, a v počátečních stádiích infekce představuje invaze buněk a intracelulární přežívání důležitý moment patogenese.

*Y. pestis* je fylogeneticky nejmladší, vyvinula se z *Y. pseudotuberculosis*, když ztratila některé geny důležité pro enterální přenos a naopak získala geny, umožňující množení v bleše a další odlišnosti. Ovšem jak *Y. pestis*, tak patogenní sérotypy *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* nesou chromozomální PAI spojený s vysokou patogenitou – tzv. **HPI**, *high pathogenicity island*, který nese přes desítku genů spojených s metabolismem železa, na prvním místě siderofor **yersiniabactin**. Je to dalším důkazem, jak důležitá je pro vysoce virulentní bakterie efektivní vazba železa.

*Y. pestis* oproti enterálním yersiniím získala několik plasmidů navíc. Jeden z nich kóduje protein **Pla**, aktivátor plasminogenu, s kombinovanou aktivitou adhezinu a proteázy. Aktivace plasminogenu vede k fibrinolýze a štěpení proteinů extracelulární matrix a usnadňuje šíření bakterií pojivovou tkání po inokulaci do kůže. Jedná se tedy o důležitý invazivní faktor. Aktivuje také prothrombin (koagulázová aktivita) a štěpí C3 složku komplementu. Další

plasmidově kódovaný povrchový **protein F1**, asociovaný s kapsulou, slouží k inhibici opsonizace.

Naopak *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* produkují adhezivní a invazivní faktory **YadA** a **invazin**, které hrají zásadní roli v internalizaci bakterií do nefagocytujících buněk v gastrointestinálním traktu.

Všechny tři popsané patogenní druhy produkují plasmidově kódovaný **sekreční systém III. typu** a jeho efektorové proteiny, tzv. **Yop**. Tento systém zajišťuje specifickou interakci yersinií s fagocytujícími buňkami. Na rozdíl od salmonel, které T3SS používají k internalizaci do buněk a modifikaci fagosomů, proteiny Yop blokují určité kroky fagocytózy a některé z nich spouští apoptózu makrofágů. YopE, T a O ovlivňují přestavbu cytoskeletu, čímž blokují membránové procesy vedoucí k pohlcování bakterií. Exprese T3SS je regulována teplotou; spouští se při 37°C.

Shrnuto a podtrženo, enterální yersinie invadují M buňky střevní sliznice, *Y. pestis* je inokulována intradermálně. V prvních fázích infekce se bakterie dostávají do regionální lymfatické tkáně, jsou pohlčovány makrofágy, což je signálem ke spuštění T3SS a produkci Yop, které blokují fagocytózu a vyvolávají apoptózu. Bakterie tak unikají fagocytujícím buňkám a dále se šíří extracelulárně. K přežití v extracelulárním prostředí jsou nezbytné efektivní mechanismy pro vazbu a skladování železa. Různé povrchové proteiny působí jako ochrana proti dalším složkám imunitního systému.

### 2.1.7.3 Diagnostika

*Y. pestis* jako mimořádně nebezpečné agens není předmětem běžné bakteriologické diagnostiky. Pro izolaci *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* jsou vhodné vzorky lymfatické tkáně, především mezenteriálních mízních uzlin po postmortálním vyšetření nebo bioptáty. Lze je izolovat také z faeces. Lze využít schopnosti yersinií růst při 4°C v poněkud zdlouhavé metodě **chladového pomnožení**, kdy se vzorky inkubují při této teplotě několik týdnů s pravidelnou subkultivací na vhodná média – krevní nebo MacConkey agar. K selektivní izolaci *Y. enterocolitica* slouží **CIN agar** (cefsulodin – irgasan – novobiocin). Inkubovat lze při teplotě 37°C, uvádí se však, že pro iniciální izolaci jsou vhodné nižší teploty (25°C).

Yersinie mohou být identifikovány biochemickými testy určenými pro enterobakterie. Vzhledem k odlišné patogenitě různých sérotypů je nezbytné izoláty dále typizovat imunologickými nebo molekulárními metodami.

### 2.1.7.4 Terapie a prevence

Mor se ve střední Evropě dlouhodobě nevyskytuje, v žádném případě však nejde o eradikované onemocnění – udržuje se sylvaticky na území Asie, Afriky i Ameriky a dochází k občasnému přenosu na domácí kočky i do lidské populace. Kočka podezřelá na infekci (klinické příznaky, cestování do endemické oblasti) musí být ošetřována s maximální opatrností – striktní izolace, likvidace blech a ochranné prostředky při manipulaci, včetně roušek. Podezření musí

být hlášeno. Vzhledem k riziku pro člověka by měla být, především v případě pneumonické formy, zvažena eutanazie. Mezi antibiotika obvykle účinná na yersiniové infekce patří doxycyklin, aminoglykosidy a fluorochinolony.

### 2.1.8 Rod *Klebsiella*

*Klebsiella* spp. patří spolu s rody *Citrobacter* a *Enterobacter* do skupiny tzv. koliformních bakterií (čeleď Enterobacteriaceae). Jejich společným znakem je schopnost fermentace laktózy u většiny kmenů. Na MacConkeyově agaru tvoří do růžova zbarvené kolonie (zbarvení mnohem méně intenzivní než u *E. coli*). Mnohé rostou ve výrazně mukózní fázi.

*Klebsiella* spp. je krátká baculatá gramnegativní tyčinka. Na rozdíl od většiny enterobakterií netvoří bičík, tudíž je nepohyblivá a chybí jí H antigeny. K sérotypizaci slouží somatické O antigeny (9 variant) a asi 80 variant kapsulárních K antigenů. **LPS** a **kapsula** se považují za nejdůležitější faktory virulence.

K druhům nejčastěji asociovaným s oportunními infekcemi člověka a zvířat patří na prvním místě *K. pneumoniae*, případně *K. oxytoca* a *K. aerogenes*.

#### 2.1.8.1 Patogenita

Klebsiely patří mezi významné oportunní patogeny především starších, imunosuprimovaných jedinců. Lidé hospitalizovaní v nemocnicích jsou ohroženi tzv. nosokomiálními infekcemi, způsobovanými často vysoce rezistentními kmeny přenášenými v nemocničním prostředí. Může se jednat o infekce ran, močového traktu nebo závažné pneumonie s abscedací plic a vysokou smrtností.

*Klebsiella pneumoniae* je velmi častým environmentálním původcem mastitid skotu a hnisavých metritid klisen. Je asociována s pneumoniemi u hříbat a všeobecně hnisavými infekcemi různých druhů.

#### 2.1.8.2 Diagnostika

Na krevním i MacConkeyově agaru je *Klebsiella* spp. nápadná mohutným mukózním nárustem. Je nehemolytická. Je nutné ji odlišit zejména od *Enterobacter* spp. (biochemická aktivita je podobná, odlišení umožňují multitesty nebo hmotnostní spektrometrie). Další charakterizace zejména molekulárními metodami včetně sekvenování je vhodná u multirezistentních kmenů.

### 2.1.8.3 Terapie

V případě nosokomiálních infekcí u oslabených pacientů, často navíc způsobovaných multirezistentními kmeny, bývá antibiotická terapie často neúčinná. Platí, že výběr použité látky závisí na testech citlivosti. V poslední době poutá pozornost zejména *K. pneumoniae* ST258. Tato epidemická linie produkuje plazmidově kódovaný gen *bla<sub>KPC</sub>*, zprostředkující rezistenci k „záchranným antibiotikům“ karbapenemům. Rizikem je také horizontální přenos tohoto genu na jiné patogeny.

Tento gen bývá spojen s tzv. integrativním konjugativním elementem ICEKp258.2, kódujícím navíc další prvky (pilus typu IV, restriční-modifikační systém typu III), zajišťující efektivní konjugativní přenos plazmidu s úzkou hostitelskou specifitou. V nepřítomnosti tohoto elementu je rezistence ke karbapenemům spojena s celou řadou dalších typů karbapenemáz – např. NDM, VIM, IMP, OXA-48. Kromě karbapenemů bývá běžná rezistence k aminoglykosidům, fluorochinolonům, makrolidům a potencionálním sulfonamidům a značnou hrozbou je rozšíření rezistence ke kolistinu. *K. pneumoniae* představuje zdroj genů karbapenemáz pro další gramnegativní bakterie.

### 2.1.9 Rod *Proteus*

Také bakterie rodu *Proteus* z čeledi Morganellaceae se běžně vyskytují v trávicím traktu savců a v prostředí. Nejběžnějším druhem izolovaným z oportunních infekcí je *P. mirabilis*, na druhém místě *P. vulgaris*. Jsou to gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, které fermentují glukózu, ale nikoli laktózu. Jsou pohyblivé a produkuje velké množství bičíků. Rozlišujeme řadu sérotypů na základě O a H antigenů.

*Proteus* získal své jméno podle nižšího antického božstva, syna boha Poseidona, schopného nekonečně měnit svou podobu. Též jeho bakteriální jmenovec se vyznačuje pozoruhodnou proměnlivostí; zejména je znám schopností tzv. plazivého růstu. Původně krátké pravidelné tyčinky se na povrchu pevného média začínají prodlužovat v dlouhá prohnutá vlákna a exprimují obrovské množství dlouhých bičíků. Plazivé buňky vytvářejí svazky, které se koordinovaně posouvají po povrchu. Kolonie se tak plazivě rozprostírá po celé ploše média.

#### 2.1.9.1 Patogenita a patogeneze

*Proteus mirabilis*, méně často jiné druhy proteů, je významným nosokomiálním infektem, asociovaným zejména s infekcemi močového traktu. Může infikovat rány a způsobovat všemožné hnisavé infekce, potenciálně i sepsi. Často je izolován jako původce *otitis externa* u psů a koček.

Významným faktorem virulence *Proteus* spp. je produkce **ureázy**. Amoniak vznikající rozkladem močoviny zvyšuje pH a výrazně podporuje vznik urolitů typu struvitu (fosfát hořečnat-amonný), vedoucí někdy až k obstrukci. Obzvláště rizikovou skupinou jsou ležící pacienti s dlouhodobě zavedeným uretrálním katetrem. Při kolonizaci močového traktu se uplatňuje velké množství fimbriálních **adhezínů** a zmíněný **plazivý pohyb**. Přeměna běžných buněk na plazivý fenotyp, exprese bičíků a koordinace pohybu pravděpodobně podléhá regulaci

systémem *quorum sensing*. Předpokládá se, že jako iniciační signál se uplatňuje „mrtvolný jed“ putrescin, produkt dekarboxylace ornithinu.

### 2.1.9.2 Diagnostika

*Proteus* spp. roste za běžných kultivačních podmínek až příliš ochotně. Jako kontaminanta nepříjemně komplikuje kultivační vyšetření, neboť na krevním agaru přerůstá kolonie jiných bakteriálních druhů a znemožňuje jejich izolaci. Plazení lze omezit přidáním různých inhibičních látek (např. alkoholu) do média. Na MacConkey agaru se neplazí a vytváří ploché bezbarvé kolonie.

Plazivé kolonie na krevním agaru se typicky šíří v koncentrických vlnách se zvlněnými okraji z místa inokulace po ploše pevného média. Netvoří hemolýzu, ale agresivní enzymatická aktivita způsobuje hnědnutí média. Nápadný je odporný fekální zápach.

Pro izolaci a identifikaci běžných původců močových infekcí (*Proteus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*) z moči je určen také komerční chromogenní agar.

*P. mirabilis* a *P. vulgaris* oba produkují ureázu a sirovodík (TSI agar). *P. vulgaris* navíc produkuje indol a je přirozeně rezistentní na řadu antibiotik, např. ampicilin.

### 2.1.9.3 Terapie

Antimikrobiální látky vhodné pro léčbu močových (eventuálně jiných) infekcí musí být zvoleny na základě *in vitro* testů citlivosti.

## 2.1.10 Další oportunní patogeny z řádu Enterobacterales

Mnohé další enterobakterie mohou příležitostně způsobovat onemocnění – kontaminují rány, močové cesty, plíce a další orgány, sporadicky způsobují i závažná onemocnění oslabených jedinců a novorozenců. Některé byly asociovány také s průjmovými onemocněními. Zdrojem těchto infekcí je fekální mikroflóra a kontaminované prostředí.

Mezi klinicky významnými příklady patří *Enterobacter* spp., zejména *Enterobacter cloacae*. Podobě jako *Klebsiella* spp. patří mezi koliformy, produkuje pouzdro, je asociován s podobnými infekcemi a kultivačně je zaměnitelný.

*Cronobacter sakazakii* (dříve *Enterobacter*) je v současnosti specificky monitorován v potravinách, zejména v kojenecké výživě. Vyvolává totiž závažné septikemie a meningitidy novorozenců a byl izolován právě ze sušeného kojeneckého mléka, v němž vydrží viabilní velmi dlouhou dobu. I své jméno získal podle antického božstva Krona, požírajícího své potomstvo. Je typický produkcí žlutého pigmentu.



Rod *Citrobacter* bývá s infekcemi asociován vzácně. Na XLD agaru může tvořit černající kolonie simulující salmonely.

Také *Serratia* spp. bývá příležitostně původcem infekcí močového nebo respiratorního traktu. Zejména druh *S. marcescens* je nápadný produkcí výrazného červeného pigmentu. Vyskytuje se s oblibou ve vlhkém prostředí, kde tvoří biofilm; způsobuje dočervena zbarvené povlaky ve sprchových koutech a záchodových mísách, může být zdrojem červenavého zbarvení zubního plaku.

*Morganella morganii* se ve střevech savců a je velmi běžnou mikroflórou plazů. Je implikována u řady extraintestinálních a nosokomiálních infekcí, zejména močového traktu, podobně jako příbuzný rod *Proteus*. Je ureáza-pozitivní, ale neprodukuje sirovodík.

*Edwardsiella tarda* (čeleď Hafniaceae) je vázána zejména na vodní prostředí. Jako oportunní patogen způsobuje infekce u různých druhů zvířat včetně plazů a savců, je však zejména významným původcem septikemického onemocnění ryb, tzv. edwardsielózy. Jiným rybím patogenem je *E. ictaluri*.

Příbuzná, taktéž psychrotrofní *Hafnia* spp. se považuje za v zásadě nepatogenní, dokonce má význam při zrání sýrů. *H. alvei* může mít význam jako patogen včel.

*Providentia rettgeri* (čeleď Morganellaceae) je také patogenem hmyzu, ale byla izolována i jako příčina cestovatelských průjmů u člověka a jako nosokomiální uropatogen.

## 2.2 Čeleď Pasteurellaceae

Čeleď Pasteurellaceae tvoří další rozsáhlou skupinu fakultativně anaerobních bakterií třídy Gammaproteobacteria a zahrnuje řadu významných patogenů. Zástupci této čeledi jsou převážně nepohyblivé pleomorfní kokotyčinky, fermentují sacharidy bez produkce plynu a až na výjimky jsou pozitivní na katalázu i oxidázu (čímž se liší od enterobakterií). Většina zástupců tvoří přirozenou součást orofaryngeální mikroflóry člověka i zvířat a způsobují oportunní infekce dýchacího traktu a měkkých tkání, některé druhy však produkují faktory virulence spojené s výraznou patogenitou.

Z nejvýznačnějších zástupců jmenujme rody *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Bibersteinia*, *Actinobacillus*, *Hemophilus*, *Histophilus*, *Avibacterium* a *Gallibacterium*.

### 2.2.1 Rod *Pasteurella*

*Pasteurella* spp. je krátká nebo pleomorfní kokotyčinka, vykazující při barvení krystalovou violetí nebo metylenovou modří tendenci k tzv. bipolární tince, kdy se barvivo hromadí v pólech buňky, takže se jeví jako dva koky vedle sebe. Je nepohyblivá, fakultativně anaerobní, fermentuje sacharidy bez tvorby plynu. Mnohé druhy pasterel se běžně nacházejí na sliznici dutiny ústní a nosní různých druhů zvířat i člověka, především však psovitých a kočkovitých šelem, prasat, drůbeže a králíků. Nejvýznamnějším patogenem je jistě *P. multocida*, zahrnující poddruhy *multocida*, *gallicida* a *septica*. Ta se podílí na vzniku nebo je příčinou řady závažných onemocnění hospodářských a zájmových zvířat.

Podle typu kapsulárního polysacharidu rozlišujeme 5 kapsulárních séro skupin *P. multocida* A, B, D, E a F. Kromě toho dle typu O-antigenů existují somatické séro skupiny značené čísly; tradičně je jich rozlišováno 16, molekulárními metodami bylo stanoveno 8 somatických séro skupin L1 – 8. Rozlišení má značný význam v diagnostice, protože s určitými infekcemi jsou obvykle spojené určité sérotypy.

#### 2.2.1.1 Patogenita

Pasterelózy domácích zvířat se obvykle vztahují k infekcím dýchacího systému, jako jsou rhinitidy a bronchopneumonie, ve vážnějších případech septikemickým systémovým onemocněním, obvykle také respiratorního původu. Druhou možností jsou infekce měkkých tkání; jako běžná orofaryngeální mikroflóra mohou různé druhy pasterel, např. *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. canis*, *P. caballi* aj., snadno infikovat například rány po kousnutí psy a kočkami a být příčinou hnisavého zánětu. *P. pneumotropica* je oportunním patogenem laboratorních hlodavců, vyvolávající konjunktivitidy, otitidy, ale i hnisavé infekce reprodukčních orgánů u potkanů, myši a morčat (většinou ve spojení s virovou nebo mykoplasmovou infekcí). *P. testudinis* byla asociována s respiratorními infekcemi a septikémií želv.

*P. multocida* ssp. *multocida* je častým respiratorním patogenem hospodářských zvířat, je součástí tzv. **respiratorního komplexu skotu** a podílí se na závažném průběhu **enzootické**

**pneumonie** prasat. Znamená to, že figuruje jako sekundární patogen v onemocněních iniciovaných viry a mykoplazmaty. Svou roli sehrávají nevhodné chovatelské podmínky a stresové faktory oslabující obranyschopnost dýchacího traktu. Výsledkem bývají hnisavé **bronchopneumonie**. Nejběžněji se v těchto případech setkáváme s kapsulárním typem A.

Sérotypy B:2 a E:2 vyvolávají závažné exotické onemocnění, vyskytující se v Africe a Asii, tzv. **hemoragickou septikémií** skotu a buvolů (vnímaví jsou však i jiní sudokopytníci). V přenosu hrají významnou roli asymptomatictí nosiči; jakmile však dojde ke vzniku klinických příznaků, je průběh onemocnění většinou fulminantní a fatální. Patogen přestupuje do systému pravděpodobně v oblasti tonzil a dochází k rozvoji toxického šoku.

Tzv. progresivní forma **atrofické rhinitidy** prasat je obvykle spojena s koinfekcí dvěma bakteriálními druhy: *Bordetella bronchiseptica* produkující dermonekrotoxin (viz kap. 3.4, č. Alcaligenaceae) a *P. multocida* typu D, méně často A, která produkuje Pmt (*P. multocida* toxin, viz níže). *B. bronchiseptica*, vybavená plejádou různých adhezínů a toxinů, usnadňuje kolonizaci řasinkového epitelu, sama o sobě však vyvolává jen neprogresivní formu tohoto onemocnění, tzv. sípavku, jehož průběh je pomalejší a mírnější a obvykle nedochází k nevratným změnám. I zde jsou zdrojem infekce asymptomatictí nosiči, selata se často infikují od matek. K rozvoji onemocnění dochází v době kolem odstavu asi do 3 měsíců života, přičemž změny sliznice a chrupavčitých a kostěných struktur jsou nevratné; synergickým účinkem toxinů dochází k úplné atrofii nosních konch a zkroucení kostního podkladu dutiny nosní. Klinicky se projevuje sípáním, kýcháním a deformitami rypáku.

**Pasterelóza králíků a zajíců** je velmi běžné onemocnění, asociované se sérotypy A, někdy D. *P. multocida* kolonizuje tato zvířata s vysokou prevalencí a podílí se příležitostně na různých hnisavých procesech, jako jsou alveolární a kožní abscesy, artritidy a infekce reprodukčního traktu. Nejběžnější formou je chronická rhinitida a konjunktivitida. Někdy dochází i k bronchopneumonii. Manifestace je často spojena s konkurentním onemocněním či jiným oslabením. U zajíců ve špatné kondici se může pasterelóza projevovat akutně jako hemoragická septikémie; protražované dochází ke vzniku hnisavě-nekrotických uzlíků v orgánech.

**Pasterelóza drůbeže** neboli **cholera drůbeže** postihuje zejména dospělou drůbež nad 16 týdnů věku, především kura domácího a krůty. V souvislosti s cholerou byly izolovány všechny tři subspecies *P. multocida*, tj. včetně *gallicida* i *septica*, ale nejčastěji se setkáváme s poddruhem *multocida*, kapsulárního typu A, F nebo D. Onemocnění postihuje primárně dýchací trakt a probíhá akutně jako hemoragická septikémie s vysokými úhyny nebo chronicky ve formě lokalizovaných hnisavých infekcí sliznic hlavy, dýchacího traktu, kloubů a kůže chodidel a lalůček (proto se také někdy tato forma nazývá lalůčkovou chorobou).

### 2.2.1.2 Patogeneze

*Pasteurella* spp. všeobecně je oportunním patogenem, adaptovaným na kolonizaci orofaryngu. Pomnožení a kolonizaci dolních částí dýchacích cest usnadňuje předchozí virová či mykoplazmová infekce. Prakticky jakýkoli sérotyp či kmen může za určitých okolností vyvolat hnisavou kožní či respirační infekci. Naproti tomu závažné a specifické formy onemocnění, jako jsou septikémie nebo např. atrofická rhinitida, bývají asociovány s určitými sérotypy a kmeny, vybavenými konkrétními faktory virulence. I zde však existuje fenomén

asymptomatického nosičství a manifestace je často spojena s oslabením a nepříznivými podmínkami. Virulentní kmeny obvykle vykazují značnou hostitelskou specifitu.

*P. multocida* produkuje **lipopolysacharid** a **kapsulu**, které hrají význačnou roli v interakci s imunitním systémem. LPS je zřejmě zodpovědný za systémovou zánětlivou odpověď a příznaky toxického šoku při hemoragických septikémiích (horečka, diseminovaná intravaskulární koagulopatie, trombózy, hemoragie a nekrózy), jeho toxicita se však liší mezi kmeny. Pouzdro má důležitou ochranou funkci. Akapsulární mutanty jsou efektivně likvidovány imunitním systémem a v infekci se neuplatní. Jak již bylo zmíněno, rozlišujeme 5 kapsulárních skupin podle typu kapsulárního polysacharidu. U typu A tvoří nejdůležitější součást kyselina hyaluronová, u typu D heparin a typu F chondroitin. Přesná struktura polysacharidů tvořících kapsulu typů B a E není ještě objasněna.

Při vzniku atrofické rhinitidy hraje klíčovou roli toxin **Pmt** (*P. multocida* toxin, v českých textech někdy označovaný dermonekrotoxin jako u *B. bronchiseptica*), produkovaný především typem D. Po vazbě na receptor se endocytózou dostává do buňky, kde ovlivňuje signální dráhy. Patří do skupiny toxinů aktivujících Rho-GTPázy a jako takový indukuje cytoskeletální změny vedoucí k atrofii tkáně. Dermonekrotoxin *B. bronchiseptica* a cytoletální nekrotický faktor *E. coli* se vyznačují podobným efektem.

**Sialyltransferázy** jsou enzymy zprostředkující přenos sialových zbytků na povrch bakterie, kde, jak se předpokládá, mohou pomáhat inhibovat imunitní odpověď, neboť sialová kyselina je obvyklou komponentou membrán hostitelských buněk. Kromě toho produkuje *P. multocida* siderofory (jmenovitě **multicidin**) a různé proteiny vázající transferrin, které jí umožňují ve vnitřním prostředí efektivně získávat železo.

### 2.2.1.3 Diagnostika

Diagnostika pasterelózy je nejčastěji založena na běžném kultivačním postupu. Do transportního odebíráme stěry hnisavých lézí a výtěry z nosních dutin, přičemž musíme mít na paměti, že *Pasteurella* spp. se v těchto místech vyskytuje běžně. V případě pneumonií jsou vhodnější laváže.

Vzorky kultivujeme za standardních podmínek, aerobně při 37°C, na krevním agaru. Na MCA neroste. Po 18 – 24 hodinové kultivaci pozorujeme šedavé mukózní nehemolytické kolonie, které jsou rozpoznatelné také typickým zápachem připomínajícím žampióny. Kromě *P. dagmatis* (O -) a *P. caballi* (K -) je katalázová a oxidázová zkouška pozitivní, glukóza je zkvašována, laktóza nikoli. K druhovému určení použijeme hmotnostní spektrometrii nebo další biochemické testy. Také poddruhy *P. multocida* lze rozlišit biochemicky. Mikroskopicky pozorujeme drobné gramnegativní kokobacilly s tendencí k bipolárnímu barvení. Ve starších kulturách se mohou buňky prodlužovat a vzniká pleomorfní obraz.

V některých případech (např. diagnostika atrofické rhinitidy, hemoragické septikémie skotu aj.) je důležité určení sérotypu. Tradičně se kapsulární typ určoval hemaglutinačně, somatický typ precipitací, dnes se spoléháme spíše na molekulární metody (PCR).

Při běžných testech citlivosti diskovou difúzní metodou vyžaduje *Pasteurella* spp. Muller-Hintonovo médium obohacené ovčí krví.

### 2.2.1.4 Terapie

K léčbě pasterelóz se používají antibiotika ze skupiny betalaktamů, doxycyklin, florfenikol a potencované sulfonamidy. Je však nutné provádět testy citlivosti, neboť dochází k nárůstu rezistence vůči těmto látkám. Alternativně lze použít fluorochinolony. *P. multocida* je přirozeně rezistentní ke klindamycinu.

Vakcíny jsou dostupné proti různým formám pasterelóz u hospodářských zvířat. V oblastech výskytu se provádí pravidelná vakcinace proti hemoragické septikemii skotu. Také respirační infekce telat lze zmírňovat aplikací polyvalentních vakcín matkám. Prasníčky a březí prasnice se vakcinují přípravkem kombinujícím bakterin *P. multocida* a *B. bronchiseptica* s toxoidem Pmt k ochraně selat v prvních týdnech života. Inaktivovaná vakcína určená pro králíky chrání vakcinovaná zvířata proti sérotypům A a D. Také pro drůbež existují inaktivované i živé vakcíny; i ty však chrání jen proti určitým sérotypům a jejich efekt není jednoznačný.

### 2.2.2 Rody *Mannheimia* a *Bibersteinia*

Ve starší literatuře se ještě můžeme setkat s druhem *Pasteurella haemolytica* jako hlavním původcem plicní pasterelózy skotu. Později byl původce označen za samostatný rod *Mannheimia*. *M. haemolytica* zahrnovala 17 kapsulárních sérotypů v rámci 2 biotypů, rozlišovaných na základě biochemických reakcí; biotyp A (arabinóza +) a biotyp T (trehalóza +). V současnosti označujeme jako *M. haemolytica* pouze biotyp A (sérotypy 1, 2, 5 – 9, 12 – 14, 16, 17), zatímco biotyp T (sérotypy 3, 4, 10, 15) vytvořil samostatný rod a druh *Bibersteinia trehalosi*. Sérotyp 11 byl označen jako druh *M. glucosida*.

Tolik na vysvětlenou; bez ohledu na označení se jedná o nepohyblivé gramnegativní kokobacily, fakultativně anaerobní, fermentativní, produkující katalázu a oxidázu. Podobně jako *Pasteurella* spp. kolonizují sliznice horních částí dýchacích cest a trávicího traktu, avšak jejich výskyt je vázán primárně na přežvýkavce, u nichž také vyvolávají respirační a septikemická onemocnění.

#### 2.2.2.1 Patogenita

*M. haemolytica* figuruje jako hlavní agens v tzv. **respiračním komplexu telat** neboli **enzootické pneumonii**, konkrétněji je hlavním původcem tzv. **plicní pasterelózy**. Jiný název zní **přepavní horečka** neboli *shipping fever*, který vyjadřuje vazbu onemocnění na stres související s přepravou telat do nového prostředí. Telata jsou obvykle odchováána v samostatných boxech a ve věku 6 – 8 týdnů se přepravují do odchovů. V nových skupinách dochází z hlediska přenosu respiračních infekcí k ideálním podmínkám – míchání zvířat z různých zdrojů a zvýšený infekční tlak, stres spojený s transportem a změnou prostředí, pokles kolostrálních protilátek atd. Jako primární agens se obvykle uplatňují viry jako parainfluenza, bovinní respirační syncytiální virus, infekční bovinní rhinotracheitida nebo bovinní virová diarrhoea, ale i mykoplazmata (zejména *M. bovis*). Bakterie jako *M. haemolytica*, *P. multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes* aj. v návaznosti na to kolonizují plíce a vyvolávají hnisavou

bronchopneumonii, v případě *M. haemolytica* často i závažné fibrinózní pleuropneumonie. V infekcích se nejčastěji uplatňuje sérotyp 1 a 6.

U malých přežvýkavců je *M. haemolytica* spojena především s celkovými infekcemi (**septikemiemi**) sajících jehňat. Kromě toho u dospělých ovcí vyvolává těžkou, až nekrotickou **mastitidu**.

Zejména u malých přežvýkavců se vyskytuje také *B. trehalosi* a způsobuje podobná onemocnění jako *M. haemolytica* – **pneumonie** a **mastitidy**. **Septikemie** spojené s *B. trehalosi* se vyskytují zejména u jehňat ve výkrmu.

### 2.2.2.2 Patogeneze

*M. haemolytica* a *B. trehalosi*, podobně jako *P. multocida*, jsou sice vybaveny řadou faktorů virulence včetně toxinů a jsou schopny vyvolat často velmi závažná onemocnění, avšak kolonizují sliznice hostitelských druhů i asymptomaticky. Za normálních okolností funkční mukociliární aparát zabraňuje kolonizaci dolních částí dýchacích cest. Teprve v návaznosti na oslabení těchto obranných funkcí (stres, virová infekce) se masivně pomnožují a pronikají do plic nebo do krevního oběhu.

*M. haemolytica* produkuje **lipopolysacharid** a **kapsulu**, které hrají důležitou roli v interakci s imunitním systémem a indukci zánětlivé odpovědi. Další povrchové struktury (např. proteiny vnější membrány) zřejmě napomáhají vazbě k extracelulární matrix a uplatňují se jako kolonizační a invazivní faktory.

Nejvýraznějším faktorem virulence *M. haemolytica* je **leukotoxin**, patřící podobně jako  $\alpha$ -hemolyzin *E. coli* do skupiny tzv. RTX toxinů (repeats-in toxins, pojmenované podle opakujících se sekvencí bohatých na glycin). Tyto toxiny se vsunují do membrány eukaryotické buňky, kde zformují pór, jímž unikají ionty z cytoplazmy; změna osmotického tlaku vede k lýzi buňky. Také leukotoxin má hemolytickou aktivitu a je aktivní především vůči leukocytům a erytrocytům přežvýkavců.

Za hostitelskou specifitu těchto patogenů jsou do jisté míry zodpovědné také **proteiny vázající transferrin**, zajišťující dostatečný přísun železa ve vnitřním prostředí. Jsou totiž schopny efektivně vázat pouze transferrin přežvýkavců, nikoli jiných zvířat nebo člověka.

### 2.2.2.3 Diagnostika

Diagnostický postup je obdobný jako v případě *P. multocida*. Vzorky (tracheální výtěry, laváže, mastitidní mléko) kultivujeme na agaru s ovčí krví za přítomnosti kyslíku při 37°C. Za 1 – 2 dny pozorujeme šedavé hladké až mukózní kolonie s úplnou hemolýzou. Na rozdíl od *P. multocida* neprodukuje *M. haemolytica* ani *B. trehalosi* indol a toleruje MacConkeyovo médium, na němž vytváří červené tečkovité kolonie. Definitivní identifikaci umožňují biochemické testy nebo MALDI-TOF. V některých případech lze přistoupit k určení sérotypu (hemaglutinace) nebo další typizaci molekulárními metodami.

#### 2.2.2.4 Terapie

K léčbě respiračních infekcí bakteriálního původu se u skotu používají zejména florfenikol, tilmikosin, tulathromycin, doxycyklin, v indikovaných případech fluorochinolony a cefalosporiny vyšších generací (např. ceftiofur). K léčbě je nutno přistupovat na základě provedených testů citlivosti. Aplikace vakcín má variabilní úspěšnost vzhledem množství faktorů, které se na vzniku respiračních infekcí u telat podílejí.

#### 2.2.3 Rod *Actinobacillus*

Také bakterie rodu *Actinobacillus* jsou fakultativně anaerobní nepohyblivé kokotčinky se sklonem k pleomorfismu. V mikroskopu se jeví směs teček a čárek poněkud jako „morseovka“. Delších forem nabývají zpravidla v bujónových kulturách. *Actinobacillus* spp. je náročná bakterie, k růstu vyžaduje obohacená média, avšak většinou není závislá na růstových faktorech V a X jako *Haemophilus* spp. Většina druhů roste na MacConkeyově médiu, produkuje  $\beta$ -galaktosidázu a ureázu a redukuje nitráty. Oxidázová zkouška je obvykle pozitivní, ale katalázová variabilní.

Zástupci rodu *Actinobacillus* patří mezi komenzály sliznic horních částí dýchacího a traktu a vnějších pohlavních orgánů s oportunní patogenitou; zdrojem infekce je často vlastní endogenní mikroflóra. Vykazují značnou, ale ne absolutní hostitelskou specifitu; např. *A. lignieriesii*, typický přežvýkavce, se může podílet na infekcích u koní, *A. equuli* a *A. suis* se vyskytují u koní i prasat.

Z veterinárního hlediska nejvýznamnější zástupce, *A. pleuropneumoniae*, je považován za primární patogen respiračního traktu prasat. Rozlišujeme 15 sérotypů v rámci dvou biotypů (podle schopnosti syntetizovat NAD; biotyp 1 je NAD dependentní a zahrnuje sérotypy 1 – 13, biotyp 2 tvoří NAD sám a zahrnuje zbývající dva sérotypy). Sérotypy se liší virulencí i geografickou distribucí. V ČR se setkáváme nejčastěji se sérotypem 2 nebo 9. Sérotypy 1, 5, 9, 10 a 11 se považují za obzvláště virulentní; virulence však může být variabilní i mezi kmeny v rámci sérotypu.

##### 2.2.3.1 Patogenita

Jak bylo řečeno, většina zástupců rodu *Actinobacillus* vykazuje oportunní patogenitu a tvoří součást normální mikroflóry sliznic. Zcela obecně se podílí na třech typech patologických procesů: respirační onemocnění, septikemie a hnisavé až pyogranulomatózní infekce měkkých tkání.

Zatímco u člověka *A. actinomycetemcomitans* tvoří součást ústní mikroflóry, *A. ureae* a *A. hominis* osidlují hlavně dýchací cesty a mohou příležitostně způsobovat pneumonie, endokarditidy nebo meningitidy. *A. capsulatus* je původcem hnisavé artritidy králíků. *A. muris* způsobuje infekce dýchacího traktu u hlodavců. U prasat, kromě níže popsaných významných

původců, se můžeme v souvislosti s dýchacími infekcemi izolovat také *A. porcinus*, *A. rossii*, *A. minor* nebo *A. indolicus*. *A. seminis* způsobuje hnisavou epididymitidu beranů. *A. succinogenes* naproti tomu tvoří normální bachorovou mikroflóru.

Také *A. lignieresii* se běžně vyskytuje na sliznici předních částí trávicího traktu skotu a ovcí, od dutiny ústní po bachor. Je původcem tzv. „dřevěného jazyka“ (*wooden tongue*), pyo-granulomatózní infekce měkkých tkání hlavy především skotu. Toto onemocnění se často zaměňuje s aktinomykózou, jejímž primárním původcem je grampozitivní anaerob *Actinomyces bovis*. Na rozdíl od tohoto stavu při aktinobacilóze obvykle nedochází k osteomyelitidě, proces zahrnuje pouze měkké tkáně jazyka, mezisaničí a regionální mízní uzliny, kde vznikají mnohočetné abscesy naplněné hnisem a tzv. „sírovými granulami“. V důsledku otoku dochází k potížím s polykáním a dušení zvířete; zaškrcený ztuhlý jazyk často visí z dutiny ústní „jako prkno“. Méně často mohou být postiženy i jiné tkáně, např. mléčná žláza. Jedná se o typickou endogenní infekci, původce proniká do tkáně obvykle následkem poranění sliznice dutiny ústní či orofaryngu ostrým předmětem, např. osinou, ostrým stéblem či hřebíkem.

*Actinobacillus equuli*, komenzál dutiny ústní a běžný původce oportunních infekcí u koní, má dva poddruhy, ssp. *equuli* a ssp. *haemolyticus*. *A. equuli* ssp. *equuli* je hlavním původcem tzv. *sleepy foal disease*, **septikemie hřibat**. Systémová infekce často vzniká důsledkem poruchy transferu kolostrálních protilátek. Původce proniká dýchacím nebo trávicím traktem, často také nezhojeným pupkem. Průběh může být fulminantní s rychlým úhynem hříběte, nebo protrahovaný, kdy dochází k šíření septických embolů krevním oběhem vznikají hnisavá ložiska v různých orgánech, nejčastěji v kloubech (septická polyartritida) a ledvinách (intersticiální nefritida). U dospělých koní se podílí na respiračních infekcích i lokalizovaných hnisavých procesech mimo dýchací trakt, jako jsou perikarditidy, peritonitidy a infekce reprodukčního traktu spojené s aborty. Může způsobovat také septikemie selat podobně jako *A. suis*. *A. equuli* ssp. *haemolyticus*, produkující, jak jméno napovídá, hemolyzin, se častěji podílí na infekcích dospělých koní.

