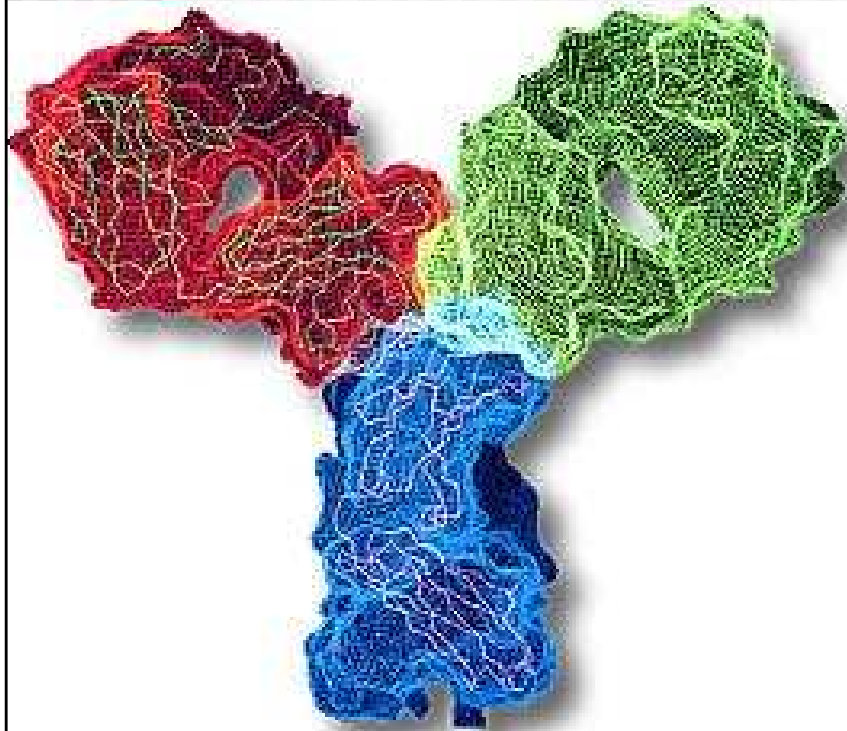


# Mikrobiální antigen, protilátka proti němu a jejich využití v diagnostice

pro studenty PŘF

hlavně pro obor

Obecná biologie



Ondřej Zahradníček

# Dnes máme na programu

---

- Krátký přehled interakcí makroorganismus – mikrob
- Stručný přehled imunologie s důrazem na postavení antigenu a protilátky v imunitním systému
- Význam antigenu a protilátky pro člověka, průběh protilátkové odpovědi
- Využití existence interakce antigen – protilátka v praktické mikrobiologické diagnostice (první část) → praktika

# Interakce mikrob – makroorganismus: obecně I

- Mezi **jakýmkoli dvěma komunikujícími organismy mohou existovat interakce**: mikrob – mikrob, makroorganismus – makroorganismus.
- Nás v tuto chvíli zajímá interakce mezi **mikrobem** (mikroorganismem) a **hostitelským organismem** (člověk, ale i zvíře, rostlina, jiný mikrob...), která má jistá specifika

# Interakce mikrob – makoorganismus: obecně II

---

- Může to být
- **kooperace** (člověk poskytuje útočiště střevním escherichiím a ty se mu za to odvděčí tvorbou vitamínů)
- vztah **výhodný jen pro jednoho**, druhému však nijak neškodí
- oboustranně **indiferentní vztah**
- **antagonistický vztah** (v důsledku vždy oboustranný) – **virulentní kmeny**

# Interakce mikrob – makoorganismus: obecně III

Mnohé ze vztahů, o kterých byla řeč, souvisí i s potravními řetězci:

- **komenzalizmus** – dělení se o potravu (např. naši střevní komenzálové)
- **saprofytismus** – získávání energie ze zbytků (např. odumřelých epitelíí)
- **parazitismus** – dlouhodobé a postupné získávání energie ze živých buněk jiného organismu (× predace, která je jednorázová, krátkodobá)

**Virulentní mikroby** jsou zpravidla parazitické. Nemusí ale být – škodlivost není přímo vázána na získávání potravy.

# Patogenita a virulence

---

- **Patogenita** je vlastnost určitého druhu mikroorganismu způsobovat postižení makroorganismu. Obligátní patogeny jsou patogenní vždy, oportunní jen za určitých okolností
- **Virulence** je vlastnost určitého kmene. V rámci patogenního druhu mohou být různě virulentní kmeny
- Proti virulentním kmenům **se makroorganismus brání**

