

Alojz Ihan
Manica Müller Premru
Katja Seme
Tadeja Matos

Medicinska bakteriologija z mikologijo in parazitologijo

Ljubljana, 2020

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Katedra za mikrobiologijo in imunologijo

MEDICINSKA BAKTERIOLOGIJA Z MIKOLOGIJO IN PARAZITOLOGIJO

Uredniki:
Alojz Ihan
Manica Müller Premru
Katja Seme
Tadeja Matos



Ljubljana, 2020

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta
Katedra za mikrobiologijo in imunologijo
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo



MEDICINSKA BAKTERIOLOGIJA Z MIKOLOGIJO IN PARAZITOLOGIJO

Glavni urednik

Alojz Ihan

Uredniki

Temeljne lastnosti bakterij, bakterijskih okužb in njihovega zdravljenja: Alojz Ihan

Patogene bakterije: Manica Müller Premru, Katja Seme

Mikologija: Tadeja Matos

Parazitologija: Alojz Ihan

Recenzenti

prof. dr. Srečko Koren, dr. med.

prof. dr. Janez Tomažič, dr. med.

doc. dr. Polona Maver Vodičar, dr. med.

Ilustracije in oprema

Manca Krošelj

Lektorica

Katarina Faganel

Prelom

Boex DTP d. o. o.

Tisk

Itagraf d. o. o.

Naklada

800 izvodov

Avtorstvo fotografij

Fotografije v učbeniku so iz lastne zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani razen spodaj navedenih:

Slika 19.1. Vir: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2373308_1476-0711-7-10-2&req=4

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

579.61(075.8)

616.992(075.8)

MEDICINSKA bakteriologija z mikologijo in parazitologijo /
uredniki Alojz Ihan ... [et al.] ; [ilustracije Manca Krošelj]. - Ljubljana :
Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo,
Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2020

ISBN 978-961-95091-0-4

I. Ihan, Alojz

COBISS.SI-ID 26586883

Copyright© Katedra za mikrobiologijo in imunologijo 2020

Učbenik je s sklepom Katedre za mikrobiologijo in imunologijo 27. 12. 2019 opredeljen kot temeljno študijsko gradivo pri predmetu »Temeljna mikrobiologija in imunologija« (enoviti magistrski študijski program Medicina na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani)

Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje delov ali celote te publikacije s katerim koli sredstvom brez pisnega dovoljenja založnika je prepovedano.

KAZALO

Seznam avtorjev	5
Seznam najpogosteje uporabljenih kratic	6
Temeljne lastnosti bakterij, bakterijskih okužb in njihovega zdravljenja	13
1. Bakterijska celica <i>A. Ihan</i>	15
2. Klasifikacija bakterij <i>A. Ihan, K. Seme, M. Pirš, J. Germ</i>	29
3. Bakterijska presnova <i>M. Žakelj Mavrič</i>	38
4. Bakterijska genetika <i>A. Ihan, E. Ružić Sabljic</i>	46
5. Normalna mikrobiota <i>K. Seme</i>	61
6. Sterilizacija in razkuževanje <i>K. Seme, N. Švent Kučina</i>	65
7. Patogeneza bakterijskih okužb <i>M. Müller Premru, A. Ihan</i>	74
8. Diagnostika bakterijskih in glivnih okužb <i>M. Pirš, K. Seme</i>	89
9. Antibiotiki in kemoterapevtiki ter mehanizmi odpornosti bakterij proti antibiotikom <i>M. Müller Premru, M. Pirš</i>	96
Patogene bakterije	115
10. Stafilokoki <i>N. Švent Kučina</i>	117
11. Streptokoki <i>K. Seme</i>	123
12. Enterokoki <i>J. Germ, K. Seme</i>	131
13. Rod <i>Bacillus</i> <i>M. Müller Premru</i>	134
14. Listerije in erizipelotriks <i>M. Müller Premru</i>	138
15. Korinebakterije in drugi nesporogeni, po Gramu pozitivni bacili <i>M. Müller Premru</i>	143
16. Mikobakterije in nokardije <i>M. Müller Premru</i>	147
17. Najserije in moraksele <i>S. Jeverica</i>	157
18. Enterobakterije <i>M. Pirš</i>	164
19. Vibrije <i>M. Pirš</i>	188
20. Kampilobaktri in helikobaktri <i>M. Pirš, S. Jeverica</i>	192
21. Pseudomonasi in drugi nefermentativni, po Gramu negativni bacili <i>M. Müller Premru</i>	200
22. Hemofilusi <i>A. Ihan</i>	205
23. Bordetele <i>D. Keše, A. Ihan</i>	208
24. Francisele, brucele in pasterele <i>D. Keše</i>	212
25. Legionele in bartonele <i>D. Keše</i>	219
26. Nesporogene anaerobne bakterije <i>S. Jeverica</i>	226
27. Klostridiji – sporogene anaerobne bakterije <i>M. Müller Premru</i>	234
28. Treponeme <i>E. Ružić Sabljic</i>	241
29. Borelije <i>E. Ružić Sabljic</i>	248
30. Leptospire <i>E. Ružić Sabljic, T. Cerar Kišek</i>	257
31. Mikoplazme in ureaplazme <i>D. Keše</i>	262

32. Rikecije, orijencija in koksijela	<i>T. Avšič Županc, M. Petrovec</i>	267
33. Anaplazme in erlihije	<i>K. Strašek Smrdel, M. Petrovec, T. Avšič Županc</i>	274
34. Klamidije	<i>D. Keše</i>	280
Mikologija		289
35. Zgradba, razmnoževanje, klasifikacija gliv in patogeneza glivnih okužb	<i>T. Matos, R. Tomazin</i>	291
36. Diagnostika okužb z glivami in protiglivna zdravila	<i>T. Matos, R. Tomazin</i>	307
37. Površinske in kožne mikoze	<i>T. Matos, J. Germ</i>	320
38. Podkožne mikoze	<i>T. Matos</i>	330
39. Endemske mikoze	<i>T. Matos</i>	335
40. Oportunistične mikoze	<i>T. Matos</i>	346
Parazitologija		365
41. Praživali	<i>B. Šoba Šparl, J. Logar</i>	367
42. Helminti	<i>M. Skvarč, J. Logar</i>	388
43. Členonožci	<i>M. Skvarč, J. Logar</i>	402
Indeks		407

SKORAJ NIČ NI VEČ ENAKO (KOT V STAREM UČBENIKU)!

Za medicino že pregovorno velja trditev o njenem bliskovitem razvoju. Ampak tako nepredstavljivo revolucijo, kot smo jo v zadnjem desetletju doživeli na področju diagnostike bakterijskih in glivnih okužb, bi težko našli celo na drugih medicinskih področjih. Klasične metode gojenja in identifikacije bakterijskih in glivnih kolonij, ki so bile poldrugo stoletje, vse od Pasteurja in Kocha, nepremakljiv temelj prepoznavanja bakterijskih in glivnih okužb, so v enem samem desetletju z razvojem novih diagnostičnih tehnologij predrugačile ne le diagnostiko, ampak tudi naše znanje o bakterijah in glivah. Metoda masne spektrometrije MALDI-TOF deluje kot prizor iz legendarnih Zvezdnih stez – mikrobe lasersko uparimo in jih nato z računalniškimi algoritmi skoraj v trenutku identificiramo z masnim spektrometrom. To omogoča še pred desetletjem nepredstavljivo hitro in natančno diagnostiko povzročiteljev okužb in opredelitev njihove občutljivosti na zdravila. V kombinaciji s tehnikami za analizo mikrobne genoma pa sodobna mikrobiološka diagnostika omogoča izjemno izboljšanje zdravljenja bolnikov z okužbami – če imamo seveda dovolj znanja, da ob bolniku z okužbo takoj vemo, kaj, zakaj, kako in kam ... ter rezultate analiz tudi znamo uporabiti za optimalno zdravljenje.

Osnovni namen knjige je študente medicine in dentalne medicine »oskrbeti« z diagnostično pomembnim znanjem o bakterijah, glivah in parazitih do stopnje, da se bodo pri pouku infekcijskih bolezni lahko nemoteno posvečali bolnikom in njihovem zdravljenju. Že omenjene nove diagnostične metode pa so poleg koristi za bolnike prinesle tudi povsem nova spoznanja o raznolikosti in dinamiki okužb ter o patogenezi infekcijskih bolezni, ki jih pred tem s klasičnimi diagnostičnimi metodami nismo mogli niti slutiti. Mnoge patogene bakterije in glive, ki smo jih v preteklosti identificirali z enim vrstnim imenom, zdaj z novimi diagnostičnimi metodami prepoznavamo kot heterogene populacije povzročiteljev bolezni. To ne omogoča le boljšega predvidevanja poteka bolezni in boljšega zdravljenja bolnikov, ampak v temelju spreminja tudi naše znanje o patogenih bakterijah in glivah – s tem tudi vsebino učbenika, ki je pred nami. Zato v primerjavi s starim učbenikom skoraj nič ni več enako! Heraklitov filozofični *panta rhei* (vse teče – se spreminja) tako dobiva še eno potrditev na področju bakteriologije, mikologije in parazitologije.

Poleg študentov medicine in dentalne medicine bodo sodobno znanje o medicinsko pomembnih bakterijah, glivah in parazitih lahko iz učbenika pridobivali tudi študentje mikrobiologije, farmacije in drugih naravoslovnih študijev pa tudi podiplomski študenti in specializanti različnih strok. Za slednje bodo posebej zanimivi tisti deli poglavij, ki opisujejo diagnostične postopke, saj so jih na osnovi lastnih izkušenj predstavili vodilni slovenski strokovnjaki, večinoma sodelavci Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V knjigo smo vnesli tudi nemalo slovenskih epidemioloških podatkov o razširjenosti okužb.

Za zaključek še enkrat spominjam, da se medicinsko znanje nenehno spreminja in da tudi najbolj temeljit avtor poglavja ali knjige ne (z)more v besedilo zajeti vsega, kar bi bilo zdravniku ali laboratorijskemu strokovnjaku koristno vedeti za kakovostno obravnavo bolnikov. Zato bralcem priporočam, da primerjajo informacije iz te in iz drugih strokovnih knjig – s čim sodobnejšo letnico nastanka. S tem bo njihovo znanje postalo širše, bolj pregledno in predvsem usklajeno z aktualnimi spoznanji. Sprotno obnavljanje mikrobiološkega znanja je v praksi zlasti pomembno zaradi nenehno spreminjajočih se informacij in kliničnih smernic o protimikrobnem zdravljenju. Izjemni geografska in časovna dinamičnost spreminjanja mikrobne populacij in njihove odpornosti na protimikrobna zdravila sta medicinsko mikrobiologijo iz nekoč statične vede spremenili v meteorologijo med medicinskimi strokami – mikrobiologi z nenehnim zbiranjem podatkov o povzročiteljih okužb in njihovi odpornosti na zdravila omogočamo ne le uspešno zdravljenje posameznih bolnikov, pač pa tudi sprotno (pre)oblikovanje epidemioloških zemljevidov, ki državam in mednarodnim zdravstvenim organizacijam omogočajo načrtovanje najbolj učinkovitih načinov za preprečevanje in zdravljenje nalezljivih bolezni. V sodobnem, globaliziranem svetu bi težko našli boljši primer nujnosti globalnega razmišljanja in sodelovanja za uspešno reševanje lokalnih problemov. Vse do konkretnega bolnika z nalezljivo boleznijo, ki mu je ta knjiga v prvi vrsti posvečena.

1

Bakterijska celica

Alojz Ihan

EVKARIONTSKE IN PROKARIONTSKE CELICE

Razlike glede celičnih sestavin (DNK in kromosomi; jedro in organele; ribosomi in rRNK).

VELIKOST IN OBLIKA BAKTERIJ

Velikost in oblika bakterij; tehnika barvanja po Gramu; po Gramu pozitivne bakterije in po Gramu negativne bakterije; urejanje bakterij v skupine.

ZGRADBA BAKTERIJSKE CELICE

Citoplazma; selektivno prepustna citoplazemska membrana; nukleoid; bakterijska stena; bakterijska kapsula; bički; gibanje bakterij; bakterijski pilusi.

CITOPLAZEMSKA MEMBRANA

Biokemijska sestava; selektivna prepustnost in aktivni prenos snovi; elektronski prenos in oksidativna fosforilacija; prenos bakterijskih hidrolitičnih encimov v okolico; prostorska organizacija multienzimskih skupkov za gradnjo DNK; citoplazemska membrana in bakterijska stena; receptorska funkcija citoplazemske membrane za signale iz okolice.

BAKTERIJSKA STENA

Zgradba in funkcije bakterijske stene; peptidoglikan po Gramu pozitivnih bakterij in po Gramu negativnih bakterij; bakterijska stena po Gramu pozitivnih bakterij; teihoična kislina; bakterijska stena po Gramu negativnih bakterij;

zunanja membrana in periplazemski prostor po Gramu negativnih bakterij; lipopolisaharidne molekule.

BAKTERIJSKA KAPSULA

Sestava kapsule; glikokaliks; funkcija in patogenetska vloga kapsule.

BAKTERIJSKI BIČKI

Sestava bička; mehanizem delovanja; kemotaksa bakterij; funkcionalna in patogenetska vloga.

PILUSI

Vrste bakterijskih pilusov; sestava, aderenza in pilusi; spolni pilusi; funkcionalna in patogenetska vloga pilusov.

SPORE

Funkcionalni pomen in struktura bakterijskih spor; sporulacija; germinacija.

RAST IN RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJ

MODEL RASTI BAKTERIJ V ZAPRTEM SISTEMU

DEJAVNIKI RASTI IN RAZMNOŽEVANJA BAKTERIJ

PREHRANA BAKTERIJ

FIZIKALNI DEJAVNIKI RASTI IN RAZMNOŽEVANJA BAKTERIJ

Kisik in bakterije; temperatura; koncentracija vodikovih ionov (pH); osmotski tlak.

BAKTERIJSKA CELICA

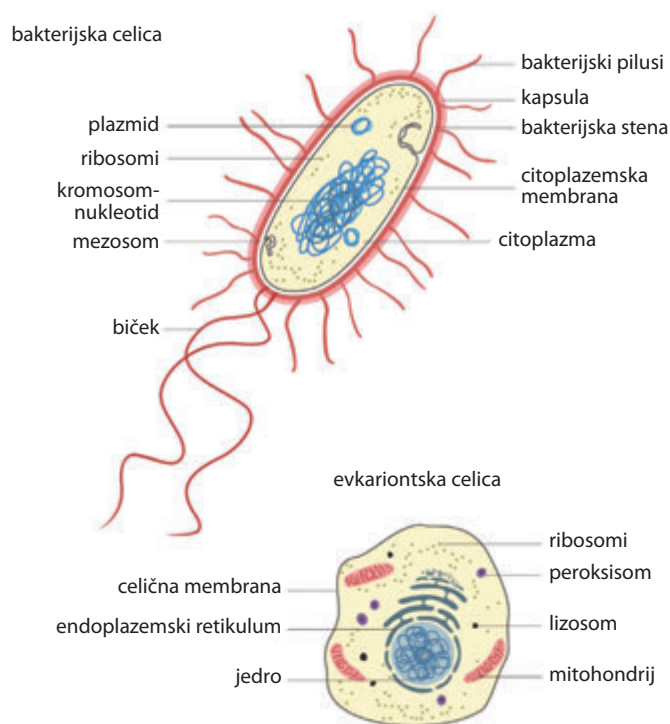
Osnovna enota, ki organizira življenjske procese, je celica. Vsaka živa celica vsebuje gensko informacijo (deoksiribonukleinsko kislino (DNK) in ribonukleinsko kislino (RNK)) in mehanizem za njeno prevažanje v beljakovine. Beljakovine usmerjajo celično presnovo in organizirajo celično strukturo. Osnovna sestavina celice je selektivno prepustna membrana (citoplazemska membrana), ki notranjost celice (citoplazmo) zamejuje od zunanosti. Tako citoplazemska membrana v celici vzdržuje notranje okolje, ki omogoča celične življenjske procese.

EVKARIONTSKE IN PROKARIONTSKE CELICE

Organizme glede na podrobnejšo zgradbo celic delimo na dve skupini – prokarionte in evkarionte. V celicah evkariontov je DNK razdeljena na kromosome. Ti se nahajajo v celičnem jedru, od citoplazme pa jih ločuje jedrna membrana. V citoplazmi so različne membranske strukture – organeli (mitohondriji, kloroplasti, endoplazemski retikulum, Golgijev aparat, lizosomi, eksocitozni mehurčki). Prokariontske celice nimajo organelov. Evkarionti imajo razmeroma velike ribosome (80 S), ki so

sestavljene iz večje podenote (60 S) in iz manjše podenote (42 S). Večja podenota vsebuje rRNK 28 S, manjša pa rRNK 18 S.

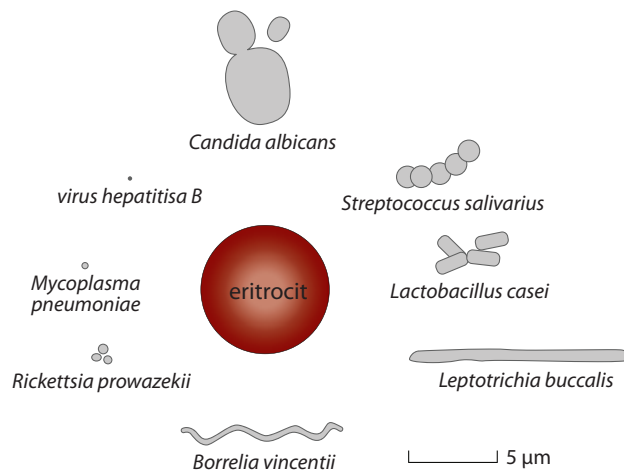
Prokariotska celica ima eno molekulo DNK, ki je praviloma krožna in vsebuje vse informacije, potrebne za celično rast in celično razmnoževanje. Poleg nje ima lahko še manjše, krožne molekule DNK (plazmide). Prokariotske celice nimajo jedra, DNK pa je prosta v citoplazmi. Ribosomi (70 S) so manjši; njihova večja podenota (50 S) vsebuje rRNK 23 S, manjša podenota (30 S) pa rRNK 16 S. Prokariotske celice imajo lahko bičke, kapsulo, peptidoglikan in druge sestavine, ki jih evkariotske celice nimajo. Razlike med prokariotsko in evkariotsko celico prikazujemo na Sliki 1.1.



Slika 1.1. Razlike med prokariotsko (bakterijsko) celico in evkariotsko celico.

VELIKOST IN OBLIKA BAKTERIJ

Bakterijska celica je dolga 0,3–20 μm , premer večine bakterij pa je približno 1 μm . Bakterije lahko opazujemo z mikroskopiranjem pri približno 1000-kratni povečavi. Razmerje med velikostjo mikroorganizmov in človeških eritrocitov prikazujemo na Sliki 1.2. Pred mikroskopiranjem bakterije navadno obarvamo. Najpogostejša tehnika v bakteriologiji je barvanje po Gramu, ki omogoča, da bakterije razdelimo v skupino po Gramu pozitivnih bakterij in v skupino po Gramu negativnih bakterij.

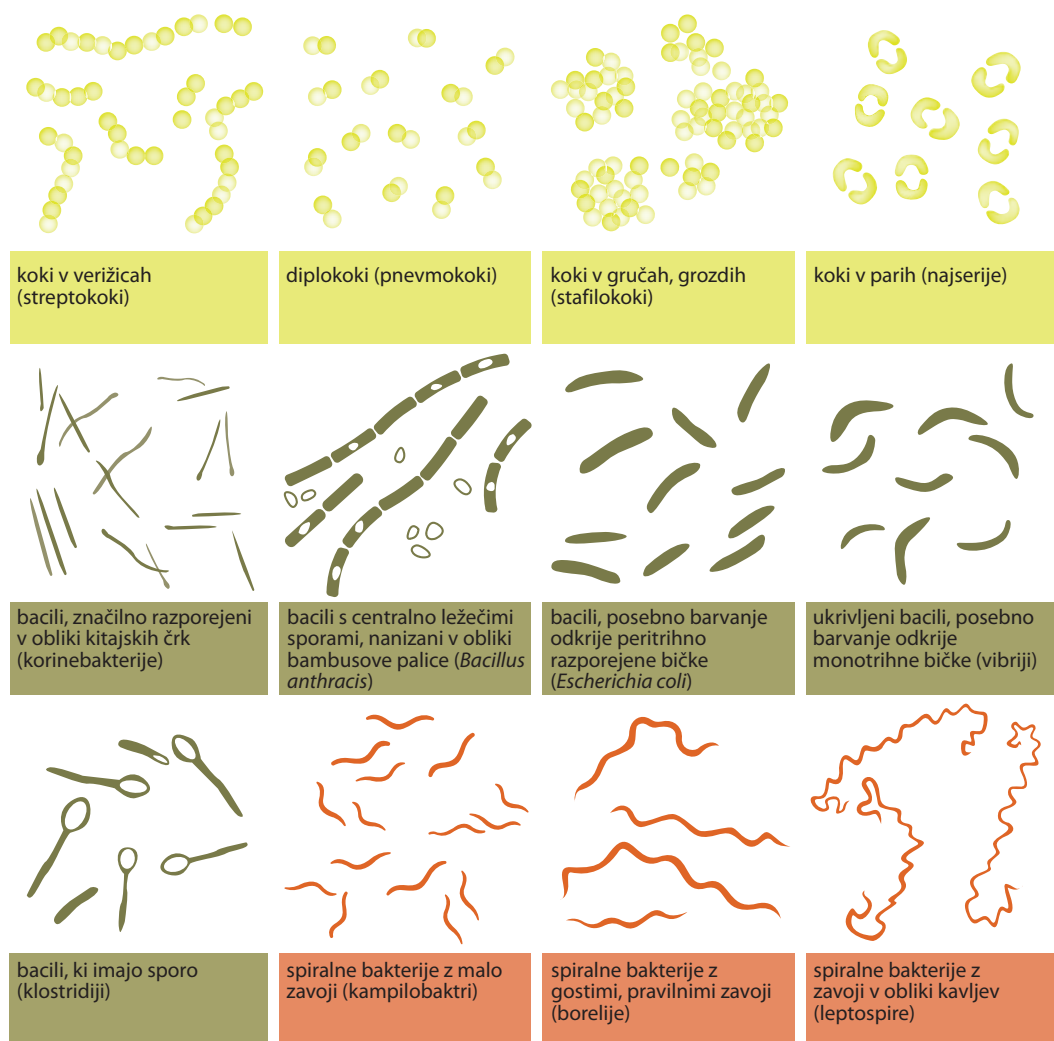


Slika 1.2. Primerjava med velikostjo mikroorganizmov in velikostjo človeških eritrocitov.

Po Gramu barvamo tako, da posušen in fiksiran razmaz bakterij na objektnem stekelcu obarvamo z metilvijoličnim barvilom in z Lugolovo raztopino. Bakterije, ki barvilo zadržijo in jih z organskim topilom (alkoholom in acetonom) ne moremo razbarvati, imenujemo po Gramu pozitivne bakterije, bakterije, ki so se razbarvale, pa po Gramu negativne bakterije. Opazujemo jih tako, da jih po razbarvanju obarvamo še z rdečim barvilom (safraninom ali karbolfuksinom). V obarvanem preparatu so po Gramu pozitivne bakterije modrovijolične, po Gramu negativne bakterije pa rdeče. Različna obarvanost po Gramu pozitivnih bakterij in po Gramu negativnih bakterij je posledica različne zgradbe njihovih celičnih sten.

Celična stena daje bakterijski celici stalno in značilno obliko. Bakterije so po obliki kroglaste (koki) ali paličaste (bacili). Vmesne oblike (kokobacile) lahko opišemo kot kratke bacile ali podaljšane koke. Nekatere vrste paličastih bakterij so na različne načine ukrivljene (spirili). Posebno morfologijo imajo spiralne bakterije (spirohete). Oblike bakterij prikazujemo na Sliki 1.3.

Nekatere bakterijske vrste se značilno urejajo v skupine (npr. korinebakterije). Po delitvi na dvojce sta novonastali bakterijski celici lahko še nekaj časa povezani. Tako nastane značilno združevanje bakterij. Če delitve potekajo vedno samo v eni ravnini (polarno) in bakterije ostanejo zlepljene več generacij, nastanejo verižice (npr. streptokoki). Pri kratkotrajnejšem zlepljanju nastanejo pari (npr. pnevmokoki). Delitve v več ravninah in dolgotrajno zlepljanje povzročijo tvorbo grozdastih skupin (npr. stafilokoki). Nekatere vrste paličastih bakterij se tudi razvejujejo (npr. mikobakterije) ali celo tvorijo micelijem podobne strukture (npr. streptomicete). Urejanje bakterij prikazujemo na Sliki 1.3.



Slika 1.3. Oblike bakterij in njihovo urejanje (posamezne bakterije, verižice, skupki, grozdi).

ZGRADBA BAKTERIJSKE CELICE

Notranjost bakterijske celice izpolnjuje citoplazma, ki jo navzven zamejuje selektivno prepustna citoplazemska membrana. Nukleoid je območje v citoplazmi, kjer je strnjen bakterijski kromosom. Bakterijska stena je trdno ogrodje, ki obdaja citoplazemsko membrano in bakterijam omogoča, da preživijo v okolju, v katerem koncentracije osmotsko aktivnih molekul niso uravnotežene z bakterijsko citoplazmo. Nekatere vrste bakterij se navzven obdajo z dodatnim ovojem, t. i. bakterijsko kapsulo, ki jih varuje pred neugodnimi vplivi okolja. Bakterije, ki imajo bičke, se lahko gibajo usmerjeno (npr. v smeri večje koncentracije hranil). Bakterijske fimbrije in pilusi bakterijam omogočajo pritrjevanje na trdne površine. Posebna vrsta so spolni pilusi, ki omogočajo izmenjavo DNK med bakterijami, t. i. konjugacijo. V neugodnih razmerah se nekatere vrste bakterij preoblikujejo v metabolno

neaktivne oblike, ki so zelo odporne proti škodljivim vplivom in jih imenujemo bakterijske spore. Bakterijsko celico sestavlja pretežno voda (70 %), v kateri so organske in anorganske snovi, potrebne za celično presnovo (npr. encimi in druge beljakovine, ogljikovi hidrati, maščobe, raztopljeni plini). V citoplazmi so poleg nukleoida tudi ribosomi, plazmidi in različni citoplazemski vključki (npr. iz škroba, žvepla, železa, maščob).