Také *A. suis* najdeme běžně na tonzilách a v horních cestách dýchacích zdravých prasat. Jako sekundární patogen se může vyskytnout u různých druhů zvířat a prasat všech věkových kategorií, nejzávažnější onemocnění ale způsobuje u selat. Uvádí se, že zejména ve stádech s vysokou úrovní hygieny (kde se tedy nevyskytují ani asymptomatictí nosiči) může mít aktinobacilóza explozivní průběh s vysokou mortalitou. Přenáší se kontaktem a aerosolem a projevuje se náhlým úhynem bez příznaků nebo jako **septikémie** s příznaky postižení plic. Poškození cévního endotelu vede ke vzniku hemoragických skvrn a onemocnění může být zaměněno za červenku. Při protrahovanějším průběhu mohou být postiženy klouby, meningy či endokard, podobně jako při infekcích *Streptococcus suis*. U starších selat je průběh mírnější. Jaké všechny faktory působí na vznik a průběh aktinobacilózy v různých stádech, není dosud objasněno.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* je původcem **pleuropneumonie prasat**, závažného onemocnění postihující zejména prasata v předvýkrmu. V přeplněných kotcích dochází velice snadno k přenosu kontaktem nebo aerosolem na krátkou vzdálenost. *A. pleuropneumoniae* přednostně kolonizuje dolní cesty dýchací a plíce, ale u asymptomatických nosičů dlouhodobě přežívá v tonzilárních kryptách. Průběh onemocnění může být perakutní septikemický s rychlým úhynem nebo akutní s příznaky postižení plic; v plicích nacházíme ostře ohraničená tmavá ložiska konsolidace, v dutině hrudní sérosangvinózní až fibrinózní exsudát, později dochází ke srůstům. Přeživší jedinci se stávají často asymptomatickými nosiči.



### 2.2.3.2 Patogeneze

K nejdůležitějším faktorům virulence *Actinobacillus* spp. se řadí produkty umožňující kolonizaci orgánů, chránící před baktericidními účinky komplementu a fagocytů a přímo poškozující hostitelské buňky. Zdaleka nejlépe je patogeneze prostudována u pleuropneumonie prasat.

*A. pleuropneumoniae* produkuje **fimbrie typu IV**, které napomáhají adhezi k plicním epiteliím. Zajímavé je, že jejich expresi pozitivně ovlivňuje nedostatek NAD. **LPS** a **kapsulární polysacharidy** se mohou taktéž podílet na adherenci k různým povrchům a hrají zásadní roli v interakci s imunitním systémem svými antikomplementovými a antifagocytárními účinky; LPS je hlavním spouštěčem zánětlivé odpovědi. Faktory zprostředkující invazi krevního oběhu při septikemickém průběhu aktinobacilóz nejsou přesně známy, pokud se nejedná o přímý přestup poškozenou tkání.

*A. pleuropneumoniae* a některé další druhy produkuje toxiny ze skupiny RTX toxinů s hemolytickými a cytotoxickými účinky (viz leukotoxin *M. haemolytica*). U *A. pleuropneumoniae* jsou známy 4 typy těchto toxinů, zvaných **Apx I – IV**, přičemž různé sérotypy produkuje různé jejich kombinace, což mimo jiné faktory ovlivňuje jejich rozdílnou virulenci. Apx I je silným hemolyzinem a slabým cytotoxinem, naopak Apx III nemá hemolytickou aktivitu, ale působí silně cytotoxicky. Apx II působí slabě obojím způsobem. Apx IV je produkován všemi sérotypy *A. pleuropneumoniae*, ale pouze *in vivo* – v standardní kultuře není produkován a jeho účinky nejsou tudíž dokonale popsány. Apx jsou zodpovědné za CAMP fenomén využívaný v diagnostice.

Blízce příbuzný *A. lignieresii* má sice geny pro Apx, jimž však chybí funkční promotor, tedy nedochází k jejich expresi. Naproti tomu *A. suis* produkuje Apx I a II a *A. rossii* Apx II a III. Podobný toxin, pojmenovaný **Aqx**, je znám u *A. equuli* ssp. *haemolyticus*. Dá se předpokládat, že u tohoto poddruhu zvyšuje potenciál vyvolávat onemocnění u dospělých koní, není však nezbytný pro vznik septikemie u hřibů, vzhledem k tomu, že u poddruhu *equuli* chybí.

Apx toxiny jsou klíčovými faktory virulence při pleuropneumonii prasat, podílející se na vzniku plicních lézí. Poškozují primárně plicní epitelie a fagocytující buňky (neutrofilů a makrofágů). Za poškození tkáně jsou zodpovědné částečně – výrazně se zde uplatňuje též indukovaná zánětlivá odpověď. Zatímco přivolané neutrofilů vykazují většinou rychlý a efektivní baktericidní účinek, zdá se, že *A. pleuropneumoniae* dokáže do značné míry odolávat účinku makrofágů; buňky lyzují účinkem Apx dříve, než stačí fagocytované bakterie usmrtit. Většina aktinobacilů produkuje **ureázu**, rozkládající močovinu na amoniak. Zvýšené pH zpomaluje fagolysosomální fúzi a inhibuje účinek hydrolytických enzymů. Význam má i **superoxiddismutáza** inaktivující produkty oxidačního vzplanutí.

Mezi mechanismy zodpovědné za vazbu železa patří různé druhy sideroforů a **proteiny vzájemně transferrin (Tbp)**. Zajímavostí je, že Tbp *A. pleuropneumoniae* či *A. suis* přednostně vážou právě prasečí transferrin.

### 2.2.3.3 Diagnostika

Při izolaci aktinobacilů z přirozeně kontaminovaných vzorků je třeba mít na paměti, že se jedná o běžné obyvatele sliznic. Je tímto způsobem možné například zjišťovat asymptomatické nosičství *A. pleuropneumoniae* u prasat – v tom případě jsou vhodné vzorky tonzil. V ostatních případech je vhodné odebírat vzorky přímo z postižených orgánů, v případě septikemických stavů i krev.

Vzorky hnisu z pyogranulomatózních lézí při aktinobacilóze skotu lze vyšetřovat přímo mikroskopii. Rozdrtíme-li na podložním sklíčku s kapkou KOH drobná granula obsažená v hnisu a překryjeme krycím sklíčkem, můžeme pozorovat tzv. drúzy, rozetovitě uspořádané struktury bakteriálních kolonií. Podobné útvary lze spatřit i při histopatologickém vyšetření.

Aktinobacily jsou kultivačně poměrně náročné bakterie, je nutno jim poskytnout obohacená média – ideálně čokoládový, většinou však postačí i běžný krevní agar. Biotyp 1 *A. pleuropneumoniae* je NAD-dependentní – znamená to, že vyžaduje obsah tohoto růstového faktoru v médiu. Často si pomáháme kultivací společně s laboratorním kmenem *S. aureus*, který produkuje betatoxin a vytváří částečnou hemolýzu. Aktinobacily rostou preferenčně v zóně hemolýzy této kultury, kde dochází k uvolnění růstových faktorů z erytrocytů. Můžeme při tom zhodnotit i tzv. CAMP fenomén. Kultivujeme při 37°C za přístupu kyslíku, ačkoli koncentrace 5 – 10 % CO<sub>2</sub> podporuje růst. Za 2 – 3 dny pozoruje šedavé tečkovité kolonie, hemolytické v případě *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* a *A. equuli* ssp. *haemolyticus*, tedy druhů produkujících toxiny RTX.

Na MacConkeyově agaru často dochází k postupnému růžovění kolonií, což reflektuje opožděné zkvašování laktózy. *A. pleuropneumoniae* na MCA neroste. Tento druh, *A. suis* a *A. equuli* vykazují variabilní reakce v oxidázové zkoušce, jedná se tedy o znak na úrovni kmene. *A. lignieresii* dává pozitivní reakce. Katalázová zkouška je většinou pozitivní. Další biochemické reakce lze využít k rodovému a druhovému rozlišení – produkce ureázy (s výjimkou *A. seminis* pozitivní), produkce indolu (negativní), hydrolýza eskulinu (pozitivní u *A. suis*), zkvašování arabinózy, trehalózy a manitolu (druhově specifický znak).

K rozpoznání *A. pleuropneumoniae* může napomoci již zmíněný CAMP test. Tato zkouška využívá synergického účinku dvou hemolytických látek produkovaných dvěma různými bakteriálními druhy. Naočkujeme-li tyto dvě bakteriální kultury v určité vzdálenosti na krevní agar (nejlépe jako dvě čáry kolmo na sebe), v místě styku kultivačních čar dochází k potenciaci hemolýzy a projasnění média. To může mít různou podobu – úplná zóna hemolýzy se může rozšířit, částečná hemolýza se stane úplnou nebo se objeví hemolýza tam, kde nebyla jinak patrná. V případě interakce Apx toxinů s betatoxinem dochází k zintenzivnění neúplné hemolýzy obklopující *S. aureus* a rozšíření úzké hemolýzy *A. pleuropneumoniae*. Pozitivně reaguje i *A. equuli* ssp. *haemolyticus*.

Další sérologická či molekulární typizace je vhodná zejména v případě *A. pleuropneumoniae*. Sérotypy lze určit aglutinací či jinými sérologickými testy. Metoda PCR umožňuje identifikovat produkované toxiny. Doporučuje se provádět sérologický monitoring ve stádech; existují ELISA testy detekující protilátky proti Apx IV, který není obsažen ve vakcínách a nedochází tak k interferenci postvakcinačních protilátek.

#### 2.2.3.4 Terapie a prevence

Aktinobacily včetně *A. pleuropneumoniae* jsou obvykle citlivé k různým skupinám antimikrobik, včetně betalaktamů, tetracyklinů, potencovaných sulfonamidů a fluorochinolonů. Často se používá také florfenikol či makrolidy jako tilmikosin či tulathromycin. Ani včasná a plošná aplikace antibiotik ve stádě nezabrání určitým ztrátám, nelze vyloučit ani vznik následného nosičství. Proto je vhodné zabránit zavlečení pleuropneumonie do stáda správnými chovatelskými opatřeními, jako je vysoká biosekurita, systém *all-in all-out* a vakcinační programy. Jsou dostupné inaktivované i mutantní živé vakcíny, které se aplikují prasnicím a selatům po odstavu. Prevence septikemií způsobované *A. suis* je poměrně obtížná a spočívá převážně v hygienických opatřeních. Spolehlivé vakcíny nejsou dostupné. Hygiena porodu, správné ošetření pupečního pahýlu a zajištění dostatečného přísunu kolostra pomáhají jsou klíčová opatření proti neonatální septikémii hříbat.

#### 2.2.4 Rody *Haemophilus* a *Histophilus*

Rody *Haemophilus* a *Histophilus* jsou gramnegativní pleomorfní kokobacily (krátké tyčinky, někdy však tvoří až vlákna) a fakultativní anaeroby využívající sacharidy fermentativně. Patří mezi bakterie náročné na nutrienty; většina druhů vyžaduje ke svému růstu jeden nebo oba tyto růstové faktory: NAD (tzv. faktor V) a hemin (faktor X). Chybí jim totiž schopnost syntetizovat určité části dýchacího řetězce. Jejich výskyt je vázán na sliznice hostitelských druhů; mohou růst na sliznicích horních cest dýchacích, dutiny ústní a pohlavních orgánů jako komenzálové, za určitých ne zcela objasněných okolností však invadují vnitřní prostředí a způsobují často závažná onemocnění.

Člověk je hostitelem několika oportunně patogenních zástupců: *H. aegyptius*, asociovaný s hnisavým zánětem spojivek, *H. haemolyticus* a *H. parainfluenzae*, který patří mezi gramnegativní původce endokarditid (tzv. HACEK). *H. ducreyi* je původcem sexuálně přenosných genitálních vředů, vyskytující se zejména v rozvojových zemích. Nejvýznačnějším a nejprostudovanějším patogenem člověka je *H. influenzae*.

*Haemophilus parasuis* je původcem systémového onemocnění mladých prasat, tzv. Glässerovy choroby. U přežvýkavců se původně rozlišovaly tři druhy, asociované s respiračními infekcemi a septikemií: *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* a *Histophilus ovis*. Ty jsou v současnosti zahrnuty v jediném druhu *Histophilus somni*. Na rozdíl od *Haemophilus* spp., *H. somni* nevyžaduje k růstu NAD ani hemin.

U psů se na sliznici pohlavních orgánů nachází *Haemophilus haemoglobinophilus*, jehož patogenita je sporná; sporadicky infikuje novorozená štěňata. *Haemophilus felis* patří mezi původce konjunktivitid a zánětů dýchacích cest u koček.

### 2.2.4.1 Patogenita

*H. influenzae* byl popsán již na konci 19. století během chřipkové epidemie, s níž byl dlouhou dobu nesprávně spojován; odtud také pojmenování. Podle kapsulárního antigenu rozlišujeme několik sérotypů. Některé kmeny kapsulu netvoří. Asymptomatické nosičství enkapsulovaných i neenkapsulovaných kmenů je poměrně běžné. Onemocnění vzniká obvykle v návaznosti na primární virovou infekci (například chřipku) nebo v důsledku imunosuprese. Virulentní opouzdřený sérovar Hib způsobuje nebezpečné invazivní infekce u dětí, septikémie a meningitidy. Někdy má infekce lokalizovaný charakter jako artritida, osteomyelitida nebo epiglottitida. U dospělých lidí jsou opouzdřené kmeny asociovány s pneumoniemi. Neenkapsulované kmeny patří mezi běžné původce konjunktivitid, zánětů středního ucha a horních i dolních cest dýchacích.

**Glässerova choroba** je onemocnění převážně mladších věkových kategorií prasat provázené polyserositidou a artritidou, někdy i meningitidou. Je známo asi 15 sérotypů *H. parasuis*; různé kmeny se mohou vyskytovat v rámci jednoho chovu. Kolonizují nosní dutinu i vaginální sliznici asymptomatických nosičů. Onemocnění propuká zřejmě v souvislosti s různými oslabujícími faktory, stresem a mykoplazmovými a virovými infekcemi jako je chřipka či PRRS. Velký význam má imunitní status stáda a zvýšený výskyt onemocnění koresponduje s poklesem mateřských protilátek. Průběh může být perakutní (septikemický), akutní až chronický. Jedná se zpravidla o fibrinózní zánět seróz (perikarditida, pleuritida, peritonitida) a kloubů, postupně se vznikem srůstů. Při tomto typickém obraze je onemocnění zaměnitelné za infekci *M. hyorhinis*. U starších selat se častěji vyvíjí meningitida s nervovými příznaky.

*Histophilus somni* je původcem závažného onemocnění skotu a ovcí s velice variabilními projevy, včetně abortů, polyartritidy, myokarditidy a tzv. **trombotické meningoencefalitidy (TME)**. Patří též mezi patogeny zapojené v respiračním komplexu a přepravní horečky skotu. U nás se vyskytuje sporadicky, na americkém kontinentu je však mnohem častější. *H. somni* kolonizuje sliznice dýchacího traktu a pohlavního aparátu – oběma cestami může invadovat vnitřní prostředí. Můžeme rozlišovat tři formy infekce: 1) **respirační** se vznikem pneumonie, někdy také nekrotické laryngitidy u telat, 2) **reprodukční** s infekcí dělohy vedoucí k abortu u březích zvířat a 3) **septikemickou**, při níž bakterie invadují krevní oběh; důsledkem poškození endotelu dochází k trombotizaci a nekrotizaci v různých orgánech včetně centrální nervové soustavy. Často dochází k náhlému úhynu bez příznaků, nebo se rozvíjí horečka a neurologické poruchy. U ovcí se nejčastěji setkáváme s reprodukčními problémy, včetně hnisavé epididymitidy beranů.

### 2.2.4.2 Patogeneze

Podstatou závažných hemofilových infekcí, jako je Glässerova choroba nebo TME, je invaze krevního oběhu a poškození různých orgánů (klouby, serózy, meningy aj.) pravděpodobně převážně v důsledku zánětlivé reakce. Není jasné, co tuto invazi spouští nebo umožňuje, pravděpodobně je zde zapojeno více faktorů. Často je popisována souvislost se stresem, imunosupresí či konkurenčním onemocněním. Klíčovou roli v patogenezi tedy hrají faktory umožňující přežití ve vnitřním prostředí a ovlivňující interakce s imunitním systémem.

Jako u jiných gramnegativních bakterií je součástí buněčné stěny *Haemophilus/Histophilus* spp. lipopolysacharid nebo **lipooligosacharid** (LOS; tento pojem se preferuje, pokud molekule chybí postranní O řetězec). LPS/LOS má toxické účinky, aktivuje koagulační kaskádu a spouští nespecifickou zánětlivou odpověď, jejímž důsledkem je tkáňové poškození. LOS *H. somni* aktivací kaspázového systému indukuje apoptózu plicních epitelů a cévního endotelu, zdá se, že také ovlivňuje permeabilitu hematoencefalické bariéry a umožňuje invazi centrálního nervového systému. LOS *H. somni* a *H. influenzae* navíc prodělává fázovou variaci. Enzymy **neuraminidáza** a **sialyltransferáza** umožňují inkorporaci sialových zbytků do molekuly LOS a brání tak aktivaci komplementu.

Některé kmeny *H. influenzae* a *H. parasuis* jsou opouštěné. U *H. somni* nebyla tvorba kapsuly prokázána. **Kapsula** patří k mechanismům zvyšujícím rezistenci ke komplementu a fagocytóze. Význačnou roli zastávají také tzv. **proteiny vázající imunoglobuliny** (IgBPs), které vážou Fc konec protilátek IgG<sub>2</sub>, čímž brání opsonizaci a aktivaci komplementu klasickou cestou. Jak *Haemophilus* spp., tak *H. somni* dokážou po určitou dobu přežít ve fagocytech, nějakým způsobem tlumit oxidační vzplanutí a modulovat jejich funkce.

#### 2.2.4.3 Diagnostika

*Haemophilus* spp. a *Histophilus* spp. jsou kultivačně náročné bakterie a izolace ze vzorků postižených orgánů, stěrů seróz, kloubů, mozkomíšního moku či krve může být obtížná. Přesto se alternativní metody detekce, např. přímý průkaz PCR, považují za méně spolehlivé. Navíc neumožňují další charakterizaci původce. Vhodná jsou média obsahující růstové faktory V a X (NAD a hemin). To je v první řadě čokoládový agar, u něž dochází zahrátím k uvolnění NAD z erytrocytů, zatímco termostabilní hemin je již přítomen. Alternativně lze využít „satelitního růstu“ v hemolytické zóně laboratorního kmene *S. aureus*. Na misce krevního agaru rozočkujeme klasickým způsobem vzorek a přes něj inokulujeme v podobě kružnice kmen *S. aureus* produkující betatoxin, jehož vlivem dochází k uvolnění růstových faktorů z erytrocytů. Po 2 – 3 dnech kultivace při 37°C v mikroaerofilní atmosféře (10 % CO<sub>2</sub>) pozorujeme velmi drobné tečkovité bezbarvé nebo lehce nažloutlé kolonie v blízkosti kultivační čáry stafylokoka. Jako typický znak se uvádí zápach po myšíně. CAMP fenomén nevzniká a většina zástupců (s výjimkou *H. haemolyticus* a některých kmenů *H. somni*) netvoří hemolýzu.

Dependence na faktorech V a X je mezidruhově odlišná a tento znak lze využít v diagnostice. Testuje se jednoduchými diskovými metodami; papírové disky napuštěné faktory V a X samostatně a jejich kombinací umístíme na povrch inokulovaného média a sledujeme, okolo kterého disku studovaná bakterie roste. Zatímco *H. influenzae* vyžaduje oba faktory, *H. parasuis* potřebuje pouze faktor V a *H. somni* je schopen růstu i v jejich nepřítomnosti.

Také katalázová a oxidázová zkouška dává variabilní výsledky. *H. somni* je negativní na katalázu, pozitivní na oxidázu, *H. parasuis* právě naopak. Glukóza je zkvašována u všech druhů, zkvašování laktózy, sacharózy a manitolu lze využít k druhovému odlišení.

Sérotypizace je vhodná k další charakterizaci izolátů *H. parasuis*. Testování citlivosti vyžaduje speciální obohacená média.

#### 2.2.4.4 Terapie a prevence

Hemofily jsou většinou citlivé k většině antibiotik včetně běžných penicilinů, avšak léčba často přichází příliš pozdě, aby zabránila ztrátám, a navíc je spojena s rizikem asymptomatického nosičství. Sérotypově specifické vakcíny proti *H. parasuis* je vhodné podávat prasnicím a selatům po odstavu. V oblastech s častějším výskytem je dostupná inaktivovaná vakcína proti *H. somni*.

#### 2.2.5 Další významní zástupci čeledi Pasteurellaceae

U ptáků, zejména drůbeže, se setkáváme s některými dalšími rody z čeledi Pasteurellaceae, jež mohou mít význam jako oportunní patogeny: *Avibacterium*, *Gallibacterium* a *Volucrobacter*.

*Avibacterium paragallinarum*, nejvýznamnější zástupce tohoto rodu, donedávna známý jako *Haemophilus paragallinarum*, je původcem **infekční rýmy drůbeže**. Jedná se o zánět horních cest dýchacích a paranasálních sinů, přenášený kontaktem, aerosolem, ale také pitnou vodou, a projevující se okulonasálním výtokem, kýcháním, dyspnoí a otokem obličeje. Někdy mohou být zasaženy i vzdušné vaky. Vnímavý je kur domácí a další druhy hrabavé drůbeže, nikoli však krůty. Vnímavost vzrůstá u starších kategorií, zejména nosnic, u nichž infekce nepříznivě ovlivňuje snášku.

*Avibacterium paragallinarum* je pleomorfní nepohyblivá kokotyčinka, negativní na katalázu a oxidázu, netvoří indol ani ureázu, zkvašuje sacharózu a manitol, nikoli laktózu. Neroste na MCA. K růstu vyžaduje NAD, proto je výhodné vyšetřované vzorky (výtěry sinů, tracheje) kultivovat na krevním agaru se stafylokokem nebo na čokoládovém agaru při mikroaerofilní atmosféře. Hemolýzu nevytváří. K sérologickému monitoringu hejn lze využívat také testy ELISA nebo imunodifúzní test.

Rozlišujeme asi 9 sérotypů. V ohrožených hejnech je možno aplikovat sérotypově specifické vakcíny.

K dalším zástupcům řazeným k rodu *Avibacterium* patří *A. gallinarum*, spojovaný s mírnými respiračními infekcemi drůbeže, *A. endocardidis*, izolovaný z případů valvulární endokarditidy kuřat, *A. avium* a *A. volantium*. Tyto bakterie lze považovat za komenzály s oportunní patogenitou pro drůbež.

Také *Gallibacterium anatis* patří mezi komenzály horních cest dýchacích a reprodukčního traktu kuřat. Zahrnuje dva biovary: zatímco nehemolytický biovar **anatis** nemá z klinického hlediska velký význam, biovar **haemolytica**, produkující hemolytický toxin, je považován za nový, „emerging“ patogen drůbeže, asociovaný zejména s postižením reprodukčního systému: **salpingitidami** a **peritonitidami** nosnic a **systémovými infekcemi** (septikémií, perikarditidy, hepatitidy a ooforitidy) kura a další drůbeže. Vznik onemocnění ovlivňuje stres, imunosupresivní faktory, věk a hladiny pohlavních hormonů. Onemocnění silně připomíná některé formy kolibacilózy a až v 50 % případů je *G. anatis* izolováno společně s *E. coli*. Kromě

zmíněného RTX toxinu **GtxA** s hemolytickým a leukotoxickým účinkem patří k důležitým faktorům virulence **kapsula**, **fimbrie FlfA** a **proteázy** štěpící drůbeží imunoglobuliny.

Jako ostatní zástupci této čeledi je *G. anatis* fakultativně anaerobní nepohyblivá gram-negativní kokotýčinka, dává pozitivní reakce v katalázové, variabilní v oxidázové zkoušce. Vzorky (stěry vnitřních orgánů, peritonea, vejcovodu) kultivujeme aerobně na krevním agaru, kde po 24 - 48 hodinách pozorujeme hladké šedavé kolonie obklopené úplnou hemolýzou. Původce lze detekovat i přímo metodou PCR. Izoláty je žádoucí podrobit testům na antibiotickou citlivost, neboť vykazuje častou rezistenci k široké řadě běžných antibiotik.

Také další zástupci tohoto rodu, *G. melopsittaci* a *G. salpingitidis*, jsou asociovány s podobnými problémy (septikemie, salpingitidy) u papoušků, respektive kachen.

*Volucribacter psittacida* a *V. amazonae* jsou příležitostnými původci septikemických onemocnění papoušků, byly však izolovány i z kuřat. Za standardních kultivačních podmínek (bez požadavku NAD) vytváří na krevním agaru nehemolytické kolonie, dávají variabilní reakce v katalázové a oxidázové zkoušce.

## 2.3 Čeleď Aeromonadaceae

### 2.3.1 Rod *Aeromonas*

Aeromonády jsou rovné gramnegativní tyčinky. Jsou fakultativně anaerobní a mají fermentativní typ metabolismu. Jsou pozitivní na oxidázu a katalázu a většina se pohybuje pomocí polárního bičíku. Výskyt aeromonád je primárně vázán na vodní prostředí; nalezneme je ve sladkých vodách, na kůži a v GIT plazů a ryb. Pohyblivé mezofilní aeromonády, z nichž nejvýznamnější je *A. hydrophila*, dále pak *A. caviae*, *A. veronii* a *A. sobria*, způsobují oportunní infekce, septikémie a střevní infekce savců, obojživelníků, plazů i ryb. Psychrofilní nepohyblivá *A. salmonicida* je původcem furunkulózy lososovitých ryb.

#### 2.3.1.1 Patogenita

Zdrojem aeromonádových infekcí je voda. *A. hydrophila* je spojena s širokým spektrem infekcí. Je významnou příčinou **hemoragické septikémie** sladkovodních ryb. Onemocnění má oportunní charakter, potencováno nevhodnými chovatelskými podmínkami, nízkou kvalitou vody a stresem. Objevují se poruchy plavání, exophthalmus, ascites, poškozené ploutve, kožní ulcerace a zvýšený úhyn ryb. Onemocnění obojživelníků (hlavně žab) se nazývá „red leg“ a je spojeno s hemoragiemi ve svalovině končetin. U hadů aeromonády způsobují **nekrotickou stomatitidu**, někdy také pneumonie a septikémie. Infekce lidí (případně jiných savců) mají charakter gastrointestinálních onemocnění, nebo infekcí ran, někdy vznikem nekrotizující fasciitidy nebo septikémie. Zdrojem kontaminace ran bývaly také pijavice, jejichž medicínské využití již naštěstí není tak hojné jako dříve. **Střevní infekce** mohou mít podobu hemoragické dyzentérie nebo vodnatého, cholery připomínajícího průjmu. Také *A. caviae* a *A. sobria* jsou sporadicky izolovány z infekcí ran a septikemií.

**Furunkulóza** je závažné onemocnění lososovitých ryb, způsobované *A. salmonicida*. Infekce je vázána na chladnější vody než v případě *A. hydrophila*. Onemocnění se přenáší kontaktem a ingescí, velkou roli zde opět hrají predispoziční faktory – stres, nevhodné chovatelské podmínky. Typické jsou hluboké kožní ulcerace, zasahující až do svaloviny, hemoragie v orgánech a zánět střeva.

#### 2.3.1.2 Patogeneze

Faktory virulence aeromonád nejsou dosud přesně známy. Aeromonády produkují řadu toxinů a **sekreční systém typu III**. Tzv. aeromonádový **exoenzym T** je efektor T3SS a způsobuje dezorganizaci cytoskeletu postižených buněk. V kolonizaci povrchů se uplatňují **fimbrie IV. typu**. Aeromonády jsou schopny tvořit **biofilm**.



K toxinům, jež byly u aeromonád identifikovány, patří **aerolyzin**, cytolytický toxin tvořící póry v membránách s hemolytickými účinky. *A. hydrophila* produkuje **cytotoxický enterotoxin Act** a **termolabilní a termostabilní cytotoxické enterotoxiny Alt** a **Ast**.

### 2.3.1.3 Diagnostika

Aeromonády patří mezi časté kontaminanty laboratorních kultur. Rostou na běžných médiích. Kolonie *A. hydrophila* a dalších mezofilních aeromonád se objevují po 24 hodinách kultivace při 37°C a jsou poměrně velké, šedé až nahnědlé, obklopené úplnou hemolýzou. Rostou také na MCA, kde jsou bezbarvé až nahnědlé (*A. caviae* a některé kmeny *A. hydrophila* však mohou být laktóza-pozitivní). *A. salmonicida* kultivujeme při 25°C 48 hodin.

Odlišení od *Vibrio* spp. umožňuje test s vibriostatikem O/129, k němuž jsou aeromonády rezistentní, zatímco u vibrií se vytváří zóna inhibice. Aeromonády jsou naopak inhibovány na médiích se zvýšeným obsahem NaCl. Glukóza je fermentována; další biochemické testy umožňují druhové určení.

### 2.3.1.4 Terapie a prevence

Vzhledem k oportunnímu charakteru aeromonádových infekcí stojí na prvním místě dodržování hygienických pravidel zejména při cestování. Chovatelé ryb by měli dbát na dobré chovatelské podmínky, vysokou čistotu vody, kvalitní výživu, správnou teplotu a vyvarovat se přehřívání nádrží a všech stresových vlivů.

Aeromonády jsou běžně rezistentní k penicilinu i ampicilinu. K léčbě infekcí se používají potencované sulfonamidy, aminoglykosidy, fluorované chinolony a karbapenemy. Testování citlivosti je však nezbytné vzhledem k nárustu rezistentních kmenů.

## 2.4 Čeleď Vibrionaceae

### 2.4.1 Rod *Vibrio*

K oddělení čeledi Aeromonadaceae a Vibrionaceae z kmene Gammaproteobacteria došlo poměrně nedávno. Čeleď Aeromonadaceae má v současnosti vlastní řád Aeromonadales, právě tak čeleď Vibrionaceae je řazena k řádu Vibrionales. Zástupci obou čeledí jsou silně vázány na vodní prostředí. Na rozdíl od aeromonád je *Vibrio* spp. halofilní a vyskytuje se převážně ve slaných a brakických vodách. *Vibria* jsou většinou rohlíčkovitě zahnuté gramnegativní tyčinky s polárním bičíkem. Jsou fakultativně anaerobní s fermentativním typem metabolismu sacharidů. Většina je pozitivní na oxidázu.

Mnoho druhů vibrií žijí jako symbionty nebo komenzálové mořských živočichů – ryb, kroužkoců, korýšů a měkkýšů. *V. harveyi* a *Aliivibrio fischeri* jsou schopny bioluminiscence – v závislosti na množství světélkují, a proto posloužily jako modelové organismy při výzkumu *quorum sensing*. Mikroflóra čtverzubců a dalších ryb z řádu Tetraodontiformes (např. *V. alginolyticus*) syntetizuje tetrodotoxiny, neurotoxiny zodpovědné za otravy lidí nesprávně upravenou japonskou specialitou – rybou fugu. Řada druhů slaných a brakických vod, jako je *V. vulnificus*, *V. fluvialis* a *V. parahaemolyticus*, způsobuje gastroenteritidy po požití nedostatečně tepelně upravených ryb a mořských plodů. *V. ordalii* a *V. anguillarum* (také *Listonella anguillarum*) jsou důležité patogeny ryb. *V. metchnikovii* je na rozdíl od jiných druhů vibrií negativní na oxidázu a byl izolován ze střeva různých zvířat a prokázán jako původce enteritidy kura domácího. Nejznámějším patogenem je zajisté *V. cholerae*, původce cholery člověka.

První cholerové epidemie se objevily v Evropě zřejmě v 19. století. V roce 1854 vypukla velká epidemie v londýnské části Soho. Tehdy se mělo za to, že příčinou infekcí jsou „miasmata“ – jakési chorobné fluidum nebo „zkažený vzduch“. Místní lékař John Snow však systematickým pátráním zjistil, že zdrojem nákazy byla jedna kontaminovaná veřejná pumpa, a prosazoval teorii, že na vině jsou spíše choroboplodné zárodky obsažené ve vodě. John Snow se sice potvrzení své teorie Robertem Kochem nedočkal, ale svým postupem položil základy epidemiologického vyšetřování.

#### 2.4.1.1 Patogenita a patogeneze

Konzumace nedovařených nebo syrových ryb a mořských plodů (např. ústřice) může způsobit nepříjemnou **gastroenteritidu** s rychlým nástupem, krvavým nebo vodnatým průjmem a zvracením, někdy horečkou. U imunosuprimovaných jedinců může infekce vést až k sepsi. Původci jsou často *V. parahaemolyticus* a *V. vulnificus*, který byl také izolován z nekrotizujících infekcí ran. *V. vulnificus* produkuje hemolyzin ze skupiny RTX toxinů.

*V. metchnikovii* byl popsán jako původce **enteritidy kura domácího**. Vzácně je implikován jako oportunní patogen člověka (pneumonie, infekce ran). I tyto infekce mají souvislost s kontaminovanou vodou. Jinak je o tomto patogenu velmi málo známo.

**Vibrióza** je příčinou velkých ztrát v akvakulturách mořských ryb, mlžů a krevet. *V. (Listonella) anguillarum*, *V. vulnificus* a další druhy vibrií způsobují hemoragické septikémie a hynutí těchto živočichů.

**Cholera** je obávaným onemocněním člověka. Také *V. cholerae* se přirozeně vyskytuje v brakických vodách, kde žije v asociaci s chitínovým exoskeletem korýšů, dostává se však i do sladkých vod. Za určitých okolností (teplota, koncentrace živin) se pomnožují do nebezpečných koncentrací, načež mohou dlouho přežívat v dormantním stavu i v méně příznivých podmínkách. Pouze některé sérotypy, zejména O1 a O139, produkují cholerový toxin a jsou spojeny s typickým lidským onemocněním. *V. cholerae* jiných sérotypů způsobuje gastroenteritidy a infekce ran jako jiné druhy vibrií. V některých zemích se cholera vyskytuje endemicky; epidemický průběh často souvisí s nízkou hygienickou úrovní. Zdrojem kontaminace vod jsou infikovaní lidé, vodou jsou pak kontaminovány potraviny. Možný je přenos přes neumyté ruce. Typickým příznakem cholery je drastický vodnatý průjem připomínající „rýžovou vodu“, vedoucí k totální dehydrataci organismu, která je příčinou smrti. Vodnatý sekreční průjem způsobuje **cholerový toxin (CTX)**, kódovaný fágem. Jedná se o ADP-ribosylující toxin, jehož účinkem dochází k zvýšení koncentrace cAMP v buňce a efluxu chloridových iontů, táhnoucích vodu do střevního lumina. Druhým důležitým faktorem virulence, tvořeným epidemickými kmeny, je TCP (toxin co-regulated pilus) – **fimbrie typu IV**, uplatňující se v kolonizaci střevní sliznice.

#### **2.4.1.2 Diagnostika**

Vibria rostou na běžných médiích za standardních podmínek (37°C, 24 hodin), rybí patogeny kultivujeme při 20°C 48 hodin. Halofilní druhy preferují zvýšenou koncentraci NaCl, která navíc omezuje růst aeromonád a dalších potenciálních kontaminant. Lze také použít speciální selektivní média, jako je TCBS, agar s thiosulfátem, citrátem, sacharózou a žlučovými solemi, do značné míry inhibující růst enterobakterií, pseudomonád a aeromonád. Okyselení způsobené fermentací sacharózy (*V. cholerae*, *V. metchnikovii*) se projeví žloutnutím původně zeleného média. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* tvoří zelené kolonie. Jiným médiem TTGA (agar s taurocholátem, teluritem a želatinou), určené pro diferenciaci *V. parahaemolyticus* od *V. cholerae*. Na krevním agaru pozorujeme různou hemolýzu v závislosti na druhu. Další biochemické zkoušky nebo hmotnostní spektrometrie umožní přesnou druhovou identifikaci.

#### **2.4.1.3 Terapie a prevence**

Úzkostlivé dodržování hygieny a používání pouze balené vody v endemických oblastech cholery. Konzumace syrových ryb a mořských plodů s sebou vždy nese určité riziko a lidé s kompromitovanou imunitou by se jí měli vyvarovat. Základem léčby je rehydratace organismu.

### 3. Gramnegativní aerobní tyčinky a koky

#### 3.1 Čeleď Pseudomonadaceae

Čeleď Pseudomonadaceae s čeledí Moraxellaceae patří do řádu Pseudomonadales třídy Gammaproteobacteria. Zahrnuje několik rodů, z nichž některé (*Azotobacter*, *Azomonas* aj.) mají význam jako půdní mikroorganismy vázající vzdušný dusík. Klinicky zdaleka nejvýznamnějším zástupcem je *Pseudomonas* spp.