# Interakce mikrob – makoorganismus: mikroby napadající člověka

---

- Mikroorganismy, které napadají člověka, jsou vybaveny různými **faktory virulence** – jsou to faktory, které zajišťují schopnost mikroba proniknout do organismu. Nejčastěji to bývají různé enzymy, toxiny, bakteriální pouzdro aj.
- Makroorganismus se mikrobům brání řadou různých způsobů. Jde vždy o to, zda se více prosadí faktor virulence mikroba, nebo **mechanismus obranyschopnosti makroorganismu**

# Imunologický přehled

- Imunologie coby věda o mechanismech obranyschopnosti úzce souvisí s mikrobiologií jako oborem, ale i s mikrobiologickou diagnostikou. Historicky se imunologie zrodila „z lůna mikrobiologie“ jako její podobor, později se osamostatnila a posunulo se její těžiště: vedle obrany proti infekci se dnes zabývá autoimunitou, protinádorové imunitě, a podobně.



# Nechci lézt imunologům do jejich zelí...

---

- ... ale neubráním se alespoň **krátkému přehledu mechanismů** obranyschopnosti organismu
- nevím totiž, co vše z této oblasti víte či nevíte
- některé věci z toho, co teď uslyšíte, budeme potřebovat v dalších částech výkladu
- a konec konců, „repetitio mater studiorum“ (opakování matkou moudrosti)

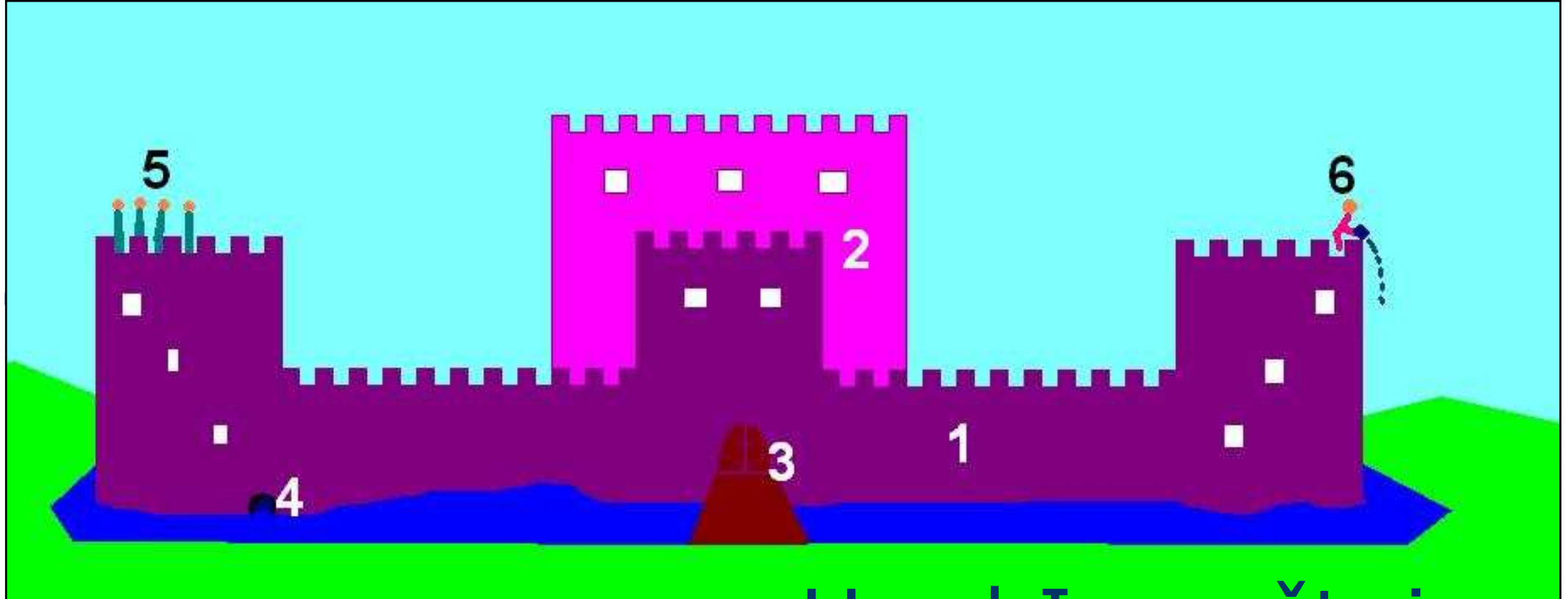
# Základní rozdělení mechanismů obranyschopnosti organismu