NUKLEOID

Nukleoid je območje, kjer se v citoplazmi nahaja bakterijska DNK. Zaradi vlaknate strukture jo je elektronskomikroskopsko mogoče razločiti v citoplazmi. DNK je krožen, izjemoma linearen (npr. pri bakteriji *Borrelia burgdorferi*) haploiden kromosom, ki bi v izravnani obliki meril približno 1 mm. Kromosom je na eni točki povezan z invaginacijo citoplazemske membrane (mezosomom). Mezo-

som pri podvojevanju celice omogoči ločitev dveh podvojenih kromosomov, pozneje pa tudi izgradnjo bakterijske stene med podvojenima kromosomoma in s tem ločitev celice na dve novi bakteriji.

CITOPLAZEMSKA MEMBRANA

Citoplazemska membrana je poltekoči dvosloj fosfolipidov, v katerega so umeščene beljakovine. Beljakovine v dvosloju omogočajo:

1. selektivno prepustnost in aktivni prenos snovi;
2. verižni prenos elektronov (e^-) do končnega akceptorja, izrivanje protonov (H^+) iz celice in oksidativno fosforilacijo (vstop protonov v celico skozi encim ATP-sintetazo);
3. prenos bakterijskih hidrolitičnih encimov v okolico;
4. prostorsko organizacijo multiencimskih skupkov za gradnjo DNK, citoplazemske membrane in bakterijske stene;
5. receptorsko funkcijo za signale iz okolice (npr. hranila, kemotaktične snovi).

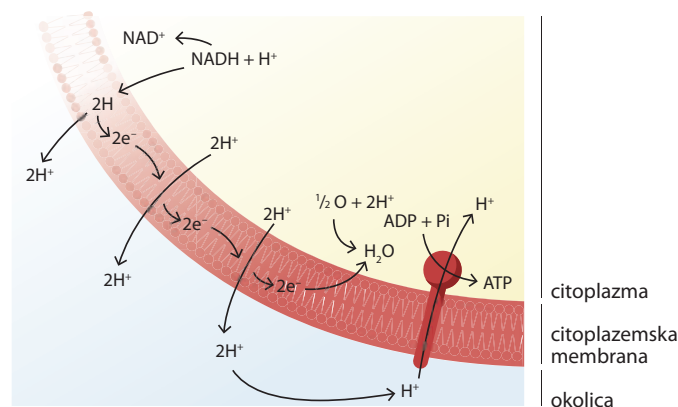
1. Selektivna prepustnost in aktivni prenos snovi

Membranske beljakovine permeaze specifično vežejo določene snovi (npr. kalij, natrij, glukozo, laktozo itd.) in omogočajo njihov prenos skozi membrano. Prenos je lahko pasiven (tj. z olajšano difuzijo v smeri manjše koncentracije snovi) ali aktiven (tj. v smeri večje koncentracije snovi). Aktivni prenos porablja energijo, zato mora imeti na voljo visoko-energijsko molekulo ATP. Ne glede na to, ali gre za pasivni ali aktivni transport, razlikujemo prenos ene snovi skozi permeazo samo v eno smer (t. i. uniport), prenos dveh snovi skozi permeazo v eno smer (t. i. simport) ter skozi permeazni prenos ene snovi v eno smer in druge snovi v drugo smer (t. i. antiport).

Skupinska translokacija je energijska združitev prenosa snovi skozi membrano in bakterijskega metabolizma. Permeaze, ki prenašajo nekatere sladkorje (npr. glukozo, manozo), so encimi, ki ob prenosu molekulo sladkorja še fosforilirajo. V citoplazmo jo sprostijo v fosforilirani obliki, ki je že prva stopnja metabolizma (npr. glukosa-6-fosfat). Zato v citoplazmi ni glukoze, kar omogoča pasiven vstop glukoze v celico zaradi koncentracijskega gradienta, po drugi strani pa fosforilirana glukosa ne more iz celice, ker zaradi močne polarnosti ne prehaja skozi dvojni maščobni sloj.

2. Elektronski prenos in oksidativna fosforilacija

V citoplazemski membrani bakterij so encimi dihalne verige, pomembni za bakterijsko respiracijo (aerobno in/ali anaerobno). Gre za zelo raznolike encime, ki so zapisani v bakterijskem genomu. Encimi dihalne verige (npr. citokromi) izrabljajo energijsko ugoden prenos elektronov (e^-) od molekule $NADH^+$ (iz citratnega cikla) do končnega akceptorja (kisika pri aerobni respiraciji, organske molekule pri anaerobni respiraciji), s čimer izrivajo protone (H^+) iz celice proti njihovem elektrokemijskemu gradientu. Transmembranski encimi ATP-aze izrabljajo elektrokemijski gradient protonov v okolici bakterije, ob vstopu protonov skozi ATP-aze pa se molekula ADP fosforilira v ATP. Transport elektronov in protonov prikazujemo na Sliki 1.4. Membranski encimi aerobnih bakterij imajo visok potencial verižnega prenosa elektronov, izrivanja protonov ter s tem hitrega ustvarjanja visokega elektrokemijskega gradienta protonov in posledičnega nastajanja velikega števila molekul ATP. Proces imenujemo oksidativna fosforilacija. Membranski encimi anaerobnih bakterij takšnega potenciala nimajo, zato izrivanje protonov iz celice poteka v manjšem obsegu in tudi izplen nastanka ATP je manjši. Pri evkariontih podoben proces poteka v membrani mitohondrijev, kar zanesljivo potrjuje teoriji, da so mitohondriji pravzaprav bakterije, ki so v preteklosti simbiozno zaživele z evkariontskimi celicami. Večina za človeka patogenih bakterij nosi zapise za različne encime dihalne verige. Glede na pogoje, v katerih se bakterija nahaja (ugodni, neugodni, aerobni, anaerobni), se vključijo geni, ki kodirajo beljakovine dihalne verige, potrebne za preživetje v trenutnem okolju. Takšne bakterije imenujemo fakultativno anaerobne bakterije (npr. *E. coli*).



Slika 1.4. Transport elektronov in protonov v citoplazemski membrani bakterije.

3. Prenos bakterijskih hidrolitičnih encimov v okolico Bakterije v svojo okolico izločajo številne encime, ki makromolekule (beljakovine, polisaharide, maščobe) razgrajujejo na sestavine, ki jih bakterijska celica lahko prenaša skozi citoplazemsko membrano in jih nato porabi v svoji presnovi. Po Gramu pozitivne bakterije izločajo encime neposredno v okolico, po Gramu negativne pa v periplazemski prostor, od koder se z različnimi mehanizmi prenesejo v okolico bakterije. Bakterijske beljakovine, namenjene za izločanje, se začnejo sintetizirati na ribosomih v citoplazmi. Začetna beljakovinska veriga iz približno 20 aminokislin tvori signalno zaporedje, ki nastajajočo beljakovino z ribosomi vred pritrdi na specifične membranske beljakovine. To omogoči, da se novonastajajoča beljakovina pomika navzven, tj. iz celice. Po končani sintezi membranske peptidaze odrežejo signalno zaporedje in s tem beljakovino sprostijo v okolico oziroma v periplazemski prostor.

4. Prostorska organizacija večencimskih skupkov za gradnjo DNK, citoplazemske membrane in bakterijske stene

V citoplazemski membrani so večencimski skupki,

ki s svojo prostorsko ureditvijo omogočajo boljše medsebojno organizacijo posameznih encimov in substratov (npr. encimi za sintezo fosfolipidov). V membrani mezosomov so tudi nekateri encimi, potrebni za podvojevanje DNK.

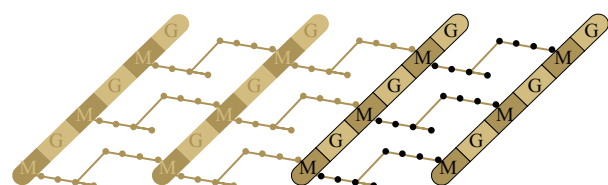
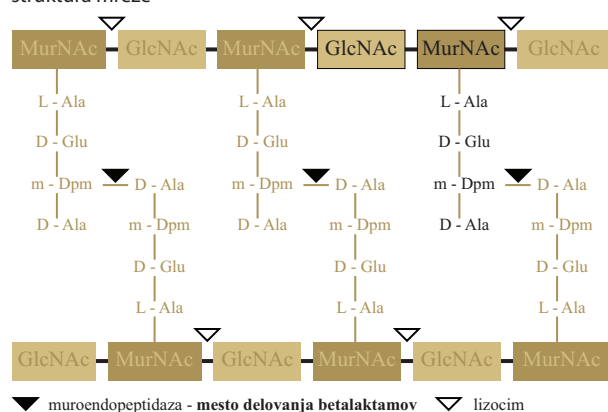
5. Receptorska funkcija za signale iz okolice

Citoplazemska membrana ima receptorje, zlasti za hranila, ki jih bakterija lahko uporablja za presnovo. Receptorji omogočajo kemotakso (usmerjeno gibanje bakterij) ter indukcijo encimov in prenosnih beljakovin, včasih pa je receptorska vezava hkrati že prva stopnja prenosa neke snovi v bakterijsko celico.

BAKTERIJSKA STENA

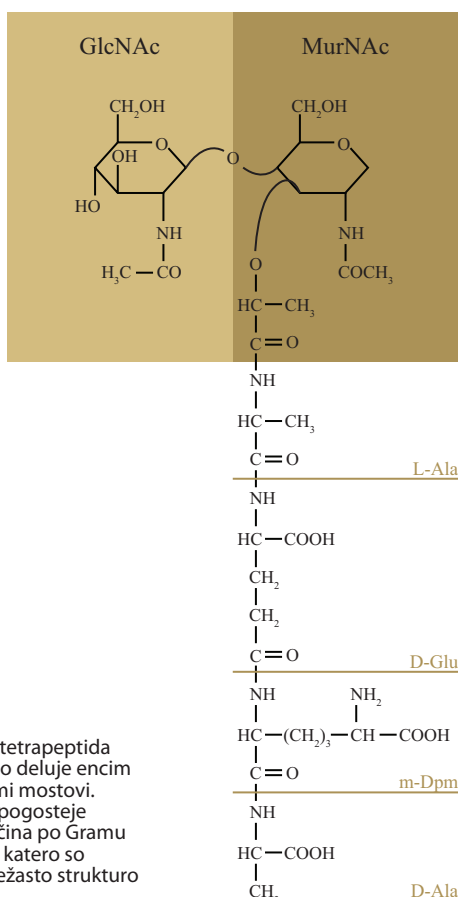
Bakterijska stena obsega vse strukture, ki se nahajajo nad citoplazemsko membrano bakterije. Bakterijska stena je trdno ogrodje, ki daje bakterijam obliko in jim omogoča, da živijo v okolju, v katerem koncentracije osmotsko aktivnih molekul niso uravnotežene z bakterijsko citoplazmo. Bakterija v citoplazmi koncentrira številne osmotsko aktivne molekule (npr. elektrolite, ogljikove hidrate, beljakovine), ki

struktura mreže

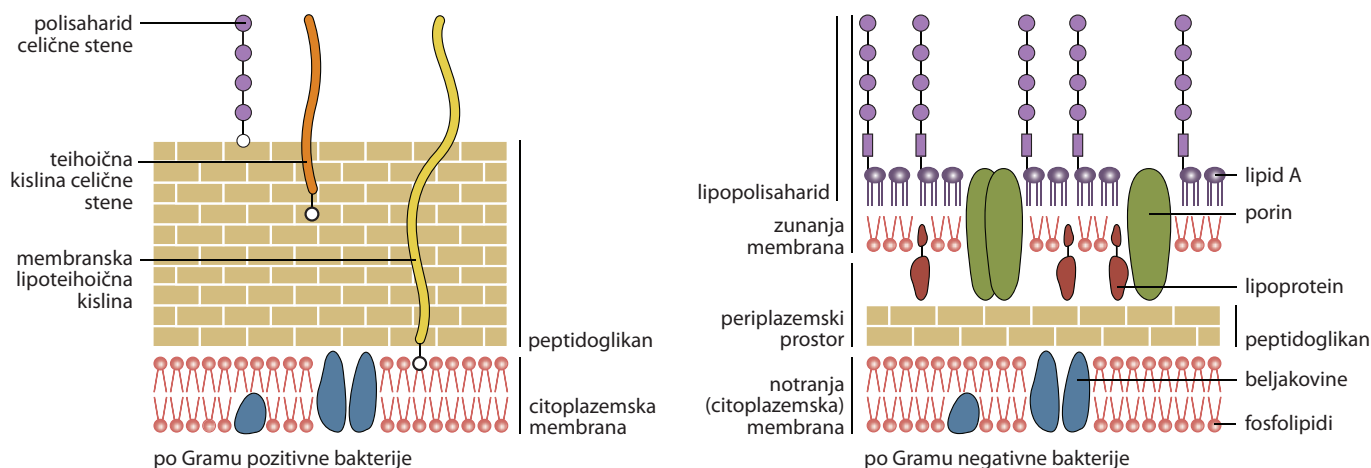


Osnovni gradnik je iz N-acetilglukozamina (GlcNAc) in N-acetilmuramiltetrapeptida (Mur-NAc), ki sta med seboj spojena z beta (1, 4) glikozidno vezjo (nanjo deluje encim lizocim). Osnovni gradniki so med seboj povezani s peptidnimi prečnimi mostovi. Sestava tetrapeptida se razlikuje od vrste do vrste. Na položaju 1 je najpogostejše L-alanin, na položaju 4 pa D-alanin. Položaja 2 in 3 sta spremenljiva; večina po Gramu negativnih bakterij ima na tem položaju diaminopimelinsko kislino, na katero so vezani lipoproteini celične stene. Povezani osnovni gradniki tvorijo mrežasto strukturo - peptidoglikan, ki ovija bakterijsko celico.

struktura osnovnih gradnikov



Slika 1.5. Struktura peptidoglikana z osnovnima gradnikoma N-acetilglukozaminom (GlcNAc; G) in N-acetilmuraminsko kislino (MurNAc; M) ter mesto delovanja encima lizocima (▽). Prečni peptidni mostovi: na položaju 1 L-alanin (L-Ala), na položaju 4 D-alanin (D-Ala), na položajih 2 in 3 spremenljivo. Mesto delovanja encima muroendopeptidaze (▼).



Slika 1.6. Zgradba bakterijske stene po Gramu pozitivnih bakterij in po Gramu negativnih bakterij.

proti okolici (npr. vodi) povzročijo visok notranji osmotski tlak (5–20 atm). Nastali tlak daleč presega trdnost citoplazemske membrane, zato bi bakterijo razneslo, če je kot lupina ne bi obdajala trdna stena.

Peptidoglikan je kompleksen polimer, ki omogoča trdno zgradbo bakterijske stene. Njegova osnovna gradnika sta N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminska kislina, ki sta z beta (1, 4) glikozidno vezjo, na katero deluje lizocim, izmenično povezani v dolgo polisaharidno verigo. Osnovni gradniki so med seboj s kratkimi tetrapeptidnimi prečnimi mostovi povezani v trdno mrežo, ki ovija bakterijsko celico. Sestava tetrapeptida se od vrste do vrste razlikuje. Na položaju 1 je najpogostejše L-alanin, na položaju 4 pa D-alanin. Položaja 2 in 3 sta spremenljiva; večina po Gramu negativnih bakterij ima na teh položajih diaminopimelinsko kislino, na katero so vezani lipoproteini celične stene. Zaradi zamreženosti je ves bakterijski peptidoglikan ena sama velikanska molekula. Strukturo peptidoglikana prikazujemo na Sliki 1.5.

Peptidoglikanska mreža ovija po Gramu pozitivne bakterije v številnih plasteh (do 40) in tvori do 50 % mase bakterijske stene. Po Gramu negativne bakterije so ovite samo z enojno ali dvojno plastjo peptidoglikana (5–10 % mase bakterijske stene). Zgradbo bakterijske stene po Gramu pozitivnih bakterij in po Gramu negativnih bakterij prikazujemo na Sliki 1.6.

Bakterijska stena po Gramu pozitivnih bakterij

Bakterijska stena po Gramu pozitivnih bakterij poleg peptidoglikana vsebuje tudi znatne količine teihoične kisline (do 50 % mase bakterijske stene). Teihoični kislini sta dve: lipoteihoična kislina je ko-

valentno povezana z glikolipidi citoplazemske membrane, teihoična kislina celične stene pa ovija peptidoglikan in tvori zunanjo plast bakterijske stene. Zaradi zunanje lege je teihoična kislina pomembna pri pritrjevanju bakterij na gostiteljeve celice, hkrati pa je proti njej usmerjena tudi večina protiteles, ki nastajajo proti po Gramu pozitivnim bakterijam.

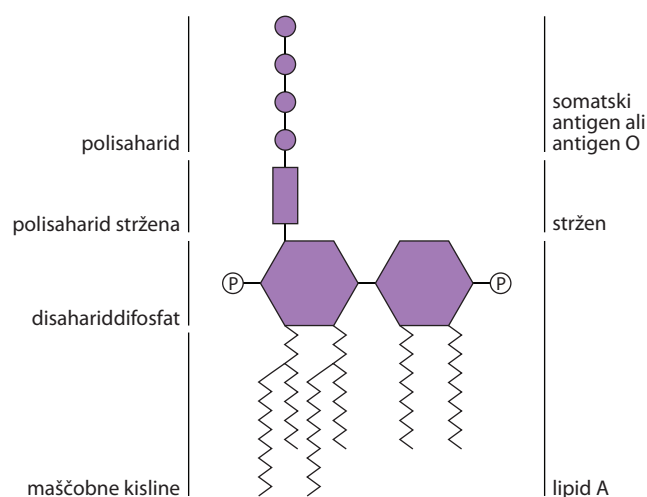
Nekatere bakterijske vrste imajo v celični steni veliko polisaharidnih molekul. Shemo bakterijske stene po Gramu pozitivnih bakterij prikazujemo na Sliki 1.6.

Bakterijska stena po Gramu negativnih bakterij

Bakterijska stena po Gramu negativnih bakterij vsebuje dve dodatni plasti, ki navzven obdajata peptidoglikan. Ti sta zunanja membrana in periplazemski prostor, ki je vmesni prostor med citoplazemsko membrano oz. peptidoglikanom in zunanjo membrano. Shemo bakterijske stene po Gramu negativnih bakterij prikazujemo na Sliki 1.6.

1. Zunanja membrana je zgrajena kot asimetrični maščobni dvosloj, v katerega so vložene beljakovine. Med njimi so zlasti pomembne transmembranske beljakovine (porini), ki omogočajo prehajanje snovi skozi zunanjo membrano po načelu olajšane difuzije. Notranji maščobni sloj je podoben fosfolipidnemu sloju citoplazemske membrane, zunanji maščobni sloj pa sestavljajo lipopolisaharidne molekule.

Lipopolisaharid (LPS) je sestavljen iz maščobne molekule, imenovane lipid A. Nanj je vezan središčni polisaharid (stržen), iz katerega štrlijo terminalne polisaharidne verige. Strukturo lipopolisaharida prikazujemo na Sliki 1.7. Osnovo lipida A tvorijo enote fosforiliranega glukozamina, na katerega so pritrjene dolgoveržne maščobne kisline. Vrsta maščobnih



Slika 1.7. Struktura lipopolisaharida.

kislin je odvisna od bakterijske vrste. Sestava središčnega polisaharida je podobna pri vseh po Gramu negativnih bakterijah, ki imajo LPS, medtem ko so po sestavi terminalnih polisaharidnih verig v skupini po Gramu negativnih bakterij velike razlike.

Terminalna polisaharidna veriga je sestavljena iz osnovnih trisaharidnih, tetrasaharidnih ali penta-saharidnih enot, ki se ponovijo do 25-krat. Terminalni polisaharidi štrlijo iz bakterijske stene in zaradi svoje zunanje lege izzovejo močan protitelesni imunski odziv, zato so pomembni kot antigeni po Gramu negativnih bakterij. Hkrati so za bakterijo značilni spoznavni antigeni (antigeni O), ki omogočajo identifikacijo bakterij. Glede na raznoliko sestavo terminalnih polisaharidov razlikujemo številne različice antigenov O (samo pri salmonelah jih npr. poznamo več kot 2000).

Molekule LPS so pomembne zaradi toksičnih učinkov. Toksični učinek LPS je skoraj v celoti vezan na lipid A (Slika 1.7), saj ob razpadu bakterijske celice razpade tudi LPS, pri čemer se sprosti lipid A z zelo močnim toksičnim učinkom. LPS spodbudi makrofage k izločanju velike količine mediatorjev imunskega sistema – citokinov (npr. interleukina 1, tumorje nekrotizirajočega faktorja (TNF)). Večja količina citokinov v organizmu povzroči hude okvare žilja, zato obsežnejša okužba s po Gramu negativnimi bakterijami lahko privede celo do septičnega šoka.

Nekatere po Gramu negativne bakterije, ki so sicer naseljene na sluznicah (npr. najserije, hemofilusi), imajo namesto dolgoveržnih terminalnih polisaharidov mnogo krajše in razvejane polisaharide. Pri njih zato ne govorimo o LPS, ampak o lipooligosaharidih. Nekateri lipooligosaharidi (npr. pri patogenih

najserijah) imajo terminalne sladkorje (npr. N-acetil-laktozamin), ki so podobni eritrocitnim molekulam, na katere lahko bakterija encimsko veže človeško sialično kislino in z njo zamaskira svojo površino, da je imunske celice in protitelesa ne prepoznajo.

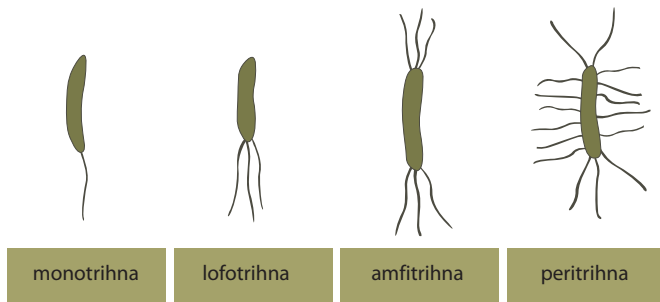
2. Periplazemski prostor stabilizirajo maščobno-beljakovinske molekule, ki so z beljakovinskim koncem vezane na peptidoglikan, maščobni del pa je nekovalentno usidran v zunanjo membrano. V periplazemskem prostoru so poleg številnih maščobno-beljakovinskih molekul vezavne beljakovine za različna hranila (aminokisline, sladkorje, vitamine), hidrolitični encimi za razgradnjo visokomolekularnih hranil in tudi encimi, ki inaktivirajo različne antibiotike (npr. betalaktamaze, aminoglikozidfosforilaze).

Protoplasti, sferoplasti, oblike L

Bakterijam lahko razgradimo peptidoglikansko plast (encim lizocim npr. specifično cepi vez med N-acetilglukozaminom in N-acetilmuraminsko kislino) ali preprečimo njeno biosintezo (npr. s penicilinom) na različne načine. Ker citoplazemska membrana ne vzdrži znatnega osmotskega tlaka, bakterije brez stene v hipoosmozem okolju ne preživijo, medtem ko bakterije brez peptidoglikana lahko vzdržujemo v izoosmozem okolju. Po Gramu pozitivne bakterije v tem primeru oblikujejo z membrano obdane kroglaste celice, ki jih imenujemo protoplasti. Po Gramu negativne bakterije zaradi zunanje membrane in periplazemskih lipoproteinov ohranijo nekoliko bolj trdno strukturo in s svojo morfologijo še vedno nakazujejo svojo prvotno obliko (sferoplasti). Ko se sferoplasti ali protoplasti lahko razmnožujejo, jih imenujemo bakterijske oblike L. Bakterijske celice v obliki L sicer izgubijo gibljivost, a lahko še vedno izločajo encime in toksine ter s tem izražajo manifestno obliko okužbe. Če bakterijske oblike L povzročimo z antibiotikom, se po odstranitvi antibiotika iz njih pogosto razvijejo normalne oblike bakterij s celično steno (npr. ponoven izbruh bolezni po zdravljenju). Če je nezmožnost peptidoglikanske izgradnje posledica sprememb bakterijskega genoma (npr. mutacije), je oblika L lahko tudi trajna.

BAKTERIJSKA KAPSULA

Številne bakterije tvorijo zunajcelični polisaharidni sloj. Polisaharid, ki tesno in kompaktno obdaja bakterijo, je kapsula. Če gre zgolj za mrežo polisahari-



Slika 1.8. Razporeditev bičkov na bakterijski celici.

dnih vlaken, ki se širijo od bakterije, tvorbo imenujemo glikokaliks, ki je pomemben pri nastanku biofilma. V nekaterih primerih bakterija tvori zunanajcelično sluz, ki ni tesno vezana na bakterijo in služi kot zaščitno, za rast ugodno okolje, ki pogosto pomaga pri pritrditvi na podlago. Poznamo en sam primer nepolisaharidne bakterijske kapsule – *Bacillus anthracis*, ki izdeluje polipeptidno kapsulo.

Kapsule patogene bakterije pogosto varujejo pred protitelesi in fagocitozo, s čimer povečujejo invazivnost bakterije. Glikokaliks omogoča predvsem pritrjevanje (adherenco) bakterij na različne površine (npr. adherenco kariogene bakterije *Streptococcus mutans* na zobno površino).

BAKTERIJSKI BIČKI

Bakterije se aktivno gibljejo predvsem z bički (flageli), ki se vrtijo z razmeroma veliko frekvenco (tudi več tisoč obratov na minuto). Rotacija bička deluje podobno kot ladijski vijak in potiska bakterijo. Orientacija bičkov se lahko spreminja zaradi različnih dražljajev, kar bakteriji omogoča usmerjeno gibanje. Pri paličastih bakterijah so bički lahko razmeščeni polarno (monotrihno – en biček na enem polu; lofotrihno – več bičkov na enem polu; amfitrihno – bički na obeh polih), lateralno ali po vsej površini (peritrihno). Razporeditev bičkov na bakterijski celici prikazujemo na Sliki 1.8.