##### 3.1.1 Rod *Pseudomonas*

Pseudomonády jsou gramnegativní tyčinky s polárním bičíkem. Nefermentují sacharidy, ale využívají je oxidativními metabolickými drahami. Přesto jsou schopny růstu i za anaerobních podmínek s využitím tzv. anaerobní respirace procesem redukce nitrátů (nitráty slouží jako akceptor elektronu místo kyslíku). Katalázová i oxidázová zkouška je pozitivní.

Pseudomonády jsou běžnou mikroflórou prostředí, které rostou v poměrně širokém rozmezí teplot (asi mezi 10°C a 40°C). *P. putida* a *P. stutzeri* jsou půdní saprofyty, které mají význam při biodegradaci plastů a bioremediaci půd. *P. syringae* je patogen rostlin. *P. fluorescens* jen velmi vzácně způsobuje oportunní infekce; je asociována s hnilobou ploutví akvarijních ryb. Naproti tomu *P. aeruginosa* pozoruhodným oportunním patogenem mimořádného významu ve veterinární i humánní medicíně.

##### 3.1.1.1 Patogenita

*P. aeruginosa* je běžnou environmentální bakterií, které se daří zejména ve vlhkém prostředí – kontaminuje medicínská zařízení jako endoskopy, katetry a anestetické přístroje, kde může přetrvávat dlouhou dobu díky tvorbě biofilmu a díky vysoké rezistenci k běžným dezinfekčním prostředkům (např. kvarterním amoniovým solím). Navíc je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik a snadno získává nové determinanty rezistence. Tyto vlastnosti z ní činí typický nosokomiální patogen. Pseudomonády kontaminují rány a způsobují hnisavé kožní infekce. Při rozsáhlém poškození přirozených bariér (např. popáleniny) nebo silné imunosupresi (onkologičtí pacienti) mohou být příčinou septikémie. Běžné jsou infekce močového traktu a pneumonie, zejména obávané u pacientů s cystickou fibrózou. *P. aeruginosa* velmi běžnou příčinou *otitis externa* u psů, očních infekcí a metritid především u koní.

##### 3.1.1.2 Patogeneze

Ačkoli je *P. aeruginosa* „pouze“ oportunním patogenem, je vybavena pozoruhodným arzenálem rozličných faktorů virulence. Je to skutečně maximálně přizpůsobivá bakterie, která

dokáže přepnout mezi dvěma zcela odlišnými životními styly. Stala se proto také jedním z modelových organismů pro studium různých regulačních mechanismů včetně *quorum sensing*.

Pseudomonády z vnějšího prostředí se nejprve dostávají do místa infekce – především traumaticky narušené sliznice nebo kůže. Aplikace katetrů, kontaktních čoček a dalších prostředků, které traumatizují sliznici a poskytují vhodné prostředí pro růst pseudomonádového biofilmu, výrazně napomáhá průniku infekce. Kolonizaci povrchů umožňuje **bičík a fimbrie IV. typu**. Tyto fimbrie (nebo také „pili“), složené ze šroubovicově uspořádaných proteinových jednotek, slouží jako adheziny a jako prostředek tzv. trhavého pohybu. Nezávisle na bičíku se bakterie takto posouvají v těsném kontaktu s povrchem. Fimbrie hrají zásadní roli v iniciálních stádiích vzniku biofilmu.

Po úspěšné kolonizaci povrchů se spouští systém *quorum sensing*, který pozitivně reguluje produkci většiny rozpoznávaných faktorů virulence, od polysacharidové substance biofilmu po exotoxiny. Řídí tak doslova „přepnutí“ životního stylu – z environmentální bakterie se stává agresivní patogen. *P. aeruginosa* používá dva systémy QS: **LasR-LasI** a **RhlR-RhII**, přičemž LasI/RhII řídí syntézu signálních molekul, tzv. autoinducérů (homoserinových laktónů), zatímco LasR/RhlR jsou transkripční aktivátory. V řízení exprese faktorů virulence se uplatňují i další regulační systémy, např. alternativní sigma faktor **RpoN** a dvoukomponentový systém **GacS/GacA**.

*P. aeruginosa* produkuje řadu enzymů a toxinů, které přispívají k lokálnímu poškození tkáně. Zatímco **exotoxin A** je produkován vně bakteriální buňky, **exotoxiny S, T, U** a **Y** jsou transportovány **sekrečním systémem typu III** přímo do eukaryotické buňky. Exotoxin A je ADP-ribosylující toxin inhibující proteosyntézu (blokuje elongační faktor 2). Výsledkem je smrt buňky, uvolnění dosud nedostupných živin a poškození napadené tkáně, umožňující bakteriím další šíření. Exotoxiny S a T modifikují funkce aktinového cytoskeletu, interferují s fagocytózou i inhibují hojení tkáně. Exotoxin U je lipáza a exotoxin Y adenylátcykláza.

K poškození tkáně výrazně přispívají pseudomonádové proteázy – **elastáza (pseudolyzin: LasA a LasB)** a **alkalická fosfatáza (aeruginolyzin)**. Působí tak jako invazivní faktory, degradující proteiny extracelulární matrix, zároveň ale štěpí i molekuly imunitního systému (složky komplementu, cytokiny). Dále *P. aeruginosa* produkuje dva hemolyziny: **fosfolipázu C**, poškozující buněčné membrány, a tzv. **rhamnolipid**, který působí jako detergent, emulgující plicní surfaktant. Způsobuje ciliostázi a blokuje tak čistící funkci řasinkového aparátu. Obojí má zásadní význam při vzniku pneumonie.

Pro *P. aeruginosa* je typická produkce **pigmentů**. Nejběžněji se setkáváme s producenty modrozeleného **pyocyaninu** nebo žlutozeleného **pyoverdinu**, vzácněji pozorujeme červený **pyorubrin** a černohnědý **pyomelanin**. Také pigmenty působí jako faktory virulence. Pyoverdin je siderofor. Spolu s dalším sideroforem **pyochelinem** zajišťuje vazbu železa z vnitřního prostředí. Pyocyanin je toxický oxidant, způsobuje uvolňování reaktivních forem kyslíku, poškozující jak hostitelské, tak jiné bakteriální buňky (samy pseudomonády se chrání produkcí **katalázy** a **superoxiddismutázy**). Není to ostatně jediný příklad agresivního chování pseudomonád vůči jiným bakteriím. Za určitých okolností, například v mnohodruhovém biofilmu, v přítomnosti vzájemně nespolupracujících druhů, používá *P. aeruginosa* **sekreční systém typu VI** (T6SS), aby se zbavila svých nepohodlných sousedů. T6SS je organela odvozená od bičíku bakteriofága, který „vstřeluje“ efektorové proteiny nejen přes membrány eukaryotických buněk, ale i do jiných bakterií.

Růst bakterií v **biofilmu** je velmi důležitý znak pseudomonádových infekcí, do značné míry odpovědný za jejich obtížnou léčitelnost. Biofilm tvoří komunity klidových „sesilních“ bezbičíkatých buněk, přisedlých na určitém povrchu a obklopených strukturovanou polysacharidovou substancí. Pseudomonády tvoří více 3 typy exopolysacharidu: **alginát**, **Psl** a **Pel** (pelikula). Kmeny produkující tzv. alginát rostou typicky v mukózní fázi.

### 3.1.1.3 Diagnostika

Pseudomonády se snadno kultivují, význam nálezu je však nutno pečlivě interpretovat (nezřídka se jedná o kontaminanty). Na krevním agaru tvoří široké ploché kovově se lesknoucí kolonie s poněkud zbrázděným povrchem, obklopené hemolýzou. Pigment, je-li produkován, nezbarvuje pouze kolonie, ale i jejich okolí. Pseudomonády jsou rozpoznatelné i ve smíšené kultuře díky typické „jasmínové“ vůni. Rostou i MCA jako bezbarvé ploché kolonie. Existuje také selektivní médium pro izolaci pseudomonád, tzv. cetrimidový agar.

Na základě pozitivní oxidázové a katalázové zkoušky, O-F testu (oxidace glukózy) a dalších zkoušek lze zvolit biochemické multitesty pro nefermentující bakterie k definitivní identifikaci. *P. aeruginosa* produkuje ureázu a zkapalňuje želatinu, neoxiduje laktózu ani maltózu (tím se liší od *B. cepacia*).

### 3.1.1.4 Terapie

Pseudomonádové infekce jsou často obtížně léčitelné. Podíl na tom má jak přirozená, tak získaná rezistence a produkce biofilmu. Nasazení antibiotik pouze na základě *in vitro* testů je tedy samozřejmostí, ale ani tento postup nezaručuje, že budou vybrané látky účinné *in vivo* – přítomnost biofilmu totiž snižuje citlivost bakterií o několik řádů.

Pseudomonády jsou přirozeně rezistentní k mnoha skupinám antimikrobiálních látek díky produkci betalaktamáz (chromozomálně kódované indukibilní AmpC betalaktamázy), snížené propustnosti vnější membrány a přítomnosti efluxních pump. Nižší generace penicilinů a cefalosporinů, tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, linkosamidy a sulfonamidy včetně potencionovaných je nutno pokládat za neúčinné. Naopak karbapenemy a „antipseudomonádové“ peniciliny jako piperacilin či ticarcilin, aminoglykosidy jako gentamicin a amikacin, kolistin a fluorované chinolony jsou většinou efektivní; je však nutno dávat pozor na získanou rezistenci. Rezistence ke karbapenemům (meropenem, imipenem) je sice poměrně vzácná, ale velice závažná. Může být neenzymatická (efluxní pumpy) nebo enzymatická (plasmidově kódované karbapenemázy). Rezistence k fluorochinolonům je obvykle způsobena chromozomálními mutacemi.

## 3.2 Čeleď Burkholderiaceae

Čeleď Burkholderiaceae z řádu Burkholderiales třídy Betaproteobacteria zahrnuje medicínský významný rod *Burkholderia* spp.

### 3.2.1 Rod *Burkholderia*

*Burkholderia* spp., dříve *Pseudomonas*, je gramnegativní, obligátně aerobní tyčinka, pohyblivá pomocí jednoho nebo více polárních bičíků (pouze *B. mallei* je nepohyblivá). Většina z nich jsou půdní a rostlinné saprofyty. Skupina, kterou označujeme jako komplex *B. cepacia*, nabývá na významu v nosokomiálních infekcích člověka, zatímco *B. mallei* a *B. pseudomallei* způsobují zoonotické pyogranulomatózní infekce a mají značný význam ve veterinární medicíně.

#### 3.2.1.1 Komplex *Burkholderia cepacia*

Druhy z této skupiny (*B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans* aj.) jsou půdní bakterie, fixující vzdušný dusík. Jsou schopné degradovat různé polutanty, např. herbicidy a ropné sloučeniny, a proto jsou považovány za bioremediační organismy. *B. cepacia* byla identifikována původně jako původce hniloby cibule. V poslední době narůstá i jejich význam jako oportunních patogenů člověka. Jsou přirozeně rezistentní k mnoha skupinám antibiotik včetně běžných aminoglykosidů, betalaktamů, kolistinu a polymixinu B, a k dezinfekčním prostředkům – kvarterním amoniovým solím a dokonce chlorhexidinu. Tvoří biofilm v močových katetrech, nitrožilních a endotracheálních kanylách a srdečních implantátech. Obzvláště nebezpečné jsou pneumonie pacientů s cystickou fibrózou.

*B. cepacia* a další druhy z tohoto komplexu se snadno kultivují, na krevním agaru tvoří žlutě pigmentované nehemolytické kolonie. Rostou i na MCA. Pro lepší rozlišení od *P. aeruginosa* se však v humánní medicíně užívají speciální selektivní média.

#### 3.2.1.2 *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*

*B. mallei* a *B. pseudomallei* jsou fakultativně intracelulární enkapsulované gramnegativní tyčinky, spojené se vznikem pyogranulomatózních lézí u zvířat i člověka. Redukují nitráty a produkují ureázu. *B. mallei* je nepohyblivá.

*B. mallei* je původcem vozohřivky (malleus), velice nebezpečné zoonotické infekce, jejímž rezervoárem jsou koňovití, vnímavá je však řada dalších druhů (člověk, morčata, šelmy, především kočkovité). *B. pseudomallei* způsobuje tzv. melioidózu (pseudomalleus) s širokým spektrem hostitelských druhů. Rezervoárem je půda. *B. pseudomallei* je považována za endosymbionta půdních améb (*Acanthamoeba* spp.). Améby se do značné míry podobají makrofágům

– adaptace na ně bývá považována za evoluční předstupeň schopnosti perzistence v makrofázích.

### 3.2.1.3 Patogenita

**Vozhřivka** je primárně infekce koňovitých, charakterizovaná vznikem pyogranulomů v postižených orgánech s akutním nebo chronickým průběhem. K nakažení dochází nejčastěji aerogenní cestou, někdy přes kůži, u zvířat také ingescí. Akutní septikemický průběh převažuje u vysoce vnímavých druhů, jako jsou osli a kočkovité šelmy, ale také u člověka, a bývá fatální. Ulcerace a kolikvující granulomy vznikají na sliznici dutiny nosní, v průběhu dýchacích cest a plicích. Odtud se infekce krevní a lymfatickou cestou diseminuje do dalších orgánů. K příznakům patří horečka, výtok z nozder a respirační potíže; u člověka silné zduření obličeje. U koní často vzniká z hlediska šíření zákeřná chronická forma, při níž mírně vyjádřené příznaky nemusí být zaznamenány a nakažená zvířata jsou zdrojem infekce.

**Melioidóza** patří spíše mezi exotické infekce, ale sporadicky se objevuje i v Evropě. K endemickým oblastem patří jihovýchodní Asie a severní Austrálie. Má široké hostitelské spektrum (ryby, ptáci, domácí zvířata, primáti). K nakažení může dojít ingescí, inhalací, kontaminací ran vodou či hlínou v endemických oblastech a v závislosti na cestě vstupu a případné diseminaci vznikají hnisavé granulomy v různých orgánech (plíce, kosti, klouby, mozek, děloha, mléčná žláza aj.). Od toho se také odvíjejí klinické příznaky. Při septikemickém průběhu se bakterie diseminují krevní cestou do různých orgánů, jsou však schopny také přímého přestupu z buňky na buňku; tímto způsobem se mohou šířit podél nervových vláken do centrální nervové soustavy. Průběh může být akutní, chronický a latentní.

### 3.2.1.4 Patogeneze

*B. mallei* i *B. pseudomallei* jsou fakultativně intracelulární patogeny, primárně napadající makrofágy. K rozpoznáním faktorům virulence patří **fimbrie typu IV**, uplatňující se v adhezi na cílové buňky, **kapsula**, chránící bakterii před účinkem komplementu i před baktericidními mechanismy makrofágů, a **sekreční systém III. typu**, jehož účinkem dochází k úniku bakterií z fagozomu do cytoplasmy a jejich šíření z buňky na buňku. Byl identifikován také sekreční systém VI. typu (T6SS).

### 3.2.1.5 Diagnostika

Burkholderie lze kultivovat na krevním agaru, kde tvoří bílé nehemolytické kolonie. Každé podezření na vozhřivku je však nutno hlásit a vyšetření musí provádět specializovaná laboratoř. Druhové odlišení umožňuje přítomnost bičíku, schopnost růstu na MCA v případě *B. pseudomallei* a některé biochemické testy. Oba druhy redukují nitráty, ale pouze *B. pseudomallei* tvoří plynný dusík.



V České republice se v současnosti vozňřivka nevyskytuje a importovaní koňovití se podrobují sérologickému testování (ELISA, komplement-fixační test). Spíše historickou záležitostí je potom intradermální maleinový test, který je principiálně analogický tuberkulinaci – purifikovaný antigen se použije k detekci oddáleného typu hypersenzitivity u zvířat, která se již setkala s infekcí. Na jatkách, kde se provádí porážka koňovitých, patří ke standardnímu postupu prohlídka nosní sliznice, zda nejsou přítomny hvězdícovité jizvy, typické pro chronické nosiče.

### **3.2.1.6 Terapie a prevence**

Systematický monitoring výskytu nákazy je nejdůležitějším preventivním opatřením. Vakcína není dostupná proti jednomu ani druhému původci. Také léčba je obtížná. *Burkholderia* spp. je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik – především polymyxinům, ale také fluorochinolónům, aminoglykosidům a makrolidům. Dlouhodobá aplikace potencovaných sulfonamidů může být úspěšná v případě melioidózy. Léčba vozňřivky se u zvířat neprovádí.

### 3.3 Čeleď Francisellaceae

#### 3.3.1 *Francisella tularensis*

*F. tularensis* z čeledi Francisellaceae třídy Gammaproteobacteria je aerobní nepohyblivá gramnegativní kokotyčinka. Jako fakultativně intracelulární patogen je původcem zoonotické nákazy s přírodní ohniskovostí – **tularemie**. Pro svou vysokou nakažlivost je řazena mezi potenciální biologické zbraně.

*F. tularensis* zahrnuje čtyři poddruhy nebo biovary, lišící se virulencí a geografickou distribucí: 1) ssp. *tularensis* neboli typ A je nejvirulentnější, způsobuje často fatální infekce a dominuje v Severní Americe; 2) ssp. *holarctica* neboli typ B, asociovaný s poněkud mírnějším průběhem, vyskytující se v Evropě a Asii; 3) ssp. *novicida*, jenž je málokdy asociován s onemocněním a byl popsán v Severní Americe; 4) ssp. *mediasiatica*, specifický pro oblast Kazachstánu a Turkmenistánu, jehož virulence není přesně známa.

##### 3.3.1.1 Patogenita

*F. tularensis* má široké spektrum hostitelů – savce, ptáky, plazy i bezobratlé. Hlavním rezervoárem v našich podmínkách jsou zajíci, hlodavci a spárkatá zvěř. V přírodních ohniscích je přenos často realizován klíštětem, nicméně vektor není k přenosu nezbytný. Bakterie je poměrně odolná v prostředí a v chladu vydrží i několik týdnů v půdě, vodě, zvířecích kadaverech a jiných kontaminovaných materiálech, např. seně. Forma onemocnění se odvíjí od cesty vstupu infekce. Člověk se nejčastěji nakazí manipulací s mrtvými zvířaty a jejich produkty, ale může zde figurovat i klíště jako vektor. Po infekci kůže vzniká nejčastější, tzv. **ulceroglandulární forma**. Typický je vznik vředovité léze s paprskovitě se větvícími cévami v místě vstupu infekce. Inhalací kontaminovaného prachu nebo aerosolu (například při omývání zvěře) vzniká nebezpečná, často letální **forma pneumonická**. Vzácněji dochází k infekci přes spojivku nebo ingescí (**oroglandulární forma**, tzv. tularemická angína). Systémová diseminace vede ke vzniku **generalizované (tyfoidní) formy**. K příznakům patří vysoká horečka a vznik pyogranulomatózních uzlíků v mízních uzlinách a postižených orgánech.

##### 3.3.1.2 Patogeneze

*Francisella tularensis* je fakultativně intracelulární a napadá různé typy buněk, primární je však infekce makrofágů, které bakterie pohlcují po jejich průniku do organismu. Nedochází však k fagolyzomální fúzi a likvidaci bakterií; ty ještě před fúzí unikají z fagozomů do cytoplasmy. O faktorech virulence, asociovaných s tímto procesem, se zatím ví poměrně málo. Vazbu na cílové buňky umožňují **fimbrie typu IV**. V obraně před různými složkami imunitního systému hrají roli **kapsula** a atypický **lipopolysacharid**, obsahující asymetrický lipid A s dlouhými řetězci mastných kyselin, který není rozpoznáván TLR-4 imunitních buněk (toll-like receptory, které rozpoznávají bakteriální LPS a aktivují zánětlivou odpověď). Ústředním faktorem virulence se zdá být ostrov patogenity **FPI** (*Francisella pathogenicity island*). Dosud

nepřesně charakterizované produkty genů asociovaných s FPI zajišťují degradaci membrány fagozomu, únik bakterie do cytoplasmy a polymeraci aktinu, umožňující pohyb bakterií v buňce i jejich šíření z jedné buňky na druhou.

### ***3.3.1.3 Diagnostika***

Původce tularémie je možno izolovat z lézí, aspirátů mizních uzlin, sputa, při septikémickém průběhu také z krve, nicméně manipulace s ním je riziková a měla by se provádět jen ve specializovaných laboratořích. Francisely jsou náročné na kultivaci, vyžadují selektivní média obohacená cysteinem, případně čokoládový agar. Kultivují se při 5 % CO<sub>2</sub> a 37°C dva dny a více. Jsou pozitivní na katalázu, negativní na oxidázu a produkují betalaktamázy. Identifikace se provádí molekulárními metodami.

Častěji (a bezpečněji) se uchylujeme k sérologickým diagnostickým metodám. Uhynulé či odstřelené zajíce s typickými lézemi (uzlíky v mizních uzlinách, játrech) lze přímo v terénu testovat rychlou sklíčkovou aglutinací – určité procento musí být otestováno povinně v rámci monitoringu. Podezření musí být potvrzeno spolehlivějšími laboratorními testy – pomalou zkumavkovou aglutinací, ELISA aj. K přímé detekci antigenu ve vzorku je vyvinut fluorescenční test.

### ***3.3.1.4 Terapie a prevence***

Profesionálně ohrožení lidé (lovci, zaměstnanci podniků zpracovávajících zvěřinu) musí dodržovat hygienická pravidla a používat ochranné pomůcky jako rukavice apod. Důkladná tepelná úprava zvěřiny je samozřejmostí. Je důležité vyvarovat se rizikových aktivit, jako je manipulace s uhynulou zvěří, a pokud možno se chránit před klíšťaty, zejména v ohniscích nákazy. Je dostupná také atenuovaná vakcína.

K léčbě tularémie se používají aminoglykosidy, doxycyklin, rifampicin nebo fluorované chinolony.

### 3.4 Čeleď Alcaligenaceae

Čeleď Alcaligenaceae z třídy Betaproteobacteria zahrnuje asi 17 rodů nefermentujících bakterií, z nichž jsou klinické významné jsou především rody *Bordetella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pelistega* a *Taylorella*.

#### 3.4.1 Rod *Alcaligenes*

*Alcaligenes* spp. jsou krátké, obvykle samostatné tyčinky s peritrichálními bičíky. Jsou aerobní a nevyužívají sacharidy. Vyskytují se ve vodě, v půdě i v trávicím traktu člověka a zvířat. *A. faecalis* a některé další druhy bývají původci oportunních a nosokomiálních infekcí, jako jsou pneumonie a bakterémie zejména u pacientů s cystickou fibrózou a infekce močového aparátu. Některé způsobují také kažení potravin.

Na krevním agaru tvoří nehemolytické nepigmentované kolonie s nasládlou vůní. Katalázová i oxidázová zkouška je pozitivní. Další identifikaci umožňují biochemické testy určené pro nefermentující bakterie nebo MALDI-TOF.

#### 3.4.2 Rod *Achromobacter*

Také *Achromobacter* spp. je nefermentující aerobní pohyblivá tyčinka, vyskytující se v prostředí. *A. xylosoxidans* bývá izolován jako oportunní patogen z pneumonií, močových infekcí a bakteremií, které jsou často obtížně léčitelné vzhledem k běžné produkci betalaktamáz, karbapenemáz a enzymů modifikujících amidoglykosidy. Původně byl identifikován jako původce otitis media. Někdy také kontaminuje laboratorní buněčné kultury.

#### 3.4.3 Rod *Pelistega*

V současnosti je navrženo několik druhů rodu *Pelistega*, definitivně uznaný je jeden: *P. europea*, identifikovaná jako původce respiračního onemocnění u holuba.

#### 3.4.4 Rod *Bordetella*

Bakterie rodu *Bordetella* jsou aerobní nefermentující gramnegativní tyčinky, specializované na kolonizaci dýchacích cest, které zahrnují několik významných respiračních

patogenů savců i ptáků. Z veterinárního hlediska je nejvýznamnější *B. bronchiseptica*, původce zánětů horních i dolních dýchacích cest řady zvířecích druhů, která je pohyblivá (produkuje peritrichální bičíky) a enkapsulovaná. Dále taktéž pohyblivá *B. avium*, způsobující respirační onemocnění zejména u krůt, a význačný lidský patogen, nepohyblivá *B. pertussis* – původce černého kašle. Bordetely jsou asacharolytické a energii získávají oxidací aminokyselin.

#### 3.4.4.1 Patogenita

**Černý kašel** neboli pertuse je vysoce nakažlivé onemocnění, nebezpečné především pro děti, které se v současnosti (díky proočkovanosti evropské populace) vyskytuje převážně v rozvojových zemích. *B. pertussis* se přenáší kapénkami a způsobuje katarální až nekrotický zánět dýchacích cest od nosohltanu po průdušky. Typickým příznakem jsou záchvaty dráždivého kašle ústící někdy až ve zvracení; u adolescentů a dospělých je průběh mírnější. Velmi podobné onemocnění vyvolává *B. parapertussis*.

*B. avium* obývá sliznice dýchacích cest drůbeže a může se podílet na různých respiračních onemocněních, specificky patogenní je však pro krůty, u nichž vyvolává tzv. **infekční rýmu krůt** neboli bordetelózu. Onemocnění se přenáší především vodou a přímým kontaktem a projevuje se sinusitidou a tracheobronchitidou s otokem submaxilárních dutin, kýčáním, výtoky z nosu a dyspnoí. Typickým nálezem jsou změkčené kolabované tracheální prstence. Koinfekce s *E. coli* komplikuje průběh onemocnění.

Nejvýznamnějším veterinárním patogenem je *B. bronchiseptica*. U řady zvířecích druhů se vyskytuje na sliznici horních cest dýchacích asymptomaticky, s onemocněním je spojena zejména u prasat, králíků a laboratorních hlodavců (zejména morčat), psů a někdy koček.

U prasat v podstavovém věku *B. bronchiseptica* způsobuje tzv. **sípavku**, neprogresivní formu atrofické rhinitidy se zánětem a hypoplasíí nosních konch bez trvalých změn a viditelných deformací rypáku. Progresivní forma onemocnění vzniká teprve koinfekcí s *P. multocida* typu D. Kromě toho je spojena s bronchopneumoniemi novorozených selat; u starších jedinců je sekundárním plicním patogenem.

U psů je *B. bronchiseptica* součástí komplexu patogenů podílejících se na tzv. **psincovém kašli** neboli infekční tracheobronchitidě. K asociovaným patogenům patří dále virus parainfluenzy, psí adenovirus 1 a 2 a herpesvirus a v menší míře další virové a bakteriální patogeny. Psincový kašel se kapénkami snadno šíří v prostředí chových zařízení s velkou koncentrací zvířat a projevuje se typickým štěkavým kašlem, někdy spojeným s dávením. U štěňat se může vyvinout závažná bronchopneumonie, staří psi naopak často trpí chronickou bronchitidou.

Infekce koček mívají většinou mírný průběh a jsou omezené na horní cesty dýchací; jsou klinicky těžko odlišitelné od onemocnění způsobených *Mycoplasma felis*, *Chlamydia felis*, kočičími kaliciviry a herpesviry, které se vesměs projevují jako konjunktivitidy a záněty dýchacích cest hlavně u mladších koček žijících v komunitách. Podobné onemocnění vzniká také u králíků. Opět platí, že mláďat nebo v koinfekci s jinými patogeny může vést k bronchopneumonii. Vážný průběh mívá infekce u morčat.

#### 3.4.4.2 Patogeneze

Bordetely jsou bakterie dokonale přizpůsobené na kolonizaci řasinkového epitelu dýchacích cest. Za tím účelem produkují řadu typů adhezínů, z nichž se některé podílí také na tvorbě biofilmu. Infekce bývají spojené s poškozením funkce mukociliálního aparátu, což výrazně snižuje obranyschopnost dýchacích cest a umožňuje koinfekci s dalšími patogeny (*P. multocida*, *E. coli* aj.). Příčinou poškození tkáně jsou různé typy toxinů. Virulence je regulována **dvoukomponentovým systémem BvgAS**, který, zjednodušeně, spouští expresi faktorů virulence při tělesné teplotě 37°C.

Iniciálním krokem infekce je kolonizace dutiny nosní. Odtud se bakterie mohou šířit do dolních částí dýchacího traktu. Chronická kolonizace dutiny nosní bývá spojena s tvorbou biofilmu. Všechny zmíněné druhy bordetel tvoří imunogenní **fimbrie**, velice podobné fimbriím typu 1 enterobakterií, a tzv. **filamentózní hemaglutinin** (FHA), vázající se k heparinu a integrinům cílových buněk. **Pertaktin** je adhezín z rodiny autotransportérů, který se váže k integrinům a vyskytuje se u všech kromě *B. avium*. *B. pertussis* navíc tvoří další autotransportér, tzv. **tracheální kolonizační faktor** (TCF) a **pertusový toxin**, který má kombinovanou funkci adhezínu a toxinu. Předpokládá se, že esenciální roli v kolonizaci řasinkového epitelu hrají fimbrie a FHA. Spolu s pertaktinem se podílejí zřejmě hlavní měrou i na formaci biofilmu v nosní dutině.

*Bordetella* spp. produkuje pět různých toxinů, které se podílejí různým mechanismem na poškození výstelky a podkladových tkání dýchacího traktu: dermonekrotoxin, tracheální cytotoxin, osteotoxin, adenylátcyklázový toxin a pertusový toxin. Ne všechny druhy tvoří všechny toxiny.

**Dermonekrotoxin** (DNT) nemá při přirozené infekci nic společného s nekrotózou kůže. Způsobuje inaktivaci GTPáz, což vede k dezorganizaci cytoskeletu epitelálních buněk. Brzdí také zrání osteoblastů. Podobnou aktivitou se vyznačují i toxiny *P. multocida* (Pmt; hlavní podíl na vzniku atrofické rhinitidy!) a tzv. cytoletální nekrotické faktory některých kmenů *E. coli*. **Tracheální cytotoxin** (TCT) je vlastně fragmentem peptidoglykanu buněčné stěny s ciliostatickými účinky. Stejně jako DNT je produkován všemi zmíněnými druhy bordetel. **Adenylátcykláza**, toxin s hemolytickou aktivitou, který chybí u *B. avium*, zvyšuje koncentraci cAMP v buňkách, což má několik důsledků: narušení iontové rovnováhy na membráně vede k ciliostázi a ke zvýšené sekreci hlenu a tekutin v dýchacích cestách. Omezená samočisticí schopnost dýchacích cest je predispozicí pro vznik bronchopneumonie. Zároveň adenylátcykláza interferuje s funkcí fagocytů. Podobně působí také **pertusový toxin**. Přestože je produkován specificky *B. pertussis*, zdá se, že není ani tolik zodpovědný za vlastní kašel, jako za doprovodné systémové příznaky (změny leukogramu aj.). Posledním toxinem bordetel je **osteotoxin**, produkováný *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* i *B. avium*, který se pravděpodobně podílí na poškození tracheální chrupavky i kostního podkladu.

#### 3.4.4.3 Diagnostika

Bordetely izolujeme z tracheálních výplášků a výtěrů, v případě sípavky prasat také nosních výtěrů. Rostou za aerobních podmínek na krevním i MacConkeyově agaru. *B.*

*bronchiseptica* v primokultuře vytváří hemolytické, hladké nebo mukózní kolonie, které mají tendenci se táhnout, nabere-li je na kličku; obě vlastnosti se mohou subkultivacemi postupně ztrácet. *B. avium* je nehemolytická. Kolonie na MCA jsou drobné.

Katalázová i oxidázová zkouška je pozitivní, glukóza není využívána (žádná reakce v O-F testu). *B. bronchiseptica* produkuje ureázu a redukuje nitráty. K druhové identifikaci lze také využít biochemické multitesty pro nefermentující bakterie.

#### **3.4.4.4 Terapie**

Antibiotickou terapii je vhodné nasadit na základě testů citlivosti.

Jsou dostupné inaktivované vakcíny proti rýmě krůt a atrofické rhinitidě prasat (společně s toxoidem *P. multocida*). Psy je možné vakcinovat proti *B. bronchiseptica*, psince, parainfluenze a adenoviru – agens, která se podílí na vzniku psincového kašle.

#### **3.4.5 Rod *Taylorella***

Bakterie rodu *Taylorella* jsou nepohyblivé gramnegativní kokobacily, mikroaerofilní, kultivačně náročné a někdy vykazující bipolární tinkci; původně byly popsány jako *Haemophilus* spp. Zahrnují dva druhy, oba úzce spjaté se sliznicí pohlavního traktu koňovitých: *T. equigenitalis* a *T. asinigenitalis*. Zatímco *T. equigenitalis* je původcem **nakažlivé metritidy klisen** (contagious equine metritis, CEM), patogenita a epidemiologický význam *T. asinigenitalis* nejsou zatím přesně známy. *T. asinigenitalis* byla poprvé izolována z *fossa urethralis* oslů, avšak vyskytuje se i u koní a zatím nebyla ani u jednoho druhu spojena s manifestním onemocněním jinak než v experimentálních podmínkách.

##### **3.4.5.1 Patogenita**

Nakažlivá metritida je významnou příčinou subfertility klisen, má závažné ekonomické dopady v chovatelství, a proto také podléhá pravidelnému monitoringu. K přenosu dochází během páření, možný je i přenos nepřímým kontaktem či inseminační dávkou. Hřebci slouží jako přenašeči a bakterie mohou u nich perzistovat na sliznici urethry a prepucia dlouhou dobu, avšak i u velké části nakažených klisen se po akutní fázi vyvíjí asymptomatické nosičství v distálních částech pohlavního traktu (zejména *fossa clitoridis*).

Akutní infekce klisen je spojena s endometritidou, projevující se několik dní trvajícím mukopurulentním výtokem přibližně do dvou týdnů po přípuštění. Zvýšená teplota ani jiné příznaky nejsou přítomny, infekce však obvykle vede k selhání koncepce. Někdy jsou reprodukční problémy jediným příznakem výskytu infekce v chovu. Spíše vzácně je *T. equigenitalis* příčinou abortu. Pokud dojde k početí, je klisna zdrojem infekce pro narozené hříbě; to se samo stává nosičem.

### 3.4.5.2 Patogeneze

Až dosud byla u *T. equigenitalis* identifikována řada produktů potenciálně asociovaných s virulencí; jelikož není infekce spojena s výraznějším poškozováním tkáně, jedná se převážně o různé faktory umožňující kolonizaci reprodukčního traktu: adheziny, ochranné faktory, jako je kapsula, produkty zajišťující vazbu železa. *T. equigenitalis* nese též sekreční systém typu IV, který chybí u *T. asinigenitalis*.

### 3.4.5.3 Diagnostika

Kultivační vyšetření se pravidelně provádí u chovných jedinců obého pohlaví a metoda odběru vzorků je přesně stanovena. U klisen se odebírá stěr z *fossa clitoridis* a druhý stěr z klitoridálního sinu, u hřebců pak stěr z *fossa glandis*, stěr z prepucia a stěr z urethry. Použití transportního média a vyšetření vzorků do 48 hodin je standardním postupem bakteriologického vyšetření obecně.

*Taylorella* spp. je náročná na kultivaci, vyžaduje speciální obohacená média, nejčastěji čokoládový agar s antibiotickým suplementem nebo bez něho, mikroaerofilní atmosféru (5 – 10% CO<sub>2</sub>) a delší dobu kultivace (nejméně týden). Jako antibiotický suplement se používá streptomycin; poměrně často se však vyskytují citlivé kmeny, které tato média potlačují. Na médiu pozorujeme drobné šedobílé až šedožluté kolonie, pozitivní na katalázu a oxidázu; další biochemická aktivita je nízká. K identifikaci a odlišení od *T. asinigenitalis* může sloužit PCR a další molekulární metody. Existuje také PCR protokol na přímou detekci *T. equigenitalis* ve vzorku.

### 3.4.5.4 Terapie

Ve většině případů je účinná několikadenní topická aplikace antibiotických přípravků (mast s nitofurazonem) spolu s výplachy *fossa clitoridis*, respektive *fossa glandis* a prepucia chlorhexidinovým antiseptickým roztokem. Vakcína není dostupná a prevence je založena na pravidelném vyšetřování.



### 3.5 Čeleď Moraxellaceae

Čeleď Moraxellaceae patří do řádu Pseudomonadales z kmene Gammaproteobacteria. Jedná se převážně o aerobní krátké gramnegativní tyčinky s respiratorním typem metabolismu. Zahrnuje několik klinicky významných rodů, především *Moraxella* spp. a *Acinetobacter* spp.

#### 3.5.1 Rod *Acinetobacter*

Bakterie rodu *Acinetobacter* jsou striktně aerobní kokotyčinky, často uspořádané v párech nebo malých shlucích. Mnohé tvoří polysacharidovou kapsulu. Nemají bičíky, ale jsou schopny tzv. trhavého pohybu. Nefermentují; glukózu napadají oxidací, nebo vůbec nevyužívají sacharidy. Mezi asacharolytické druhy patří *A. lwoffii*; klinicky významnější je však skupina oxidující glukózu, zastoupená *A. baumannii* a *A. calcoaceticus*.

Acinetobaktery patří mezi velmi běžné environmentální bakterie; vyskytují se trávicím traktu, na sliznicích a kůži člověka a zvířat, přežívají na různých površích, vodě a půdě. Často jsou vysoce rezistentní k dezinfekčním prostředkům, což umožňuje jejich dlouhodobou perzistenci v prostředí nemocnic. Jedná se o typické oportunní patogeny, asociované s nosokomiálními infekcemi.

