

Splošna mikrobiologija

Boštjan Müller
<neonatus@udba.org>

24. maj 2000

Kazalo

1	Kaj je mikrobiologija?	5
1.1	Zgodovina mikrobiologije	5
2	Svet mikrobov	7
2.1	Razdelitev mikrobov	7
3	Bakterije	9
3.1	Taksonomija bakterij	9
3.1.1	Nomenklatura:	9
3.1.2	Identifikacija neznane bakterije:	10
3.1.2.1	Morfologija:	10
3.1.2.2	Biokemijska preiskava:	10
3.1.2.3	Serološka preiskava:	10
3.1.2.4	Fagotipizacija:	10
3.1.2.5	Genetska klasifikacija:	10
3.2	Morfologija bakterij:	11
3.2.1	Kroglaste bakterije - koki:	11
3.2.2	Paličaste bakterije - bacili:	11
3.2.3	Spirili in spirohete - svedrasti mikrobi:	11
3.2.4	Prokariontska celica:	12
3.2.4.1	Bički ter resice	12
3.2.4.2	Ovojnice:	13
3.2.4.2.1	Kapsula:	13
3.2.4.2.2	Bakterijska stena:	13
3.2.4.3	Citoplazemska opna:	15
3.2.4.3.1	Prenos snovi skozi membrane:	15
3.2.4.4	Sporulacija:	16
3.2.4.4.1	Nastanek spore:	16
3.2.4.4.2	Oblike spor:	16
3.3	Fiziologija bakterij	16
3.3.1	Prehrana bakterij	16
3.3.1.1	Rast bakterij	18
3.3.1.2	Metabolizem bakterij	18
3.3.1.3	Neobičajne bakterijske vrste	19
3.3.2	Genetski elementi:	19
3.3.2.1	Replikacija DNA	19
3.3.2.2	Hitrost replikacije DNA	19
3.3.2.3	Rekombinacija DNA	19

Kazalo

3.3.2.4	Transkripcija - prepis DNA	20
3.3.2.5	Translacija - prevod mRNA v proteine	20
3.3.2.6	Mutacija DNA	20
3.3.2.7	Prenos dedne snovi	21
4	Virologija	25
4.1	Moderna virologija	25
4.1.1	Zgradba virusov	26
4.1.2	Kemična zgradba virusov	27
4.1.3	Replikacija ali pomnoževanje virusov	27
5	Protimikrobno zdravljenje - kemoterapija & zdravljenje z antibiotiki	31
5.1	Sulfonamidi	31
5.2	Antibiotiki	32
5.2.1	Antibiotiki, ki poškodujejo celično steno	32
5.2.1.1	Odpornost bakterij <i>proti</i> antibiotikom - občutljivost <i>za</i> antibiotike	33
5.2.2	Antibiotiki, ki delujejo na sintezo beljakovin	33
6	Dezinfekcija in sterilizacija	37
6.1	Dezinfekcija	37
6.2	Sterilizacija	37
6.2.1	Črne koze ali variola	39
7	Imunologija	41
7.1	Naravna humoralna obramba	44
7.1.1	Antivirusno delovanje	49
7.2	Naravna celična obramba	49
7.2.1	Fagocitoza	50
7.2.1.1	Adherenca	50
7.2.1.2	Mehanizmi za ubijanje mikrobov	51
7.2.2	Imunska ali limfatična tkiva/Imunski ali limfatični organi	53
7.2.2.1	Bezgavke	53
7.2.2.2	Razdelitev obrambnih mehanizmov	54
7.3	Mehanizmi humoralne imunosti	54
7.3.1	Antigeni	54
7.3.1.1	<i>Teorija prepovedanih klonov:</i>	55
7.3.2	Protitelesa	55
7.3.2.1	Teorije o nastanku protiteles	56
7.3.2.2	Razdelitev protiteles	56
7.3.2.3	Klonalni razvoj plazmatk	57
7.3.3	Celična imunost	58
7.3.3.1	Limfociti T	58
7.3.3.2	T-citotoksične celice (TC)	58

1 Kaj je mikrobiologija¹?

To je znanost o živih bitjih, ki jih s prostim očesom ne vidimo. To so mikroorganizmi ali mikrobi med katere štejemo: bakterije, viruse, glivice, praživali, nekatere vrste alg, nekatere posebne oblike življenja, ki jih ni mogoče uvrstiti v nobeno od omenjenih skupin mikrobov, vede, ki se z njimi ukvarjajo pa so bakteriologija², virologija³, mikologija⁴, protozoologija⁵ in fikologija⁶.

1.1 Zgodovina mikrobiologije

- * Miazemska teorija (gr. miazma = strupena snov) <-> Hipokrat; vdihovanje miazmov povzroči porušenje ravnovesja v 4 telesnih sokovih (kri, sluz, rumeni in črni žolč)
- * Stari vek: pojavita se izraza "animalia minuta" - male živali (M. Terentius Varo) ter "semenia morbum" - bolezenske klice (T. Lucretius Carus).
- * Srednji vek: ni napredka na tem področju
- * Renesansa: razvoj novih ved (anatomija, nauk o kužnih boleznih, fiziologija), utemeljijo, da je kužnina živa snov, utemeljijo pojem nalezljivost (per contactum = z dotikom, per fomites = z kontaminiranimi predmeti, ad distans = na daljavo)
- * 17. stoletje - mikroskop

¹gr. mikros = majhen ; bios = življenje ; logos = beseda, veda

²gr. bacteria = palica

³lat. virus = strup

⁴gr. mykes = gliva

⁵gr. protos = prvi, prvobiten ; zoon = žival

⁶gr. phykos = morska trava, alga

1 Kaj je mikrobiologija?

2 Svet mikrobov

Razdelimo jih na:

- * prokarionte¹
- * evkarionte²

2.1 Razdelitev mikrobov

- * prokarionti

MONERA; ³ bakterije, cianobakterije, arhebakterije

PROTISTA; alge, protozoji

- * evkarionti

FUNGI; preproste enocelične kvasovke, zapleteno sestavljene nitaste plesni

- * posebna skupina mikrobov

VIRUSI; DNA, RNA, živalski, rastlinski, bakterijski (bakteriofagi⁴ ali fagociti)

¹pro = pred ; gr. karion = oreh, lešnik, jedro

²gr. eu = dobro, pravo

³gnrus = enostaven

⁴gr. phagos = jedec, požeruh

2 *Svet mikrobov*

3 Bakterije

3.1 Taksonomija¹ bakterij

To je veda o razvrščanju bakterij. Razdelimo jo v tri med seboj povezane panoge:

- * klasifikacija ali razvrščanje bakterij v ustrezne taksonomske enote
- * nomenklatura² ali poimenovanje
- * identifikacija ali ugotavljanje za katero bakterijo gre in v katero taksonomsko enoto sodi

3.1.1 Nomenklatura:

Prvo imenovanje se opravi po binarni nomenklaturi („Ime vrste“ „ime rodu“ = *Staphylococcus aureus*), naslednje imenovanje skrajšano („I“ „ime rodu“ = *S. aureus*). Slovenjenje je dovoljeno tako v strokovnih kot nestrokovnih delih.

- * kraljestvo (REGNUM)
- * oddelek (DIVISIO)
- * razred (CLASSIS)
- * red (ORDO)
- * družina (FAMIGLIA)
- * rod (GENUS)
- * vrsta (SPECIES)
- * podvrsta (SUBSPECIES)
- * tip ali var
- * sev

¹gr. taxis = red, vrsta, razvrščanje ; nomos = zakonitost, pravilo

²lat. nomen = ime

3 Bakterije

3.1.2 Identifikacija neznane bakterije:

3.1.2.1 Morfologija:

Zadošča za določitev bakterijskega rodu. Sem spadajo naslednje lastnosti:

- * oblika
- * približna velikost
- * porazporeditev posameznih celic ob delitvi
- * oblika rasti na različnih gojiščih
- * značilnosti bakterijske kulture

Bakterijska kultura = bakterije + umetno gojišče

Glede na obarvanje ločimo:

- * Gram + (pozitivne) bakterije (debel mureinski ovoj)
- * Gram - (negativne) bakterije (tanek mureinski ovoj)

3.1.2.2 Biokemijska preiskava:

Ker vsem bakterijam samo z morfološko preiskavo ne moremo določiti vrste posegamo po biokemijski preiskavi. Tu bakterije preiskujemo glede na sposobnost razgradnje določenih O.H, pregledujemo jih na navzolčnost določenih encimov, ter drugih snovi.

3.1.2.3 Serološka preiskava:

Specifična vezava antigen-protitelo nam pokaže specifičen antigen ali protitelo (odvisno od iskanega).

3.1.2.4 Fagotipizacija:

Z znanim fagom okužimo neznano bakterijo. Če jo fag uniči prepoznamo bakterijo - ugotovimo njen fagotip. S tem ugotovimo tip znotraj neke vrste.

3.1.2.5 Genetska klasifikacija:

Kriteriji za razvrščanje so:

- * razmerje G:C
- * DNA hibridizacija
- * zgradba 16S rRNA

Bakterije lahko razvrstimo po genotipu.

Če celoten sistem živih bitij razdelimo po sorodnosti 16S rRNA dobimo tri domene:

- * bacteria
- * archaea
- * eucarya

3.2 Morfologija bakterij:

Je nauk o oblikah ali oblikoslovje bakterij.³

Ločimo tri osnovne oblike bakterij:

- * okrogle - koki
- * paličaste - bacili
- * svedraste:
 - vibriji⁴;
 - spirili⁵; celica je čvrsta, neupogljiva, oblika je stalna, imajo biček
 - spirohete so elastične, upogljive, imajo poseben biček znotraj ovojnice - *aksialni filament*

3.2.1 Kroglaste bakterije - koki:

Ločimo različne rodove. Eden pomembnih kriterijev za njihovo razdelitev je razporeditev celic po delitvi:

- * diplokoki; po delitvi ostanejo po dve celici skupaj
- * streptokoki⁶; po delitvi ostanejo nanizani v verižici
- * stafilokoki⁷; ostanejo v formaciji podobni grozom
- * tetrade; ostanejo po 4 skupaj
- * sarcina; ostanejo po 8 kokov skupaj

3.2.2 Paličaste bakterije - bacili:

Ločimo različne oblike bacilov:

- * kot vagon (kvadratasti - tetraeder) (*B. anthracis*)
- * cigarete (valj)
- * cigare (terminalno zaobljen valj)

Pogosto so to drobcene paličice ali pa so povezane v verižicah - streptobacili.

- * vibriji = vibrio (upognjene paličaste bakterije)

3.2.3 Spirili in spirohete - svedrasti mikrobi:

Glej poglavje 3.2

³gr. morfe = oblika

⁴lat. vibrio = hitro se premikam

⁵lat. spira,ae = zavoj

⁶gr. streptos = ogrlica

⁷gr. stafile = grozd

3 Bakterije

3.2.4 Prokariontska celica:

Glavni bakterijski DNA je shranjen v krožnem kromosomu. Delci dednine so shranjeni tudi v plazmidih.

3.2.4.1 Bički ter resice

Pri resicah ločimo:

- * fimbrije
- * pile

Bičke ima polovica paličastih in vse svedraste bakterije. Spirili imajo navaden biček, spirohete pa notranjega. Biček postavlja posebna snov - *flagelin*. Premikanje bička omogočijo protoni v okolici. Smer vrtenja pa pogojujejo snovi v okolici - atraktanti⁸, ti povzročijo vrtenje bička v smeri nasprotni urnemu kazalcu in bakterije privlačijo. Tem nasprotni snovi so repelenti⁹, ti povzročijo vrtenje bička v smeri urnega kazalca in tako odmik od repelentne snovi. Različne bakterije imajo različno število bičkov:

- * monotrihne¹⁰; imajo le en biček
- * amfitrihne¹¹; bakterije, ki imajo na vsakem polu po en biček
- * lofotrihne¹²; imajo šop bičkov na enem ali obeh koncih
- * peritrihne¹³; imajo bičke po celi površini

Biček bakterijo lahko poriva ali pa vleče. Gibljivost bakterij opazujemo na gojiščih (nativni preparat, poltrda gojišča). Glede na njihovo gibanje ločimo tudi oblike gojišč:

- * rast H¹⁴; to je rast, kjer se okrog kolonije pojavi rast na površini gojišča struktura podobna sapi na steklu.
- * rast D¹⁵; to je rast, kjer okrog kolonije ni prejšnjega pojava

H in O antigeni se ločijo po vrsti bakterij. H antigeni so antigeni bičkov, O antigeni so antigeni ovojnic.

Bički niso nujno potrebni za preživetje bakterij. Gibanje je mogoče tudi brez bičkov - polzeče gibanje - gliding (*gliding bacteriae*), ter trzajoče gibanje - teitching (*twitching bacteriae*), to je posledica gibanja resic. Poznamo tudi nepravo - Brownovo gibanje - molekularno gibanje.

Ločimo dve vrsti resic:

- * dolge

⁸gr. attraho = potegnem

⁹lat. repello = odbijam

¹⁰monos = eden, sam; trix = las

¹¹amphis = obojen, dvojen

¹²gr. lophos = čop. šop

¹³gr. peri = okrog, okoli

¹⁴nem. hauch = dih

¹⁵nem. ohne = brez

* krajše / drobnejše

Sestava obeh vrst resic je v bistvu enaka. Kemijsko so lektin (adhezini) - snov, ki se lepi¹⁶. Bakterije s to lastnostjo (adherenca) se pogosto zlepljajo med seboj. S pomočjo resic se pritrdijo na ciljne organe. *Adherenca* je lahko tudi dejavnik patogenosti.

Daljše resice se imenujejo *pili*. Pile imenujemo tudi spolni pili. Njihovo sintezo kodirajo geni v F-plazmidu (F-faktorju, tudi spolni faktor). F+ celice ta faktor imajo in jih imenujemo moške celice, F-celice faktorja nimajo, ter jih imenujemo ženske celice. Pili F+ celice poišče F- celico, ter jo pritegne. Sledi skrčenje pilusa in pritegnitev celic. Pride do nastanka citoplazemskega mostiča, na določenem mestu poči plazmid DNA in ena od obeh vijčnic odpotuje iz F+ v F-, nato se v obeh celicah začne tvoriti komplementarna DNA, posledica sta dve F+ celici, ki sta sposobni sintetizirati piluse.

3.2.4.2 Ovojnice:

So kompleksne. Poznamo:

1. kapsulo¹⁷
2. celično steno (lastna vsem bakterijam)
3. citoplazemska opna/membrana

3.2.4.2.1 Kapsula: Bakterije na površino izločajo polisaharide ali polipeptide, lahko tudi oboje (sluzavi, lepljivi polimeri) skupno ime je *glikokaliks*¹⁸. Če je glikokaliks oprijet je to kapsula, če pa je ohlapen je to *sluzavi sloj* - slime layer.

Vzrok izločanja te snovi pri bakterijah še ni dognan, je pa znana škodljivost za organizem gostitelja, pri nekaterih bakterijah celo dejavnik patogenosti. Kapsula preprečuje fagocitozo, prepreči vdor bakterijskih virusov, lahko preprečuje izsuševanje bakterije za določen čas, lahko je tudi strupena.

Sluzast ovoj (Streptococcus mutans - karies). Izloča veliko dekstranovih vlaken s katerimi se pripenja na zobno sklenino. Dekstran sintetizira naravnost iz dekstroze. Ob pomanjkanju hranljivih snovi uporablja dekstran, ki ga je izločil za energijsko zalogo.

3.2.4.2.2 Bakterijska stena: Je čvrsta ovojnica, ki daje bakteriji obliko. Zadržuje ozmotski pritisk, ki ga ustvarjajo nakopičeni ioni v citoplazmi. Glede sestave je v živalskem svetu edinstvena, saj vsebuje *murein* - peptidoglikan. Snov je sestavljena iz zaporedij N-acetil glukozamina in N-acetil muraminske kisline, ta zaporedja poezčujejo tetrapeptidi, pri nekaterih bakterijah še druge snovi.

Če bi bakterije namesto po podobnosti delili po celični steni bi dobili:

- * Gracilites¹⁹ (Gram -) oddelek (divisio) (Eubacteria)
- * Firmicutes²⁰ (Gram +) oddelek (divisio) (Eubacteria)

¹⁶lat. adhesio = pritrjevanje

¹⁷lat. capsula,ae = škatla

¹⁸lat. kalix = posoda, čaša

¹⁹lat. gracilis = tanek, nežen ; cutis = koža

²⁰lat. firmis = čvrst

3 Bakterije

- * Tenericutes²¹ (brez ovojnice) oddelek (divisio) (Eubacteria)

-
- * Mendosicutes²² (brez mureina) oddelek (divisio) (Archebacteria)

Ad 3:

So majhna skupina bakterij, ki jih imenujemo *mikoplazme* in so brez celične stene. Povezava med molekulami mureina je pri Gram+ močnejša kot pri Gram-, kjer so vezi bolj neurejene. Pomembna sestavina Gram+ bakterij je tudi **lipoteiholitična kislina**. Pri Gram+ je mureinski sloj večplasten in močno povezan, pri Gram- pa tanka in slabo povezana. Zunanja opna pri Gram-bakterijah šteje kot del celične stene.

Sestava celične stene: osnova je fosfolipidni dvosloj, različni proteini in lipopolisaharidi. Prostor med fosfolipidnim dvoslojnikom in citoplazemsko opno imenujemo *periplazemski prostor*. V tem prostoru se nahaja peptidoglikan murein in različni proteini, tudi encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu bakterije, zlasti pri transportu snovi. Za transport so odgovorni tudi transmembranski proteini - *porini*.

Lipopolisaharid pri Gram- bakterijah ima dva glavna dela:

- * lipid a
- * sladkorni del

Sladkorni del sestavljajo verige različnih oligosaharidov. Zunanja opna je pomembna kot zaščita bakterije, saj vsaj do neke mere brani bakterijo pred obrambnimi mehanizmi makrofagov - podobno kot kapsula, ne prepušča antibiotikov ali jih slabo prepušča. Predvsem je pomembna kot dejavnik patogenosti, saj velika količina lipopolisaharidov deluje toksično²³. Pri lipopolisaharidu je toksičen lipid a. Odgovoren je za hudo klinično sliko pri okužbi z nekaterimi bakterijami - povzroča visoko temperaturo, bolečine v sklepih in mišicah, . . . Kadar se nakopiči dovolj tega strupa pride do endotoksinskega²⁴ šoka.

Sestava lipopolisaharida:

- lipid a;
 - * fruktozamin
 - * glukozamin
 - * na prejšnja dva pripete maščobne kisline
- polisaharidna sredica
- specifične verige (polisaharidi 10-20) (antigen 0)

Poimenovanje lipopolisaharidov:

1. LPS = lipopolisaharidi
2. endotoksin = lipid a

²¹lat. tener = nežen, mehak

²²lat. mendosus = napačen, z napakami

²³gr. tokson = lok ; toksikon = strup v katerega so stari grki namakali puščice

²⁴gr. endon = znotraj

3. antigen 0 = polisaharidni del

Z serološkimi metodami lahko določimo podvrste in tipe Gram- bakterij, kar je zelo pomembno pri epidemiologiji. Ime antigen 0 je dobil zaradi celične ovojnice.

