

Forelæsningen gennemgår bakteriernes biologi og inddeling.

Læseforslag: Schaechter kap. 3, 4, 8, 10

Kap 3 Biology of Infectious Agents

Viden om bakteriernes anatomi og metabolisme kan være en hjælp til at udvikle kraftige antibiotika. Bakterierne tilhører de lavere protister (prokaryotiske), mens svampe, protozoer og orme tilhører de højere protister (eukaryotiske). Prokaryotiske gruppe mangler kerne og andre membranbundne organeller. Deres kernemateriale ligger frit i cellens cytoplasma. De er haploid med single kromosom og ekstrakromosomal plasmider. De er også anderledes, når det gælder deres ribosomer og lipider. Deres ribosomer er mindre end eukaryoternes.

Pga. manglende kernemembran syntetiserer prokaryoterne hele tiden proteinsyntesen og messenger RNA molekyler. Man kan sige med andre ord, at translation er koblet til transskriptionen, derfor dannes der hele tiden nye messenger RNA-kæder.

I eukaryoterne er processen ikke koblet. Her dannes først nuclear RNA i kernen før den transporteres gennem kernemembranen til ribosomerne i cytoplasmaet, hvor protein syntesen finder sted.

Mikroorganismer møder hele tiden kemiske eller fysiske agenter, der truer deres eksistens. Derfor har de med tiden udviklet resistens mod mange ting.

De formerer sig hurtigt, og nogle op til hver 20 minut under optimale omstændigheder. De har en større overflade, jo mindre de er, og deres metaboliske rate er meget højere end eukaryoterne. De omdanner hurtigt ernæringen til energi og struktur og makromolekyler syntese er med at give forståelse af hvordan de maksimerer deres chance til overlevelse samt hvordan vi kan hæmme deres vækst.

Bakterierne er mellem 0,1 um og 10 um store. Bakterier er omgivet af et cytoplasmatiske membran, der afviger fra ene bakterie til den anden. Overfladens komponenter er afgørende for om de kan overleve i organismen og forårsage sygdommen. Nogle bakterier har også undepå cytoplasmatiske membran en cellevæg og yderligere en ydre membran, flagella, pili og en kapsel. De ydre komponenter udgør ca. 20 % af bakteriens vægt. Disse ekstra komponenter giver mening, når man tænker på hvad bakterien går igennem i sine omgivelserne f.eks E. coli vil få opløst sin cellemembran ved mødet med galdesalte.

Cellevæggen er tyk og ueftergivelig, der betinger deres ydre form. Cellevæggen er opbygget af trådformede molekyler, der indbyrdes er bundet sammen på kryds og tværs til et tæt og stærkt fletværk. Den største komponent i cellevæggen er en kombination af aminosukkerarter (skiftevis N-acetylglukosamin og N-acetylmuraminsyrer) og den anden vej af oligopeptider, kaldet murein eller peptidglykan. Den sørger for formen og rigiditet samt hæmmer indtrængen af hydrofobe elementer da komponenter af murein er af polære strukturer. Cellevæggen beskytter bakterierne mod ydre påvirkninger og modstår det indre osmotiske tryk i bakterierne (højere end udenfor), som kan blive op til 25 ATF. Ved forsøg kan cellevæggen opløses

med lysosomer, og cellen vil briste pga. det indre osmotisk tryk, da i organismen findes der mureinhydrolytiske enzymer. Behandling med lysosomer vil derfor dræbe bakterierne ved lav-osmotisk tryk omgivelser. Hvis bakterien uden cellevæg bevares i isoosmotisk medium, vil der ikke ske dem noget, kaldet spheroplast.

Afhængig af hvilken form murein har, kan bakterie have forskellige former som stave, kokker eller skruer. Man kan med specifikke farvemethoder kende forskel på forskellige bakterier. Det vigtigste eksempel er gramfarvning, opdaget af den danske læge Chr. Gram. den muliggør en adskillelse af store grupper af bakterier – de grampositive og de gramnegative. Ved gramfarvning farver man først bakterierne med krystalviolet og iodine, og dernæst affarves med alkohol for endelig at efterfarve med safranin. De grampositive bakterier vil beholde den blå-violette farve fra methylviolet trods affarvning med alkohol, mens de gramnegative mister denne farve og farves røde ved efterfarvning med safranin.

