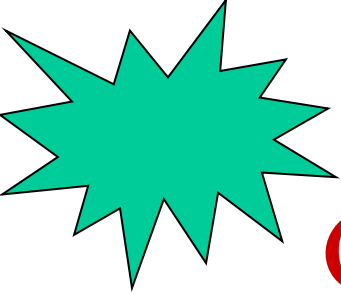


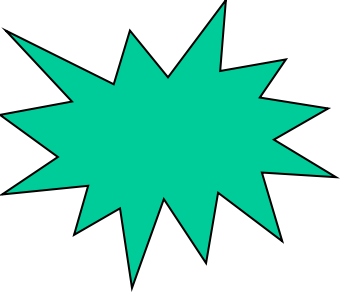
Genetika baktérií

- Replikácia -DNA - prenos vlastností
- Regulácia
- Zmena vlastností - mutácie
- - výmena génov, - bakteriofágy
- Genetické inžinierstvo v medicíne
- Využitie pre diagnostiku



Genetický materiál - DNA

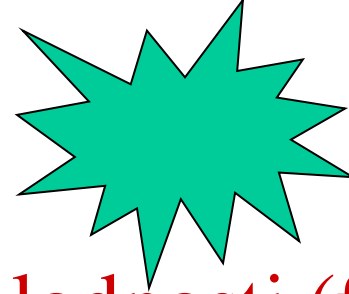
- Bakteriálna bunka
 - DNA - genetické informácie uložené:
 - * v nukleoide - cirkulárny dvojvláknový chromozóm
 - * v plazmide
- Replikácia DNA prebieha
 - obojsmerne - nukleotid
 - jednosmerne - plazmid



Plasmidy

- Extrachromozomálne genetické jednotky
- Replikujúce sa samostatne
- nekóduje vitálne funkcie a vlastnosti
- nadstavbové genetické informácie
- *Genotyp - súbor genetických informácií*
- *Fenotyp - súbor vlastností, ktoré sa prejavujú*

Typy plazmidov a ich význam



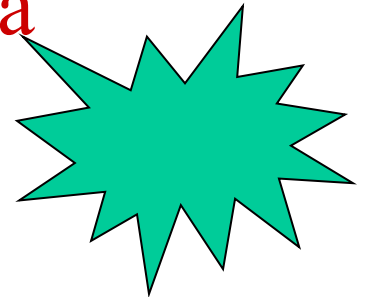
- Veľké plazmidy - napr. faktor plodnosti (fertility factor, F), faktor prenosu rezistencie - (resistance transfer factor RTF) - nesú informáciu pre
 - *vlastnosť, *vytvorenie nástroja prenosu - pilus
 - *mechanizmus prenosu - konjugácia
- Menšie plazmidy
 - nekonjugatívne - nenesú informáciu pre vytvorenie proteínu prenosu
- Šírenie informácie konjugáciou, transdukciou, inkorporáciou

Replikácia DNK - podmienka prenosu informácie

- Transkripcia - prepis pôvodnej informácie z DNA do mRNA
- Translácia - preklad informácie z mRNA prostredníctvom tRNA na bielkoviny

Regulácia expresie - prejavenia sa - genetickej informácie

- Bunka aj bakteriálna musí byť schopná sa adaptovať na meniace sa podmienky:
 - má základné regulačné mechanizmy
 - musí minimalizovať energetické nároky
 - byť schopná sa vypnúť alebo zapnúť podľa potreby
- Zoskupenie génov, ktoré kódujú enzýmy jednej metabolickej cesty
OPERON: promótor, gény, terminátor sú koordinovane regulované, prepísané aj preložené



Regulácia traskripcie

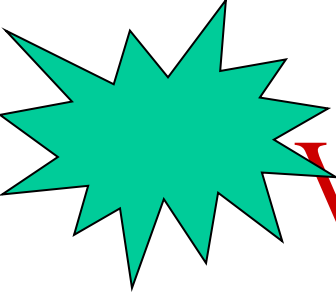
- 1) Gény sa prepisujú dovtedy, pokiaľ nie je prepis zablokovaný represorom - **negatívna kontrola** - (enzým sa produkuje až, kým nie je jeho produkcia zablokovaná nadbytkom produktu)
- 2) Gény sa nezačnú prepisovať pokiaľ nie je prítomný induktor - aktívny regulačný protein - **pozitívna kontrola** - (enzým sa nezačne produkovať, ak nie je v prostredí substrát, na ktorý by pôsobil)