Anatomické bariéry a funkční mechanismy		
imunita Vlastní	Nespecifická buněčná	Nespecifická látková
	Specifická buněčná	Specifická látková

# Anatomické bariéry a funkční mechanismy

---

- **Kůže** – neporušenou kůží proniká jen málo mikrobů
- **Sliznice** – zranitelnější, ale zase má spoustu mechanismů, jak čelit infekci
- **Funkční mechanismy**: pohyb řasinek, kýchání, kašláni, smrkání, zvracení, průjem, močení (vypuzení proudem moče)
- **Prostředí nevyhovující mikrobům**: nízké poševní pH, zvýšená teplota u viróz apod.



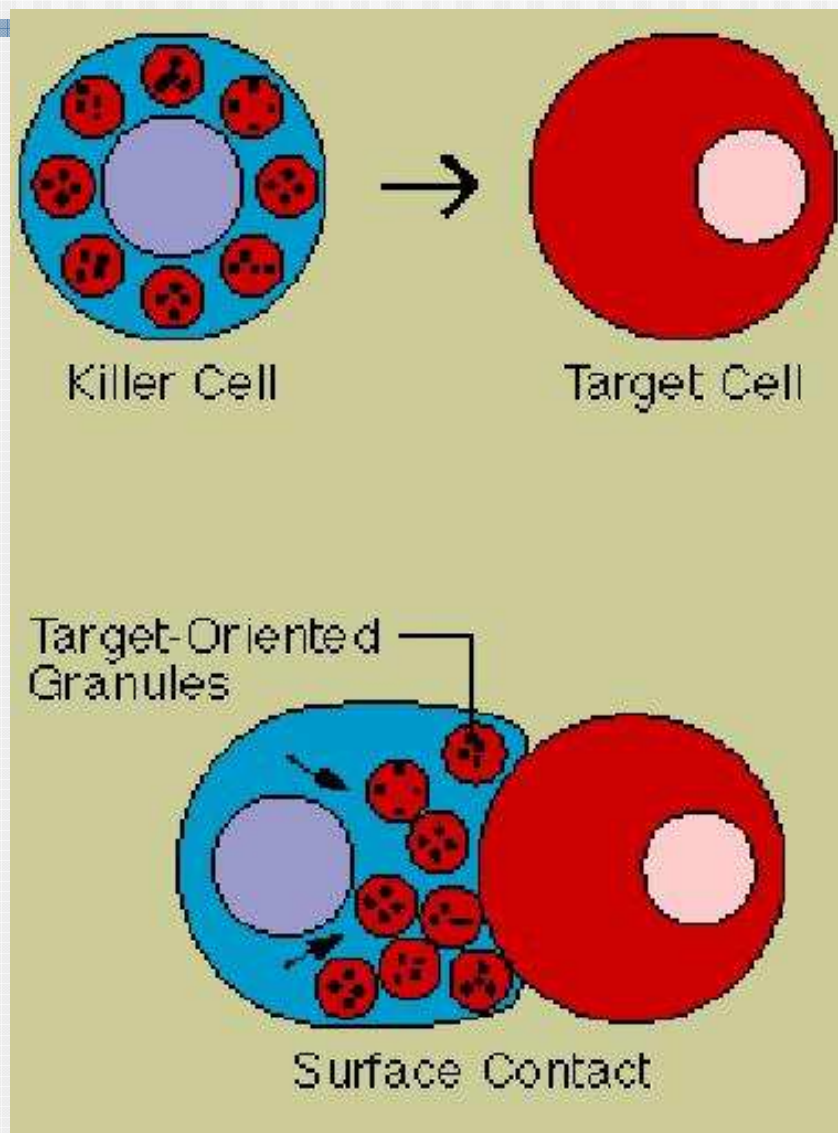
## Hrad Imunštejn

- 1 – vnější hradba (kůže)
- 2 – vnitřní opevnění (hematoencefalická bariéra)
- 3 – dubová brána (sliznice – slabší než hradby, ale pevná)
- 4 – stoka (teoreticky možnost vniknout dovnitř, ale proud odpadní vody brání vniknutí)
- 5 – obránci hradu (buněčná imunita)
- 6 – vylévání horké vody přes hradby (vylévání produktů toxických pro útočníka, humorální imunita)