En grampositiv bakterie vil beskytte sin cellemembran med en tyk cellevæg, 35-40 lag af murein. Som nævnt før er en af de største komponenter er en kombination af polysakkarider og polypeptider kaldet murein eller peptidglykan. Murein bevarer formen og rigidhed af både gram-positiv og gram-negativ, men spille størst rolle i at beskytte gram-positiv bakteriens cellemembran.

Deres cellevæg indeholder også andre polymere f.eks. teichoic syrer, der er kæder af ribitol eller glycerol kædet sammen af fosfoester bindinger. De spiller en rolle i patogenese.

En gram-negativ bakterie har en helt anden struktur. Den har en ydre membran, ovenpå cellevæggen. Den er kemisk anderledes, og kan modstå flere kemiske agenter. Den er dobbeltlaget, og dens ydre lag indeholder lipopolysaccharider (LPS), et molekyle, der ikke er fundet andre steder i naturen. Den forhindrer farvestoffet i at nå ind til den indre del af cellevæggen. Den er meget reaktiv i organismen.

LPS har 3 komponenter:

- **Lipid A:** en glycolipid af disaccharider hvor der er hæftet fedtsyrer og fosfatgrupper. Den kan give feber og aktivere en serie af immunologiske og biokemiske mekanismer der leder til mobiliseringen af immunforsvaret. I større mængder af denne komponent kan denne forårsage chok og evt. død.
- **Core:** små serier af sukker, polysaccharider. Der er 2 karakteristiske: ketodeoxyoctanoic og heptose.
- **O antigen:** kulhydratkæde op til 40 sukke i længden. Den hydrofile lag af O antigen udgør bakteriens overflade og afstøder hydrofobe elementer. De findes i mange variationer og præsenterer forskelle blandt gram-negative bakterier.

Fordi den også har en lipid struktur, er det forventet, at den også afstøder hydrofile elementer. Ved ernæringen har den ydre membran en membrankanal, der tillader passive diffusion af hydrofile komponenter som sukker, aminosyrer og diverse ioner. Disse kanaler kaldes for poriner og de er meget trange (størrelsen har en betydning for entring = op til 600-700 daltons).

Denne dobbeltmembran system af gram-negative bakterier skaber et kompartment kaldes periplasmatiske space eller periplasma, der indeholder et tyndere mureinlag og geleagtige opløsning med komponenter, der faciliterer næringen. Af disse komponenter er der fosfatase, nuclease og protease og andre hydrolytiske enzymer, der nedbryder store makromolekyler, så de bedre kan blive optaget. Den indeholder desuden nogle bindingsproteiner, som kan optage forskellige aminosyrer og glukose. Den indeholder også enzymer der inaktiverer antibiotika som f.eks. penicillin og cephalosporins, β -lactamase.

Det er det ydre lag der gør de gram-negative bakterier mere resistente overfor desinfektionsmidler og antibiotika, specielt penicillin.

Antibiotika og murein syntese

Stoffer der blokerer syntesen af murein, vil lede til lyse og drab af bakterien f.eks. penicillin, cephalosporins og β -lactams. Disse antibiotika er baktericidal dvs. de dræber bakterien, og er mindre toxic for organismen. Forskel mellem denne form for antibiotika og lysosomer er at de påvirker ikke selve murein men kun syntesen. Bakterien vil blive ved med at syntetisere komponenter, men når der ikke dannes krydslink mellem peptiderne, vil celledmassen øges og cellen eksploderer. De celler der ikke vokser, er upåvirket af penicillin.

Murein eller peptidglykan syntesen forgår i cytoplasmaet, hvor tetrapeptid koblet til N-acetylmuraminsyre opbygges som et pentapeptid med 2 D-alanin molekyler i enden. Til den tredjesidste aminosyre kobles et peptid bestående af 5 glycinmolekyler. Disse bliver transporteret til lipid carrier i membranen. De bliver tilføjet til den voksende kæde af murein. Dette trin kan hæmmet af vancomycin. Regeneration af lipid carrier er hæmmet af en anden antibiotika, bacitracin.