Večina bakterij ima celično steno. *Tenericutes* so majhen oddelek - skupina mikoplazem. Nastopajo tudi v živalski patologiji. Njihova značilnost je, da nimajo celične stene. Bakterijski filtri jih ne zadržijo, ker spreminjajo obliko. Imajo le s steroli ojačano citoplazemsko opno.

V laboratoriju lahko bakterijam z encimom lizocimom razgradimo celično steno. Gram- bakterije tako postanejo stereoplasti -imajo še zunanjo opno, Gram+ bakterije pa protoplasti in postanejo okrogle.

(Za razlike med Gram+ in Gram- bakterijami si oglej tabelo 4 na strani 32 v skriptu: J. Jurca Splošna mikrobiologija)

3.2.4.3 Citoplazemska opna:

Sestavlja jo fosfolipidni dvosloj, katerega glavna sestavina je fosfolipid. Ta ima hidrofilno glavo in 2 hidrofobna repa. 50% citoplazemske opne pa sestavljajo proteini. Ti navadno delujejo kot encimi, transmembranski/integralni pa skrbijo za transport preko membrane. Struktura celične membrane se imenuje *struktura tekočega mozaika*. Citoplazemska opna opravlja številne pomembne naloge:

- * zagotavlja prenos e in p, sproščeno E pretvori v kemično energijo za potrebe celice
- * vsebuje nekatere encime potrebne pri sintezi in prenosu peptidoglikana, teiholične kisline in nekaterih sestavin potrebnih za sestavo zunanje opne celične stene
- * izloča ekstracelularne hidrolitične encime in zagotavlja porazdelitev jedrne snovi med celično delitvijo
- * skrbi za transport/prenos skoraj vseh snovi iz/v celico

3.2.4.3.1 Prenos snovi skozi membrane:

Ta je lahko:

1. *Aktiven*
2. *Pasiven*

Ad 1.)

Tu se porablja energija v obliki ATP in pride v poštev takrat, ko celica povečuje koncentracije določenih snovi v svoji citoplazmi. Zelo pomembni so membranski proteini, ki ta prehod omogočajo. Te delimo na:

- * uniportne; prenašajo le v eno smer
- * simportni; v eno smer prenašajo dve snovi
- * antiportni; prenašajo dve snovi v različnih smereh

3 Bakterije

Ad 2.)

To je difuzija ali pretok. Gre za pospešeno ali olajšano difuzijo z encimi, osmozo. Velike molekule ostanejo zunaj, manjše pa enostavno prehajajo skozi opno. Važno je, da so molekule majhne in topne v lipidnem delu membran.

Poseben način transporta je grupna translokacija. Bistvo tega procesa je kemijska sprememba snovi med transporti, ki povzroči, da snov ne more več ven.

3.2.4.4 Sporulacija:

Posebne oblike, ki nastajajo pri sporulaciji se imenujejo endospore. Odporne so proti izsuševanju, T, razkužilom, Ab, žarčenju, imajo dolgo življenjsko dobo. Tega sta sposobna le dva patogeni rodovi:

1. Bacillus
2. Clostridium²⁵

Ad. 1.)

Bacillus

Ad. 2.)

Sem spadajo zelo nevarne bakterije: Clostridium Tetanii - raste brez kisika in izloča zelo hud strup, Boulinus²⁶ (najhujši naravni strup).

3.2.4.4.1 Nastanek spore:

- * običajna celica
- * po spremembi okolja na slabše se začne preobrazba
- * prestrukturiranje DNA - večina se preseli na en konec citoplazme in citoplazma se z večjim delom DNA oddeli od ostale citoplazme - *predspora* (celična opna + dvojni sloj mureinske celične stene)
- * nastanek skorje ali korteksa (debela ovojnica v katero se nalagajo proteini, predvsem pa je pomembna snov *kalcijev dipiholinat* - kalcijeva sol dipiholinske kisline)
- * hidrolitični encimi načno nepotreben ostanek prostale celice in prodro ovojnico, skozi katero prodre zrela spora.

3.2.4.4.2 Oblike spor: Glej scripta J. Jurca Splošna mikrobiologija str. 36.

3.3 Fiziologija bakterij

3.3.1 Prehrana bakterij

Bakterije morajo dobiti hranilne snovi v obliki, ki jim je dostopna - se lahko prenaša preko polpropustne celične opne. Bakterija hrano prebavi tako, da zapletene velike bakterije najprej razgradi,

²⁵gr. kloster = vreteno pri tkanju

²⁶lat. botulus = klobasa

manjše enostavne pa vsrka. V ta namen izloča encime - t.i. *eksoencime* (celulaze, amilaze, proteaze, lipaze, nukleaze, ...). Pri patogenih bakterijah so trije pomembnejši encimi:

- * haluronidaza (pomaga pri razgradni tkiv)
- * streptokinaza
- * koagulaza

Gradniki, ki jih bakterije uporabljajo:

a) *Viri ogljika:*

Zagotavljajo energijo za oksidacijo in strukturne elemente celične stene, to so praktično vse snovi, ki vsebujejo ogljik.

b) *Viri dušika:*

Zagotavljajo dušik za Ak., n.k., koencime. N_2 iz zraka, NO_3^- , NH_4 , N iz organskih snovi.

c) *Anorganski ioni:*

Nujni kofaktorji za encime, zaloga energije. To so Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , PO_4^{2-} , Na^+ , K^+

d) *Esencialni metaboliti:*

Snovi, ki jih metabolizem ne sintetizira sam. To so vitamini, Ak, purini, pirimidini.

Prehrana kjer organizem snovi razgradi izven celice se imenuje *holofitna prebava* (rastline), za razliko od *kolozične prebave*, ki je lastna višjim živim bitjem.

Glede na možnost sinteze surovin za svoj razvoj ločimo bakterije na:

- * *prototrofne bakterije:* kar potrebujejo sintetizirajo same
- * *avksotrofne bakterije:* predvsem patogene bakterije, potrebujejo že narejene snovi

Avksotrofi != avtotrofi, ker avtotrofi za življenje ne potrebujejo organskih snovi. Heterotrofne bakterije se lahko hranijo z odmrliimi organskimi snovmi - *saprofiti*.

Vrste življenjskih stilov bakterij glede na odnose z drugimi bitji:

- * simbioza = sožitje; ozka povezava s potrebami po hrani, zaščiti, druge oblike pomoči
- * mutualizem²⁷ = simbioza dveh populacij organizmov, ki koristi obema
- * komenzalizem²⁸ = priskledništvo; korist ima le ena stran, medtem, ko druga ne trpi škode
- * sinergizem²⁹ = sodelovanje dveh skupin
- * parazitizem³⁰ = ena žival ima škodo (gostitelj), druga korist (parazit)

Bakterije za svoje delovanje potrebujejo primerno okolje, pH mora biti 7 ali rahlo alkalen - 7.4, pri 8 uspevajo redke bakterije. Nekatere bolj uspevajo v kislem okolju pH = 6, redke pa v zelo nizkem pH = 4.

T je drug pomembnejši dejavnik okolja. Ločimo:

²⁷ang. mutual = vzajemen, skupen

²⁸lat. comensalis = tovariš pri mizi

²⁹lat. synergia = sodelovanje

³⁰gr. parasitos = zajedalec

3 Bakterije

- * *mezofilne bakterije*; T [20°C, 40°C]; sem sodijo vse patogene bakterije, ki uspevajo v glavnem od sobne pa do telesne T, preživijo tudi pri nizkih T in prenesejo zmrzovanje ter odmrzovanje.
- * *psihrofilne*³¹ *bakterije*; T [0°C, 20°C]
- * *termofilne bakterije*; T [40°C, 90°C]

Bakterije razdelimo tudi glede na potrebe po kisku:

1. *aerobne bakterije*
2. *anaerobne bakterije*

Ad. 1.)

Te vežejo kisik iz zraka.

Ad. 2.)

ločimo:

- * *obligatorne* (atmosferski kisik jih ubija)
- * *mikroaerofilne* (uspevajo pri nižanem tlaku O₂)
- * *fakultativne* (so med obligatornimi anaerobi in obligatornimi aerobi, izkoriščati morajo prost ali vezan kisik, rastejo pa lahko aerobno ali anaerobno)
- * *aerotolerantne* (nimajo oksidativne presnove, vendar jih prisotnost kisika ne moti)

3.3.1.1 Rast bakterij

Rastejo z *binarno delitvijo*, zato je *rast eksponentna*. Čas v katerem se celica razdeli na dvoje imenujemo *generacijski čas*. Pri večini patogenih bakterij je generacijski čas 1 ura.

Faze rasti bakterij pri presajanju na gojia so:

- * *lag*³² *faza* = faza prilagajanja; v tej fazi se bakterije ne dele, temve se prilagodijo na novo okolje, njihova presnova aktivno teče.
- * *logaritemska faza*; bakterije se začno burno razmnoževati
- * *stacionarna faza* (obdobje mirovanja); porabijo se hranilne snovi in razmnoževanje jenja, pri določenih vrstah se pričmop ustvarjati spore - *involucojske*³³ *oblike*
- * faza odmiranja; razmnoževanje se popolnoma zaustavi in odmiranje ga prehit. Ta faza lahko traja tudi več mesecev

Natančneje v scripta: J. Jurca; Splošna Mikrobiologija

3.3.1.2 Metabolizem bakterij

Glej skripta: J. Jurca; Splošna Mikrobiologija (str 43-49)

³¹gr. psychros = mrzel

³²ang. to lag = zaostajati

³³lat. involutio = zaostajanje

3.3.1.3 Neobičajne bakterijske vrste

Glej skripta: J. Jurca; Splošna Mikrobiologija (str 49)

3.3.2 Genetski elementi:

- * kromosom
- * plazmid
- * virus
- * transpozon

3.3.2.1 Replikacija DNA

- * komplementarno parjenje baz
- * dvojna vijačnica ze razpre - na 3' koncu mora biti prosta OH skupina - polimeraza DNA dodaja nukleotide na oligonukleotidne začetnike sinteze (*primer*) - pri replikaciji encim primaza sintetizira kratke segmente RNA

Pri replikaciji E. coli sodelujejo sledeči encimi:

- * topoizomeraze
- * helikaze
- * primaza
- * polimeraza DNA III
- * polimeraza DNA I
- * ligaza DNA

3.3.2.2 Hitrost replikacije DNA

E. coli potrebuje 40 min., da se podvoji in nato še 20 minut, da se podvoji celica se pravi skupaj 60 min. Začetek replikacije je odvisen od stopnje rasti. Polimerizacija nukleotidov - 50.000/minuto.

3.3.2.3 Rekombinacija DNA

Poznamo dve osnovni rekombinaciji:

- a)** Homologna rekombinacija: pride do spremembe položaja obstoječih genov (spreminjanje lastnosti zaradi zamenjave genov - novi serotipi - spremenjene imunogene lastnosti)
- b)** Heterologna rekombinacija: pride do vnašanja novih genov v replikon (generalizirana replikacija - tu pride katerikoli delec DNA, mestno specifična - tako se vgrajujejo virusi, transpozicijska rekombinacija - nosilci virulence, rezistence na antibiotike)
- c)** Izmenjava bakterijske DNA

3 Bakterije

3.3.2.4 Transkripcija - prepis DNA

- * Encim RNA polimeraza ($\alpha, \alpha, \beta, \beta', \delta$)
- * Operoni; skupina genov, ki jih regulira skupni promotor, geni kodirajo policistronsko mRNA, pri prepisu RNA v polipeptide nastane z eno molekulo RNA več peptidov.

Nekateri antibiotiki delujejo na polimerazo RNA (rifamicini, streptovaricini, streptoglidin, amanitin), preprečujejo polimerizacijo RNA molekule.

3.3.2.5 Translacija - prevod mRNA v proteine

- * iniciacija
- * podaljševanje
- * terminacija

(Glej scripta str. 58)

Sporočila so pogosto policistronska. Pri bakterijah poteka prepisovanje in prevajanje v istem oddelku, ni modifikacij RNA, ki so potrebne za prehajanje skozi membrano, že med prepisovanjem RNA na isti molekuli poteka prevajanje mRNA v aminokislino in spreminjanje v peptide.

Ribosomi v bakterijah so drugačni kot v evkariontskih - odlična tarča za antibiotike. Nekateri antibiotiki inhibirajo sintezo proteinov, ker delujejo na ribosome:

- * streptomycin; preprečuje iniciacijo prepisovanja
- * puromicin; zavira podaljševanje
- * kloramfenikol; -||-
- * cikloheksimid; -||-
- * tetraciklin; -||-

3.3.2.6 Mutacija DNA

To je sprememba v zaporedju nukleotidov. Pomembne so predvsem zaradi nastajanja novih serotipov, saj tako protitelesa lahko ne delujejo več na te bakterije.

Oblike mutacij so:

- * delecija
- * insercija
- * zamenjava (tranzicija, transverzija)

Povzročitelji mutacij so:

- * napake med replikacijo ($1/10^7 - 10^{11}$)

- * UV svetloba
- * kemični mutageni (guanidin - guanin se kemično spremeni in nato se namesto C na G veže T; etidijev bromid, nekatera antivirusna zdravila)

Posledice:

- * tiha mutacija (če se zamenja tretji nukleotid v tripletu)
- * točkovna mutacija
- * nonsense mutacija
- * premaknjen bralni okvir (prezgodaj se pojavi stop kodon, dobimo le delček proteina)
- * pogojno letalna mutacija
- * letalna³⁴ mutacija

Manifestacija: smrt celice, odpornost na antibiotike, izguba virulence.

3.3.2.7 Prenos dedne snovi

Pri bakterijah je genom načeloma stalen, stabilen. Ti dve lastnosti sta zahtevi dednostne teorije z namenom ohranitve vrste. Na drugi strani so spremembe genoma. Biološki cilj je izboljšanje vrste, razvoj vrste, pridobitev novih lastnosti, ki so vrsti koristne. Dedna zasnova se lahko spreminja na dva osnovna načina:

1. Z mutacijo:

Te so osnova evolucije - mutacije + selekcija. Narava uravnava količino in pogostnost mutacij, ter določa katere ostanejo in katere popravi. Ostajajo učinkoviti popravljalni mehanizmi, ki spremembe popravljajo.

2. S prenosom dednega materiala:

S spolnim razmnoževanjem je dana velika možnost za različno razvrščanje lastnosti, za selekcijo lastnosti, za izboljšanje vrste, za nastanek novih vrst. Bakterije ne poznajo spolnega razmnoževanja, obstajajo pa določeni mehanizmi, ki jih nekako lahko imenujemo paraseksualne. Pri bakterijah moška in ženska celica nista enakovredni, kot pri višjih organizmih, saj ne dajeta enakovrednih delov dednine. Ker ni enakovrednosti je tudi poimenovanje drugačno - pri bakterijah poznamo moško celico - "donor", celica, ki sprejema dedno snov je sprejemnik - "recipient". Dedni material, ki preide iz donorske v recipientsko celico je zelo majhen v primerjavi z DNA recipienta. Delček donorjeve DNA potuje v recipientsko celico, kjer se rekombinira.

Poznamo tri osnovne mehanizme prenosa dedne snovi:

1. Transformacija³⁵
2. Transdukcija³⁶
3. Konjugacija³⁷

³⁴lat. laeto = usrtim

³⁵ang. transformation = pretvorba

³⁶ang. transduction = vodenje preko

³⁷ang. conjugation = združitev

3 Bakterije

Leta 1928 prvič dokažejo, da se dedne informacije prenašajo z DNA (Preizkus s pnevmokoki - Griffith).

Ad. 1.)

To je način prenosa dednega materiala, ki je najmanj pogost v naravi. Mnenje je, da se dogaja predvsem tam, kjer je velika količina bakterij na enem mestu (črevesje). Le redke vrste so primerne za transformacijo - tiste, ki sintetizirajo poseben peptid *dejavnik kompetence*. Donorska DNA je v okolju celice recipienta, fragmenti se najprej rahlo, nato pa zelo čvrsto vežejo z celico recipienta nato pride do "fragmentacije" delca. Vstopa le ena vijačnica donorske DNA, druga pa ostane zunaj in razpade. Ta, ki vstopi je v nevarnosti pred encimi znotraj celice, zato jo zaščitijo posebni proteini. Potrebno je, da se donorska DNA čimprej vključi v recipientski kromosom - delček kromosoma se izreže in na njegovo mesto vstopi donorska DNA. Pri rekombinaciji pomagajo *REC* (Rekombinantni A proteini). Ta del nosi tuje lastnosti. Da to uspe, morata donor in recipient biti v zelo ozkem sorodstvu. V naravi je ta postopek pogostejši pri Gram+ kot pri Gram- bakterijah (lahko pa postopek pri Gram- bakterijah opravimo v laboratoriju).

Ad. 2.)

To je mehanizem pri katerem virus prenese del bakterijskega genoma iz ene celice v drugo. Poznamo dva tipa transdukcije:

- * *generalizirana ali splošna transdukcija*; kjer bakteriofag prenaša iz celice v celico katerikoli odsek genoma napadene celice.
- * *specialna ali posebna transdukcija*; tudi omejena transdukcija, kjer določen fag prenaša vedno določene gene.

Oba mehanizma sta povezana z naravo virusa, ki napada, z njegovimi lastnostmi ali z njegovim krogom razmnoževanja. Pri napadu bakteriofaga na bakterijo navadno ločimo:

(T4 na *E. coli*)

- * prosti fag (ločimo virusno glavo, vrat, rep, posebne dlačice za pritrditev)
- * bakterija se "veže" na fag-specifičen receptor na bakteriji
- * tesen stik
- * skrčenje repa in vbrizganje DNA v bakterijo

Virusna NK v trenutku prevzame ves nadzor napadene celice in začne po svoje urejati metabolizem napadene celice. Eden prvih ukrepov je, da razbije bakterijski kromosom. Prepove sintezo bakterijskih snovi, uporabi material, ki je v bakterijski celici, da razmnoži lastno NK. Ko se razmnoži do določene stopnje preide napad v naslednjo fazo - sintetizirajo se fagove beljakovine, poleg tega se še vedno sintetizira fagova NK in še drugi virusni delci. Pri tem se uporabljajo snovi iz napadene celice, uporablja se poglaviti mehanizem - za sintezo beljakovin, izrablja se celična energija. Na koncu virus ukaže celici sintezo encima lizocina, ki napade celično steno, ter jo razbije - liza celice. To je **litični krog** razmnoževanja faga v celici. Ta je posledica napada hudo virulentnega virusa. Nato se z sproščenimi fagi virus ponovi. Vsi virusi niso tako virulentni - so umirjeni ali temperirani, ti imajo t.i. **lizogeni razvojni krog**. Pri tem krogu lahko pride do lize celice, ni pa to nujno. Pri lizogenem krogu se fagova DNA navadno vključi v bakterijski kromosom - se integrira. Sintetizira se posebna beljakovina represor, katerega kodira *cI* regija fagove DNA, ki zavre osnovne vegetativne funkcije faga. Fag, ki je integriral v bakterijski kromosom se imenuje profag. Celica, ki nosi tag fag je lizogena celica. Fag se

torej ne razmnožuje, temveč se le podvojuje s kromosomom. V naravi imajo bakterije zelo pogosto integriran bakteriofag. V takem stanju gre za neke vrste sožitje, saj bakteriofag lahko z svojo DNA prenaša lastnosti, ki so za bakterije pomembne.

