

IMUNOLOGIE V ZUBNÍM LÉKAŘSTVÍ

4 (2018)

Mikroorganismy a imunitní systém.

Mikrobiota a mikrobiom

Imunologické aspekty zubního kazu

Vakcíny a vakcinace

Prof. J. Lokaj

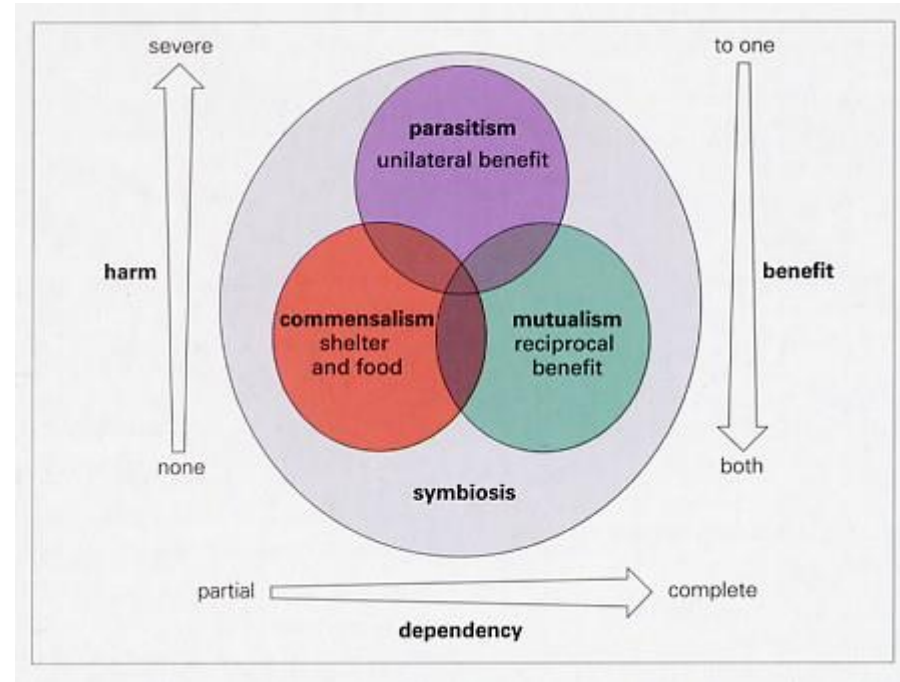
Základní fyziologickou funkcí imunitního systému je obrana proti patogenním mikroorganismům.

Imunoprevence – vakcinace

Imunoterapie – substituce, modulace

Ekologické interakce mikrobů a hostitele

Parasitismus



Komensalismus

Mutualismus

PATHOBIONT – PATHOGEN

...Člověk hned po narození už není jen sám sebou. Lidský organismus se stává gigantickým sídlištěm pro miliardy mikroorganismů.

Soužití hostitele s mikroorganismy je výsledkem oboustranných adaptací, které se v průběhu věků neustále vyvíjely a zdokonalovaly...

Jiří Kruml a Ivo Miler: Život bez mikrobů (Orbis, Praha, 1975)

Terminologie

***Microbiota (dříve mikroflóra):
společenství mikroorganismů v různých místech
hostitele***

***Mikrobiom:
původně kompletní set genů v mikrobiotě,
hromadný genom mikrobů žijících v a na nás,
nyní mikrobiota a její veškerý genetický materiál***

Mikrobiota obsahuje 10^{14} bakteriálních buněk, tj. 10x více než je buněk, které tvoří naše tělo.

(Jsme tedy z více než 90% „mikrobiální“).

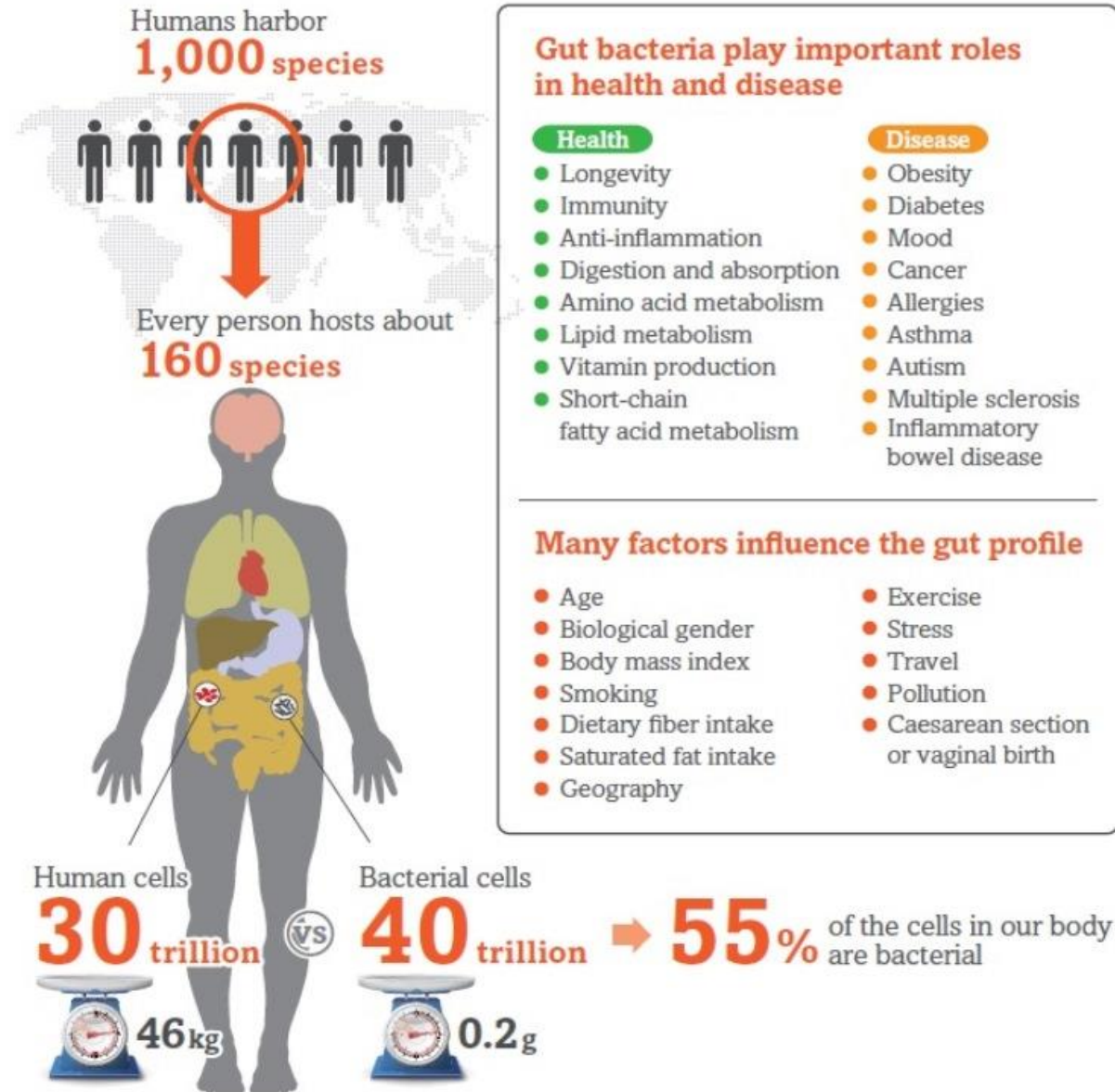
Počet genů našeho mikrobiomu převyšuje 150x počet genů v lidském genomu.