Sidste led i processen er krydsbindingen som foregår ved en transpeptidering. Den frie aminogruppe på glycin-kæden bindes til det næstsidste D-alaninmolekyle i et tilgrænsende lag af PG-strukturen under fraspaltning af det sidste D-alaninmolekyle.

På denne måde bliver hele PG-laget et stort molekyle som i grampositive bakterier udgøres af mange (ca. 20) lag af sakkardet og i gramnegative af få lag (2-3) af sakkardet. Man kalder dette trin også for transpeptidation. Dette trin kan hæmmes af penicillin eller cephalosporiner dvs. af β -lactam-antibiotika.

Nogle bakterier er bakteriostatisk, ikke baktericidal. Det betyder at de er tolerante overfor penicillin. Disse bakterier mangler et enzym, der kan kløve murein. Sådanne bakterier er resistente for selv den stærkeste antibiotika.

Mycoplasma-bakterier har ikke nogen murein, er hverken rigid eller nogen definitiv form. De er ligeledes resistente for penicillin.

Transportformer gennem cytoplasmatiske membran

Cytoplasmatiske membran indeholder forskellige carrier, kaldet permeases, der faciliterer entre af forskellige metabolitter. Permeases har en høj affinitet for substrater på ydersiden, mens lav på indersiden.

Der er 3 former for transport:

- Faciliterede diffusion: her bliver en substans optaget for at skabe ligevægt mellem inderside og ydersiden af membran. F.eks. glycerol bliver fosforyleret til glycerol-3-fosfat intracellulært. Derfor bliver der mere fri glycerol optaget fra ydersiden.
- Gruppe translokation: er også kendt som fosforylationlinkede transport. F.eks. glukose binder sig til en bestemt carrier, enzymet E2, hvorefter bliver glucose molekyler fosforyleret til glucose-3-fosfat. E.coli bruger denne transport form for at optage glukose.
- Aktiv transport: til denne transport bliver energi brugt for at optage substansen hvor koncentrationen i forvejen er uændret, hvilket gør transport af yderligere molekyler ufavorable. Energien bliver hentet fra ATP eller NADH.

Cytoplasmatisk membran har også cytokromer, hvor oxidative metabolisme finder sted. Den spiller en rolle der minder om mitokondrierne.

Bakterier og jern

Jern er vigtig for væksten af bakterier. Bakterier har siderophores og optagelsessystemer, der binder jern.

Bakterier og kromosomer

Genomet består af en enkel cirkulær kromosom af et dobbeltstrengt DNA. Kromosom af E. coli har ca. 5 millioner basepar. Disse koder for omkring 2000 til 3000 gener. Der findes langsomme voksende og hurtige voksende E. coli. De langsomme vokser med replikationshastigheden på hver 100. minut, mens de hurtige vokser med på hver 20 minut. Replikationen starter et sted på replikativ origin, og fortsætter i begge retninger til terminus. I gennemsnit tager det ca. 40 minutter på 37 grader. Det vil sige, i de hurtige voksende E. coli vil en ny replikation starte 20 minutter før, den forrige replikation er færdig.

Bakterier og antibiotika

De forskellige antibiotika virker på forskellige dele af cyklussen af replikation eller protein syntese.

Rifampin er en kraftige inhibitor af bakterial transskription, virker på initiation stadiet. Den binder sig til molekyler af RNA polymerase, der flyder frit i cytoplasmaet end mindre til RNA polymerase der er bundet til DNA. Dvs. det sidste kan ikke inaktiveres af rifampin. Rifampin bliver brugt til behandling af tuberculose

For at hæmme protein syntesen binder nogle antibiotika til enten den lille eller den store subunit af ribosomal RNA. tRNA. Af disse kan nævnes **makrolid, erythromycin og kloramfenikol**. Disse binder sig til 50S subunit og hæmmer protein syntese ved elongation stadiet. Disse antibiotika er bakteriostatiske.