##### 3.5.1.1 Patogenita

Acinetobaktery snadno kontaminují rány a u celkově oslabených jedinců mohou způsobit bakterémii s následkem sepse, meningitidy nebo endokarditidy. Obzvláště nebezpečné jsou nemocniční kmeny se získanou antibiotickou multirezistencí. *A. baumannii* je nejčastěji izolován jako původce pooperačních peritonitid a sepsí, infekcí popálenin a močového traktu a pneumonií u lidí na jednotkách intenzivní péče. Méně často jsou s podobnými infekcemi spojeny další druhy, *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii* aj. Acinetobaktery se vyskytují a způsobují příležitostné infekce i u zvířat; např. *A. calcoaceticus* může být izolován ze septikemických kuřat.

##### 3.5.1.2 Diagnostika

Acinetobaktery snadno rostou na běžných kultivačních médiích za standardních podmínek. Na krevním agaru tvoří malé hladké až mukózní kolonie, které mohou být nažloutlé nebo našedlé, obvykle nehemolytické (*A. haemolyticus* je výjimkou). Na MCA pozorujeme vypouklé a lesklé narůžovělé kolonie. Je-li primokultura smíšená, musíme být opatrní s interpretací, acinetobaktery jsou běžná kontaminující mikroflóra. Katalázová zkouška je pozitivní, oxidázová negativní; odlišení od č. Enterobacteriaceae umožňuje negativní fermentace glukózy a negativní redukce nitrátů. Jednotlivé druhy lze identifikovat biochemickými testy pro nefermentující bakterie nebo hmotnostní spektrometrií. Mikroskopicky vykazují krátké, v párech nebo ve shlucích uspořádané kokotyčinky tendenci ke gramlabilitě, zadržují krystalovou violet a lze je někdy zaměnit za grampozitivní koky.

### 3.5.2 Rod *Moraxella*

*Moraxella* spp. je krátká gramnegativní kokotyčinka, obvykle uspořádaná v párech. Druhy více koloidního tvaru se dříve označovaly jako rod *Branhamella* (*B. ovis*, dnes *M. ovis*). Je nepohyblivá, jistý druh „trhavého“ pohybu jí však umožňuje přítomnost stažitelných fimbrií IV. typu. Jsou to striktní aeroby s oxidativním typem metabolismu, obvykle pozitivní na katalázu i oxidázu. Vyskytují se jako komenzálové na sliznicích horních cest dýchacích a spojivky u člověka i zvířat.

#### 3.5.2.1 Patogenita

Většina druhů, jako *M. caviae*, *M. canis* aj., se izolují běžně od klinicky zdravých zvířat různých druhů. *M. catarrhalis* je příležitostným původcem zánětů horních cest dýchacích a středního ucha u dětí, vzácně zápalů plic a celkových infekcí dospělých jedinců. *M. ovis* a *M. bovoculi* mohou být spojeny s keratokonjunktivitidou přežvýkavců. Zdaleka největší význam má však *M. bovis* – původce infekční keratokonjunktivitidy skotu.

**Infekční keratokonjunktivitida skotu (IKKS)** je běžná a ekonomicky významná nákaza zejména u skotu na pastvě, který je vystaven řadě predispozičních faktorů. Patří k nim intenzivní UV záření, drobná traumata způsobená ostrými stébly a hmyz, který nejen způsobuje podráždění oka, ale také roznáší infekci. Význam může mít i ko-infekce s jinými patogeny, např. *Mycoplasma bovoculi*, *Listeria monocytogenes* nebo virus infekční bovinní rhinotracheitidy.

K prvním příznakům patří slzení a blefarospasmus, objevuje se edém rohovky a ulcerace, která podle závažnosti může vést ke vzniku jizvy nebo ruptuře rohovky a úplné slepotě. Onemocnění je velice bolestivé, což se mimo jiné odráží na snížené produkci zvířete a ekonomických ztrátách.

#### 3.5.2.2 Patogeneze

Pro vznik infekce jsou v podstatě klíčové dva kroky: adheze bakterií ke korneálnímu epitelu, při níž hrají největší roli **fimbrie typu IV**, a poškození korneálního stromatu produkcí **cytolyzinu**.

Fimbrie typu IV jsou výběžky složené z opakujících se proteinových podjednotek, rozmístěné po povrchu bakterie. Kromě adheze k cílovým buňkám umožňují i tzv. trhavý pohyb – mají totiž schopnost smršťovat se při styku s povrchem. Jsou imunogenní a podle typu exprimované fimbrie rozlišujeme 6 sérotypů *M. bovis*. Vlastní poškození oka způsobuje hemolytický toxin, zvaný **cytolysin**. Patří do skupiny RTX toxinů (podobně jako Apx toxiny *Actinobacillus pleuropneumoniae* nebo  $\alpha$ -hemolysin *E. coli*), které tvoří póry v membráně napadených buněk, způsobující jejich lýzu. Produkce cytolysinu koreluje s virulencí; nehemolytické kmeny *M. bovis* jsou nepatogenní.

### ***3.5.2.3 Diagnostika***

*Moraxella* spp. je vysoce citlivá na vyschnutí, proto se doporučuje hned po odběru stěru spojivky vyočkování na agar. Není-li to možné, je nutné použít transportní médium. Kultivujeme na krevním agaru v aerobních podmínkách při 37°C. Po přibližně 48 hodinách se objevují okrouhlé našedlé kolonie obklopené úzkou zónou úplné hemolýzy.

### ***3.5.2.4 Terapie a prevence***

Nemocná zvířata je vhodné umístit do čisté tmavé stáje a zabránit dalšímu dráždění. Postižené oko lze ošetřit antibiotickými přípravky. Rezistence nebývá běžná. V ohrožených stádech je možné použít vakcínu, je však třeba předem znát, jaký sérotyp se ve stádě vyskytuje, neboť imunita mezi sérotypy není zkřížená.

## 3.6 Čeleď Brucellaceae

*Brucella* spp. je patogenem mimořádného významu ve veterinární medicíně. Patří do čeledi Brucellaceae, řádu Rhizobiales z kmene Alphaproteobacteria. V témž řádu se nachází rhizobia, půdní mikroorganismy fixující vzdušný dusík a symbionty bobovitých rostlin, a pozoruhodný druh *Agrobacterium tumefaciens*, u něhož byl poprvé popsán tzv. sekreční systém IV. typu, který tento rostlinný patogen používá k transferu vlastní DNA do rostlinných buněk a indukci tumorů. Kromě *Brucella* spp. patří k významným patogenům člověka i zvířat ještě *Bartonella* spp. z čeledi Bartonellaceae.

### 3.6.1 Rod *Brucella*

*Brucella* spp. je aerobní gramnegativní kokobacilus, který netvoří kapsulu ani bičíky. Vykazuje slabou acidorezistenci, a proto ji lze barvit modifikovaným způsobem dle Ziehl-Neelsena (s použitím ředěného karbolfuchsinu a slabé octové kyseliny). Brucely jsou fakultativně intracelulární bakterie, primárně napadající makrofágy, a obligátní patogeny savců – nevyskytují se jako komenzálové nebo saprofyty. Jsou poměrně citlivé a ve vnějším prostředí jsou inaktivovány vlivem sucha, tepla a UV záření.

K šesti „tradičním“ druhům brucel se v nedávné době přidalo několik nových. Prvním objeveným druhem byla *B. melitensis*. Roku 1887 na Maltě popsal Sir David Bruce jako příčinu smrti vojáka, který se nakazil pitím syrového kozího mléka, tzv. „Bruceův kok“. O deset let později dánský veterinář Bernhard Bang identifikoval „Bangův bacil“ – *B. abortus* – jako původce abortů u skotu. Teprve americká mikrobioložka Alice Evansová rozpoznala, že se jedná o tentýž bakteriální rod, a že Bangův bacilus je zodpovědný za velké množství nediodagnostikovaných, často závažných onemocnění lidí, nakažených z nepasterovaného kravského mléka. Trvalo ještě dlouho, než jí společnost byla ochotna dát za pravdu a přijmout ochranná opatření.

*B. abortus* a *B. melitensis* jsou původci brucelózy skotu, respektive malých přežvýkavců a představují nejpatogennější druhy s největším zoonotickým potenciálem. V současnosti se v České republice nevyskytují, zůstávají však problémem Středomoří. S ohledem na virulenci a zoonotický potenciál stojí někde uprostřed *B. suis* s několika biovary: brucelózu prasat způsobují biovary 1, 2 a 3, biovar 2 napadá také zajíce. Právě zajíc je hlavním rezervoárem brucelózy v České republice. Další druhy brucel se vyznačují poměrně nízkým zoonotickým potenciálem (nebo není znám): *B. canis* způsobující brucelózu psů, *B. ovis*, původce infekční epididymitidy beranů, *B. microti* a *B. neotomae* hlodavců, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* mořských savců. Jistou záhadou zůstává *B. inopinata*, izolovaná z prsního implantátu, jejíž rezervoár není zatím znám. Laboratorní hlodavci (např. morče) jsou značně vnímaví a používají se pro biologické pokusy.

#### 3.6.1.1 Patogenita

Brucelóza je zákeřné zoonotické onemocnění, jež se u primárních hostitelů projevuje reprodukčními poruchami, především aborty v pozdní fázi gravidity, a u člověka celkovým

onemocněním. Projev onemocnění u zvířat je úzce vázán na pohlavní zralost a stupeň gravidity. U pohlavně nedospělých zvířat zůstávají brucely ve stádiu latence v mízních uzlinách, aniž by docházelo k interakci s imunitním systémem a sérokonverzi. Takto latentně nakažená zvířata jsou proto nedekovatelná sérologickými metodami.

K nakažení může dojít perorálně, inhalací, případně porušenou kůží. Hlavním zdrojem *B. abortus* a *B. melitensis* jsou abortované plody, plodové obaly a tekutiny a dále mléko. Člověk se snadno nakazí manipulací s těmito materiály či pitím tepelně neopracovaného mléka. *B. suis* a *B. canis* se více přenáší i blízkým kontaktem nebo močí a významnou roli zde hraje pohlavní styk. Přenos *B. ovis* je převážně venerický.

Brucely obecně pronikají přes sliznice, jsou pohlcovány makrofágy a dostávají se do regionálních mízních uzlin či jiné asociované lymfatické tkáně. Zde mohou zůstávat ve fázi latence nebo vzniká bakterémie s napadením dalších orgánů. Brucely mají obzvláštní afinitu k pohlavnímu aparátu, zejména placentě. Jedná se o místo příhodné k pomnožení brucel jednak proto, že je do značné míry nedosažitelné pro imunitní systém, a kvůli vysoké koncentraci erythritolu, který je preferovaným, ač ne esenciálním zdrojem uhlíku pro brucely. Zánět placenty vede k abortu obvykle v poslední třetině březosti, většinou bez jiných projevů onemocnění. Později vzniká mastitida. Brucely však napadají i jiné orgány, jako jsou klouby a šlachové pochvy, a s infekcí mohou být spojeny projevy polyarthritidy, diskospondylitidy a postižení páteřní míchy, tendosynovitidy, někdy i endokarditidy. U sameců často vzniká zánět varlat a nadvarlat s palpačně detekovatelným otokem a infertilitou. Infertilita je nejpodstatnějším projevem infekční epididymitidy beranů, k abortům dochází jen zřídka.

U člověka se brucelóza projeví nespecifickým celkovým onemocněním s různě dlouhou inkubační dobou. Typická je návratná „undulující“ horečka, bolesti kloubů a hlavy a celková zchvácenost. Nebezpečnou komplikací je meningitida nebo endokarditida.

### 3.6.1.2 Patogeneze

Patogenita brucel se odvíjí od schopnosti perzistovat v makrofázích. Makrofágy jsou primárními cílovými buňkami na počátku infekce a místem latence, ačkoli ve fázi aktivní infekce se brucely množí v různých typech buněk.

První interakci s makrofágem zajišťuje **lipopolysacharid**. Tento krok rozhoduje, zda se bakterie úspěšně internalizuje, nebo bude fagocytována a usmrcena. LPS brucel se poněkud odlišuje od LPS jiných gramnegativních bakterií, má nižší tendenci aktivovat komplement a jeho lipid A je poměrně málo toxický. LPS kmenů rostoucích v „hladké“ fázi obsahuje postranní O-polysacharid, který brání opsonizaci. Mutanty a méně patogenní druhy *B. ovis* a *B. canis*, kterým O-polysacharid chybí, mají výrazně sníženou virulenci, jsou opsonizovány a fagocytovány interakcí s komplementovými receptory nebo Fc-receptory pro protilátky. V tom případě nastává fagolyzozomální fúze a efektivní likvidace bakterií. Naproti tomu neopsonizované brucely vstupují do makrofágů membránové glykolipoproteinové domény (tzv. „lipidové rafty“). Interakci zajišťuje právě „hladký“ LPS. Vzniká fagozom obsahující internalizované bakterie. Okyselení fagozomu spouští expresi tzv. operonu *virB*, kódujícího **sekreční systém typu IV**, jehož efekторы zastaví další okyselování a řídí modifikaci fagozomu na tzv. **brucelozom**. Pokud nastává fáze latence, bakterie se v brucelozomu nemnoží, ale perzistují dlouhou

dobu v dormantním stavu. LPS hraje významnou roli také v ochraně bakterií před produkty metabolického vzplanutí a baktericidními kationickými proteiny. Detoxikaci ROS a peroxy-nitritu zajišťují enzymy **superoxiddismutáza** a **alkylhydroxidreduktáza C**.

### **3.6.1.3 Diagnostika**

Brucely je možno izolovat z kloubních punktátů, krve odebrané ve febrilní fázi, abortovaných materiálů a postižených tkání. Kultivace vyžaduje obohacená selektivní média se sójovým proteinem a antibiotickým suplementem (Brucella agar, Columbia agar), inkubovaná při vyšší koncentraci oxidu uhličitého, 37°C, 6 – 10 dní. *Brucella* spp. vytváří obvykle hladké bílé nehemolytické kolonie.

Jelikož brucelóza skotu byla u nás eradikována již v 60. letech, je nařízen pravidelný sérologický monitoring. Povinně se vyšetřují abortující zvířata (přežvýkavci, prasnice). Používá se pomalá aglutinace, reakce vazby komplementu, ELISA a tzv. Rose-Bengal test. K průkazu aktivní infekce je však nutný opakovaný odběr s nálezem signifikantního zvýšení titru protilátek nebo vyšetření hladiny IgM (umožňuje např. ELISA). Podezřelí zajáci, u nichž nalézáme zánětlivé „květákovité“ uzlíky v pohlavních, ale i jiných orgánech (proto je třeba odlišit infekci od pseudotuberkulózy a tularémie), se vyšetřují rychlou sklíčkovou aglutinací. Jistou komplikací sérologické diagnostiky může být zkřížená reaktivita s některými sérotypy *E. coli* a *Y. enterocolitica*.

### **3.6.1.4 Terapie a prevence**

V mnoha zemích, kde se brucelóza stále vyskytuje, se hospodářská zvířata pravidelně vakcinují. V České republice je však vyžadována séronegativita, a proto není vakcína dostupná. Léčba se u zvířat neprovádí; u člověka přichází v úvahu kombinace doxycyklinu nebo fluorochinolonů s rifampicinem po dobu šesti týdnů.

## 3.7 Čeleď Bartonellaceae

### 3.7.1 Rod *Bartonella*

Bartonely jsou malé aerobní gramnegativní tyčinky řádu Rhizobiales, třídy  $\alpha$ -proteobacteria. Jsou fakultativně intracelulární, přizpůsobené buňkám savců i hmyzích vektorů. Mají výraznou afinitu k erytrocytům a u rezervoárových savčích hostitelů vyvolávají dlouhodobou intraerytrocytární bakterémii. Přenos je obvykle závislý na krev sajícím členovci.

Mnoho druhů bartonel bylo izolováno z přežvýkavců, hlodavců, lidí, psů a koček, přičemž v přenosu se převážně uplatňují blechy, klíšťata, u lidských druhů vši. Infekce rezervoárových hostitelů mají různé projevy, od zcela asymptomatických po závažné onemocnění. Často se jedná o zoonózy.

#### 3.7.1.1 Patogenita

Klinický projev bartonelových infekcí, jak se zdá, souvisí s imunokompetencí hostitele. U imunosuprimovaných jedinců mohou být asociovány s širokým spektrem symptomů a syndromů včetně chronické únavy, horečky neznámého původu, endokarditidy a nervových poruch. Bartonely napadají endotel, a endokarditida je proto velmi častým důsledkem chronické infekce různých hostitelů, jinak zdravých. Kromě toho mají tendenci vyvolávat – zejména při imunopresi – vaskulární proliferativní léze.

Mezi lidské patogeny patří *B. bacilliformis*, jedna z mála pohyblivých bartonel (polární bičík), která vyvolává tzv. **horečku Oroya**. Chronická infekce se manifestuje vznikem kožních vaskulárních tumorů – tzv. **verruža peruana**. Onemocnění je přenášeno mouchami rodu *Lutzomyia* a vyskytuje se pouze v Jižní Americe. *B. quintana* je původcem tzv. **zákopové horečky**, která řádila mezi vojáky za první světové války. Příznaky poněkud připomínají skvrnitý tyfus (horečka, hemoragická vyrážka) a v přenosu se uplatňuje stejný vektor – veš šatní (*Pediculus humanis corporis*). K chronickým následkům infekce patří endokarditida. U imunodeficientních lidí (s poruchou buněčné imunity, např. HIV pacienti) vzniká tzv. **bacilární angiomatóza** – kožní tumorózní léze připomínající hemangiomy, a tzv. **hepatální nebo splenická pelióza** (mikroskopické krevní cysty v orgánech).

Z veterinárního hlediska je nejvýznamnějším a také nejvíce popisovaným zástupcem *B. henselae*, jejímž primárním hostitelem jsou kočky a jež u lidí způsobuje tzv. **nemoc z kočičího škrábnutí** (CSD, cat scratch disease). Méně často je izolována *B. clarridgeiae*. Přenos je vázán na kočičí blechu *Ctenocephalides felis*, nicméně, jak vyplývá z názvu onemocnění, člověk se nejčastěji nakazí škrábnutím nebo kousnutím kočky. Zdrojem infekce je pravděpodobně trus blech, sajících na infikovaných kočkách, a bakterie jsou škrábnutím inokulovány do kůže. Podobně probíhá i přenos zákopové horečky a skvrnitého tyfu.

Nemoc z kočičího škrábnutí se obvykle nepovažuje za závažné onemocnění, v akutní fázi se projevuje horečkou, lymfadenopatií až lymfadenitidou, nevolností a jinými nespecifickými symptomy. Pouze vzácně vzniká meningoencefalitida a jiné závažné komplikace. Na druhou stranu chronická infekce se může skrývat za různorodými zdravotními problémy včetně

artritidy a endokarditidy a závažnost onemocnění je možná podceněna. Také *B. henselae* může vyvolávat bacilární angiomatózu imunosuprimovaných lidí. Infikované kočky bývají asymptomatické, i u nich však byla popsána asociace s endokarditidou a uveitidou.

*B. vinsonii* ssp. *berkhofii* byla asociována s endokarditidou u psa, *B. bovis* u skotu.

### 3.7.1.2 Patogeneze

Bartonely se dlouhodobě vyskytují v krvi v asociaci s erytrocyty a umožňují tak nasátí členovcem. Bylo prokázáno, že bakterie na erytrocyty jednak těsně adherují, ale také pronikají intracelulárně. Většinou bartonel chybí bičík (výjimky: *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*), ale exprimují **fimbrie typu IV**, které umožňují šubavý pohyb a spolu s některými **povrchovými proteiny (BadA *B. henselae*, skupina Vomp *B. quintana*)** zajišťují adherenci k erytrocytům.

Bartonely kódují **sekreční systém IV. typu (T4SS)** a translokované efektorové proteiny **BepA-G**. Zdá se, že umožňuje invazi endoteliálních buněk. Reorganizace cytoskeletu vede k pohlcení bakterií napadenými buňkami a dalším funkčním změnám. T4SS má antiapoptotický a prozánětlivý účinek. Jakou roli však hraje v indukci vaskulární proliferace, není dosud známo.

### 3.7.1.3 Diagnostika

Bartonely je možné, vzhledem k dlouhodobé bakterémii, izolovat z krve. Pro běžnou diagnostiku však není kultivace příliš spolehlivá. Používají se obohacená média obsahující nejčastěji králičí nebo ovčí krev, možná je i ko-kultivace s jinými savčími nebo hmyzími buňkami. Vzorky je možné nejprve pomnožit v speciálním tekutém médiu BAPGM (Bartonella/Alpha-proteobacteria growth medium) a posléze očkovat na pevné či semisolidní půdy s krví. K pomnožení lze použít i standardní hemokultivační systémy. Inkubace při 5 % CO<sub>2</sub> a 35 – 37°C trvá dlouhou dobu, až 4 týdny. Kolonie jsou malé, tuhé až hrubé konzistence, vnořené do média. Identifikace se opírá o molekulární metody, zejména PCR. Možný je i přímý průkaz PCR v bi-optátech z lymfonodů.

V diagnostice CSD u lidí se běžně používají sérologické testy k detekci signifikantního titru protilátek. Je nutná opatrná interpretace výsledků vzhledem k vysoké séroprevalenci.

### 3.7.1.4 Terapie a prevence

Jelikož pro přenos *B. henselae* je nezbytná infestace blechami, jiné druhy bartonel se přenáší klíšťaty a dalšími krev sajícími členovci, preventivní opatření směřují primárně proti těmto parazitům. V terapii bartonelových infekcí se zpravidla osvědčují makrolidová antibiotika (azitromycin) nebo doxycyklin.



Doporučená četba:

Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. FEMS Microbiol Rev. 2012 May;36(3):563-99.

### 3.8 Čeleď Flavobacteriaceae

Čeleď Flavobacteriaceae patří do kmene Bacteroidetes a zahrnuje různorodou skupinu gramnegativních bakterií, většinou aerobních tyčinek nefermentujících sacharidy (některé jsou fakultativní anaeroby a fermentují), které netvoří bičíky a pohybují se tzv. klouzáním. Vyskytují se hojně v prostředí (voda, půda) a některé z nich byly popsány jako oportunní patogeny. Poměrně častým znakem (neplatícím pro všechny) je také produkce žlutého pigmentu a hydrolýza želatiny.

Řada zástupců čeledi Flavobacteriaceae v současnosti nabývá na významu jako původci nosokomiálních infekcí člověka a potenciálně i zvířat. *Chryseobacterium indologenes* a *Elizabethkingia* (dříve *Chryseobacterium*) *meningoseptica* jsou štíhlé nepohyblivé tyčinky, tvořící biofilm ve vlhkém prostředí a perzistující ve špatně čistitelných částech medicínských pomůcek a přístrojů. Byl prokázán i přenos ventilačním zařízením. Jsou nebezpečnými, často multirezistentními původci meningitid zejména u předčasně narozených dětí, dále oportunní bakterémie, endokarditidy i pneumonie. Běžná je produkce širokospektrých betalaktamáz a karbapenemáz. Rostou na krevním a čokoládovém agaru jako žlutě pigmentované nehemolytické kolonie. Produkují indol, *E. meningoseptica* také želatinázu. Sacharidy využívají oxidativně.

Velmi podobné vlastnosti mají další oportunní patogeny. *Myroides odoratus* je charakteristický sladkou ovocnou vůní. Byl asociován s nosokomiálními urogenitálními infekcemi, pneumoniemi a endokarditidami. Také *Empedobacter brevis* a *Weeksella virosa* byly izolovány v souvislosti s meningitidou a urogenitálními infekcemi. Vesměs se jedná o nepohyblivé tyčinky, nefermentující nebo asacharolytické, kataláza- a oxidáza-pozitivní, které tvoří žluté kolonie na krevním a čokoládovém agaru. Na MCA obvykle nerostou.

#### 3.8.1 Rod *Capnocytophaga*

*Capnocytophaga* spp. z čeledi Flavobacteriaceae jsou značně pleomorfní, vřetenovité až vláknité gramnegativní tyčinky, které tvoří běžnou součást orofaryngeální mikroflóry savců. *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *C. canimorsus* a další jsou izolovány z ústní dutiny lidí, psů i koček. Jsou to kapnofilní fakultativní anaeroby. Kultivace vyžaduje vyšší koncentrace oxidu uhličitého (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C), obohacený krevní agar a delší dobu inkubace (pět dní i déle). Jsou nepohyblivé (avšak schopné „klouzavého pohybu“) a pozitivní na katalázu a oxidázu. Sacharidy využívají fermentativně.

*Capnocytophaga* spp. je oportunní patogen, který se může podílet na vzniku periodontálních abscesů a u imunosuprimovaných jedinců způsobovat bakterémie s následkem septického šoku, osteomyelitidy, peritonitidy, meningitidy aj. Zdrojem *C. canimorsus* je zejména ústní mikroflóra psů a koček, proto infekce – velmi vzácné, ale obvykle závažné – vznikají až v polovině případů v souvislosti s pokousáním psem.

### 3.8.2 Rod *Flavobacterium*

Flavobacteria jsou gramnegativní štíhlé tyčinky. Zahrnují významné patogeny kaprovitých i lososovitých ryb, vyskytující se ve sladkých vodách. Tyto druhy jsou striktní aeroby, nevyužívající sacharidy; energii a uhlík získávají především štěpením peptidů. Nemají bičíky ani fimbrie, pohybují se klouzáním. Jiné druhy byly izolovány i z mořských řas a živočichů a jejich charakteristika je odlišná.

#### 3.8.2.1 Patogenita

*F. psychrophilum* je původcem tzv. **cytofagózy lososovitých ryb** neboli „coldwater disease“. Její výskyt je vázán na nižší teplotu vody, optimum růstu *F. psychrophilum* je kolem 16°C. Vnímaví jsou především pstruzi a další lososovití. Infekce začíná kolonizací kožního povrchu ryb, která se projeví vznikem bílých skvrnek zejména v okolí tukové ploutvičky. Postupně vznikají eroze až nekróza s černáním okolí ocasu. Systémové příznaky zahrnují anémii, páteřní deformity, výhřez anu a nervové příznaky.

*F. columnare* je původcem tzv. **kolumnarózy**, která v našich podmínkách postihuje především kaprovité ryby. Kolumnaróza je infekce kůže, žaber a ploutví. U mladších věkových kategorií dochází většinou k akutní nekróze žaber, u starších probíhá spíše chronicky. Nejprve se objevují skvrny na kůži se zarudlým okrajem (mikroskopicky se jedná o rhizoidní bakteriální kolonie), progredující v ulcerace. Dochází i k poškození žaber a rozpadu ploutví.

*F. branchiophilum* způsobuje infekce žaber sumců. Zcela výjimečně mohou environmentální flavobacteria způsobovat oportunní infekce savců. Např. *F. breve* bylo izolováno z případu meningitidy psa.

#### 3.8.2.2 Patogeneze

Zdrojem infekce jsou nemocní nebo kolonizovaní jedinci a voda, v níž původce dlouhodobě přežívá. Narušení ochranné slizové vrstvy kůže a žaber výrazně zvyšuje vnímavost ryb k infekci. Vliv může mít infestace parazity nebo nevhodné chemické složení vody, ale také nevhodná teplota.

Iniciálním krokem je kolonizace kožního povrchu, při němž se uplatňuje zřejmě klouzavý pohyb bakterií a produkce extracelulárního hlenu z galaktosaminglykanu. **Chondroitinsulfátlyáza A a C** *F. columnare* a různé **proteázy** štěpí mukopolysacharidy a proteiny pojivové tkáně, umožňují získání živin, šíření tkání a vznik hlubokých lézí.

#### 3.8.2.3 Diagnostika

Seškraby lézí kultivujeme v aerobní atmosféře při 16 – 20°C na speciálních médiích, jako je TYES agar, Cytophaga agar nebo médium dle Ordala. Flavobacteria vytváří výrazně

žlutě pigmentované kolonie. Jsou pozitivní na katalázu a oxidázu. Biochemicky jsou málo aktivní, ale mají výraznou proteolytickou aktivitu. *F. columnare*, na rozdíl od *F. psychrophilum*, produkuje sirovodík.

#### **3.8.2.4 Léčba a prevence**

Podle citlivosti se k léčbě používají oxytetracyklin, sulfonamidy, florfenikol a další antibiotika.

### **3.8.3 Rod *Ornithobacterium***

*Ornithobacterium rhinotracheale* je nepohyblivá vysoce pleomorfní gramnegativní tyčinka, v současnosti řazená do čeledi Flavobacteriaceae, která byla popsána jako respirační patogen drůbeže a dalších druhů ptáků. Je fakultativně anaerobní, oxidáza-pozitivní, avšak kataláza-negativní. Je známo 18 sérotypů.

#### **3.8.3.1 Patogenita a patogeneze**

*O. rhinotracheale* způsobuje respirační onemocnění s vysoce variabilními projevy. Přenáší se aerosolem a pitnou vodou a vnímavé jsou všechny věkové kategorie. Vznik je potencionován environmentálními predispozičními faktory, jako je koncentrace amoniaku, prašnost, hustota naskladnění. K vážnějším projevům dochází v ko-infekci s jinými respiračními patogeny, jako je *E. coli*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma synoviae* a viry infekční bronchitidy nebo newcastleské choroby. Vzniká pneumonie, pleuritida a aerosakulitida s výtokem z nosu, kýcháním a respirační tísní. U nosnic může souviset s poklesem snášky.

Faktory virulence nebyly zatím podrobně popsány. Byla prokázána produkce neuraminidázy, štěpící glykoproteiny tracheálního hlenu.

#### **3.8.3.2 Diagnostika**

*O. rhinotracheale* lze izolovat ze stěrů z průdušnice, plic a vzdušného vaku. Roste po 1 – 3 dnech na krevním nebo čokoládovém agaru při 37°C a 10 % CO<sub>2</sub> ve formě velmi drobných bezbarvých nehemolytických kolonií. Na MCA neroste. V preparátu barveném dle Grama pozorujeme nestejně zbarvené vysoce pleomorfní kokoidní až vláknité tyčinky. K identifikaci jsou dostupné biochemické testy (API 20NE).

K monitoringu výskytu nákazy v chovech lze využít sérologické testy.

### 3.8.3.3 *Terapie a prevence*

Při výskytu onemocnění se aplikují antibiotika dle citlivosti. V ohrožených chovech lze použít živé i inaktivované vakcíny.

### 3.8.4 Rod *Riemerella*

*Riemerella anatipestifer*, původce **infekční serositidy kachen**, je gramnegativní nepohyblivá enkapsulovaná tyčinka s tendencí k bipolárnímu barvení. Je známo 21 sérotypů. Infekční serositida je septikemické onemocnění kachen a hus, postihující zejména mláďata ve věku 1 – 8 týdnů. Přenáší se aerogenně, ale také přes kůži (zejména oděrky na končetinách). Je charakterizováno vznikem fibrinózních nálepu na všech serózách a projevuje se výtokem z nosu a očí, kašlem, zelenavým průjmem a nervovými příznaky (tremor, pádlovací pohyby). Přeživší jedinci jsou často zakrslí.

K diagnostice je vhodné odebrat stěry z nekontaminovaných vnitřních orgánů, nejlépe mozku nebo kostní dřeni. *R. anatipestifer* roste na krevním nebo čokoládovém agaru lépe při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub>, 37°C, 1 – 2 dny. Kolonie jsou hladké, konvexní, bezbarvé, hemolýza nevzniká. Na MCA neroste. Katalázová zkouška je pozitivní, oxidázová negativní, sacharidy nevznikají. Bakterie zkapalňuje želatinu.

Je dostupná sérotypově specifická vakcína. K léčbě jsou doporučována antibiotika dle citlivosti, např. potencionované sulfonamidy, penicilin nebo linkomycin.

Doporučená četba:

Loch T.P., Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. J Adv Res. 2015 May;6(3):283-300.

Declercq A.M., Haesebrouck F., Van den Broeck W., Bossier P., Decostere A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Vet Res. 2013 Apr 24;44(1):27.

## 4. Gramnegativní aerobní nebo mikroaerofilní spirálovitě zakřivené bakterie

### 4.1 Čeleď Campylobacteraceae

#### 4.1.1 Rod *Campylobacter*

Zástupce čeledi Campylobacteriaceae řadíme do třídy Epsilonproteobacteria a řádu Campylobacterales. Jméno *Campylobacter* pochází z řečtiny a znamená zakřivená, zahnutá tyčinka. Skutečně, kampylobaktery jsou štíhlé, rohlíčkovitě až esovitě zakřivené gramnegativní tyčinky, často vytvářející dvojice spojené na pólech, takže poněkud připomínají „křídla letícího racka“. Tvoří kapsulu a polární bičík na každém konci, díky němuž se pohybují charakteristickým šroubovitým pohybem. Kampylobaktery jsou typické mikroaerofilní bakterie, preferující atmosféru se sníženou koncentrací kyslíku a vyšší koncentrací oxidu uhličitého. Některé druhy (zejména původci enteritid) jsou termotolerantní a lépe rostou při 42°C. Oproti enterobakteriím jsou mnohem náročnější na kultivaci, jsou oxidáza a obvykle i kataláza-pozitivní, nefermentují glukózu a všeobecně příliš nevyužívají cukry; energii získávají oxidací aminokyselin.

Kampylobaktery jsou přirozenými komenzály střeva různých druhů zvířat a jejich asociace s příznaky střevního onemocnění je u těchto druhů často nejasná. Rezervoárem *C. jejuni* a *C. lari* je střevo ptáků (především drůbež, respektive racci), *C. coli* se běžně vyskytuje u prasat. *C. helveticus* a *C. upsaliensis* lze najít u dospělých psů a koček. Také *C. fetus* ssp. *fetus* obývá střevo přežvýkavců, především ovcí; naopak *C. fetus* ssp. *venerealis* tvoří určitou výjimku, neboť je vázán na prepuciální sliznici býků. Některé druhy se vyskytují také v dutině ústní.

Z rodu *Campylobacter* byl poměrně nedávno vyňat zvláštní rod *Arcobacter*, zahrnující morfologicky podobné, ale aerotolerantnější bakterie, izolované ze střeva zdravých i průjmujících hospodářských zvířat a psů. Některé z nich, jako *A. cryaerophilus* a *A. butzleri*, byly asociovány s gastroenteritidou člověka, ale také mastitidou skotu. Na rozdíl od kampylobakterů nevyžadují mikroaerofilní atmosféru a rostou i na MacConkeyově agaru.

##### 4.1.1.1 Patogenita

Kampylobaktery vyvolávají enterální onemocnění nebo reprodukční problémy. Zejména enterální druhy se vyznačují zoonotickým potenciálem.

*C. fetus* ssp. *venerealis* je původcem **venerické kampylobakteriózy** neboli **enzootické sterility skotu**. Jak název napovídá, přenos této infekce je vázán na sexuální kontakt, případně umělou inseminaci, přičemž zdrojem je prepuciální sliznice asymptomatických býků. Po skončení říje se bakterie dostávají do dělohy, vyvolávají zde zánět, který brání uhnízdění a vývoji embrya. Proto se nákaza projevuje jako dlouhodobé nezabřezávání a poruchy pohlavního cyklu. Pouze výjimečně dochází k abortům. Infikované krávy mohou být samy zdrojem nákazy pro býky.

*C. fetus* ssp. *fetus* a *C. jejuni* vyvolávají **aborty** u ovcí. Tyto druhy obývají střevo a ovce se nakazí perorálně; zdrojem je fekální kontaminace vody a krmiva nebo obaly abortovaných plodů. U březích zvířat se bakterie dostávají ze střeva do cirkulace a do placenty. Následná placentitida vede k abortu.

Tzv. enterické druhy způsobují **enterokolitidy** různých druhů, největší význam však nejspíš mají u člověka. *Kampylobakteri*óza je v současnosti nejběžnější bakteriální infekcí získanou z potravin (v nedávné době předběhla salmonelózu). Trpí jí nejčastěji děti a mladí dospělí (souvisí se zvýšenou vnímavostí, v druhém případě snad spíše se stravovacími návyky) Zdaleka nejčastěji je původcem *C. jejuni*, jehož hlavním zdrojem je drůbež. Méně často jsou infekce spojeny s *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*. Člověk se nakazí špatně tepelně upraveným masem (např. rychlá úprava kuřecího na pánvi), nepasterovaným mlékem, ale také kontaminovanou vodou. *Kampylobaktery* jsou poměrně citlivé ve vnějším prostředí, takže k sekundární kontaminaci dochází méně než u salmonel, zato však je třeba mnohem nižší infekční dávky (asi 500 buněk) ke vzniku onemocnění. *Kampylobakteri*óza se projevuje zvýšenou teplotou, vodnatým, někdy až krvavým průjmem a křečemi, které mohou simulovat zánět slepého střeva. Zvracení obvykle nebývá přítomno.

*C. jejuni*, *C. upsaliensis* aj. jsou spojeny s průjmovými onemocněními psů a někdy i jiných domácích zvířat. Ačkoli je u dospělých psů a koček běžná asymptomatická kolonizace (zejména jsou-li krmeni syrovou stravou), v rektálních výtěrech průjmujících zvířat se nacházejí ve výrazně vyšších počtech. Infekce má význam především u štěňat, *kampylobaktery* také mohou komplikovat průběh jiných enterálních, např. parazitických onemocnění. Také psi mohou představovat zdroj infekce pro člověka, především pro děti.