Zmena genetickej informácie

- Mutácia - náhodné poškodenie DNA. DNA obsahuje reparačný systém
- Výmena génov - rekombinácia

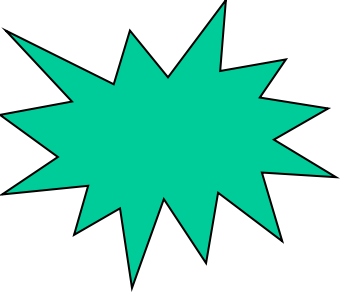
Pôvod mutácií

- Spontánne
- Indukované
 - teplo
 - ultrafialové svetlo
 - ionizujúce žiarenie
 - chemické mutagény - analógy nukleotidových báz
= štrukturálna podobnosť



Výmena a prenos genetickej informácie

- Medzi bakteriálnymi bunkami
 - 1) transformáciou - inkorporácia exogénnej DNA
 - 2) transdukcia - prenos z jednej baktérie do ďalších bakteriofágom - vírusom baktérie
 - 3) konjugáciou - akoby sexuálna výmena - prenos informácie z jednej baktérie do druhej prostredníctvom pillusu
- Prenesené gény sú často integrované do DNA nukleoidu alebo plazmidu a prenášané na dcérske bunky



Bakteriofág

- vírus bakteriálnej bunky, využíva ich energetický systém a syntézu proteínov. Baktériu infikuje len nukleová kyselina, ktorá sa replikuje a môže dôjsť k rekombinácii medzi NK baktérie a fágu.

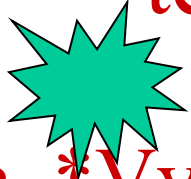
Životný cyklus bakteriofágov

- lytický - po napadnutí bunky a replikácii fágovej NK dôjde k lýze bunky. Nové fágy sú virulentné, napádajú ďalšie baktérie
- lysogénny - nelytický - fágová DNA je integrovaná do NK baktérie - temperovaný fág - po viacerých generáciách dôjde ku konverziii a zmene na virulentný

Genetické inžinierstvo v mikrobiológii

- Vytvorenie vektorov alebo nástrojov schopných klonovať rôzne DNA sekvencie
- Eukaryotické gény môžu byť prenesené a exprimované prokaryotickými systémami
- Mnohé genetické metabolické ochorenia sú spôsobené chýbaním enzýmov a proteínov - ich produkcia baktériami
- Produkcia rekombinantných vakcín baktériami

Využitie molekulárnych a genetických technológií v diagnostike mikrobiálnych infekcií



- *Využitie genetických sond na diagnostiku ochorení - nukleová kyselina - typická pre ochorenie je inkorporovaná do baktérie, kde je pomnožená, označená napr. radionuklidom, fluorescenčným farbivom, aby sa dala detekovať
- *in situ hybridizácia - pomnoženie genetickej informácie vírusu priamo v odobratom tkanive
- *PCR - vytvorenie miliónov kópií nukleovej kyseliny alebo typickej sekvencie suspektného mikroorganizmu

Antibiotiká a chemoterapeutiká

vysvetlenie pojmov

mechanizmus pôsobenia

typ účinku

nežiadúce účinky

rozdelenie antibiotík, zásady liečby

ANTIBIOTIKÁ

- Selektívne inhibujú alebo usmrcujú mikroorganizmy v koncentráciách, ktoré ešte nie sú toxické pre makroorganizmus - preto na rozdiel od dezinfekčných a antiseptických látok môžeme ATB používať v liečbe
- zaradujeme sem aj chemoterapeutiká s antibakteriálnym účinkom, ktoré sa získavajú (semi)synteticky, majú svoj pôvod v prírode, alebo boli získané umelo