En anden stor gruppe af protein syntese inhibitorer er **aminoglycosider**. De er bakteriocidal. Af stoffer nævnes **streptomycin, gentamycin og neomycin**. De binder til 30S subunit af bakterial ribosomer og forårsager translational misreading og hæmmer elongation af protein kæden. Aminoglycosider er

bakteriocidal. Gentamycin er en kraftig bakteriocidal antibiotika der ikke kan penetrere vævet men dræber bakterierne ekstracellulært.

Hvordan overlever bakterier i forskellige omgivelser ???

Flere bakterier har ekstra komponenter på overfladen såsom kapsel, flagella og pili. **Kapsel** er en ydre slimede overflade. De består af højt molekylære polysaccharider der gør bakterien glat og svært for de hvide blodlegemer at fagocyttere. F.eks. pneumokokker, meningokokker og andre bakterier der møder fagocytter er indkapslede. **Flagella** er filamenter, der gør bakterierne mobile, kaldet kemotaxis. Kemotaxis spiller en rolle i patogenese, hvor den guider bakterierne om at svømme mod cellulær targets (tiltrækning) og væk fra de hvide blodlegemer (frastødning). Bakterier kan enten have en eller flere flagella. **Pili** er involveret i tilhæftning af bakterier til celler eller andre overflader. De er mindre end flagella. Der findes også bakterier med længere pili (han-køn), der er specialiserede i at donere materiale i den recipient celle (hun-køn). Af bakterier kan der nævnes gonokokker. Gonokokker har den egenskab, at de hele tiden ændrer version af deres pili og hele tiden stimulerer dannelse af antistoffer til de forskellige variationer. På molekylære basis består pili gen af 2 sekvenser: en koder for en konstant region, som er ikke særligt antigenisk, mens den anden koder for en variabel region som er stærk antigenisk. Når den konstante region recombinerer med den variable region, vil der opstå et nyt gen til pili og dermed en ny variation. De er altid et skridt foran og holder sig i live i lang periode. Der har derfor ikke været muligt at fremstille en vaccination mod gonokokker. Af andre bakterier med lignende evne kan nævnes **Borrelia** og **Salmonella**.

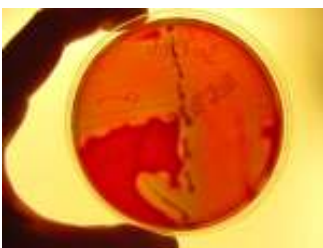
Aerobe og anaerobe bakterier

Bakterier kan udover gramfarvning, deles i 2 store grupper:

- Aerobe bakterier
- Anaerobe bakterier

Aerobe bakterier lever bedst hvor der er ilt til stede f.eks. **bacillus**, der trives bedst i lungerne. Anaerobe bakterier (obligate = restriktiv) lever bedst i omgivelser uden ilt. Det drejer sig om bakterier, der forårsager tetanus og botulisme. De bakterier der vokser med og uden tilstedeværelse af ilten, kaldes for fakultative anaerobe bakterier og inkluderer E. coli og andre intestinale bakterier.

Kap 4 Genetic Approches to Studying Bacterial Pethogenesis



Virulence faktor henviser til substans der er produceret af mikroorganismer og kan skade værten. Flere teknikker er opfundet til at finde de diverse virulence faktorer. Hver bakterie udtrykker sine egne virulence faktorer.

Man har fundet **clostridium botulinum**, en grampositiv anaerobe bakterie, der vokser pga. insufficient tilberedt dåsemad. Toxiner fra bakterien kan medføre pølseforgiftning. En anden bakterie, **salmonella enterica**, der ved mavetarm

kanalen kan nå ind dybere væv og forårsage dødelig systematisk infektion.