(V lidském trávicím traktu je 3,3 milionu genů z více než tisíce druhů mikrobů (lidský genom má 20-25000 genů)).

Gilbert JA et al.: Current understanding of the human microbiome (*Nature Medicine* 2018; 24(4): 392 -400):

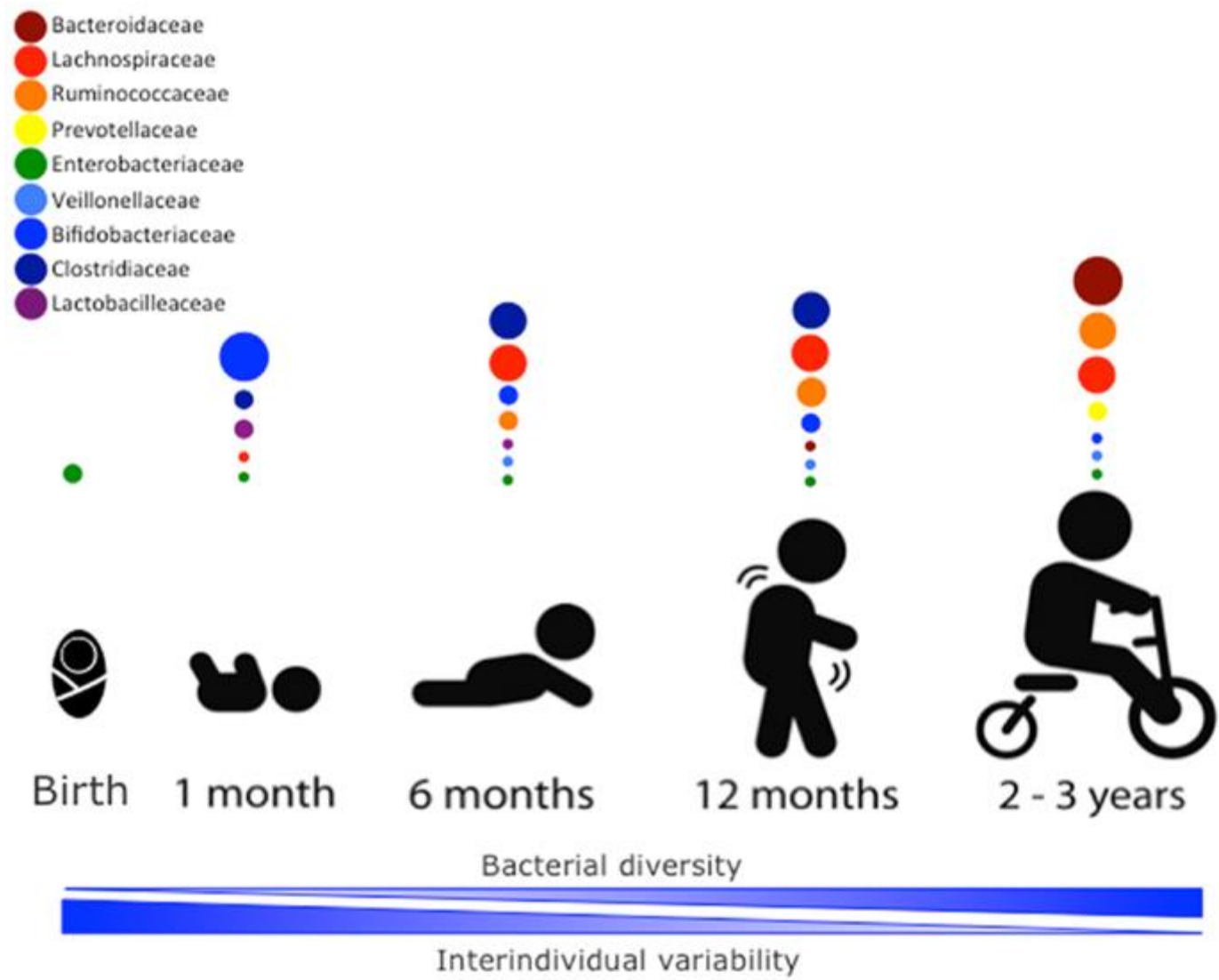
Podle nových výzkumů je poměr bakterií k lidským buňkám cca 1,3: 1 a jejich genů cca 2 miliony k 20 000).

The gut microbiota



Ovlivnění skladby mikrobiomu

- porod
- kojení
- strava
- infekce
- antibiotika
- hygienická opatření
- kontakt se zevním prostředím