Tako kot se fag integrira se lahko tudi izreže - *ekscizija*. Generalizirana transdukcija nastopi v litičnih krogih razmnoževanja. Včasih pri vstopu novo sintetizirane virusne NK v glavico pride do napake in se namesto fagove NK vgradi v glavico bakterijska razbita NK. Tako ta fag prenese pri okužbi nove bakterije bakterijsko NK namesto virusne. Ta delec ni več virulenten, vendar še lahko napade in izbrizga NK, ker so mehanizmi prilepljanja in izbrizganja NK vezani na beljakovine fagovega partikla ne na NK. Če je bakterijska DNA, ki jo fag izbrizga dovolj komplementarna gostiteljski DNA, lahko pride do rekombinacije. Izreže se del gostiteljske DNA in se vgradi odsek fagove-bakterijske DNA in bakterija tako lahko pridobi nove lastnosti.

Za obrambo bakterije proti antibiotikom skrbi zapis bakterijskega genoma, ki navadno leži na plazmidu. Če tak plazmid zajame fag in ga prenese v bakterijo, ki tega plazmida ni imela ta postane na določen antibiotik odporna. Tako se dosti hitreje prenaša odpornost znotraj bakterijske populacije v določeni regiji, kot če bi čakali na mutacije.

Staphylococcus aureus je eden zelo pomembnih povzročiteljev mastitisa pri kravah. Pri specialni transdukciji fag zajame natančno določen delec. Fag lambda: linearni fag vdre v celico in iz njega se oblikuje krožen fag. Ta krožna oblika je potrebna zaradi integracije v kromosom. Bakterijski kromosom na točno določenem mestu počni in naredi prostor za fagovo NK. Fag se nato integrira v kromosom. Ta fag se vnese v lokus med galaktoznim in biotinskim operonom. V celici živi dalje in se podvojuje z bakterijskim kromosomom. V določenih razmerah pride do ekscizije faga in dobimo zopet samostojen fagov partikel, podobno kot plazmid. Zelo redko se pri tem izrezu naredi napaka. Izreže se del galaktoznega operona in v kromosomu ostane del fagove nukleinske kisline. Tag fag je defektiven - saj bo prenesel v sosednjo bakterijo gene za razgradnjo galaktoze (bakterijo, ki do sedaj morda ni imela teh lastnosti) dobi te lastnosti ob infekciji s fagom.

Specialna transdukcija se imenuje, ker se fag vključuje vedno na istem lokusu in prenaša vedno iste gene.

Ad. 3.)

Konjugacija je zelo pomemben mehanizem pri prenosu dednega materiala pri bakterijah, predvsem pri gram- bakterijah, pri gram+ pa je redka. Mehanizmi niso povsem jasni. Pri konjugaciji ločimo moške *F+* celice, ki nosijo t.i. *F-faktor* (F-plazmid). Na F-plazmidu kodirajo sintezo spolnih pilusov. Pilus na *F+* celici pritegne *F-* celico brez pilusa in naredi se mostiček med njima, počni ena vijačnica plazmida in potuje iz *F+* v *F-* celico po mehanizmu pro-link. Posledica je, da *F-* celica pridobi plazmid in postane *F+* celica. Do razlike pride, ko se plazmid vgradi v kromosom na način podoben vgradnji temperiranega faga v kromosom. V določenem trenutku *F+* plazmid počni in začne prodor v sosednjo celico. *F+* plazmid za seboj vleče kromosomsko vijačnico v sosednjo *F-* celico. S tem, ko prenaša kromosom iz celce v celico prenaša tudi lastnosti iz celice v celico. Če so razmere ugodne lahko *F+* plazmid iz celice v celico med konjugacijo povleče ves kromosom (trajanje cca. 100 min.). Ta pojav izkoriščamo v laboratoriju pri izdelavi t.i. genskih map (točno vemo kateri geni ob katerem času potujejo). Celica, ki ima vgrajen *F+* faktor se imenuje *Hfr celica*, kar je zelo redek pojav. *F+* faktor se zelo redko vključuje, ko pa se vključi pa zelo pogosto prenese svoj kromosom in kromosom bakterijske celice - High frequency of recombination. Dokazano je da je konjugacija lahko najpomembnejši mehanizem za prenos dednega materiala iz bakterije v bakterijo. Tako se pogosto prenaša tudi *multipla rezistenca* - odpornost proti več antibiotikom hkrati.

3 *Bakterije*

4 Virologija

4.1 Moderna virologija

Značilno, da virus vedno raziskujemo z gostiteljem in njegove reakcije. Virusi so večinoma vrstno specifični. Ločimo:

- * bakterijski (bakteriofagi ali fagociti)
- * bakterijske viruse - bakteriofage
- * viruse ljudi in živali
- * rastlinski virusi

Virus; majhen, obvezno intracelularni *parazit*, kise razmnožuje le v živih, zanj občutljivih celicah.

Od drugih mikroorganizmov se razlikujejo po tem, da virion sestavljata:

- * centralno ležeča N.K.
- * beljakovinski plašč ali kapsida

Viruse ločimo tudi glede na njihovo N.K.:

- * RNA virusi
- * DNA virusi

Za viruse je značilno, da nimajo lastne metabolične aktivnosti, niso neodvisni pri rasti in razmnoževanju. Nimajo:

- * ribosomov
- * transportne RNA
- * encimov za sintezo NK in beljakovin

Virusni genom; spremeni oz. blokira metabolizem gostiteljeve celice, tako da ta začne sintetizirati virusu lastne snovi, ter jih združevati v sestavine za novo generacijo virusnih delčkov.

Virusi se ne delijo, temveč se replicirajo z podvojitvijo genoma NK.

So metabolično inertni - neobčutljivi za antibiotike in snovi, ki delujejo na metabolizem.

Večina virusov je občutljiva na interferon. Poznamo tri vrste interferona:

4 Virologija

- * α
- * β
- * γ

Interferon tvorijo celice aktivirane od virusa, kot zaščito pred okužbo drugih celic.

Nekateri virusi so sposobni *latentne infekcije* - virusna dednina se infiltrira v celično DNA in tam ostane nedoločeno dolgo. Taki virusi so npr. herpes virusi, kjer lahko po akutni okužbi pride do latentne oblike virusa in ob določenih pogojih kot npr. stres zopet izbruhnejo - se aktivirajo.

Viruse delimo na:

- * RNA:
 - enovijačne:
 - + naboj
 - naboj
 - dvovijačne

- * DNA:
 - enovijačne
 - dvovijačne
 - z ovojnico
 - brez ovojnice

Pri RNA enovijačnih z + nabojem je že sama NK kužna - ne potrebuje ovoja in so zelo kužni.

4.1.1 Zgradba virusov

- * beljakovinski plašč ali *kapsida*, ki je sestavljen iz podenot ali kapsomer, ki je z NK povezan z t.i. *nukleokapsido*.
- * nekateri virusi imajo še zunanjo ovojnico iz lipidov in glikoproteinov
- * nekateri imajo polžasto kapsido
- * virusi, ki so kubično simetrični so ikozaedri - sestavljeni iz 20 enakostraničnih trikotnikov
- * virusi helikalne oblike se kapsomere naložijo okrog NK spiralno, kot luske pri storžu

Tobačni mozaični virus je sestavljen iz 2130 identičnih kapsomer. Pri najmanjših virusih so tri kapsomere za eno ploskev (skupaj 60 enot), naslednja velikost je nato 180 na vseh ploskvah, sledi 240, formula je $10(N-1)^2+2$.

Adeno virusi so sestavljeni iz 262 ploskev, herpes virusi le iz 62, ... Najenostavnejši virusi so *ssRNA* (single stranded RNA).

Po obliki viruse ločimo po tem ali imajo ovojnico, kakšna je oblika strukture.

Poxviridae so največji in kompleksno sestavljeni virusi, oblika je lahko opekasta (virus črnih koz).

Diagnostika je v laboratoriju usmerjena le v eni smeri, zaradi prevelikega števila virusov in poteka na anamnezi, ter klinični sliki.

4.1.2 Kemična zgradba virusov

Imajo ovojnico iz lipidov, OH, NK. Razmerje med proteini in NK je lahko pri posamznih virusih zelo različno - pri bakteriofagih so beljakovine lahko 40% suhe snovi v celici, virus vakcinije (pox virus) ima 94% suhe snovi.

Sama NK je lahko vedno le ena. + nabiti RNA virusi pa so edini primer RNA, kjer je RNA nosilec dedne informacije. Virusni genomi so večinoma v haploidni obliki, izjema je genom retrovirusov, kjer so v diploidni obliki. Lahko so enovijačni, dvovijačni. Proteini iz katerih so virusi sestavljeni se lahko ločijo v dve skupini:

- * strukturni proteini (sestavni del viriona)
- * nestrukturni proteini (potrebni v fazi razvoja oz. replikacijskega ciklusa in nato so izločeni)

Maščobe lahko tvorijo od 30-35% suhe teže virusne ovojnice in te lipidi izvirajo iz celične stene gostitelja.

OH kot komponenta glikoproteinov in jih običajno najdemo v posebnih podaljških.

4.1.3 Replikacija ali pomnoževanje virusov

1. adsorbpcija - pritrjevanje virusa na celico
2. penetracija - prodiranje virusa v občutljivo celico
3. slačenje virusa
4. transkripcija - prepisovanje zgodnje mRNA
5. translacija - interpretacija zgodnjih proteinov
6. replikacija - pomnoževanje virusne DNA
7. transkripcija - prepisovanje pozne mRNA
8. translacija - interpretacija poznih proteinov
9. sestavljanje virionov
10. sproščanje virionov

Stopnja 1 lahko poteče le, če ima celica ustrezen receptor kamor se veže.

Stopnja 2 poteče z invaginacijo celične stene.

Zgodnji proteini so pomembni za samo pomnoževanje NK in ekspresije genov.

Nekateri virusi se razmnožujejo v jedru, drugi v citoplazmi, odvisno od vrste NK, ter funkcije ki jo opravlja.

Ad. 1.)

Sam proces je odvisen od večih faktorjev. Sami virusi in celice imajo - naboj pri pH od 7-7,5 in tu se eden od drugega odbijajo, če nebi bilo receptorjev do vezave sploh nebi prišlo. Receptorji so pomembni za vezavo virusa, in to omogočajo specifični virusni glikoproteini, ki so lahko zelo različni;

4 Virologija

integrini, IgA, CD4T-celični markerji (limfociti), nevraminska kislina, acetilholinski receptor.

Viruse ločimo tudi na take, ki okužujejo eno vrsto živali in take, ki okužijo lahko več vrst (steklina, aujetszkijeve bolezni).

Za vnos virusa v celico je pomembna tudi *permisivnost/prehodnost* celice za virus.

Celice, kjer virus vstopi, ne pride pa do razmnoževanja so dovzetne, niso pa permisivne.

Geni v virusnem genomu morajo vsebovati informacije za vsaj tri funkcije:

- * proteini za samoreplikacijo
- * sestavljanje genoma v virusni delec ali virion
- * funkcija spremembe strukture/delovanja celice

Virusi imajo različno strategijo napada celice in razmnoževanja v njej. V primeru papova virusov gostiteljski encimi pomagajo virusu pri replikaciji genoma. Pri picorna, reo, herpes virusih pa sami virusni proteini pomnožujejo virusni genom.

Virusi privedejo do:

- * celične smrti
- * funkcijskih sprememb
- * antigenska reakcija

Pri okuženih celicah se spremenijo antigenske lastnosti celice; na površini imajo celice 4 vrste receptorjev, vsak virus pa lahko doseže, da se določeni virusni antigeni izrazijo na površini celice.

V določeni fazi razmnoževanja se pojavi tudi t.i. *faza eklipse*. Ta se pojavi med fazo penetracije in fazo slačenja. V tej fazi virus navidezno izgine. V tej fazi se virus pritaji, vendar je v resnici že slečen in pride do ekspresije prvih genov.

Virus se začne razmnoževati v t.i. *fazi maturacije*. Tu poteka eksponentno naraščanje količine virusov. Pri nekaterih pride nato že po nekaj urah do razpada celice, pri drugih pa lahko tudi dlje.

Sama infekcija lahko zavzame 4 faze:

- * produktivna faza
- * restriktivna faza
- * abortivna faza
- * latentna faza

Prva poteka v celicah brez zastojev.

Tretja se lahko pojavi iz dveh razlogov, ali celice niso dovzetne za infekcijo, lahko pa so celice dostopne, vendar okužene z defektnim virusom, ki nima celotnega kompleta genoma.

Za četrto je značilno, da perzistira le genom. Če je žival zaradi stresov v slabši formi, se latentna infekcija lahko preobrbe zopet v aktivno fazo.

Možna je tudi perzistenca virusa, pri tem se del virusnega genoma veže na celično DNA, ki v določenih pogojih lahko privede celo v malignost.

Določeni virusi imajo na svoji površini podaljške imenovane *peplomeri*, ki so glikoproteini, ki so razprostrti po celotni površini virusa in se tako lahko vežejo na celice. To so protireceptorji celičnim receptorjem. Virus ima lahko več protireceptorjev ali pa imajo na istem protireceptorju več reaktivnih domen.

Pri infekciji morata biti tudi primeren pH in T. Za vezavo protireceptorja z receptorjem je potrebna tudi določena energija. Pri vezavi pride do ireverzibilnih sprememb na celičnem receptorju. Nekateri virusi imajo na protireceptorjih encime (nevraminidaza), ta pri vezavi z določenim celičnim receptorjem le-tega poškoduje, virusni pa ostane nepoškodovan. Po določenem času pride do popustitvi te vezi in virus ostane aktiven, celica pa je okvarjena. Nevraminidaza ima hemaglutinacijsko aktivnost - nase lahko veže eritrocite. Vsaka vrsta influence značilno okvari eritrocite - kar je pomembno pri tipizaciji virusa. S tem lahko z eritrociti, ki imajo točno določen receptor okvarjen ugotovimo tip virusa.

Ad. 2.)

Virusi lahko v celico vstopajo na najmanj tri načine:

- * z invaginacijo - po pritrditvi virusa se vgrezne celična stena, ki se z lizosomom združi v fagolizosom
- * penetracija z translokacijo - celoten virus se prenese preko citoplazmeske membrane fuzija s celično membrano - s fuzijskim glikoproteinom

Ad. 3.)

Virus se mora vsaj delno odpreti, da pride lahko do prepisa zgodnjih genov.

Nekateri virusi se slečeje šele v jedru.

Ad. 4.)

Tekom evolucije so virusi razvili različne strategije pri kodiranju in organizaciji genov, ter različne strategije ekspresije, ter same replikacije genoma. Virus mora svojo mRNA predstaviti celici. Pri tem nastanejo tri vrste ovir:

- * celice ustvarjajo svojo mRNA iz svoje DNA in temu postopku sledi poprepisovalni postopek. Razen virusov, ki s posebnim signalom dosežejo jedro in tam izkoriščajo celično transkriptazo, virusi ne morajo uporabljati celičnih encimov za proizvodnjo mRNA.
- * celični sistem za sintezo proteinov je naravnano tako, da prevaja le monocistronske informacije. Zato mora imeti za vsak gen svojo mRNA - funkcionalna monocistronska informacija.
- * celica proizvaja sebi potrebne proteine in virus mora prisiliti celico za izdelavo virusnih proteinov

Če so geni razporejeni na enem kromosomu je to *monopartiten*, če so na večih je *multipartiten*.

Najenostavnejše je prepisovanje virusov z ssRNA. Taka služi tudi kot mRNA in se direktno veže na ribosom in delno ali v celoti prevede brez predhodnih postopkov.

a) Pri DNA virusih je za prepis v celici potrebna DNA odvisna RNA polimeraza. Prepisovanje poteka programirano - da ne pride do napak in da se sočasno ne izrazijo vsi geni. Geni se prepisujejo v sekvencah - najprej zgodnji, nato pozni geni. Poznamo najmanj 4 strategije izražanja virusnega genoma:

4 Virologija

- * dsDNA virusi (papovavirusi, adenovirusi, herpes virusi); prepisujejo se v jedru in potrebujejo celično DNA odvisno RNA polimerazo. Prihaja do več ciklov prepisovanj - policistronski RNA prepisi, cepljenje, monocistronska mRNA.
- * dsDNA virusi (poxvirusi, virus afriške prašičje kuge); se replicirajo v citoplazmi, mRNA se prepíše direktno iz virusne DNA imajo tri cikle prepisovanj.
- * ssDNK (parvovirusi); včasih so tudi defektni in se lahko le delno razmnožujejo, ker imajo DNA v enojni vijačnici in so odvisni od celične transkriptaze - če pridejo v jedro se lahko razmnožijo, drugače pa lahko ostanejo perzistentni.
- * ds/ss DNK (hepadna virusi); del ssDNA genoma se popravi z virusu pripadajočo DNA polimerazo

b) RNA virusi:

virusna RNA, ki nosi + naboj je sama infektivna, deluje kot mRNA.