Bički so iz vlaken, ki jih tvori beljakovina flagelin. Osnovne enote flagelina se vijačno združujejo v dolgo, cilindrično strukturo – vlakno. Rotacijski pogon je nameščen na mestu, kjer je biček vsajen v citoplazemsko membrano. Beljakovinsko strukturo, v katero je vsajen biček, imenujemo bazalno telesce. V njem se vrti bazalni del bička. Rotacijo poganja protonski gradient, ki je vzpostavljen med zunanostjo in notranostjo citoplazemske membrane. Vsadišče bička v bakterijsko steno se med po Gramu negativ-

nimi bakterijami in po Gramu pozitivnimi bakterijami nekoliko razlikuje. Vsadišče bička v bakterijsko steno po Gramu negativne bakterije prikazujemo na Sliki 1.9.

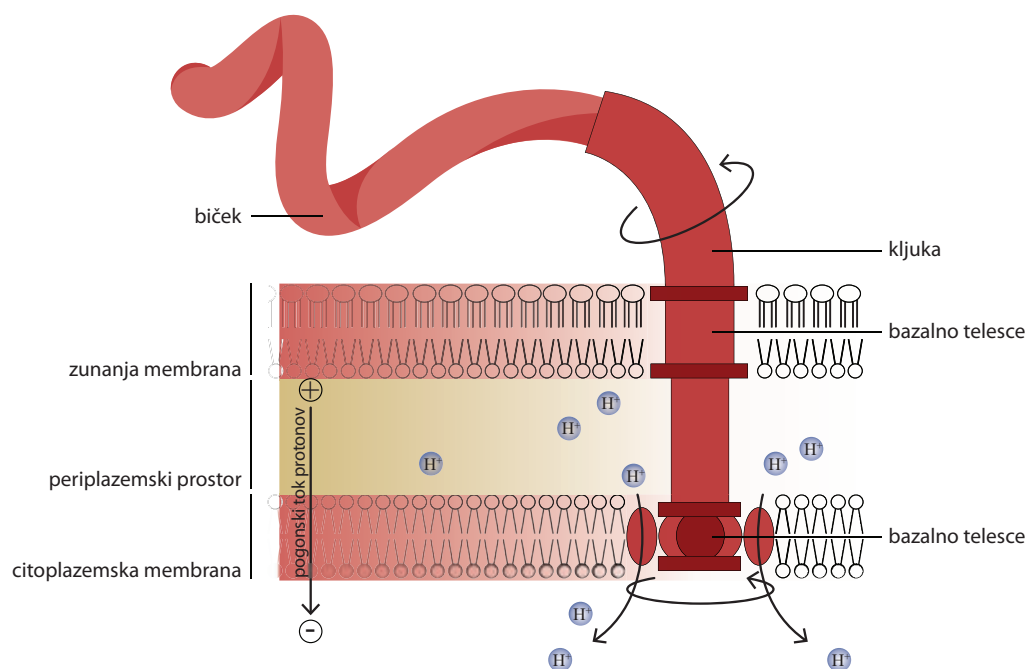
Receptorji za posamezne snovi (npr. sladkorje, aminokisline) lahko po vezavi substrata povzročijo spremenjeno orientacijo bičkov in s tem usmerjeno gibanje bakterije glede na koncentracijo snovi. Pojav imenujemo kemotaksa. Pri hranilih gre navadno za gibanje proti večji koncentraciji snovi, medtem ko posamezne snovi (npr. c-GMP) lahko izzovejo tudi usmerjeno gibanje proč od sebe. Poleg kemotakse poznamo tudi usmerjeno gibanje zaradi drugačnih dražljajev; aerotaksa je gibanje proti optimalni koncentraciji kisika, fototaksa pa gibanje proti svetlobi.

Struktura flagelina se pri posameznih bakterijskih vrstah in podvrstah razlikuje, zato poznamo tudi številne antigenske različice bakterijskih bičkov. Antigensko različnost bičkov lahko uporabimo pri opredelitvi oziroma razlikovanju bakterij (npr. pri salmonelah). Po okužbi bički izzovejo gostiteljev imunski odziv in so zaradi stika z okoljem močno izpostavljeni protitelesnemu imunskemu odzivu.

FIMBRIJE IN PILUSI

Nekatere po Gramu negativne bakterije imajo na površini številna (nekaj deset do nekaj tisoč) vlakna (0,2–2 μm dolge izrastke, ki štrlijo iz bakterije), ki so krajša in tanjša od bičkov. Sestavlja jih beljakovina, imenovana pilin, ki ima molekulsko maso 20 kDa. Več pilinskih beljakovin je vijačno nanizanih v obliki dolgih, upogibljivih nitk. Vlakna izhajajo iz celične stene in se v nasprotju z bički ne vrtijo. Razlikujemo dve vrsti bakterijskih izrastkov – fimbrije in piluse.

Kratke in tanke fimbrije bakterije navadno potrebujejo predvsem za pritrjevanje na površino (gonokokom npr. omogočijo, da se pritrdijo na ploščat epitel v materničnem vratu). Za vezavo na površino gostiteljeve celice je odločilen vrh fimbrije, ki ima posebne adhezivne beljakovine. Receptorske molekule na gostiteljevih celicah so najpogostejše sladkorni ostanki površinskih glikoproteinov ali glikolipidov. Vezava fimbrijskih adhezinov in ustreznih receptorjev gostiteljeve celice je specifična in določa občutljivost tkiv na različne bakterijske vrste. Fimbrije kodira bakterijski kromosom, najdemo pa jih pri po Gramu pozitivnih bakterijah in pri po Gramu negativnih bakterijah.



Slika 1.9. Vsadišče bička v bakterijsko steno po Gramu negativne bakterije.

Daljši izrastki so pilusi (do deset na celico), ki so zapisani na bakterijskih plazmidih, in jih imajo samo po Gramu negativne bakterije. Ker omogočajo izmenjavo genov med sorodnimi bakterijami (konjugacija), jih imenujemo tudi spolni pilusi.

SPORE

Nekatere bakterije se v neugodnih življenjskih razmerah (pomanjkanje hranil oz. vode, neugodna temperatura, drugo) v procesu sporulacije preoblikujejo v spore. Med sporulacijo iz posamezne bakterije nastane ena sama spora, ki bakteriji omogoča, da preživi v neugodnih razmerah. Proces sporulacije in zgradbo bakterijske spore prikazujemo na Sliki 1.10.

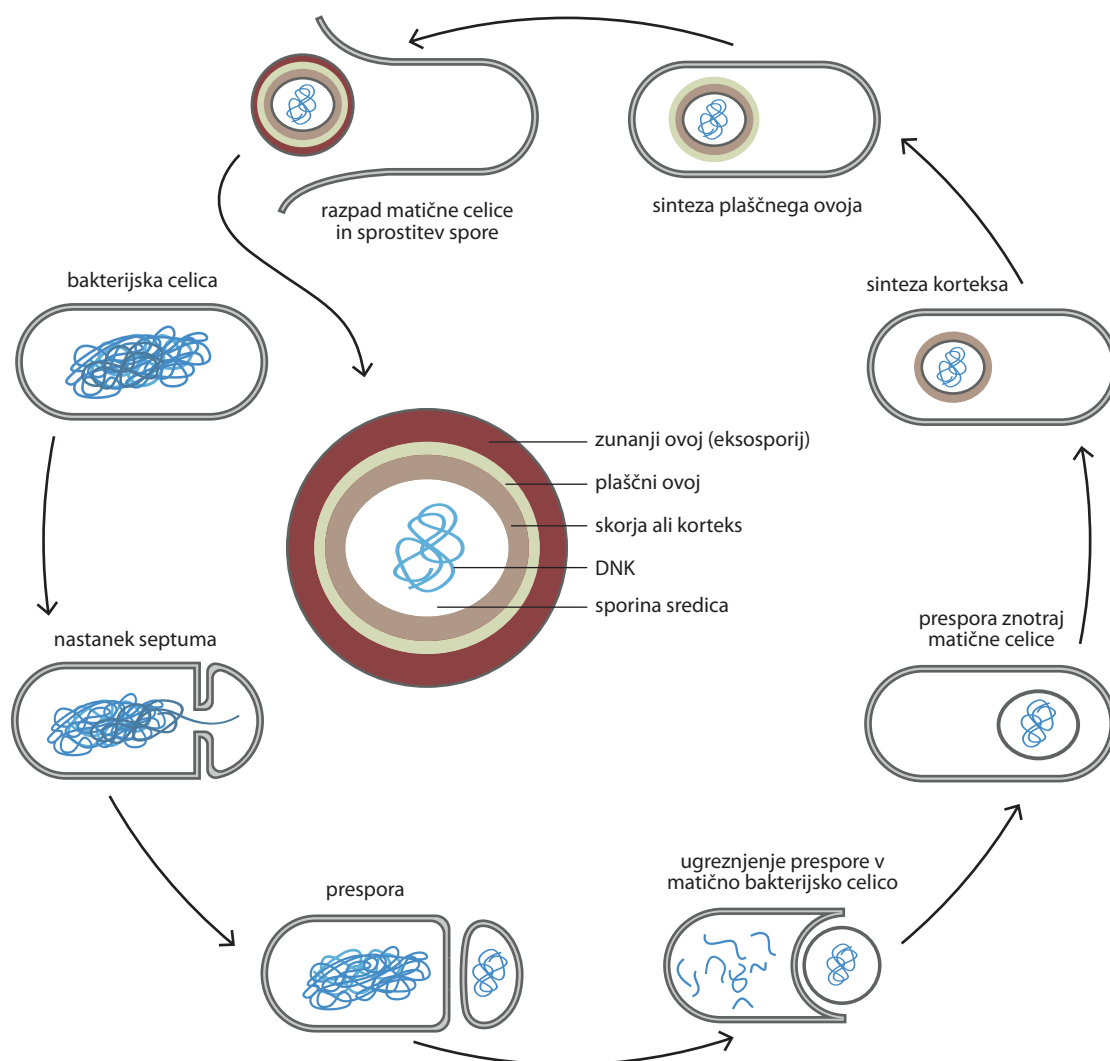
Spora je metabolno neaktivna celica, ki ima v citoplazmi ohranjen celoten genom, navzven pa je obdana z debelo in trdno steno. Zaradi sestave je zelo odporna proti izsušitvi, vročini in škodljivim kemikalijam. Ko se spora vrne v ugodnejše okolje (tudi po letih, desetletjih, stoletjih), se iz nje ponovno razvije metabolno aktivna bakterija – proces imenujemo germinacija. Pojav je torej povsem različen od evkariontske tvorbe spor (npr. pri glivah), ki je način razmnoževanja. Sporulacija je značilna za razmeroma redke vrste medicinsko pomembnih bakterij (rodova *Bacillus* in *Clostridium*).

Sporulacija se prične v neugodnem okolju, zlasti ob pomanjkanju hranil. Kot odziv na neugodne

razmere se aktivirajo geni, ki zaženejo diferenciacijo bakterijske celice v sporo. Proces sporulacije traja nekaj ur (npr. 7 ur pri bakteriji *Bacillus subtilis*).

Prvi morfološki znak sporulacije je replikacija DNK, nato pa se od površine bakterije proti sredini ugrezne duplikatura citoplazemske membrane (septum) in razdeli celico (Slika 1.10). Po razdelitvi se v manjšem delu kondenzira ena molekula DNK, ki vsebuje celoten bakterijski genom, in se pogrezne v preostali (večji) del bakterijske celice (prespora). Tako je prespora v bakteriji, njena membrana pa je navzven obdana s citoplazemsko membrano bakterije. Obe prilegajoči se membrani sodelujeta pri tvorbi ovojev, ki sporo varujejo pred zunanjimi vplivi. Neposredno na membrani prespore se oblikuje sporina stena, ki vsebuje peptidoglikan, nad sporino steno pa skorja (korteks), ki je najdebelejši del sporinega ovoja. Skorjo tvorijo peptidoglikan, ki je razmeroma slabo zamrežen s križnimi povezavami, dipikolonična kislina in Ca^{++} . Na zunanji strani obeh prilegajočih se membran se oblikuje še plaščni ovoj iz keratinu podobne beljakovine, ki je nemočljiva in omogoča, da je spora odporna proti številnim baktericidnim kemikalijam. Plaščni ovoj je obdan še z zunanjim ovojem iz maščob in beljakovin.

Sporina sredica vsebuje bakterijski genom, encime za proteinsko sintezo, glikolitične encime in zaloge visokoenergijskih molekul v obliki 3-fosfoglicerata. Odpornost encimov proti toplotni denaturaciji je delno posledica dehidriranega stanja sredice, del-



Slika 1.10. Proces sporulacije in zgradba bakterijske spore.

no pa velikih količin kalcijevega dipikolinata, ki stabilizira encime proti toplotni denaturaciji. Spora lahko ostane v matični celici (pri tem sta lega in oblika spore značilni za identifikacijo bakterije), lahko pa pride do lize matične celice (kot tudi do lize DNK vegetativne celice) in spora se sprostí v okolje.

Germinacija spore je proces, ki omogoči preobrazbo spore v metabolno aktivno bakterijo. Germinacijo sprožijo receptorji, ki prepoznavajo hranila oziroma ugodno okolje v okolici spore. Receptorska prepoznavna aktivira avtolitične procese, ki razgradijo peptidoglikan sporine skorje. Sledi vdor vode in večino sporinega ovoja razgradijo hidrolitični encimi, medtem ko sporina stena postane celična stena metabolno aktivne bakterije.

Pri nekaterih bakterijah ob procesu sporulacije ali germinacije nastajajo različne snovi, npr. antibiotik bacitracin pri *Bacillus subtilis*, nevrotoksini pri *Clostridium tetani* in *Clostridium botulinum* ter enterotoksini pri *Clostridium perfringens*.

RAST IN RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJ

Naše znanje o rasti in razmnoževanju bakterij večinoma izhaja iz rezultatov raziskav in praktičnih izkušenj, pridobljenih pri delu z bakterijami v laboratorijskih ali industrijskih razmerah *in vitro*. Iz tega sklepamo, kako bakterije rastejo in se razmnožujejo v naravnih razmerah, v našem okolju ali v različnih bakterijskih gostiteljih. Vedeti moramo tudi, da ugotovitve o rasti in razmnoževanju določene bakterije ne izhajajo iz raziskav ene same bakterijske celice, ampak jih izpeljemo iz rezultatov raziskav na celotni populaciji domnevno enakih bakterij.

Ko bakterija pride v primerno okolje, začne (kot vsi živi organizmi) rasti. Ko zraste do kritične velikosti (približno dvojne velikosti mirujoče bakterije), se razdeli na dve skoraj enaki polovici. Način razmnoževanja bakterij zato imenujemo delitev na dvoje (t. i. binarna fisija). Nastali hčerinski bakterijski celici takoj začneta rasti in se razmnoževati naprej. Rast bak-

terije se kaže s povečevanjem prostornine bakterijske citoplazme, ki ga spremlja podaljševanje celične stene. Novonastala celična stena se pri nekaterih bakterijah (npr. streptokokih) izgrajuje samo na obeh polih, pri drugih (številnih po Gramu negativnih bakterijah) pa se nove sestavine celične stene naključno vgrajujejo v obstoječe dele celične stene. Ko se bakterijska celica dovolj podaljša, mezosom organizira ločitev podvojenega bakterijskega genoma na enaka dela. Iz mezosoma se oblikujeta dva lista prečne membrane, ki bakterijsko citoplazmo razdelita na dva dela. Ko vsaka od prečnih membran navzven izgradi še bakterijsko steno, nastaneta dve samostojni bakteriji. Pri nekaterih vrstah ostanejo celice po delitvi še nekaj časa povezane. Na ta način nastanejo različna združenja bakterij, npr. verižice (streptokoki), pari (pnevmokoki) ali grozdasti skupki (npr. stafilokoki).

Hitrost razmnoževanja bakterije je odvisna od primernosti okolja za razmnoževanje in od drugih dejavnikov, med katerimi je najpomembnejši generacijski čas bakterije. To je čas, ki je potreben, da iz ene bakterije v optimalnih okoliščinah nastane dve hčerinski celici, kar pri večini bakterij traja 15–25 minut, pri nekaterih bakterijah (npr. *Mycobacterium tuberculosis*) pa celo 18–24 ur. Kratek generacijski čas je osnovna evolucijska prednost bakterij pred drugimi organizmi, saj jim omogoča hitro prilagajanje na spremembe v okolju in preživetje tudi v najslabših razmerah. Kolikšna moč je skrita v kratkem generacijskem času, najbolje ponazarja izračun, da lahko teoretično iz ene same bakterije z generacijskim časom 20 minut v 24 urah nastane kar 10^{21} oz. 400 ton bakterij.

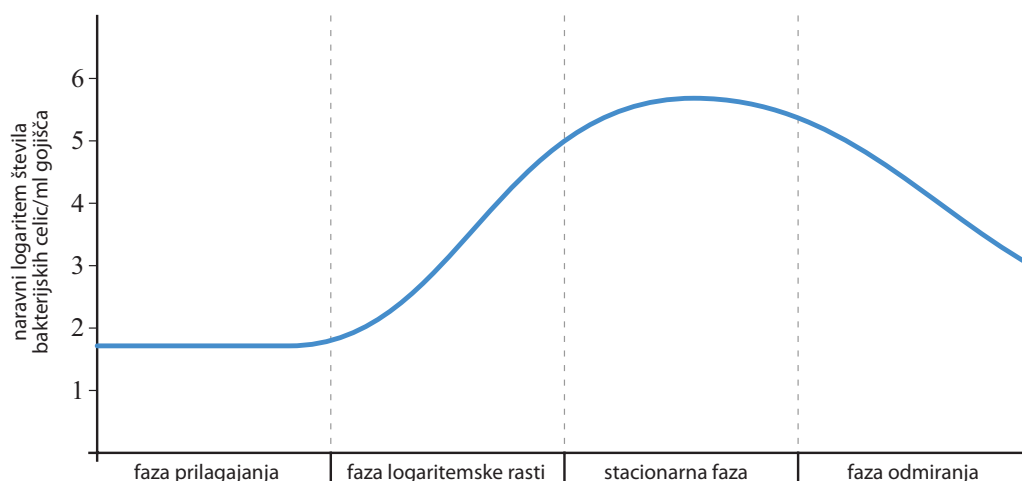
V klinični mikrobiologiji je za diagnostične namene predvsem pomembno določanje približnega

števila živih bakterij v kliničnem vzorcu. Število živih bakterij v kliničnem vzorcu navadno izrazimo v enotah CFU (*angl.* colony forming units), tj. s številom mikroorganizmov, ki so na nekem gojišču sposobni ustvariti bakterijsko kolonijo. Ena bakterijska kolonija na gojišču kaže rast in razmnoževanje ene same bakterijske celice iz kliničnega vzorca, zato je skupek gensko popolnoma enakih bakterij.

MODEL RASTI BAKTERIJ V ZAPRTEM SISTEMU

Ko bakterija v mirujočem stanju prispe v ugodnejše okolje, začne rasti in se razmnoževati. Njen razvoj najbolje ponazorimo s teoretičnim modelom rasti bakterij v zaprtem sistemu. V tem modelu poteka gojenje bakterij v zaprtem sistemu, v katerem se večina njegovih bistvenih sestavin ne obnavlja in tudi presnovki se ne izločajo iz njega. Teoretični model rasti bakterij v zaprtem sistemu najverjetneje najbolje ponazarja dogajanje med rastjo in razmnoževanjem bakterij *in vivo* oz. pri večini kulturacij *in vitro*. Po tem modelu rast in razmnoževanje bakterijske populacije potekata v štirih fazah (Slika 1.11).

Prva faza prilagajanja ali *lagfaza* običajno traja 1–4 ure. V fazi prilagajanja se bakterije počasi prilagodijo novemu okolju, sintetizirajo pomembne encime in se pripravljajo na delitev. Bakterijske celice se povečajo samo volumsko, njihovo število pa ostane enako. Sledi ji faza logaritemske rasti ali *logfaza*, v kateri se bakterijske celice intenzivno razmnožujejo. Število in masa bakterij naraščata eksponentno s časom, hitrost naraščanja (nagib krivulje) pa je odvisna od generacijskega časa bakterije. Že po nekaj urah intenzivnega razmnoževanja se rast upočasni,



Slika 1.11. Model rasti bakterij v zaprtem sistemu.

predvsem zaradi zmanjšanja količine razpoložljivih hranil in energije ter nabiranja odpadnih presnovkov, ki ovirajo nadaljnje razmnoževanje. Populacija ob koncu faze logaritemske rasti navadno doseže koncentracijo 10^8 – 10^9 bakterij v mililitru gojišča, celice pa so manjše in fiziološko bolj dejavne v primerjavi s celicami v drugih fazah kulture. V tem obdobju so bakterije tudi bolj občutljive za večino protibakterijskih snovi. Fazi logaritemske rasti sledi stacionarna faza, v kateri se bakterije zaradi varčevanja z energijo razmnožujejo počasneje. Sinteza novih ribosomov preneha, število obstoječih ribosomov pa se bistveno zmanjša. Prirastek celic je približno enak odmiranju, zato v stacionarni fazi število bakterij ostane nespremenjeno. Zaradi neugodnega okolja se bakterijske celice v stacionarni fazi morfološko in fiziološko precej razlikujejo od celic v fazi logaritemske rasti. Zato moramo celotno mikrobiološko identifikacijo bakterij izvajati pri bakterijskih populacijah v fazi logaritemske rasti. Stacionarna faza se nadaljuje v fazo odmiranja, v kateri bakterijske celice postopno propadajo. Največ bakterijskih celic propade zaradi razkroja, nekatere pa zaradi popolne razgradnje ribosomov. Določene bakterije v takšnih okoliščinah sporulirajo (predstavniki rodov *Bacillus* in *Clostridium*) in tako preživijo.

DEJAVNIKI RASTI IN RAZMNOŽEVANJA BAKTERIJ

Za preživetje morajo bakterije v naravnem ali laboratorijskem okolju (gojišču) najti vire vseh potrebnih hranilnih snovi, iz katerih sintetizirajo lastne makromolekule. Pomemben pogoj preživetja so tudi ustrezne osnovne fizikalne razmere za uspešno rast in razmnoževanje (npr. voda, primerna temperatura, osmotski tlak in vrednost pH).

PREHRANA BAKTERIJ

Osnovni element, potreben za rast in razmnoževanje bakterij, je ogljik. Heterotrofne bakterije črpajo ogljik iz organskih spojin, ki jih po delni razgradnji uporabljajo za gradbene delce pri sintezi lastnih makromolekul. Katero organsko spojino lahko določena bakterija uporabi kot vir ogljika, je odvisno od encimov, ki jih vsebuje. Bakterije z maloštevilnimi encimi črpajo ogljik samo iz nekaterih organskih spojin, medtem ko ga bakterije s številnimi

encimi (npr. psevdomonasi) lahko črpajo tudi iz več kot 100 različnih organskih spojin. Medicinsko pomembne bakterije pridobivajo ogljik največkrat iz ogljikovih hidratov in aminokislin, ki jih najdejo v telesnih tekočinah in tkivih. Za številne biokemijske procese bakterije potrebujejo tudi ogljikov dioksid (CO_2), ki ga večina bakterij v obdobju mirovanja sintetizira v sicer majhnih, a zadostnih količinah. Nekatere bakterije (npr. *Neisseria gonorrhoeae*) za začetek rasti in razmnoževanje potrebujejo večjo količino CO_2 , zato ga moramo pri njihovem gojenju posebej dodajati.

Dušik je ključna sestavina beljakovin in nukleinskih kislin. Osnovna anorganska dušikova spojina, vpletena v številne biokemijske procese, je amonijak, navadno v obliki amonijevih soli. Heterotrofne bakterije ga v takšni obliki lahko najdejo v okolju. Uporabljajo ga neposredno ali ga proizvajajo posredno z deaminacijo aminokislin ali redukcijo nitratov. Elementarni dušik lahko s procesom fiksacije reducira v amonijak le nekatere bakterije. Pomembne presnovne poti, ki omogočajo omenjeni proces, danes poznamo samo pri prokariotih.

Osnovni vir fosforja so anorganski fosfati iz okolja. Fosfor je pomembna sestavina ADP, ATP, nukleinskih kislin in koencimov. Žveplo je sestavni del nekaterih pomembnih strukturnih aminokislin (cistein, metionin) in koencimov, bakterije pa ga največkrat pridobivajo iz anorganskih snovi v obliki sulfatov ali organskih spojin. Bakterije poleg naštetih elementov potrebujejo še številne druge elemente, a v nekoliko manjših količinah.

FIZIKALNI DEJAVNIKI RASTI IN RAZMNOŽEVANJA BAKTERIJ

Poleg hranil in drugih spojin bakterije za rast in razmnoževanje potrebujejo tudi ustrezne fizikalne razmere (Tabela 1.1). Čeprav lahko nekatere bakterije rastejo in se razmnožujejo v ekstremnih fizikalnih okoliščinah, se je večina evolucijsko prilagodila razmeram, v katerih živi tudi večina drugih mikroorganizmov in makroorganizmov na Zemlji. Medicinsko pomembne bakterije so se tako v preteklosti izjemno dobro prilagodile fizikalnim razmeram v človeškem telesu.

Kisik in bakterije

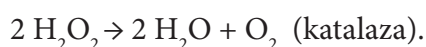
Osnovna in pomembna lastnost vsake bakterije je njen odnos do atmosferskega kisika (O_2). Skupina

Tabela 1.1. Osnovni fizikalni dejavniki, ki vplivajo na rast bakterij.

Fizikalni dejavniki	Skupine bakterij	Razmere za rast in razmnoževanje
kisik	obvezno aerobne bakterije obvezno anaerobne bakterije fakultativno anaerobne bakterije aerotolerantne anaerobne bakterije mikroaerofilne bakterije	rastejo samo v prisotnosti O ₂ O ₂ je zanje toksičen rastejo v prisotnosti ali odsotnosti O ₂ O ₂ zanje nekaj časa ni toksičen rastejo v okolju z manj O ₂ , kot ga je v zraku
temperatura	psihofilne bakterije mezofilne bakterije termofilne bakterije	0–20 °C 25–40 °C 40–75 °C
pH	acidofilne bakterije nevtrofilne bakterije alkalofilne bakterije	pH 0,5–6,0 pH 7,2–7,6 pH 8,0–9,5

bakterij, ki v svoji presnovi kot končni sprejemnik elektronov uporabljajo izključno kisik ter lahko rastejo in se razmnožujejo samo v njegovi navzočnosti, so obvezno ali striktno aerobne bakterije. Zaradi obilja kisika si za rast in razmnoževanje v človeškem organizmu največkrat izberejo dihala. Tipični predstavniki obvezno aerobnih bakterij je *M. tuberculosis*.