Birth

1 month

6 months

12 months

2 - 3 years

Bacterial diversity

Interindividual variability

Člověk a jeho mikroby

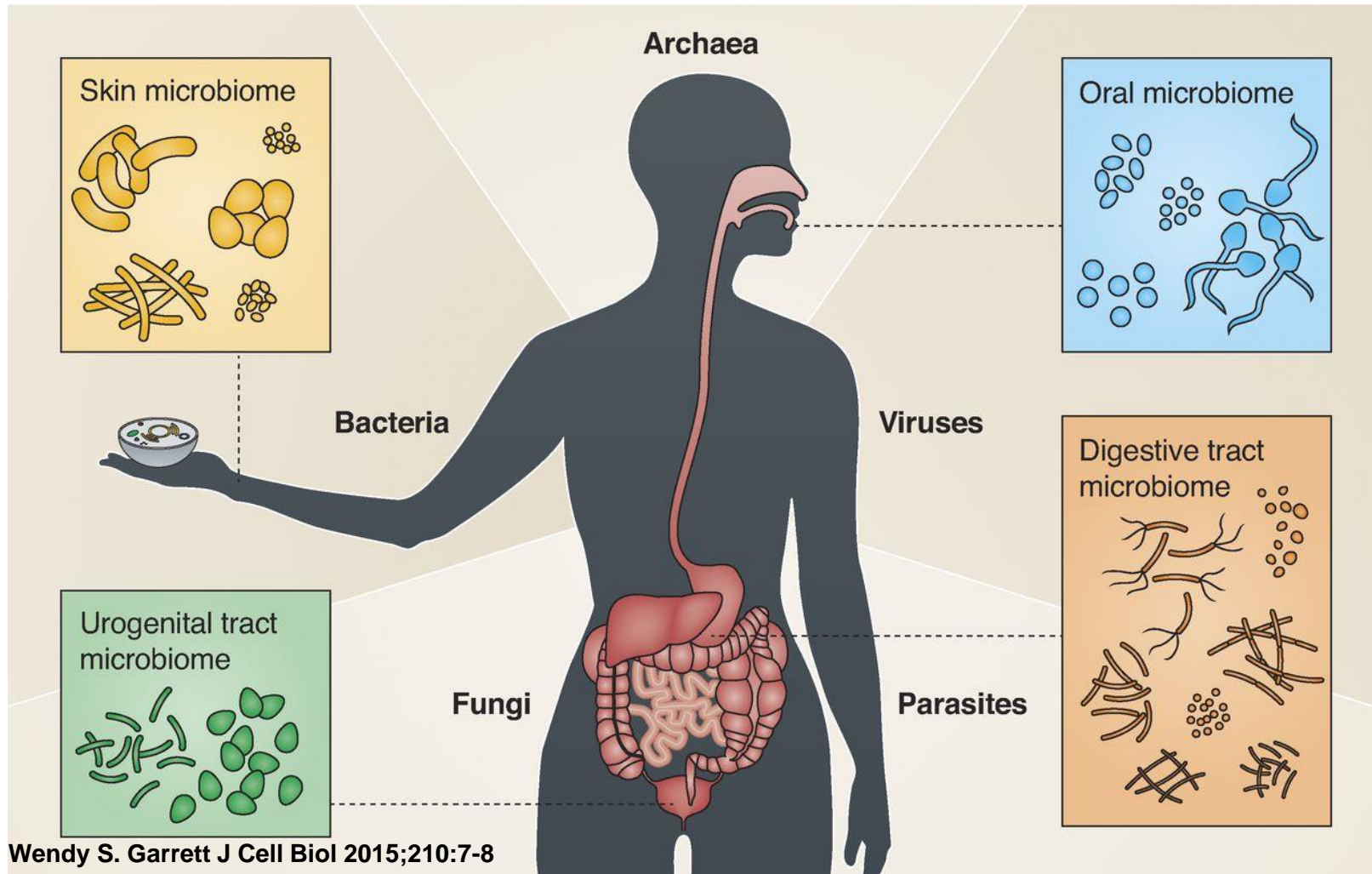
„superorganismus“

„kompletní já“

Molekulární biologické metody při studiu mikrobioty

- 16S rRNA – kódující geny
- Metagenomická analýza – sekvenování veškeré mikrobiální DNA komplexního společenstva
- Analýza transcriptomu, proteomu, metabolomu

Mikrobiom člověka



Mikrobiom: *Archaea*

Jednobuněčné mikroorganismy

- „extremofilní“ (hyperthermofilní, hyperacidofilní, hyperhalofilní)
- mesofilní
- některé druhy mají charakteristický metabolismus - methanogenesi.

V lidském trávicím traktu se vyskytují:

Methanobrevibacter smithii

Methanosphaera stadtmanae

Methanobrevibacter oralis

Biologický význam je tč. studován.

Archaea představují novou skupinu probiotik (archaeobiotika)

(Gaci N et al: *World J Gastroenterology* 2014; 20(43): 16062-16078)

Mikrobiom: *Bakterie*

Firmicutes:

Clostridium, Bacillus, Lactobacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus....

Bacteroidetes:

Bacteroides, Flavobacteria ...

Actinobacteria:

Corynebacterium, Propionibacterium....

Proteobacteria:

E. coli, Proteus

Mikrobiom: *Houby*

*Aspergillus, Alternaria, Candida, Cladosporium,
Cryptococcus, Fusarium, Malassezia,
Rhodotorula, Sacharomyces*

Mikrobiom - Virom

Bakteriofágy, vč. temperovaných (cca 1200 virotypů)

Breitbart M et al.: Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces.