- * (-) ssRNA in dsRNA imajo virus odvisno RNA polimerazo - prepis mRNA iz virusne RNA
- * (+) ssRNA retrovirusiv se prepíše v DNA, ki služi kot matrica za prepis mRNA s pomočjo celične transkriptaze

5 Protimikrobno zdravljenje - kemoterapija & zdravljenje z antibiotiki

Kemoterapija je zdravljenje z kemično sestavljenim zdravilom, ki uniči povzročitelja bolezni, hkrati pa organizma gostitelja ne zadene preveč, ali sploh ne. V ta širši okvir spadajo tudi antibiotiki, čeprav jih štejemo kot posebna zdravila. Prvotni antibiotiki so bili produkt živih bitij - mikrobov. Snovi, ki jih sintetizirajo določeni mikrobi, da se z njimi borijo proti drugim mikrobov v borbi za življenjski prostor. Antibiotik - ime je bilo skovano konec prejšnjega stoletja za snov piocianin, katerega izloča *Pseudomonas aeruginosa* (*Bacillus piocianus*¹). Še danes se antibiotiki proizvajajo iz bakterij - aktinomicet. V zgodovini so poleg rastlinskih zdravil poznali tudi maloštevilna zdravila mineralnega izvora. V glavnem je šlo za žveplo, arzen, antimon, živo srebro. S Hg so zdravili sifilis. Eden prvih že nekoliko modernih zdravnikov Paracelsus. Eden od pionirjev moderne kemoterapije je nemški znanstvenik Paul Erlich, ki je bil zelo dober mikrobiolog, ter je bil bogat - bil je tovarnar. Leta 1905 je Erlich pristal pri barvilu 606 - salvarzan, vsebovalo je arzen (As) in je delovalo proti treponemam (sifilis). Leta 1912 so zdravilo močno izpopolnili in ga poimenovali neosalvarzan, ki ni bil več tako toksičen. Leta 1935 izumijo prontosil - barvilo, ki je vsebovalo žveplo je bilo učinkovito proti streptokokom in stafilokokom. Iz te osnove so nato razvili veliko pomembno skupino kemoterapevtikov - t.i. sulfonamide. Leta 1929 je A. Fleming odkril, da plesen *Penicillium notatum* zavira rast stafilokokov. Do odkritja je prišlo slučajno. V letih 41-42 so iz te plesni izolirali penicilin. Za rabo je bil na voljo leta 42. V 40. letih pridobijo še kloramfenikol, kasneje pa še streptomycin. Kloramfenikola se ne uporablja več, ker je do neke mere toksičen in kancerogen. Kemijsko zdravilo, ki bi bilo res dobro, bi moralo ustrezati nekaterim zahtevam:

- * selektivna toksičnost; ozko specifičen (uniči tujek, ne poškoduje gostitelja)
- * ne sme povzročati preobčutljivosti
- * ne sme izzvati ne genotipske, ne fenotipske odpornosti mikrobnega povzročitelja bolezni
- * organizem, ki ga zdravimo zdravila nebi smel prehitro razkrojiti ali izločiti
- * zdravilo, naj bi zlahka in hitro doseglo področje okužbe, pa tudi baktericidno koncentracijo (bakteristatiki mikrobov le zaustavijo v rasti)

5.1 Sulfonamidi

Razvili so jih v 30. letih iz rdečega barvila prontosil. Prvi sulfonamidi so bili precej toksični za organizem gostitelja. Kasneje so ta zdravila precej izboljšali, tako, da današnji sulfonamidi so dosti manj strupeni.

¹gr. pus,ris = gnoj

5 Protimikrobno zdravljenje - kemoterapija & zdravljenje z antibiotiki

1. Sulfamilanid
2. Sulfadiazin
3. Sulfapiridin
4. Sulfametazin
5. Sulfaguanidin

Delujejo dobro, tako na gram+, kot na gram- bakterije. Strokovno tak način delovanja označimo: imajo širok spekter delovanja, *širok protibakterijski spekter*. Način po katerem delujejo sulfonamidi ima posebno oznako - gre za t.i. *kompetitivno inhibicijo*. Sulfonamid tekmuje z neko drugo substanco (*paraminobenzojevas kislina - PABA*) za mesto v zapleteni kemijski formuli *folne kisline*. Celica tako nima faktorja rasti in se zaustavi v rasti. Sulfonamid ne ubija, temveč zaustavlja v rasti - je **bakterio-statik**. Evkarionti ne sintetizirajo folne kisline, temveč jo pridobijo s hrano - selektivna toksičnost.

5.2 Antibiotiki

Poznamo 4 poglavitna prijemališča antibiotikov = štiri poglavitne načine delovanj. Od teh 4 sta dve zares pomembni:

- * delovanje na celično steno
- * blokada, oz. zaviranje sinteze proteinov pri bakterijah
- * delovanje na sintezo nk (manj pomemben)
- * delovanje na citoplazemsko opno (manj pomemben)

Pri prvih dveh načinih je odlično izpolnjen pogoj o selektivni toksičnosti.

Antibiotik napade na strukturo, ki je lastna le bakterijam in je evkariontske celice nimajo - murein, sinteza proteinov (razlika v ribosomih).

5.2.1 Antibiotiki, ki poškodujejo celično steno

PENICILIN

Bakterije ob rasti povečujejo mureinski plašč tako, da dodajajo podenote n-glutaminsko kislino + n-acetil-muraminske kisline + 5 glicinov. Ta podenota se sintetizira v citoplazmi in pripotuje na površje, kjer se vgradi v mureinski plašček in ga tako povečuje. Tu vskoči penicilin. Encim transpeptidaza pomaga pri sestavi plašča. Sinteza poteka tako, da se zadnji glicin veže na zadnji d-alanin, ki izpade. Penicilin se veže s transpeptidazo in jo ireverzibilno inaktivira. Bakterija tako zraste z nepopolnim mureinskim plaščem, ter tako v njej propade ozmotsko ravnotežje, celica propade. Podobno kot penicilini delujejo še nekatere druge skupine antibiotikov npr. *cefalosporini*. Ločijo se od penicilina po beta-laktamskem obroču, ki ima beta-laktamsko vez (jo ima tudi penicilin), zaradi te vezi te antibiotike poimenujemo **beta-laktamski antibiotiki**. Penicilini v bakterijskih celicah povzročajo izločanje določenih encimov - avtolizinov in od znotraj poškodujejo bakterijsko steno.

Kljub izrednemu razvoju industrije zdravil, kljub številnim antibiotikom penicilin še vedno obstaja eden najboljših/najučinkovitejših antibiotikov, z določenimi omejitvami.

Najprej je bil izumljen penicilin G, katerega izloča gljivica *Penicillium notatum* na običajnem gojišču, ima pa številne pomankljivosti; potrebno ga je aplicirati parenteralno (želodčni sok ga razgradi).

Penicilin V - dobili so ga z gojenjem na drugačnem gojišču. Ta je za želodčno kislino neobčutljiv, torej je oralna uporaba omogočena.

5.2.1.1 Odpornost bakterij *proti* antibiotikom - občutljivost za antibiotike

Gre za tri načine rezistence proti antibiotikom:

1. če nima prijemališča za vezavo antibiotika
2. antibiotik ne more prodreti v bakterijo
3. bakterija sintetizira določene snovi (encime), ki se izločajo v okolje ali pa se hranijo znotraj bakterijske celice. Ti encimi kemijsko razgradijo antibiotik, tako, da postane neučinkovit

Rezistenca je lahko naravna, *lastna* določeni vrsti mikroba. Ta odpornost pa je lahko tudi *pridobljena* - pridobljena rezistenca, do tega lahko pride na 2 načina; z mutacijo (sprememba lokusov na kromosomu - kromosomska rezistenca), posledica katere je navadno izguba prijemališča za antibiotik; druga vrsta je plazmidna rezistenca - preko rezistenčnega plazmida (R-plazmid), na teh plazmidih so navadno zapisi za sintezo encimov, ki inaktivirajo antibiotik.

S. aureus je po naravi občutljiv za penicilin - dobro deluje na gram+ bakterije, ker ima penicilin dober dostop do mureina. Lahko nastopi mutacija na kromosomu in začne *S. aureus* izločati penicilinazo, ki deluje kot beta-laktamaza in inaktivira penicilin. Če pobijemo veliko število stafilokokov z penicilinom ostanejo le še mutanti in nato se lahko ti razmnožijo, ker so na penicilin odporni.

Če na gojišče penicilinuma dodajamo določene kemijske spojine lahko vplivamo na zgradbo penicilinov. Gre za dodajanje različnih novih stranskih verig. Govorimo o polsintetskih penicilinih. Tako nastanejo penicilini, ki niso več občutljivi za penicilinazo in beta-laktamazo (meticilin, kloksa, oksa, nafcilin).

Penicilin slabo deluje na bakterije z celično steno zunaj bakterij, neučinkovit je proti gram- bakterijam. Zunanja ovojnica gram- bakterij je - nabita in odbija penicilin. Proti gram- bakterijam so učinkoviti *amino penicilini*.

Tartenicilin je pomemben predvsem pri zdravljenju *P. aeroginoza*. Prodira v mikrob in je odporen proti notranjim penicilinazam.

Z umetnimi posegi zmanjšujemo naravno učinkovitost penicilina.

Dandanes izdelujejo peniciline, ki sami poškodujejo penicilinazo. En tak primer je *klavulanska kislina*. Učinkovitosti proti bakterijam nima skoraj nikakršne, vendar razgradi encim penicilinazo, zato jo kombiniramo z enim od učinkovitejših penicilinov (amoksiklav = klavulanska kislina + amoksicilin). *Amoksicilin* sodi med aminociline - širok mikrobní spekter.

5.2.2 Antibiotiki, ki delujejo na sintezo beljakovin

Ti antibiotiki lahko zaustavijo sila zapleten proces na različnih stopnjah, kot so npr:

1. prepis mRNA iz DNA in vezava mRNA na 30S podenoto ribosoma
2. stvarjanje kompleksa a.k.:tRNA in njegova enota na 50S podenoto ribosoma

5 Protimikrobno zdravljenje - kemoterapija & zdravljenje z antibiotiki

3. stvarjanje peptidne vezi med novo prispelo a.k. in karboksilnim koncem zadnje a.k. v nastajajoči beljakovini
4. translokacija ali premikanje ribosoma vzdolž mRNA od kodona do kodona in končno odcepitev gotove proteinske verige z ribosoma, potem, ko je ta dosegel terminacijski kodon.

Eden najučinkovitejših antibiotikov iz omenjene skupine je **KLORAMFENIKOL**, ki je antibiotik širokega protimikrobnega spektra in deluje tako na gram+, kot na gram- bakterije in sicer bolj bakteristatično, kot baktericidno. V nasprotju s penicilinom bakterije torej zaustavlja v rasti in jih ne uniči. Pritrdi se na 50S podenoto bakterijskega ribosoma in inhibira encim *peptidiltransferazo*. Encim sodeluje pri ustvarjanju peptidne vezi med na novo prispelo a.k., ki se še drži tRNA in zadnjo a.k. nastajajoče beljakovine.

Linkomicin in **eritromicin** tekmujeta s kloramfenikolom za isto prijemališče. Tako hkratno zdravljenje z dvema inhibitorjema 50S podenot nima smisla.

(Stranski učinki kloramfenikola: glej Splošna mikrobiologija - J. Jurca; str. 93)

ODPORNOST PROTI KLORAMFENIKOLU:

Zanjo je odgovoren poseben plazmid, temelji pa na stvarjenju posebnega encima **kloramfenikolacetiltransferaze**, ki ga naredi nedejavnega. Odpornost pa je lahko tudi posledica mutacije na kromosomu, ki spremeni podenoto 50S in tako zmanjša afiniteto za kloramfenikol.

MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI:

1. *eritromicin*
2. *oleandomicin*
3. *karbomicin*
4. *spiromicin*
5. *linkomicin*
6. *klindamicin*

Preprečujejo sintezo beljakovin tako, da reagirajo s 50S podenoto ribosoma. Linkomicin pa poleg tega razbija polisome, kar povzroča razpad posameznih ribosomov na 50S in 30S podenoti. Protimikrobni spekter delovanja je podoben penicilinu, zato se uporabljajo kot alternativa pri pacientih preobčutljivih na penicilin.

TETRACIKLINI:

Imajo širok protibakterijski spekter, vežejo se na 30S podenoto ribosomov in preprečujejo pritrditev tRNA, ki nosi a.k. Uporabljamo jih za zdravljenje okužb z bakterijami, ki ustvarjajo β -laktamazo, pri okužbah z rikecijami, klamidijami in mikoplazmami.

ODPORNOST PROTI TETRACIKLINOM:

Nastane zaradi zmanjšane prepustnosti bakterije za tetracikline, lahko pa je posledica povečanega izločanja in zato premajhne koncentracije antibiotika v celici.

AMINOGLIKOZIDNI ANTIBIOTIKI:

Streptomycin deluje na gram+ in gram- bakterije. Delovanje je odvisno od sposobnosti specifične vezave na poseben ribosomski protein S12 na 30S podenoti. Posledica te vezave je napačno branje mRNA. Poleg tega pa še preprečuje premikanje ribosoma vzdolž mRNA, blokira torej iniciacijski kompleks.

ODPORNOST PROTI STREPTOMICINU:

Temelji na spremembi ribosomskega proteina S12. Podenote 30S ne reagirajo več s streptomycinom, ker ni več ustreznega prijemališča.

Ostali aminoglikozidni antibiotiki so še:

1. **neomicin**
2. **kanamicin**
3. **amikacin**
4. **tobramicin**
5. **gentamicin**
6. **spektinomycin**

Vsi zavirajo sintezo beljakovin na ravni 30S podenote. Neomicin, kanamicin in gentamicin imajo vsaj dve vezni mesti, ki pa sta različni od prijemališča za streptomycin.

5 Protimikrobno zdravljenje - kemoterapija & zdravljenje z antibiotiki

6 Dezinfekcija in sterilizacija

Ignaz Semmelweis - 1847 - stažisti so od seciranj hodili direktno k porodom in so tako prenašali streptokoke k porodnicam. Semmelweis je ukazal, da morajo vsi zdravniki pred porodom roke umiti v raztopini klora, s tem je drastično zmanjšal število smrtnih primerov. Sklical je sestanek vodja vseh klinik, vendar ga ni nihče poslušal in se njegovih navodil niso nameravali držati, ker bi tako povedali, da so zdravniki prenašali bolezn. Joseph Lister - 1860 - vedel je, da mikrobi okužujejo kirurške rane, ter, da se mora kirurg umiti in razkužiti inštrumente pred delom. Pazil je na to, da je bil razkužen zrak nad operacijskim poljem. Izumil je poseben razprišilec s katerim je razkuževal zrak v okolici pacienta nad operacijskim poljem.

6.1 Dezinfekcija

Izraz pomeni uničevanje kužnih klic.¹

Uničevanje patogenih mikrobov.

Pri uničevanju mikrobov ločimo dve vrsti postopkov in temu primerno dve vrsti sredstev:

- * fizikalna sredstva & postopki
- * kemijska sredstva & postopki

Pod sterilizacijo razumemo uničevanje mikrobov s fizikalnimi sredstvi, pri dezinfekciji pa mislimo na kemijske snovi.

Dezinficiens = kemijsko sredstvo za dezinfekcijo

Antiseptik = -||-

Slovensko nadomestilo za obe besedi je razkužilo.

Antiseptiki se uporabljajo za razkuževanje kože pri operaciji - razkužujemo živo snov. Antiseptiki ne smejo biti korozivni - razjedati ne smejo materialov, ki jih razkužujemo.

6.2 Sterilizacija

Danes pod tem terminom razumemo uničenje vseh mikrobov, čeprav izraz ne ustreza.²

Zelo preprosto sredstvo, hkrati zelo učinkovito je vročina. Zažiganje je učinkovit način sterilizacije. Če hočemo učinkovito preprečiti širjenje okužbe z nekega območja zažgemo bolnico. V laboratoriju imamo plinski gorilnik, s katerim ožigamo cepilne zanke, vratove epruvet, zahtevne manipulacije opravimo v bližnji okolici plamena. Vročina deluje učinkovito na različne vrste mikrobov. Predvsem prizadene bistveno sestavino - beljakovine, ki pri vlažni vročini koagulirajo. Pri suhi vročini

¹lat. inficio = vnesem, okužim

²lat. sterilis,e = neploden

6 Dezinфекcija in sterilizacija

pride do denaturacije. Tako zelo hitro uničimo bakterije, viruse in glive, razen spor, ki so sila trdovratna oblika. Spore lahko vremo v vodi več ur, pa vendar ostanejo žive (odvisno od vrste bakterij). Zelo hitro jih uniči temperatura 160°C v olju. Vodna para pod pritiskom v aparatu, ki ga imenujemo avtoklav. Tu dosežemo temperaturo 121°C in do 1 atmosfere/cm². Pri 121°C se v avtoklavu uničijo kmalu tudi spore (10-15min). V avtoklavu razkužujemo povoje, kirurške inštrumente in drug kromiran material, ki tako segrevanje prenese. Za uničevanje vegetativnih oblik bakterij pa nam zadoščajo nižje T. Že dobrih 100 let se pozna postopek pasterizacije. S pasterizacijo uničimo patogene bakterije v živilih, zlasti v mleku. Poznamo različne postopke pasterizacije in različne temperaturne razpone. Klasična počasna pasterizacija 63-65°C za 30". Srednja 71-74°C, 42-45 sek. Hitra ali visoka pasterizacija 85°C, nekaj sekund. Večina patogenih mikrobov propade pri 60°C, samo nekatere vrste so odpornejše. Nekaj časa je veljalo, da je treba pri pasterizaciji uničiti bacil tuberkuloze, ki je bil merilo za veliko odpornost proti visokim temperaturam. Sedaj ga je zamenjala rikecija - *Coxiela burnettii*, ta povzroča Q mrzlico. V mleku po pasterizaciji ostane še dosti živega - termofilni mikrobi, ki prenašajo višje temperature, vendar sem ne sodijo patogeni mikrobi, so pa tu nekateri mikrobi, ki kvarijo živila. Mleko boljše kakovosti se pasterizira, slabše pa se sterilizira in prodaja kot alpsko mleko. Spore so tako odporne zaradi *debelega plašča, nizke vsebnosti vode in kalcijevega dipikolinata*. Sterilizacija je hitrejša in učinkovitejša, če skušamo uničiti čisto kulturo bakterij, če pa so bakterije nekako zaščitene s svojim naravnim okoljem - bakterije v krvi, v gnoju, v ostali umazaniji, v različnih beljakovinskih snoveh, tu je treba pri razkuževanju ali povišati T ali podaljšati čas razkuževanja, da T pač doseže mikrobe, ki so skriti v različnih snoveh. **Avtoklaviranje in pasterizacija** spadata med *postopke sterilizacije z vlažno vročino*, sem spada še *tindalizacija*.

Tindalizacija poteka sledeče:

- * material, ki ga razkužujemo segrevamo od 80-100°C (uničimo vegetativne oblike)
- * pri visokih T se nekateri bacili sporulirajo
- * s segrevanjem prenehamo za 24 ur, nato zopet segrevamo
- * ta postopek ponavljamo 3 dni

Pri uporabi suhe vročine so pravila nekoliko drugačna. Suha vročina ni tako učinkovita kot vlažna. Uporabljamo jo za sterilizacijo steklovine in snovi, ki so neprepustne za paro (olje, želatinaste snovi, snovi v prahu). Mikrobov uniči T predmetov in materialov s katerimi so v stiku, ne pa temperatura vročega zraka.

Izsuševanje ali desikacija; je metoda fizikalnega razkuževanja, saj suhega okolja večina mikrobov ne prenese dalj časa. Nekatere patogene bakterije izsuševanje uniči že v 1 uri. Zmrzovanje mikrobov ne škoduje (z zmrzovanjem jih ohranjamo).

Liofilizacija; je poseben postopek, pri katerem material obenem izsušujemo in ohladimo in zamrzujemo.