Presnova aerobnih bakterij temelji na procesu aerobne respiracije. Ker med njihovo presnovo nastaja večja količina peroksidov in kisikovih prostih radikalov, ki lahko zavirajo delovanje številnih encimov, oksidirajo membranske maščobe in okvarijo bakterijsko DNK, so aerobne bakterije evolucijsko razvile učinkovit sistem odstranjevanja oz. inaktivacije škodljivih snovi. Sistem zahteva delovanje nekaterih bakterijskih encimov – superoksid dismutaze, katalaze in peroksidaze. Končna produkta encimskih reakcij sta največkrat voda in kisik:



Druga skupina bakterij, ki v dedni zasnovi nimajo genov za superoksid dismutazo in večina niti za katalazo in za katere je zato atmosferski kisik izredno toksičen, so obvezno ali striktno anaerobne bakterije. Te bakterije najbolje rastejo in se razmnožujejo v okolju brez kisika, ob prisotnosti majhnih količin kisika pa le v okolju z velikimi zmoglostmi za redukcijo kisika (npr. v prisotnosti natrijevega tioglikolata kot reducenta). Presnova obvezno anaerobnih bakterij temelji na anaerobni respiraciji in je torej fermentativna. Tipični predstavniki obvezno anaerobnih bakterij so vrste rodu *Clostridium*.

Tretja, najbolj številna in za človeka najbolj pomembna skupina bakterij so fakultativno anaerobne bakterije. V navzočnosti kisika uporabljajo za

presnovo aerobno respiracijo, ko imajo na voljo omejeno količino kisika ali ga sploh nimajo, pa fermentacijo oziroma anaerobno respiracijo. Zaradi možnosti preživetja v skoraj vseh okoliščinah so se med vsemi bakterijami evolucijsko najbolj prilagodile parazitiranju v človeškem organizmu. Tipični predstavniki fakultativno anaerobnih bakterij so streptokoki in stafilokoki.

Četrta skupina bakterij so aerotolerantne anaerobne bakterije. Imajo fermentativno presnovo ter za rast in razmnoževanje ne potrebujejo kisika. V nasprotju z obvezno anaerobnimi bakterijami za aerotolerantne anaerobne bakterije kisik ni toksičen, ker imajo vsaj enega izmed prej omenjenih encimov za odstranjevanje peroksidov ali prostih radikalov kisika. Tipični predstavniki so laktobacili.

Posebna skupina so mikroaerofilne bakterije, ki lahko rastejo in se razmnožujejo samo v okolju z manj kisika, kot ga je v zraku. Takšna je večina bakterijskih vrst rodu *Campylobacter*.

Temperatura

Čeprav lahko bakterije preživijo v sorazmerno širokem temperaturnem razponu (spodnja toplotna meja preživetja je največkrat nejasna, zgornja pa jasno določena), v večini optimalno rastejo in se razmnožujejo samo v ozkem temperaturnem območju. Večina medicinsko pomembnih bakterij najbolje raste pri temperaturah med 25 °C in 40 °C. Takšne bakterije imenujemo mezofilne bakterije. Nekatere lahko zadovoljivo hitro rastejo v dokaj širokem razponu temperatur (npr. *Pseudomonas aeruginosa* med 5 °C in 43 °C), večina pa je bolj zahtevnih (npr. *Neisseria gonorrhoeae* raste samo pri temperaturi med 30 °C in 39 °C). Bakterije, ki najbolje rastejo in se razmnožujejo pri temperaturah, nižjih od 20 °C,

so psihofilne bakterije. Nekatere zadovoljivo rastejo pri 0 °C, druge celo pri –7 °C. Skupina, ki najbolje raste in se razmnožuje pri temperaturah, višjih od 40 °C, so termofilne bakterije. Bakterije, ki živijo v termalnih vrelih, se lahko razmnožujejo celo pri temperaturah, višjih od 90 °C (npr. *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*). Iz takšnih bakterij osamljene DNK-polimeraze danes v diagnostični molekularni mikrobiologiji široko uporabljamo kot encime za pomnoževanje značilnih delcev DNK (verižna reakcija s polimerazo). Večina psihofilnih in termofilnih bakterij pri ljudeh ne povzroča okužb, izjema so le nekatere bakterije iz rodov *Pseudomonas* (psihofilne) in *Bacillus* (termofilne).

Koncentracija vodikovih ionov (pH)

Ustrezna koncentracija vodikovih ionov (pH) naravnega ali laboratorijskega okolja je pomemben fizikalni pogoj za rast in razmnoževanje bakterij. Večina medicinsko pomembnih bakterij najbolje raste v okolju z nevtralno vrednostjo pH ali v rahlo alkalnih okoliščinah (pH 7,2–7,6). Takšne bakterije so ne-nevtrofilne. Bakterije, ki bolje rastejo v kislih razmerah, so acidofilne bakterije. Tipični predstav-

niki acidofilnih bakterij so laktobacili. Nekatere patogene bakterije so zelo občutljive za kislo okolje in dobro prenašajo alkalne razmere, v katerih se tudi optimalno razmnožujejo. Imenujemo jih alkalofilne bakterije, njihov klasični predstavnik pa je *Vibrio cholerae*.

Osmotski tlak

Bakterije lahko zaradi trdne celične stene brez posledic prenesejo večje spremembe osmotskega tlaka v svoji okolici. Zaradi zmožnosti aktivnega prenosa ionov skozi membrano niso občutljive za večje spremembe njihove koncentracije v okolju, v katerem bivajo.

Vse medicinsko pomembne bakterije potrebujejo NaCl v fiziološki koncentraciji 0,9 %. Halofilne bakterije dobro živijo tudi v okolju z višjo koncentracijo NaCl. Tako *V. cholerae* preživi v okolju s 6-odstotno koncentracijo NaCl in ne v okolju z 8-odstotno koncentracijo NaCl. Nekatere morske bakterije (*Vibrio parahaemolyticus*) zahtevajo gojišča s 3- do 8-odstotno koncentracijo NaCl; obstaja pa tudi posebna skupina halofilnih bakterij, ki lahko živijo celo v nasičeni raztopini NaCl (30 %).

LITERATURA ZA NADALJNI ŠTUDIJ

1. James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, Karen C. Carroll, ur.: Manual of clinical microbiology. Washington: ASM; 2015, 11. izdaja. Dosegljivo na: <http://education.bd.com/manual-of-clinical-microbiology-11th-edition.aspx>.
2. Carroll KC, Jeffery A, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrrow JH, Sakanari JA: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 2015, 27. izdaja. Dosegljivo na: https://books.google.si/books/about/Jawetz_Melnick_Adelbergs_Medical_Microbi.html?id=cZH7rQEACAAJ&source=kp_cover&redir_esc=y.

2

Klasifikacija bakterij

Alojz Ihan, Katja Seme, Mateja Pirš, Julija Germ

TAKSONOMIJA BAKTERIJ

Opredelitev vrste pri evkariontih in bakterijah; bakterijska vrsta; poimenovanje bakterij.

NAČINI IDENTIFIKACIJE IN KLASIFIKACIJE BAKTERIJ

Morfološke in fiziološke identifikacijske metode v medicinski bakteriologiji; biokemijska identifikacija bakterij; metoda masne spektrometrije MALDI-TOF; identifikacija bakterijskih antigenov; analiza bakterijskega genoma.

FILOGENETSKA KLASIFIKACIJA BAKTERIJ

Arhebakterije; evbakterije; Bergeyjev priročnik bakteriologije.

TAKSONOMIJA BAKTERIJ

Taksonomija mikroorganizmov obsega sistematično klasifikacijo (razvrščanje v sorodne vrste), nomenklaturu (sistem poimenovanja) in identifikacijo.

Naloga taksonomije v medicinski bakteriologiji je takšna opredelitev bakterijskih povzročiteljev bolezni, da jih z objektivnimi metodami lahko prepoznamo (identificiramo) in jih uvrstimo v posamezno bakterijsko vrsto (klasificiramo), s čimer bakterija dobi določeno ime (nomenklatura).

Sistematična opredelitev bakterijskih povzročiteljev bolezni omogoča, da prepoznamo patogene bakterije, lažje opredelimo klinični pomen osamitve posamezne vrste in hkrati izvedemo tudi ustrezno testiranje občutljivosti za antibiotike, ki so primerni za zdravljenje.

Bakterije razvrščamo glede na medsebojne razlike in podobnosti, ki so v osnovi genetske, kažejo pa se v strukturnih in metabolnih lastnostih. Klasifikacija mora temeljiti na objektivnih in dostopnih metodah, s katerimi »merimo« posamezne bakterijske lastnosti na ravni:

- bakterijske strukture (npr. barvanje po Gramu in mikroskopiranje);
- fizioloških lastnosti (npr. rast v določenih pogojih (aerobni, anaerobni, temperatura) in določenih gojiščih, občutljivost za določene antibiotike oz. odpornost proti njim);
- lastnosti bakterijskih encimov (npr. testi encimske (biokemijske) aktivnosti s posameznimi substrati, t. i. biokemijski profil);
- lastnosti bakterijskih beljakovin, glikoproteinov (npr. antigenski testi);
- analize beljakovin z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF (*angl.* matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight);
- analize maščobnih kislin s kromatografskimi metodami;
- analize bakterijskih genov (npr. hibridizacija DNK, pomnoževanje odsekov DNK, določanje nukleotidnega zaporedja bakterijske DNK (t. i. sekvenciranje)).

Racionalno izbrana kombinacija metod omogoča hitro, uspešno in optimalno učinkovito razpoznavo posameznega bakterijskega seva.

Opredelitev vrste pri evkariontih in bakterijah

Osnovna klasifikacijska skupina evkariontskih organizmov je biološka vrsta. Vrsta je zelo stabilna biološka skupina, saj se njeni predstavniki med seboj razmnožujejo spolno ter tako izmenjujejo in izpopolnjujejo svoje gene, medtem ko se s pripadniki drugih vrst ne morejo spolno razmnoževati (segregacija). Bakterije se ne razmnožujejo spolno, ampak samo z delitvijo (tj. vegetativno), zato zanje ne velja evkariontska opredelitev vrste. Tudi zelo sorodne bakterije si med seboj ne izmenjujejo tako

velikih delov genoma kot pri evkariontskem spolnem razmnoževanju znotraj iste vrste (vertikalni prenos genetskega materiala). Po drugi strani pa se manjši deli bakterijskega genoma včasih izmenjujejo ne samo znotraj vrste ali med sorodnimi vrstami, ampak tudi med razmeroma nesorodnimi bakterijami z različnimi mobilnimi genetskimi elementi (horizontalni oz. lateralni prenos genetskega materiala). Zato opredelitev bakterijske vrste ni mogoče utemeljiti s tako jasnim biološkim merilom, kot je pri evkariontih zmožnost medsebojnega spolnega razmnoževanja.

Opredelitev bakterijske vrste je v nasprotju z evkarionti dogovorna. Bakterijska vrsta je skupina bakterijskih sevov, ki so si podobni po lastnostih (genetski podobnosti, presnovi, celični steni, toksinih, patogenezi). Zaradi silovitega razvoja genetskih analiz v zadnjih letih opredelitev bakterijske vrste poleg fenotipskih značilnosti vključuje še vsaj 70-odstotno skladnost istovrstnih sevov pri DNK-DNK hibridizaciji celotnega genoma in vsaj 97-odstotno skladnost pri sekvenčni analizi 16 S ribosomske RNK.

S klasifikacijo bakterijskega seva, ki temelji na izbrani kombinaciji fenotipskih lastnosti, (fenotipska ali determinacijska klasifikacija), lahko v zaporedju opredelimo:

- nadcarstvo (*superregnum*),
- kraljestvo (*regnum*),
- deblo (*phylum*),
- razred (*classis*),
- red (*ordo*),
- družino (*familia*),
- rod (*genus*),
- bakterijsko vrsto (*species*).

Bakterijska vrsta je opredeljena s prototipom bakterije, navadno s prvim opisanim izolatom, ki je shranjen v splošno dostopni celični banki (npr. American Type Culture Collection, ATCC). V okviru bakterijske vrste lahko naletimo tudi na seve, ki po nekaterih lastnostih od prototipa znatno odstopajo. Takšni sevi so bakterijske podvrste, ki jih lahko opredelimo glede na drugačno morfologijo (morfovar), antigensko zgradbo (serovar), metabolne lastnosti (biovar), ekološko razširjenost (ekovar) itd.

Poimenovanje bakterij

Poimenovanje (nomenklatura) bakterij je podobno kot pri rastlinah in živalih. Zasnoval ga je Carl von

Linné (1707–1778) in je binominalno, grško-latinško. Prvo ime označuje pripadnost bakterije rodu (npr. *Legionella*, *Treponema*), drugo ime pa bakterijsko vrsto (npr. *Legionella pneumophila*, *Treponema pallidum*). Prvo ime vedno pišemo z veliko začetnico in ga pogosto skrajšamo na samo veliko začetnico (npr. *L. pneumophila*, *T. pallidum*). Okrajšave lahko pri začetnikih v bakteriologiji včasih privedejo do nesporazumov, saj imajo številni rodovi iste začetne črke (npr. streptokoki, stafilokoki, spirili, streptomycete). Zato velja pravilo, da v vsakem besedilu ime vrste prvič izpišemo v celoti, v nadaljevanju pa napišemo le skrajšani naziv.

Redka uveljavljena izjema je skrajšani zapis imena za salmonelo. Rodovnemu imenu (*Salmonella*) sledi le ime serotipa, ki ga pišemo z veliko začetnico in pokončno (npr. *Salmonella* Typhi), medtem ko ime vrste in ime podvrste izpustimo.

NAČINI IDENTIFIKACIJE IN KLASIFIKACIJE BAKTERIJ

Morfološke metode identifikacije v medicinski bakteriologiji

Identifikacija bakterij je dolgo temeljila na ugotavljanju bakterijskih fenotipskih lastnosti. Osnovne morfološke lastnosti bakterijske celice opazujemo pod mikroskopom, pri čemer si lahko pomagamo z različnimi tehnikami barvanja. Ena osnovnih je barvanje po Gramu, ki poda pomembno informacijo o zgradbi bakterijske stene in hkrati omogoča, da z mikroskopiranjem (praviloma pri 1000-kratni povečavi) določimo tudi osnovne morfološke lastnosti bakterijske celice (velikost, obliko, razporejanje). Tipične bakterije imajo praviloma stalno obliko, po kateri jih medsebojno razlikujemo. Okrogle bakterije imenujemo koki in diplokokki, paličaste bacili, zapognjene vibrije in spiralno zavite spirili. Bacili, ki imajo sporo, so sporogeni bacili. Glede na postopek barvanja, ki se imenuje po danskem zdravniku Hansu Christianu Gramu, razvrstimo bakterije v dve skupini – v skupino po Gramu pozitivnih bakterij, ki se obarvajo modrovijolično, in v skupino po Gramu negativnih bakterij, ki se obarvajo rdeče.

Če želimo spoznati morfološke, biokemijske in antigenske značilnosti bakterij, ki so domnevne povzročiteljice okužbe, jih moramo osamiti iz kužnine in jih vzgojiti na gojišču. Šele po nacepit-

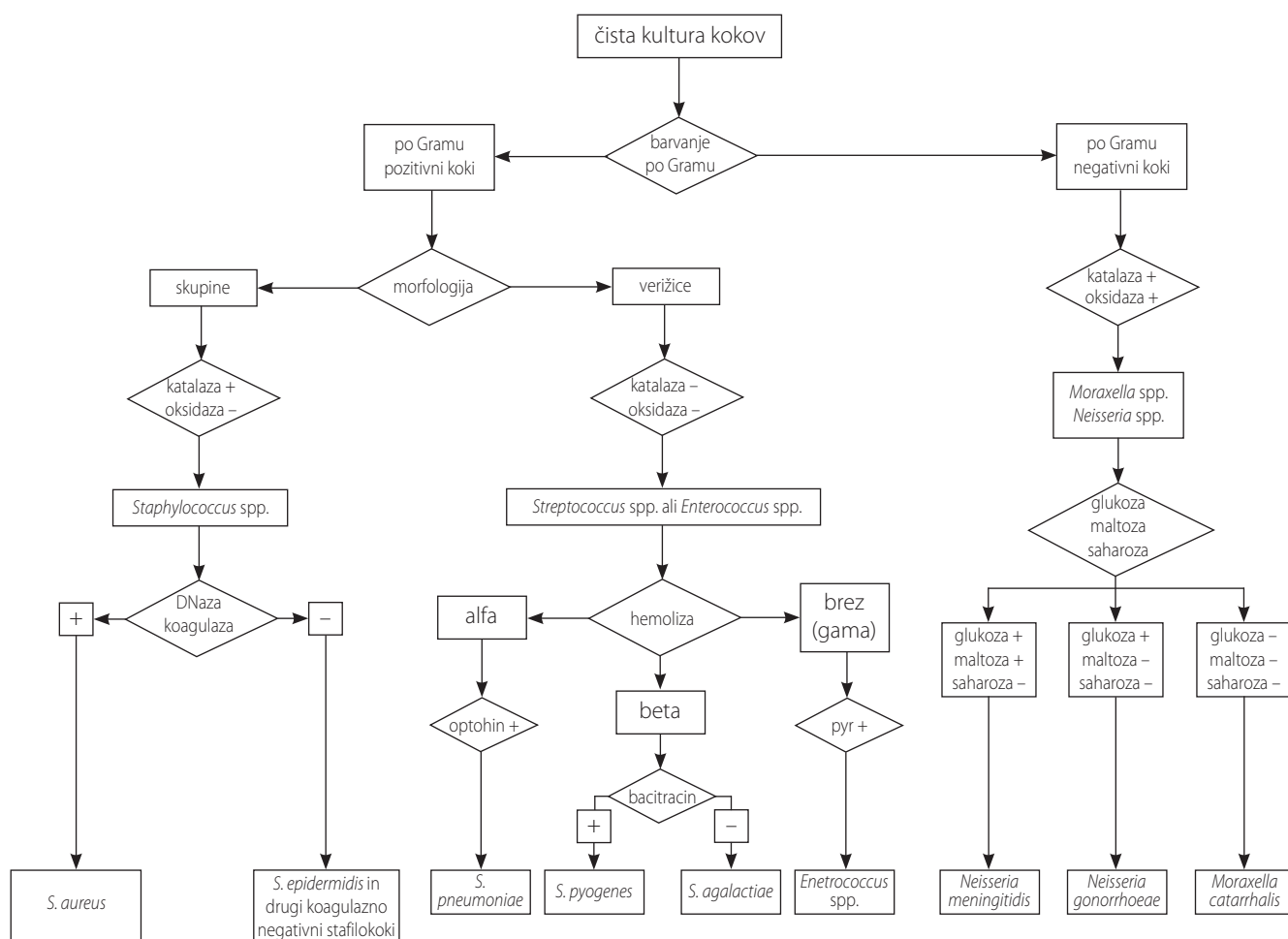
vi in osamitvi na bakteriološkem gojišču jih lahko identificiramo. Uporabna bakteriološka gojišča so razvili šele 100 let po tem, ko so že videli prve mikro-
be (Leuwenhoek, 1673). Leta 1860 je Louis Pasteur med raziskovanjem teorije o spontani generaciji pri eksperimentih uporabil gojišče (*lat. infusum*), ki je vsebovalo kvasni prah, sladkor in amonijeve soli. K razvoju trdnih gojišč je veliko prispevalo odkritje Petrijeve posodice (Petri, 1887), v katero so nalili gojišče, ki se je strdilo (leta 1881 je Walther Hesse za strjevanje uporabil kuhanju namenjeni agar). Pozneje so odkrili, da moramo poleg osnovnih hranilnih snovi (sladkorji, peptoni, peptidi, aminokisline, vitamini in minerali) za uspešno kultiviranje določenih zahtevnejših bakterijskih vrst v gojišča pogosto dodajati različne rastne dejavnike (npr. faktorja X in V za rast bakterije *Haemophilus influenzae*).

Večino za človeka patogenih bakterij lahko vzgojimo z inkubacijo zasejanih gojišč v termostatu pri 35–37 °C v 24–48 urah. Za razmnoževanje številnih bakterij je pomembna navzočnost kisika (O₂), za ne-

katere pa atmosfera brez kisika ali atmosfera s povečano koncentracijo ogljikovega dioksida (CO₂). Glede na zmožnost rasti v gojišču s kisikom bakterije razdelimo na aerobne bakterije (t. i. aerobe), ki potrebujejo kisik, in na anaerobne bakterije (t. i. anaerobe), ki jim kisik škoduje.

BIOKEMIJSKA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

Bakterijska kolonija je skupek bakterijskih celic, ki so se namnožile iz ene same bakterijske celice. Bakterijsko vrsto identificiramo tako, da kolonijo analiziramo z različnimi mikrobiološkimi tehnikami in ugotovitve sestavljamo do stopnje, ko ustrezajo identiteti vrste. Zelo pomembna metoda, na kateri temelji identifikacija bakterijskih sevov, je biotipizacija sevov, zraslih na gojišču, glede na njihove fiziološke lastnosti v kombinaciji s podatki o makroskopski morfologiji (kolonije) in mikroskopski morfologiji (barvanje po Gramu, oblika, razporeja-



Slika 2.1. Shema biotipizacije bakterijskih kultur.

nje), določitvi navzočnosti različnih encimov (katalaza, oksidaza, koagulaza), sposobnosti izkoriščanja različnih substratov (zasejavanje biokemijske vrste in ugotavljanje metabolnih značilnosti), občutljivosti za določene antibiotike itd. (Slika 2.1). Če želimo med gojenjem ugotavljati biokemijske spremembe, ki nastajajo ob razgradnji značilnih sestavin, v gojišče dodamo barvni indikator, ki se ob ustrezni biokemijski pretvorbi značilno spremeni. S sestavljanjem tako pridobljenih lastnosti, ki jih primerjamo z znanimi lastnostmi za določeno bakterijsko vrsto (baze podatkov z biokemijskimi profili bakterij), ugotovimo, katere bakterijske vrste smo osamili iz kužnine. V ta namen so na voljo številni miniaturizirani komercialni testi, ki identifikacijo močno olajšajo z avtomatskim primerjanjem dobljenega biokemijskega oz. metabolnega profila z bazo podatkov.

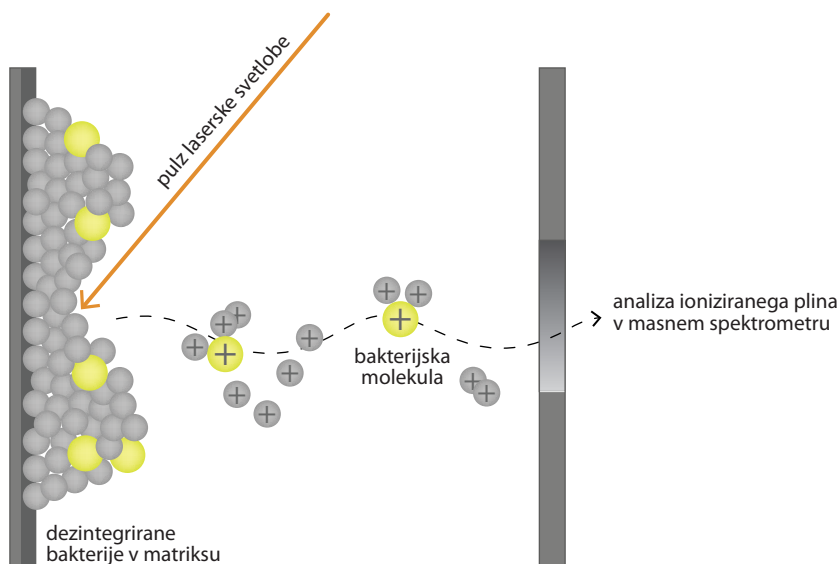
IDENTIFIKACIJA MEDICINSKO POMEMBNIH BAKTERIJ IN GLIV: ANALIZA BAKTERIJSKIH BELJAKOVIN Z METODO MASNE SPEKTROMETRIJE MALDI-TOF

Identifikacija bakterij in gliv temelji na metodi masne spektrometrije MALDI-TOF, tj. laserski ionizaciji bakterijskih molekul in masnim analizatorjem, ki meri čase preletov ionov in iz njih oblikuje spektre, ki so značilni za posamezno bakterijsko vrsto.

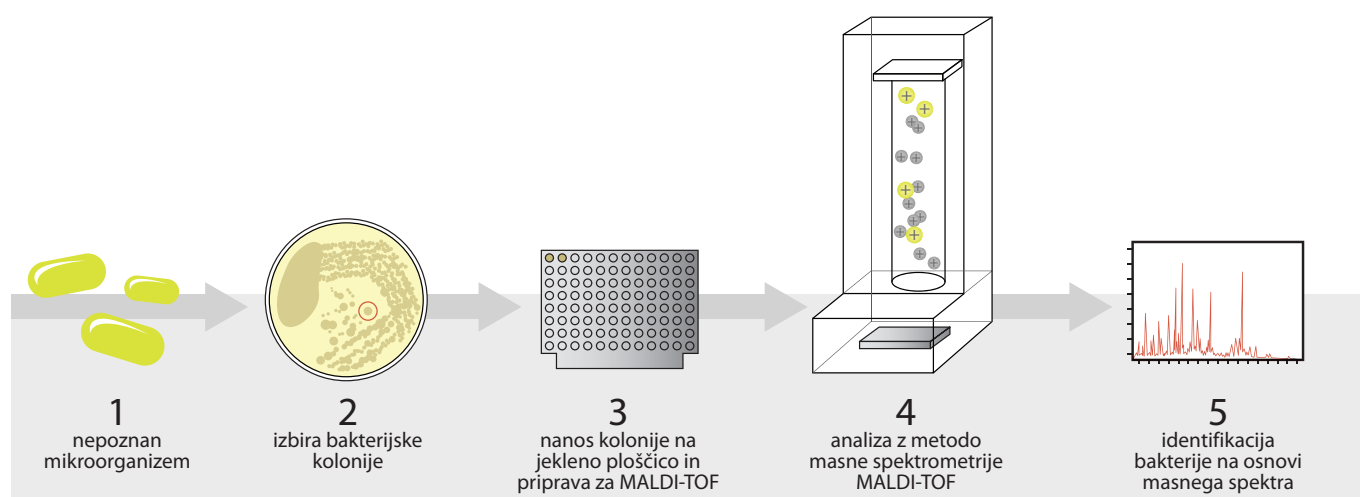
Masni spektrometer sestavljajo ionski izvor, masni analizator in detektor (Slika 2.2). V ionskem izvoru

molekule izbranih spojin najprej pretvorimo v ionsko obliko, nastale ione pa nato v masnem analizatorju ločimo glede na razmerje med maso (m) in nabojem (z). Maso in naboj zaznamo z detektorjem, ki izmeri nastali tok pri posamezni vrednosti razmerja med maso in nabojem (m/z).