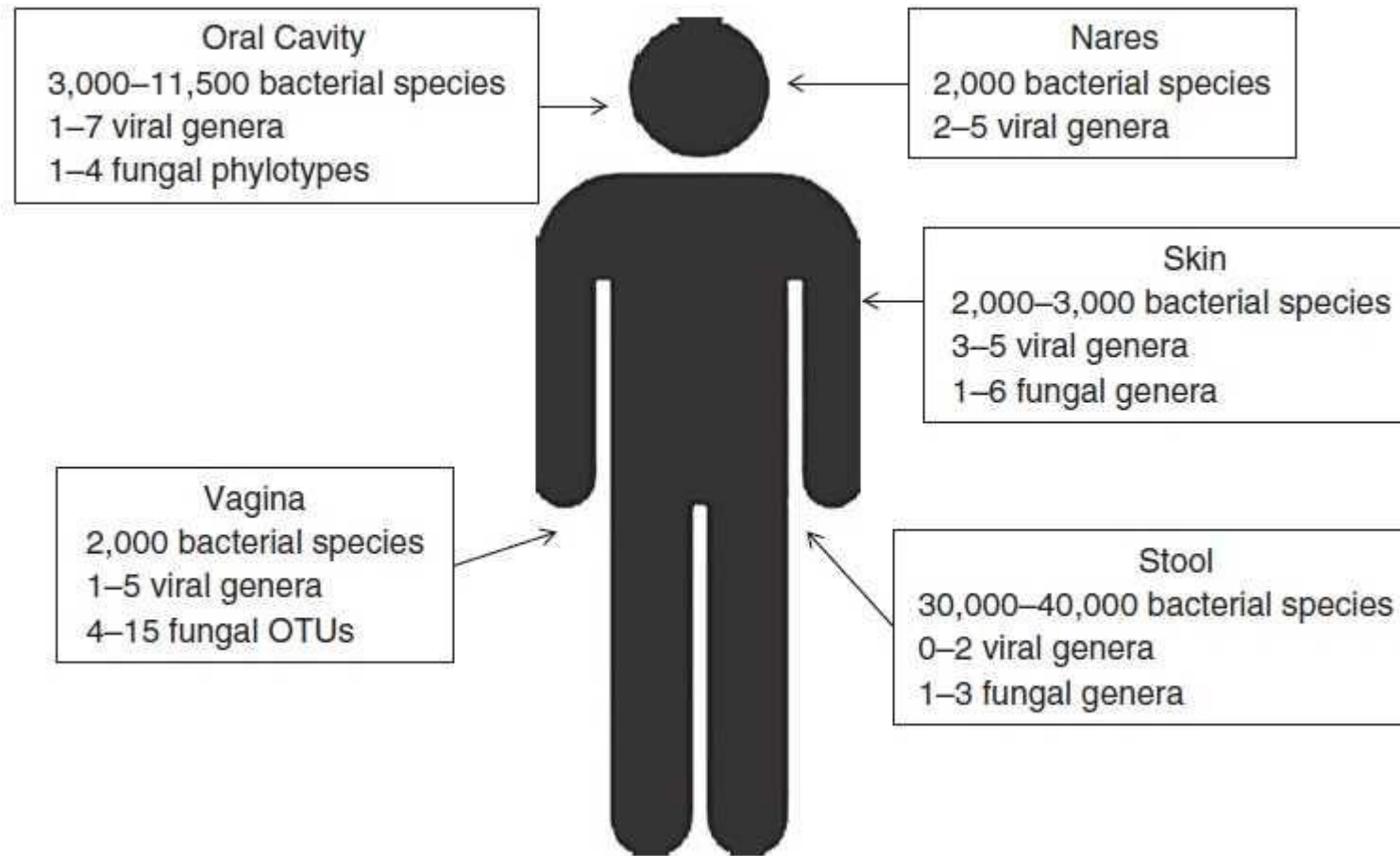
(J Bacteriol 2003; 185: 6220-6223)

Viry eukaryontů (adenoviry, rotaviry, enteroviry, noroviry, Bocavirus, Picobirnavirus, Cosavirus, Anneloviridae)

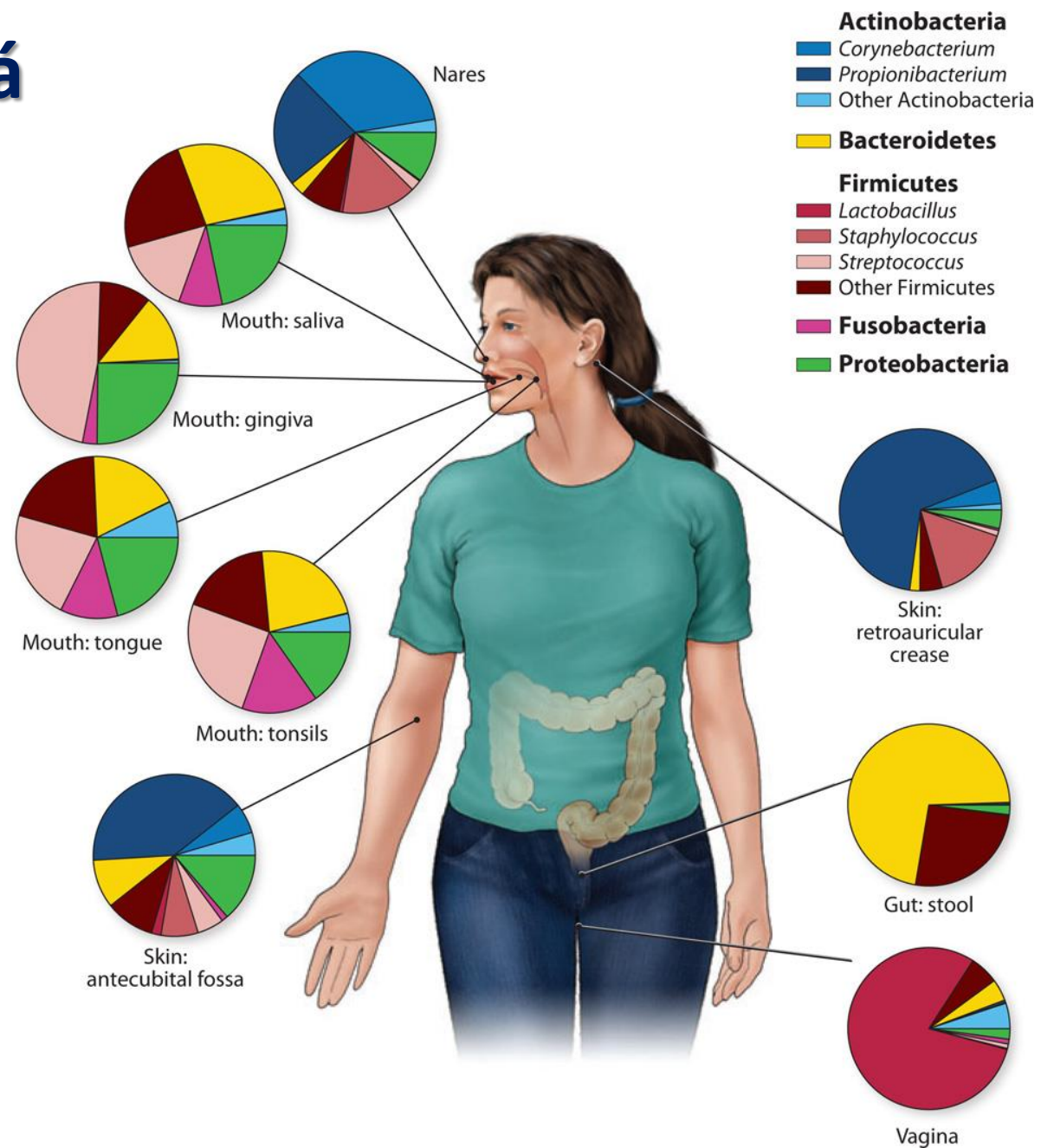
Reyes A et al.: Going viral: next generation sequencing applied to phage populations in the human gut.