Mikrobov zelo učinkovito uničuje **sevanje**. Najbolj običajno so to UV žarki. Vegetativne oblike bakterij in drugih mikrobov ne prenesejo sončne svetlobe zaradi UV žarkov. Ti poškodujejo DNA, gre za direktne poškodbe in za kasnejše škodljive mutacije. Pri neposrednih poškodbah gre za velik vpliv na pirimidinske baze na timin. UV žarki povzročijo, da se sosednje molekule timina v dvojni vijačnici nekako zlepijo. Nastanejo nekakšni grudasti izrastki ireverzibilne narave na dvojni vijačnici, podvojene zanke iz molekul T, poškodba DNA, ki je neodpravljiva in celica propade. Že spet ni tega učinka pri sporah, ki so odporne proti UV žarkom. Pri sporulaciji se sintetizirajo posebni drobni proteini -

SASP (Small Acid Soluble Spore Proteins), ki zaščitijo DNA pred UV žarki. Ni več zlepljanja timinskih molekul, ker ti proteini rahlo odvijajo dvojno vijačnico in nastane spremenjena prostorka struktura DNA in ta malenkostna sprememba povzroči neobčutljivost DNA za UV žarke. Poleg UV žarkov poznamo tudi t.i. ionizirajoče sevanje - X-žarki, gamma-žarki. Tu gre za žarke, ki izrivajo elektrone tako, da nastajajo ioni (od tu ime ionizirajoče sevanje) ioni se nato vežejo na organske molekule, na proteine na DNA in jih takjo uničijo. UV žarke rabimo za razkuževanje prostorov (kirurških dvoran, v mikrobioloških laboratorijih pri delu z virusi). Ionizirajoče sevanje je primerno za sterilizacijo določenih zdravil in kirurških pripomočkov, uveljavlja pa se tudi pri sterilizaciji določenih živil.

Med fizikalne postopke sodi tudi *filtracija*, aplicira se predvsem v laboratorijih. Poznamo različne filtre z različno velikostjo por, ki zadržijo predvsem bakterije. Filtracijo kot metodo uporabljamo pri sterilizaciji različnih občutljivih snovi, serumov, organskih snovi, vitaminov, vakcin . . .

6.2.1 Črne kozе ali variola

Gre za hudo kužno bolezen, ki se manifestira z visoko vročino, izpuščaji na koži, ki se zagnojijo in počijo. Nastanejo čiri, ki so globžki in se slabo zdravijo, ko se pozdravijo ostane z njimi sled. Povsem je bila izkoreninjena v začetku 70 let, zadnji izbruhi so bili v etiopiji. Prvo imunološko znanje je vezano na to bolezen - na zaščito proti tej bolezni. O črnih kozah piše Voltaire (18. stol), ko v enem od svojih pisem razlaga, da je znanje o črnih kozah prišlo z kitajske. Kitajci so imeli posebno metodo, da so pobrali kraste z teh poškodb na koži. Kraste so zmleli v prašek. Človek, ki so ga želeli zaščititi je ta prašek ponjuhal. Če je šlo vse po sreči je tak človek zbolel za blago obliko črnih koz, skoraj brez izpuščajev, v kratkem času si je povsem opomogel in je bil do smrti zaščitem pred napadom te bolezni v kakršnikoli obliki. V prahu se je ohranil virus črnih koz, vendar oslavljen. Zmanjšano je imel virulenco. Ohranil pa je vse t.i. antigene lastnosti. Na tem načelu so narejene vse vaccine. Voltaire je napisal tudi, da je v Evropo prišla zaščita proti kozami ne od kitajcev, temveč od turkov, kamor naj bi jo prinesli čerkezi - revno vendar ponosno ljudstvo, katerega edino premoženje so bile njihove lepe hčere, katere so prodajali. Z njimi so zalagali carigranski dom, hareme raznih mogočnikov, ki so si to razkošje lahko privoščili. Čerkezi so zaščitili vse otroke po kitajski metodi. Lady M. W. Montague je pomagala pri prinosu zdravila v Evropo. V Turčiji so za cepljenje uporabljali gnoj variuloznih čirov. Lady M. je dala svojega sina cepiti. V Angliji je to metodo razglasila in se je začela uveljavljati in je bila metoda dovoljena do leta 1721 metodo imenujemo *variolacija*. Obolevnost je 60%, od the 60% je mortalnost 33.33 %, 66.66% pa preboli in nosi posledice celo ivljenje. A. de Haen je v Avstriji tedaj nasprotoval variolaciji, saj je bila verjetnost, da ljudje zaradi nje zbolijo enako grozeča, kot okužba sama. Umirali so v glavnem otroci. Cesarica Marija Terezija je imela velike izgube v svoji rodbini. Cesarica je zbolela in tudi prebolela bolezen, ter ostala do smrti kozava. Odšla je v Anglijo, kjer so imeli že precej izpopolnjene metode. Leta 1768 ji je osebni zdravnik poslal madega, obetavnega, vendar izkušenega zdravnika J. Ingeh Housz. Poučeval je Dunajske zdravnike o posebnih tehnikah zaščite. Opravljali so poskuse na zločincih in otrocih v sirotišnicah. 10.9.1768 je pocepil pripadnike rodbine. Vsi so zboleli za blago obliko. Šel je v Firence in se ustavil v naših krajih in poučeval tudi slovenske zdravnike o variolaciji. Metoda je bila pri nas dovoljena, vendar se ni najbolje prijela.

Na podeželju je bilo znano da kravje dekile redko zbolijo za kozami. Te so se okužile s kravjimi kozami. Bolezen kravje kozе poteka zelo blago, sta si pa virus kravjih koz in virus variole antigensko tako podobna, da eden zaščiti tudi proti drugemu.

E. Jenner je dečka cepil z gnojem kravjih koz in ga čez 2 tedna okužil s črnimi kozami - deček ni zbolel. Jenner je napisal tudi knjigo o vakcini za variolo in je postala temelj za vsa kasnejša prizadevanja in sodobno vakcinalno zaščito. Sprva je naletel na odpor. Kasneje so zdravniki metodo kmalu in temeljito preizkusili. Z metodo so se strinjali. Z Jennerjevimi cepivom so bili problemi, saj

6 Dezinfekcija in sterilizacija

zdravniki tako niso dobili ustreznega materiala za cepljenje, če pa so ga dobili pa pogosto ni bil pravi (ni izviral iz pravih kravjih koz). Izraz vakcinacija si je kakih 100 let kasneje izmislil Luis Pasterur na čast Jennerju³. Pasteur se je ukvarjal z povzročiteljem kokošje kolere - *Pasterella aviseptica*. Pasteur je cepil piščance, ki so redno poginjali, nakar jih je seciral, nasadil spremenjene organe na bakteriološka gojišča in določil povzročitelja. Ko je šel na dopust je pustil eno od petrijevk zunaj na odprtem in ko se je vrnil je bila kultura suha. S to kulturo je cepil piščance, ki pa tokrat niso zboleli. Nato je te iste piščance cepil s svežo kulturo in piščanci so ostali zdravi. S tem, ko je posušil kulturo je zmanjšal virulenco mikroba, ni pa oslabil antigenskih lastnosti mikroba. Istega leta je naredil še vakcino za vranični prisad. Bacil je vzgajal pri visoki T (42-43C). Bacil je rasel, ohranil Ag lastnosti, izgubil pa je virulenco. Leta 1885 pa je izumil tudi cepivo za steklino. Vedel je, da gre za snov, ki je filtri ne izdrže. Virus je gojil na živih živalih tako, da je cepil kunce. Aplikacija je potekla direktno v možgane. Sušil je hrbtenjačo, ki jo je nato zmlal in emulgiral v formalinu. Pasteur je zaščitil pse, človeka pa ni upal cepiti. Julija 1885 je bil v to prisiljen, ko mu je neka mati pripeljala sina, katerega je hudo ogrizel stekel pes. Dečka je nato vakciniral - dal mu je 13 injekcij emulzije v peritonealno votlino. Vakcino so delali na ovčjih možganih, ki so bili zelo podobni HMC človeškim in je tako prišlo do imunskega odziva, ki je uničeval človeku lastne celice. V veterinarski medicini so poskušali pridobiti vakcino proti goveji kugi, ki je precej nevarna bolezen, saj ima veliko obolevnost in veliko smrtnost. Bolezen povzroča ogromno gospodarsko škodo v tedaj živinorejsko že dokaj razviti Evropi. Strokovnjaki so se poskušali boriti z obliko podobno variolaciji. Uspehi so bili precej dobri.

³lat. vacca = krava

7 Imunologija

Za določene mikrobo nismo dovzetni oz. občutljivi. Za rastlinske viruse so občutljive rastline. Znotraj različnih živalskih vrst obstaja *vrstna občutljivost*. Za virus svinjske kuge so pujsi, za pasjo kugo psi, ... Občutljivost je lahko *rasna ali pasemska*. Črnci in indijansi so bolj občutljivi za tuberkulozo kot belci. Plemenite evropske pasme pujsov imajo zelo pogosto rdečico. *Individualna občutljivost* je odvisna od dedne zasnove, do vsakodnevne prehrane, hormonalnega ravnotežja, vitaminov, do tega kako živimo, od starosti. Kljub temu, da smo za določene mikrobo dovzetni, so ti primeri obolenja zelo redki. Tak primer je steklina.

Od leta 1972 imamo v Sloveniji steklino. Gre za gozdno (silvatično) steklino -> nanaša se na način širjenja. Glavni prenašalci so zlasti lisice, glodalci oz. gozdni divji prebivalci. Veliko lisic je poginilo in v stik s steklimi živalmi pride veliko ljudi; lovci, gozdarji, veterinarji. Nimamo primera stekline pri ljudeh. Ljudje so manj občutljivi za to bolezen. Koža nas ščiti, da ne zbolimo pogosteje. Virus ne more skozi kožo in nepoškodovana koža je odlična pregrada za različne mikrobo. Keratinska plast in mrežasta razporeditev celic v koži pripomoreta k temu in branita vstop. Gre pa tudi za veliko kemično zaščito -> izločamo loj in znoj, ki vsebujeta različne snovi, ki so škodljive za mikrobo -> zlasti nenasičene maščobne kisline (trigliceridi), mlečna kislina, steroidi, fosfolipidi, polipeptidi, nekatere Ak, razmeroma nizek pH kože. Je pomembna tudi kot biološka zaščita. Na koži se nam naselijo neškodljive bakterije. Govorimo o residentni (domači) mikroflori, ki zasede prehrabeno nišo. Ne dovoli patogenim mikrobom naselitev na koži. Nekatere celo izločajo določene snovi, ki škodijo Gram- bakterijam (določenim). Med naravne prepreke, ki sodjo k koži prištevamo še gosto dlako pri živalih, ki to imajo in perje pri pticah. Sluznice so odličen obrambni sistem. Sama sluz je zelo pomembna, je odlična fizikalna bariera, enostavno zleplja mikrobo in onemogoča njihovo delovanje. Sluznica dihal ima migetalke na epitelu, vdihnemo zrak, zrak kroži, bakterije se nabirajo na sluznici nosu, kihanje, kašljanje -> spada med fizikalne bariere. Baktericidnost in viricidnost se začne že v slini. Tudi želodčni sokovi so za številne mikrobo prekisli. V črevesju je spet domača flora:

- * v debelem črevesju anaerobna mikroflora
- * v tankem črevesju mikroaerofilna mikroflora

Jogurt nam pomaga pri prebavnih motnjah -> uravnovesi mikrofloro.

Pri prebavilih je še peristaltika. Zvija nas po trebuhu in izločimo patogene bakterije. Ne pride do adhezije. Podobno je v urogenitalnem traktu. Gre za stalno spiranje z urinom. Preprečuje adherenco določenih bakterij. Tudi rahlo kislo okolje preprečuje ugodno naselitev. V genitalnem traktu, zlasti pri ženskah imamo sijajno kemijsko zaščito -> vaginalni pH je sila nizek -> to velja za žensko v rodni dobi. Dekleta pred puberteto in ženske po meni te zaščite nimajo. Gre za mikrofloro v vagini, mlečna kislina je odlična zaščita. Cervikalni čep zapira dohod v maternico. Obstaja tudi raznovrstna zaščita mlečne žleze; mišica zapiralka, keratinska obloga seskovega kanala. Kerotinski kanalček je kratek in izloča različne baktericidne proteine. Tudi samo mleko deluje proti mikrobom. Oči so zaščitene z vekami, trepalnicami, zlasti pa s solzami, ki vsebujejo encim lizocim, ki raztaplja mureinsko vrečko.

7 Imunologija

Nevaren je za Gram+ bakterije. Koncentracija tega encima je v solzah do 1000x večja kot drugje. V ušesih imamo ušesno maslo.

Med prepreke, ki branijo pred vdorom mikrobov v organitem spada vse to. Včasih se zgodi, da so te prepreke premalo in mikrobi vdoro v organizem s t.i. *notranjo obrambo*. Doslej smo govorili o *zunanji obrambi*. Notranja obramba se aktivira, ko mikrobi vdoro v organizem. Patogeni mikrobi v prebavnem traktu pa ne pomenijo vdora v organizem. Kljub izredni zapletenosti in medsebojni povezavi obrambnih mehanizmov vendarle lahko nekako razdelimo to področje.

Ločimo dva poglobitna sistema obrambe:

- a) **naravna obramba**; je prirojena in nespecifična, neusmerjena => mehanizmi branijo pred vsemi mikrobi, ki vdirajo. Gre za prastare mehanizme. Deluje takoj, v sekundi. Mehanizmi naravne obrambe so zelo stari. Kot dopolnilo naravni obrambi pa štejemo
- b) **imunost**; ta je pridobljena, specifična obramba, usmerjena je v vsak posamezen mikrob posebej. Je filogenetsko precej mlajša od naravne obrambe. Sesalci imamo najboljše razvito imunost. Deluje z zamudo in ima spomin.

Mehanizmi naravne obrambe na ravni telesnih sokov => **humoralna obramba**. Ločimo pa še **celično obrambo** (naravno in celično imunost).

Naravna obramba na ravni telesnih sokov (naravna humoralna obramba):

Sem sodijo drobne molekule, posamezni ioni, nekoliko bolj zapletene molekule kot npr. lizocin, baktioferin. Pridemo do dveh velikih sistemov:

- * sistem komplementa
- * sistem interferona

Bistven mehanizem je *fagocitoza* -> znotrajcelično ubijanje mikrobov, presnova in za manj pomembno zunajcelično ubijanje, za kar poskrbijo *natural killer cells*. Gre za nespecifično prirojeno obrambo. Ločimo dve vrsti limfocitov:

- * *limfociti B* (humoralna imunost); preobrazijo se v plazmatke in izločajo protitelesa, ki sodijo v humoralno imunost
- * *limfociti T*; so nosilci celične imunosti

Med obema vrstama limfocitov obstaja nujno potrebno sodelovanje. Gre za povezave med fagociti in limfociti.

Pri naravni humoralni obrambi nas zanimata dva sistema:

1. KOMPLEMENTARNI SISTEM (komplement)

Poimenovanje ne ustreza povsem. Izraz izhaja iz lat. *compleo* = dopolnjen. Gre za samostojen, ubijalski sistem *26 beljakovin*, ki so v glavnem v krvnem serumu, pa tudi v drugih telesnih tekočinah. Če ni potrebe, te beljakovine mirujejo. Če pa nastopi potreba, če nastane poškodba na kateremkoli delu telesa, če v organizem vdrejo mikrobi, se ta sila pomembnega močnega beljakovinskega sistema aktivira. Aktivacija poteka tako, da se posamezne komponente sistema cepijo. Beljakovine nastajajo na različnih koncih organizma; v jetrih in določenih krvnih obrambnih celicah, kot so npr. makrofagi. Beljakovine označujemo s črko C; C₁, C₂, C₃, C₄ => zaporedna številka označuje zaporedje v katerem se te beljakovine cepijo. Posamezni fragmenti lahko učinkujejo samostojno, lahko pa se združujejo v

posamezne sklope in delujejo kot encimi. Na ta način tudi sprožajo naslednje stopnje cepljenja. Če bi skušali zajeti poglobljeno nalogo tega sistema v enostavnejšo obliko bi rekli takole: beljakovine imajo tri velike naloge:

- * spodbujajo vnetje
- * pomagajo (omogočajo) fagocitozo
- * liza celic => raztapljanje in ubijanje celic

Slednja pomeni lizo bakterijskih celic. Lizirajo tako, da se združijo v *encimski kompleks* => *litični kompleks*, ki dela luknje v fosfolipidni dvosloj celic. Fosfolipidni dvosloj je pri Gram- bakterijah na zunanji strani. Pri Gram+ bakterijah pa je zunaj mureinski sloj, zato litični kompleks tu ne deluje, tu delujejo lizocimi, ki delujejo v zvezi s tem kompleksom.

Encimski kompleks ne loči med membrano bakterije in membrano celic domačega organizma in zato nujno poškoduje tudi domače celice. Obstajajo celični regulatorni mehanizmi, ki skrbijo za pravilno doziranje, za uravnavanje cepljenj beljakovin tega sistema in posledično za uravnovešeno delovanje beljakovin sistema.

Kljub veliki raznolikosti in zapletenosti različnih obrambnih mehanizmov si lahko uredimo sistem.

Lastnosti naravne obrambe:

- * prirojena
- * nespecifična
- * neusmerjena
- * filogenetsko stara
- * deluje takoj

Gre za močne, učinkovite mehanizme.

2. IMUNSKI SISTEM¹:

Imunost je lastnost višje razvitih organizmov in deluje kot nadgradnja oz. dopolnitev naravne obrambe. Filogenetsko je mlajša od naravne obrambe. Je pridobljena v ontogenetskem razvoju, vsak osebej jo pridobi individualno. Izgrajuje se sistem imunosti. Poglobljeno značilnost teh mehanizmov je usmerjenost v natančno določanje povzročitelja. Sistem ima spomin, deluje z določeno zakasnitvijo oz. zamudo.

Poznamo tudi druge vrste razdelitev (na humoralno in celično obrambo).