V masni spektrometriji metodo MALDI-TOF uporabljamo predvsem pri analiziranju večjih bioloških molekul velikosti 2–100 kDa, kot so beljakovine. Pri metodi MALDI molekule vzorca zmešamo z matriksom, ki vsebuje organsko topilo ter organsko kislino z nizko molekulsko maso in visoko absorptivnostjo svetlobe v območju valovne dolžine uporabljenega laserja. Matriks služi kot vir protonov za ionizacijo molekul vzorca. Zaradi nizke molekulske mase se zlahka uplini, visoka absorptivnost svetlobe v območju valovne dolžine uporabljenega laserja pa omogoča absorpcijo večjega dela energije laserskega pulza, kar molekule vzorca obvaruje pred fragmentacijo. Valovno dolžino izberemo tako, da čim manj prizadene molekule v vzorcu. Molekule vzorca in matriksa ko-kristalizirajo. Ob obstreljevanju z laserjem matriks zaradi absorpcije ultravijolične (UV) svetlobe razpade in se uplini, pri čemer pride do desorpcije, uplinjanja in ionizacije molekul vzorca. Gre za tehniko t. i. mehke ionizacije (*angl.* soft ionization), ki omogoča analizo velikih biomolekul, kot so intaktne beljakovine. Ob ionizaciji nastajajo večinoma protonirane oz. deprotonirane ionizirane enojno nabite molekule vzorca. Nastale ionizirane molekule vzorca (in matriksa) pospešimo z električnim poljem in jih usmerimo v dolgo



Slika 2.2. Princip analize z metodo MALDI-TOF.



Slika 2.3. Identifikacija bakterij in gliv z metodo MALDI-TOF.

cev, v kateri je vakuum, da med molekulami ne prihaja do trkov, kar bi oviralo njihovo odkrivanje (detekcijo). Ioni se glede na maso in naboj premikajo različno hitro (manjši oz. lažji ioni potujejo hitreje), masni analizator pa meri čas prihoda do detektorja, tj. čas preleta ionov (*angl.* time-of-flight, TOF), ki je sorazmeren s kvadratnim korenom razmerja med m in z (m/z). Z ločevanjem molekul glede na razmerje med maso in nabojem (tj. glede na čas preleta ionov do detektorja) dobimo masni spekter vzorca. Masni spekter prikazuje intenzivnost (tj. število ionov) posameznih ioniziranih molekul z določenim razmerjem m/z . Z metodo MALDI navadno nastanejo enojno nabiti ioni, zato vrednost razmerja m/z ionizirane molekule ustreza njeni masi. Pri identifikaciji molekul vzorca si pomagamo tako, da jih primerjamo z vrednostmi v knjižnici z znanimi masnimi spektri.

Identifikacija bakterij in gliv z metodo MALDI-TOF temelji na analizi zelo konzervativnih beljakovin, ki so nujne za celično preživetje in niso pod velikim vplivom dejavnikov okolja. Najprimernejše masno območje za prepoznavanje je 2–20 kDa, v katerem prevladujejo citosolne bazične beljakovine, predvsem ribosomske beljakovine (ki sicer predstavljajo približno 20 % bakterijske mase), tj. beljakovine, ki sodelujejo pri vezavi DNK ali RNK.

Postopek identifikacije bakterij in gliv z metodo MALDI-TOF

Za identifikacijo bakterij in gliv vzorec sveže kolonije najprej nanesemo na nosilec – jekleno ploščico (Slika 2.3), čemur sledi nanos matriksa. Za prepoznavanje navadno uporabljamo α -ciano-4-hidroksicimetno

kislino (*angl.* α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA), raztopljeno v organskem topilu (npr. acetonitrilu in trifluoroocetni kislini). Ob sušenju pride do ko-kristalizacije matriksa in mikrobnega materiala. Nosilec z vzorcem vstavimo v masni spektrometer in ga obstreljujemo z laserjem (npr. valovne dolžine 337 nm), pri čemer pride do ionizacije ter uplinjenja molekul vzorca in matriksa. Uplinjen pozitivno nabit oblak beljakovin vzorca in matriksa po masnem analizatorju potuje do ionskega detektorja, ki izmerjene vrednosti mase in naboja pretvori v masne spektre. Izmerjene masne spektre intaktnih celic bakterij ali gliv nato primerjamo s spektri znanih oz. referenčnih izolatov. Ti so na voljo v komercialni knjižnici masnih spektrov za več tisoč bakterijskih vrst (odvisno od proizvajalca naprave).

Povprečni čas identifikacije bakterij in gliv se je z uvedbo metode MALDI-TOF s 24–48 ur, ki jih zahteva identifikacija na osnovi biokemijskega oz. metabolnega profila, skrajšal na manj kot eno uro, ob tem pa potrebujemo tudi bistveno manj bakterij (zadošča ena sama kolonija).

IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH BELJAKOVIN (ANTIGENOV) S PROTITELESI

Ker so protitelesa specifični reagenti za makromolekule (antigene), lahko bakterije identificiramo s protitelesi proti določenim bakterijskim molekulam, ki so značilne samo za posamezno bakterijsko vrsto ali sev. Med bakterijami, ki jih uvrščamo v eno vrsto, lahko torej s protitelesi razlikujemo številne podvrste (med salmonelami npr. več kot 2000 serotipov).

Z ustrezno izbranimi protitelesi lahko ugotavljamo tudi antigene, značilne za posamezno vrsto (npr. *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *L. pneumophila*), ali širšo skupino bakterij. Z lateksno aglutinacijo npr. razlikujemo med različnimi vrstami betahemolitičnih streptokokov (npr. skupina A – *Streptococcus pyogenes* in skupina B – *Streptococcus agalactiae*).

KLASIFIKACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN GLIV Z ANALIZO GENOMA

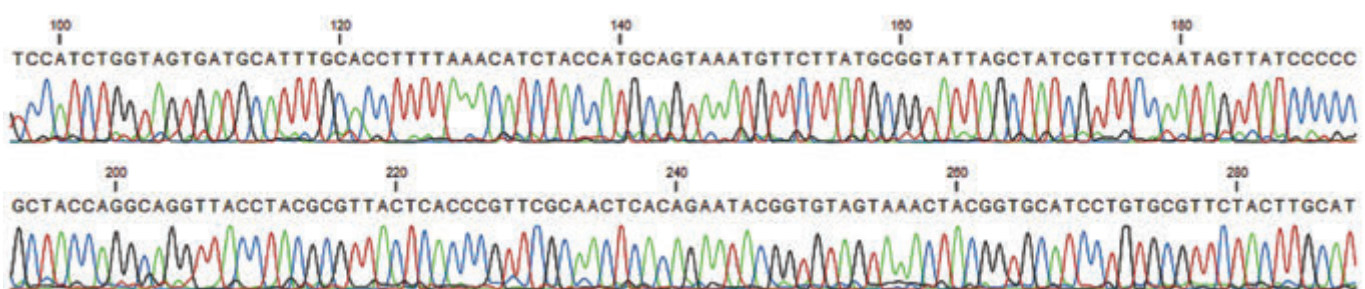
Analiza genoma omogoča neposredno opredelitev stopnje sorodnosti med bakterijami. Določanje nukleotidnega zaporedja za posamezne gene namreč kaže stopnjo evlucijske sorodnosti med bakterijami. Pri bližje sorodnih bakterijah so razlike manjše, zato je za njihovo razlikovanje smiselna primerjava nukleotidnih zaporedij genov, ki se v evoluciji hitro spreminjajo. Pri genetsko oddaljenih bakterijah raje primerjamo nukleotidna zaporedja genov, ki se spreminjajo zelo počasi (npr. tistih za ribosomsko RNK in za ribosomske beljakovine). Zlati standard za primerjanje genske sorodnosti bakterijskih sevov so hibridizacijske tehnike (npr. DNK-DNK hibridizacija celotnega genoma), ki jih v zadnjem času zaradi enostavnosti delno nadomešča sekvenčna analiza 16 S ribosomske RNK. Vse bolj pomembne

so tudi novejša metode sekvenciranja celotnega genoma (t. i. sekvenciranje naslednje generacije).

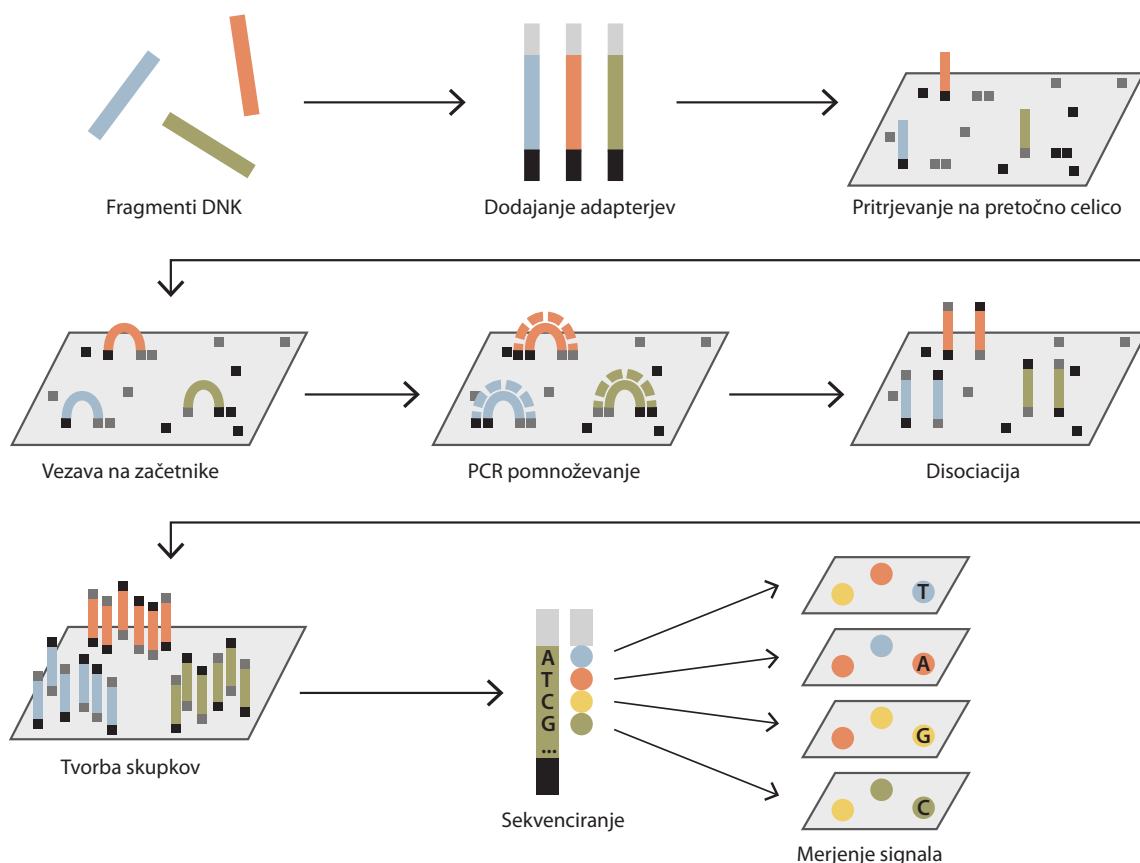
Identifikacija bakterij in gliv z molekularnimi metodami

Identifikacija s pomnoževanjem specifičnih odsekov DNK. Za vsakdanjo identifikacijo določenih bakterijskih vrst je zelo priročno pomnoževanje izbranih odsekov DNK z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR), pri čemer izberemo tiste odseke DNK, ki so značilni za določeno skupino (družino, vrsto) bakterij.

Identifikacija s pomnoževanjem konzervativnega odseka DNK in s sekvenciranjem. V redkih primerih, ko identifikacija z drugimi metodami ni uspešna, lahko uporabimo molekularno metodo, pri kateri pomnožimo konzervativni odsek DNK, mu določimo nukleotidno zaporedje (sekvenciranje) in ga nato primerjamo z znanimi zaporedji različnih vrst bakterij v bazah podatkov. Identifikacijo bakterij izvedemo z molekularno metodo, pri kateri z metodo PCR pomnožimo odsek gena za ribosomalno 16 S rRNK, medtem ko pri glivah pomnožimo celotno regijo vmesnega distančnika (angl. internal transcribed spacer, ITS) in jo primerjamo z znanimi zaporedji v ustrezni bazi podatkov (Slika 2.4). Za identifikacijo do ravni vrste moramo včasih izbrati drug, za določen rod bolj informativen odsek DNK.



Slika 2.4. Kromatogram zaporedja DNK s prikazom zaporedja baz od 97. do 288. mesta v genomu.



Slika 2.5. Potek sekvenciranja naslednje generacije s sintezo.

Sekvenciranje. Pri klasičnem sekvenciranju po Sangerju z metodo PCR pomnožen odsek genoma, katerega zaporedje nas zanima, zmešamo v sekvenčno mešanico, ki vsebuje en začetni nukleotid, encim polimerazo ter deoksi-nukleotide (dNTP) in dideoksi-nukleotide (ddNTP). Vsak ddNTP je označen s svojim fluorokromom (štiri barvila) in spodbujen, da oddaja svetlobo različnih valovnih dolžin. Med pomnoževanjem zaradi vključevanja dNTP in ddNTP nastajajo različno dolgi fragmenti (ddNTP zaustavijo pomnoževanje). Po kapilarni elektroforezi nastane barvna lestvica velikosti fragmentov, pri čemer do detekcijskega okna najhitreje pride najkrajši fragment. Laser v detekcijskem oknu fluorescentne barve spodbudi, da oddajo svetlobo specifične valovne dolžine, računalniški program pa signale zbira in jih analizira (Slika 2.4).

Pri sekvenciranju naslednje generacije (*angl.* next generation sequencing, NGS), tj. masovnem vzporednem sekvenciranju, ne potrebujemo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Pristopi so različni, v večini pa uporabljamo t. i. ciklični mrežni pristop. Pri vseh pristopih naključni fragmentaciji DNK sledijo prilepljanje skupnih DNK-adapterjev, pomnoževanje posameznih fragmentov DNK in priprava

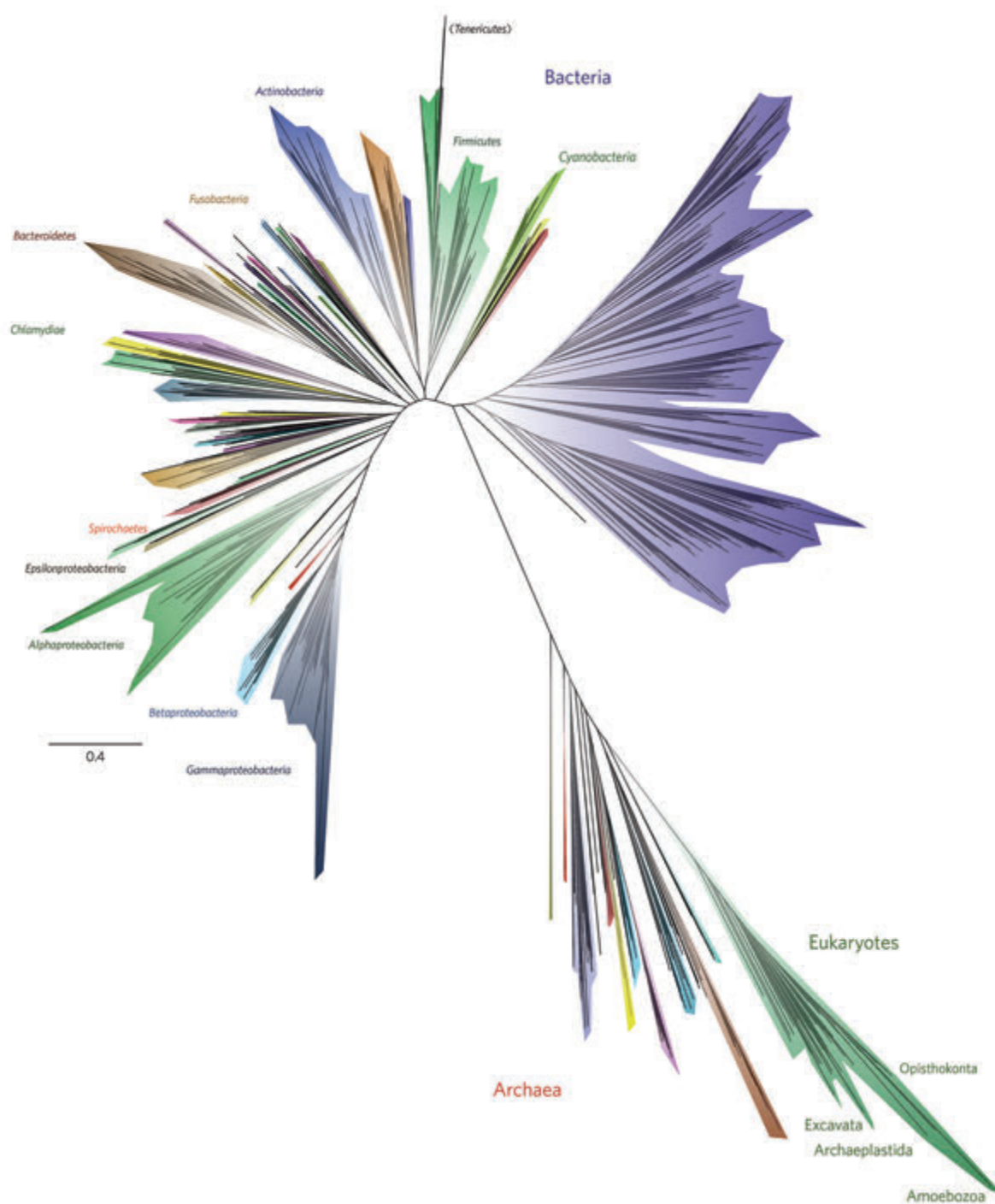
prostorsko ločenih pomnožkov. Za pomnoževanje DNK, s katerim ojačamo signal, obstajajo različni pristopi, npr. emulzijski PCR z amplifikacijo na kroglicah in premostitveni PCR.

Proces določanja nukleotidnega zaporedja poteka s ponavljajočimi se koraki encimsko kataliziranega vključevanja fluorescentno označenih nukleotidov ali z merjenjem spremembe pH ob vključitvi nukleotida. Dobljena nukleotidna zaporedja (odčitki) iz celotne mreže se z uporabo računalniških algoritmov sestavijo v neprekinjeno zaporedje (Slika 2.5). Tovrstni pristopi k določanju nukleotidnega zaporedja so bistveno hitrejši in cenejši od klasičnega sekvenciranja ter omogočajo analizo celotnega genoma in ne le posameznih genov oz. krajših odsekov DNK.

Pri najnovejših metodah visokozmogljivega sekvenciranja tretje generacije izvajamo sekvenciranje brez amplifikacije in določamo zaporedje ene izvorne molekule DNK.

FILOGENETSKA KLASIFIKACIJA BAKTERIJ

DNK-DNK hibridizacija celotnega genoma in sekvenčna analiza ribosomske RNK sta omogočili pri-



Slika 2.6. Drevo življenja (prirejeno po Hug in sod., Nat Microbiol 2016).

merjanje evolucijske sorodnosti med bitji in izdelavo filogenetskega drevesa. Z vse širšo uporabo podatkov, pridobljenih z analizo nukleotidnih zaporedij celotnega genoma, in metagenomskega sekvenciranja, s katerim lahko raznolikost bakterijskih vrst v določenem okolju ocenimo brez potrebe po včasih izjemno zahtevni uspešni kultivaciji, lahko na tem področju pričakujemo še veliko novih spoznanj (in s tem tudi sprememb). Razvejitve filogenetskega drevesa kažejo, da so se prvotni prokarionti že zelo

zgodaj razdelili na skupini *Archaeobacteria* (oz. *Archaea*) in *Eubacteria* ter na tretjo vejo, ki se je razvila v smer evkariontov *Eukarya* (Slika 2.6).

Arheje

Arheje so enocelični mikroorganizmi, ki nimajo jedra. (Slika 2.6) Sprva so jih klasificirali med bakterije (arheobakterije), kasneje pa so ugotovili, da glede na značilnosti ne sodijo ne med bakterije ne med evkarionte.

Arheje so sprva odkrili predvsem v okoljih, ki zaradi ekstremnih življenjskih razmer (velika koncentracija soli, visoka temperatura) evbakterijam ne ustrezajo. Konec 20. stoletja so z vse večjo uporabo molekularnih tehnik ugotovili, da arheje najdemo v najrazličnejših življenjskih okoljih in da posamezni predstavniki arhej kot del mikrobiote živijo celo v živalskih (in tudi človeških) prebavilih (npr. različni metanogeni iz rodu *Methanobrevibacter*, ki so predstavniki oddelka *Euryarchaeota*), najdemo pa jih tudi v ustni votlini in na koži. Arheje so morfološko na videz v večini podobne bakterijam. Za razliko od bakterij nimajo peptidoglikana (imajo psevdopeptidoglikan), medtem ko so maščobe v membrani vezane z etri (za razliko od bakterij in evkariontov, pri katerih so maščobe vezane z estri).

Termofilne arheje lahko zaradi termostabilnih encimov, ki ne denaturirajo pri vrelišču, živijo celo v vreli vodi (tipično jih najdemo v vročih vrelih). Eden takšnih termostabilnih encimov, DNK-polimeraza bakterije *Thermus aquaticus* (polimeraza Taq), je omogočil pomnoževanje DNK pri visokih temperaturah, ki je pomemben del metode PCR.

Evbakterije

Z analizo rRNK med evbakterijami odkrivamo več velikih skupin, med katerimi so medicinsko pomembne predvsem po Gramu pozitivni bakterijski skupini *Actinobacteria* in *Firmicutes*, po Gramu negativne bakterijske skupine *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* in *Spirochaetes* ter *Chlamydiae*.

Klasifikacija bakterij je dogovorna, zato mora obstajati tudi splošno sprejet enoten sistem klasifikacije. Od leta 1923 izhaja Bergeyjev priročnik, ki ga nenehno dopolnjujejo (zadnja izdaja je iz leta 2015). Poimenovanje bakterij (nomenklatura) določa Mednarodni odbor za sistematično bakteriolo-

gijo (*angl.* International Committee on Systematic Bacteriology).

Za človeka patogene bakterije v grobem razdelimo v več skupin (Slika 2.6):

- *Actinobacteria* so po Gramu pozitivne bakterije z visoko vsebnostjo G + C. Številne rastejo filamentozno in lahko tvorijo miceliju podobne strukture. Nekateri predstavniki se z metodo barvanja po Gramu slabo obarvajo (npr. mikobakterije). V to skupino prištevamo tudi aktinomycete in korinebakterije.
- *Firmicutes* so po Gramu pozitivne bakterije z nizko vsebnostjo G + C. Po obliki so lahko bacili (nekateri sporogeni) in koki. V to skupino uvrščamo večino medicinsko pomembnih, po Gramu pozitivnih kokov (npr. stafilokoke in enterokoke), po Gramu pozitivne sporogene anaerobne bacile (npr. klostridije) in po Gramu pozitivne nesporogene bacile (npr. laktobacile).
- *Tenericutes* so brez celične stene (mikoplazme in ureaplazme).
- *Proteobacteria* so zelo velika skupina po Gramu negativnih bakterij, ki so po obliki bacili, lahko tudi koki. Razlikujemo pet skupin – alfa (*Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp.), beta (*Neisseria* spp., *Burkholderia* spp.), gama (enterobakterije, *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Legionella* spp.), delta (ne vsebuje znanih medicinsko pomembnih bakterij) in epsilon (*Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp.).
- *Bacteroidetes* so po Gramu negativne anaerobne bakterije (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. in *Porphyromonas* spp.).
- *Spirochaetes* so bakterije s celicami, ki imajo spiralno obliko z internim bičkom (*Borrelia* spp., *Treponema* spp. in *Leptospira* spp.).
- *Chlamydiae* so striktni znotrajcelični paraziti (*Chlamydia* spp.).

LITERATURA ZA NADALJNI ŠTUDIJ

1. Jorgensen JH, Pfaller MA, ur. Manual of clinical microbiology. 15. izdaja. Washington: ASM; 2015.
2. Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W, ur. Medical microbiology. 10. izdaja. Churchill Livingstone Elsevier; 2012.

11

Streptokoki

Katja Seme

MIKROB

Streptokoki (rod *Streptococcus*) so po Gramu pozitivni koki, ki se urejajo v pare ali verižice in jih glede na tip hemolize razvrščamo na alfa hemolitične, beta hemolitične in gama hemolitične ali nehemolitične.

PATOGENEZA

Beljakovina M, streptolizin O, streptolizin S, streptokinaza, hialuronidaza, deoksiribonukleaza in eritrogeni toksini, kapsula; okužba je lokalizirana ali razširjena v kri in likvor.

EPIDEMIOLOGIJA

Prenaša se kapljično, z neposrednim stikom, invazivnimi posegi in poškodbami. Vir okužbe so bolniki in klicenosci.

KLINIČNA SLIKA

Streptococcus pyogenes: akutno vnetje žrela, škrlatinka, okužbe kože in podkožja, nekrotizirajoči fasciitis, sepsa, streptokokni sindrom toksičnega šoka, revmatična vročina, akutni glomerulonefritis.

Streptococcus agalactiae: novorojenček – zgodnja okužba (sepsa) in pozna okužba (meningitis); porodnica – vročina po porodu, endometritis, poporodna sepsa; ostali – okužbe mehkih tkiv, okužbe sečil, pljučnica, endokarditis, septični artritis.

Zeleneči streptokoki: endokarditis, abscesi, sepsa pri nevtropeničnem bolniku.

Streptococcus pneumoniae: akutno vnetje srednjega ušesa, vnetje obnosnih votlin, pljučnica, meningitis, sepsa.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Dokaz povzročitelja v kužninah.

ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

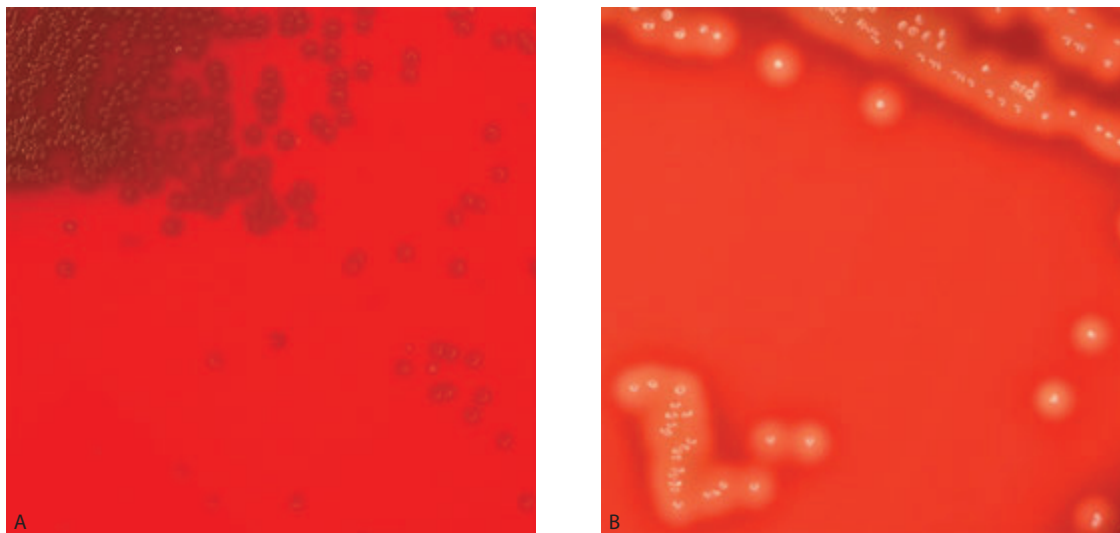
Penicilin, cefalosporini, makrolidi, klindamicin in vankomicin; konjugirano in polisaharidno cepivo proti pnevmokoku.

Streptokoki so heterogena skupina v naravi zelo razširjenih bakterij. So del mikrobiote zgornjih dihal, prebavil, sečil in rodil. Številni med njimi povzročajo pomembne okužbe. Na streptokoke kot povzročitelje nevarnih okužb so prvič opozorili v drugi polovici 19. stoletja.

Poznamo več različnih in delno prekrivajočih se shem za razvrščanje streptokokov (Tabela 11.1). Glede na polisaharidni antigen v bakterijski celični steni jih razdelimo v skupine po Lancefieldovi. Glede na vrsto hemolize jih razvrščamo na alfa hemolitične (delna, zelenkasta hemoliza), beta hemolitične (popolna hemoliza) (Slika 11.1) in gama hemolitične ali nehemolitične. Glede na vrsto okužb, ki jih povzročajo, jih delimo v piogene (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*) in nepiogene. Razvrščamo jih tudi glede na biokemijske lastnosti.

MIKROB

Streptokoki so po Gramu pozitivni koki s premerom približno 1 μm . Urejajo se v pare ali verižice (Slika 11.2), so negibljivi in ne sporulirajo. Večinoma so fakultativni anaerobi, le peptostreptokoki so obvezni anaerobi. Imajo fermentativni metabolizem. Za razliko od stafilokokov nimajo encima katalaze. Kolonije na krvnem agarju so drobne in po 24-urni inkubaciji dosežejo 0,5–2 mm. So prozorne in navadno brez pigmenta. Če v krvnem agarju okrog svoje kolonije popolnoma razgradijo eritrocite, jih imenujemo beta hemolitični streptokoki. Če jih razgradijo nepopolno in okrog bakterijske kolonije nastane zelen pas, govorimo o alfa hemolitičnih streptokokih, če eritrocitov sploh ne hemolizirajo, pa o gama hemolitičnih ali nehemolitičnih streptokokih (Slika 11.1). Na osnovi značilnih polisahari-



Slika 11.1. Kolonije alfa-hemolitičnega (A) in beta-hemolitičnega (B) streptokoka na krvnem agarju.

dnih antigenov v bakterijski celični steni, ki jih je leta 1930 odkrila Rebecca Lancefield, streptokoke razvrščamo v skupine od A do H, v skupine od K do V in v skupino nerazvrščenih. Za človeka najpomembnejše vrste streptokokov so v skupinah A, B, C, D in G. V skupini nerazvrščenih, za človeka pomembnih streptokokov, so *S. pneumoniae* in zeleni streptokoki (imenovani tudi viridans streptokoki), razen vrst, ki pripadajo skupini *Streptococcus anginosus* (Tabela 11.1).

Streptococcus pyogenes

Je najpomembnejši beta-hemolitični streptokok. Uvrščamo ga v skupino A po Lancefieldovi. Na krvnem agarju raste v obliki prosojnih kolonij s premerom 1–2 mm, ki jih obdaja širok pas popolne beta-hemolize (Slika 11.3A). Za razliko od večine ostalih

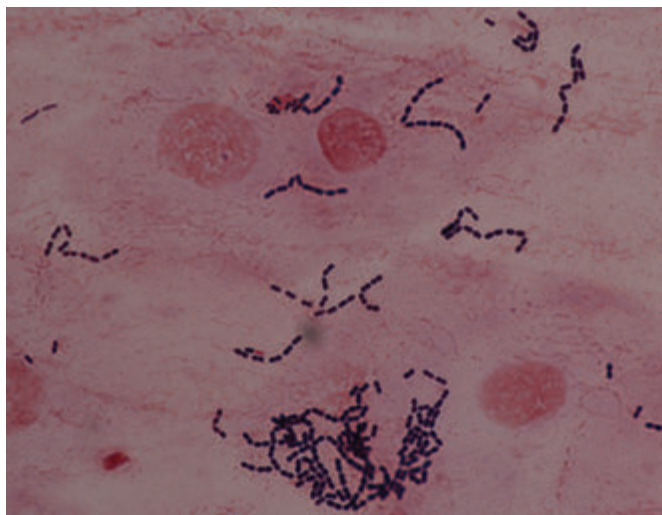
beta-hemolitičnih streptokokov je občutljiv za bacitracin in tvori pirolidonil arilamidazo (PYR).

Streptococcus agalactiae

Uvrščamo ga v skupino B po Lancefieldovi. Kolonije na krvnem agarju so v primerjavi s kolonijami *S. pyogenes* bolj maslene. Obdaja jih ožji pas popolne hemolize, nekateri sevi pa so lahko nehemolitični (Slika 11.3B). Za razliko od ostalih beta-hemolitičnih streptokokov hidrolizirajo natrijev hipurat.

Streptococcus pneumoniae

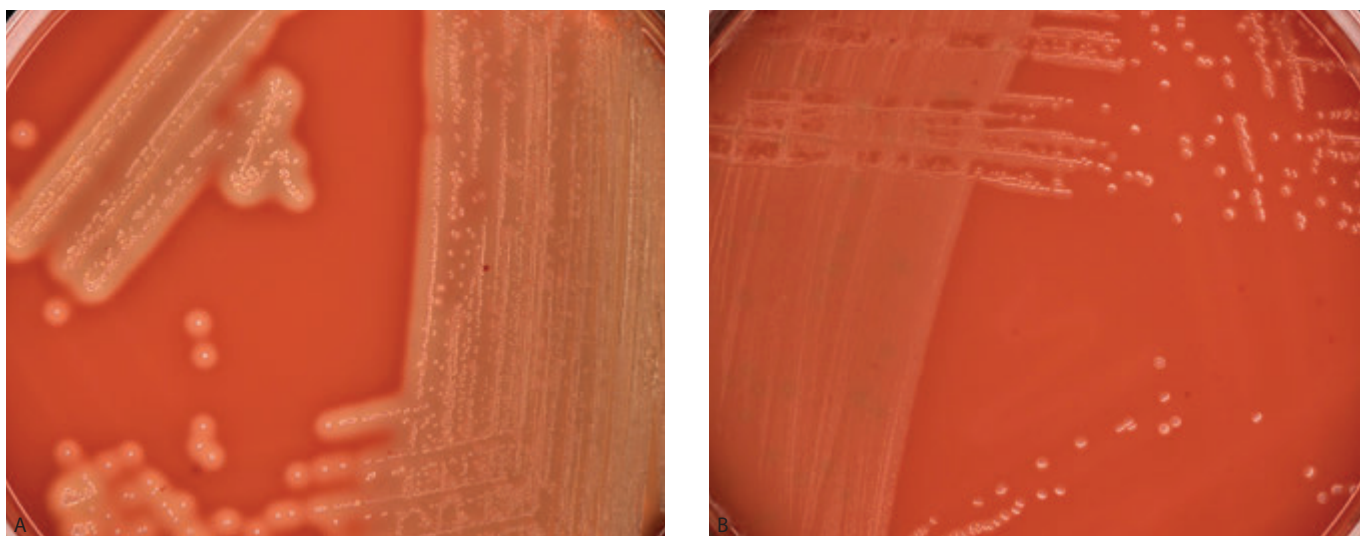
Pnevmokokove celice so praviloma ovalne ali lancetne oblike in se urejajo v pare (diplokok) ali kratke verižice (Slika 11.4). Kolonije na krvnem agarju obdaja pas delne alfa-hemolize. Bolje raste v atmosferi, obogateni z ogljikovim dioksidom (CO₂). Mor-



Slika 11.2. Verižice po Gramu pozitivnih kokov v kužnini (1000-kratna povečava).

Tabela 11.1. Razvrstitev za človeka najpomembnejših streptokokov.

Vrsta/skupina	Skupina po Lancefieldovi	Hemoliza
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	beta
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	beta
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	A, C, G, L	beta
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	alfa
zeleni streptokoki		
— skupina <i>Streptococcus anginosus</i>	A, C, G, F	beta (alfa ali gama)
— skupina <i>Streptococcus bovis</i>	D	gama
— skupina <i>Streptococcus mitis</i>	—	alfa ali gama
— skupina <i>Streptococcus mutans</i>	—	alfa ali gama
— skupina <i>Streptococcus sanguinis</i>	—	alfa ali gama
— skupina <i>Streptococcus salivarius</i>	—	alfa ali gama

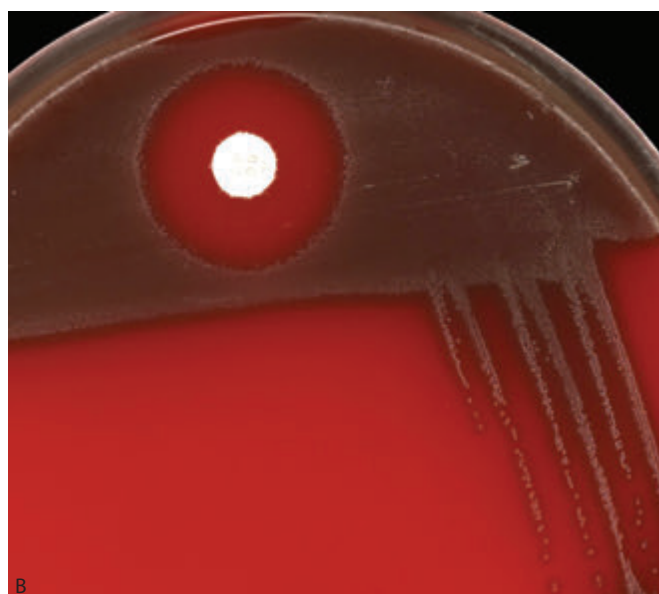


Slika 11.3. Primerjava kulture *S. pyogenes* (A) in kulture *S. agalactiae* (B) na krvnem agarju.

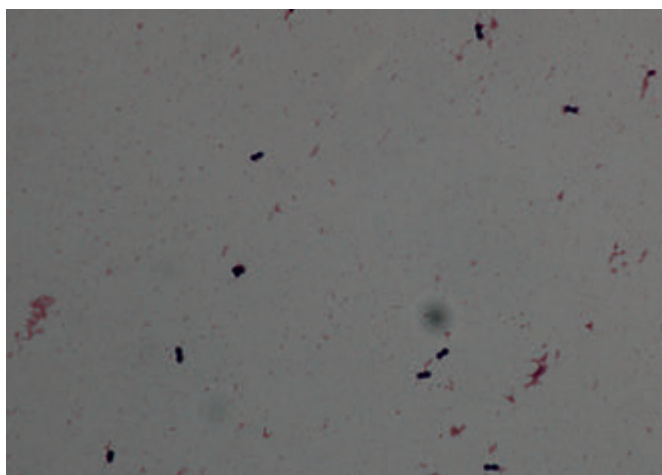
fologija kolonij je različna. Kolonije kapsuliranih sevov so večje, s premerom 1–3 mm, ter okrogle in sluzne, medtem ko so kolonije nekapsuliranih sevov manjše in ploščate s centralnim delom, ki je pogosto nižji od njenih robov (Slika 11.5A). Po tem se razlikujejo od ostalih alfa-hemolitičnih streptokokov. S staranjem postajajo pnevmokoki po Gramu negativni in avtolizirajo. Avtoliza je pospešena ob prisotnosti površinsko aktivnih snovi, kot sta žolč ali natrijev deoksiholat, kar ni značilno za ostale alfa-hemolitične streptokoke. Pnevmonokoki so tudi edini alfa-hemolitični streptokoki, katerih rast zavre optohin (Slika 11.5B).

Ostali alfa-hemolitični streptokoki

Ker so prehransko zahtevni, rastejo samo na kompleksnih gojiščih, vsaj z dodatkom krvi. Podobno kot pnevmokoki bolje rastejo v atmosferi, obogateni



Slika 11.5. Kolonije *S. pneumoniae* na krvnem agarju (A) in občutljivost pnevmokoka za optohin (B).



Slika 11.4. Po Gramu pozitivni diplokokci v kužnini (1000-kratna povečava).

z ogljikovim dioksidom (CO₂). Za razliko od pnevmokokov optohin ne zavre njihove rasti, prav tako jih ne raztopijo površinsko aktivne snovi. Vrste alfa-hemolitičnih streptokokov med seboj razlikujemo glede na biokemijske lastnosti.

PATOGENEZA

Streptococcus pyogenes

Virulenca *S. pyogenes* je odvisna od sposobnosti seva, da se pritrdi na površino gostiteljevih celic, vstopi v epitelne celice, se izogne opsonizaciji in fagocitozi ter izdeluje različne encime in toksine. Ve-zavo na epitelne celice na mestu vstopa v organizem mu omogočajo lipoteihoična kislina, beljakovina M in beljakovina F. Beljakovina M je glavni virulentni dejavnik bakterije *S. pyogenes* in poleg beljakovin T in R eden izmed treh površinskih beljakovinskih antigenov te bakterijske vrste. Zasidrana je v citoplazemski membrani, sega skozi celotno celično steno (je del fimbrije) in kot vlakno štrli nad celično površino. Poznamo več kot 100 različnih tipov beljakovine M. Beljakovina M na površini bakterijske celične stene preprečuje fagocitozo. Fagocitozo preprečuje tudi kapsula iz hialuronske kisline, ki jo imajo nekateri sevi *S. pyogenes*. Ker je antigensko neločljiva od hialuronske kisline, v vezivnem tkivu sesalcev tudi preprečuje fagocitozo bakterijskih celic. Poleg že naštetih virulentnih dejavnikov so za razvoj okužb, ki jih povzroča *S. pyogenes*, odgovorni tudi številni encimi in toksini (Tabela 11.2).

Tabela 11.2. Encimi in toksini, ki jih izločajo betahemolitični streptokoki, ter njihovi patogenetski učinki.

Encimi, toksini	Učinek
streptolizin O	lizira eritrocite, levkocite in trombocite; je imunogen
streptolizin S	lizira eritrocite, levkocite in trombocite; ni imunogen
streptokinaza (fibrinolizin)	katalizira pretvorbo plazminogena v plazmin, kar vodi v razgradnjo fibrina; razgrajuje krvne strdke; olajša širjenje bakterije v tkivih
hialuronidaza	hidrolizira hialuronsko kislino in s tem omogoča prodiranje skozi tkiva
deoksiribonukleaza (DNAza)	depolimerizira prosto DNK, kar zmanjšuje viskoznost gnoja in olajša širjenje bakterije
eritrogeni (pirogeni) eksotoksini (štirje antigensko različni; zapis na lizogenem bakteriofagu)	pirogeni učinek; delujejo kot superantigeni; povzročijo značilen kožni izpuščaj pri škrlatinki; povzročijo streptokokni sindrom toksičnega šoka

Streptococcus agalactiae

Osnovni virulentni dejavnik *S. agalactiae* je polisaharidna kapsula, ki preprečuje s komplementom posredovano fagocitozo. Različni hidrolitični encimi lahko olajšajo razgradnjo tkiv in omogočajo sistemsko širjenje bakterije.

Streptococcus pneumoniae

Najpomembnejši virulentni dejavnik pnevmokoka je polisaharidna kapsula, ki bakterijo varuje pred fagocitozo. Razlikujemo več kot 90 seroloških tipov pnevmokoknih kapsul. Protitelesa proti posameznemu kapsularnemu tipu učinkovito nevtralizirajo protifagocitni učinek kapsule. Površinski beljakovinski adhezini omogočajo pnevmokoku vezavo na epitelne celice, najpogosteje sluznice zgornjih dihal. S sekretornimi IgA-proteazami in pnevmolizinom pnevmokok razgrajuje sluznična protitelesa in utekočinja sluz. Pnevmoлизin je pravzaprav citotoksin, ki veže holesterol v celični membrani gostiteljeve celice in ustvarja pore. S tem uničuje migetalčni epitel in fagocite. Klinična bolezen je posledica čezmernega razmnoževanja in širjenja pnevmokokov iz nosno-žrelnega prostora v obnosne votline (sinuzitis), srednje uho in pljuča (pljučnica). Če pnevmokoki vdrejo v kri, se lahko razširijo kjer koli po telesu. Najpogosteje ob tem povzročijo bakteriemijo in meningitis.

Pljučnica je posledica prisotnosti pnevmokokov v alveolih. Mikrobo fagocitirajo alveolni makrofagi, ki po fagocitozi začnejo izločati velike količine vnetnih mediatorjev (citokinov), kar povzroči vdor vnetnega eksudata (plazma, nevtrofilci) iz alveolnega žilja v alveolni prostor. Izločanje citokinov, zlasti interleukina 1, povzroči visoko vročino, alveolni eksudat pa znake pljučne infiltracije.

Ostali alfa-hemolitični streptokoki

Nekateri alfa-hemolitični streptokoki iz saharoze tvorijo zunajcelične polisaharide dekstrane in levane, ki so pomembni sestavni deli zobnih oblog. Poleg tega fermentirajo sladkorje, zlasti glukozo in saharozo, pri čemer nastajajo kisli produkti, predvsem mlečna kislina. Oboje je ključno za nastanek zobne gnilobe. Zeleneči streptokoki so zaradi sposobnosti prilepljanja na endokard tudi med najpogostejšimi povzročitelji infekcijskega endokarditisa.

EPIDEMIOLOGIJA

S. pyogenes kolonizira žrelo in kožo presredka. Vir okužbe so bolniki ali klicenosci, lahko tudi površine, kontaminirane z izločki bolnikov ali klicenoscev. Okužba se prenaša kapljično ali ob neposrednem stiku z bolnikom, klicenoscem ali kontaminirano površino oz. predmetom. Okužbe s *S. pyogenes* so zelo pogoste. Po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) je bilo v letu 2015 v Sloveniji med 78.375 prijavljenih primerov nalezljivih bolezni kar 11.463 primerov streptokokne angine in 3.084 primerov škrlatinke. Istega leta je bil streptokokni tonzilitis v Sloveniji po številu hospitaliziranih na šestem mestu med desetimi najpogostejšimi nalezljivimi boleznimi.

S. agalactiae kolonizira prebavila, zlasti črevo, sečila in rodila. Približno 10–40 % nosečnic ima sluznico nožnice kolonizirano s *S. agalactiae*. Približno polovica novorojenčkov koloniziranih porodnic se med porodom kolonizira s *S. agalactiae*, 1–2 % pa zboli s klinično izraženo boleznijo. Po porodu lahko povzroči okužbo maternice in sepso pri materi ter sepso in meningitis pri novorojenčku. V zadnjem času so pogostejše okužbe s *S. agalactiae* pri odraslih bolnikih s pridruženimi kroničnimi boleznimi.

S. pneumoniae kolonizira nosno-žrelni prostor zdravih ljudi. V zunanem okolju hitro propade. Pogostejše so kolonizirani otroci, med odraslimi pa tisti, ki živijo v gospodinjstvu z otroki. Kolonizacija se navadno začne približno pri starosti 6 mesecev. Pozneje se otrok prehodno kolonizira s pnevmokoki drugih serotipov, trajanje kolonizacije pa je praviloma z vsakim naslednjim serotipom krajše. Med predšolskimi otroki je s pnevmokokom koloniziranih 20–50 % otrok, med starejšimi otroki in mlajšimi odraslimi pa samo še 5–15 %. Vir okužbe so kolonizirane osebe in bolniki. Pnevmonokna okužba se razvije pri manjšem delu koloniziranih, odvisno od virulence pnevmokoka in gostiteljevega imunskega odziva. Prenaša se kapljično ali z neposrednim stikom. Pnevmonokne okužbe se pojavljajo sezonsko, predvsem pozimi in zgodaj spomladi. Zbolevajo zlasti otroci, mlajši od 5 let, in odrasli, starejši od 65 let. Po podatkih NIJZ je bilo v letu 2015 prijavljenih 332 primerov potrjenih invazivnih pnevmokoknih okužb (16,1/100.000 prebivalcev). Med prijavami z znano klinično sliko so bili v večini bolniki z invazivno pljučnico.

Ostali alfa-hemolitični streptokoki so del normalne mikrobiote zgornjih dihal, ustne votline, prebavil

in sečil. So pomembni povzročitelji subakutnega infekcijskega endokarditisa, sepse pri nevtropeničnih bolnikih in različnih abscesov.

KLINIČNA SLIKA

Streptococcus pyogenes

Akutno vnetje žrela (streptokokna angina ali streptokokni tonzilitis) in škrlatinka

Bakterijsko akutno vnetje žrela povzroča *S. pyogenes*, lahko tudi beta-hemolitični streptokoki skupin C in G, medtem ko škrlatinko povzročajo samo tisti sevi *S. pyogenes*, ki izločajo pirogene eksotoksine (eritrogene toksine). Za okužbo so dovzetne vse starostne skupine, vendar najpogostejše zbolijo otroci med 3. in 10. letom starosti. Akutno vnetje žrela se začne nenadno z mrzlico, visoko vročino in bolečinami pri požiranju. Žrelo je močno pordelo, jeziček otekel, nebnički pokriti z belimi čepki ali sivobelimi oblogami, področne bezgavke spredaj na vratu so povečane in boleče. Pri škrlatinki akutno vnetje žrela spremlja značilen folikularni izpuščaj, ki se s trupa širi na vrat in ude in se po enem tednu začne luščiti. Bolnik s škrlatinko ima tudi izrazito rdeča lica, bledico okoli ust ter malinast jezik. Ker diferencialnodiagnostično pri akutnem vnetju žrela pridejo v poštev številne virusne okužbe, se glede antibiotičnega zdravljenja odločamo na osnovi kliničnih Centorjevih meril in hitre mikrobiološke diagnostike z dokazom streptokoknega antigena v brisu žrela. Po prebolelem streptokoknem vnetju žrela se razvije učinkovit imunski odziv, ki varuje pred ponovno okužbo z beta-hemolitičnim streptokokom skupine A z enakim serotipom M. Zaradi velikega števila različnih serotipov M, lahko za streptokoknim vnetjem žrela zbolimo večkrat. Po preboleli škrlatinki se razvije učinkovit imunski odziv, ki varuje pred ponovitvijo škrlatinke zaradi toksina enakega serotipa. Ker obstajajo 4 serotipi eritrogenega toksina (A, B, C in F), lahko za škrlatinko zbolimo večkrat.

Streptokokna gnojna okužba kože

Streptokokna gnojna okužba kože ali impetigo je pretežno bolezen vročega in vlažnega podnebja, pri nas pa se pojavlja zlasti poleti in zgodaj jeseni. Prizadeta je vrhnjica (epidermis) z značilnimi skupki gnojnih mehurčkov in krastami. Okužba se prenaša z ne-

posrednim stikom z bolnikom, ki ima streptokokne gnojne kožne lezije. Povzročitelji impetiga so lahko betahemolitični streptokoki skupin A, B, C in G.

Invazivne streptokokne okužbe

V zadnjem desetletju se je po vsem svetu povečala pojavnost invazivnih okužb z betahemolitičnimi streptokoki, kot so šen, streptokokni celulitis, nekrotizirajoči fasciitis, miozitis in streptokokni sindrom toksičnega šoka. Šen ali erizipel je streptokokna okužba kože, ki prizadene usnjico (dermis). Najpogostejše nastane na obrazu ali spodnjih udih. Bolezen se začne naglo z vročino in mrzlico, na koži se nenadno pojavi od zdrave kože ostro omejena boleča rdečina, dvignjena nad raven kože, vnete so tudi limfne žile in bezgavke. Celulitis je akutno difuzno gnojno vnetje kože z jasnim žariščem okužbe na koži ali brez njega. Ker gre za vnetje v globini, rob ni ostro omejen od zdrave kože. Nekrotizirajoči fasciitis je zelo huda bakterijska okužba mehkih tkiv, ki prizadene usnjico, podkožno tkivo, mišične ovojnice in/ali mišičnino. Večinoma zbole vajo odrasli, vstopno mesto okužbe pa so največkrat koža in mehka tkiva. Če invazivno okužbo kože povzročijo sevi bakterije *S. pyogenes*, ki izločajo pirogene toksine, pride zaradi prekomerne aktivacije imunskega sistema do razvoja streptokoknega sindroma toksičnega šoka, za katerega so podobno kot pri stafilokoknem sindromu toksičnega šoka značilni visoka vročina, hipotenzija, izpuščaj, luščenje kože in večorganska prizadetost, ki hitro napreduje v šok. V primeru streptokoknega sindroma toksičnega šoka so bakterije navadno tudi v krvi (bakteriemija in toksemija). Najpogostejši povzročitelji so sevi *S. pyogenes* serotipov M1 in M3.