# Nespecifická buněčná imunita

- **neutrofilly** – je jich nejvíc, krátká životnost, nedělí se, musí "uzrát" nové
- **monocyty** (v periferní krvi) / makrofágy - (ve tkáních) – dlouhá životnost, mohou se dělit
- **eozinofily** - zmnoženy u některých typů alergie a u infestací červy
- **bazofily** (v krvi) / **mastocyty** (ve tkáních) – po aktivaci (kontaktu s cizorodým materiálem) uvolňují histamin a jiné látky
- **z lymfocytů NK-buňky** (z angl. natural killer) přímo, bez imunizace zabíjejí cizorodé nebo i vlastní, ale "zvrhlé" buňky (nádorové, nakažené)

# Různé typy bílých krvinek



# Nespecifická humorální imunita 1

- **Histamin** a další látky uvolňované bazofily – rozvoj takzvaných atopických příznaků – rýma, astma, kopřivka
- **Komplement** = 7 – 10 % sérových globulinů, hlavně z  $\beta$ -frakce; může být aktivován nespecificky (pomalu) nebo pomocí protilátek (rychle). Funkce:
  - **chemotaxe** – "přilákání" bakterií
  - **opsonizace** – "ochucení" bakterií, aby "chutnaly" leukocytům
  - **podíl na ničení bakterií** a jiných cizorodých faktorů

# Nespecifická humorální imunita 2

- **Interleukiny** – produkovány různými leukocyty po kontaktu s cizorodým materiálem, mnoho typů, funkce:
  - **horečka** (protože zvýšená teplota ničí některé mikroby, zejména viry)
  - **mobilizace některých hormonů** a naopak utlumení těch, které nejsou při infekci potřeba
  - spousta **dalších vlivů** na chování makroorganismu
- **Lymfokiny** – produkovány některými lymfocyty, funkce:
  - **"přilákání" a aktivace buněk**, zodpovědných za zánět (neutrofily, makrofágy)
  - podpora **množení aktivovaných lymfocytů**
- **Interferon** – účinný proti virům a některým nádorům



# Specifická buněčná imunita: zaměřená hlavně na nitrobuněčné parazity (viry, TBC)

- **Lymfocyty** – vznik v kostní dřeni, vyskytují se hlavně v mízních uzlinách a slezině, při kontaktu s cizorodým materiálem se začnou mohutně množit
- **T-lymfocyty** – zrají částečně v brzlíku – jsou zodpovědné za buněčnou imunitu
- **B-lymfocyty** (v krvi) / **plasmatické buňky** (v lymfoidních tkáních) – produkují protilátky specificky proti "svým" antigenům (viz dále)

# Specifická látková imunita – nejdříve co je to **antigen** a **protilátka**

## Co je to antigen?

- je to cizorodá struktura, která vyvolává tvorbu **protilátek** (viz dále)
- je to vždy **makromolekula** (bílkoviny, polysacharidy, nukleové kyseliny); malé molekuly jsou antigenní jen po navázání na makromolekulu

# Příklady antigenů

- **mikrobiální antigeny** (různé povrchové struktury mikrobů – bílkoviny, polysacharidy apod.)
- **alergeny** – antigeny ze zevního prostředí, které vyvolávají přecitlivělost
- **autoantigeny** – vlastní antigeny, které se změnily a imunitní systém je přestal tolerovat
- **nádorové markery** – změněné znaky na nádorových buňkách
- **histokompatibilní (HLA)** – antigenní znaky na vlastních buňkách, význam při transplantacích, určení otcovství. Organismus jimi rozeznává "svoje" od "cizího"