Humoralna naravna obramba

- * ioni (H^+ , Cl^- , K^+)
- * encimi; molekule, encimi (izločajo jih različne imunske celice)

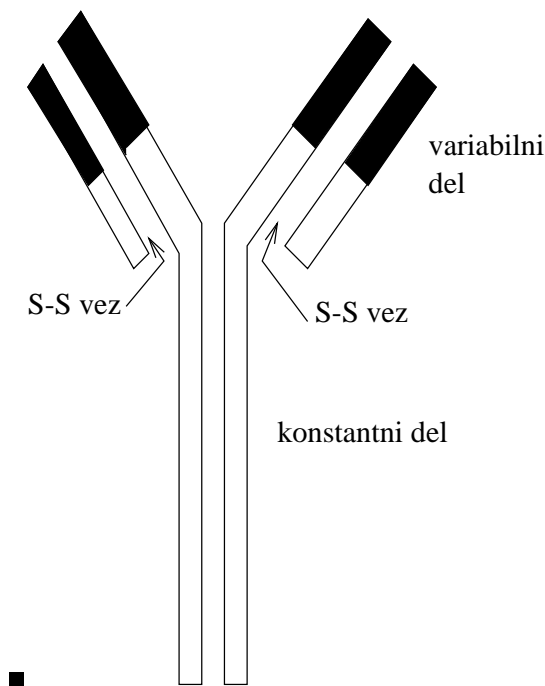
¹lat. immunis = prost davkov; munio 4 = gradim, utrujem

Komplementni sistem

Tukaj je najmanj 26 beljakovin, ki so v glavnem krvnem serumu. Beljakovine tega sistema so neaktivne, če jih organizem ne potrebuje. Določene snovi sistem aktivirajo, cepijo se osamezne beljakovine sistema, fragmenti so lahko učinkoviti kot samostojni ali pa se združijo v komplekse, kjer delujejo kot encimi. Gre za tri poglobitve načine delovanja.

7.1 Naravna humoralna obramba

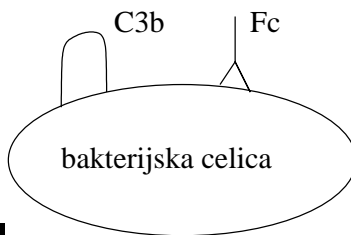
Sistem začne delovati ob določeni vzpodbudi. Tu sta dva (znana) načina cepljenja beljakovin. En sistem je povezan z imunostjo, je filogenetsko mlajši, popolnejši. Da se sproži, so potrebna protitelesa. Sodiijo v skupino globulinov γ . Protitelesa so iz dveh težkih in dveh lahkih verig, ki so povezani z disulfidnimi mostovi. Pri protitelesih ločimo konstantne dele, ki so stalni, nespremenjeni, ter variabilne dele. Osnovna oblika beljakovine je oblika vilic oz. oblika črke Y. Če na protitelesa delujemo z proteolitičnimi encimi jih lahko razbijemo na dva fragmenta. Zgornji del je Fab (frgment, ki veže antigen), spodnji del Fc pa je fragment, ki kristalizira. Z zgornjim delom, ki vsebuje variabilne dele se protitelo veže na antigen.



Slika 1.1: Shema protitelesa

Gre za filogenetsko mlajši organizem. Gre za t.i. klasični potek cepitve. Pri tem cepljenju so potrebna protitelesa. Ker so vključena protitelesa, ki so del imunosti sodi *klasični potek* na desno stran sheme (slika 4: Shematska razdelitev obrambe). Protitelesa se vežejo na bakterijsko opno. Protitelo deluje na na makromolekulo C_1 . Ta se aktivira in postane encim, ki cepi dve zaporedni beljakovini - C_2 in C_4 . Beljakovina se razcepi v dva dela - večjega in manjšega. Manjši fragmenti praviloma delujejo samostojno - tako, da močno spodbujajo vnete, označujemo jih s črko *a* (C_4a). Imajo kemotaktične lastnosti, privabljajo fagocitne celice in tako pospešujejo vnetje. Večji fragment

se označi z *b*. To pravilo o cepitvi ne velja za beljakovino C_2 , saj je večji fragment *a* in manjši *b*. Po razcepitvi C_4 in C_3 se potek nadaljuje. Formira se poseben droben kompleks C_4b_2a . Ta kompleks deluje kot encim in ga poimenujemo C_3 konvertaza, ker cepi osrednjo beljakovino sistema $\rightarrow C_3$. C_3a fragment zopet odplava in pospešuje vnetje. Ostane fragment C_3b , ki ima posebno nalogo; deluje kot **opsonin**². C_3b fragment se veže na bakterijsko celico na steno, tvori zelo močen kompleks in deluje kot začimba, da to bakterijo fagocit lažje požre. Opsonin deluje kot nekakšno prijemališče. Ko tako trdno zgrabi bakterijo jo lahko tudi požre.



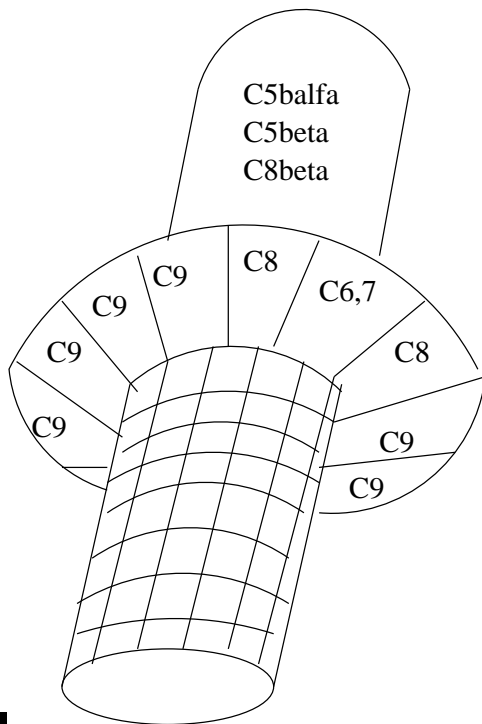
Slika 2: Opsonini na bakteriji

Opsoninov je več vrst. Sem spadajo protitelesa (Fab fragment protitelesa se prilepi na bakterijsko celico, Fc fragment štrli v okolje). Fagocit ima sprejemnik za Fc. Protitelo je odličen opsonin in pomaga pri fagocitozi.

Kompleks, ki nastane (C_{423b}) deluje na naslednjo pomembno beljakovino $\rightarrow C_5$. Encimski sestav je C_5 konvertaza. Beljakovina C_5 se razcepi v encimskem sistemu na C_{5a} , ki je pri pospeševanju vnetja pomemben droben peptid in C_{5b} , ki ima druge pomembnejše naloge. Začenja sestavljati t.i. *litični kompleks*. Poleg C_{5b} vsebuje ta kompleks še C_6 , C_7 , C_8 beljakovine. Naštete beljakovine skupaj že delujejo kot nekakšen sveder, ki lahko naredi luknjo v membrani celice (v fosfolipidni dvosloj) premer luknje je $\phi 10\text{nm}$. Skoznjo potujejo ioni in druge različne snovi. Podre se kemijsko, zlasti pa ozmotsko ravnotežje celice, ki zato propade. Luknja nastane, beljakovina C_9 luknjo krožno utrdijo. Celična membrana lahko sama zalije določene poškodbe. C_9 je zato, da luknja ostane.

Sveder \Rightarrow MAC kompleks = membrane attack complex

²gr. opson = začimba



slika 3: MAC kompleks

Komplementni sistem ne loči med bakterijo in celico lastnega organizma. Ob delovanju komple-mentnega sistema vedno nastajajo poškodbe v tkivu gostitelja. Po eni strani vnetje (C4a, C3a), na drugi strani dejanske poškodbe membran celic domačega organizma.

Vnetje:

To je vseobsegajoč, sila razvejan proces, ki nastane ob poškodbi tkiva, ter ob vdoru mikrobov v organizem. Vključuje tako elemente naravne obrambe, kot elemente imunosti. Navadno na začetku vnetje omejeno - lokalizirano, lahko pa se tudi razširi po potrebi. Poznamo:

a) hitro t.i. akutno vnetje:

To navadno s številnimi mehanizmi okvaro organizma popravi, premaga vsiljivce, ...

b) dolgotrajno ali kronično vnetje:

Naloga je ista, kot pri akutnem, le da skrbi z drugačnimi sredstvi za sanacijo problema. Nastane kot neuspela asnacija akutnega vnetja.

Definicija vnetja je znana že od antike. Znaki so znani še danes:

- * rubor = rdečina
- * calor = povišana T na mestu vnetja
- * dolor = bolečina
- * tumor = oteklina
- * functio laesa³ = ovirano delovanje tkiva/organa

³lat. laedo = poškodujem

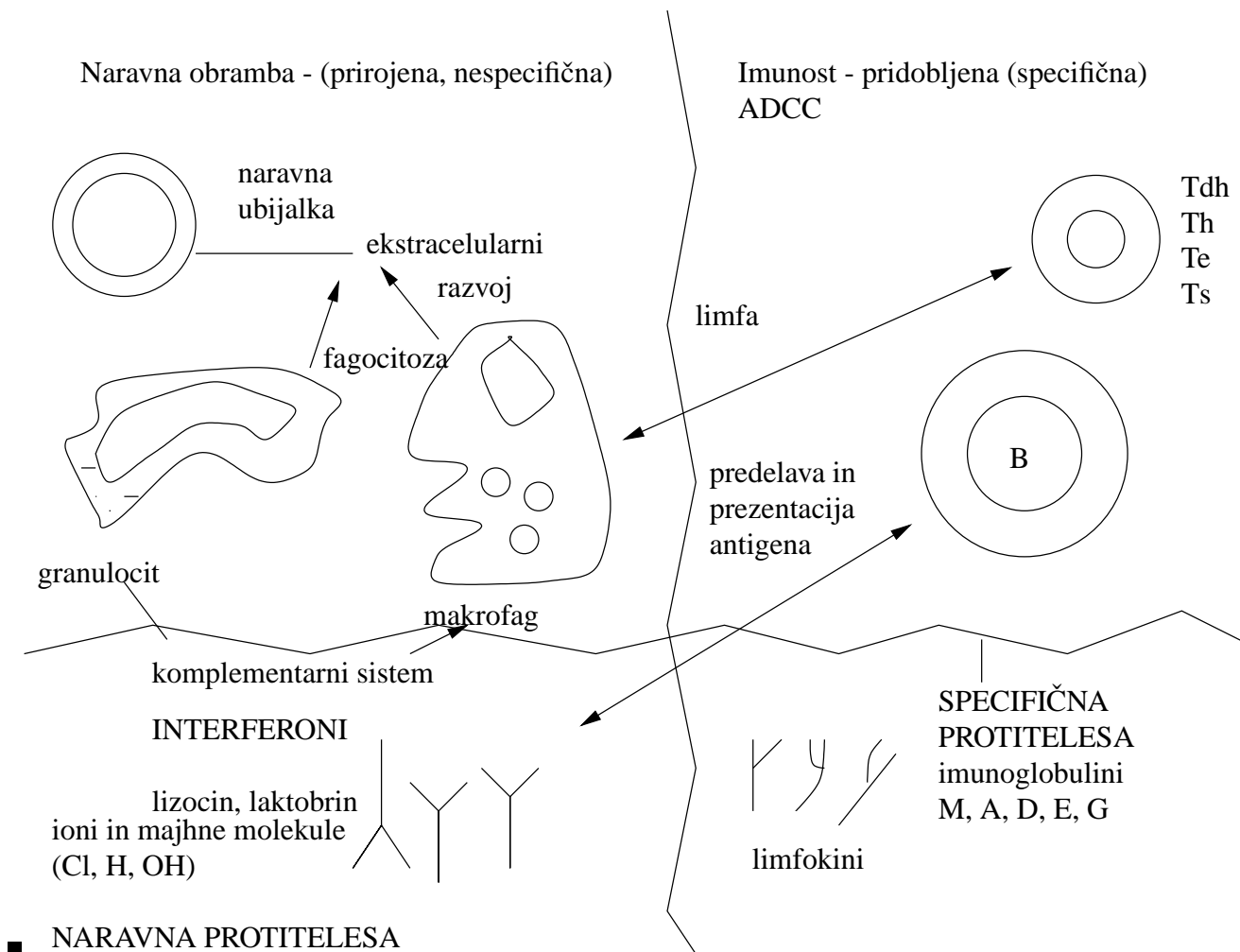
7.1 Naravna humoralna obramba

Kapilare se razširijo in poveča se dotok krvi, permeabilnost kapilar se poveča - kapilare postanejo prehodne za določene beljakovine, molekule, celice. Na mesto vnetja z veliko hitrostjo priplavajo zlasti neutrofilni granulociti in se lepijo na notranje stene razširjenih kapilar, ki nato preide skozi poro v kapilari v vneto okolico. Izloček fagocitov ob fagocitiranju mikrobov povzroča vnetje v okolnem tkivu, kasneje pa ga pospešujejo fragmenti beljakovin komplementnega sistema. Granulociti se degranulirajo in granule preidejo med tkivo. Med temi je tudi *histamin* - mediator - pospeševalec vnetja.

Nizek pH deluje protimikrobno. Pritisk kisika najprej naraste zaradi povečanega pretoka krvi, kasneje upade zaradi blokade področja s tumorjem, ki blokira pretok krvi. Vnetje je odličen zapleten, široko razvejan obrambni mehanizem, ki vsebuje elemente naravne obrambe in imunosti.

Obramba na ravn komplementarnega sistema je prastara, dosti starejša, kot mehanizmi imunosti. Obstajala je že milijardo let pred protitelesi. Poznamo t.i. *alternativni potek* => *neposredno cepitev beljakovin komplementarnega sistema*, kjer ni nobenih protiteles. Alternativni potek so odkrili kasneje kot klasični potek, je preprostejša varianta in dosti starejša in verjetno tudi življenjsko pomembnejša varianta. Pri alternativnem poteku ni uvodnih reakcij, začne se pri osrednji beljakovini C₃. Beljakovina C₃ se direktno cepi. Pri tem se sproža oz. cepljenje sprožajo deli same bakterijske celice, zlasti deli bakterijskih open. Bakterijska stena po Gram- neposredno cepi C₃.

Ena in druga pot cepljenja lahko konvergirata. Obe poti konvergirata na točki C₅.



Slika 4: Shematska razdelitev obrambe

Gre za stopničast sistem, ki se sproži, ko razpade kot domine - kaskadni sistem.

Leta 1957 so prvič ugotovili, da nekatere snovi zavirajo razmnoževanje virusov v okuženih celicah. Poimenovali so jih interferoni, kasneje so ugotovili, da gre za zelo majhne beljakovinske molekule, ki jih sproža virus v napadeni celici. Prodrejo v sosednje zdrave celice in jih zaščitijo pred virusno okužbo.

Poznamo interferone alfa, beta, gama.

Interferoni alfa nastajajo v limfocitih - belih krvničkah, beta pa v fibroblastih. Gama interferoni (posebna skupina), nastajajo v limfocitih T.

Poglavitne naloge interferonov:

- * delujejo protivirusno = antiviralno delovanje
- * antiproliferativno delovanje -> zavirajo rast nekaterih tumorjev (pri miškah blokirajo tumorje -> proti raku)
- * imunomodulatorno delovanje -> uravnavajo delovanje imunskega sistema (npr. spodbujajo makrofage, limfocite T in B, spodbujajo naravne ubijalke - gre za interferon gama)

7.1.1 Antivirusno delovanje

Interferoni sami virusom ne škodujejo, sproščajo = dereprimirajo sintezo najmanj dveh encimov in ta dva zavirata razmnoževanje virusov. Na dva načina se lahko sprosti sinteza interferonov:

- * ob napadu celice -> indukcija z virusom
- * v laboratoriju

Virus napade celico, se v njej razmnožuje, celica propade in nastajajo novi virusni partilki. Preden celica propade sintetizira interferon, ta prodre v sosednjo zdravo celico, vpliva na jedro snov, tako, da sproža sintezo dveh encimov - *protein kinaza* in *poliadenilat sintetaza*. Protein kinaza blokira translacijo pri sintezi virusnega proteina, poliadenilat sintetaza pa deluje ko je virusna mRNA gotova in jo razgradi. Interferoni ne delujejo specifično - ne delujejo na določen virus ampak na vse. Celica je potem zaščitena proti virusu, ki je sprožil sintezo in proti ostalim virusom. Interferon pa je vrstno specifičen -> človeški interferon zaščiti samo ljudi, kunčji samo kunce, ...

Zaenkrat interferoni še niso za praktično rabo. Znanstveniki so se premagali skozi 1 problem, ki je bil količina (interferonske molekule so majhne in se sintetizirajo v majhnih količinah) -> z gensko tehnologijo je bil ta problem rešen. Pojavi se nov problem = interferon so pravzaprav strupeni. Ko so poskusnim pacientom vbrizgali interferon, so se pri njih pojavila enaka klinična znamenja, kot pri virusnih obolenjih, npr. gripi: povišana tel. T, glavobol, bolečine v mišicah in sklepih. Brez večjega sklepanja lahko rečemo, da je pri gripi in podobnih boleznih za klinično sliko kriv interferon ne pa sami virusi -> hudi nepremostljivi stranski učinki.

Sklep: interferonsko zdravljenje pride v poštev pri nekaterih boleznih npr; norice, herpes, hepatitis B. Vendar so blagodejni učinki majhni, da bi upravičili tak način zdravljenja bolezni, vendar ima raziskovanje na tem področju prihodnost.

7.2 Naravna celična obramba

Sila učinkovit sistem, najbolj učinkovit sistem naravne obrambe je fagocitoza. Gre za filogenetsko prastar mehanizem. Fagocitne celice sodijo v prvo obrambno črto organizma. Takoj so tam, kjer jih organizem potrebuje npr. na mestu vdora mikrobov. Ločimo dve pglavitni vrsti fagocitnih celic:

- * *neutrofilni granulociti = makrofagi* (gre za polimorfonuklearne celice, ki nastajajo v kostnem mozgu - 10 mio/dan delujejo in živijo cca. 6h krožijo po krvnih in limfnih žilah, v kapilarah se prilepijo na endotel in po potrebi difundirajo, sicer odmro. Lastnosti; velika občutljivost za kemotaktične dejavnike (na daleč začutijo snovi, ki jih izločajo bakterije, snovi, ki se kopičijo ob poškodbi tkiva) in sila hitro prispejo na mesto vdora mikrobov in so zelo požrešni. Spravijo se tudi na trn ali trsko v koži. Po opravljeni nalogi hitro odmrejo. Odmrle neutrofilne granulocite vidimo kot gnoj na rani. Njihov razvoj je zaključen že, ko priplavajo iz kostnega mozga v krvni obtok.)
- * *mononuklearne celice*: monociti v krvi. Ti monociti se kasneje naselijo v različnih tkivih v organizmu in jih imenujemo makrofagi. Ko monociti odidejo v obliki promonocitov iz kostnega mozga se diferencirajo -> makrofag, ki se naseli v tkivih -> poimenujemo jih različno:
 - makrofagi v jetrih so Kupferjeve celice
 - alveolarni makrofagi v pljučih

7 Imunologija

- makrofagi v živčnem sistemu so mikroglia
- prosti makrofagi v krvi in bezgavkah
- peritonealni makrofagi v prebavilih
- osteoklasti v kosteh
- histociti v vezivnem tkivu

Osnovna razlika med njimi in neutrofilnimi granulociti: namesto vnetja oz. vdora mikrobov ne pridejo tako hitro, kot neutrofilni granulociti in niso tako požrešni, razen v primerih, ko jih vzpodbudijo določene snovi npr. interferon gama. Spodbujeni makrofagi požirajo zelo odločno in so zelo požrešni, zato obstaja zanje poimenovanje *jezni makrofagi*. Taka celice se spremeni tudi morfološko. Makrofagi so dolgo živeče celice, ima svojo energijo in skrbi za zalogo energije. Del fagocitiranih snovi porabijo zase, sicer je njihova poglavitna naloga, da počistijo bojno polje -> da požro ostanke mrtvih bakterij in drugih mikrobov, da požro ostanke uničenega tkiva gostitelja, da počistijo z odmrliimi neutrofilnimi granulociti. Pomembno nalogo imajo pri uničevanju tumorjev (lastnih tumorskih celic). So povezava med naravno obrambo in imunostjo.