Pozni zapleti streptokokne okužbe

Kot pozna zapleta se nekaj tednov po okužbi z bakterijo *S. pyogenes* lahko razvijeta revmatična vročina in postreptokokni akutni glomerulonefritis. Domnevajo, da je revmatična vročina posledica navzkrižne imunske reakcije med streptokokno beljakovino M in humanim tkivom, zlasti miokardom. Do postreptokoknega akutnega glomerulonefritisa pride zaradi odlaganja imunskih kompleksov (strukturnih antigenov iz streptokokne celične membrane in protiteles proti njim) na glomerulni bazalni membrani in posledičnega imunskega odziva, ki pripelje do njenega uničevanja.

Streptococcus agalactiae

Pri novorojenčku se lahko razvije zgodnja okužba s *S. agalactiae* (v prvem tednu po porodu) in pozna okužba s *S. agalactiae* (v enem tednu do treh mesecev). Zgodnja okužba, ki je posledica okužbe v porodnem kanalu, se kaže z znaki neonatalne sepse, ki je klinično ne moremo razlikovati od sepse, povzročene z drugimi bakterijami. Pozna okužba je lahko posledica okužbe v porodnem kanalu ali kasnejše okužbe, katere vir je kolonizirana mati ali drug koloniziran otrokov skrbnik. Pri poznih okužbah se največkrat razvije gnojni meningitis.

Pri materah se okužba kaže z vročino po porodu, endometritisom ali poporodno sepsom, pri ostalih odraslih osebah pa *S. agalactiae* lahko povzroča okužbe mehkih tkiv in kože (najpogostejše celulitis), okužbe sečil, pljučnico, endokarditis in septični artritis.

Drugi betahemolitični streptokoki povzročajo podobne okužbe kot *S. pyogenes*, lahko tudi meningitis, epiduralne abscese, abscese v trebušni votlini in okužbe sečil.

Streptococcus pneumoniae

Pnevmokoki povzročajo pljučnico domačega okolja, akutno vnetje srednjega ušesa, akutno vnetje obnosnih votlin, gnojni meningitis in bakteriemijo. Redkeje povzročajo osteomielitis, septični artritis, endokarditis, perikarditis, peritonitis, celulitis in možganski absces. Dejavniki tveganja za pnevmokokne okužbe so predhodna virusna okužba dihal, pridružene kronične bolezni dihal, srca, ledvic in jeter, sladkorna bolezen, asplenija, drugi vzroki oslabelosti imunskega sistema (npr. imunosupresivno zdravljenje, primarne imunske pomanjkljivosti, okužba s HIV, bolezen kostnega mozga), kajenje, starost (manj kot 5 let in več kot 65 let), alkoholizem, podhranjenost ter neugodne socialne razmere. Polžkov vsadek in likvoreja povečujeta tveganje pnevmokoknega meningitisa.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Diagnozo bolezni, ki jih povzročajo streptokoki, postavimo z dokazom povzročitelja v kužninah (npr. brisu nebnic, brisu žrela, gnojnih kožnih spremembah, hemokulturah, izmečku). Kužnino cepimo na ustrezna bakteriološka gojišča, kjer povzročitelja osamimo, ga identificiramo in pri betahemolitičnih

streptokokih opredelimo polisaharidni antigen. S hitrimi antigenskimi testi lahko *S. pyogenes* v nekaj minutah dokažemo neposredno v kužninah, odvzetih iz zgornjih dihal, topni pnevmokokni antigen pa v seču.

Odvzem kužnin

Za neposredno dokazovanje streptokokov jemljemo glede na vrsto okužbe različne kužnine v akutni fazi bolezni. Pri sumu na streptokokno vnetje žrela odvajamo bris žrela ali bris nebnic, enako pri sumu na škrlatinko.

Za ugotovitev povzročitelja impetiga odvajamo bris vsebine pustul ali vezikul, pri celulitisu pa skušamo streptokoke osamiti iz tkivne tekočine, odvzete z aspiracijo z iglo. Pri razširjenih in globljih streptokoknih okužbah tkiv in sumu na streptokokno sepsa odvajamo hemokulture.

Za dokaz povzročitelja pljučnice preiskujemo izmeček in kri (hemokultura), pri drugih bolezenskih znakih pa likvor (meningitis), plevralni punkt, peritonealni eksudat in druge kužnine, odvisno od mesta vnetja.

Preiskave

Neposredna mikroskopska preiskava

Primerna je za pregled izmečka in vseh primarno sterilnih kužnin (npr. likvorja, peritonealnega eksudata, punkt, aspiratov). Mikroskopska slika razmaza kužnine, obarvanega po Gramu, kaže morfološko značilne bakterije, tj. po Gramu pozitivne diplokoke ali po Gramu pozitivne koke v verižicah.

Hitri antigeni testi

Hitri antigeni test za dokaz *S. pyogenes* neposredno v brisu žrela ali nebnic je med najbolj uporabljenimi hitrimi mikrobiološkimi testi. Pri akutnem vnetju žrela je najbolj pomembno, da razlikujemo med okužbo s *S. pyogenes*, ki jo moramo zdraviti z antibiotikom, in ostalimi, večinoma virusnimi povzročitelji. Pri odločanju, kako ukrepati ob akutnem vnetju žrela, si lahko pomagamo s kliničnimi točkovnimi merili (npr. Centorjevimi merili), ki nam pomagajo pri odločanju, pri katerem bolniku je smiselno dodatno mikrobiološko diagnosticiranje. Ob izpolnjenih kliničnih točkovnih merilih s hitrim antigenim testom lahko praktično ob bolniku v dobrih 15 minutah ugotovimo, ali akutno

vnetje žrela povzroča *S. pyogenes*, in se ob pozitivnem rezultatu odločimo za antibiotično zdravljenje. Testi temeljijo na dokazu streptokoknega specifičnega polisaharidnega antigena A, ki ga najpogosteje dokažemo s specifičnimi protitelesi v imunokromatografski reakciji. Hitri testi so visokospecifični in nekoliko manj občutljivi.

S hitrim antigenim testom lahko dokazujemo tudi topni pnevmokokni antigen v urinu ali likvorju.

Osamitev in identifikacija bakterijske vrste

Kužnino zasejemo na krvni agar in obogateno tekočo gojišče ter inkubiramo 24–48 ur pri 35 °C. Streptokoki zrastejo na gojiščih večinoma že v 24 urah. Na krvnem agarju opredelimo vrsto hemolize in se na tej osnovi odločimo za nadaljnje biokemijske teste, potrebne za prepoznavanje streptokokov. Pri betahemolitičnih streptokokih obvezno določimo tudi polisaharidni antigen ali skupino po Lancefieldovi, ki jo rutinsko določamo s specifičnimi protitelesi proti polisaharidnim antigenom A, B, C, F in G, največkrat z reakcijo koaglutinacije. Večino streptokokov lahko zanesljivo prepoznamo tudi z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF. Ne moremo pa na ta način razlikovati med *S. pneumoniae* in vrstama *Streptococcus mitis* in *Streptococcus oralis*. Zato najpomembnejši test za prepoznavanje pnevmokoka ostaja optohinski test, s katerim ugotavljamo občutljivost izolata za optohin.

Molekularne metode

Za neposreden dokaz okužbe s *S. pyogenes*, *S. agalactiae* in *S. pneumoniae* lahko uporabimo tudi različne molekularne teste, s katerimi v kužnini, ustrezni za posamezno vrsto okužbe, neposredno pomnožimo specifični odsek nukleinske kisline posameznega povzročitelja.

Tipizacija pnevmokokov

Za tipizacijo pnevmokokov lahko uporabimo fenotipske metode in genotipske metode. Med fenotipskimi metodami je najpomembnejša reakcija Neufeld-Quellung, ki temelji na nabrekanju kapsule po vezavi s tipsko specifičnimi protitelesi iz diagnostičnih antiserumov in s katero določimo kapsularni serotip pnevmokoka. Vse več uporabljamo tudi različne genotipizacijske protokole, ki temeljijo na pomnoževanju in sekvenciranju posameznih genov. Tipizacija pnevmokoknih izolatov je pomembna predvsem za epidemiološko spremljanje invaziv-

nih pnevmokoknih okužb, tj. za zbiranje podatkov o serotipih invazivnih izolatov pnevmokokov, ki je osnova za odločanje o cepljenju in izbiri cepiva, primerne za določeno okolje.

Serološka diagnostika okužb z bakterijo *S. pyogenes*

Z različnimi serološkimi testi lahko ugotovimo prisotnost protiteles proti nekaterim antigenom bakterije *S. pyogenes* v bolnikovem serumu (protitelesa proti streptolizinu O, deoksiribonukleazi, hialuronidazi in streptokinazi). Dokazovanje naštetih protiteles za diagnostiko akutnih okužb s *S. pyogenes* ni smiselno, saj se protitelesa v bolnikovem serumu pojavijo šele 2–3 tedne po začetku bolezni, torej takrat, ko večina bolnikov že ozdravi. Določanje protiteles proti streptokoknim antigenom in spremljanje dinamike njihovega titra sta zelo pomembni pri diagnostiki revmatične vročine in poststreptokoknega akutnega glomerulonefritisa. Pomemben porast titra protiteles proti vsaj enemu izmed omenjenih antigenov potrjuje pred kratkim prebolelo okužbo s *S. pyogenes*.

ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Okužbe, ki jih povzroča *S. pyogenes*, zdravimo s penicilinom. V nasprotju z večino po Gramu pozitivnih bakterij *S. pyogenes* še ni razvil odpornosti proti peniclinu. Zdravljenje je učinkovito tudi s cefalosporini prve generacije, makrolidi, klindamicinom in vankomicinom. Z ustreznim zdravljenjem okužb, ki jih povzroča *S. pyogenes*, preprečujemo tudi revmatično vročino. Tudi pri okužbah, ki jih povzroča *S. agalactiae*, je zdravilo izbire penicilin, učinkoviti pa so tudi ampicilin, cefalosporini tretje generacije in vankomicin. Pnevmonokokne okužbe

zdravimo s penicilinom, če so izolati zanj občutljivi. Učinkoviti so tudi ampicilin, cefalosporini tretje generacije, kinoloni novejših generacij in vankomicin.

Pri porodnicah, koloniziranih s *S. agalactiae*, z antibiotično zaščito med porodom zmanjšamo stopnjo kolonizacije novorojenčka in tveganje okužbe novorojenčka.

Med vsemi streptokoknimi okužbami lahko dejavno, tj. s cepljenjem, preprečujemo samo pnevmokokne okužbe. Na voljo sta dve vrsti cepiv proti pnevmokokom – konjugirano in polisaharidno. Osnova polisaharidnih cepiv so prečiščeni kapsularni polisaharidi iz 23 serotipov pnevmokokov, ki povzročijo več kot 80 % vseh invazivnih pnevmokoknih okužb. Priporočamo jih odraslim in otrokom, starejšim od 2 let, z velikim tveganjem pnevmokoknih okužb. Konjugirana cepiva vsebujejo prečiščene kapsularne polisaharide desetih, novejša pa kar trinajstih najbolj pogostih serotipov pnevmokokov, ki so vezani na beljakovinski nosilec (v zaključni faczi raziskav je že 20-valentno cepivo). Z njimi lahko cepimo otroke po dopolnjenem 2. mesecu starosti. Čeprav so bila konjugirana pnevmokokna cepiva sprva namenjena otrokom, jih zaradi boljšega imunskega odziva uporabljamo tudi za cepljenje starostnikov in imunsko oslabljenih oseb. V Sloveniji je bilo protipnevmonokokno cepljenje dojenčkov v prvem letu starosti leta 2015 uvrščeno v program temeljnega cepljenja kot prostovoljno cepljenje, ki se plačuje iz sredstev obveznega zavarovanja. Cepljenje priporočamo tudi otrokom, ki so bolj izpostavljeni okužbi, in otrokom z večjim tveganjem težjega poteka bolezni.

LITERATURA ZA NADALJNI ŠTUDIJ

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, 8. izdaja. Philadelphia: Elsevier; 2016.
2. Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology, 27. izdaja. New York: McGraw-Hill; 2015.
3. Tomažič J, Strle F s sodelavci. Infekcijske bolezni, 2. izdaja. Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD; 2017.

37

Površinske in kožne mikoze

Tadeja Matos, Julija Germ

POVRŠINSKE MIKOZE

Površinske mikoze, povzročene z glivami *Malassezia* spp. *pityriasis versicolor*; seboroični dermatitis.

Površinska kandidoza: kandidate, najpogostejše *Candida albicans*, povzročajo okužbe sluznice ustne votline, žrela in požiralnika, vulvovaginalne okužbe, okužbe kože in nohtov, kronično mukokutano kandidozo.

KOŽNE MIKOZE

MIKROB

Dermatofiti, plesni, iz rodov *Microsporum*, *Trichophyton* in *Epidermophyton*.

PATOGENEZA

Povzročitelji pri človeku in živalih; parazitirajo v poroženelih delih kože, škodo povzročajo z mehanskim razraščanjem hif.

EKOLOGIJA IN EPIDEMIOLOGIJA

Geofilni (prst; patogeni za živali in človeka), zoofilni (značilni za določene vrste živali; patogeni tudi za človeka; koža, dlaka živali) in antropofilni (patogeni za človeka). Nekateri se pojavljajo po vsem svetu, drugi so značilni za določena geografska področja.

KLINIČNA SLIKA

Dermatofitoze, tinea, onihomikoza.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Neposredni mikroskopski preparat (KOH), osamitev in identifikacija iz kužnine (postržek kože, koščki nohtov, lasje).

ZDRAVLJENJE

Topični antimikotiki (lokalizirane okužbe), sistemski antimikotiki (razširjene, kronične okužbe).

- kožne mikoze, pri katerih se glive razraščajo v globlje plasti epidermisa, nohtov in las;
- podkožne mikoze, ki prizadenejo dermis, podkožno tkivo, mišice in fascije.

POVRŠINSKE MIKOZE

Povzročitelji površinskih mikoz so glive, ki navadno kolonizirajo poroženele dele kože, las in nohtov. Za rast izkoriščajo maščobe in keratin ter nikoli ne vdirajo v globlje plasti. Vnetne reakcije ne izzovejo ali pa je zelo šibka. Navadno so le estetska motnja, ki se odraža s pigmentnimi spremembami na koži (*pityriasis versicolor* in *tinea nigra*) ali z vozličastimi spremembami na laseh (črna in bela piedra).

Površinske glivne okužbe so pogostejše v toplejših in vlažnih predelih. V našem okolju so najpogostejši povzročitelji površinskih mikoz vrste rodu *Malassezia*, ki povzročajo *pityriasis versicolor*, povezujejo pa jih tudi z nastankom seboroičnega dermatitisa, prhljajem in folikulitisom. Kandidate, zlasti *Candida albicans*, so povzročiteljice površinske kandidoze kože in sluznic po vsem svetu. Med redkejših površinskih mikoz sodijo še *tinea nigra* ter bela in črna piedra, ki so razširjene predvsem na omejenih področjih s tropskim in subtropskim podnebjem. Povzročitelje in klinične značilnosti opisujemo v Tabeli 37.1.

Glivne okužbe kože, nohtov in las glede na globino tkiv, ki jih prizadenejo, razdelimo v tri velike skupine:

- površinske mikoze, ki so omejene na zunanjo, poroženo plast kože in las;

Površinske mikoze, povzročene z vrstami rodu *Malassezia* spp.

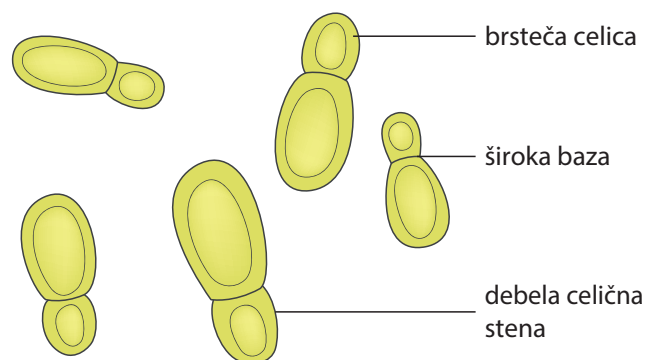
Mikrob

V rod *Malassezia* sodi več kot deset opisanih vrst, povzročitelji kožnih mikoze na različnih geografskih področjih sveta pa so predvsem *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* in *Malassezia restricta*. So dimorfne lipofilne glive, ki jih uvrščamo med bazidiomicete. Iz okroglih in ovalnih kvasovk običajno brstijo s široko bazo. Imajo debelo steno in so velike 2–6 µm. Od ostalih kvasovk se značilno razlikujejo po brazgotini, ki nastane ob brstenju in se kaže na površini celice kot nekakšen »ovratnik« (Slika 37.1). V primernih okoliščinah na koži se iz komenzalne oblike preoblikujejo v parazitsko, micelijsko obliko. Okužbo, ki jo povzročajo, imenujemo *pityriasis versicolor*.

Epidemiologija in patogeneza

Malasezije naseljujejo kožo večine odraslih. Do začetne naselitve pride kmalu po rojstvu, zlasti pa se koloniziramo v mlajši odraslosti. *Pityriasis versicolor* se pojavlja pri sicer zdravih osebah po vsem svetu, najpogostejše v tropskih in subtropskih predelih, najdemo pa jo tudi pri toplokrvnih živalih. Okužba navadno poteka endogeno, s človeka na človeka pa se prenaša z neposrednim stikom ali posredno preko delčkov odlučene kože, ki ostajajo na oblačilih in drugih predmetih.

V nekaterih tropskih predelih *pityriasis versicolor* prizadene do 60 % prebivalstva, medtem ko je razširjenost v severnih deželah (npr. na Švedskem) nižja od 1 %. Na področjih z zmerno klimo se pojavlja zlasti v poletnih mesecih. Zaradi hormonskih sprememb in povečanega izločanja žlez lojnic, kar ugodno vpliva na razrast gliv, je pogostejša v mladostništvu.



Slika 37.1. *Malassezia furfur* z brstečimi celicami, ki spominjajo na odtis stopala (»stopinja«).

Klinična slika

Pri bolnikih s *pityriasis versicolor* na koži najdemo drobne hipopigmentirane ali hiperpigmentirane lise različnih velikosti in oblik. Najpogostejše so na zgornjem delu trupa, ramenih, obrazu in vratu, tj. na predelih kože, ki so bogati z žlezami lojnicami. Spremembe so jasno razmejene od zdrave kože, lahko so rahlo dvignjene, in se drobno luščijo, kar je bolj izrazito ob drgnjenju kože. Hipopigmentacija, ki je posledica vpletanja *M. furfur* v proces sinteze melanina, se pogosteje pojavi pri temneje pigmentiranih osebah. Pri osebah s svetlejšo poltjo so spremembe rožnate ali svetlo rjave in postanejo bolj opazne po izpostavljanju sončni svetlobi. Večinoma ne povzročajo težav in tudi do imunske reakcije navadno ne pride, pri hujših oblikah okužbe ali na močno vlažnih predelih kože pa se lahko pojavi rahlo srbenje. Pigmentne spremembe na koži lahko kljub ustreznemu zdravljenju vztrajajo več mesecev.

Ob okužbi lasnih foliklov pride do folikulitisa, perifolikulitisa ali kožnih abscesov, a so tovrstni zapleti redki. Z malasezijami povzročen folikulitis je pogostejši v tropskih in subtropskih predelih sveta. Klinično se kaže v obliki srbečih monomorfni papul in pustul na področju prsnega koša, ramenskega obroča, redkeje na vratu in obrazu. Pogosteje se pojavlja pri bolnikih, ki se zdravijo z glukokortikoidi, dolgotrajno z antibiotiki, imajo sladkorno bolezen, kronično ledvično odpoved, rakave bolezni in aids. Kolonizacijo lasnih foliklov z malasezijo ugotavljajo tudi pri zdravih osebah.

Seboroični dermatitis je pogosta dermatoza, ki prizadene 1–3 % imunokompetentnega odraslega prebivalstva. Delež se spreminja glede na imunsko stanje in starost. Etiološko ga še niso opredelili, a ga pogosto povezujejo s prisotnostjo malasezije. *Malassezia* spp. lahko zlasti pri novorojenčkih in nedonošenčkih, ki prejemajo maščobno parenteralno prehrano, povzroči katetrsko sepsa (Poglavje 40).

Mikrobiološka diagnostika

Za postavitev diagnoze zadošča značilna klinična slika *pityriasis versicolor*, ki jo potrdimo z mikroskopskim pregledom postržka prizadete kože. Preparat pripravimo na stekelcu, postržek spremembe pa prelijemo z 10-odstotno raztopino kalijevega hidroksida (KOH) ali obarvamo s kalkofluor belim (*angl.* calcofluor white, CFW). V preparatu najdemo kratke, septirane hife različnih dolžin, ki v

premeru merijo 2,5–4 µm in so prepletene s skupki enoceličnih okroglih ali ovalnih brstečih celic z debelo celično steno in značilno široko bazo (značilen izgled »špagetov z mesnimi kroglicami«).

Kultivacija *M. furfur* je zahtevna, saj ne zraste na standardnih mikoloških gojiščih, ampak za rast potrebuje dodatek maščob. Kultiviramo jo na posebnih gojiščih ali na Sabouraudovem gojišču z dodatkom oljčnega olja. Po nekaj dneh inkubacije pri 30 °C na gojišču zrastejo drobne, konveksne kolonije kremnobeke barve. Identifikacija do ravni vrste pri zdravljenju površinskih mikoz ni potrebna. Priporočajo jo, če gre za izolat, ki je povzročil fungemijo, ter v epidemiološke namene.

Zdravljenje

Čeprav lahko okužba spontano preide, je navadno kronična in dolgotrajna. Zdravimo jo z lokalnim nanašanjem azolov in keratolitikov ter z negovanjem prizadetih predelov kože s šamponi, ki vsebujejo ketokonazol in selenov disulfid.

Površinska kandidoza

Mikrob

Številne kvasovke rodu *Candida* so normalno navzoče na površinah sluznic prebavil in spolovil ter na koži. Z njimi pridemo v stik že kmalu po rojstvu. Površinsko kandidozo najpogosteje povzroča *C. albicans*, redkeje tudi druge vrste. Kandidate so sicer tudi najpomembnejši oportunistični povzročitelji sistemskih glivnih okužb.

Epidemiologija in patogeneza

Površinska kandidoza je razširjena po vsem svetu. Najpogosteje se pojavlja na sluznicah in vlažnih predelih kože (npr. v dimljah, pod dojkami). Gre za oportunistično okužbo. Različni notranji in zunanji dejavniki lahko porušijo ravnovesje normalne mikrobiote kože in sluznic, ki omogoča čezmerno razrast kandid in znake površinske kandidoze (Tabela 37.2).

Klinična slika

Najpogostejša oblika površinske kandidoze je okužba sluznic, na katerih vidimo nežne, bele in rahlo privzdignjene obloge. Obloge se zlivajo med seboj in tvorijo siraste psevdomembrane, kar imenujemo psevdomembranska kandidoza ali sor. Pri oralni kandidozi najdemo bele obloge na bukalni sluznici in trdem nebu; navadno jih z lahkoto odstranimo, pod njimi pa se pokaže rdečina ali plitka razjeda, okolna sluznica pa je rdeča in otekla. Vaginalna kandidoza je pogosta med nosečnostjo, pogosteje zbole vajo ženske s sladkorno boleznijo in ženske, ki jemljejo oralna kontracepcijska sredstva ali prejemajo hormonsko nadomestno zdravljenje. Kožna kandidoza se pojavlja na mestih, ki so pogosto vlažna (pod dojkami, na notranji strani pregibov, med prsti). Prizadeta koža je pordela in se lušči. Bolniki tožijo zaradi pekočega in srbečega občutka na koži. Pri majhnih otrocih kandida povzroča »dermatitis pod pleniciami«. Otomikoza je subakutna ali akutna površinska glivna okužba zunanjega sluhovoda, ki jo v desetini primerov

Tabela 37.1. Povzročitelji površinskih mikoz.

Povzročitelj	Značilnosti povzročitelja	Okužba	Klinične značilnosti	Epidemiologija
<i>Malassezia furfur</i>	lipofilna kvasovka	<i>pityriasis versicolor</i> , <i>seboroični dermatitis</i> , folikulitis	nepravilno oblikovane lise, rahlo pigmentirane, rdečkaste, drobno luščoče se, na ravni kože – trup, ramenski obroč	kolonizira kožo; širom po svetu
<i>Candida</i> spp.	kvasovka	kožna in sluznična kandidoza, otomikoza, kronična mukokutana kandidoza	prizadeta koža je pordela in macerirana, z luščenjem, na sluznicah vidimo bele obloge, ki se zlivaj	kolonizira kožo, sluznice prebavil in spolovil; širom po svetu
<i>Hortaea werneckii</i>	temno pigmentirana gliva	tinea nigra	temne lise na dlaneh in podplatih	soline; širom po svetu
<i>Trichosporon inkin</i> , <i>T. beigeli</i> , <i>T. asahii</i> , <i>T. mucoides</i>	kremnobeke kolonije kvasovk artrokoniidij	bela piedra	beli vozlički na laseh in dlakah, zlahka jih odstranimo s prsti	tropska in in subtropska področja
<i>Piedraia hortae</i>	temno pigmentirana gliva	črna piedra	črni trdi vozlički na laseh se ne dajo zlahka odstraniti	tropska in in subtropska področja

Tabela 37.2. Oblike površinskih, neinvazivnih okužb, ki jih povzročajo *Candida* spp., in najpogostejši dejavniki tveganja.

Oblike površinskih in neinvazivnih okužb, ki jih povzročajo <i>Candida</i> spp.	Dejavniki tveganja
okužbe ustne sluznice in žrela, okužbe sluznice požiralnika (ezofagitis)	ekstremna starost (starostniki, nedonošenčki), maligna bolezen, antibiotiki, citotoksična kemoterapija, sistemski kortikosteroidi, obsevanje glave in vratu, zobna proteza, bolniki, okuženi s HIV, stanje po presaditvi krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov
vulvovaginalne okužbe	oralna kontracepcijska sredstva, nosečnost, skladkorna bolezen, sistemski kortikosteroidi, antibiotiki
okužbe kože in nohtov	vlažna koža (plavalci, gospodinje, koža pod plenici, pod kožnimi gubami), periferna žilna bolezen, sladkorna bolezen, debelost
kronična mukokutana kandidoza	T-limfocitna pomanjkljivost – prirojena bolezen
okužbe sečil	urinski kateter, motnje pretoka urina, posegi na sečilih, sladkorna bolezen

povzročajo glive, med njimi najpogosteje vrste iz rodov *Aspergillus* (do 90 %) in *Candida* (10 %), redkeje tudi druge. Do naselitve gliv in okužbe pogosto pride sekundarno, tj. po predhodni bakterijski okužbi, poškodbi ali ob povečanem izločanju ušesnega masla. Otomikoza je značilna za tropske predele, pojavnost pa je večja pri posameznikih, ki so pogosto v stiku z vodo (npr. vodni športi), saj je vlaga pomemben dejavnik tveganja. Prizadeto področje je vneto in srbeče, z izcedkom iz sluhovoda, ki ga lahko spremlja slabši sluh.