Drůbež bývá s vysokou prevalencí infikována *C. jejuni*; zcela výjimečně je infekce spojena s onemocněním zvaným **vibriová hepatitida** (*kampylobaktery* byly původně považovány za vibria). Bakterie se šíří ze střeva do jater, lze je izolovat ze žluči. Onemocnění se projevuje chřadnutím a poklesem snášky, na jatkách se nacházejí nekrózy a hemoragie v játrech.

#### 4.1.1.2 Patogeneze

*Kampylobaktery* jsou invazivní bakterie, které penetrují střevní výstelku a mohou se šířit do jater a do dalších orgánů. Vývrtkovitý pohyb umožňuje průnik hlenovou vrstvou, povrchové adhezivní molekuly a polysacharidová **kapsula** přispívají k vazbě na enterocyty. Vlastní invaze enterocytů je, jak se zdá, spjata s funkcí **sekrečního systému typu III** a jím indukovanou endocytózou. Bakterie, které pronikají do cirkulace, musí čelit imunitním mechanismům, jako je fagocytóza a komplement. Kromě kapsuly k sérové rezistenci výrazně přispívá tzv. **S-vrstva** (*Surface layer*, jinak také mikrokapsula), vrstvička pravidelně uspořádaných proteinových podjednotek z vnější strany buněčné stěny, která mimo jiné brání vazbě opsonizačních složek komplementu.

*Kampylobaktery* produkují tzv. **cytoletální distendující toxin (CDT)**, toxin s DNázovou aktivitou, jehož účinkem, jak se ozývá v názvu, dochází k distenzi a následné apoptóze napadených buněk. Jeho role při vzniku onemocnění (enterálního nebo reprodukčního) je však nejasná.

### 4.1.1.3 Diagnostika

Diagnostický postup se poněkud liší, izolujeme-li původce venerické kampylobakteri-  
ózy a abortů, nebo původce enteritid, a vyšetřujeme-li klinické vzorky, či vzorky potravin.

*C. fetus* ssp. *venerealis* hledáme v prepuciálních výplascích a smegmatu asymptomatic-  
kých býků. V případě abortů odebíráme plodové vody a orgány (játra, která bývají nekrotická)  
abortovaných plodů. U průjmujících zvířat vyšetřujeme rektální výtěry. V těchto vzorcích mů-  
žeme hledat typické bakteriální buňky v preparátech barvených krystalovou violetí, dle Grama  
nebo polychromaticky, záchytnost je však různá a přímé mikroskopické vyšetření platí pouze  
za orientační.

*Campylobacter* spp. je kultivačně náročná bakterie. K izolaci používáme obohacená se-  
lektivní média, krevní agar s antimikrobiálním suplementem (novobiocin, polymyxin B). Izo-  
laci z potravin, kde je nízká koncentrace bakterií, musí předcházet pomnožení v bujónu. Pro  
enterální druhy je určen tzv. Karmali agar, obsahující antibiotický suplement a aktivní uhlí.  
Inkubujeme vždy v mikroaerofilní atmosféře za použití speciálních vyvíječů (6 % O<sub>2</sub>, 10 %  
CO<sub>2</sub>) 48 hodin při 37°C v případě diagnostiky reprodukčních poruch (*C. fetus*), při 42°C v pří-  
padě původců průjmů (*C. jejuni* a další termofilní druhy; většina kmenů *C. fetus* při této teplotě  
neroste).

*C. jejuni* vytváří šedavé ploché, poněkud splývavé kolonie, zatímco kolonie *C. fetus*  
jsou drobné a připomínají kapičky rosy. Přestože *Campylobacter* spp. je biochemicky málo  
aktivní, několik testů dovoluje následnou druhovou identifikaci: hydrolýza hippurátu sodného  
(pozitivní pro *C. jejuni*), schopnost růstu při 25°C (*C. fetus*), citlivost k nalidixové kyselině (*C.*  
*jejuni*) a cefalotinu (*C. fetus* ssp. *venerealis*).

### 4.1.1.4 Léčba a prevence

Stádo lze udržet prosté venerické kampylobakteri-  
ózy pravidelným vyšetřováním býků  
a kontrolou inseminačních dávek. Jsou dostupné vakcíny pro skot i pro ovce, běžně se však  
nepoužívají.

K léčbě kampylobakteri-  
ózy se primárně používají makrolidová antibiotika jako erythro-  
mycin nebo azithromycin. Při běžném střevním onemocnění však jejich použití není nutné a  
spíše se nedoporučuje. Průjem obvykle odezní sám od sebe, je nutné dbát na rehydrataci orga-  
nismu. Loperamid a jiné přípravky inhibující střevní peristaltiku jsou kontraindikovány.



## 4.2 Čeleď *Helicobacteraceae*

### 4.2.1 Rod *Helicobacter*

*Helicobacter* spp. je zahnutá až spirálovitá gramnegativní tyčinka. Je kultivačně náročná, mikroaerofilní, a tvoří unipolární nebo bipolární bičíky. Kromě nejznámějšího *H. pylori* je popsáno mnoho species od různých zvířecích hostitelů; zdá se, že snadno překračují hostitelskou bariéru a mají zoonotický potenciál. Asociace s onemocněním není vždy zcela zřejmá, podle místa výskytu je však lze rozdělit na dvě skupiny: tzv. gastrické a enterohepatální.

#### 4.2.1.1 Patogenita

Modelovým zástupcem gastrických helikobakterů je *H. pylori*, dobře známý a vysoce prevalentní patogen člověka. Udává se, že až polovina populace (až 90 % v rozvojových zemích) je kolonizována. Kolonizace žaludeční sliznice *H. pylori* je příčinou chronické gastritidy a predispozicí pro vznik peptických vředů; navíc je vysoce rizikovým faktorem pro vznik gastrických malignit (adenokarcinom nebo lymfom).

Z žaludku psů a koček byly izolovány *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. heilmannii*, *H. baculiformis*, *H. salomonis* aj., některé z nich jsou schopné přenosu na člověka, u něhož mohou vyvolávat podobné, ale obecně mírnější změny jako *H. pylori*. Naopak *H. pylori* u psů ani koček běžně nalézán není. Klinický význam helikobakterů u psů a koček (potažmo jiných zvířat) zůstává neobjasněn. *H. mustelae* je známý u fretek, u nichž vyvolává chronickou gastritidu.

Mezi enterohepatální helikobaktery patří *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. pullorum*; zejména druhy izolované od hlodavců (*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. cinaedi*) mohou být zoonotické a byly asociovány s chronickými záněty trávicího traktu a karcinomy jater.

#### 4.2.1.2 Patogeneze

Typickým znakem gastrických helikobakterů je produkce **ureázy**. Považuje se za ústřední faktor virulence, který pomáhá přežít v extrémně kyselém prostředí žaludku. Rozkladem močoviny vzniká amoniak, neutralizující kyselinu žaludečních šťáv v bezprostředním okolí bakteriální buňky. To však samo o sobě v žádném případě nestačí. Přítomnost bakterií vyvolává zánětlivou odpověď, která však nevede k jejich likvidaci; naopak se zdá, že helikobaktery jsou schválně přizpůsobené na kolonizaci zanícené sliznice. V adhezi se uplatňují především **adheziny BabA** a **SabA**, vázající se k molekulám, které se více odhalují právě následkem zánětu. *H. pylori* obsahuje ostrov patogenity, kódující **sekreční systém typu IV** a jeho efektor, **CagA** (cytotoxin-associated gene), dále produkuje **vakuolizující cytotoxin (VacA)** a **cytoletální distendující toxin (CDT)**. Tyto faktory přispívají k poškození buněk žaludeční sliznice. U *H. hepaticus* byl popsán **granulující cytotoxin (GCT)**, toxický pro jaterní buňky myši. Helikobaktery musí odolávat imunitním mechanismům zanícené tkáně. Enzym **kataláza** pomáhá neutralizovat produkty oxidativního vzplanutí fagocytujících buněk.

#### **4.2.1.3 Diagnostika**

Bakterie je možné demonstrovat kultivačně nebo přímo v polychromaticky barvených preparátech z endoskopicky odebraných bioptátů žaludeční sliznice. Kultivace je náročná, vyžaduje obohacená selektivní média a mikroaerofilní atmosféru. Lze také využít testy na detekci ureázové aktivity ve vzorcích sliznice.

#### **4.2.1.4 Terapie**

U člověka se k léčbě využívá kombinace antibiotik, nejčastěji amoxicilinu s klaritromycinem, a inhibitorů protonových pump (omeprazol). Účinnost antibiotik by měla být ověřena *in vitro* testem.

### 4.3 Čeleď Desulfivibrionaceae

Čeleď Desulfivibrionaceae z třídy Deltaproteobacteria zahrnuje striktně anaerobní bakterie s fermentativním nebo respiratorním typem metabolismu; některé druhy jsou schopné tzv. anaerobní respirace procesem, v němž jako finální akceptor elektronů slouží sulfáty. Bakterie redukující sulfáty se vyskytují hojně v různém prostředí včetně gastrointestinálního traktu. Důležitou roli hrají také jako součást mořských sedimentů. Modelovým organismem je *Desulfovibrio vulgaris*, relativně aerotolerantní rohlíčkovitě zakřivená tyčinka s jedním polárním bičíkem, kterou nacházíme v půdě, vodě i jako součást střevní mikroflóry. Spíše zřídka může *Desulfovibrio* spp. figurovat jako oportunní původce bakterémie a intraabdominálních infekcí, např. abscesů a zánětů slepého střeva. Dalším druhem ne zcela objasněného klinického významu je *Bilophila wadsworthia*, nepohyblivá, kataláza a ureáza-pozitivní bakterie, izolovaná ze střeva člověka, z případů peritonitid, perforujících apendicitid a abscesů. Zvýšená produkce sirovodíku těmito bakteriemi může být příčinou chronického dráždění střevní sliznice, vedoucí k zánětlivým nebo nádorovým změnám.

Specifickým patogenem z této čeledi je rod *Lawsonia* s jediným druhem *L. intracellularis*, původce proliferativní enteropatie prasat a některých dalších zvířecích druhů.

#### 4.3.1 Rod *Lawsonia*

*L. intracellularis* je rohlíčkovitě zakřivená obligátně intracelulární gramnegativní tyčinka, pohyblivá díky polárnímu bičíku, pokud se nachází extracelulárně; v cytoplasmě bičík neexprimuje a po úniku z napadené buňky vykazuje šubavý pohyb. Povrch je kryt trojvrstevnou membránou. *L. intracellularis* napadá enterocyty a množí se v jejich apikální cytoplasmě.

##### 4.3.1.1 Patogenita

*L. intracellularis* způsobuje tzv. **proliferativní enteropatii** neboli **ileitidu** prasat, nicméně podobné onemocnění vyvolává také u hřibat, fretek, králíků, křečků. Jak z obou názvů vyplývá, onemocnění primárně postihuje distální část tenkého střeva (v pozdějších fázích se šíří i do dalších částí) a je spojeno s proliferací střevní sliznice, jejím zesílením a gyrifikací; takto postižená sliznice ztrácí svou absorpční schopnost. Dochází k malabsorpci a chronickému „maltovitému“ průjmu se závažným zhoršením produkčních parametrů. Tato nejběžnější forma onemocnění, také zvaná porcinní intestinální adenomatóza, postihuje převážně výkrmová a předvýkrmová prasata. U mladých dospělých prasat se setkáváme někdy s akutní hemoragickou formou, spojenou s náhlým úhynem. K dalším specifickým formám patří tzv. nekrotická (s koagulační nekrózou střeva) a regionální ileitida (silná granulace vedoucí až k perforaci střeva). Zdrojem infekce jsou faeces napadených zvířat, možný je i mezidruhový přenos. Možnost infekce člověka nebyla dosud popsána, nelze ji však zcela vyloučit.

#### 4.3.1.2 Patogeneze

Zcela všeobecně lze říci, že *L. intracellularis* invaduje enterocyty, uniká do cytoplasmy a množí se v jejich apikální části, avšak mechanismy uplatňující se v patogenezi dosud nebyly přesně pochopeny. Bičík slouží v iniciálních stádiích infekce k průniku hlenovou vrstvou kryjící enterocyty. *L. intracellularis* produkuje povrchový antigen **LsaA**, sloužící jako adhezin, který se také využívá v sérologických testech, a dále byl popsán **sekreční systém typu III**. Nedávno byl také popsán operon příbuzný SPI-2 salmonel, jehož produkty by mohly hrát roli v interferenci s maturací fagozomu a úniku bakterie do cytoplazmy. Podle jiných studií by únik do cytoplazmy mohl zajišťovat hemolytický toxin, jeho produkce však nebyla potvrzena.

Právě tak není dosud známo, jakým mechanismem lawsonia indukuje proliferaci střevní sliznice. Je jisté, že nějakým způsobem brání maturaci enterocytů a jejich apoptóze; buňky se nepřestávají množit, jsou však nezralé a neschopné plnit svou funkci. Dochází ke zkracování klků, prodlužování krypt, ztlustění sliznice a ztrátám tekutin a proteinů. Během intracelulární fáze bakterie využívají účinku enzymů **superoxiddismutázy**, chránící před oxidativním stresem, a **ATP/ADP translokázy**, která umožňuje parazitovat na energetickém metabolismu hostitelské buňky. Po pomnožení opouštějí bakterie buňku a napadají další enterocyty.

#### 4.3.1.3 Diagnostika

Z hlediska klinických příznaků v diferenciální diagnostice u prasat připadá v úvahu především intestinální spirochetóza (*B. pilosicoli*), nebo dyzentérie (*B. hyodysenteriae*) v případě hemoragické formy, avšak patomorfologický a především histologický nález je poměrně typický. Imunohistochemie nebo impregnace stříbrem poslouží k vizualizaci bakterií v histologických řezech střeva. Bakterie lze také prokázat v seškrabek střevní sliznice a vzorcích faeces metodou PCR. *L. intracellularis* jakožto obligátně intracelulární bakterii není možno kultivovat na bezbuněčných živných médiích a k izolaci na buněčných kulturách se přistupuje pouze experimentálně. Používá se buněčná linie potkáních enterocytů (IEC 18) a speciální mikroaerofilní atmosféra. K průkazu protilátek je dostupný nepřímý imunofluorescenční test.

#### 4.3.1.4 Terapie

U prasat se k terapii nejčastěji používají pleuromutilinová antibiotika tiamulin a valnemulin, z dalších možností se uvádí tylosin, tetracykliny a enrofloxacin. K indukci protektivní slizniční imunity lze použít perorální živou vakcínu. Sající selata jsou chráněna IgA v mléce (laktogenní imunita).

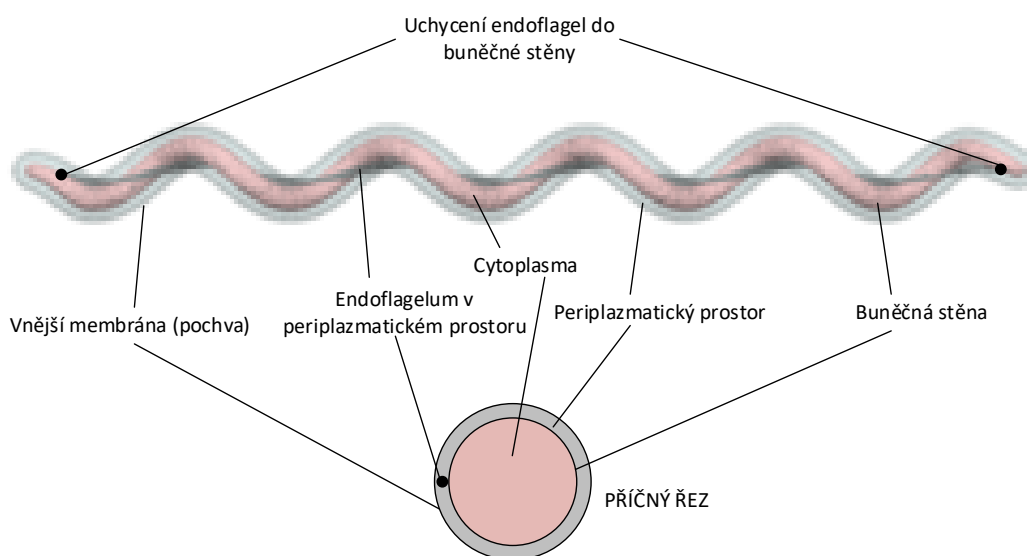
Doporučená literatura:

Vannucci FA, Gebhart CJ. Recent advances in understanding the pathogenesis of Lawsonia intracellularis infections. Vet Pathol. 2014 Mar;51(2):465-77.

## 5. Spirochety

Řád Spirochety (Spirochaetes) tvoří pět čeledí, z nichž tři, Leptospiraceae, Spirochaetaceae a Brachyspiraceae, zahrnují veterinárně významné patogeny. Společným znakem těchto bakterií jsou jejich jedinečné morfologické a funkční vlastnosti. Spirálovitě utvářené buňky se pohybují díky endoflagelám, které rotují v periplazmatickém prostoru (obrázek č. 1), a tím jim udávají vývrtkovitý pohyb. Veterinárně významné rody *Leptospira*, *Borrelia*, *Brachyspira* a *Treponema* zahrnují patogeny zvířat i člověka (schéma č. 2). Někteří zástupci těchto rodů se řadí mezi původce zoonóz a jiní jsou naopak nepatogenní. Spirochety se všeobecně obtížně kultivují a vyžadují k tomu speciální média.

Schéma č. Klasifikace veterinárně významných spirochét		
Řád	Čeleď	Rod
Spirochetales	Leptospiraceae	<i>Leptospira</i>
	Spirochaetaceae	<i>Borrelia</i>
		<i>Treponema</i>
	Brachyspiraceae	<i>Brachyspira</i>



Obrázek 1 Schématické zobrazení morfologie spirochet

## 5.1 Rod *Leptospira*

Leptospiry jsou pohyblivé tenké spirálkovitě stočené bakterie ( $0.1 \times 6$  až  $12 \mu\text{m}$ ) s hákovitým zakončením (Obr. 36.3). Mají dva kruhové chromozomy s geny, které kódují vlastnosti nezbytné pro přežívání v prostředí. Přestože patří složením buněčné stěny mezi gram-negativní bakterie, nebarví se obvyklými barvicími postupy a jsou ve světelném mikroskopu viditelné jen v nativních preparátech na temném pozadí při bočním osvětlení (technika temného pole). V tkáních uhynulých zvířat se leptospiry vizualizují speciálními technikami, jako je impregnace histologických řezů stříbrem nebo metodou imunofluorescence, která využívá fluoresceinem značených specifických protilátek. Leptospirové infekce mohou postihnout prakticky všechny druhy savců včetně člověka. Závažnost průběhu bývá od lehkého postižení močového nebo genitálního systému až po těžké systémové infekce. Taxonomická klasifikace druhů leptospir spočívá v hodnocení jejich genetické příbuznosti. V klinické diagnostice a epidemiologických studiích se však hlavně využívají sérologické metody, které jsou založené na hodnocení antigenní odlišnosti patogenních sérotypů leptospir.

### 5.1.1 Obvyklý habitat

Leptospiry mohou přežívat při přiměřené teplotě prostředí v povrchových vodách, vlhké půdě i bahně. Patogenní leptospiry perzistují v organismu infikovaných zvířat v proximálních tubulech ledvin a jsou vylučovány močí do prostředí. Za příznivých podmínek prostředí je možný i jejich nepřímý přenos, ale leptospiry jsou většinou citlivé na podmínky prostředí, proto jsou mnohem účinněji přenášeny na další hostitele přímým kontaktem.

### 5.1.2 Druhy leptospir a jejich rozlišení

Dříve byly leptospiry řazeny na základě sérologických analýz ke dvěma druhům, *L. interrogans* zahrnující patogenní sérotypy, a *L. biflexa* zahrnující saprofytické nepatogenní sérotypy. Dnes jsou leptospiry rozlišeny na druhy či spíše genospecies na podkladě podobnosti DNA v rámci každého druhu, a na různé sérovary dle odlišné povrchové antigenní struktury. Sérovary se společnými antigeny patří ke stejné sérologické skupině. V současnosti je rozlišováno 20 druhů leptospir, které se člení do tří skupin, druhy patogenní, nepatogenní a s neurčitou patogenitou. Patogenní leptospiry patří k více než 250 patogenním sérovarům, které se řadí do 24 sérologických skupin. Taxonomické třídění podle skladby DNA a antigenní struktury vedlo k tomu, že některé antigeně podobné leptospiry (sérovary) patří současně ke dvěma druhům. Například sérovar Hardjo, náleží ke dvěma druhům, *L. borgpetersenii* a *L. interrogans*, protože jeho povrchové antigeny jsou zastoupeny u obou geneticky odlišných druhů leptospir. Sérologická klasifikace leptospir zůstává klinicky významnější, protože jednotlivé sérovary jsou spojeny se specifickým hostitelským druhem zvířete a zkřížená imunita mezi sérovary je minimální. Z tohoto důvodu identifikace sérovaru, který vyvolal infekci je zásadní pro diagnostiku a objasňování epidemiologie leptospirových infekcí.

Tabulka č. 3 Sérovary leptospir jako původci infekcí domácích zvířat

Sérovar	Hostitel	Klinické infekce
<i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo	skot ovce	aborty, mrtvě narozené plody, ztráta laktace
<i>L. interrogans</i> serovar Hardjo	člověk	chřipce podobné stavy, postižení jater nebo ledvin
<i>L. borgpetersenii</i> serovar Tarassovi	prase	problémy s reprodukcí, aborty a mrtvě narozené plody
<i>L. interrogans</i> serovar Bratislava	prase, kůň, pes	problémy s reprodukcí, aborty a mrtvě narozené plody
<i>L. interrogans</i> serovar Canicola	pes	akutní nefritida štěňat, chronický zánět ledvin (dospělí)
	prase	aborty a mrtvě narozené plody, nefritidy mladých prasat
<i>L. interrogans</i> serovar Grippotyphosa	skot, prase, pes	septikémie mladých zvířat, aborty
<i>L. interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae	skot, ovce, prase pes, člověk	septikémie telat, selat a jehňat; aborty perakutní hemoragické infekce, akutní hepatitidy se žloutenkou
<i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni	domácí zvířata člověk	perakutní a akutní onemocnění; aborty zvířat
<i>L. interrogans</i> serovar Pomona	skot, ovce	akutní infekce provázené hemolýzou u telat a jehňat; aborty
	prase	problémy s reprodukcí; septikémie selat
	kůň	aborty, periodická oftalmitis

### 5.1.3 Epidemiologie

Ačkoliv jsou leptospiry rozšířeny celosvětově, tak některé jejich sérovary se vyskytují jen v určitých geografických oblastech. To souvisí s tím, že většina sérovarů je vázána na specifický hostitelský druh zvířete, ve kterém se sérovar perzistuje. Tito specifictí hostitelé se snadno infikují, ale průběh onemocnění je u nich často jen lehký nebo pouze subklický, a v důsledku toho je vylučování leptospir močí těchto zvířat dlouhodobé. Tito specifictí hostitelé jsou tak hlavním zdrojem kontaminace prostředí a přirozeně přenáší leptospiry na jiné druhy zvířat, které označujeme jako sekundární hostitele. Tito sekundární hostitelé obvykle vykazují nižší vnímavost k infekci, ovšem těžce onemocní. Genomické studie ukázaly, že patogenní leptospiry jen omezeně přežívají v prostředí. Sérovary patřící k druhu *L. borgpetersenii* v prostředí nepřežívají, naopak sérovary druhu *L. interrogans* jsou schopny ve vhodném prostředí, jako je povrchová voda, dlouhodobého přežívání. Kontaminované

prostředí je považováno jako hlavní cesta přenosu leptospirové infekce mezi hlodavci, ale přenos přímým kontaktem je častější. U krys byl dokonce popsán přenos i pohlavní cestou *in utero* nebo mlékem na mláďata. Výsledek infekce u různých hostitelských druhů zvířat může ovlivnit mnoho faktorů, včetně virulence původce a stavu imunity hostitele.

Rezervoároví hostitelé a běžně infikovaní sekundární hostitelé vybraných sérovarů *L. interrogans* jsou uvedeni v tabulce č. 3.

Tabulka č. 4 Rezervoároví hostitelé a běžně infikovaní sekundární hostitelé vybraných sérovarů *L. interrogans*

Sérovar	Rezervoároví hostitel	Sekundární hostitel
Bratislava	prase, ježek, kůň	pes
Canicola	pes	prase, skot
Grippotyphosa	hlodavci (hraboš polní)	skot, prase, kůň, pes
Hardjo	skot, ovce, jelenovití	člověk
Icterohaemorrhagiae	potkan	domácí zvířata, člověk
Pomona	prase, skot	ovce, kůň, pes

#### 5.1.4 Klinické infekce

Přehled klinických infekcí spojených s infekcí jednotlivých sérovarů u domácích zvířat dokumentuje tabulka č. 4.

##### 5.1.4.1 Leptospiróza skotu a ovci

Skot je specifickým hostitelem *L. borgpetersenii* sérovar **Hardjo** a množí se důkazy o tom, že tento sérovar je také adaptován na ovce a jelenovitou zvěř. *Leptospira interrogans* sérovar **Hardjo** je také adaptován na skot. Zdá se, že *L. interrogans* sérovar Hardjo, který vyvolává jen sporadické případy onemocnění skotu, může být více virulentní než *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo. Akutní leptospiróza provázená horečkou a agalakií všech čtvrtí mléčné žlázy se zjišťuje po zařazení odděleně odchovaných prvotetek do infikovaného stáda dojnic. Leptospiróza může také vést k abortům a porodům mrtvých telat. Pokud podmínky odchovu umožní vystavení jalovic infekci a rozvoj imunity před jejich připuštěním, tak se reprodukční problémy nemusí objevit. Agalackie vyvolaná leptospirovou infekcí může být diagnostikována průkazem vzestupu titru specifických protilátek v párových vzorcích krevního séra.



Infekce ovcí vyvolané sérovarem Hardjo, zejména u intenzivně chovaných stád v nížinách, mohou být provázeny aborty a agalaxií. V takových případech antibiotická terapie streptomycinem nebo amoxicilinem může omezit vylučování leptospir močí a šíření infekce. V zemích a oblastech s vyšším výskytem leptospirózy ovcí a skotu se k prevenci používá vakcinace komerčně dostupnými monovalentními a polyvalentními inaktivovanými vakcínami. Sérovary **Pomona**, **Grippotyphosa** a **Icterohaemorrhagiae** mohou vyvolat těžké infekce, zejména telat a jehňat. Infekce jsou provázeny horečkou, hemoglobinúrií, žloutenkou a kachexií. Poškození ledvin se projeví urémií, která často předchází úhyn. Vakcinace se užívá i k tlumení leptospirózy vyvolané sérovarem Pomona, který bývá v některých zemích důležitým původcem abortů skotu.

#### **5.1.4.2 Leptospiróza koní**

Ačkoliv sérologický nález potvrzující prodělání leptospirové infekce je u koní poměrně běžný, tak klinické infekce jsou spíše vzácné. Za specifické leptospirózy koní jsou pokládány infekce vyvolané sérovarem **Bratislava**, které bývají provázené aborty a porody mrtvých hříbat. Klinické infekce mohou být vyvolané také sérovarem **Pomona** i jinými sérovary podle dané geografické oblasti. Příznaky zahrnují aborty u klisen a u mladých koní to bývá postižení ledvin. Chronická leptospiróza koní se může projevit ve formě **rekurentní uveitis** (periodická oftalmitis, také „**měsíční slepota**“). Tento stav by mohl souviset s přetrvávající infekcí oka leptospirami, navíc do tohoto onemocnění mohou být zapojeny autoimunitní mechanismy, což naznačují zkřížené reakce mezi antigeny leptospir a proteiny rohovky a čočky. Vakcíny proti leptospiróze koní nejsou v současné době registrovány.

#### **5.1.4.3 Leptospiróza prasat**

Akutní leptospirózu prasat vyvolávají sérovary adaptované na myšovitě hlodavce, **Icterohaemorrhagiae** a **Copenhageni**. Tyto sérovary jsou příčinou závažných infekcí, které mohou u mladých prasat končit úhynem. Příznaky jsou podobné těm, které se zjišťují u akutních leptospiróz jiných druhů zvířat. Ve většině zemí světa je hlavním původcem leptospiróz sérovar **Pomona**, který je adaptovaný na prase. Subklinicky infikovaná prasata mohou vylučovat tyto leptospiry močí a to po poměrně dlouhé období. Infekce může u prasnic vést k poruchám reprodukce včetně abortů a porodů mrtvých plodů. Prasata jsou také specifickým hostitelem sérovarů **Tarassovi** a **Bratislava**, které mohou u prasnic rovněž vyvolat reprodukční poruchy.

#### **5.1.4.4 Leptospiróza psů a koček**

Leptospirózy psů jsou vyvolávány především sérovary **Canicola** a **Icterohaemorrhagiae**. Důsledkem zařazení antigenů těchto sérovarů do všeobecně používaných polyvalentních vakcín vzrůstá u psů také význam jiných sérovarů **Grippotyphosa**, **Bratislava** a **Pomona**, proti kterým tyto vakcíny neindukují imunitu. Infekce je u psů nejčastější ve stáří 4 až 7 let, s větším rizikem u loveckých psů. Známa je sezónnost leptospirových infekcí s častým výskytem v pozdním létě a časném podzimu, případně spojitost vyššího výskytu leptospirózy

s deštivým obdobím. Na psa je adaptován sérovar *Canicola*, který v oblastech jeho výskytu vyvolává závažná poškození ledvin štěňat. U jedinců, kteří přežijí akutní fázi infekce, se může následně rozvinout chronický uremický syndrom. Psi se mohou infikovat i jinými sérovary jako *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* nebo *Pomona*, které jsou specifické pro myšovitě hlodavce a prase. Pro tyto infekce je charakteristická akutní hemoragická diatéza, subakutní selhání jater a ledvin. Sérovar *Bratislava* byl zaznamenán jako původce abortů a infertility fen. Psi jsou někdy uváděni i jako specifictí hostitelé tohoto sérovaru.

Ačkoliv leptospiroza koček není běžná, sporadické případy infekcí byly popsány.

### 5.1.5 Patogeneze a patogenita

Patogenita leptospir souvisí s virulencí sérovaru, který vyvolal infekci, a s vnímavostí hostitelského druhu. Onemocnění může mít závažnější průběh u hostitelů s nedostatečnou obranyschopností, ale mnohem těžší průběh leptospirozy se vyskytuje častěji u sekundárních hostitelů. Znalosti o faktorech virulence a mechanismech vzniku onemocnění jsou jen omezené. Leptospiry napadají tkáň skrze macerovanou či poškozenou kůži, nebo sliznici. Díky aktivnímu vývrtkovému pohybu pronikají do hlubších tkání a pak se šíří krevním oběhem do celého organismu. Asi za 10 dnů po infekci je infekční proces usměrňován tvorbou specifických protilátek, které zapříčiní postupné mizení leptospir z krevního oběhu. Část leptospir může uniknout imunitní odpovědi hostitele a perzistovat v organismu v tkáních s nízkou koncentrací protilátek, zejména v proximálních ledviných tubulech, ale také v děloze, v oku nebo na mozkových plenách. Přesné mechanismy, které leptospirám umožňují přežít v těchto místech navzdory specifické imunitní odpovědi hostitele, jsou však nejasné. U hostitelů s dobrým stavem obranyschopnosti, jako je například potkan kolonizovaný sérovarem *Copenhageni*, leptospiry nejdříve mírně poškodí ledviny, ale nevyvolají významnou lokální buněčnou imunitní odpověď, a to i přes výskyt leptospir v moči od 7 dne infekce. Přestože se za 1 měsíc po infekci vyvíjí mírná až těžká intersticiální nefritida, a tak vylučování leptospir močí může přetrvávat po celý život potkana. Snížení exprese proteinových antigenů na povrchu leptospir nebo rozdílná exprese proteinů během chronické infekce jsou považovány za možné mechanismy, které umožňují leptospirám přežít specifickou imunitní odpověď v organismu hostitele. Faktory určující stupeň virulence leptospir nebyly úplně charakterizovány. Toxické komponenty se zdají být těsně spojené s buňkou a zahrnují proteiny vnější membrány. LPS leptospir má mnohem menší toxickou aktivitu než endotoxin jiných gramnegativních bakterií a aktivuje imunitní odpověď hostitele spíše cestou TLR-2 než TLR-4. Počáteční adherence k buňkám hostitele může být zprostředkována vazbou povrchových proteinů leptospir jako je protein vážící se na fibronectin, který tvoří extracelulární matrix (pojivovou tkáň) hostitele. V počátcích infekce se může uplatnit i chemotaxe leptospir k hemoglobinu. Leptospiry mohou v krevním řečišti uniknout fagocytóze navozením apoptózy makrofágů. Předpokládá se, že po vazbě na buňky hostitele do nich leptospiry vstoupí s využitím endocytózy zprostředkované receptorem. U vnímavých zvířat jsou během akutní leptospirozy poškozovány buněčné membrány erytrocytů a endotelu cév společně s poškozením hepatocytů, což je provázeno hemolytickou anémií, žloutenkou, hemoglobinurií a krváceninami na sliznicích. Silné krvácení do plic je často charakteristický příznak perakutního průběhu leptospirozy člověka. Patogenní

leptospiry totiž tvoří mnoho hemolyzínů včetně **sfingomyelináz**, které mohou být částečně odpovědné za popsané změny.

### 5.1.5 Diagnostika

Charakteristické klinické příznaky společně s anamnestickými údaji, které potvrzují předchozí vystavení kontaktu s močí podezřelých zvířat mohou ukazovat na akutní leptospirozu.

Potvrzení leptospirozy u hospodářských zvířat bez klinických příznaků obvykle vyžaduje vyšetření určitého počtu zvířat v závislosti na velikosti stáda, aby byli odhaleni jedinci se specifickými protilátkami. Leptospiry je možné prokázat v sedimentu čerstvé moči mikroskopii na temném poli, ale tento postup je relativně málo průkazný. Leptospiry mohou být izolovány z krve během prvních dnů infekce a z moče asi 2 týdny od začátku infekce, a to kultivací krve nebo moče do tekutého média nebo experimentální infekcí pokusného zvířete. Pomalu se množící sérovary jako Hardjo mohou vyžadovat inkubaci vzorku v tekutém médiu při 30 °C po dobu až 6 měsíců. Pro kultivaci se používají tekutá či polotuhá média. Při tom se několik kapek krve, likvoru či moči vkápne do zkumavek s kultivační půdou. Média se inkubují buď v termostatu při 28 °C nebo při pokojové teplotě, růst leptospir se hodnotí průběžně mikroskopicky za 3–7 dní a pak ještě jednou za 14–21 dnů. Nevýhodou metody je nízký záchyt, časová náročnost a častá sekundární bakteriální kontaminace biologického materiálu (moč).

Průkaz DNA patogenních leptospir metodou PCR umožňuje rychlý a citlivý průkaz leptospir ve vzorku. Existuje řada komerčně vyráběných kitů pro diagnostiku leptospir PCR, které se liší v amplifikaci různých cílových genů DNA. Leptospiry je možno metodou PCR zachytit v prvních deseti dnech od nakažení v krvi, po týdnu také v moči. Metoda PCR je použitelná i pro další klinické materiály, jako například jaterní biopsie či jiné tělní tekutiny. Další techniky založené na průkazu specifické DNA se mohou využít pro experimentální účely.

Za „zlatý standard“ je v laboratorní diagnostice leptospirozy považován nepřímý průkaz leptospirozy detekcí specifických protilátek **mikroskopickým aglutinačním testem (MAT)** s živými laboratorními kmeny leptospir. Principem testu je reakce specifické protilátky s živým antigenem. Tato reakce způsobí aglutinaci a následnou lýzu leptospir. Práce s živými kulturami však přináší pro laboratorní pracovníky potenciální nebezpečí infekce. Vzhledem ke skutečnosti, že detekovatelné množství protilátek je infikovaným hostitelem tvořeno od 7–10 dne po nakažení, je tento test velmi vhodný k následnému konfirmačnímu vyšetření a určení sérovaru, který infekci vyvolal. Metoda je založena na inkubaci živých laboratorních kmenů leptospir s ředěným sérem pacienta po dobu jedné hodiny při 37 °C. Výsledek této mikroaglutinační reakce se odečítá mikroskopicky na temném poli nebo v zástinu. Za pozitivní se považuje reakce, kdy aglutinuje a následně lyzuje přibližně 50 % leptospir v zorném poli mikroskopu. U všech vyšetřovaných kmenů se mikroskopicky stanoví výsledný titr protilátek, tj. ředění séra, při kterém aglutinuje 50 % leptospir. Nejsou-li leptospiry v zorném poli mikroskopu vůbec aglutinovány a volně se pohybují, je reakce MAT negativní. Titry přesahující 1:400 nebo čtyřnásobné zvýšení titru u párových vzorků

krevního séra jsou signifikantní, když jsou u zvířete provázeny klinickými příznaky odpovídajícími leptospiróze. Sérologická diagnostika leptospirózy vyvolané sérovary adaptovanými na hostitele může být komplikována klesajícími titry protilátek nebo dokonce jejich absencí i přes přítomnost klinických příznaků. Typickým příkladem je sérovar Hadjo, který u skotu indukuje nedostatečnou imunitní odpověď, což se projeví infekcí s dlouhodobým vylučováním leptospir močí bez vývoje signifikantních titrů protilátek.