Virulens er ikke en fast egenskab ved en patogen bakterie:

- Er en egenskab ved den enkelte bakteriestamme
- Udvikles ved kontakt med værtsorganismen
- Kan tabes
- Kan overføres til en anden bakterie

Kap 8 The Parasite's Way and life

Mikroorganismer er udstyret med substanser eller organeller, der er involveret i at hæfte sig fast på værtoverfladen og kaldes adhæsin. Disse binder sig til specifikke receptorer på værtoverfladen. Nogle grampositive bakterier har deres adhæsin på deres fimbriae eller pili, som de bruger til at hæfte sig på epitheloverfladen. På gramnegative bakterier er adhæsiner fundet direkte på overfladen og ikke på udstående overflader. F.eks. invasin er en adhæsin, der genkender integrins på celleoverfladen. Integrins er normalt involveret i andre processer, hvor de binder hvide blodlegemer til endothelial overflader. Integrins kan også binde bakterier.

Receptor for grampositive bakterier er det protein fibronectin, som normalt beklæder mucosal overflader af epithelial celler. De spiller en stor rolle i normalfloran i munden og pharynx. Mange hospitaliserede patienter har utilstrækkelige fibronectin formentlig pga. for meget brug af antibiotika. Når dette protein er lav, har gramnegative bakterier tendens til at erstatte grampositive bakterier, fordi der pga. mangel af fibronectin afsløres flere receptorer for gramnegative bakterier.

Kroppens væsker indeholder plasma med indeholdende sukker, vitaminer, mineraler og andre substanser som bakterierne, svampe og andre parasitter kan bruge til at vokse. Men stadig vokser bakterierne sparsomt da plasmaet også indeholder lysosomer, komplementsystemet og antistoffer.

Plasmaet indeholder også meget små mængder af frie jern, som bakterier kan bruge til at syntetisere cytokromer og andre enzymer. Når mikroorganismer invaderer kroppen, vil kroppen reagere ved at udskille jern-bindende proteiner, der vil reducere frie jern endnu mere i plasmaet. Men bakterier kan respondere ved selv at udskille nogle molekyler, der kan stjæle jernet fra jern-bindende proteiner. Andre kan udskille nogle toxiner der kan destruere cellerne og dermed stjæle jernet f.eks. røde blodlegemer.

Bakterier møder mange forhindringer på vej ind i organismen. Spørgsmålet er hvordan de kan undgå at blive genkendt af komplementsystemet, fagocytter og antistoffer. Vi gennemgår dem hver for sig nedenunder.

Forsvar mod komplementsystemet

Bakterier kan hæmme komplementsystemet for at beskytte sig selv. Det gør de ved at skjule de komponenter, der aktiverer den alternative vej. Lipopolysakkarider af gramnegative bakterier, teichoic syrer af grampositive bakterier og andre strukturelle komponenter af mikroorganismer er potentielle komplementære aktivatorer. Meningokokker og pneumokokker er eksempler på bakterier, der forhindrer

aktivering af komplementsystemet ved sin kapsel der dækker disse aktivatorer. Nogle bakterier bruger kroppens egne mekanisme til at forhindre aktivering. F.eks. sukker, sialicysyre, er inkorporeret på værtens overflademolekyler. Gonokokker bruger også sialicysyre i deres capsulære polysakkarider.

Meningokokker bruger en anden strategi til at beskytte sig selv. De bliver beklædt med cirkulerende IgA antistoffer, så de ikke aktiverer komplementsystemet. Denne strategi hæmmer også andre antistoffer til at starte aktiveringen gennem den klassiske vej.

Virusser har også fundet mekanismer til at hæmme aktiveringen af komplementsystemet. F.eks. herpes simplex virus har glykoprotein der binder sig til komplement komponent C3b og hæmmer aktiveringen af den alternative vej.

Forsvar mod fagocytter

Mikroorganismer har også mange strategier til at hindre blive dræbt af fagocytter. At blive fagocyteret behøver ikke være en dårlig ting for mikroorganismer. Nogle mikroorganismer kan vokse inde i cellen, hvor de er beskyttet fra antistoffer og antimikrobielle stoffer.

Nogle mikroorganismer forhindrer sekundær frigørelse af neutrofile kemotaxiner og opsiner og reducerer risikoen for at møde disse celler og dermed deres funktion. Bordetella pertussis hæmmer direkte motilitet af neutrofile og kemotaxis ved at producere en toxin der øger AMP. Gruppe A streptokokker producerer C5a peptidase, der specielt inaktiverer kemotaxisk produkt af komplementsystemet.