Cca. 20% fagocitiranega Ag. na poseben način predelajo in predstavijo celicam T-limfocitom. Brez te predstavitve celice T-limfociti nebi prepoznali Ag.

7.2.1 Fagocitoza

Potek:

1. Adherenca (adhaereo = prilepljanje). Potreben je tesen stik.
2. Potem se membrana celice uviha
3. Začne se izliv toksičnih snovi v nastajajočo vakuolo, nastane vakuola imenovana fagosom
Primarna ali modra ali acidofilna granula, rumena specifična granula polna strupenih snovi, pomembne so drobne molekule kisikovih metabolitov, ki so strupene za bakterije. Mehurček počí, v vakuolo se sprostijo strupene snovi. Takšna vakuola je fagolizosom.
4. Nastane t.i. rezidualno telo
5. Nastopi končna faza defekacija.

7.2.1.1 Adherenca

Nastane na osnovi prepoznavanja. Fagocit mora nekako prepoznat bakterijo kot tujo. Ta prepoznavanje je slaba in nespecifična. Določeni glikoproteini fagocita prepoznavajo določene karbohidrate celične stene mikroba. Gre za t.i. prvotno prepoznavanje, ki ni natančno, ni specifično. Za razliko od specifičnega in natančnega prepoznavanja pri limfocitih; ta prepozna določen mikrob med 1000 drugimi. Zato je adherenca slaba -> pogosto se taka fagocitoza ne posreči. Pnevmonok -> kapsula; fagocit požira paličaste mikrobove, pnevmokoki s kapsulo plavajo in se ne zmenijo za fagocit. Fagocit inkapsulirane bakterije s panožicami enostavno ne more zgrabiti (izmuzne se kot nam milo). Zato so potrebne vezne molekule *opsonini*. Pomemben opsonin je protitelo. Take vrste fagocitoza se v vsakem primeru posreči. Poimenujemo jo *imunska fagocitoza* - ker kot glavni opsonin nastopajo protitelesa - ta so del imunskega sistema.

Fagociti, tako nevtrofilci, kot makrofagi, imajo posebne receptotje.

Dvojna opsomizacija: receptor tako za C3b, kot za protitelo -> sigurna fagocitoza.

Fagocitoza ima 5 faz:

1. kemotaksa
2. adherenca
3. endocitoza = mehanizem sprejemanja
4. liza = ubijanje, še prej pa lahko raztapljanje (če je potrebno)
5. defekacija

Encimi v granulah makrofagih: (granulev makrofagih so lizosomi)

- * fagocitin
- * katepsin
- * levkinin
- * fosfataze
- * amilaze
- * proteaze
- * lipaze
- * lizocinin ...

Encimi poškodujejo tudi organizem gostitelja.

Če se fagocitoza dogaja v anaerobnih razmerah (npr. v črevesju), se ta sistem ne posreči. Gre za anaerobno ubijanje (z encimi).

Makrofagi so most med naravno obrambo in imunostjo, saj snovi na poseben način predelajo in jo ponudijo na prepoznavo limfocitom T. Makrofag sodi med *antigen prezentirajoče celice*, brez katerih ni učinkovitega imunskega odgovora.

7.2.1.2 Mehanizmi za ubijanje mikrobov

Sem sta udeleženi predvsem dve vrsti celic:

- * eozinofilni granulociti (sicer so tudi fagocitne celice, vendar slabe) njihovo delovanje je usmerjeno proti višjim parazitom (trihinele,...). Eozinofilni granulociti se v teh primerih prilepijo na velike parazite in njihove larve s svojimi receptorji za protitelesa. Protitelesa obdajo parazite, Fc štrli v prostor in rabi za druge naloge, Fab pa se prilepi na parazita. Na ta način eozinofilni granulociti tesno obdajo veliko telo granulocita, nastopi degranulacija granulocitov (strupene snovi iz granul iztečejo iz celice in se nakopičijo na kutikuli napadenega parazita).
- * NK celice; niso ne T in ne B. Nimajo torej zunanjih markerjev. So torej primitivni limfociti. Njihov izvor in delovanje sta še nejasna. Ubijajo domače z virusom okužene celice in nekatere tumorske celice. Tudi naravne celice ubijalke imajo receptorje za FC. Z njihovo pomočjo pritegnejo bakterije, mehanizem ubijanja je podoben, kot pri eozinofilnih granulocitih. So namreč polne granul z različnimi encimi strupi, ..., ki jih izpraznijo ob zunanost ran, celičnih ovojnic, bakterij in na ta način uničijo bakterijo. Ta mehanizem ubijanja ima posebno ime - *Antibody Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity - ADCC*.

Granulociti:

Polimorfonuklearne celice, omejeni so na preobčutljivostne reakcije.

Mononuklearne celice:

Monociti so makrofagi.

Dendritične⁴ celice:

Gre za razvejane celice, ki sicer ne fagocitirajo, vendar s svojimi protoplazemskimi podaljški ulovijo/zajamejo antigen. Njihova naloga je, da ujeti antigen čimdlje zadržijo v organizmu. Na ta način stalno in za daljši čas spodbujajo imunski sistem k imunskemu odgovoru. Te celice spadajo med pomožne celice, ker pomagajo limfocitom. Limfocite imenujemo imunskokompetentne/imunskoizmožne celice. To so celice, ki skrbijo za usmerjenost imunskega odgovora in obenem za spomin.

Glede na zunanje markerje ločimo 2 vrsti limfocitov:

- * limfociti T (T-celice), ker se dokončno preoblikujejo v thymus-u
- * limfociti B (B-celice), ker se dokončno izoblikujejo v Bursi Fabricii (pri pticah)

Naloge:

Glavna naloga *celic B* je sinteza in izločanje obrambnih beljakovin t.i. protiteles. Ko zrele celice B srečajo Ag. jih ta spodbudi, da se preobrazijo v t.i. plazma celice/plazmatke.

Celice T ne izločajo protiteles, pač pa izločajo številne sila pomembne snovi, ki sodelujejo v obrambi mehanizma, ki uravnavajo imunski odgovor, ki prenašajo sporočila od celice na celico, spodbujajo ali zavirajo določene celice, ki ukazujejo kdaj je treba ostati na mestu in kdaj iti na pot, ... Te snovi z zelo širokim poimenovanjem poimenujemo **citokini** = *interlevkini* + *zaporedna št.*

Zadnja leta poskušajo na tem področju ustvariti čimveč reda in tako se vedno bolj uporablja izraz *interlevkin* + *zaporedna številka*. Citokinin je snov, ki jo izločajo celice, interlevkin je snov, ki kroži med levkociti, ter z njimi sodeluje. (npr. Celica T izloča interlevkin 4 in 5 in oba pospešujeta rast in iniciacijo celic B). Za nas so od T celic pomembne:

- * **T4/celice T pomagalk** (4 = antigenska oznaka te skupine) pomagajo celicam B, makrofagom,... So center imunskega sistema. Antigeni označeni s 4 t.i. CD4 markerji so receptorji za virus HIV. Aids izbruhne na določeni stopnji, ko je helperjev premalo in ne obvladujejo več situacije in ko organizem začno napadati mikrobi sicer banalne mikroflore, ki zdravemu človeku ne morejo škodovati, pred tem so ljudje le HIV+, ne pa bolani.
- * **T8 celice** Antigeni so označeni z CD8 antigenom. To so t.i. citotoksične celice T/T celice ubijalke.

Manj pomembne pa:

- * **T celica kasne preobčutljivosti/Tdth** (delayed time of hypersensitivity) Marker je CD4.
- * **T celice zaviralke/Ts celice** (T suppressor cells). Marker je CD8. Zavirajo preveč buren imunski odgovor.

⁴gr. dendron = drevo

7.2.2 Imunska ali limfatična tkiva/Imunski ali limfatični organi

O imunskem tkivu govorimo, ko gre za neorganizirane skupke celic, o organu govorimo, ko ima specifične organe.

V primarnih limfatičnih organih se dokončno preoblikujejo limfociti B/T. Ti organi so:

- * thymus
- * črevesni epitel (celice T)
- * RKM (celice B)

Nezreli limfociti T se obdajo s posebno vrsto celic - velike celice s posebnimi lastnostmi, ki jih imenujemo celice pestunje/nurse cells. Te pestujejo negujejo mlade T-celice, spodbujajo le tiste celice, ki kažejo določene lastnosti - kažejo, da bodo odločno prepoznavale Ag. Šibke in neizrazite predhodnice T celic pa zanemarjajo - **pozitivna selekcija**. Hkrati se v thymus-u dogaja **negativna selekcija**, kjer se označijo predhodniki limfocitov, ki bi se utegnili obrniti proti antigenom lastnega organizma. Ti defektni limfociti se uničijo - **apoptoza/apoptosis**. Podobno se dogaja tudi v kostnem mozgu. Do te faze celice T/B še niso prišle v stik z zunanjimi Ag. to so t.i. virgin cells/deviške celice. Ko je opravljena v organih selekcija jih cca. 5% zapusti primarne limfatične organe in odpotuje v sekundarne limfatične organe. Ti so predvsem mesta za filtracijo, tu se zadrži antigen. V sekundarnih limfatičnih organih celice T in B pridejo v stik z antigenom. Antigen jih spodbudi k nadaljnemu razvoju. Med sekundarne limfatične organe spadajo: *bezgavke, vranica (bela pulpa), jetra, tonsillae, appendix*.

Celice se tu diferencirajo:

- * celična imunost T
- * humoralna imunost B

Limfociti nato potujejo v sekundarne limfatične organe. Pridejo v stik z Ag. Poteče dodatna diferenciacija in razvoj limfocitov, **celična imunost**, za katero so osnova celice T in **humoralna imunost**, kateri so osnova celice B.

Limfatični organi pri ptičih:

- * thymus
- * B. fabricii
- * kostni mozeg

7.2.2.1 Bezgavke

Bezgavke so razporejene po celotnem telesu in so tako blizu vdorov antigenov, razporejene so na strateških mestih v telesu. V bezgavki ločimo:

- * *kapsulo*
- * *skorjo ali cortex* (tu so tudi primarni folikli)
- * *parakorteks* (tu so predvsem celice T)

(med obema so še makrofagi in dendritične celice, pri infekciji v primarnih foliklih nastanejo germinalni centri in nato iz primarnih nastanejo sekundarni folikli)

- * sredica

7.2.2.2 Razdelitev obrambnih mehanizmov

1. RAZPOZNAVNI SISTEM; obramba je razporejena tako, da loči lastno od tujega. V ta namen so se razvili posebni receptorji (za opsonine, FC del protitelesa, za opsonin C3b, ...). Ta sistem deluje nenatančno nedoločno prepoznavanje in ločevanje tujega (non self) in lastnega (self) pri fagocitozi. Nezgredljivo natančno prepoznavanje določenega mikroba, določene kemijske strukture med tisoči drugih specifičnosti.
2. OSREDNJI SKLOP MEHANIZMOV; sem spadajo sistemi za ubijanje in odstranjevanje. Usmerjen je predvsem proti bakterijam, glivam, tudi virusom. Na drugi strani je zunajcelično ubijanje - naravne ubijalke, ubijalske lastnosti celic T. Fagocitoza je tako namenjena organizmu lastnim organizmom, zunanja pa za tuje organizme.
3. SISTEMI RAZVEZE; večina obrambnih celic deluje pod vplivom snovi iz drugih celic. Te snovi obrambnim celicam dajo informacijo, kdaj naj se delijo in kdaj ne, kdaj naj se premaknejo na drugo mesto, kako naj se preoblikujejo in kaj izločajo. Imunski sistem je izjemno povezan, podobno kot hormonski. Povezujejo ga snovi po imenu citokini. TNF citokin (tumor necrosis factor), ta uničuje določene tumorske celice pri miškah. Počasi se uveljavlja poimenovanje interleukini - snov, ki deluje med levkociti označimo ga z oznako Il-X (kjer je X zaporedna številka).

7.3 Mehanizmi humoralne imunosti

7.3.1 Antigeni

Ag je vsaka snov, ki v organizmu vzpodbudi imunski odgovor. To je vzpodbuda imunskega odgovora, ki je lahko močan ali šibak. Tako lahko potem ločimo močne in šibke Ag.

Poglavitne lastnosti dobrega Ag so:

- * velika molekularna masa
- * čim večja kemijska zapletenost
- * tujost (foreignness)

Ad. 1.)

Lahke molekule delimo pod 1000 daltonov molekularne mase in te niso imunogene. Molekule z molekulsko maso 2-6000 sprožijo odgovor ali pa tudi ne, pri molekulski masi 10000 se začnajo t.i. dobri Ag.

Pojem **imunogenost** je lastnost spodbuditi imunski odgovor. Snovi, ki tak odgovor vzpodbudijo so **imunogeni**.

Pri antigenosti nimajo vsi antigeni lastnosti vzpodbuditi imunski odziv. Pri tem jih omejuje molekulska masa.

Hapten je drobna Ag. molekula, ki sama ni sposobna spodbuditi imunskega odgovora, lahko pa ga vzpodbudi z večjo molekulo t.i. **nosilec**. Produkti tega imunskega odgovora so usmerjeni v hapten. Hapten se nato veže na produkt imunskega odgovora, ki ga je sprožil z vezavo na nosilec. Nosilec dodajamo, važno je, da drobno molekulo vežejo in da cel kompleks vbrizgamo kot vakcino in dobimo imunski odgovor.

Imunogenost; spodbujanje imunskega odgovora, vsi antigeni pa niso imunogeni (hapten ni). Vsi pa imajo lastnost, da se vežejo s produkti imunskega odgovora, ki so ga povzročili z vezavo na nosilec.

Adjuvansi so kemijske snovi, ki pomagajo pri spodbujanju imunskega odgovora v vakcinalni mikrobiologiji.

Ad. 2.)

Čim bolj je neka snov kemijsko zapletena, tem boljši antigen je. Celotna molekula nikakor ni imunogena. Imunski odgovor spodbuja le droben delec te velike strukture. Gre za zaporedje 4-6 Ag. Ta del imenujemo *antigenska determinanta ali epitop*. Velika beljakovinska molekula ima številne epitope in imunski odziv organizma se obrne proti vsem tem epitopom. Kakovost imunskega odgovora je torej heterogena. Ag. mora imeti torej vsaj 2 Ag. *determinanti* za zadosten odgovor. Najboljši Ag. so beljakovine. Dobri Ag. so tudi nekateri polisaharidi, glikoproteini, glikolipid, tudi nukleinske kisline, ter tudi številne druge snovi.

Ad. 3.)

Tujost - imunski sistem se med ontogenetskim razvojem nauči razlikovati med self in non self snovmi. Ko se limfociti v primarnih limfatičnih organih dokončno preoblikujejo organizem ubije vse tiste celice, ki bi se lahko obrnile proti lastnemu organizmu - apoptoza oz. programirana celična smrt. Ostanejo le limfociti usmerjeni proti tujim Ag. Če imamo kunčji krvni serum in ga vbrizgamo kuncu, ga kunčji organizem ne prepozna kot organizmu tujo snov. Če pa ga vbrizgamo v budro je to za budro tujo snov in odgovori nanj z imunskim odgovorom. Snov je toliko bolj tuja kolikor dlje je določeni orgnizem oddaljen od našega na filogenetski lestvici.

7.3.1.1 Teorija prepovedanih klonov⁵:

Klon je skupina povsem enakih celic, ki izvirjo iz iste materinske celice.

Najprej se limfociti srečajo z lastnimi antigeni, in nekateri se z svojem organizmu lastnimi Ag. tudi vežejo. Potemtakem so nevarni snovem lastnega orgnizma. Ti nezreli limfociti z receptorji za domače gene nato programirano umrejo. Ostanejo le limfociti, ki nosijo receptorje usmerjene v tuje gene. Vse t.i. prepovedane klone organizem uniči.

7.3.2 Protitelesa

Sem sodijo gama globulini ali imunoglobulini - Ig. Sestavljeni so iz dveh težkih in dveh lahkih verigi. Osnovna struktura je oblika črke Y. To je monomerna struktura. Posamezne monomerne strukture se pri različnih protitelesih povezujejo v različne kombinacije, predvsem v dimere in pentamere. Tako pri lahkih, kot pri težkih verigah ločimo dva dela:

- * stalni ali konstantni del, ki se ne spreminja označen z C, sem spada konstantni del težkih in lahkih verig
- * spremenljivi ali variabilni deli, sem spada varabilni del lahke in težke verige. Ti so odvisni od antigena.

Verige so med seboj in znotraj sebe povezane s t.i. S mostovi - disulfidnimi mostovi. Če na protitelesa delujemo s proteolitičnimi encimi jih ti razbijejo. Saj so protitelesa beljakovine. Če cepimo osnovno strukturo protitelesa s papainom dobimo dva fragmenta: Fab - ta veže antigen, Fc - ima druge naloge. Posebno mesto pri vilicah, ki je gibljivo in se imenuje *hinge region*. Na Fc fragmentu imamo t.i. C

⁵gr. klon = vejica, popek

7 Imunologija

terminal. Na Fab fragmentu pa imamo N terminal. Težko verigo označujemo z *H* - *heavy* in lahko verigo z *L* - *light*. Pri protitelesih sodelujejo 4 vrste genov:

Glede na tip težke verige ločimo tip; gamma, mi, alfa, eta, sigma, ločimo 5 razredov protiteles in sicer IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Zaporedje je glede na pomen in na količino. Imamo pa samo dva tipa lahkih verig: tip kappa in tip lambda.