Kronična mukokutana kandidoza je heterogena skupina sindromov z značilnimi kroničnimi kožnimi spremembami kože, nohtov in sluznic. Zgodnje spremembe v ustni votlini so podobne tistim, ki jih vidimo pri psevdomembranski kandidozi, kasneje pa dobijo videz kronične hiperplastične (nodularne) kandidoze. Spremembe so navadno generalizirane, koža in nohti pa so prizadeti v različnem obsegu in stopnji. Navadno se pojavijo že v otroštvu in so pogosto povezane s številnimi imunološkimi nenormalnostmi. Nekatere oblike spremljajo različne endokrinološke motnje.

Mikrobiološka diagnostika

Iz postržka ali brisa prizadete kože oz. sluznic pripravimo mikroskopski preparat z 10-odstotno raz-

topino KOH, v katerem opazujemo brsteče celice s psevdohifami ali brez njih. Za kultivacijo kužnino nacepimo na Sabouraudovo gojišče in na kromogeno gojišče. Osamljen izolat identificiramo po standardnem postopku z biokemijskimi testi ali masno spektrometrijo.

Zdravljenje

Površinske okužbe nohtov, kože in sluznic zdravimo z lokalnim nanašanjem antimikotikov, kot sta klotrimazol in mikonazol. Trdovratnejše ali ponavljajoče se okužbe zdravimo oralno s flukonazolom ali itraconazolom. Sluznične in kožne spremembe pri kronični mukokutani kandidozi lahko učinkovito nadzorujemo s sistemskimi antimikotiki, a se ob prekinitvi zdravljenja znaki in simptomi ponovno pojavijo.

Kožne mikoze, dermatofitoze

Mikrob

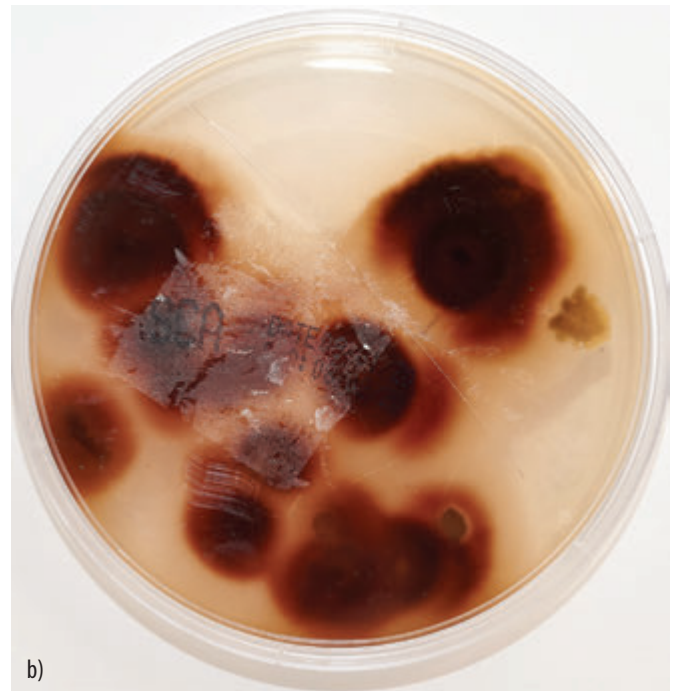
Kožne mikoze oz. dermatofitoze so površinske okužbe kože, las, lasišča in nohtov. Povzroča jih skupina vlaknatih gliv, ki jih imenujemo dermatofiti in imajo podobne fiziološke in morfološke značilnosti ter antigensko strukturo. Njihova najbolj izrazita lastnost je sposobnost razgradnje keratina.

Dermatofite, pri katerih poznamo spolni način razmnoževanja (tvorba askospor), uvrščamo v deblo *Ascomycota*. Večina dermatofitov se razmnožuje nespolno s tvorbo spor. Enocelične imenujemo mikrokonidiji, večcelične pa makrokonidiji. Poznamo približno 40 vrst dermatofitov, ki jih glede na način nespolnega razmnoževanja razvrščamo v tri rodove: *Trichophyton*, *Epidermophyton* in *Microsporum*.

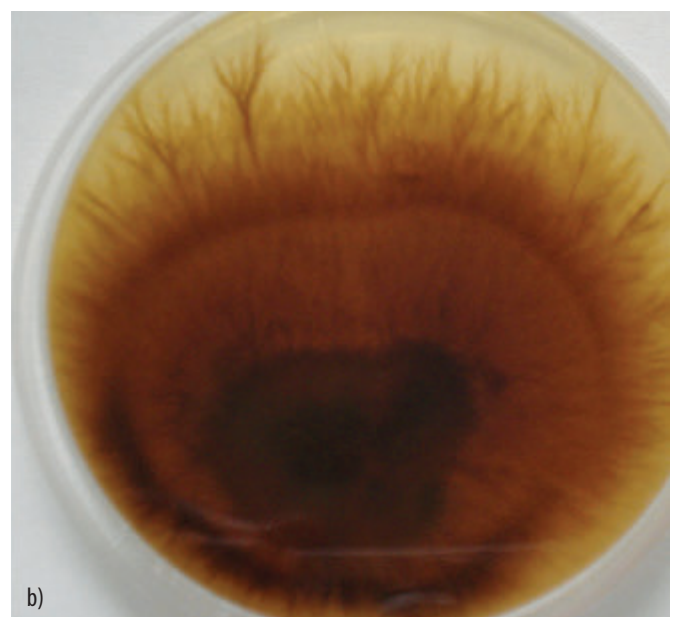
Rodove med seboj razlikujemo glede na rast na gojiščih in zahteve po hranilih, medtem ko se mikroskopsko razlikujejo po obliki mikrokonidijev in

makrokonidijev. Vsi rodovi imajo hialine, septirane hife. Največ predstavnikov uvrščamo v rod *Trichophyton* (Slike 37.2–37.5). Zanje so značilni redki, cilindrični makrokonidiji z gladko površino in številni mikrokonidiji (Sliki 37.4 in 37.5).

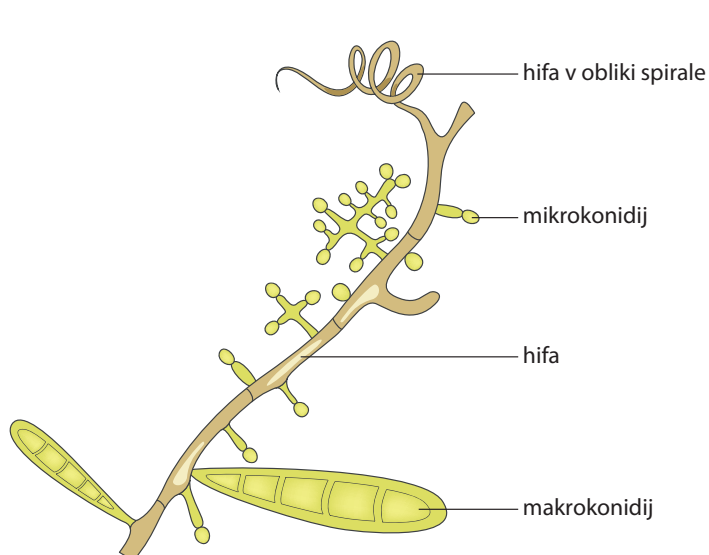
Vrste iz rodu *Microsporum* se nespolno razmnožujejo z mikrokonidiji in zašiljenimi večceličnimi makrokonidiji, ki imajo pogosto hrapavo površino (Sliki 37.6–37.8). *Epidermophyton floccosum* je edini predstavnik svojega rodu. Zanj je značilna tvorba gladkih kijastih makrokonidijev, ki se urejajo v



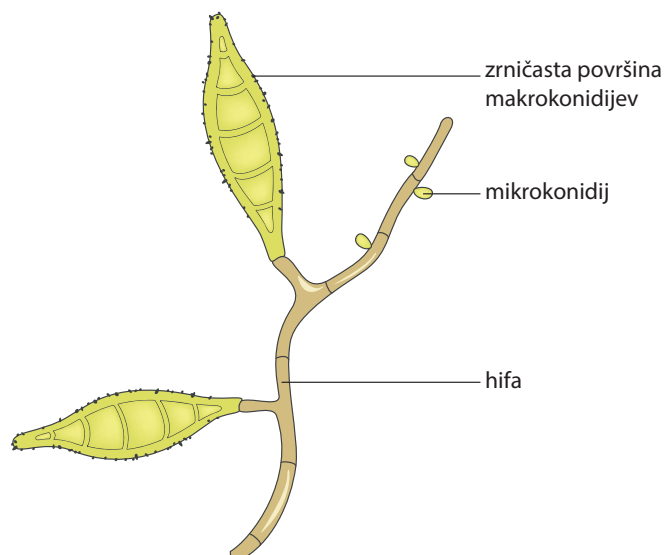
Slika 37.2. *Trichophyton rubrum* – kultura: a) zračni micelij, b) ozadje.



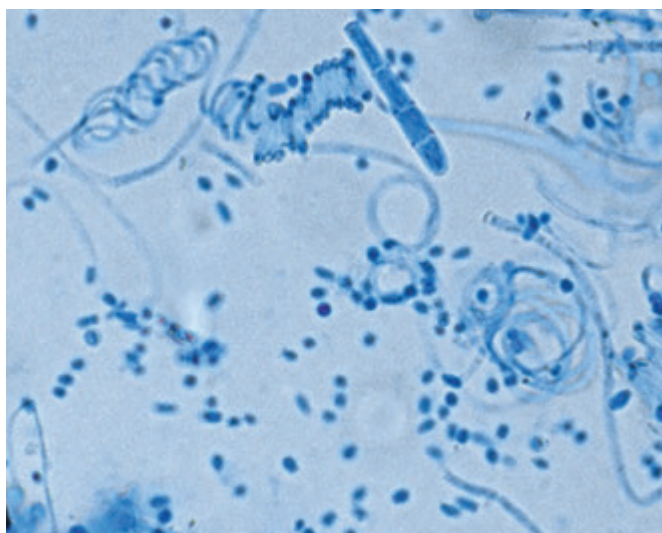
Slika 37.3. *Trichophyton mentagrophytes* – kultura: a) zračni micelij, b) ozadje.



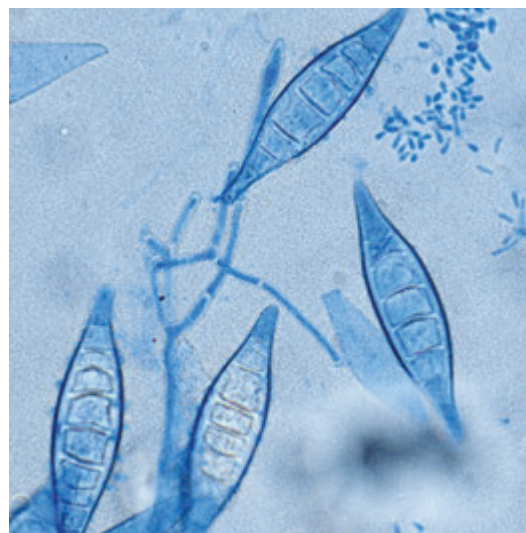
Slika 37.4. *Trichophyton mentagrophytes*, značilne mikroskopske strukture.



Slika 37.7. *Microsporum canis*, značilne mikroskopske strukture.



Slika 37.5. *Trichophyton mentagrophytes*; nativni preparat iz kulture, laktofenol modro, 400-kratna povečava.



Slika 37.8. *Microsporum canis*, nativni preparat iz kulture, laktofenol modro, 400-kratna povečava.



Slika 37.6. *Microsporum canis*, kultura; zračni micelij.



Slika 37.9. *Epidermophyton floccosum*, kultura; zračni micelij.

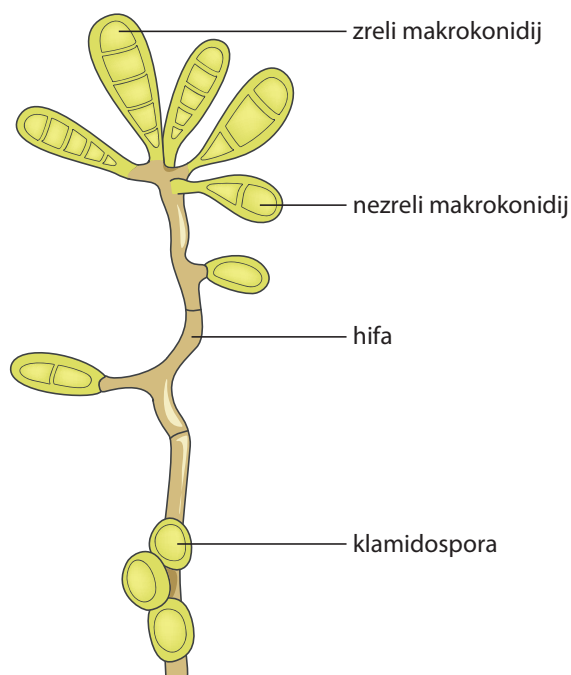
Slika 37.10. *Epidermophyton floccosum*, značilne mikroskopske strukture.Slika 37.11. *Epidermophyton floccosum*, nativni preparat iz kulture, laktofenol modro, 400-kratna povečava.

Tabela 37.3. Povročitelji dermatofitoz glede na najpogostejše mesto okužbe.

Dermatofitije	Povročitelji
tinea pedis	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i>
tinea capitis	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. canis</i>
tinea barbae	<i>T. mentagrophytes</i>
tinea cruris	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i>
tinea corporis	<i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>
tinea unguinum	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i>
tinea manum	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. canis</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>M. gypseum</i>

skupine, medtem ko mikrokonidijev ne tvori (Slike 37.9–37.11).

Patogeneza

Dermatofiti povzročajo okužbe pri človeku in pri živalih. Prizadenejo le povrhnje dele epidermisa, sloj *stratum corneum* ter poroženele dele las in nohtov. V zrnasto plast epidermisa *stratum granulosum* vdrejo redko. Sistemskih okužb ne povzročajo, saj pri 37 °C ne morejo rasti; rastejo pri temperaturi 20–25 °C. Dobro so prilagojeni na poroženele dele kože, kjer parazitirajo. Škodo povzročajo z mehanskim razraščanjem hif v tkivu in z razgradnjo keratina. Nastanek dermatofitoz pospešujejo nekateri lokalni dejavniki na koži (npr. topli, vlažni predeli kože, hiperhidroza), zmanjšan imunski odziv (prirojena ali pridobljena imunska oslABLjenost), genetska nagn-

jenost in morebitne pridružene bolezni. Odpornost proti okužbam omogočajo maščobne kisline in hitro obnavljanje epitelnega sloja kože. Pri patogenezi je verjetno pomembna T-celična imunost, pri okužbi lasnih foliklov tudi fagocitna sposobnost nevtrofilcev. Vrašcanje hif v keratinski sloj lahko povzroči suho luščenje, hiperkeratozo, eritem ali celo edem. Dermatofitoze ali tinee se razlikujejo glede na povročitelja in jih imenujemo po prizadetih delih telesa (Tabela 37.3).

Ekologija in epidemiologija

Dermatofite glede na naravni habitat razdelimo na geofilne, zoofilne in antropofilne. Geofilne dermatofite najdemo v prsti ter so patogeni za živali in za človeka. Zoofilne dermatofite najdemo v koži in dlakah živali. Antropofilni dermatofiti navad-

Tabela 37.4. Razvrstitev dermatofitov glede na ekološke niše in način okužbe pri človeku.

Ekološka niša	Vrsta	Gostitelj	Način okužbe pri človeku
antropofilni	<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum audouinii</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. violaceum</i>	človek	posredni in neposredni prenos – preko kožnih lusk, ki odpadejo s prizadetega dela kože
zoofilni	<i>M. canis</i> , <i>M. gallinae</i> , <i>T. equinum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> , <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> , <i>T. verrucosum</i>	mačka, pes, ptice, glodavci, jež, krava, konj	parazitirajo dlake in kožo živali prenos preko dlake na človeka pri živalih okužba neizrazita
geofilni	<i>M. gypsum</i>	prst	stik z zemljo, pogosteje v tropskih predelih

no povzročajo bolezen pri človeku. Osamitev in identifikacija dermatofita omogočata napoved poteka okužbe. Okužbe z antropofilnimi glivami, ki povzročajo večino dermatofitoz pri ljudeh, so kronične in s šibkim vnetnim odzivom, zdravljenje pa je zahtevno. Okužimo se ob neposrednem ali posrednem stiku z bolnim človekom s koščki keratina, v katerih dermatofiti dolgo ostanejo živi. Zoofilni in geofilni dermatofiti pri gostitelju izzovejo močnejši imunski odziv, saj niso tako dobro prilagojeni na človeka. Pričakujemo dober odziv na zdravljenje. Do prenosa pride s stikom z dermatofiti iz zemlje ali po stiku z okuženimi živalmi. Okužbe z geofilnimi glivami so pogoste pri ljudeh, ki so v stiku z zemljo. V našem okolju je najpomembnejši predstavnik *Microsporum gypsum*. Zoofilni dermatofiti parazitirajo na govedu, glodalcih, psih in mačkah, pri nas najpogosteje *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* in *Trichophyton verrucosum* (Tabela 37.4).

Dermatofitoze se pojavljajo pri obeh spolih v vseh starostnih obdobjih, a z nekaterimi izjemami – *tinea capitis* pogosteje opazimo pri otrocih pred puberteto, odrasli moški pa so bolj dovzetni za *tinea cruris* in *tinea pedis*. Nekatere vrste dermatofitov so ubikvitarne, druge so značilne za endemska območja. Medtem ko v Severni Ameriki prednjači *Trichophyton tonsurans* (75–88 %), je spekter dermatofitov v Evropi bolj pester. Na Nizozemskem v polovici primerov osamijo *T. verrucosum* in *Trichophyton schoenleinii*, sledijo *Trichophyton violaceum* in *M. canis*. Povsem drugače je v Nemčiji in srednji Evropi, kjer prednjači *M. canis*. Enako velja tudi za Slovenijo. V pregledni raziskavi so v obdobju

1995–2002 v ljubljanski regiji po pogostosti osamili *M. canis* (46,8 %), *Trichophyton rubrum* (36,7 %), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (7,9 %) in *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (4,9 %).

Klinična slika

Dermatofitoze uvrščamo med najpogostejše okužbe na svetu. Dermatofiti parazitirajo v poroženelih plasteh kože, nohtih in laseh. Klinična slika je pestra in odvisna od vrste povzročitelja, količine inokuluma in gostiteljevega imunskega stanja. Najpogostejša klinična slika je kolobarjasta eritematozna sprememba, ki se pojavi na koži trupa, obraza ali udov, se drobno lušči, ima privzdignjen rob in včasih srbi. Glivično okužbo nohtov imenujemo onihomikoza in jo povzročajo številni dermatofiti; prizadene približno 3 % prebivalstva v državah z zmernim podnebjem. Navadno se pojavi pri odraslih. Pogosto prizadene nohte na prstih nog, pri čemer prednjači noht na palcu. Potek je dolgotrajen; noht postane zadebeljen, razbarvan, privzdignjen in lomljiv. Najpogostejši povzročitelj je *T. rubrum*.

Tinea lasišča se lahko kaže s privzdignjenim okroglim ali obročastim področjem alopecije z rdečino in luščenjem, včasih tudi s papulami, pustulami in vezikli. Značilno privzdignjeno in zadebeljeno spremembo imenujemo kerion in prizadene tudi lasne mešičke. Lasje, okuženi z *M. canis*, *Microsporum audouinii* in *T. schoenleinii*, ob osvetlitvi z Woodovo svetilko fluorescirajo rumenozeleno. Tinea lasišča moramo prepoznati in pravočasno zdraviti, saj se sicer lasišče zabrazgotini in vodi v izgubo las.

Diagnostika

Klinična slika dermatofitov je značilna. Potrdimo jo z neposrednim mikroskopskim preparatom, izdelanim z 10-odstotno raztopino KOH, v katerem lahko opazujemo glivne elemente, najpogosteje septirane hife, lahko tudi konidije in artrokonidije. Diagnozo dokončno potrdimo z osamitvijo povzročitelja iz kužnine (postržka kože, koščkov nohtov ali las). Poleg morfoloških in fizioloških značilnosti povzročitelja sta pomembni tudi klinična slika in epidemiološka anamneza, saj so nekateri dermatofiti prisotni na omejenih geografskih območjih. Ker na gojiščih rastejo počasi, moramo za negativni izvid počakati najmanj štiri tedne. Vzorce inkubiramo na trdnih gojiščih pri sobni temperaturi, najpogosteje na standardnem Sabouraudovem gojišču, v katero dodamo antibiotike in cikloheksimid, ki zavre rast drugih hitrorastočih kontaminantov. Na dermatofitnem gojišču dermatofiti spremenijo barvo gojišča iz rumenooranžne v rdečo; njihova rast namreč gojišče alkalizira, zato indikator (fenol rdeče) spremeni barvo. Dermatofiti se med seboj pomembno razlikujejo glede na hitrost rasti, videz površine kolonij in barvo (Slike 37.2, 37.3, 37.6, 37.9). To je pogosto izrednega pomena, saj omogoča, da jih prepoznamo že pred mikroskopiranjem. Kolonije so lahko puhaste in prašnate ter rastejo izrazito konveksno ali bolj površinsko. Barva kolonij je odvisna od sestave gojišča in vrste dermatofita; kolonije so bele, krem ali rožnate ter tudi rdeče javkaste in vijolične. Mikroorganizem navadno opredelimo s kombinacijo makroskopskih in mikroskopskih značilnosti. Izolate z neznačilno morfologijo identificiramo s sekvenciranjem vmesnega distančnika ribosomskega operona.

Zdravljenje

Lokalizirane okužbe, ki ne prizadenejo las in nohtov, zdravimo lokalno z nanašanjem krem in gelov, ki vsebujejo antimikotike, medtem ko razširjene in kronične okužbe zdravimo s sistemskimi antimikotiki. Pomembni so tudi higienski ukrepi, npr. striženje ali britje prizadetega lasišča in umivanje z antimikotičnimi šamponi. Da preprečimo širjenje okužbe, moramo bolnike poučiti o pravilnem ravnanju. Potrebno je tudi dosledno čiščenje javnih kopališč in bazenov s fungicidnimi raztopinami ter odkrivanje in zdravljenje dermatofitov pri živalih.

Onihomikoze, ki jih povzročajo nedermatofitne glive

Mikrob

Onihomikoze so glivne okužbe nohtov in jih poleg dermatofitov povzročajo tudi številne druge glive, med njimi predvsem vrste iz rodov *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Neoscytalidium dimidiatum* in *Neoscytalidium hyalinum*.

Patogeneza

Okužba lahko nastane na dva načina. Okužba, ki se prične v proksimalnem delu nohta, na obnohtju, in napreduje distalno proti prostemu delu nohta, navadno prizadene nohte rok. Največkrat jo povzroča *Candida* spp., pojavlja pa se predvsem pri osebah, ki si pogosto močijo roke. Okužba s pričetkom na distalnem delu nohta poteka v obratni smeri s počasnim proksimalnim širjenjem do zarodnega dela nohta, značilna pa je za nohte nog. Vzroki okužbe so slabša prekrvljenost, poškodba nohtov, sladkorna bolezen, pogost stik z vlago oz. delo v vlažnem okolju, pomanjkljiv imunski odziv in dolgotrajna izpostavljenost povzročiteljem. Okužba se lahko z enega nohta prenese na ostale.

Klinična slika

Onihomikoze so dolgotrajne in za bolnike estetsko breme; včasih jih spremljata bolečina in zmanjšana delovna zmožnost. Okužba prizadene enega ali več nohtov hkrati. Bolezenske spremembe lahko potekajo vrsto let, preden bolnik obiše zdravnika. Okuženi nohti so zadebeljeni in lomljivi ter spremenjene barve.

Mikrobiološka diagnostika

Zgolj s pregledom diagnoze ne moremo postaviti; dokažemo jo z mikrobiološkimi laboratorijskimi preiskavami. Odvzamemo prizadet delček nohta, ki ga odrežemo čim bolj v zdravi del. Za mikroskopski pregled pripravimo preparat z dodatkom 10-odstotne raztopine KOH in v vzorcu iščemo glivne elemente. Za dokaz povzročitelja okužbe kužnino nacepimo na mikološka gojišča, porasle kolonije pa identificiramo s standardnimi metodami. Pri tolmačenju rezultata preiskave moramo biti previdni, saj ob osamitvi glive ne gre vedno za okužbo, ampak lahko le za saprofitno kolonizacijo poškodovanega nohta. Okužba z glivami je bolj verjetna, če glive osamimo večkrat zapored, pred tem pa potrdimo pri-

sotnost glivnih struktur v neposrednem mikroskopskem pregledu vzorca prizadetega dela nohta.

Zdravljenje

Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo glive *Fusarium* spp., *S. brevicaulis*, *N. dimidiatum* in *N. hyalinum*,

so zaradi šibkega odziva na običajno zdravljenje nadvse zahtevne. Najboljši učinek dosežemo s kombinacijo delne ali popolne odstranitve prizadetega nohta in sistemskega zdravljenja z itraconazolom in/ali terbinafinom.

LITERATURA ZA NADALJNI ŠTUDIJ

1. Superficial and Cutaneous Mycoses. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, eds. Medical Microbiology, 7. izdaja, Philadelphia: Saunders Elsevier; 2013. p. 643–651.
2. Renati S, Cukras A, Bigby M. *Pityriasis versicolor*. BMJ. 2015; 350: 1394–400.
3. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M et al. The *Malassezia* genus in skin and systematic diseases. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(1): 106–41.
4. Dolenc Voljč M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995–2002. Mycoses. 2005; 48(3): 181–6.
5. Golle A, Matos T, Tomazin R, et al. Dermatofitije: diagnostika, epidemiologija in zdravljenje. Med. Razgl. 2018; 57(3): 65–74.