(Nature Rev Microbiol 2012; 10: 607-617)

Rozmanitost mikroorganismů v lidském těle



Fyziologická mikrobiota



Význam střevní mikrobioty

- Zábřana usídlování patogenních mikrobů.
- Lokální produkce antimikrobiálních působků.
- Stimulace tvorby Treg (*Bacteroides fragilis*)
- Tvorba vitaminů B₁₂, K
- Degradace komplexních polysacharidů (*Bacteroides thetaiotaomicron*)
- Tvorba a sekrece imunoglobulinů
- Regulace hematopoézy
- Rozvoj „MALT“
- Maturace imunitního systému
- Regulace hematopoézy
- Ovlivňování neurohormonálních procesů

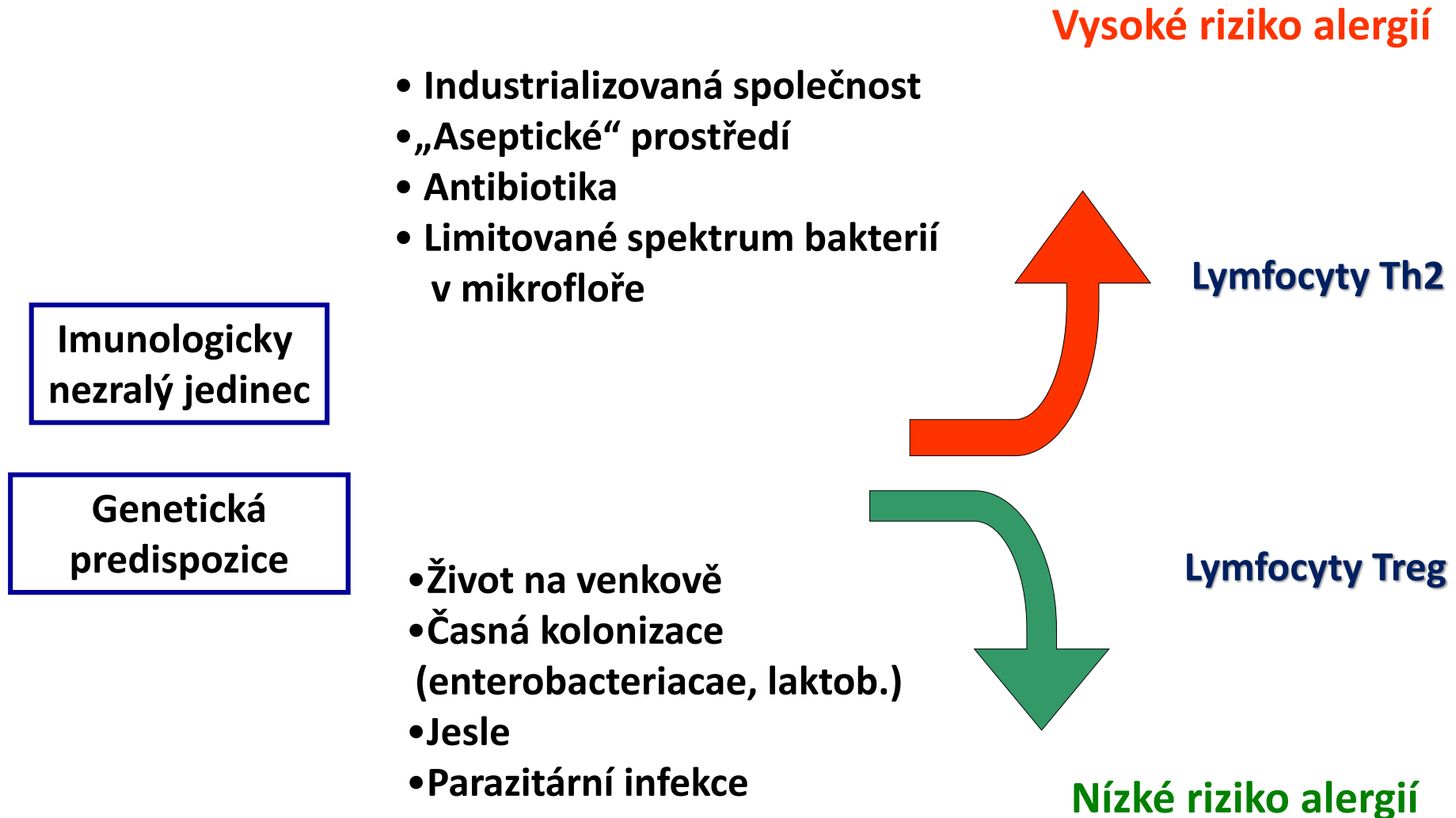
Fyziologická mikrobiota indukuje tvorbu „přirozených protilátek“

- Isohemaglutininy (anti A, B)
- Xenoaglutininy (např. anti α Gal)
- Protilátky proti antigenům mikrobioty

*Nízká séroreaktivita proti některým mikrobům (např. Firmicutes, Proteobacteria) v raném dětství je asociována s vývojem alergie v pozdějším období).
Christman et al. JACI 2015*

„Hygienická“ hypotéza

Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size (BMJ 1989; 299: 1259-1260)



Dlouhodobé působení probiotik (*E. coli* - *Colinfant*) na imunitní systém dětí

Opakovaná orální aplikace nepatogenního kmene *E. coli* po porodu
redukovala výskyt alergií v pozdějším věku (10 a 20 let)

	Clin. symptoms
<u>After 10 years</u>	
Colonized infants (n = 77)	12%* (9)
Control infants (n = 55)	33% (18)
<u>After 20 years</u>	
Colonized infants (n = 150)	16% (24)
Control infants (n = 144)	32% (46)

*p < 0.01

Mikroby a autoimunitní choroby

Molekulární (antigenní) mimikry:

Genetická konservace klíčových molekul v průběhu evoluce zaručuje, že četné významné molekuly infekčních agens a jejich hostitele jsou si velmi podobné, v určitých doménách dokonce identické.

Rozšiřování spektra epitopů v průběhu infekčního procesu

Vliv střevní mikrobioty

Experimentální modely vč. bezmikrobních zvířat: vliv na zánětlivé choroby střeva, ale i na extraintestinální autoimunitní choroby (revmatoidní artritida, T1 diabetes, roztroušená skleróza, uveitida).

Mikrobiota a nádory

Hromadí se důkazy, že fyziologická, komensální mikrobiota má významný vliv na karcinogenezi, progresi nádorů i odpověď na protinádorovou léčbu.

Tyto účinky mohou být lokální i celkové.

K praktickému využití se nabízí úprava diety, prebiotika, probiotika, transplantace stolice nebo definované mikrobioty.