Na trhu je k dispozici v různých zemích i několik ELISA testů. Tyto testy detekují pouze rodově specifické protilátky. Jelikož existuje velké množství patogenních sérovarů, jsou pro přesnou diagnostiku leptospirózy a pro konfirmační vyšetření nepoužitelné.

### 5.1.6 Léčba a tlumení

Prevence leptospirózy u domácích zvířat je primárně závislá na použití vakcinace. Navozená imunita je specifická pro daný sérovar, proto by vakcíny měly obsahovat antigeny sérovarů leptospir, které se v dané geografické oblasti vyskytují. Současné vakcíny obsahují obvykle inaktivované leptospiry (bakteriny) a imunita musí být obnovována pravidelnou revakcinací.

Aktuálně jsou vyvíjeny a zaváděny subjednotkové vakcíny a určitou perspektivou by mohly být vakcíny na bázi rekombinantních proteinů, které by umožnily křížovou ochranu proti několika patogenním sérovarům.

Leptospiry jsou citlivé k účinkům úzkospektrálních penicilinů, tetracyklinů (zejména se používá doxycyklin) a streptomycinu.

### 5.1.7 Význam pro veřejné zdraví

Leptospiróza je zoonóza a bývá profesionální chorobou pracovníků jatek, ošetřovatelů skotu a prasat, veterinárních lékařů, pracovníků přicházejících do kontaktu s odpadními vodami, záchranářů pracujících při záplavách, lidí věnujících se vodním sportům. Člověk patří k sekundárním hostitelům a infikuje se převážně při styku odřené kůže nebo poškozené sliznice s vodou nebo vlhkou půdou znečištěnou močí infikovaných zvířat. Patogenní leptospiry aktivním pohybem pronikají do krve a šíří se dále hematogenní cestou a vyvolávají širokou škálu klinických příznaků od mírné horečky, přes žloutenku až po plicní hemoragický syndrom, postižení jater a ledvin, což jsou život ohrožující stavy. Celosvětově každým rokem leptospiróza vyvolá více než 1 milion závažných případů a z nich asi 60 000 končí smrtí.

Literatura:

Adler B., De La Peña Moctezuma A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 140, 287–296.

## 5.2 Rod *Borrelia*

Borélie jsou delší a širší než ostatní spirochéty a mají podobný spirálovitý tvar buňky (obrázek č. 2). Navíc mají lineární chromozom, což je mezi bakteriemi unikátní. Borélie obsahují také lineární a cirkulární plazmidy, z nichž některé jsou pro tyto bakterie nepostradatelné. Tyto spirochéty jsou přenášeny členovci. Vyvolávají u zvířat a člověka klinické i subklinické infekce. Přehled druhů borélií významných pro zvířata, jejich vektorů a jimi vyvolaných klinických infekcí je dokumentován v tabulce č. 5.

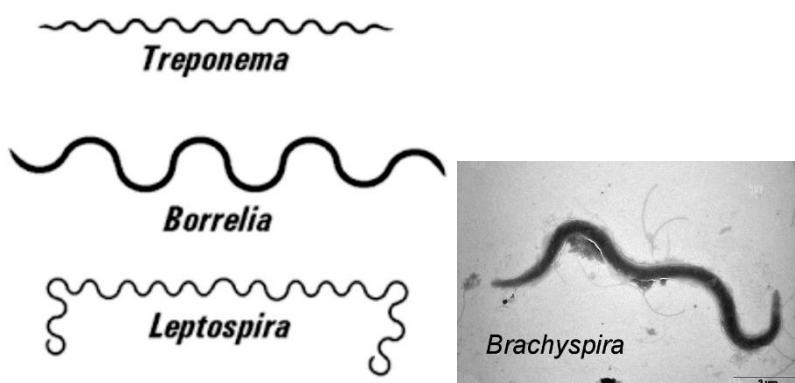
### 5.2.1 Obvyklý habitat

Borélie jsou obligátní parazité různých rezervoárových druhů obratlovců, ve kterých dlouhodobě přežívají a jsou v jejich populacích přenášeny vektory, kterými jsou různé druhy klíšťat. Spojení určitých druhů borélií s odpovídajícími druhy členovců – vektorů a rezervoárových hostitelů jsou důležitá pro určení epidemiologie (zdrojů a cest šíření) druhů borélií.

Tabulka č. 5. Druhy borélií, vektorů, rezervoárových hostitelů a klinických infekcí

Druh	Vektor	Rezervoárový hostitel	Klinické infekce
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Hlodavci, ptáci, plazi	Artritidy, neurologické a kardiologické poruchy u psů, občas u koní, skotu, ovcí
<i>B. anserina</i>	<i>Argas</i> sp.	Ptáci	Horečka, anémie, stráta kondice u drůbeže
<i>B. thaileri</i>	Různé druhy klíšťat	Skot, ovce, koně	Mírné horečnaté stavy provázené anémií
<i>B. coriaceae</i>	<i>Ornithodoros</i> sp.	Skot, jelenovitá zvěř	Epizootické aborty skotu v USA

Obrázek č. 2. Znárodnění rozdílů ve velikosti a tvaru veterinárně významných spirochét



### 5.2.2 Rozlišení druhů borélií a klinické infekce

Borélie se liší od ostatních spirochét morfologií, nízkým obsahem guaninu a cytosinu v genomu, ekologií, kultivačními vlastnostmi a biochemickou aktivitou. Identifikace borélií je založena především na analýze DNA. Použitím DNA-DNA hybridizace, sekvenováním 16S rRNA a dalšími molekulárními metodami se rozlišuje nejméně 13 různých genospecies nebo genomických skupin souhrnně označovaných *B. burgdorferi* sensu lato. Omezený počet těchto druhů je patogenní.

Veterinárně významnými druhy jsou *B. burgdorferi* sensu lato, původce Lymeské choroby zvířat a člověka, a *B. anserina*, původce boreliózy ptáků. Význam dalších dvou druhů *B. theileri* a *B. coriacea* jako patogenů zvířat nebyl přesvědčivě potvrzen.

Lymeská choroba, známá také jako Lymeská borelióza byla poprvé prokázána v roce 1975 při objasňování případů artritid dětí v okolí města Old Lyme, v USA ve státě Connecticut. Původce byl tehdy pojmenován *Borrelia burgdorferi*. Od té doby bylo popsáno v USA a Evropě několik genospecies *B. burgdorferi*. Ačkoliv *B. burgdorferi* sensu stricto je hlavní genotyp izolovaný v USA, tak je zjišťována genetická různorodost. Přehled druhů v entitě *B. burgdorferi* sensu lato je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Přehled druhů v entitě <i>B. burgdorferi</i> sensu lato		
<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. spielmanii</i>
<i>B. bissetii</i>	<i>B. japonica</i>	<i>B. tanukii</i>
<i>B. californiensis</i>	<i>B. lusitaniae</i>	<i>B. turdi</i>

<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>B. sinica</i>	<i>B. valaisiana</i>
-------------------------------------	------------------	----------------------

### 5.2.3 Epidemiologie

**Lymeská borelióza** byla popsána u lidí, psů, koní, skotu a ovcí. Přenášet tuto infekci jsou schopná pouze klíšťata. Infekci získají obvykle během larválního stádia při sání na drobných myšovitých hlodavcích, ale jako rezervoár mohou sloužit také hmyzožravci, plazi a ptáci. Borélie přetrvávají v dalších vývojových stádiích klíšťat a jsou přenášeny při sání krve. Dospělci klíšťat preferují sání na velkých savcích, jako je spárkatá zvěř, na které se udržuje populace klíšťat. Člověk a domácí zvířata se stávají náhodnými hostiteli. Udržování borélií v přírodním ohnisku je tedy závislé na přítomnosti vhodných rezervoárových hostitelů pro borélie a hostitelů pro udržování populace klíšťat. Ojedínele se může v populaci klíšťat vyskytnout transovariální přenos borélií, ale nemá epidemiologický význam. Nejběžnějším vektorem *B. burgdorferi sensu lato* v Evropě je klíště obecné (*Ixodes ricinus*).

### 5.2.4 Patogeneze

K přenosu *B. burgdorferi sensu lato* dochází, když infikované klíště saje na vnímavém jedinci. Před sáním klíštěte se borélie nacházejí v jeho střevě a při sání krve jsou prokazovány ve slinných žlázách. Při sání krve klíštětem borélie mění expresi svých povrchových proteinů (Osp). Proteinem **OspA** jsou vybaveny pro uchycení ve střevě klíštěte a při sání krve je exprese tohoto proteinu potlačena a je aktivována tvorba proteinu **OspC**, který brání borélii v organismu hostitele před smrtícím účinkem komplementu. V krvi vnímavého hostitele se borélie množí a touto cestou se šíří do organismu. Mohou být prokázány v kloubech, mozku, srdci, nervové i oční tkáni. Zda klinické onemocnění je výsledkem aktivní infekce nebo imunitní reakcí, případně kombinací obou procesů, není zatím zcela přesně objasněno. Perzistentní infekce vede k indukci tvorby cytosinů, které se mohou podílet na tvorbě změn ve tkáních postižených infekcí. Jednotlivé klinické syndromy u člověka (artritidy, kožní a neurologické projevy) mohou být spojeny s různými genotypy *B. burgdorferi sensu lato* (v Evropě hlavně *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*).

Většina infekcí člověka a zvířat bývá subklická a sérologické studie naznačují, že expozice hostitelů v endemických oblastech je častá. Klinické projevy jsou zjišťovány zejména u psů. Zahrnují horečku, apatii, záněty kloubů, změny ve funkci srdce, ledvin a CNS. U koní mohou být navíc diagnostikovány poruchy pohybového aparátu, zánět duhovky, jater a mozku. Ovšem takové případy nebyly zcela exaktně potvrzeny. U skotu a ovcí byly po předchozí boréliové infekci popsány rovněž poruchy pohybového aparátu.

### 5.2.5 Diagnostika

Laboratorní potvrzení přítomnosti borélií přímými metodami může být komplikováno nízkou koncentrací původců ve vzorcích v různých fázích klinické infekce zvířat. Navíc jsou velmi náročné na kultivaci. Ve specializovaných laboratořích se spíše pro experimentální metody borélie kultivují v **Barbour-Stoenner-Kelly mediu** po dobu 6 týdnů za mikroaerofilních podmínek. Ke zjištění borélií ve vzorcích z klinicky nemocných zvířat by mohla být použita i metoda PCR, ale většinou chybějící typické příznaky neumožňují tuto metodu využít. Proto v běžné klinické praxi je pro stanovení diagnózy důležitým předpokladem údaj o přisátí klíštěte při pobytu zvířete v endemické oblasti v období před pozorovanými klinickými projevy onemocnění. Pro potvrzení diagnózy je zásadní zjištění vzrůstajícího titru protilátek ve spojení typickými klinickými příznaky. Časně protilátky třídy IgM se tvoří v nejvyšší míře 3. až 6. týden od přisátí klíštěte, poté jejich hladina v krvi většinou klesá. Pozdní protilátky třídy IgG dosahují nejvyšších hladin v 6. až 10. týdnu od přenosu infekce, poté jejich koncentrace zvolna klesá. Jelikož subklinické infekce jsou v endemických oblastech časté, tak samotné vysoké titry protilátek bez klinických příznaků nemusejí být průkazné. Ke stanovení titru protilátek se běžně užívá metoda ELISA. Pro potvrzení výsledků získaných touto metodou lze využít „Western Immunoblott“.

### 5.2.6 Léčba a kontrola

Akutní infekce reagují na léčbu ampicilinem a oxytetracyklinem. Chronické infekce je třeba léčit prodlouženou a opakovanou léčbou. Preventivní aplikace repelentních přípravků a okamžité odstranění přisátých klíšťat, denní kontrola přítomnosti a odstraňování klíšťat nezabrání v endemických oblastech infekci.

V některých zemích jsou vyráběny vakcíny pro veterinární použití, ale jejich účinnost je diskutabilní.

### 5.2.7 Význam pro veřejné zdraví

Lymeská choroba je významná infekční choroba člověka přenášená klíšťaty. Klinické příznaky zahrnují charakteristickou kožní eflorescenci (*erythema migrans*) v místě přisátí klíštěte. Pokud se pacient neléčí, rozvíjí se záněty kloubů, bolest svalů, poruchy funkce srdce a neurologické příznaky. K přenosu infekce na člověka dochází při volnočasových aktivitách a práci v endemických oblastech a při současné zvýšené aktivitě klíšťat. Psi, kočky a hospodářská zvířata mohou na sobě přenášet infikovaná klíšťata, čímž mohou vystavit člověka riziku infekce.



### 5.2.8 Spirochetóza ptáků

Toto akutně probíhající onemocnění je vyvoláno *Borrelia anserina* a může v tropech a subtropích způsobovat významné ekonomické ztráty. Mohou být postižena hejna kura domácího, krůt, bažantů, kachen a hus. Onemocnění přenášejí klíšťata rodu *Argas*. Původce může jen omezený čas přežít v prostředí a tkáních uhynulých ptáků. Proto jen za určitých okolností může být pro vnímavé ptáky infekční krev, tkáň nebo exkrementy nemocných jedinců.

Borélie mohou být přenášeny mezi vývojovými stádii klíšťat i transovariálně, a to mezi jednotlivými populacemi klíšťat. Vzplanutí spirochetózy ptáků souvisí s aktivitou klíšťat během vlhkých a teplých období roku. Onemocnění se projevuje horečkou, výraznou anémií a ztrátou tělesné hmotnosti. Infekce graduje až do celkové paralýzy. Během rekonvalescence se vytváří imunita, která je specifická pro dané sérotypy, kterých může být v určitých oblastech i několik.

Diagnostika se opírá o mikroskopický průkaz spirochét v roztěrech frakce leukocytů a krevních destiček, která se získá při sedimentaci vzorku krve a následně barví dle Giemsky. Pro mikroskopický průkaz v tkáních je vhodná impregnace stříbrem nebo přímá imunofluorescence. Borélie se izolují z krve nebo homogenizovaných tkání pasáží přes kuřecí embrya nebo mladá kuřata. K charakterizaci izolátů *B. anserina* byly využity i techniky na principu PCR. K léčbě postižených ptáků lze použít antibiotika. Hlavními prostředky tlumení této infekční choroby jsou inaktivované vakcíny a snižování výskytu klíšťat v endemických oblastech.

## 5.3 Rod *Brachyspira*

Příslušníci tohoto rodu díky svému habitatu patří mezi spirochéty střeva savců a ptáků. Rod zahrnuje patogenní i nepatogenní druhy, které jsou zjišťovány v tlustém střevě prasat, drůbeže, volně žijících ptáků, hlodavců a primátů. *Brachyspiry* jsou důležitými původci kolitid a tyflitid prasat a drůbeže.

### 5.3.1 Klinické infekce

*Brachyspiry* vyvolávají ekonomicky závažné infekce prasat. *Brachyspira hyodysenteriae* je původcem **dyzentérie prasat**, *B. pilosicoli* **spirochetózy střeva prasat**, nově popsané dva druhy *B. hampsonii* a *B. suanatina* bývají příčinou onemocnění probíhajícího také pod klinickým obrazem dyzentérie. Prasata se nakazí prostřednictvím kontaminovaných výkalů klinicky nemocných nebo latentně infikovaných jedinců. V takzvané naivních stádech prasat se po zařazení infikovaných prasat do stáda infekce začne postupně šířit z kotce do kotce a klinicky se projeví u všech věkových kategorií prasat. Ve stádech s endemickým výskytem onemocnění je klinický projev posunut v důsledku působení ko-lostrální a laktogenní imunity až do věkové kategorie výkrmových prasat. Zde pak klinické vzplanutí probíhá často ve dvou vlnách, na začátku a na konci výkrmu. Postižená prasata stráci kondici, jsou vyhublá, ve výkalech je velký podíl hlenu s příměsí krve. Přestože mortalita je nízká, tak ztráty na živé hmotnosti v důsledku špatné konverze krmiva vedou k značným ekonomickým ztrátám.

Na šíření infekce na farmě se podílejí myšovití hlodavci a mouchy. Při nedodržování biosekurity na malých farmách k šíření infekce přispívají také psi, kočky i samotní chovatelé, zejména prostřednictvím kontaminované obuvi. Mezi farmami se infekce šíří nákupem prasat z nekontrolovaných chovů, dopravními prostředky apod.. Spirochetóza střeva prasat je jakousi mírnější formou dyzentérie, při které je snížena konverze krmiva a nízké přírůstky na váze tak snižují užitkovost prasat a ekonomiku chovu.

*Brachyspira pilosicoli* se vedle prasat uplatňuje také jako původce tyflitid a kolitid drůbeže, bažantů, psů i člověka. Mezidruhový přenos této brachyspiry však nebyl zatím uspokojivě potvrzen.

Spirochetéza slepých střev drůbeže je provázána vylučováním vlhčího trusu, což je příčinou zvýšeného výskytu zašpinění vaječných skořápek a snížení produkce vajec. Častěji se tyto infekce vyskytují v chovech s přirozeným výběhem (free range). Jako původci těchto infekcí se uplatňují *B. pilosicoli*, *B. intermedia* a *B. alvinipulli*.

### 5.3.2 Patogeneze

Nejvíce informací bylo získáno studiem původce dyzentérie prasat *Brachyspira hyodysenteriae*. **Positivní chemotaxe k mucinu** je považována za hlavní faktor virulence.

S patogenitou koreluje také **hemolytická** a **cytotoxická** aktivita původce. Navíc se při poškození sliznice kolonu uplatňují **protézy**. Při rozvoji dyzentérie prasat mají význam také predisponující dietetické a imunitní faktory. Patogeneze spirochetózy střeva prasat vyvolaná *B. pilosicoli* se liší od patogeneze dyzentérie prasat. V případě dyzentérie prasat původce díky chemotaxi k mucinu proniká ve sliznici kolonu až do Lieberkhünových krypt a pohárkových buněk, které tvoří mucin. Účinkem hemolýzínu a proteáz dojde k porušení integrity sliznice střeva, což se projeví jejím hemoragicko-nekrotickým zánětem. Oproti tomu druh *Brachyspira pilosicoli*, který vyvolává spirochetózu střeva, se svým jedním koncem vnoří do apikálního konce enterocytů bez porušení plazmatické membrány (invaginace). Tato kolonizace vede k edematizaci sliznice střeva a narušení její resorpční funkce.

### 5.3.3 Diagnostika

Dyzentérii prasat lze diagnostikovat na základě anamnézy, typických klinických příznaků a patoanatomického nálezu. K laboratornímu vyšetření se odebírají rektální výtěry, stěry ze změněné sliznice kolonu nebo úsek tlustého střeva postiženého hemoragicko-nekrotickým zánětem, případně se vzorkovnice po okraj naplní výkaly podezřelých prasat. Brachyspiry jsou anaerobní bakterie, proto je třeba vzorky chránit před toxickým účinkem atmosférického kyslíku použitím transportního média. Laboratorní potvrzení diagnózy je založeno na mikroskopickém vyšetření, kultivaci původce a jeho další typizaci, zejména se jedná o stanovení citlivosti vůči antimikrobikům volby. Vzhledem k výskytu nepatogenních druhů brachyspir ve výkalech prasat (*B. innocens*, *B. murdochii*) má mikroskopie nativních i barvených preparátů připravených z výkalů nemocných prasat ve vlastním diagnostickém postupu jen podpůrný význam. Ke kultivaci brachyspir se využívá krevní agar s přídatkem antibiotik, vzorky se inkubují v anaerobní atmosféře při 37 nebo 42°C po dobu minimálně 3 dnů. *Brachyspira hyodysenteriae* i další původci tohoto onemocnění *B. hamptonii*, *B. suanatina* vytvářejí na tomto médiu úplnou hemolýzu, *B. pilosicoli* a ostatní druhy vytvářejí pouze částečnou hemolýzu. Pro orientační rozlišení lze využít i rychlé testy stanovení tvorby indolu a hydrolýzy hipurátu sodného (tabulka č. 7). V současnosti se k rozlišení druhů brachyspir používá hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, druhově specifická PCR a PCR spojená s hodnocením restričních profilů DNA (RFLP).

K odhalování latentních nosičů byly experimentálně ověřovány také sérologické testy na principu ELISA metod nebo imunoblotu.

Diferenciální diagnostika brachyspir spočívá v posouzení hemolýzy na krevním agaru, produkce indolu, hydrolýzy hipurátu sodného (tab. č. 7). Nověji se druhy a kmeny brachyspir rozlišují metodami molekulární biologie, zejména metodou PCR spojenou s analýzou polymorfismu DNA.

Tabulka č. 7. Základní fenotypové vlastnosti brachyspir patogenních pro prase domácí

Druh	Laboratorní testy		
	Hemolýza	Indol	Hydrolyza hipurátu sod- ného
<i>B. hyodysenteriae</i>	úplná	+	-
<i>B. hampsonii</i>	úplná	-	-
<i>B. suanatina</i>	úplná	+	-
<i>B. pilosicoli</i>	částečná	-	+

#### 5.3.4 Léčba a tlumení

Brachyspiry jsou sice citlivé k několika skupinám antimikrobik, ale pro značný rozvoj získané rezistence je třeba citlivost ověřit laboratorním vyšetřením, které je možné provést jen kvantitativní metodou zředování testovaných látek v bujónu nebo agaru. Antibiotiky první volby jsou pleuromutiliny (tiamulin, valnemulin). Léčba se provádí medikací napájecí vody nebo krmiva a musí být provázena zvýšenou úrovní hygieny a úpravou krmné dávky s vyšším podílem vlákniny.

Ozdravení chovu prasat lze provádět různými způsoby. Může se jednat o antibiotickou terapii účinným antidysenterikem ve spojení s částečnou depopulací základního stáda prasnic nebo úplnou depopulací pozitivního stáda a jeho obměnu zdravými prasnicemi z prověřeného chovu. Oba tyto postupy musí být provázeny sanitací, dezinfekcí a deratizací. Experimentálně byly ověřovány i celobuněčné vakcíny, ale jejich účinnost byla nejistá.

## 5.4 Rod *Treponema*

Rod *Treponema* je anaerobní nebo mikroaerofilní, obtížně kultivovatelná a mimořádně tenká spirochéta, zahrnující řadu patogenních druhů. Jedná se o několik původců infekcí člověka, *T. pallidum pallidum* způsobuje syfilis, *T. pallidum pertenue* frambézii (yaws), *T. pallidum endemicum* (endemická syfilis, bejel), *T. carateum* (pinta) a *T. denticola* je asociována s periodontálním onemocněním. *T. paraluisuniculi* způsobuje treponemální onemocnění králíků. Řada druhů treponem byla také prokázána v lézích dermatitis digital skotu a nakažlivého kulhání ovcí (nakažlivá hniloba paznehtů).

*T. pallidum* ssp. *pallidum*, „bledý bacil“, je obligátním patogenem člověka bez významu ve veterinární medicíně. Přesto jistě neuškodí udělat si malou exkurzi do historie této metly lidstva. Snad žádné onemocnění si nevysloužilo takovou plejádu jmen jako právě syfilida. Říkalo se jí lues venerealis, Venušin mor, příjice (podle údajné slovanské bohyně lásky Prije) a získávala různé geografické přívlastky, podle toho, která vojska jí na daném území zrovna roznášela. Tak to byla pro Italy francouzská nemoc a pro Francouze Neapolská nemoc, v Holandsku španělská nemoc, v Rusku polská nemoc, u nás uherská nemoc, neboť vojáci se často nakazili ve válce proti Turkům. A pro Turky to byla samozřejmě křesťanská nemoc. Název syfilis použil poprvé lékař Girolamo Fracastoro; pastýř Syfilis byl potrestán hroznou nemocí pro urážku bohů. Syfilida byla pro svou souvislost s pohlavním stykem vnímána jako trest boží za nehodný, prostopášný život. Její počátky jsou zahaleny tajemstvím. Dlouho se předpokládalo, že byla do teprve dovezena z Ameriky Kříštofem Kolumbem, kde se jeho námořníci nakazili od domorodých žen. Skutečně, krátce po objevení Nového Světa bylo toto onemocnění poprvé zaznamenáno a na přelomu 15. a 16. století prošlo celou Evropu ve formě velké epidemie, což by svědčilo o nové, na evropskou populaci dosud neadaptované infekci. Teorie o zavlečení z Ameriky se však v poslední době zpochybňuje – je možné, že v této době došlo ke genetické změně nějakého endemicky se vyskytujícího kmene *T. pallidum*, čímž vznikla agresivní *T. pallidum* ssp. *pallidum*. Z dobových záznamů víme, že v době renesance probíhala syfilis akutněji a drastičtěji než dnes, byla spojena s velkými bolestmi a fyzickým znetvořením, čímž dobře odpovídala představě božího trestu. Kosila řadové vojáky, generály i generalissimy (například Albrechta z Valdštejna), nevyhýbala se císařům (Rudolf II.) ani papežům (údajně Alexandr VI.). Později nemoc nabyla pravděpodobně formy, jakou známe dnes, zůstávala však extrémně častou až do první poloviny 20. století. Není divu, že první cíleně vyvinutá antimikrobiální látka vůbec byl Salvarsan, v roce 1910 použitý k léčbě syfilidy. Přestože měl mnoho vedlejších účinků (již se nepoužívá), byl to velký pokrok, neboť syfilida se tradičně léčila rtutí, vypalováním míchy nebo umělým nakažením malárií, což častěji zabilo dříve pacienta než bakterie.

### 5.4.1 Klinické onemocnění a patogenita

Přenos **syfilidy** je nejčastěji spojen s pohlavním stykem, ale není omezen jen na něj. Treponemata pronikají sliznicemi, někdy i porušenou kůží. Na vzduchu rychle hynou, ale ve vlhkém prostředí přežívají dost dlouho na to, aby byl možný i nepřímý přenos. Onemocnění typicky probíhá ve třech stádiích. První je charakterizováno vznikem vředovité léze (ulcus durum) v místě průniku infekce a lokálního pomnožení treponemat. Posléze se bakterie šíří do regionálních mízních uzlin a do krve. Druhé stádium je charakterizováno celkovými příznaky, především makulopapulózní vyrážkou po celém těle včetně rukou a nohou. Může být doprovázeno závažnými komplikacemi, například hepatitidou, meningitidou, imunokomplexovou nefritidou, chorioretinitidou nebo periostitidou. V této fázi je nakažený vysoce infekční. Určité procento lidí se po této fázi uzdraví samo od sebe, u většiny však následuje latentní fáze, která může trvat roky, a u některých se vyvíjí rovnou terciární stádium. V této fázi už je

treponemat v organismu málo (mohou se však vyskytovat v centrální nervové soustavě, oku a obecně v „imunologicky privilegovaných“ tkáních) a jedinec je málo infekční. Příznaky možná souvisejí více s patologickou imunitní odpovědí na perzistentní přítomnost treponemat: dochází k rozvoji granulomatózních lézí, tzv. gumat, v kůži, kostech i orgánech (např. játrech), k poškození srdce (aneurysmata, poruchy chlopní) a degenerativním změnám CNS, vedoucí k demenci, mánii nebo progresivní paralýze a tzv. tabes dorsalis. Specifickou formou je tzv. kongenitální syfilis, spojená s aborty nebo typickými vývojovými vadami novorozenců.

Další treponemové infekce člověka, jako je **bejel** (Afrika, Střední východ), **frambezie** (tropické oblasti) a **pinta** (Mexiko, Jižní Amerika), se přenáší nepohlavně, kontaktem především mezi dětmi v chudých oblastech. Jedná se převážně o kožní afekce, systémové komplikace (poškození srdce, CNS, kostí) se vyskytují spíše vzácně.

**Treponematóza králíků** se také přenáší kontaktem mezi zvířaty nebo pohlavně, samice bývá zdrojem pro potomstvo. Onemocnění je typické vznikem vředů a krust na mukokutánních přechodech (čenicích, pohlavní orgány) a poruchami reprodukce (metritidy, mrtvě narozené plody).

*T. denticola* je obligátně anaerobní silně proteolytická spirochéta, která součástí orální mikroflóry a spolu s dalšími anaeroby (např. *P. gingivalis*, viz dále), se podílí na vzniku **periodontálních onemocnění** u člověka. Chronický zánět je považován za rizikový faktor pro vznik aterosklerózy a orálních nebo pankreatických karcinomů.

**Digitální dermatitida skotu** je obvykle polyetiologická infekce a treponemata implikovaná v těchto případech se řadí k několika fylogenetickým liniím, *T. denticola/T. pedis*, *T. phagedenis* a *T. medium/T. vincentii*.

### 5.4.2 Patogeneze

Tak jako u jiných spirochet, k nejdůležitějším faktorům virulence patří **vývrtkovitý pohyb**, umožňující aktivní penetraci sliznic i poškozené kůže s následnou invazí krevního oběhu v případě systémových infekcí. Pohyb je „motivován“ chemotakticky – chemoatraktanty představuje například glukóza nebo sérum. Molekuly flagellinu – H antigeny – jsou navíc schovány pod vnější membránou, čímž brání jejich rozpoznání TLR a dalšími molekulami imunitního systému. Také lipopolysacharid má atypickou strukturu, vyvolává dysregulaci zánětlivé odpovědi s kontinuální produkcí prozánětlivých cytokinů a migrací zánětlivých buněk. To vede k poškození vlastní tkáně, jak je to dobře popsáno v případech onemocnění parodontu.

Treponemata vůbec exprimují velmi málo imunogenních molekul na vnějším povrchu, a když, jsou vysoce proměnlivé a prodělávají **antigenní variaci**. To znamená, že individuální buňka má schopnost změnit své povrchové antigeny. Imunitní systém je proto obtížně rozpoznává a nemůže spustit adekvátní odpověď.

*T. denticola* tvoří **Msp** (major sheath protein) z rodiny treponemových variabilních proteinů, patřící mezi adheziny, umožňující vazbu k subgingivální tkáni, ale k jiným bakteriím, podílejíce se na vzniku mnohohodrového biofilmu. To je klíčový moment v chronických lokálních zánětech (např. onemocnění parodontu); jednotlivé druhy spolu metabolicky kooperují,

podpoří vzájemně svůj růst v relativně konstantních poměrech. Zplodiny metabolismu (např. sirovodík) přispívají k poškození tkáně a působí prozánětlivě. *T. denticola* a příbuzné druhy produkují **proteolytické enzymy**, např. **dentilisin**, degradující proteiny extracelulární matrix a mezibuněčných spojů.

### 5.4.3 Diagnostika

Patogenní treponemata byla dlouhou dobu považována za nekultivovatelná; nedávno se sice podařilo izolovat *T. pallidum* na tkáňové kultuře, ale to nic nemění na tom, že tato metoda je pro běžnou diagnostiku nepoužitelná.

Pro diagnostiku syfilidy a treponematózy králíků můžeme odebírat seškraby raných kožních a slizničních lézí a mikroskopovat jejich suspenzi na temném poli. Užitečné je i histologické vyšetření biopsií impregnovaných stříbrem. Pro malou citlivost je však nutno považovat mikroskopii pouze za pomocnou metodu.

Druhy *Treponema* spp. v zubním plaku nebo zanícené interdigitální tkáni se zjišťují obvykle molekulárními metodami a jedná se spíše o experimentální záležitost.

Definitivní diagnostika syfilidy a treponematózy králíků je opírá o sérologické vyšetření. Jsou dostupné testy založené na principu mikrohemaglutinace nebo nepřímé imunofluorescence. U králíků je údajně hladina protilátek měřitelná teprve tři měsíce po infekci; séro-prevalence značně stoupá s věkem a sérologické vyšetření pomáhá odhalit asymptomatické nosiče.

### 5.4.4 Terapie a prevence

Neexistuje vakcína chránící proti syfilidě. Vzhledem k dostupnosti léčby již dnes není syfilida takovým strašákem jako dříve a není již tak stigmatizována, ale není také úplně vzácná. Osoby v kontaktu s nakaženým by se měly samy nechat vyšetřit a případně se podrobit antibiotické léčbě. Používají se úzkospektrální peniciliny a tetracykliny. Králíkům se podává parentálně penicilin G.

## 6. Gramnegativní anaerobní bakterie

### 6.1 Čeleď Cardiobacteriaceae

#### 6.1.1 Rod *Dichelobacter*

Rod *Dichelobacter* z čeledi Cardiobacteriaceae třídy Gammaproteobacteria zahrnuje jeden významný patogenní druh – *D. nodosus*. Jedná se o gramnegativní tyčinku s typicky zduřelými konci. Nefermentuje sacharidy. Je řazen mezi obligátní anaeroby, je však značně aerotolerantní. Jako obligátní parazit se přirozeně nevykytuje v prostředí ani jako komenzál a je hlavním původcem tzv. nakažlivé hniloby paznehtů ovcí.

##### 6.1.1.1 Patogenita

**Nakažlivá hniloba paznehtů ovcí** je hnisavý až nekrotizující zánět epidermis v mezi-prstí. Zánět může progredovat od mírných povrchových lézí až po nekrózu a „vyzutí“ – separaci rohoviny od měkké tkáně. V iniciaci onemocnění se podílí vlhké a teplé prostředí (nad 10°C) a asociované patogeny – anaeroby *Fusobacterium necrophorum* a *Treponema penortha*. *D. nodosus* je však rozhodujícím patogenem této formy onemocnění. Je zavlečen do stáda s asymptomaticky infikovaným zvířetem.

##### 6.1.1.2 Patogeneze

Macerovaná, narušená epidermis je snadno napadána „univerzálním“ původcem nekrotickým lézí z fekálně kontaminovaného prostředí, *F. necrophorum*. Zanícenou, nekrotizující tkáň poté snadněji kolonizuje *D. nodosus*. Tyto dva patogeny se nejčastěji vyskytují společně (často ještě s dalšími původci), ale experimentálně bylo zjištěno, že to *D. nodosus* „zvládne“ i sám o sobě.

Rozhodujícími faktory virulence jsou **fimbrie typu IV**, umožňující jako adheziny kolonizaci tkáně, ale také „trhavý“ pohyb, jímž se patogen přemísťuje do míst s anaerobní mikroatmosférou. Poškození tkáně vedoucí k vyutí paznehtu nejspíš zapříčiňují **serinové proteázy**.

##### 6.1.1.3 Diagnostika

Přestože je *D. nodosus* značně aerotolerantní, je kultivace náročná. Vzorky (stěry, biopťáty postižené tkáně) je třeba transportovat bez přístupu kyslíku a co nejrychleji zpracovat. Pro kultivaci používáme speciální obohacená média určená pro anaeroby, vždy čerstvě připravená, jež umístíme v anaerobním boxu nebo anaerostatu při 37°C. *D. nodosus* roste poměrně pomalu, malé šedé kolonie bez hemolýzy pozorujeme po 3 – 7 dnech. *D. nodosus* je negativní na



katalázu i oxidázu, produkuje sirovodík, ne však ureázu ani indol. Sacharidy nevyužívá. V odlišení vysoce virulentních kmenů se uplatňuje test na elastázu (degradace elastinu v médiu koreluje s virulencí).

Vzhledem k náročnosti nemusí být kultivační vyšetření spolehlivé. Stále častěji se preferuje použití molekulárních metod. PCR umožňuje i identifikaci sérotypu (A – I, M).

#### **6.1.1.4 Terapie a prevence**

Při výskytu nakažlivé hniloby paznehtů je nezbytná důkladná sanitace stáje a vyhledání a oddělení infikovaných zvířat. V léčbě se obvykle uplatňují lokální antiseptické koupele s odstraněním nekrotické tkáně, ve vážných případech s aplikací systémových antibiotik (penicilin, tetracykliny). V ohrožených stádech lze použít vakcínu proti *D. nodosus*.

## **6.2 Čeleď Fusobacteriaceae**

### **6.2.1 Rod *Fusobacterium***

Název *Fusobacterium* se odvíjí od poněkud vřetenovitého tvaru těchto obligátně anaerobních gramnegativních tyčinek; jsou však značně pleomorfní, často nabývají až vláknitých forem. Patří do kmene Fusobacteria, jednoho z minoritních kmenů přirozené střevní mikrobioty. Vyskytují se i v dutině ústní a v batoru.

*F. necrophorum* je častým původcem nekrotických zánětů měkkých tkání, obecně zvaných nekrobacilóza. Rozeznáváme dva subspecies, lišící se morfologií buněk, růstem i virulencí: virulentnější ssp. *necrophorum* a ssp. *funduliforme*.

Z dalších druhů zmiňme *F. mortiferum*, *F. canifelinum*, *F. russi*, *F. nucleatum*, *F. equinum*, *F. necrogenes*, *F. ulcerans*. Jedná se často o orální mikroflóru, izolovanou z infikovaných ran, někdy také periodontálních zánětů.

#### **6.2.1.1 Patogenita**

**Nekrobacilóza** je infekce traumatizovaných nebo jinak narušených tkání, charakterizovaná vznikem abscesů a nekrotických lézí. Zdrojem infekce je orální mikroflóra nebo fekálně kontaminované prostředí. Často se jedná o endogenní infekce. Fusobacteria snadno infikují hluboké rány po kousnutí. U člověka je významným (ač méně častým ve srovnání se streptokoky skupiny A) původcem paratonzilárních abscesů, které mohou někdy progredovat v septickou tromboflebitidu (tzv. Lemierreův syndrom). Uplatňuje se při vzniku mastitidy, metritidy a pyomyeomy a dalších hnisavých infekcí vnitřních orgánů.