Rozdelenie ATB podľa pôvodu:

Producentom môžu byť

1.aktinomycéty-aminoglykozidy,TTC,makrolidy

2.iné baktérie-predovšetkým bacily-bacitracin,polymyxin

3.mikroskopické huby-penicilium,aspergilum-penicilíny

ATB sa dajú získať aj- z vyšších rastlín-fytoncidy

- zo živočíšnych tkanív-ekmolin

Rozdelenie podľa použiteľnosti:

- 1. antibakteriálne preparáty - väčšina používaných antibiotík a chemoterapeutík, aj antiriketsiálne**
- 2. antimykotické preparáty - účinné na plesne, kvasinky (fungicidin, griseofulvin, mikonazol, ketokonazol)**
- 3. antiprotozoárne preparáty - účinné napr. pri toxoplazmóze, amebiáze - spiramycin, paromomycín**
- 4. antivírusové preparáty - chemoterapeutiká**

Bakteriostáza

- zástavu množenia baktérií vplyvom antibiotika, pričom baktérie nie sú usmrtené. Prirodzené odumieranie kľudových foriem nie je ovplyvnené

Baktericidita

**-usmrtenie bakteriálnych buniek antibiotikom
-špecifický význam má baktericídny účinok počas prvých 4 hod.**

pôsobenia ATB: ak je v tomto čase usmrtených aspoň 99 % baktérií,

ide o klinicky relevantnej baktericidite

Rozdelenie antibiotík podľa typu účinku:

1. Antibiotiká a chemoterapeutiká primárne bakteriostatické

- chloramfenikol**
- tetracyklíny**
- makrolidy**
- sulfonamidy**
- nitrofurány,...**

2. Antibiotiká a chemoterapeutiká primárne baktericídne

- penicilíny**
 - cefalosporíny**
 - streptomycín**
 - polymyxíny,...**
- penicilíny a cefalosporíny účinkujú baktericídne len na množiace sa baktérie**
- aminoglykozidy pôsobia baktericídne aj na kludovú fázu baktérií**

Rozdelenie antibiotík podľa spektra účinku:

1.Úzkospektrálne antibiotiká a chemoterapeutiká

- umožňujú len úplne cieleňú terapiu**
- antituberkulotiká-viomycin,INH,PAS**

2.Širokospektrálne antibiotiká a chemoterapeutiká

- aminoglykozidové ATB**
- ampicilin**
- chloramfenikol**
- tetracyklíny**
- cotrimoxazol**

-

Mechanizmus účinku antibiotík:

1. Tlmenie syntézy peptidoglykánov bunkovej steny

- syntéza prebieha v 4 fázach**
- v prvých 3 fázach pôsobia bacitracín,vankomycín,cykloserín**
- vo 4.fáze pôsobia penicilíny,cefalosporíny**

2. Narušenie protoplazmatickej membrány

- polymyxínové antibiotiká,niektoré polyenové antimykotiká**
- polymyxínové molekuly sa viažu na lipidové a proteínové vrstvy protoplazmatickej membrány a narúšajú jej bariérové funkcie.**

3. Inhibícia proteosyntézy

- tetracyklíny,makrolidy,aminoglykozidové ATB,...**
- inhibícia väzby aminoacyl-tRNA na receptory ribozómov-
nedostatok aminokyselín**
- blokovanie tvorby polyzómov z voľných ribozómov a mRNA**

Bunková stena

- **beta-laktámové ATB** - **blokáda syntézy peptidoglykánu**
- **vankomycin, teikoplanin** - **blokáda kondenzácie acyl-D-alanyl-D-alaninu**
- **bacitracin** - **syntéza fosfolipidov**

Cytoplazmatická membrána:

- polymyxiny** **-fosfolipidy cytoplazmatickej membrány**
- amfotericin B** **-syntéza ergosterolu**
- azoly** **-syntéza ergosterolu**

Proteosyntéza:

Ribozómy

- chloramfenikol** **-peptidyltransferázu**
- tetracyklíny** **-ribozom A**
- makrolidy** **-translokáciu**
- klindamycin** **-peptidyltransferáza**
- aminoglykozidy** **-ribozomálna syntéza**