(Dzutsev A et al, Eur J Immunol 2015; 45: 17-31)

Mikroby a metabolismus

V mikrobiotě střeva obézních je zvýšené zastoupení *Firmicutes*

Souvisí se schopností mikrobioty využívat energii z potravy?

Ovlivňují některé bakterie mikrobioty kmenové buňky pro diferenciaci v buňky tukové?

Ovlivňuje mikrobiota pocit hladu?

Možnosti ovlivnění mikrobioty

- Probiotika
- Prebiotika
- Imunomodulátory
- Antibiotika
- Terapie bakteriofágy
- Transplantace stolice (u infekcí *C. difficile*)
- Produkty mikrobioty (např. bakteriální polysacharidy *Bacteroides fragilis*)

PROBIOTIKA

**živé mikroorganismy aplikované perorálně,
působící blahodárně na zdraví člověka a
zvířat**

nejčastěji používaná probiotika:

laktobacily,

streptokoky, enterokoky

bifidobakterie,

E. coli (kmen Nissle),

kvasinky (Saccharomyces boulardii)

PREBIOTIKA

Selektivně fermentované složky potravy, které vedou k specifickým změnám ve složení a aktivitě střevní mikrobioty s blahodárným vlivem na zdraví hostitele:

Inulin, fructo-oligosacharidy, galacto-oligosacharidy, lactulosa...

Transplantace mikrobioty stolice (fecal microbiota transplantation)

- Od jednoho dárce, často blízkého příbuzného.
- Od více dárců (stool banks).
- Transplantace autologní stolice (odebrané v klidovém období a vhodně uchované).
- Anaerobně kultivovaná stolice od zdravých dárců.

*Využití: průjem vyvolaný antibiotiky
průjem způsobený Clostridium difficile
perspektivně metabolické, kardiovaskulární,
neurologické, autoimunitní, alergické choroby*

Každý máme svůj vlastní mikrobiální „makeup“

„Náš individuální osud, zdraví a možná i některé z našich činností je mnohem více závislé na variantách genů v našem mikrobiomu než v našich vlastních génech“.

Ackerman J: The ultimate social network.

(Scientific American 2012)

IMUNITA V ÚSTNÍ DUTINĚ

Ústní dutina jako součást slizničního imunitního systému

Indukční (imunizace , tolerance) i efektorové schopnosti

Sliny: obsahují produkty lokální i systémové imunitní reakce

slinné žlázy

štěrbínová tekutina

Etiopatogenéze chorob ústní dutiny je vázána na lokální systémovou imunitu, na lokální i systémové choroby, na vrozenou i adaptivní imunitu, na buněčné i humorální faktory.

SLINY

- 750 – 1000 mL/den: parotická žláza 40%, submandibulární 40%, sublinguální 10%, malé slinné žlázy 10%.
- Většina IgA dimer, 5-10% monomer. $IgA_1 : IgA_2 = 55 : 45$
- $sIgA : IgG : IgM = 200 : 2 : 1$ g/L
- Muciny, lysozym, laktoferin, laktoperoxidáza, defensiny a jiné antimikrobiální peptidy, inhibitory proteáz
- Sulkulární tekutina (*gingival crevicular fluid*) se dostává do slin v množství cca 1-2 mL/den, v nichž je naředěna 1:500 – 1:1000. Protilátky zde obsažené jsou především z krve.

Imunologicky aktivní buňky v ústní dutině

- Epitelové (PRR, cytokiny)
- Lymfocyty T, B, diferencované plasmacyty, dendritické buňky, makrofágy, neutrofilní, eosinofilní, basofilní leukocyty, mastocyty, buňky NK
- Aplikace antigenu do sliznice indukuje tvorbu protilátek v malých slinných žlázách, aplikace submukózní vede k tvorbě protilátek ve velkých slinných žlázách.
- Intranazální a sulinguální imunizace indukuje tvorbu protilátek, které jsou prokazatelné ve slinách i v genitálním traktu.

ZUBNÍ KAZ

- Je považován za nejrozšířenější (infekční) chorobu
- Lokalizovaná destrukce zubní tkáně bakteriemi
- Etiologie: především *Streptococcus mutans* (*glucosyl transferase*, *GTF*), *surface protein streptococcal antigen I/II* (*SAI/II*)
- Možnosti aktivní i pasivní imunizace

Vakcíny a vakcinace

Aktivní a pasivní imunizace

- Aktivní imunizace

 - Indukční fáze – produkční fáze

 - Imunologická paměť (primární a sekundární reakce)

 - Specifická prevence příp. profylaxe a terapie

- Pasivní imunizace

 - Účinek okamžitý, přechodný (biologický poločas)

 - Specifická terapie příp. profylaxe

Vakcinace je hodnocena medicínsky i ekonomicky jako jeden z nejefektivnějších způsobů prevence vzniku a šíření infekčních chorob.

Na individuální úrovni chrání jedince před onemocněním.

Na populační úrovni (kolektivní imunita daná vysokou proočkovaností populace) brání šíření infekčních agens a ochrání i neočkované osoby.

AN
INQUIRY
INTO
THE CAUSES AND EFFECTS
OF
THE VARIOLÆ VACCINÆ,
A DISEASE

DISCOVERED IN SOME OF THE WESTERN COUNTIES OF ENGLAND,

PARTICULARLY

GLOUCESTERSHIRE,

AND KNOWN BY THE NAME OF

THE COW POX.

BY EDWARD JENNER, M. D. F. R. S. &c.

— QUID NOBIS CERTIUS IPSIS
SENSIBUS ESSE POTEST, QUO VERA AC FALSA NOTEMUS.

LUCRETIVS.

London:

PRINTED, FOR THE AUTHOR,

BY SAMPSON LOW, N^o. 7, BERNICK STREET, SOHO:

AND SOLD BY LAW, AVE-MARIA LANE; AND MURRAY AND HIGHLEY, FLEET STREET.

1798.