Ke specifickým stavům asociovaným s *F. necrophorum* patří **interdigitální nekrobacilóza** a **interdigitální abscesy** u skotu a jiných sudokopytníků (často v ko-infekci s jinými

patogeny, jako je *Trueperella pyogenes*, *Porphyromonas levii* a *Prevotella melaninogenica*). Účastní se také vzniku **nakažlivé hniloby paznehtů** ovcí (s *D. nodosus* a spirochétami). Tyto záněty jsou nejčastější příčinou kulhání u skotu a představují závažný problém z hlediska produkce i welfare.

Tzv. **difterie telat** je nekrotická stomatitida nebo laryngitida, endogenní infekce sliznice, jež vzniká v souvislosti s nehygienickými podmínkami a nevhodnou výživou, častěji v zimních měsících, a manifestuje se nejprve horečkou a hnilobným zápachem z tlamy.

*F. necrophorum* je spolu s *T. pyogenes* nejvýznamnějším patogenem spojeným se vznikem **rumenitidy** a **jaterních abscesů** u vysokoprodukčního skotu. Toto onemocnění souvisí s nevhodnou dietou s převahou jadrného krmiva, vedoucí ke vzniku bachorové acidózy. Pokles pH způsobený metabolizací sacharidů podporuje růst laktobacilů produkujících laktát, který je využíván *F. necrophorum*. Kyselé pH dráždí sliznici bachorové stěny. V jiném případě může být stěna narušena průnikem cizího tělesa. Vzniká rumenitida, při níž se uplatňuje endogenní mikroflóra včetně oportunních plísní, jako je *Absidia*, *Mucor* aj. Z abscesů se uvolňují hnisavé emboly, zanášené portálním oběhem do jater. Výsledkem jsou hnisavá ložiska v játrech.

### 6.2.1.2 Patogeneze

K významným faktorům virulence *F. necrophorum* patří **lipopolysacharid**, **hemaglutinin** s funkcí adhezinu a další, rozhodujícím faktorem virulence je však **leukotoxin**. Tento proteinový toxin ne zcela známým mechanismem poškozují fagocytující leukocyty, hepatocyty a nejspíš i další buňky přežvýkavců. Poddruh *necrophorum* produkuje podstatně více leukotoxinu než ssp. *funduliforme*.

*F. necrophorum* často působí synergicky s jinými patogeny. Taková „spolupráce“ bývá oboustranně výhodná: například fakultativní anaerob *T. pyogenes* spotřebovává kyslík a tvoří tak anaerobní prostředí vhodné pro *F. necrophorum*, to zase produkuje leukotoxin chránící oba druhy před imunitním systémem. Synergicky rostoucí patogeny si také často poskytují nutriční podporu, jeden druh produkuje substrát metabolizovaný jiným druhem atd.

### 6.2.1.3 Diagnostika

Přestože *F. necrophorum* je relativně aerotolerantní, odebírané vzorky, jako je hnis z abscesů, stěry a bioptáty, je vhodné chránit před přístupem kyslíku a zpracovat co nejrychleji. Kultivujeme na čerstvě připravených obohacených médiích určených pro anaeroby. Po 48 hodinách anaerobní kultivace pozorujeme šedavé (ssp. *necrophorum*) či nažloutlé kolonie (ssp. *funduliforme*), někdy s hemolýzou. Mikroskopicky má ssp. *necrophorum* tendenci vytvářet dlouhá, nepravidelně zbarvená vlákna, buňky ssp. *funduliforme* jsou kratší a pravidelnější.

*F. necrophorum* je nepohyblivé, negativní na oxidázu i katalázu, produkuje indol a sirovodík, neredukuje nitráty, většinu sacharidů nefermentuje.

#### 6.2.1.4 Terapie a prevence

K léčbě nekrobacilózy se používají peniciliny, tetracykliny, makrolidy a linkosamidy. Je třeba mít na paměti, že aminoglykosidy jsou v případě anaerobních infekcí obvykle neúčinné.

### 6.3 Čeleď Bacteroidaceae

#### 6.3.1 Rod *Bacteroides*

Gramnegativní kmen Bacteroidetes je jedním z majoritních kmenů střevní mikroflóry (druhým jsou grampozitivní Firmicutes). Zahrnuje čeledi Bacteroidaceae, Rikenellaceae, Prevotellaceae a Porphyromonadaceae. Některé degradují složité rostlinné polysacharidy, jako jsou pektiny, škroby a celulóza, jiné jsou asacharolytické a metabolizují dusíkaté látky.

Hojní zástupci rodu *Bacteroides* jsou nepohyblivé obligátně anaerobní tyčinky, tvořící komenzální mikroflóru, často s druhovou adaptací na určité hostitele. Utilizují jednoduché sacharidy a uplatňují se v dekonjugaci žlučových kyselin. Většina z nich nemá klinický význam. Výjimkou je tzv. skupina *B. fragilis*, zahrnující m.j. *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgatis*, *B. caccae* a samozřejmě *B. fragilis*, které se uplatňují jako oportunní patogeny.

##### 6.3.1.1 Patogenita

*B. fragilis* způsobuje posttraumatické nebo pooperační hnisavé infekce měkkých tkání, často peritonitidy a intraabdominální abscesy, a bakterémie progredující v anaerobní septikémii, endokarditidy, meningitidy, osteomyelitidy a artritidy.

Tzv. enterotoxigenní *B. fragilis* (ETBF) je asociován s průjmy u dětí a mláďat hospodářských zvířat. Byl izolován i od zdravých jedinců.

##### 6.3.1.2 Patogeneze

K faktorům virulence produkovaným *B. fragilis* patří **kapsula**, poskytující ochranu před imunitním systémem, **fimbrie**, uplatňující se v kolonizaci, a **LPS**. Produkuje řadu **enzymů** poškozujících hostitelské tkáně – proteázy, neuraminidázu, hyaluronidázu, kolagenázu aj. Kataláza a superoxidodismutáza chrání bakterie před oxidativním vzplanutím a jsou příčinou aerotolerance.

ETBF se vyznačují produkcí enterotoxinu, tzv. **fragilyzinu**. Jedná se o Zn-metaloproteinázu, která dosud nepopsaným mechanismem indukuje změny v buněčné signalizaci a zánetlivé procesy ve střevě.

### 6.3.1.3 Diagnostika

*B. fragilis* lze izolovat z krve a postižených orgánů. Ke kultivaci se používají obohacené krevní agary určené pro anaeroby (jako antibiotický suplement se uplatňuje kanamycin, vankomycin nebo kolistin) a tzv. BBE (Bacteroides bile esculin), na němž detekujeme hydrolyzu eskulinu, projevující se hnědnutím média. Na krevním agaru tvoří šedavé kolonie bez hemolýzy.

*B. fragilis* je pozitivní na katalázu, oxidáza je variabilní. Komerční biochemické testy určené pro anaerobní bakterie lze užít k druhové identifikaci. Produkci enterotoxinu lze detekovat PCR.

### 6.3.1.4 Terapie

*B. fragilis* produkuje pravidelně betalaktamázy, takže betalaktamová antibiotika bez potenciace inhibitory betalaktamáz bývají neúčinná. Vzrůstá také rezistence ke klindamycinu. K terapii lze použít metronidazol, u lidí karbapenemy.

## 6.4 Čeleď Prevotellaceae

### 6.4.1 Rod *Prevotella*

Gramnegativní anaerobní tyčinky rodu *Prevotella* z čeledi Prevotellaceae, kmene Bacteroidetes, tvoří běžnou orální, střevní a vaginální mikroflóru. Degradují složité sacharidy. Byla prokázána souvislost mezi zvýšeným zastoupením *Prevotella* spp. ve střevě na úkor *Bacteroides* spp. a převážně vegetariánskou dietou bohatou na sacharidy (naopak západní tučná dieta se zdá podporovat převahu *Bacteroides* spp.).

Z klinického hlediska se zástupci rodu *Prevotella* uplatňují jako oportunní patogeny v anaerobních infekcích měkkých tkání (plicní abscesy, infekce po kousnutí, bakterémie a abscesy vnitřních orgánů, osteomyelitidy. *P. intermedia* a *P. nigrescens* patří mezi původce gingivitid a periodontálních abscesů. *P. melaninogenica* se spolu s *Porphyromonas levii*, *F. necrophorum* a *T. pyogenes* podílí na vzniku interdigitálních abscesů sudokopytníků.

*Prevotella melaninogenica* a jiné druhy po delší době anaerobní kultivace produkují černý pigment hematin. Někdy jsou hemolytické.

## 6.5 Čeleď Porphyromonadaceae

### 6.5.1 Rod *Porphyromonas*

Také *Porphyromonas* spp. z čeledi Porphyromonadaceae, kmene Bacteroidetes, patří k významným zástupcům ústní mikroflóry. Porphyromonády jsou asacharolytické gramnegativní anaerobní tyčinky. Jsou nepohyblivé a železo získávají vazbou heminu, což je příčinou černé pigmentace kolonií.

*P. levii* se podílí na vzniku interdigitální dermatitidy skotu. Nejprostudovanějším zástupcem je však *P. gingivalis*, jeden z hlavních periodontálních patogenů člověka i zvířat.

#### 6.5.1.1 Patogenita a patogeneze

Patogeneze periodontálních onemocnění je velmi komplexní, mnoho faktorů ovlivňuje rovnováhu mezi obrannými mechanismy hostitele a rezidentní mikroflórou subgingiválního plaku. Anaerobní bakterie, jako *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* a *Tannerella forsythia* zde tvoří smíšený biofilm a vzájemně se ovlivňují. Jakékoli narušení „místních poměrů“, např. pomnožení jednoho druhu na úkor jiného, indukuje zánětlivou odpověď vedoucí k dalšímu poškození tkáně a prohloubení problému.

*P. gingivalis* adhezuje k různým povrchům dutiny ústní. Bakterie, jako orální streptokoky, fusobakterie, aktinomyceity a výše zmíněné anaeroby, zde tvoří smíšenou komunitu, adhezuje k epitelovým buňkám, ke složkám slin i k sobě navzájem. Uvnitř komunit probíhá čilá mezidruhová signalizace, bakterie spolupracují na metabolické úrovni a vzájemně se podpoří v kolonizaci. *P. gingivalis* tvoří několik druhů fimbrií a hemaglutinin, které sehrávají roli kolonizačních faktorů a jsou důležité pro překonání primární bariéry junkčního epitelu a k průniku do subgingiválních prostor. *P. gingivalis* je považována za invazivní organismus, schopný internalizace do buněk. Byl identifikován sekreční systém III. typu, indukující cytoskeletovou přestavbu gingiválních epitelů.

*P. gingivalis* využívá peptidy jako hlavní živiny. Neprodukuje klasické siderofory, ale získává železo z heminu, který váže na svůj povrch z různých vazebných proteinů (hemoglobin, hemopexin, haptoglobin, transferrin aj.). Proto také proteázy – enzymy degradující proteiny – hrají v patogenezi zásadní roli. Proteázy *P. gingivalis*, tzv. **gingipainy**, umožňují nejen získávání živin, ale také invazi hlubší tkáně. Štěpení proteinů extracelulární matrix – fibronektinu, lamininu, kolagenu aj. – vede k expozici nových vazebných míst. Počáteční gingivitida tak progreduje v rozvinutou periodontitidu. Proteázy navíc štěpí imunoglobuliny a prozánětlivé cytokiny. Další ochranu před imunitním systémem poskytuje kapsula.

Bylo zjištěno, že LPS a další produkty *P. gingivalis* stimulují resorpci kostní tkáně, což se projevuje v pokročilých stádiích periodontálního onemocnění. Zánět se může šířit z ústní dutiny systémově se vznikem sekundárních ložisek ve vnitřních orgánech. Také může být zdrojem infekcí ran po kousnutí.

### **6.5.1.2 Diagnostika**

Pro diagnostiku periodontálního onemocnění má význam stomatologické vyšetření. *P. gingivalis* lze kultivovat za anaerobních podmínek, je to však standardní součást orální mikrobiologie.

### **6.5.1.3 Terapie**

Bez správného stomatologického ošetření je antibiotická terapie periodontálních onemocnění zcela neúčinná. Podpůrně se používá amoxicilin-klavulanát, metronidazol, klindamycin a další látky.

Doporučená četba:

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Dec;62(4):1244-63.

## 7. Mollicutes

### 7.1 Čeleď Mycoplasmataceae

Bakterie čeledi Mycoplasmataceae, obecně nazývané mykoplazmata, patří do třídy Mollicutes a kmene Tenericutes. Název třídy pochází z latinského slova „mollis“, měkký, a „cutis“, kůže – mykoplazmatům chybí zcela buněčná stěna a mají jedinou cytoplazmatickou membránu, která na rozdíl od většiny jiných bakterií obsahuje cholesterol, poskytující odolnost vůči osmotickému tlaku. Díky této „měkké kůži“ nemají mykoplazmata pevný tvar a jsou rezistentní k betalaktamům a jiným antimikrobikům narušujícím tvorbu buněčné stěny. Schopnost měnit tvar a malá velikost (asi 0,3 – 0,8  $\mu\text{m}$  v kulovité formě) umožňuje procházet bakteriologickými filtry (0,2 – 0,45  $\mu\text{m}$ ). Jsou to vůbec nejmenší a nejjednodušší organismy schopné samostatné replikace, nikoli však proto, že by byly fylogeneticky primitivnější než jiné bakterie; poskytují příklad tzv. degenerativní evoluce, vlastně ztráty funkčních genů až na nezbytné „minimum“ nutné k přežití. Přestože se díky absenci peptidoglykanu barví slabě gramnegativně, jsou geneticky bližší kmenům grampozitivních bakterií a předpokládá se, že se vyvinuly z bakterií příbuzných streptokokům a laktobacilům z kmene Firmicutes.

Mykoplazmata mají velmi malý genom (*M. genitalium* jen kolem 580 kbp); reduktivní evolucí ztratila řadu biochemických drah a schopnost syntetizovat důležité živiny, aminokyseliny, mastné kyseliny a steroly. To je činí závislými na buňkách obratlovců, členovců i rostlin, s nimiž žijí v úzké asociaci jako saprofyty nebo parazité. Nejsou také schopna oxidativní fosforylace (chybí potřebné cytochromy), energii získávají štěpením různých substrátů (glukóza, arginin, glycerol, močovina v případě *Ureaplasma* spp.).

Mykoplazmata neprodukují bičíky, pohybují se zvláštním „klouzavým pohybem“ s využitím tzv. cytoadherentní organely na pólu buňky a cytoskeletonových proteinů – FtsZ (podobný tubulinu eukaryot) a MreB (podobný aktinu). Dynamická přestavba cytoskeletu umožňuje pohyb a změnu tvaru.

#### 7.1.1 Výskyt

Mykoplazmata jsou ubikvitárními obyvateli sliznic trávicího a urogenitálního traktu, horních cest dýchacích, oka, mléčné žlázy i synoviální membrány kloubů. Přestože byla v některých případech detekována i uvnitř buněk, považují se za extracelulární bakterie – těsně adherují na hostitelské buňky a odebírají jim živiny. Zároveň je poškozují toxickými produkty, jako je peroxid vodíku (produkt nekompletního metabolismu glycerolu). Ve vnějším prostředí jsou poměrně citlivá a ničí je vysoká teplota, vyschnutí a dezinfekční prostředky, zejména na bázi detergentů.

Zástupci třídy Mollicutes jsou většinou poměrně hostitelsky specifické, ať už se jedná o rostliny, bezobratlé či obratlovce. Kromě řádu Mycoplasmatales s čeledí Mycoplasmataceae sem patří další řády s rody převážně bez klinického významu. *Acholeplasma* spp. nepotřebuje k růstu cholesterol v živném médiu. Bývá někdy izolováno z klinických vzorků, převážně se však asi jedná o kontaminantu; některé druhy často kontaminují buněčné kultury v laboratořích. *Anaeroplasma* spp. tvoří součást bacherové mikroflóry a vyžaduje, jak název napovídá, striktně anaerobní atmosféru. Rod *Spiroplasma* z řádu Entomoplasmatales žije symbioticky ve střevě hmyzu, ale také je parazitem rostlin, asociovaným s chorobami citrusů a kukuřice. Nabývá spirálovitého tvaru a pohybuje se šroubovitým pohybem. Velmi zajímavý druh *Haloplasma*

*contractile* (řád Haloplasmatales) byl izolován z hloubky Rudého moře. Vysílá dlouhý kontraktilní výrůstek, několikrát delší než vlastní kulovité „tělo“, který se šroubovitě kontrahuje, čímž dochází k posunu buňky.

Jen pro zajímavost se můžeme zmínit o druhu *Mycoplasma laboratorium*. Někteří vědci se podjali úkolu hodného kapacit druhu dr. Fausta, dr. Frankensteina či magistra Kelleyho – stvoření umělé bytosti. Podstatou však nemá být hvězdné fluidum ani sešité mrtvolky, nýbrž zcela syntetická DNA. Zároveň se jedná o pokus identifikovat skutečný „minimální genom“ potřebný k životu.

### 7.1.2 Patogenita

Čeď *Mycoplasmataceae* zahrnuje dva klinicky významné rody, *Mycoplasma* a ureázopozitivní *Ureaplasma*, s velkým množstvím víceméně hostitelsky specifických druhů. Mnohé z nich jsou považovány za saprofyty sliznic, bez spojitosti s jakýmkoli onemocněním, jiné však patří mezi oportunní i primární patogeny savců, ptáků i plazů.

Z patologického hlediska můžeme mykoplazmata zhruba rozdělit do tří skupin. První jsou tzv. **hemotrofická mykoplazmata**, žijící v asociaci s erytrocyty různých druhů a vyvolávající infekční anémie.

Druhou skupinu bychom mohli nazvat **invazivní mykoplazmata**. Jimi vyvolávaná onemocnění jsou spojena s průnikem mykoplazmat do cirkulace a jejich systémovým šířením; napadají zejména klouby a výstelky tělních dutin a vyvolávají obecně **polyserositidy** a **polyarthritidy** (s různým vyjádřením postižení dalších orgánů, např. plic, mléčné žlázy apod.). K invazivním mykoplazmatům patří u prasat *M. hyosynoviae* a *M. hyorhinae*, u skotu *M. mycoides* ssp. *mycoides*, u malých přežvýkavců *M. mycoides* ssp. *capri*, *M. agalactiae* aj., u drůbeže *M. synoviae* a *M. meleagridis*.

Konečně třetí skupinu tvoří mykoplazmata převážně asociovaná s **lokálním postižením sliznic** respiratorního a urogenitálního traktu, oka nebo mléčné žlázy. Často způsobují chronické záněty a zhoršují průběh jiných onemocnění; mohou se podílet na chorobách vyvolaných jinými bakteriemi nebo viry. Například *M. gallisepticum* spolu s *E. coli* vyvolávají tzv. chronickou respiratorní chorobu kura domácího. K dalším příkladům patří *M. hyopneumoniae* prasat, *M. bovis* skotu, *M. felis* koček nebo *M. pulmonis* hlodavců.

#### 7.1.2.1 Hemoplazmata

Tzv. hemotrofická mykoplazmata, dříve klasifikovaná jako rod *Haemobartonella* nebo *Eperythrozoon*, jsou parazité červených krvinek, k nimž těsně adherují – jsou všeobecně považována za tzv. epitelulární parazity. Na druhou stranu se má za to, že za jistých okolností invadují buňky a nacházejí se intracelulárně. Imunitní reakce a zvýšená fagocytóza napadených erytrocytů vede k hemolytické anémii a ikteru. K příznakům patří deprese, bledost a mírný ikterus, nikoli však hemoglobinurie – nedochází k intravaskulární hemolýze, poškozené erytrocyty jsou odstraňovány ve slezině. Infekční anémie se přenáší krví, uplatnit se může krev sající hmyz (např. vši), ale i krvavé střety mezi zvířaty. Přítomnost hemoplazmat byla prokázána ve slinách a nové studie naznačují také možnost vertikálního přenosu. Zdrojem infekce jsou perzistentně infikovaní nosiči. Onemocnění se projevuje převážně u mláďat a imunosuprimovaných jedinců.



Hemoplazmata byla identifikována u prasat (*M. suis*), koček (*M. haemofelis*), psů (*M. haemocanis*), ovcí (*M. ovis*), skotu (*M. wenyonii*), myši (*M. haemomuris*) a lam (*M. haemolamae*). U zdravých dospělých zvířat jsou časté asymptomatické infekce, ačkoli *M. haemofelis* může způsobit akutní hemolytickou anémii v jakémkoli věku. Infekční anémie koček bývá exacerbována koinfekcí s imunosupresivními retroviry (FIV/FeLV). U prasat trpí infekční anémií převážně malá selata, která častou hynou v důsledku hypoglykémie, neboť mykoplazmata rychle spotřebovávají glukózu z krve. Častá je koinfekce s PRRSV.

Hemoplazmata obecně se nedaří kultivovat. V diagnostice se uplatňuje PCR a sérologické testy, mykoplazmata adherující k erytrocytům je možné přímo vizualizovat v krevním nátěru (Giemsa, Diff-Quick). K léčbě se doporučují tetracyklinová antibiotika a fluorochinolony, u prasat spíše pleuromutiliny. Zřejmě i po antibiotické léčbě může přetrvávat perzistentní infekce.

#### 7.1.2.2 Mykoplazmata člověka

Asi 15 druhů mykoplazmat je specificky asociováno se sliznicemi dýchacího, trávicího a urogenitálního traktu člověka, u většiny však nebyla prokázána žádná souvislost s onemocněním. Výjimku tvoří především *M. pneumoniae*, jedna z hlavních příčin atypické pneumonie, a *M. genitalium*, spojená se sexuálně přenosnými záněty pohlavního aparátu (velmi podobné STD způsobovaným chlamydiemi). Méně často se uplatňují např. *M. hominis* nebo *M. penetrans*. Primární atypická pneumonie mívá často protražovaný průběh a chronická infekce může souviset se vznikem autoimunitních chorob (revmatoidní artritida, nemoc chladových aglutininů) a různými kardiovaskulárními, nervovými nebo kožními komplikacemi.

#### 7.1.2.3 Mykoplazmata skotu

Nejzávažnějším mykoplazmovým onemocněním je **nakažlivá pleuropneumonie skotu** neboli **plicní nákaza**, způsobovaná primárně patogenním *M. mycoides* ssp. *mycoides* SC (small colony variant). V současnosti se vyskytuje hlavně v Africe, kde zodpovídá za významné ztráty v chovech dobytka. Onemocnění se přenáší kapénkami a akutně je spojeno s vysokou mortalitou, horečkou a projevy závažné pleuropneumonie (bolestivost hrudníku, rozkročený postoj). Typickým nálezem je slámově žlutý výpotek s vločkami fibrinu v pleurální dutině a mramorování plic. Mohou však také vznikat chronické plicní léze. Chronicky nakažení jedinci se stávají zdrojem infekce.

V našich podmínkách se často setkáváme s neinvazivními mykoplazmaty, která mohou být izolována i ze zdravých jedinců. Nejčastějším, nejzávažnějším a zároveň největším generalistou je *M. bovis*. Spolu s dalšími bakteriálními a virovými patogeny se podílí na respiračním komplexu telat, podobně jako *M. dispar*. Způsobuje také závažné, těžko léčitelné mastitidy; po průniku do cirkulace může vzniknout artritida. *M. bovis genitalium* a *Ureaplasma diversum* jsou asociovány se záněty urogenitálního traktu (vulvovaginitidy, endometritidy, infertilita). *M. bovoculi* způsobuje konjunktivitidy.

#### 7.1.2.4 Mykoplazmata malých přežvýkavců

Podobně jako u skotu se v podobných oblastech vyskytuje také **nakažlivá pleuropneumonie koz**. Kauzálním agens je *M. capricolum* ssp. *capripneumoniae*, avšak závažnou

(pleuro)pneumonii může způsobit také *M. mycoides* ssp. *capri*, *M. mycoides* ssp. *mycoides* LC (large colony variant) nebo *M. capricolum* ssp. *capricolum*. Tyto patogeny vyvolávají generalizovanou infekci spojenou se septikémií, postižením kloubů a mastitidou. K dalším invazivním mykoplazmatům, postihujícím ovce i kozy, patří *M. agalactiae*, způsobující tzv. **nakažlivou agalaktii**. Tato nákaza je častěji chronická a projevuje se postižením kloubů, očí a mléčné žlázy, vedoucí k atrofii a někdy až úplné agalaktii. Mastitidu způsobuje u malých přežvýkavců také *M. putrefaciens*. *M. conjunctivae* je původcem keratokonjunktivitid.

#### 7.1.2.5 Mykoplazmata prasat

*M. hyopneumoniae* je původcem tzv. **enzootické pneumonie prasat**. Toto onemocnění se často vyskytuje v chovech enzooticky, má protražovaný průběh a u výkrmových prasat má podíl na zhoršení produkce. Samo o sobě je obvykle mírné, ale v kombinaci s dalšími faktory (stres, nevhodné zoohygienické podmínky, virové a bakteriální infekce) může vzniknout závažná pneumonie s typickým postižením apikálních plicních laloků. V přenosu se uplatňuje kapénková infekce, prasnice mohou být zdrojem pro novorozená selata.

*M. hyorhinis* způsobuje onemocnění velice podobné Gläserově chorobě (*Haemophilus parasuis*), systémovou infekci selat v odstavovém a předvýkrmovém věku s postižením kloubů a seróz (polyarthritida, fibrinózní peritonitida, pleuritida a perikarditida). *M. hyosynoviae* nacházíme u poněkud starších prasat (3. až 6. měsíc věku), u nichž postihuje klouby. Obě onemocnění jsou exacerbována stresem a dalšími predispozičními faktory; mykoplazmata vyskytující se na sliznici horních cest dýchacích pronikají do cirkulace, odkud se dostávají do predilekčních orgánů.

#### 7.1.2.6 Mykoplazmata drůbeže

Nejvýznamnějším mykoplazmatem drůbeže je *M. gallisepticum*, způsobující tzv. **chronickou respirační chorobu kura domácího**, respektive **infekční sinusitidu krůt**. Mykoplasma samo způsobuje většinou mírný zánět v průběhu respiračního traktu – sinusitidu, tracheitidu a aerosakulitidu. Velice často je infekce spojena s konkurentní infekcí *E. coli*, která je příčinou závažnějšího postižení vzdušných vaků a plic a nezřídka ústí v septikemické onemocnění a polyserositidu s fibrinózními nálepy. Opět zde výraznou roli hrají zoohygienické a další predispoziční faktory.

Také *M. synoviae*, *M. meleagridis* a *M. iowae* mohou u kura a hlavně u krůt způsobovat mírné infekce horních cest dýchacích a vzdušných vaků, ale pronikají také systémově a více než *M. gallisepticum* jsou spojeny s postižením kloubů a šlachových pochev (arthritidy, tenosynovitidy, růstové deformity).

V šíření mykoplazmových infekcí u drůbeže hraje zásadní roli vertikální přenos přímo přes vaječníky a někdy dochází k poklesu snášky a zvýšení embryonální mortality.

#### 7.1.2.7 Mykoplazmata psů a koček

U psů se *M. cynos* podílí na tzv. komplexu psincového kašle, zatímco *M. canis* způsobuje urogenitální infekce. *M. felis* je častým původcem konjunktivitid a zánětů horních cest dýchacích u koček. Spolu s chlamydiemi, herpesviry a kaliciviry tvoří tzv. respirační komplex koček.

### 7.1.2.8 Mykoplazmata plazů a drobných savců

*M. alligatoris* a *M. crocodyli* jsou invazivní mykoplazmata izolovaná z krokodýlovitých s polyserositidou, polyarthritidou a pneumonií. *M. agassizii* a *M. testitudineum* jsou významnými agens zánětů horních cest dýchacích u želv (tzv. URTD). *M. iguanae* bylo izolováno z abscesu leguána.

*M. pulmonis* postihuje dýchací cesty včetně plic a středního ucha laboratorních a domácích hlodavců, především starších potkanů. Onemocnění – podobně jako v případě enzootické pneumonie prasat – má spíše chronický průběh a predisponuje k infekci dalšími respiračními patogeny. *M. arthritidis* způsobuje polyarthritidy. *M. neurolyticum* bylo izolováno z mozku myši v souvislosti s experimentálně vyvolanými neurologickými poruchami, ale jeho přítomnost na sliznici horních cest dýchacích nebývá spojena s žádným klinickým postižením.

### 7.1.3 Patogeneze

Podstatou onemocnění způsobených mykoplazmaty je obvykle perzistentní kolonizace slizničních, za určitých okolností také serózních, kloubních a jiných povrchů. Mykoplazmata pevně adherují k hostitelským buňkám, odebírají jim živiny (např. arginin), mechanicky a chemicky je poškozují, vyvolávají chronické dráždění a zánět. Kontakt je tak těsný, že aspoň u některých druhů může dojít dokonce k fúzi membrán, jak bylo pozorováno elektronovým mikroskopem např. u *M. fermentans*. Mykoplazmata zapojují různé mechanismy, aby se vyhnula imunitnímu systému, včetně antigenní a fázové variace, tvorby biofilmu a intracelulární penetrace. Všechny tyto vlastnosti jsou geneticky kódovány, proto genom patogenních mykoplazmat obsahuje mnohem víc genů, než je nezbytné „minimum“.

Kolonizace sliznic je základním krokem patogenese. Mykoplazmata tvoří jedinečný typ specializovaného adhezinu, tzv. **cytadherentní organelu**. Jedná se o komplexní proteinovou strukturu umístěnou na pólu buňky. Na špičce se nachází hlavní adhezín P1, vázající se k proteinům extracelulární matrix, sialovým zbytkům a různým glykoproteinům buněčných membrán, který je podpořen řadou přídatných proteinů, tvořících elektrodenzní jádro, prstenec a vlákna zasahující do středu buňky. Tato organela je zároveň zapojena i v klouzavém pohybu, přestože se v něm uplatňují i další povrchové adheziny. Klouzavý pohyb umožňuje průnik hlenovou vrstvou sliznic.

Jako adheziny slouží i další **povrchové lipoproteiny**, např. variantní hemaglutinin **VlhA** *M. gallisepticum*, **Vlp** *M. hyorhinitis*, **Vsp** *M. bovis*, **Vmm** *M. mycoides* aj. Jsou to imunodominantní antigeny, prodělávající častou antigenní nebo fázovou variaci; změna umožňuje jednak adhezi k různým strukturám během jednotlivých fází infekce, jednak je to hlavní cesta úniku před imunitním systémem. Tak například VlhA je kódován více než 40 různými geny v několika shlucích, přičemž transkribován je vždy jen jeden; navíc dochází k rekombinacím s velkým množstvím částečných kopií těchto genů za vzniku nových variant. Výsledná variabilita hemaglutininu je proto obrovská.

U různých druhů mykoplazmat byla prokázána schopnost invadovat epiteliální buňky a erythrocyty. To může hrát roli jak v systémové diseminaci, tak při vzniku chronické, perzistentní infekce.

Přítomnost mykoplazmat je často spojena s poškozením buněk a indukcí zánětlivé odpovědi. Mykoplazmata na jednu stranu stimulují imunitní systém, sekreci prozánětlivých

cytokinů, aktivují komplement a nespecifickou polyklonální proliferaci lymfocytů, při níž se uplatňuje produkce tzv. **superantigenů** (např. MAM *M. arthritidis*) a dalších mitogenů. Mykoplazmové infekce bývají zejména v chronické fázi spojeny s intenzivní lymfocytární infiltrací postižené tkáně. Díky antigenní variaci dochází k perzistentní stimulaci imunitního systému. Vlastní imunitní odpověď nejspíš značně přispívá ke vzniku onemocnění; poškozené buňky uvolňují živiny pro mykoplazmata, která se zatím chrání různými mechanismy. Na druhou stranu mykoplazmata mohou modulovat cytokinovou odpověď s výsledným imunosupresivním efektem a někdy vykazují antifagocytární aktivitu. Přítomnost „nepatogenních“ mykoplazmat výraznou imunitní odpověď nevyvolává. Interakce mykoplazmat s imunitním systémem je, krátce řečeno, velice složitá a zahrnuje celou síť aktivačních a inhibičních vlivů s cílem zajistit úspěšnou kolonizaci dané tkáně, přičemž strategie se liší druh od druhu.

Kromě indukce zánětu mykoplazmata přispívají k poškození buněk vlastními mechanismy. Produkce **toxických metabolitů** jako peroxidu vodíku už byla zmíněna, dále dochází k enzymatickému narušení membrán vázanými fosfolipázami. Navíc byla u některých mykoplazmat prokázána produkce **exotoxinů**: nejlépe je definován tzv. CARDS (community acquired respiratory distress syndrome) toxin *M. pneumoniae*, ADP-ribosylující toxin poněkud připomínající pertusový toxin. Zdá se také, že intenzivní tkáňová nekróza a akutní zánětlivá odpověď (infltrace neutrofilů, fibrinopurulentní exsudát) při plicní nákaze skotu by mohla souviset s produkcí toxinu.

Mykoplazmata vážně narušují samočistící schopnost a obranyschopnost dýchacího traktu **navozením ciliostáze**, čímž predisponují k sekundárním bakteriálním infekcím. Tato vlastnost je výrazná zejména u druhů asociovaných s pneumoniemi, jako *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. gallisepticum* aj.

#### 7.1.4 Diagnostika

Vzorky k průkazu mykoplazmat je nutno odebírat do transportních médií. Podle typu infekce odebíráme stěry sliznic, laváže, kloubní punktáty, stěry a kusy vnitřních orgánů, mléko nebo krev.

Přímá vizualizace polychromatickým barvením je prakticky použitelná u krevních mykoplazmat; v jiných případech jsou malá pleomorfní mykoplazmata obtížně pozorovatelná.

Mykoplazmata je možno kultivovat na bezbuněčných médiích, ale je to náročný proces; je nutno jim poskytnout speciální, velice bohatá média s obsahem sterolů, glukózy a argininu. Přidává se do nich sérum, kvasničný extrakt, Tween 80 a antibiotický suplement (peniciliny, bacitracin, amfotericin B aj.), někdy také krev. *Ureaplasma* spp. vyžaduje přídavek močoviny. Média mohou být tekutá nebo pevná agarová. Inkubace vyžaduje mikroaerofilní atmosféru (5 % CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>3</sub>) a trvá minimálně 7 dní. Růst mykoplazmat není pozorovatelný pouhým okem, ani v tekutých médiích se neprojevuje výrazným zákalem jako u jiných bakterií, proto je často detekován barevnou změnou. Na pevných médiích vytvářejí mikroskopické kolonie zvláštního tvaru, připomínající „volská oka“ – víceméně okrouhlé útvary s plochými okraji a vyvýšeným středem, hluboko klínovitě zanořeným do média. Inokulovaná média pozorujeme každý den pod mikroskopem; subkultivace za účelem získání čisté kultury vyžaduje vyříznutí bločku agaru s vybranou kolonií sterilním skalpelem.

Několik biochemických testů slouží k rodové identifikaci získané kultury: citlivost k digitoninu slouží k odlišení *Acholeplasma* spp., které je rezistentní, zatímco růst *Mycoplasma* spp. a *Ureaplasma* spp. je inhibován. *Ureaplasma* spp. je pozitivní v ureázovém testu. Druhov

identifikace je náročnější a vyžaduje zapojení molekulárních nebo sérologických metod (inhibice růstu druhově specifickým antisérem, imunofluorescence apod.).

Kultivační vyšetření se provádí pouze v několika specializovaných laboratořích. V běžné diagnostice se čím dál častěji uplatňuje PCR k přímé detekci mykoplazmat ve vzorku. Sérologické metody se uplatňují zejména při monitoringu výskytu nákazy ve stádech či hejnech hospodářských zvířat; takto se sleduje např. *M. gallisepticum*. Používá se ELISA, ale i rychlá sklíčková aglutinace.

### 7.1.5 Terapie a prevence

V oblastech výskytu plicní nákazy se používají živé i inaktivované vakcíny, v našich podmínkách je dostupná inaktivovaná vakcína proti enzootické pneumonii prasat a živé vakcíny proti *M. gallisepticum* a *M. synoviae*. Žádná z nich však není plně protektivní, spíše brání rozvoji onemocnění než vlastní infekci. U kuřat, kde se mykoplazmata přenáší transovariálně, ale i u jiných hospodářských zvířat patří sérologický monitoring, biosekurita a udržování stáda/hejna prostého nákazy k hlavním opatřením, jak zabránit ztrátám.

Mykoplazmata jsou přirozeně rezistentní na betalaktamy a glykopeptidy, ale také k rifampicinu, sulfonamidům (včetně potencovaných) a polymyxinům. K léčbě se doporučují zejména tetracykliny, makrolidy (tylosin), pleuromutiliny a fluorované chinolony, ačkoli je pozorována zvyšující se rezistence zejména k prvním dvěma zmíněným skupinám. Vzhledem k výše popsaným kultivačním nárokům je stanovení citlivosti *in vitro* technicky obtížné.

Doporučená četba:

Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):417-32.