Nukleové kyseliny:

- chinolóny**
- rifampicin**
- nitroimidazoly**
- DNK-gyráza**
- RNK-polymeráza**
- šróbovica DNK**

Syntéza kyseliny listovej:

- sulfonamidy - syntetáza kyseliny listov**
- trimetoprim - reduktáza**
kys.dihydrolistovej

penicilíny	-syntéza peptidoglykánov b. steny
cefalosporíny	-//-
karbapenémy	-//-
monobaktamy	-//-
inhibítory beta-laktamáz	

aminoglykozidy

tetracyklíny	- syntéza mikrobiálnych proteínov
chloramfenikol	-//-
makrolidy	-//-
polypeptidy	- synt.bunkovej steny
linkosamidy	-proteosyntéza
glykopeptidy	-syntéza mukopeptidu bunkovej steny

Antibakteriálne chemoterapeutiká

sulfonamidy

-syntéza kys. listovej

sulfonamidy

-//-

+diaminopyrimidiny

nitrofurány

-inhibícia

metabolizmu cukrov

chinolóny

**-syntéza nukleových
kys.**

nitroimidazoly

**-syntéza nukleových
kyselín(anaeróbne b.)**

Peniciliny -primárne baktericídne

**G PNC -G+ -streptokoky,pneumokoky,korynebakteria,listérie,
stafylokoky netvoriace beta lektamázu**

**protistafylokokové PNC-odolné k stafylokokovej beta laktamáze
meticilin,oxacilin**

**širokospektrálne pnc - G- paličky,okrem pseudomonád,proteus,
-enterokoky**

antipseudomonádové pnc-pseudomonády,proteus indol +

acylureidoPNC- G+,G-,pseudomonády

Cefalosporíny

- polosyntetické**
- baktericídne**
- vysoké koncentrácie**

v moči,likvore

1.generácia- G +

G - enterobaktérie

močových inf.

2.generácia- G - paličky

- gonokoky

3. generácia- G-

4.generácia-enterokoky,stafylokoky

pseudomonády

Iné betalaktámové ATB:

monobaktamy: baktericídne
G - (enterobaktérie,serratia,pseudomonády)

karbapenemy: baktericídne
G+ G-
veľmi široké spektrum

Chloramfenikol: bakteriostatické
G+ G-

Tetracyklínové ATB : bakteriostatické,vo vyšších koncentráciach
baktericídne
G+ G-
treponemy,leptospiry,mykoplazmy,chlamýdie

Makrolidy: bakteriostatické,
stredne široké spektrum
G +

Aminoglykozidy: baktericídne
široké spektrum
G + G-

Polypeptidy : baktericídne
G - paličky okrem proteus (polymyxiny)

Linkomycín, clindamicín-G+ koky

Vankomycin G+ (stafylokoky, enterokoky)

Antituberkulotiká: bakteriostatické

vysoká toxicita

využívajú sa len v liečbe TBC (rifampicin

INH,ETM,PYR,PAS

Chemoterapeutiká

sulfonamidy: bakteriostatické

**G + G- ,aj chlamýdie,mykoplazmy,nokardie,
toxoplazma,**

cotrimoxazol: kombinované (trimetoprim+sulfametoxazol)

baktericídne

G + G-

chinolóny:

baktericídne

1.gen. Kys. nalidixová- G-,uroinf.

2.gen. Fluorochinolony-G +,G-

3.gen. Di.-Tri.-fluorované chinol.