Nogle bakterier producerer leukocidiner der slår makrofager og neutrofile celler ihjel. Leukocidin er en opløselig produkt, der fra afstand beskytter bakterier at blive fagocyteret. Typiske er bakterier som pseudomonas, stafylokokker, gruppe A streptokokker og klostridia (der forårsager gangræn).

Overlevelse inden i fagocytter

Nogle bakterier kan hæmme fusion af lysosomer og fagosomer, der ellers tilsammen udskiller en bakteriocidal substans.

Shigellae, Listeria monocytogenes og rickettsiae krydser membranen af fagocytisk vesikel og træder ind i cytoplasma, hvor den er beskyttet mod lysosomal enzymer.

Kap 10 Introduction to the Pathogenic Bacteria

Bakterier kan deles ud fra gramfarvningen som nævnt i kap. 3 og ud fra om de er kokker eller stave.

Gram-positive kokker

De mest almindelige grampositive kokker er streptokokker og stafylokokker.

Af streptokokker er der β -hæmolytisk streptokokker, der kan forårsage de fleste streptokok infektioner, hæmolyse. På petriskålen giver der en klar zone omkring kolonier. De er mest patogene. De kan underdeles yderligere fra gruppe A til T. Gruppe A er den mest vigtige, S. pyogenes. De forårsager infektionen i halsen og andre alvorlige infektioner. Disse infektioner kan give rheumatisk feber eller glomerulonefrit.

α -hæmolytisk streptokokker giver en grøn zone omkring kolonier. Denne gruppe inkluderer en vigtig patogen, *S. pneumoniae*.

Non-hæmolytisk sker der ikke noget. Nogle streptokokker er strikte anerobe bakterier. Men mest af streptokokker vokser i oxygen, derfor kaldes de for fakultative anaerobe bakterier.

Stafylokokker er der to hovedtyper: *S. aureus* og *S. saprophyticus*. Stafylokokker findes også på hudoverfladen som en del af normal floraen, *S. epidermidis*, der kan give infektioner. De er mere robuste end streptokokker og de er aerobe. De kan forårsage pus i såret, osteomyelitis eller endokarditis. Ligesom streptokokker producerer de også flere forskellige toxiner og ekstracellulære enzymer. Et enzym, koagulase, kan danne klumper i plasmaet og kan bruge til at identificere *S. aureus*.

Gram-negative kokker

Af gramnegative kokker af *Neisseria* den mest vigtig. Denne findes i munden og i pharynx hos raske menneske. Der er 2 vigtige patogener, gonokokker og meningokokker.

Ligesom alle andre gramnegative bakterier indeholder deres ydre membran endotoxin, lipopolysakkarider. Gonokokker kan forårsage gonore og meningokokker meningitis og forskellige sepsis.

Gram-positive stave

Difteri har været dødelig blandt børnene indtil vaccinationen kom til. Det bliver forårsaget af bakterien *Corynebacterium diphtheriae* og har familien difteroid.

Aerobe bacillus indeholder *B. anthracis* der kan give anthrax; og strikt anaerobe, som er medlem af *Clostridium*. Af dem kan der nævnes *C. botulinum* og *C. tetanus*, der hhv. kan forårsage botulisme og tetanus og *C. perfringens*, der producerer gasgangræn.

En af de almindelig er *C. difficile*, der kan give pseudomembranous colitis efter stort brug af antibiotika.

Til sidst skal der nævnes *Listeria monocytogenes*, der giver alvorlige infektioner hos børn og voksne der har lav immunforsvar og hos gravide.

Gram-negative stave

Denne gruppe inkluderer mange patogener. Enterobakterier er de vigtigste f.eks. *Escherichia coli*. *Shigella* og *salmonella* er nogle patogen der kan give gastroenteritis.

Andre gramnegative stave er der *Campylobacter jejuni* og *Helicobacter pylori*, der hhv. giver diarre og ulcus.