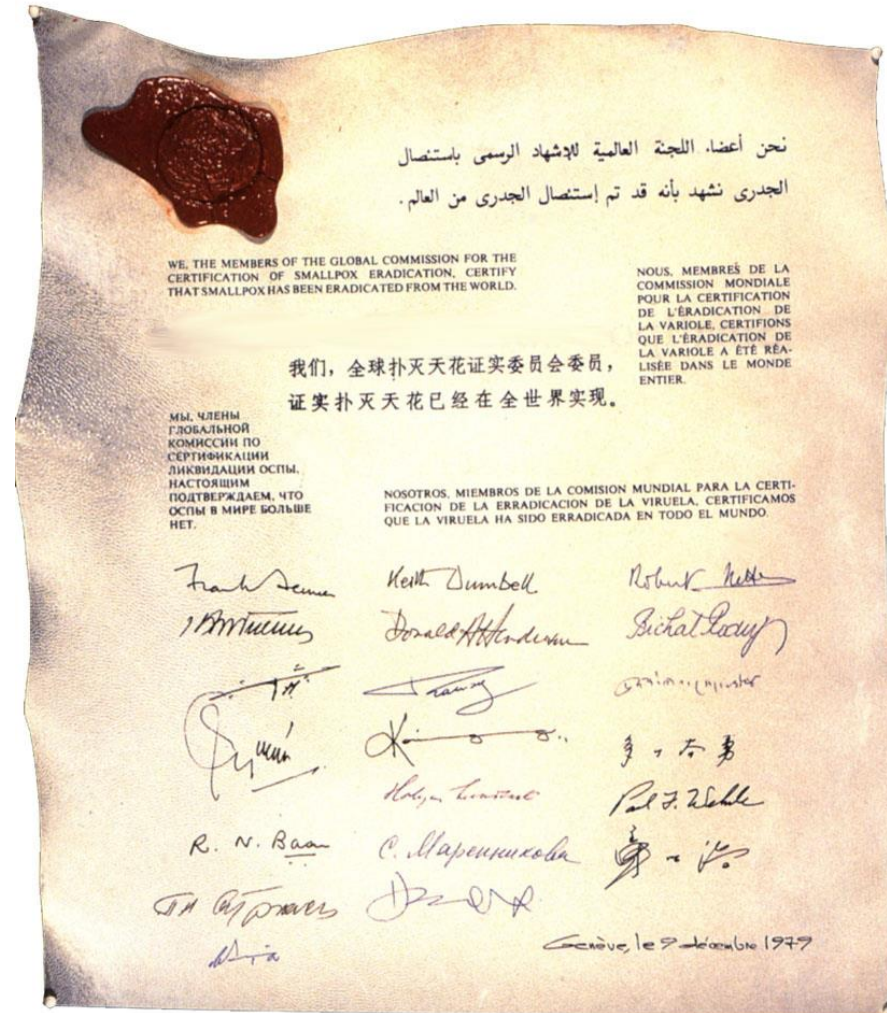
Jennerova vakcína v Brně

(c.k.všeobecný zaopatřovací ústav u sv. Anny)

Do roku 1817 proběhlo pět velkých očkovacích slavností s hudbou a zpěvem, tancem, hrami a premiemi, zprvu na komárovské louce, později v Pisárkách, kde v parku byl postaven dřevěný pavilon ve stylu antické svatyně s bustou E. Jennera.

*(Kruta V: Počátky očkování proti neštovicím na Moravě,
Dějiny vědy a techniky 1971;4: 228-244)*

On 9th December 1979, the W.H.O. officially declared smallpox to be completely eradicated



Pravidelné očkování v ČR 2011

(Vyhláška 537/2006, novela 299/2010 Sb.)

povinné plošné očkování proti

záškrtu, tetanu, černému kašli, hemofilové invazivní infekci, virové hepatitidě B, dětské obrně, spalničkám, zarděnkám, příušnicím

doporučená očkování

u rizikových dětí proti tbc (BCG)

proti pneumokokovým a meningokokovým (A+C) onemocněním, klíšťové encefalitidě, virové hepatitidě A, planým neštovicím, infekci lidskými papilomaviry, chřipce

Hexavakcína

Záškrt, tetanus, pertuse, virová hepatitida B, dětská obrna, infekce způsobené H. influenzae b.

Ukončení do 18 měsíců věku, přeočkování.

Spalničky, zarděnky, příušnice

Od 15. měsíce, přeočkování za 6-10 měsíců

„Klasické“ vakcíny

Atenuované mikroby: BCG (proti TBC), poliomyelitis (Sabinova), spalničky, zarděnky, příušnice, cholera, žlutá zimnice

Inaktivované mikroorganismy: pertuse, vztekлина, hepatitis A, klíšťová encefalitida, poliomyelitis (Salkova), cholera

Toxoidy: tetanus, záškrt

NOVÉ VAKCÍNY

Subjednotkové

Splitové, štěpené (připravované štěpením infekčních agens a izolací imunoprotektivních složek)

Rekombinantní (vlození genu kódujícího protektivní antigen do produkčního mikroorganismu, který pak tento antigen produkuje, vyprodukovaný antigen je izolován a purifikován)

Imunogennost je zvýšena adsorpcí na minerální nosič nebo konjugací s bílkovinným nosičem, např. toxoidem.

NOVÉ VAKCÍNY

Vektorové (vektorem jsou především poxviry, např. vysoce atenuovaný kmen Ankara, ptačí poxviry, adenovirus, S. typhi a další, kromě antigenů mohou kódovat i cytokiny, např. IL-2)

DNA-vakcíny (gén, kódující antigen umístěn do bakteriálního plasmidu, který obsahuje imunomodulační nemetylovaný motiv bakteriální DNA – CpG)

DNA-vakcíny

Úsek DNA kódující příslušný antigen je vpraven s vhodným promotorem do bakteriálního plasmidu.

Aplikace intramuskulární,
intraepidermální - „gene gun“
slizniční

Antigen se vytváří in vivo a indukuje jak protilátkovou, tak celulární imunitní reakci

Principy správné vakcinace

Individuální přístup k očkovanému.

Dodržování absolutních a relativních kontraindikací.

Dodržování správné očkovací techniky.

Použití vhodné vakcíny podle věku.

Vybrání vhodného místa aplikace.

Desinfekce místa vpichu (alkohol)

Zdravotnický dohled po dobu 30 min.

Schema vakcinace

Základní schema

konvenční,
zrychlené

Přeočkování

Využití fenomenu imunologické paměti (primární a sekundární reakce)

Způsoby aplikace vakcín

Intramuskulárně

jehla 25 mm, oblast nedominantního deltového svalu, u kojenců a batolat do 2 let do střední části anterolaterální oblasti kvadricepsu, kolmo

Subkutánně

jehla 15-20 mm, kožní řasa nad tricepsem nedominantní paže, pod úhlem 45 st.

Intradermálně

jehla 9-10 mm, přední strana deltového svalu nebo na volární stranu předloktí

Perorálně, sublinguálně, nasálně

Nežádoucí účinky vakcinace

(Souhrn údajů o přípravku, příbalový leták).