7.3.2.1 Teorije o nastanku protiteles

1. **Teorija stranskih verig:** Limfociti = imunsko kompetentne celice = imajo na površini na tisoče receptorjev. Ti receptorji imajo raznoliko kemijsko zgradbo. Ko v organizem vdre Ag, katerega kemijska zgradba je komplementarna zgradbi enega od receptorjev, pride do vezave. Ko nastane povezan kompleks se limfocit poškoduje. Posledica te poškodbe je izločanje protiteles iste specifičnosti, kot je bil receptor s katerim se je povezal Ag. Vendar pa je nemogoče, da bi bili na tako majhni celici limfocita vsi receptorji za vse Ag, ki so okrog nas.
2. **Instrukcijska teorija:** Ko Ag prodre v organizem se sreča z limfociti. V stiku z njegovim genomom, spodbudi izločanje specifičnih protiteles. Vendar to bi pomenilo tvorbe protiteles še ob vdoru v limfocit - prepozno.
3. **Klonska - selekcijska teorija:** Imunski sistem obsega ogromno število klonov limfocitov. Posamezni kloni nosijo specifične receptorje. Ko vdre v organizem Ag, spodbudi zgolj tiste limfocite, ki nosijo zanj komplementarne receptorje. Vsi drugi limfociti ne reagirajo. Ko pride do povezave antigenske determinante - *epitopa* s komplementi receptorjev spodbudi nadaljni razvoj limfocita. Gre za ekspanzijo klona = enormna namnožitev in preoblikovanje (celic B). Po preobrazbi in po klonski ekspanziji celic z ustreznim receptorjem, se začno izločati specifična protitelesa. Limfociti B gredo v plazmatke, te izločajo protitelesa. Del na receptorju in del na Fab je *paratop*, komplementaren epitopu. Torej v organizem vdre Ag A najde receptor (npr. klon št. 10), pride do ekspanzije celic klona 10 - plazmatke in nastanek specifičnih efektorskih celic T.

7.3.2.2 Razdelitev protiteles

1) IgG:

V telesu jih je največ. So monomerne oblike, majhne molekule. Ker so zelo majhni so primerni za natančne naloge = nevtralizacijska protitelesa - onemogočajo, nevtralizirajo delovanje strupov. Nevtralizirani toksini ne poškodujejo celic. IgG so odlični opsonini. Makrofagi imajo receptorje za Fc, ki ujame Fc fragment na fagocitu = aderenza in t.i. imunska fagocitoza, ki nikoli ne odpove. Pri ljudeh IgG pomenijo znotrajmaternično zaščito plodu. Pasirajo skozi placento in prodre v novorojenca.

2) IgM:

Makroglobulini. So velike molekule, sestavljene iz 5 monomernih molekul povezanih z S vezmi. Imajo veliko število prijemališč za antigen (do 10). Značilnosti: IgM se izločajo prvi = primarni protitelesni odgovor. So odlična litična telesa, spodbujajo cepljenje beljakovin. Komplementarnega sistema C1 = luknje v steni celic. V naravi je taka situacija zelo redka. IgM so pentamere, zato tako lizo omogočajo. Uporabljamo jih v laboratoriju za aglutinacijo.

3) IgA:

Lahko so v monomerni obliki, pogosteje pa so v obliki dimera. Vmes je J veriga, ki povezuje obe molekuli. Pomembna je tudi **sekretorna veriga** - dobijo jo v epitelni celici. Delujejo na sluznicah, prebijajo se skozi sluznični epitelij in ostanejo v sluzi.

Naloga: preprečevanje adhezije, so torej prva zaščita sluznic. Pomembni so v prebavilih = centri za IgA sisteme so v limfatičnem tkivu črevesja. Tu so plazmatke proti Ag, ki jih pojemo. IgA se izločajo tudi v cholostrumu.

4) IgE:

Varujejo pred črevesnimi zajedalci. Udeležena so tudi pri alergijah. Pri teh reakcijah sodelujejo IgE. Potek za **Anafilaktično reakcijo**:

V organizem vdre Ag, imunski sistem občutljive osebe izloča preveč IgE (pri zdravih sami v sledovih). Ag. prepoznajo receptorji na limfocitih => kloni => plazmatka => IgE oz. **senzibilizirajoča protitelesa**. IgE se z Fc fragmentom vežejo na domače celice, Fab fragment pa štrli v prostor => nima še posledic. Če ni več Ag. se protitelesa počasi odplavijo. Če kmalu za prvim vdorom sledi še drugi vdor istega Ag se Fab fragment nanj veže. Nastanejo **imunski kompleksi**, ki poškodujejo granulocit. V tkivo stečejo strupi iz zrnč granulocita. To so vazoaktivni amini = histamini...

Posledica: krčenje gladkega mišičja, delovanje na endotelij in majhne žile = solzenje, kašljanje, dušenje, ...

Celica B se aktivira tudi, če se paratop in epitop ne skladata povsem. Posledica tega je manjša afiniteta protiteles. Specifičnost torej mora biti, vendar ne vedno popolna. Receptor na celici B je protitelo in to navadno iz razreda D in M. Gre za enako zgradbo in za isto specifičnost. Paratopi na receptorjih so enaki paratopom protiteles, ki jih preobrazena celica B začne izločati po določenem času. Govorimo o površinskih protitelesih ali **sIg**. Ta protitelesa z Fab fragmentom štrlijo v prostor in prestrezajo Ag. Fc so vsidrana v membrano limfocita. Celice B prepoznajo antigen v nespremenjenem, naravnem stanju.

7.3.2.3 Klonalni razvoj plazmatk

Ko pride B v stik z Ag se začne drugi del razvoja limfocita.

1. del: pozitivna in negativna selekcija. So so na koncu zrele a še ne uporabljene. Ko pride Ag se začne drugi del.

2. del: nenaden izbruh razmnoževanje ob enem pa tudi preoblikovanje iz celice B v plazmatko.

Prva delitev celice B je 10 ur po kontaktu z Ag. Celice se močno razmnožijo že v 5 dneh. Jedro se v celici začne krčiti, drugi dan več ribosomov, tretji dan povečanje GER in prva posamezna protitelesa. Četrty dan je jedro skrčeno GER-a je veliko (za celice, ki sintetizirajo beljakovine). Peti dan celica že izloča ogromno protiteles = nastala je zrela plazmatka.

Za imunski odgovor je potreben tudi spomin.

LATENTNA FAZA: od 5-14 dni. Na zunaj se v organizmu ne opazi nič.

FAZA NARAŠČANJA: 4-90 dni. Tvorba ogromnega št. protiteles.

FAZA UPADANJA: več mesecev, let.

Celica B pride v stik z Ag, začne se razmnoževanje klona, ki teče dvotirno. Po eni strani gredo do celic plazmatk, ki izločajo protitelesa. Po drugi strani pa razvoj ne gre do konca ampak se ustavi na stopnji spominskih celic. (celice B naj nebi dobile dovolj spodbude, da bi nastale plazmatke). V organizmu ostanejo še leta za tem.

7 Imunologija

Če v organizmu vdre enak Ag govorimo o sekundarnem protitelesnem odgovoru. Ag naleti na spominske celice primarnega odgovora in te reagirajo takoj, ni več latentne faze. Odgovor je tudi do 100x močnejši, kot primarni. Na tem bazira vakcinacija. S poživilnimi odmerki (BOOSTER DOZA) mi enormno povečamo moč in učinkovitost vaccine. Če pride v telo nek drug Ag., gre zopet vse od začetka.

Pomembne molekule pri primarnem odzivu: IgM

Pomembne molekule pri sekundarnem odzivu: IgG

Vakcinacija: umetna spodbuda organizma k obrambi. Gre za aktivno imunost, organizem sam izgradi obrambo, sam sintetizira protitelesa.

Imunost je lahko pridobljena tudi pasivno, to je takrat, ko dobimo že narejena protitelesa naravnost v žilo = serumizacija npr; cepljenje proti tetanusu ob poškodbah ima tako vpliv vakcinacije in serumizacije = zaščita takoj, protitelesa nato izginejo pride vpliv vakcinacije.

Serumizacija je pasivna imunost. Pasivno imunost potrebujejo tudi dojenčki, ker še nimajo izgrajenega imunskega sistema. Zato v prvih dneh potrebujejo protitelesno zaščito, ki jo dobijo od matere.

Potek: mati ima v zalogi različna protitelesa. Poporodna zaščita je pri ljudeh in živalih precej različna. Placenta je pri ljudeh prehodna, IgG matere prehajajo skozi placento in zaščitijo novorojenčka. Osnovna zaščita pri ljudeh in kuncih je torej **diaplacentarna**. Ko dojenček pije mleko pri nekaterih vrstah s cholostrumom popije še IgA, IgG in IgM. Ta protitelesa so za lokalno zaščito, se ne resorbirajo.

- * podgane, miši, psi imajo mešano zaščito. Nekaj je diaplacentarne nekaj IgG se tudi resorbira. Resorpcija je zmerna in selektivna samo IgG.
- * prežvekovalci in konji imajo epitelohorialno placento, zato imunost ne gre skozi. Pri konju in prašiču se resorbira močno skupina IgG manj IgM, nič pa IgA. Pri prežvekovalcih pa se vsa imunost prenese z mlekom v prvih 24 urah. Resorpcija je neselektivna. Gredo vsa protitelesa. Nosilci humoralne imunosti so limfociti B.

7.3.3 Celična imunost

7.3.3.1 Limfociti T

Limfociti T ne izločajo protiteles ampak številne snovi - LIMFOKINE, ki uravnavajo imunski odgovor. Osrednja celica sistema je celica T-pomagalka. Njena Ag. formula je CD4.

Najpomembnejša naloga: prepoznavanje Ag, da se ob tem senzibilizira, da izloča snovi, pri katerih so pomembne tiste s katerimi pomaga celicam B, da se namnožijo in preobrazijo, ter izločajo protitelesa. Poleg te naloge ima še številne druge.

7.3.3.2 T-citotoksične celice (TC)

To so celice T-ubijalke. Imajo Ag. formulo CD8. Pozitivna in negativna selekcija celic T se dogaja v thymus-u. Približno 5% zrelih celic gre vsak dan iz thymus-a, ostalih 95% ni v rabi in počasi odmrejo. Receptorji na celicah T so različni in specifični. Sledi razvoj in razmnoževanje reaktivnih celic T podobno kot pri B. Za visoko razvite sesalske organizme niso dovolj samo obrambni sistemi. Neki mikrobi, zlasti tisti, ki se skrijejo v celico, pridejo mimo protiteles (npr. Bacil TBC, virusi). Za take primere se je izoblikovala celična imunost, katere nosilec so Tc.

Naloga: ubijanje tarčnih celic, ki so treh vrst:

1. Z virusi okužene celice; virusi po namnožitvi v celici prodirjo skozi membrano celice gostiteljice - brstenje. Pri drugih vrstah en del virusnih Ag nabira na domačih celicah in tako celico ubije. Virusu odvzame možnost razmnoževanja.
2. Tumorsko spremenjene domače celice. Če kje kaj "škripne" pride do raka
3. Celice presadka - transplantata. Npr: presajanje organov. Celice lahko zavrnejo presadek.

Potek: obe celici se tesno stakneta za najmanj 2 min. V tem času se granule koncentrirajo ob steni, ki je pritisnjena ob tarčno celico. Sledi smrtni udarec - degranulacija. Nastanek odprtine v tarčni celici, ki povzroči ozmotsko neravnovesje in pride do lize tarčne celice. Citotoksična celica ostane povsem nepoškodovana.

Primer: Pnevmonok. Makrofag fagocitira paličaste bakterije. Pnevmonokom ne more nič, ker ni adherence.

Pnevmonoki pridejo v stik s celicami B. Kapsula vsebuje snovi, ki se zelo dobri antigeni s številnimi epitopi. Najde se ustrezen klon celic B - klon, ki ima receptorje komplementarne z antigensko determinanto na kapsuli. Fab fragment veže Ag, Fc je vsidran v membrani limfocita.

Celice klona se začno množiti, celice B gredo v plazmatke. Po 7 dneh se začno izločati protitelesa - enake specifičnosti kot Ag na celici B. Protitelesa se lepijo na kapsulo pnevmokokov - sproži se klasični potek aktivacije komplementarnega sistema. C_1 se aktivira in cepi C_2 in C_4 , da nastane *Streptococcus pneumoniae*.

Kapsula je dejavnik patogenosti (adherenca ni učinkovita in se ne posreči) => pnevmokoki se izognejo fagocitozi. Pridejo v stik z imunskim sistemom => limfociti B. Kapsula vsebuje snovi, ki so zelo dobri Ag s številnimi epitopi. Najde se ustrezen klon celic B, ki nosi receptorje, komplementarne z Ag determinanto na kapsuli. Receptorji prepoznajo Ag determinante na kapsuli. Zgradba receptorjev na limfocitih B je enaka zgradbi protiteles - Y oblika - Fc fragment je vsidran v membrano limfocita, Fab fragment veže Ag. Celice klona se hitro razmnožujejo, preoblikujejo se v plazmatke. Pri pnevmokokih traja ta faza 7 dni. Po tem času se protitelesa zlepljajo na kapsulo pnevmokoka - v parih (drug λ poleg λ) => sproži se klasični način aktivacije *komplementnega sistema* -> aktivacija C_1 -> C_2 , C_4 => *skupek, encim C_2B_4a* => *cepi osrednjo beljakovino sistema C_3* na dva dela, zelo pomemben je C_3B fragment, ki deluje kot opsonin => protitelesa in opsonini na pnevmokoku. Fagocit ima receptorje za Fc fragmente Y in tudi za C_3B opsonine. Povezava - adherenca je sedaj zelo močna => fagocitoza se lahko začne. Fagociti takoj požro vse pnevmokoke in bolezensko stanje se dobesedno čez noč popravi (vendar šele po 7 dneh).

Podobno je pri rdečici $T = 41^\circ C$, žival težko diha, ima značilen izpuščaj po trebuhu - rdeči ali brezbarvni - vsi pa so trapezoidaste oblike velikosti nohta. Aplicira se antibiotik in serum proti rdečici z že narejenimi protitelesi - pasivna imunizacija živali -> čez noč se živali pozdravijo.

Pri celicah B je prepoznavanje Ag enostavno -> molekula Ag je enaka kot molekula protitelesa => iste specifičnosti (epitop je komplementaren paratopu). Govorimo o t.i. sIg o površinskih Ig, ki Ag prepoznavajo v nespremenjenem, naravnem stanju (čvrste, trdne ali tekoče Ag).

Drugače pa je pri celicah T. Te ne prepoznavajo t.i. naravnih Ag. Zelo pomembni so pri tem fagociti => povezava med naravno in imunsko obrambo 20% Ag, ki ga požre makrofag, se na poseben način predela (v glavnem denaturacija beljakovin). Ta predelan Ag odrine na svojo membrano in ga ponudi v prepoznavo celicam T -> prezentacija Ag. To še ne zadostuje. Predelan Ag makrofag ponudi v prepoznavo s posebnimi beljakovinskimi molekulami, ki jih imenujemo *molekule tkivne skladnosti oz. histokompatibilnosti*.

Glede na histokompatibilnost ločimo dve glavni skupini Ag. v organizmu:

7 Imunologija

- * *tkivni Ag*, ki so vrstno specifični. Npr. pri kuncu, človeku => tkivni Ag. jeter, ledvice. So pri vseh posameznikih iste vrste enaki.
- * *histokompatibilnostni Ag oz. Ag tkivne skladnosti*, ki so pri vsakem osebk drugačni. Zagotavljajo ogromno raznolikost med osebki iste vrste. Pri vsakem so drugačni. Po njih ločimo osebek od osebka => zagotavljajo individualnost vsakega osebka. Molekule teh Ag so dveh vrst:

1. MHC I

2. MHC II

Lokuse, ki jih kodirajo imenujemo **poglavitni histokompatibilnostni kompleks - MHC oz. PHC**.

Makrofag spada med Ag prezentirajoče molekule (APC). Obenem s predelavo Ag teče sinteza molekul MHC. Makrofag poveže predelan Ag in MHC molekulo. Na membrani ponudi ta kompleks v prepoznavo T-celici pomagalki. Ta ima posebej prirejen receptor za Ag (predelan skupaj v kombinaciji z MHC II molekulami). Receptor je iz verige $\alpha\text{In}\beta$, ter sladkorja (mora prepoznati Ag-MHC II kompleks). T-helper celica ne prepozna Ag v naravnem stanju! -> vedeti mora, da ji predelan Ag ponuja domač makrofag (MHC!) => DVOJNO PREPOZNAVANJE je značilnost celic T (poleg Ag še molekulo lastnega MHC kompleksa).

Molekule MHC II nosijo v glavnem same celice, ki predeljujejo in prezentirajo Ag => APC (glavna celica je makrofag). Vse druge celice organizma pa nosijo molekulo MHC I. Te pa prepoznava T-citotoksične celice => T-ubijalke (CD8). Ubijajo celico tarčo (z virusom okuženo, rakavi ali celico presadka). Primer: z virusom okužena celica => virusni AG + MHC I, T-killer celica ima zapleten receptor za omenjeno kombinacijo -> DVOJNO PREPOZNAVANJE na podoben a ne povsem enak način kot prej.

POVZETEK:

1. Fagocitoza: (prva obrambna črta organizma => naravna obramba) - fagocitov je v krvi in tkivu ogromno. Brez fagocitoze v nekaj dneh umremo. Ni pa vseobsegajoča in popolna, pogosto patogeni mikrobi pobegnejo - potrebni so dodatni mehanizmi = *imunost* - lastnost višje razvitih organizmov.
2. Ag, ki pobegne se sreča s celicami B => naravni Ag so prepoznani z receptorji za Ag -> v smislu klonske selekcijske teorije. Ag. fagocitirajo APC = npr. makrofagi => pojavijo se na površini celice z MHC. Celica T-helper (CD4) ima za kompleks prirejen receptor. T celica zahteva pri tem še sila učinkovit limfokin => **interlevkin 1** (nudi ga makrofag). T celica pomagavka postane s prepoznavo osrednja celica sistema -> izloča **interlevkin 2** (IL-2). Ta deluje nazaj na celico, ki ga izloča in jo spodbuja, da deluje še na številne druge celice v okolici, povzroči buren razvoj T-helper celic. Osrednja celica sistema izloča številne interlevkine 3, 4, 5, 6 => pomembni za razvoj limfocitov B (zato pomagalka):

* B - cell growth factor (IL 4)

* B - cell differentiation factor (IL 5)

Ti celicam B pomagajo, da se začne razmnoževati (ekspanzija klona) in preobrazati v plazmatko. Te po določenem času izločajo specifična protitelesa iste specifičnosti, kot so receptorji za Ag na celici B. Protitelesa se prilepljajo na Ag - kot oznaka za ubitje. Nastane pa tudi velika količina spominskih celic.

7.3 Mehanizmi humoralne imunosti

Ob prepoznavi vdora => hitrejši odziv.

Aktivirana T-helper celica se tudi razmnožuje in diferencira. Z IL-2 celice pomagalko delujejo na citotoksične T celice (CD8 celice) in jih spodbujajo. Ta prepozna Ag na domači (MHC I) npr. z virusom okuženi celici. Prepozna, deluje -> ubije celice tarče. V rezervi ostane tudi velika količina spominskih T-citotoksičnih celic => obramba organizma.

7 *Imunologija*

Literatura

[1] Predavanja Jože Jurca - Mikrobiologija, Veterinarska fakulteta Univerza v Ljubljani, 1999/2000

[2] Skripta: Jože Jurca; Splošna mikrobiologija