Nežiadúce účinky

**vznikajú pri obvyklých dávkach a
doporučovaných
farmakoterapeutických koncentráciách
antibiotík**

Toxické účinky

**Vznikajú pri vysokých dávkach a vysokých
plazmatických
koncentráciách antibiotika, event. pri vyššej
reaktivite organizmu.**

Nežiadúce účinky

Alergie-obvykle po predchádzajúcej senzibilizácii vyvolanej aj malou dávkou antibiotika

- sú časté napr.u penicilínov**
- pátrame po nich v anamnéze**
- polymorfné exantémy, eozinofília, edémy, konjunktivitída fotodermatózy, anafylaktický šok,...**
- nebezpečné formy sú spojené hlavne s parenterálnym podaním antibiotika**
- môžu sa prejavit' ako včasné alebo neskoré reakcie počas liečby, po jej ukončení**
- môžu vzniknúť ako reakcia na pomocné látky prítomné v liekových formách**

Nežiadúce účinky

biologické efekty -sú spôsobené oplyvnením prirodzenej bakteriálnej mikroflóry kože,slizníc

-sú veľmi časté pri podávaní širokospektrálnych ATB (ampicilin,tetracyklín)

-hlavne dyspepsie,hnačky,hypovitaminóza K, následné poruchy hemostázy

-prerastanie kvasiniek alebo rezistentných baktérií(stafylokokov,ps.aeruginoza,...), tieto komplikácie sú náročné na liečbu

Toxické účinky

hematotoxické -gancyklovir, chloramfenikol

nefrotoxické -amfotericin B

hepatotoxické -rifampicin, ketokonazol

**neurotoxické -
nitrofurantoin, gentamycin, izoniazid, streptomycin**

Rezistencia-odolnosť baktérií voči účinku antibiotika alebo chemoterapeutika.

-prirodzená-mikroorg. je mimo spektra účinku ATB

-primárna-necitlivosť časti bakteriálnej populácie ktorá patrí do spektra účinku ATB, a to bez ohľadu na to ,či pred tým došlo k styku s daným ATB

-sekundárna-necitlivosť kmeňa patriaceho do spektra účinnosti ATB, kt. vzniká až po kontakte s daným ATB

**-mutačná-vzt'ahuje sa k predchádzajúcej liečbe,
mutácia-rezistenciu-množenie rezistentných
baktérií**

- prenosná rezistencia- sprostredkovná plazmidmi**
 - častejšia u G-**
 - prenos genetickej informácie:**

Konjugácia

Mechanizmus transdukcie- DNK plazmidu je prevzatá do bakteriálneho vírusu a prenesená do ďalšej baktérie

- skrížená rezistencia - súčasná necitlivosť na rôzne ATB**
 - obojustranne (príbuzné ATB)**
 - jednostranne (Gent.-Amikacin),citlivosť menšieho počtu baktérií môže byť voči jednému ATB zachovaná.**

Mechanizmy vzniku rezistencie

1. Produkcia enzýmov: ich pôsobením sa mení štruktúra antimikrobiálnej látky, strata účinnosti

Beta laktamázy- extracelulárne pôsobiace enzýmy mikroorganizmov, ktoré štiepia beta-laktámový kruh, čím antibiotiká tohoto typu strácajú účinok.

Podobný účinok majú intracelulárne pôsobiace acetyltransferázy na účinok chloramfenikolu.

Klasifikácia beta-laktamáz

Cefalosporinázy(neinhibované kys.klavulanovou)

Chromozómami podmienené enzýmy Ps.aeruginoza, Ent. cloacae

Penicilinázy,cefalosporinázy Inibované kys.klavulanovou

Sprostredkované plazmidy TEM-typ.,Chromozómami podm.enzýmy Klebsiela spp.,stafylokokové enzýmy

metaloenzýmy

Enzýmy hydrolyzujúce imipenem,z Xantomonas maltophylia

Penicilinázy(neinhibované kys.klavulanovou)

Chromozómami pomienené enzýmy Ps.cepacia

2. Mutačné zmeny na úrovni intracelulárneho receptora:

- zmeny v štruktúre PBP- vznik rezistencie na penicilíny**
- metylácia aminokyseliny na 50 S ribizómovej podjednotke -vznik rezistencie na erytromycín**

3.Zamedzenie penetrácie antibiotika cez bunkovú stenu:

- výsledkom je blokovanie pôsobenia ATB na intracelulárnych receptoroch (PBP,30S,50S)**
- aminoglykozidy,tetracyklíny**