Očekávané

neočekávané

závažné

Místní: zarudnutí, otok, bolest

Celkové: tělesná teplota (do 37,4 běžné, do 38 tolerováno, od 38,1 léky, lékařská pomoc),

únava, bolest hlavy, svalů, kloubů

Alergické nežádoucí účinky na aktivní i pasivní složky vakcíny (zpravidla během minut!)

Ostatní biologicky významné součásti vakcín

Antibiotika (kanamycin, neomycin)

Konservační prostředky (thiomersal)

Stabilizátory: struktura a konformační integrita epitopů je ovlivněna především teplotou a pH.

Chlorid hořečnatý, humánní albumin, laktóza, sorbitol, želatina.

Látky z technologického procesu (např. OVA)

Imunologické adjuvans

Substance podané spolu s antigenem zvyšující jeho imunogennost

Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V:

The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum

(J Path Bacteriol 1926; 38-45, 1926)

Aluminium fosfát nebo hydroxid zůstávají stále hlavním imunologickým adjuvans v humánní medicíně

Imunologické adjuvans

Zesiluje a udržuje imunogenost antigenu.

Účinně moduluje imunitní reakci.

Redukuje potřebné množství antigenu i nutnost opakovaného podání.

Zlepšuje účinnost vakcin u novorozenců, starých osob i nemocných s podlomenou imunitou.

Jejich význam je zvláště důležitý u strukturálně jednoduchých preparátů.

Adjuvans: základní mechanismy účinku

„Doručení“ antigenu buňkám a orgánům imunitního systému („delivery systems“).

*minerální soli, emulze, liposomy, virosomy,
biodegradovatelné polymerní mikrosféry, ISCOM
(immune stimulating complexes)*

Imunostimulace (především aktivací buněk vrozené imunity)

ligandy TLR, cytokiny, saponiny, bakteriální exotoxiny

Budoucnost mají komplexní adjuvanční systémy (integrovaná adjuvancia); je nutno vzít v úvahu zvláštnosti patogeneze i rozdílné imunogenní vlastnosti antigenů.

Adjuvans aktivuje dendritické buňky

Aktivace přímá

interakce složek adjuvans charakteru „PAMP“
s TLR i dalšími PRR

Aktivace nepřímá

prostřednictvím „DAMP“ uvolňovaných při
poškození tkání mikroby (kyselina močová,
ATP, HMGB-1)

Význam „fylogeneticky konservovaných“ struktur mikrobů.

Adjuvancia polarizují imunitní reakci

Adjuvancia obsahující ligandy TLR (např. monofosforyl lipid A – MPL) podporují odpověď **Th1 a CTL**,

Adjuvancia vedoucí k tvorbě DAMP (např. aluminium a MF59 – emulze squalenu, polyoxyethylen monooleátu a sorbitantrioleátu ve vodě) podporují odpověď **Th2 a B**.

Virosomy, liposomy, ISCOM se uplatňují při **zkřížené presentaci** a zapojení lymfocytů **T CD8+**.

Adjuvancia v humánních vakcínách

Sloučeniny alumina

DPT, DT, H. influenzae b, S. pneumonie,
HAV, HBV, inakt. poliovirus, HPV

Olej/voda-MF59

HSV, HBV, HIV

MPL– AS04/AS02

HAV, HBV, HPV, HIV, malarie, tbc, leishmaniasa

Virosomy (IRIV)

HBV, HPV/HAV

Podjednotka cholerového toxinu B

cholera

Adjuvans – dvě tváře

- Zesiluje, udržuje a směřuje imunogennost antigenu.
- Účinně moduluje imunitní reakci.
- Redukuje potřebné množství antigenu i nutnost opakovaného podání.
- Zlepšuje účinnost vakcin u novorozenců, starých osob i nemocných s podlomenou imunitou.
- Jejich význam je zvláště důležitý u molekulárně jednoduchých preparátů.
- *Má schopnost prolomit přirozenou imunologickou toleranci (experimentální autoimunitní choroby)*

Imunoglobulinové preparáty

Využití imunoglobulinových preparátů

Identifikace a kvantifikace antigenů (mikrobiologie, hematologie, transplantologie, klinická imunologie)

Imunoterapie a imunoprolaxe

(klasická pasivní imunizace, terapie nádorů, imunomodulace, především imunosuprese)

Izolace a purifikace antigenních preparátů

Příprava imunoglobulinových preparátů

Polyklonální „antiséra“ (hyperimunní séra) xenogenní

(imunizace zvířat – králík, koza, prase, kůň...)

alogenní (lidská od přirozeně i záměrně imunizovaných dobrovolníků)

Monoklonální protilátky

myší

modifikované (chimerické, humanizované, lidské)

Indikační skupiny imunoglobulinové léčby

Substituce tvorby protilátek

Primární imunodeficience

Sekundární imunodeficience

Imunoregulace

Autoimunitní choroby

Vaskulitidy

Alergická onemocnění

Léčba infekčních chorob - substituce i imunoregulace

Antiséra používaná v lidské medicíně

- Antibakteriální: tetanus (lidské), botulismus (koňské), antigangrenózní (koňské), záškrt (koňské)
- Protivirová: hepatitida B (lidské), vzteklna (koňské), varicella-zoster (lidské), CMV (lidské), klíšťová encefalitida (lidské), hepatitida A, spalničky a jiné virózy (nespecifický lidský imunoglobulin)
- Proti hadím a pavoučím jedům (koňská)
- Anti Rh (lidské)

Nespecifické (normální) imunoglobulinové deriváty

(příprava z plasmy 15 000-60 000 zdravých dárců krve)

Intravenózní - 5%:

7S - intaktní molekula IgG

5S - molekula IgG rozštěpena v pantové oblasti na fragmenty Fab₂ a Fc (Gama-Venin)

IgM, obohacené preparáty (Pentaglobin)

Intramuskulární 16% roztok převážně IgG

Subkutánní - jedná se v podstatě o intravenózní deriváty zahuštěné na 16%.

Indikace substituční imunoglobulinové léčby

IgG > 5 g/l: Při klinicky zřejmé imunodeficienci a poruše tvorby specifických protilátek.

5 g/l < IgG > 2 g/l: Při příznacích imunodeficiencie nebo poruše tvorby specifických protilátek.

IgG < 2 g/l: Jednoznačná indikace zahájení imunoglobulinové léčby.