## 8. Obligátně intracelulární bakterie

### 8.1 Čeleď Rickettsiaceae

Řád Rickettsiales z třídy  $\alpha$ -proteobacteria zahrnuje několik čeledí, jejichž zástupci jsou považovány primárně za endosymbionty buněk členovců. Některé teorie zde hledají původ semiautonomních organel eukaryot, jako jsou mitochondrie. Zásadní klinický význam mají čeledi Rickettsiaceae a Anaplasmataceae, v nichž se nachází patogeny člověka i zvířat. Jsou to obligátně intracelulární bakterie, neschopné množit se mimo hostitelskou buňku, a proto byly také po svém objevení na začátku 20. století považovány za viry. Jedná se však o velmi malé nepohyblivé aerobní gramnegativní bakterie. Jsou pleomorfní, kokovitého až tyčinkovitého tvaru a nabývají velikosti do 0,5  $\mu\text{m}$ . Jsou to tzv. energetičtí parazité – odebírají hostitelské buňce, kromě dalších živin, také molekulu ATP. K tomu využívají speciální enzym ATP/ADP translokázu. Mimo hostitelskou buňku dlouho nepřežívají a na rozdíl od *Chlamydia* spp. a *Coxiella* spp. nevytvářejí extracelulární odolná stádia – přenos je realizován vektory, obvykle krev sajícími členovci, jako jsou klíšťata, blechy a vši.

Čeleď Rickettsiaceae charakterizuje obzvláštní afinita k cévnímu endotelu. Vyvolávají nebezpečná horečnatá onemocnění spojené s vaskulitidou, projevující se často hemoragickou vyrážkou na různých částech těla. Po napadení hostitelské buňky unikají z fagozomu a množí se v cytoplazmě.

Čeleď obsahuje dva významné rody – *Rickettsia* spp. a *Orientia* spp. *O. tsutsugamushi* je původcem tzv. horečky cucugamuši („scrub typhus“), vyskytující se v oblasti mezi Afgánistánem a Japonskem, jež značně přispěla ke ztrátám americké armády během války ve Vietnamu. Přenáší ji sametky (Trombiculidae) a rezervoárem jsou myši; člověk, u nějž vyvolává horečnaté onemocnění s postižením CNS, je spíše náhodným onemocněním.

#### 8.1.1 Rod *Rickettsia*

*Rickettsia* spp. zahrnuje mnoho druhů, vyskytujících se po celém světě a vyvolávajících tyfu podobná horečnatá onemocnění člověka. Všeobecně se však jedná o zoonózy, jejichž primárním hostitelem je zvíře, nejčastěji hlodavec, a proto mají své místo zde.

##### 8.1.1.1 Patogenita

Z hlediska patogenity můžeme *Rickettsia* spp. rozdělit na dvě skupiny: **skupinu skvrnitého tyfu** a **skupinu skvrnitých horeček**.

První skupinu zastupuje *R. prowazekii*, původce epidemického skvrnitého tyfu člověka, a *R. typhi*, jež vyvolává tzv. **endemickou skvrnivku** neboli myší tyfus. Přírodním hostitelem *R. typhi* jsou potkani, přenáší se blechami (*X. cheopis* aj.). Vyskytuje se v subtropických, zejména přímořských oblastech Evropy a vyvolává onemocnění prakticky nerozlišitelné od skvrnitého tyfu, ač obvykle s mírnějším průběhem. **Skvrnitý tyfus** patří k několika nejobávanějším „metlám lidstva“ (ač přírodním hostitelem je původně nejspíš poletuška), neodmyslitelně doprovázejícím války a přírodní katastrofy po celé dějiny lidstva. S velkou pravděpodobností řádl již v periklovských Athénách během Peloponéských válek, v 19. století kosil Napoleonovu armádu na útěku z Ruska více než mráz, ničivá epidemie řádila během první světové

války v Rusku a Polsku, za druhé světové války vypukaly epidemie v koncentračních táborech. *R. prowazekii* dostala jméno podle dvou vědců, kteří padli skvrnitému tyfu za obět' – amerického mikrobiologa patologa Howarda Rickettse (objevitele horečky Skalistých hor) a českého parazitologa Stanislava Provázka (Prowazeka), který v roce 1914 při ošetřování vězňů v zajateckém táboře označil přenašeče onemocnění – veš šatní (*Pediculus humanus*). Podobně jako v případě zákopové horečky, i zde je zdrojem infekce trus vši, který se dostává do organismu přes kožní oděrky (škrábáním). Onemocnění začíná nesnesitelnými bolestmi hlavy, následuje vysoká horečka, blouznění a příznaky meningitidy. Po několika dnech se na hrudníku objevuje petechiální vyrážka. I po uzdravení může následovat recidiva onemocnění (tzv. Brill-Zinserova choroba), s odstupem až desítek let.

Skupina skvrnitých horeček je podstatně širší, zahrnuje mnoho druhů, pojmenovaných často podle místa první izolace. Přenáší se, až na některé výjimky, klíšťaty (zdrojem jsou slinné žlázy), a rezervoár tvoří hlavně hlodavci a volně žijící zvíř. Nejdříve a nejlépe byla popsána *R. rickettsii*, původce tzv. **horečky Skalistých hor** (Rocky Mountain spotted fever). V první polovině 20. století byla izolována z klíšťat rodu *Dermacentor*, vyskytujících se v „kaňonech smrti“ ve Skalistých horách. Lidé vracující se z těchto oblastí často záhadně umírali na horečnaté onemocnění s bolestmi hlavy a vyrážkou začínající na končetinách. *R. rickettsii* se vyskytuje i v jiných oblastech Ameriky a vnímaví jsou také psi, u nichž se infekce projevuje podobně jako u člověka, meningeálními příznaky a lymfadenopatií s hepatomegalií.

K dalším zástupcům patří komplex *R. conorii*. *R. conorii* je původcem tzv. marseilleské horečky, která se vyskytuje v Středomoří, přenáší ji *Rhipicephalus* spp. A rezervárem jsou krysy, ale také psi. Komplex dále zahrnuje původce astrachaňské horečky, indického a izraelského klíšťového tyfu, přenášené klíšťaty rodu *Rhipicephalus* a *Hyalomma* a vyskytující se od Středomoří po Indii. Podobně *R. africae*, *R. sibirica*, *R. japonica*, *R. australis* vyvolávají různé „místní“ klíšťové tyfy. V Evropě se vyskytuje *R. helvetica* a *R. slovaca* (původce tzv. TiBoLa – tick borne lymphadenitis, horečnaté onemocnění s tvorbou příškvaru v místě přisání klíštěte). Rezervoárem *R. felis* je kočka a přenašečem kočičí blecha (*Ctenocephalides felis*).

### 8.1.1.2 Patogeneze

Rickettsie napadají především cévní endotel a po průniku do cirkulace adherují na cílové buňky pomocí **proteinů vnější membrány OmpA a OmpB**, které spouští řadu procesů vedoucích k internalizaci bakterie zipovým mechanismem. Následně bakterie uvolňují **fosfolipázu D a hemolyzin C**, lyzující membránu fagozomu, a unikají do cytoplazmy, kde se pomnožují. Polymerizace aktinových vláken umožňuje pohyb v rámci buňky i přímý přestup z buňky na buňku (aktinová vlákna tvoří tzv. „ocas komety“ a posouvají bakterie dopředu). Kromě endotelu napadají také další buňky retikuloendotelové soustavy (lymfatické orgány). Výsledkem je lymfadenopatie. Pomnožení rickettsií vede k poškození buněk a indukci zánětlivé odpovědi. Poškozený endotel spouští koagulační kaskádu, vznikají mikrotromby. Vaskulitida se zvýšenou permeabilitou cév, trombotizace a hypoperfuze je zodpovědná za vznik typických hemoragických vyrážek, poškození parenchymatózních orgánů i za nervové a meningeální příznaky.

### 8.1.1.3 Diagnostika

Izolace rickettsií není možná na bezbuněčných médiích a v běžných podmínkách se neprovádí. Diagnostika je založena na přímé vizualizaci rickettsií v tkáních, molekulárních

metodách (PCR) nebo průkazu protilátek (nepřímá imunofluorescence, ELISA). Jako vzorek jsou vhodné kožní biopsie nebo krev. Barvení dle Grama není vhodné, používají se barvicí metody dle Giemsa, Giménez nebo Macchiavello.

#### ***8.1.1.4 Terapie***

Na rickettsiová onemocnění obecně nejsou dostupné vakcíny. Lékem volby jsou tetracykliny, především doxycyklin.



## 8.2 Čeleď Anaplasmataceae

Čeleď Anaplasmataceae zahrnuje obligátně intracelulární bakterie, které, na rozdíl od rickettsií, se pomnožují ve vakuolách uvnitř hostitelské buňky (neunikají do cytoplasmy, naopak modifikují fagozom). Podobně jako rickettsie mají afinitu k buňkám RES. Napadají také endotel, ale především je nacházíme v různých typech krevních buněk (v závislosti na druhu v monocytech, ale i granulocytech, červených krvinkách a krevních destičkách). Dalším rozdílem je absence buněčné stěny, jež je příčinou pleomorfního tvaru těchto bakterií. I ony jsou závislé na přenosu vektory.

Čeleď zahrnuje rody *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* a *Wolbachia*.

### 8.2.1 Rod *Anaplasma*, rod *Ehrlichia*

*Anaplasma* spp. a *Ehrlichia* spp. jsou obligátně intracelulární bakterie bez buněčné stěny, které se množí ve fagozomech napadených buněk. Mají afinitu k různým řadám krevních buněk; v polychromaticky barvených krevních nátěrech pozorujeme intracytoplasmatické inkluze, tzv. **moruly**. U člověka i zvířat vyvolávají onemocnění spojené v různé míře s lymfadenopatiemi, vaskulitidami, anémií a imunosupresí. Přenašeči bývají klíšťata, u nichž dochází k transstadiálnímu, nikoli transovariálnímu přenosu.

#### 8.1.2.1 Patogenita

*Anaplasma marginale*, *A. centrale* a *A. ovis* napadají erythrocyty přežvýkavců. *A. marginale* je původcem **erythrocytární anaplazmózy skotu**, *A. centrale* způsobuje mírnější formu téhož onemocnění. Oba druhy se liší v umístění morul (inkluzí) v napadených erythrocytech – na okrajích, respektive ve středu buňky. Onemocnění se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech a je přenášeno místními druhy klíšťat rodu *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* aj. Akutní fázi charakterizuje řada nespecifických příznaků včetně anémie, horečky, anorexie a deprese s až 50% mortalitou, přeživší jedinci se mohou stát chronicky infikovanými nosiči.

*Anaplasma platys* (dříve *Ehrlichia*) je původcem tzv. **cyklické trombocytopenie psů**; jako naprostá výjimka mezi intracelulárními bakteriemi infikuje krevní destičky. Onemocnění je přenášeno pravděpodobně klíštětem *Rhipicephalus sanguineus*, vyskytuje se v Africe, Americe, Austrálii, Číně a Středomoří a je charakterizováno trombocytopenií exacerbující přibližně v čtrnáctidenních cyklech. Je doprovázeno dalšími změnami v krevním obrazu – anémií, lymfadenopatií a horečkou.

V našich podmínkách je nejvýznamnějším zástupcem rodu *A. phagocytophilum* (dříve též *Ehrlichia phagocytophilum* a *Ehrlichia equi*), původce **granulocytární anaplazmózy** (ehrlichiozy) člověka, psů a koní a tzv. **klíšťové horečky** (tick-borne fever) skotu. Jedná se o silně poddiagnostikované onemocnění, které v mnohém připomíná boreliózu. Přenáší jej v našich podmínkách klíště *Ixodes ricinus* a rezervoárem jsou především hlodavci a spárkatá zvěř (perzistentní infekce). Původce se nachází v morulách uvnitř neutrofilních granulocytů, vyvolává též vaskulitidu spojenou s tvorbou trombóz, hemoragií a edémů. Většina infekcí je mírných s nespecifickými příznaky (horečka, bolest hlavy, svalů a kloubů přibližně 14 dní po infestaci klíštětem); k dalším příznakům patří vyrážky, splenomegalie, anémie, ikterus a různé neurologické poruchy.

Onemocnění vyvolaná bakteriemi rodu *Ehrlichia* se u nás přirozeně nevyskytují. *E. canis*, přenášená *Rhipicephalus sanguineus*, je původcem **monocytární ehrlichiozy psů**, *E. ewingii* způsobuje **granulocytární ehrlichiozu psů** a přenáší ji *Amblyomma americanum*; obě se vyskytují hlavně v Americe. *E. chaffeensis* (přenos *Amblyomma*, *Dermacentor* spp.) způsobuje **monocytární ehrlichiozu člověka**, ale byla izolována i ze psů. Příznaky těchto onemocnění jsou obdobné. Po akutní fázi s horečkou, anorexií, zvracením, anémií a leukopenií často následuje chronická fáze s hepatosplenomegalií, lymfadenopatií a edémy.

*Ehrlichia ruminantium* (dříve *Cowdria*, ještě dříve *Anaplasma*) se vyskytuje v subsaharské Africe, ale také v oblasti Karibiku, kde vyvolává závažné onemocnění skotu, tzv. **heartwater** (doslova vodnaté srdce). Napadá vaskulární endotel; jeho poškození vede k oběhovým poruchám včetně hydroperikardu, hydrothoraxu a edému plic, ústicím ve vysokou mortalitu. Přítomny jsou též horečka a krváceniny. Přenašečem je *Amblyomma* spp.

### 8.1.2.2 Patogeneze

Příznaky popsaných onemocnění vznikají zpravidla nejen poškozením napadených buněk vlastními bakteriemi, ale také důsledkem imunitních reakcí, takže příznaky nemusí vyloženě korelovat s mírou bakterémie. Patogeneze se jistě liší podle druhu a typu napadených buněk, ale obecně platí, že dochází k **inhibici fagolysozomální fúze** a baktericidních mechanismů a **modifikaci fagozomu** na „parazitoformní“ vakuolu, v níž se bakterie množí a vytvářejí tzv. morulu. *A. phagocytophilum* (a další zástupci) je výjimečná právě v tom, že napadá neutrofilní granulocyty, tedy profesionální fagocyty, vybavené těmi nejúčinnějšími baktericidními mechanismy. K těm patří zejména oxidativní vzplanutí s tvorbou reaktivních forem kyslíku, v němž ústřední roli hraje enzymatický komplex NADPH-oxidáza. Bakterie brání expresi jednotlivých komponent NADPH oxidázy nebo je dokonce degradují a vzniklé ROS pomáhá detoxikovat enzym superoxidodismutáza. Anaplazmatům chybí základní složky buněčné stěny gramnegativních bakterií, peptidoglykan a lipopolysacharid, což jsou hlavní „PAMPs“ (pathogen-associated molecular patterns), ligandy neutrofilových receptorů, jejichž aktivací se spouští mnoho imunitních pochodů. Zároveň bakterie nějakým způsobem brání apoptóze napadených buněk. Adhezi k cílovým buňkám zajišťují povrchové proteiny MSP, jež jsou zároveň hlavními imunogeny; antigenní variace umožňuje vznik perzistentní formy infekce.

### 8.1.2.3 Diagnostika

Intracelulární inkluze, „moruly“, lze pozorovat v polychromaticky (např. Giemsa) barvených krevních nátěrech a podle typu napadených buněk a umístění lze pouze zhruba usuzovat na druh bakterie. K detekci bakterií v krvi lze použít PCR. Nejběžněji se však používají sérologické testy (imunofluorescence, ELISA); čtyřnásobné zvýšení titru protilátek po opakovaném odběru značí akutní infekci. Mezi jednotlivými druhy *Anaplasma* spp. nebo *Ehrlichia* spp. může docházet ke zkříženým reakcím.

### 8.1.2.4 Terapie

Lékem volby jsou tetracyklinová antibiotika.

### 8.1.3 Rod *Neorickettsia*

Bakterie rodu *Neorickettsia* jsou považovány za přirozené endosymbionty motolic (Digenea), u nichž se přenáší transovariálně, prodělávají s nimi jejich složitý vývojový cyklus a posléze napadají a množí se v savčích hostitelích, v enterocytech a monocytech/makrofázích. Evoluční význam tohoto procesu není zcela jasný, neboť těmto bakteriím by stačilo udržovat se v motolicích a napadení savce se zdá jaksi „navíc“.

#### 8.1.3.1 Patogenita

*N. salminicola* vyvolává tzv. „salmon poisoning“ u psů. Onemocnění se vyskytuje pouze v pobřežních oblastech Severní Ameriky a rezervoárem je motolice *Nanophyetus salminicola*, jejíž vývojový cyklus zahrnuje plže a lososovitou rybu. Pes je finálním hostitelem; nakazí se pozřením syrové ryby infestované vývojovými stádii infikované motolice. Vajíčka motolic s bakteriemi jsou vylučována trusem.

*N. risticii* je původcem tzv. **potomacké horečky koní**. I toto onemocnění se vyskytuje jen v určitých oblastech Ameriky a je vázáno na motolice, jejichž finálním hostitelem je kůň a mezihostiteli sladkovodní plži a hmyz (jepice). Koně se nejspíš nakazí pitím vody kontaminované cercáriemi nebo pozřením investovaného hmyzu.

Onemocnění je v obou případech charakterizováno spojením gastrointestinálních příznaků (průjem, zvracení, někdy i hemoragická enterokolitida) s nespecifickými příznaky připomínajícími ehrlichiozu (leukopenie, lymfadenomatie, horečka). U koní se často objevuje laminitida.

*N. sennetsu* byla popsána v Japonsku ve spojitosti s onemocněním člověka po pozření syrových ryb. Je geneticky velmi blízká *N. risticii*.

#### 8.1.3.2 Patogeneze

Pozřené metacerkárie se ve střevě mění v dospělé a uvolňují neorickettsie, které invadují střevní výstelku, kde nejspíš probíhá první pomnožení, a buňky monocyto-makrofágové řady. Dostávají se tak do lymfatických i jiných orgánů (mízní uzliny, slezina, plíce, mozek). Pohlcení probíhá receptorem zprostředkovanou endocytózou, nezávislou na fagocytujících schopnostech napadené buňky. Bakterie brání fagolysozomární fúzi a množí se ve vakuolách.

#### 8.1.3.3 Diagnostika

Bakterie lze demonstrovat v polychromaticky barvených krevních nátěrech nebo bioprátech mízních uzlin. Detekce molekulárními metodami (PCR) je však citlivější. Použit lze také sérologické metody (imunofluorescence, ELISA).

#### 8.1.3.3 Terapie

Jako u jiných onemocnění vyvolaných bakteriemi této čeledi, primárním lékem volby je doxycyklin.

#### 8.1.4 Rod *Aegyptianella*

*Aegyptianella pullorum* je patogenem drůbeže, přenášeným klíšťáky *Argas persicus*. Napadá erytrocyty a vyvolává onemocnění velice podobné spirochetóze drůbeže (*Borrelia anserina*, též přenášená klíšťáky) s anémií a depresí. Mohou být přítomny petechiální krváceniny, ascites a hepatoplenomegalie. V endemických oblastech (tropy, subtropy) probíhá infekce často asymptomaticky. Bakterie je nutno v krevních nátěrech odlišit od intraerytrocytárních parazitů (*Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp.)

#### 8.1.5 Rod *Wolbachia*

Bakterie rodu *Wolbachia* jsou endosymbionty bezobratlých živočichů (členovců, helmintů aj.), včetně některých patogenních filárií člověka a zvířat. Jejich vztah je mutualistický, bakterie pozitivně ovlivňují reprodukční schopnost svých hostitelů. Tak je tomu například v případě *Dirofilaria immitis* – srdečního červa psů – nebo původců říční slepoty a elefantiázy člověka. *Wolbachia* spp. vyvolává odezvu imunitního systému a zřejmě přispívá k patogenezi těchto onemocnění. Naopak eliminace těchto bakterií doxycyklinem narušuje reprodukci parazitů a může být využita v terapii.

Doporučená četba:

Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):469-89.

## 8.2 Čeleď Coxiellaceae

Čeleď Coxiellaceae zahrnuje nejlépe charakterizovaný rod *Coxiella* a klinicky významný druh *C. burnetii*. Tato obligátně intracelulární bakterie byla dříve řazena k rickettsiím. Nyní však patří do řádu Legionellales třídy  $\gamma$ -proteobacteria. Příbuzné bakterie rodu *Legionella* (čeleď Legionellaceae) jsou parazity měňavek; tato adaptace zároveň umožňuje napadat makrofágy. *L. pneumophila* je původcem tzv. legionářské choroby (legionelózy člověka). Zdrojem infekce je voda a člověk se nakazí vdechováním aerosolu (např. při sprchování, ale i z klimatizace nebo ve vířivce). Onemocnění je závažné, s postižením plic, zvracením, průjmem a vysokou horečkou. Jiné druhy vyvolávají tzv. pontiackou horečku.

### 8.2.1 Rod *Coxiella*

Také *Coxiella* spp., krátká gramnegativní tyčinka, napadá makrofágy a množí se dokonce v kyselém prostředí zralých fagolysosomů. Je obligátně intracelulární, ale na rozdíl od rickettsií vyvábí i odolná extracelulární infekční stádia, takže přenos je možný i bez prostřednictví vektora.

#### 8.2.1.1 Patogenita

**Q horečka** (podle slova „query“ – otázka, nebo podle australského Queenslandu, kde byla poprvé diagnostikovaná u pracovníků jatek) je zoonotické onemocnění, vyskytující se čas od času i v Evropě. V přírodních ohniscích jsou hostiteli volně žijící hlodavci, vačnatci i přežvýkavci a přenos zajišťují hlavně klíšťata, u nichž se infekce přenáší také transovariálně. Zdrojem infekce pro člověka jsou však především domácí přežvýkavci (synantropní cyklus), u nichž někdy způsobuje aborty, často je však asymptomatická. *C. burnetii* vytváří vysoce odolná stádia podobná spórám, která vydrží dlouhou dobu v prostředí a odolávají UV záření, vyschnutí a vysokým teplotám včetně mírné pasterizace. Jsou vylučovány různými sekrety a exkrety (trus, moč, mléko, plodové vody) a člověk se může nakazit jak klíštětem, tak (častěji) aerogenně, vdechnutím infekčních stádií z kontaminovaného prostředí, případně pitím syrového nebo slabě pasterovaného mléka.

Koxiely napadají makrofágy regionálních mízních uzlin a různých orgánů (alveolární makrofágy, Kupferovy buňky), což vede ke vzniku pneumonie a hepatitidy. Subklinické infekce jsou poměrně časté. Manifestované onemocnění člověka připomíná chřipku a je dále spjato s horečkou, bolestmi hlavy, svalů a kloubů, někdy s meningitidou nebo endokarditidou, která se projeví až po delší době. Napadení placenty vede k abortu. Bakterie mohou perzistovat ve slezině, kostní dřeni a játrech (s tvorbou granulomatózních lézí) a způsobit návrat onemocnění po dlouhé době latence. Závažné formy infekce našťastí nejsou příliš časté. Výskyt v Evropě je sporadický, nicméně musí být zvažován v případě zmetání skotu a malých přežvýkavců.

### 8.2.1.2 Patogeneze

*C. burnetii* vytváří malá, vysoce odolná extracelulární stádia (**SCV**, *small cell variants*) s kondenzovaným chromatinem, které interagují s receptory profesionálních fagocytů, jsou pohlcovány a mění se ve velká metabolicky aktivní stádia (**LCV**, *large cell variants*), které se množí v **modifikovaných fagolysosomech**, tzv. CCV (Coxiella-containing vacuole). Tento kompartment má charakter zralého fagolysozomu, včetně velmi nízkého pH, jež *C. burnetii* zjevně vyhovuje, umožňuje její replikaci a expresi **sekrečního systému typu IV**, secernujícího efekty ovlivňující další funkce napadených buněk. Důležitým faktorem virulence je také **lipopolysacharid**. Pouze tzv. antigenní fáze I (odpovídá S fázi jiných gramnegativních bakterií) je patogenní, fáze II se změněnou strukturou LPS (odpovídá R fázi) je atenuovaná a získává se pasáží v laboratorních podmínkách.

### 8.2.1.3 Diagnostika

Jako jiné obligátně intracelulární bakterie, *C. burnetii* není možno kultivovat na bezbuněčných médiích. K izolaci se často používají i kuřecí embrya, přistupuje se k ní však spíše za experimentálních podmínek. K běžné diagnostice a monitoringu se používá sérologických metod (komplement fixační test, ELISA). Vhodným materiálem pro přímý průkaz je v případě abortů plodová voda a placenta. Organismus lze demonstrovat molekulárními metodami (PCR) nebo v otiskových a histologických preparátech postižených orgánů speciálním barvením (Machiavello), imunofluorescenčně nebo imunohistochemicky.

### 8.1.2.4 Terapie a prevence

K léčbě Q horečky jsou doporučována tetracyklinová antibiotika, chloramfenikol nebo fluorochinolony. V endemických oblastech (Austrálie) lze chránit zvířata i lidi vakcínou, jejíž účinnost bývá však zpochybňována; hlavním problémem je střídání dvou antigenních fází, kdy atenuovaná fáze II není plně protektivní proti virulentnější fázi I.

Doporučená četba:

Woldehiwet Z. 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Res Vet Sci 77: 93 – 100.

## 8.3 Čeleď Chlamydiaceae

Chlamydie jsou zvláštní skupinou obligátně intracelulárních bakterií, s vlastní třídou Chlamydia a kmenem Chlamydiae. Spolu s kmeny Verrucomicrobia a Planctomycetes tvoří společný superkmen (tzv. PVC group), jenž má blízký vztah ke kmeni Proteobacteria. Jsou to drobné, kulovité nebo vejčité bakterie velikosti cca 0,2 – 1  $\mu\text{m}$ , jejich buněčná stěna se barví gramnegativně, má vnitřní a vnější membránu, ale stavbou se liší od jiných gramnegativních bakterií; peptidoglykan v periplasmatickém prostoru nejspíš zcela nechybí, jak se dříve předpokládalo, ale je těžko detekovatelný. Zdá se však, že peptidoglykan, jako u jiných bakterií, je důležitý pro správné dělení buněk, což také vysvětluje citlivost chlamydií k betalaktamovým antibiotikům. Buněčná stěna obsahuje LPS a další složky, proteiny bohaté na cystein (CRP); tzv. hlavní protein vnější membrány (MOMP neboli OmpA) *C. trachomatis* je dominantním antigenem, určujícím jednotlivé sérotypy. Zvláštní stavba buněčné stěny dala chlamydiím jméno – chlamys je plášť, do něž se halili staří Řekové. V řádu Chlamydiales byly popsány další příbuzné čeledi, např. Parachlamydiaceae nebo Waddliaceae, zahrnující endosymbionty jednobuněčných eukaryot.

Genom chlamydií je výrazně redukovaný. Podobně jako rickettsie mají **ATP/ADP translokázu**, ale na rozdíl od nich jsou zcela závislé na přísunu ATP syntetizovaného hostitel-skou buňkou (energetičtí parazité). Mají afinitu k epiteliálním buňkám, v nichž se množí uvnitř vakuol, a vyvolávají onemocnění postihující především sliznice oka, respiračního, reprodukčního a trávicího traktu.

Životní cyklus chlamydií je bifázický. Vytvářejí infekční extracelulární stádia, tzv. **elementární tělíska**, velká asi 0,3  $\mu\text{m}$ , která jsou zdánlivě metabolicky inaktivní a vysoce odolná vůči vlivům vnějšího prostředí. Jejich povrch tvoří síť proteinů spojených disulfidickými můstky, tzv. komplex vnější membrány. Po průniku do organismu ingescí, inhalací kontaminovaného prachu, případně venerickou cestou elementární tělíska pronikají endocytózou do buněk a po 6 – 8 hodinách se ve vakuolách mění na vysoce metabolicky aktivní, replikující se **retikulární tělísko**, velké asi 1  $\mu\text{m}$ . To se množí v modifikovaném endozomu (inkluzi), které, pokud je buňka napadena více tělísky, splývají dohromady, zatímco k fúzi s lysozomy díky různým inhibičním mechanismům nedochází. Po asi 24 hodinách se retikulární tělíska opět mění na elementární tělíska, která po buněčné lýze napadají další buňky nebo jsou uvolňována do vnějšího prostředí s různými sekrety a exkrety. Za určitých okolností nedojde k produkci elementárních tělísek a retikulární tělíska se mění na velká neaktivní stádia, tzv. **aberantní tělíska**. Tvorbu aberantních tělísek experimentálně indukují například betalaktamová antibiotika nebo interferon  $\gamma$  a věří se, že jsou podstatou perzistentních chlamydiových infekcí.

Donedávna se rozlišovaly dva hlavní rody v čeledi Chlamydiaceae, *Chlamydia* a *Chlamydophila*; v současnosti se uznává pouze rod *Chlamydia*. Nejprostudovanější jsou samozřejmě lidské patogeny, *C. trachomatis* a *C. pneumoniae*, z veterinárního hlediska jsou nejvýznamnější *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. suis*, *C. pecorum*. Některé druhy nejsou striktně hostitelsky specifické a *C. psittaci* je významným zoonotickým patogenem.

### 8.3.1 Patogenita

*C. trachomatis* je velmi rozšířeným lidským patogenem. Podle hlavního proteinu vnější membrány se rozlišuje několik sérotypů, z nichž sérotypy A – C vyvolávají konjunktivitidy dospělých lidí a tzv. **trachom**, závažnou keratokonjunktivitu u dětí zejména v rozvojových

zemích, který je jednou z hlavních příčin léčitelné slepoty. Přenos usnadňují nehygienické podmínky. Sérotypy D – K jsou asociovány se sexuálně přenosnými infekcemi urogenitálního traktu (urethritidy a pánevní záněty vedoucí někdy k infertilitě nebo ektopické graviditě). Sérotypy L1 – L3 způsobují tzv. **lymphogranuloma venereum**, vředovité venerické onemocnění vyskytující se v tropech a subtropích.

*C. pneumoniae* není tak hostitelsky specifická, zahrnuje lidský (tzv. TWAR), koňský a koali biotyp. Spolu s mykoplazmaty je hlavní příčinou „**atypických**“ pneumonií u člověka. Tento pojem se vztahuje zánětům plic způsobených jinými než „typickými“ původci (např. pneumokoky), s absencí některých „typických“ příznaků (např. lobární konsolidace plic) a naopak s přítomností jiných vedlejších příznaků. Infekce *C. pneumoniae* byla asociována i se zvýšeným rizikem aterosklerotických onemocnění a chronickými bronchitidami připomínajícími astma. Také u zvířat způsobuje respirační infekce, zoonotický potenciál jednotlivých biovarů však není objasněn.

*C. psittaci* je mimořádně významná z hlediska humánní i veterinární medicíny. Způsobuje systémové onemocnění různých druhů ptáků, včetně domácí drůbeže, jelikož však byla objevena v souvislosti s onemocněním papoušků, vžilo se nejprve pojmenování psitakóza, později se používalo názvu psitakóza pro chorobu papoušků a ornitóza pro onemocnění jiných druhů. Nyní se preferuje název **chlamydióza ptáků**. Ve 30. letech se v Evropě a Americe objevila záhadná „papouščí nemoc“ – závažná atypická pneumonie, na níž umírali majitelé papoušků. V roce 1934 publikoval George McCoy zprávu o šíření „psitakózy“ v prostředí hygienické laboratoře, jejíž několik zaměstnanců zemřelo, čímž prokázal přenos nákazy z ptáků na lidi. Následně byl popsán „virus papouščí nemoci“ – později bakterie *C. psittaci*.

*C. psittaci* má několik genotypů, z nichž genotyp A se specializuje na papoušky, další se vyskytují u jiných ptačích druhů. Onemocnění ptáků je systémové s komplexní symptomatologií, příznaky onemocnění dýchacího traktu (okulonasální výtok, dyspnoe), trávicího traktu (zeleně zbarvený průjem), encefalitida, artritida, splenomegalie, polyserositida, postižení ledvin a jater a nespecifické příznaky (načepýření, apatie) mohou být u různých druhů různě vyjádřeny. Vedle papoušků bývají nejčastěji infikováni holubi. Inkubační doba je dlouhá a akutní onemocnění často propuká následkem imunodeprese (typicky v souvislosti s přepravou do chovu). Člověk se nakazí přímým nebo nepřímým kontaktem s ptáky (interhumánní přenos není pravděpodobný), ingestí nebo inhalací elementárních tělísek vylučovaných v tělesných exkretách a kontaminujících dlouhodobě prostředí (rizikové je například víření prachu v prostorách, kde jsou chováni ptáci). Ohrožení jsou zejména chovatelé exotického ptactva, holubáři, ale i zaměstnanci v chovech drůbeže. Onemocnění člověka připomíná chřipku s výraznými bolestmi hlavy, ale často dochází k rozvoji atypické pneumonie, případně i multiorgánovému selhání. Kromě lidí byla *C. psittaci* izolována také ze skotu.

Také *C. abortus*, původce **enzootického zmetání ovcí**, má zoonotický potenciál. Organismus infikuje placentu a plod a vyvolává zmetání, které je příčinou ztrát zejména v chovech malých přežvýkavců, ale může se vyskytnout i u skotu nebo koní. Infekce je perorální nebo inhalační. U člověka vzniká chřipkové onemocnění s rizikem abortu.

*C. pecorum* způsobuje respirační onemocnění, konjunktivitidy, postižení kloubů nejen u koal, ale také prasat a přežvýkavců. *C. caviae* je příčinou konjunktivitid a urogenitálních infekcí morčat. Také infekce *C. suis* jsou asociovány s konjunktivitidami a pneumoniemi.

*C. felis* je jedním z nejdůležitějších původců konjunktivitid a onemocnění horních cest dýchacích u mladých koček. Má zoonotický potenciál.



### 8.3.2 Patogeneze

K rozpoznáním faktorům virulence chlamydií patří **lipopolysacharid** a **proteiny vnější membrány** (MOMP a další proteiny bohaté na cystein, OmcA a OmcB, tvořící membránový komplex), které zajišťují jak odolnost elementárních tělísek, tak adhezi a interakci s receptory hostitelských buněk. Po připojení bakterie spouští **sekreční systém typu III**, jenž tvoří mnohočetné výběžky na povrchu elementárních tělísek, a injikuje efektorové proteiny zajišťujících pohlcení elementárního tělíska a bránících aktivaci komplexu kaspáz, čímž inhibují apoptózu napadené buňky (naopak v pozdějších stádiích je apoptóza indukována). Retikulární tělíska produkují další efekторы, modifikující membránu inkluze (tzv. **Inc proteiny**) a zajišťující přísun živin.

Zásadním znakem chlamydiových infekcí je vznik **perzistentní fáze**, kdy bakterie zůstávají v neaktivním stavu uvnitř buněk bez příznaků onemocnění a jsou do značné míry refrakterní k léčbě antimikrobiky. Aktivovány pak mohou být zřejmě vlivem imunitního oslabení, např. stresu. Okolnosti vedoucí ke vzniku perzistentní infekce nejsou ještě zcela pochopeny. Experimentálně se podařilo indukovat perzistenci např. deplecí různých živin, účinkem interferonu  $\gamma$  nebo penicilinovými antibiotiky a bylo zjištěno, že ji podpoří koinfekce s některými viry nebo například tabákový kouř. Peniciliny narušují syntézu buněčné stěny a brání tvorbě elementárních tělísek. Interferon  $\gamma$  je jedním z ústředních cytokinů buněčného typu imunitní odpovědi a vykazuje také účinek proti chlamydiím, pravděpodobně se však zde uplatňují odlišné mechanismy než aktivace makrofágů; IFN $\gamma$  například omezuje dostupnost tryptofanu, jež si většina chlamydií neumí syntetizovat. Zatímco vyšší hladina IFN $\gamma$  úplně zastavuje množení chlamydií, nižší dávky indukují vznik aberantních tělísek.

Během akutní fáze chlamydie vyvolávají lýzu a apoptózu napadených buněk, avšak předpokládá se, že za hlavní poškození sliznic a dalších orgánů je zodpovědná vlastní imunitní odpověď.

### 8.3.3 Diagnostika

Chlamydie je možno kultivovat na různých buněčných systémech, jako jsou kuřecí embrya nebo McCoyovy buňky, izolace se však k běžné diagnostice nepožívá. V naprosté většině případů se používá sérologický průkaz (ELISA, reakce vazby komplementu) nebo detekce organismu PCR. V sérologických testech může docházet ke zkříženým reakcím s *C. burnetii*. Chlamydie mohou být také demonstrovány v roztěrech sekretů a otiskových preparátech postižených orgánů imunofluorescenčně, imunoperoxidázovým testem nebo speciálním barvením (Giemsa, Giménez, Macchivello). Vhodnými vzorky podle typu onemocnění například abortované plody a placenta (*C. abortus*), játra a slezina (*C. psittaci*), výtěry spojivky aj.

### 8.3.4 Terapie a prevence

K léčbě se používá několikátýdenní administrace doxycyklinu nebo fluorchinolonových chemoterapeutik. Jsou dostupné inaktivované i živé vakcíny proti *C. felis* a *C. abortus*, vakcína proti chlamydióze je součástí běžného očkovacího schématu u koček. Žádná vakcína proti chlamydióze ptáků není k dispozici.

Doporučená četba:

Schoborg R.V. Chlamydia persistence -- a tool to dissect chlamydia--host interactions. *Microbes Infect.* 2011;13(7):649-662. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.004

Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Jun;14(6):385-400.

Doporučená četba (speciální bakteriologie):

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.