4.Zmena metabolickej cesty,zmena afinity cieleného enzýmu pre chemoterapeutikum

Beta laktámové ATB

**zmena PBP,znížená permeabilita
produkcia beta laktamáz**

**aminoglykozidy,makrolidy-znížená väzba na cieľové ribozómy
znížená permeabilita bunk.steny
inaktivujúce enzýmy**

cloramfenikol

**znížená- väzba na ribozómy
-permeabilita
chlmf-acetyltransferáza**

tetracyklíny

**nedostupnosť cieľových ribozómov
aktívny bunkový eflux**

Chinolony

**rezistencia DNA -gyrázy
znížená permeabilita pre
antibiotikum
aktívny bunkový eflux**

sulfonamidy

rezistencia syntetázy

trimetoprim

**rezistencia reduktázy
znížená permeabilita**

Cielená liečba -predstavuje ideálny postup
- najprv izolovaný konkrétny pôvodca infekcie
-určená citlivosť na antibiotiká
-voľba antibiotika
(dobrá znášanlivosť,úzke spektrum)
-u chronických infekcií,vyvolaných vysoko rezistentnými
pôvodcami

Empirická liečba -voľba antibiotika podľa očakávaného spektra
pôvodcu infekcie
-správne zhodnotenie klinického stavu
-znalosť možných(najčastejších)patogénov v
súvislosti s lokalizáciou infekcie a klinických
príznakov

Intervenčná liečba-ak nebol preukázaný pôvodca infekcie

-postupná liečba podľa určitej schémy,ktorá stanoví ďalšie ATB v prípade neúčinnnej iniciálnej terapie

Širokospektrálna liečba-u život ohrozujúcich infekcií

-ATB schopné pokryť takmer celé spektrum potencionálnych pôvodcov

-kombinácie ATB

-hlavne u sepsy,peritonitídy,infikované gangrény,popáleniny,endometritídy...

-imipenem,cefotaxim+piperacilin

- Aditívny účinok-výsledný účinok kombinácie dvoch alebo viacerých antibiotík,ktorý zodpovedá súčtu účinku jednotlivých komponent
- Antagonizmus ATB-vzájomný vzťah farmák použitých v kombinácii,jeho výsledkom je inhibícia bakteriálnej kultúry pri vyšších koncentráciách ako pri použití jednotlivých ATB samostatne.

Kombinácia antibiotík-má slúžiť k dosiahnutiu synergizmu v účinku,
-cieľom je zvýšenie účinnosti rozšírenie antibakteriálneho spektra
a prevencia vývoja bakteriálnej rezistencie

Synergizmus-pri súčasnom pôsobení dvoch alebo viacerých ATB na bakteriálnu populáciu je vyvolaný účinok vyšší v porovnaní s účinkom, ktorý by bol vyvolaný každou látkou zvlášť

Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC)

-najmenšie namerané množstvo (koncentrácia) antibiotika ktoré inhibuje rast a množenie baktérií v testovacom médiu in vitro.

-pri zisťovaní MIC je dôležitá štandardizácia podmienok,

-výsledky môžu byť ovplyvnené veľkosťou

inokula, druhom

testovacej pôdy, trvaním a teplotou inkubácie, atď.

Minimálna baktericídna koncentrácia (MBC)

-najnižšia nameraná koncentrácia antibiotika in vitro, ktorá usmrtí exponovanú bakteriálnu kultúru v priebehu 24 hod. inkubácie v tekutej pôde.

-kontrolou MBC je následný kultivačný test na agarových pôdach.

Aplikácia-parenterálna

- perorálna**
- lokálna**

Dávka -jednotlivá

- denná**
- celková**

Dávkovací interval

- čas medzi jednotlivými dávkami**
- úprava při renálnej,hepatálnej insuficiencii**
v závislosti na spôsobe eliminácie ATB

Dávkovanie-úprava podľa závažnosti infekcie(u širokospekt. ATB)

- deti**

**Dĺžka liečby-jednorázová(nekomplikovaná kvapavka,
ulcus molle,
kandidová kolpitída)**

-7-10 dní-bežné infekcie(dýchacie cesty)

**-dlhodobá-abscesy,granulomy,osteomyelitídy.
tuberkulóza,sepsa,endokarditída
-pacienti s oslabenou imunitou**