# Protilátka (specifická humorální imunita)

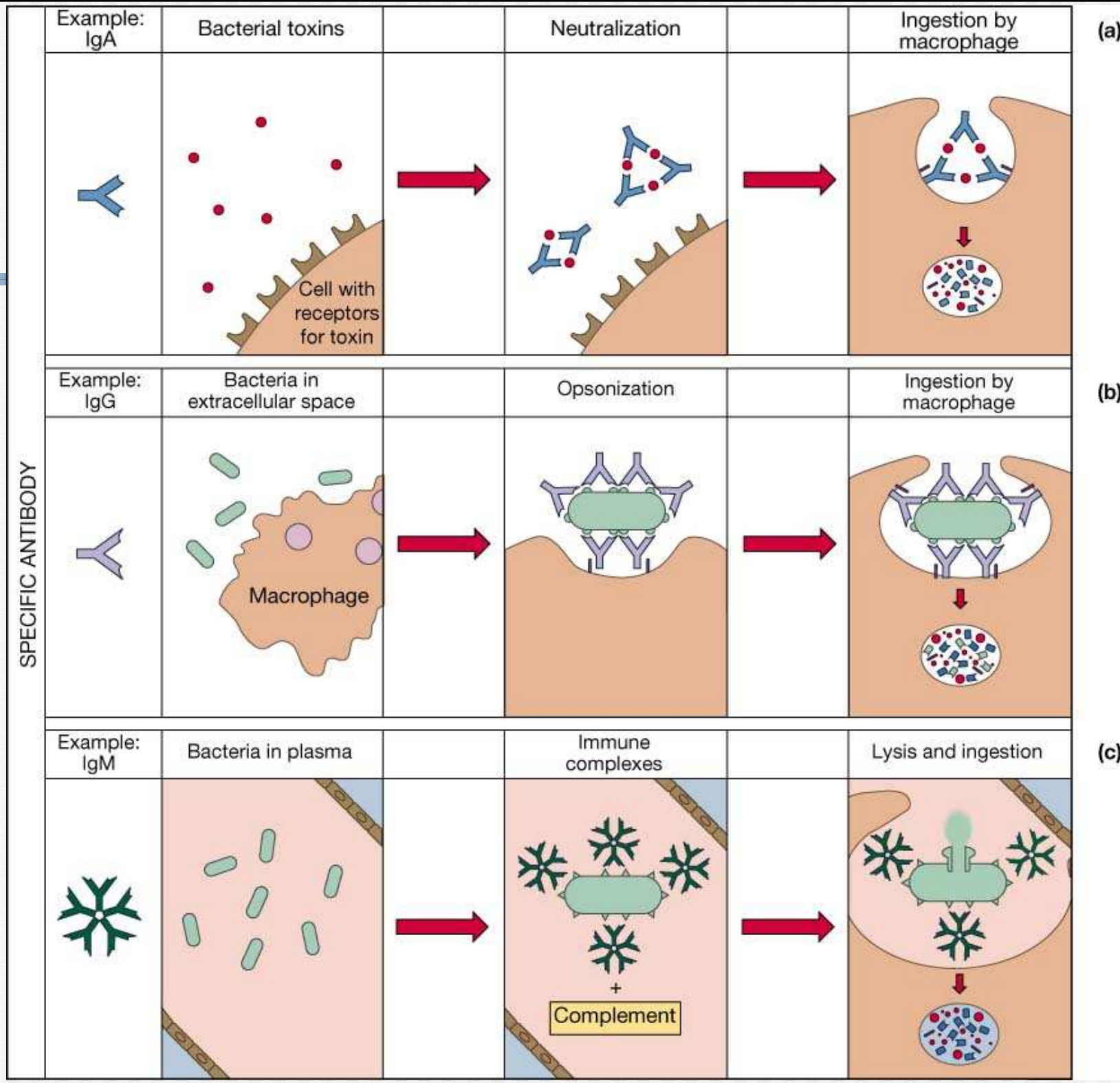
- **protilátky – gama globuliny**, v séru i tkáních, produkovány B-lymfocyty. Protilátka se vždy vytváří jako odezva makroorganismu na podráždění určitým mikroblem.
- **účinky:**
  - **přímé zneškodnění** – možné jen u virů a bakteriálních jedů, ne však (zpravidla) u celých bakterií
  - **opsonizace** ("ochucení" bakterií)
  - **posílení funkce komplementu**



# Třídy protilátek

- **IgG** – největší část protilátek, začnou se tvořit později, ale po prodělané infekci zůstává celoživotně určitá hladina IgG proti danému mikrobu; á hladina ukazuje na chronic. infekci; procházejí placentou
- **IgM** – velká molekula, placentou neprocházejí; tvoří se jako první při infekci i očkování; á hladina ukazuje na čerstvou infekci, nepřetrvává dlouho
- **IgA** – hlavně na sliznicích (slizniční imunita)
- **IgD** – stopová množství, funkce málo známá
- **IgE** – souvisí s přecitlivělostí (alergií)

# Různé funkce protilátek



# Protilátky a průběh infekce

- při infekci se jako první tvoří IgM, jejich hladina ale brzo zase klesá
- až později se začínají tvořit i IgG, přetrvávají však dlouhodobě až celoživotně

# Protilátky a mateřství

- při narození má novorozenec nejprve IgG od matky
- pak si sám začne tvořit své vlastní IgG a pak i IgM



# Lymfoidní tkáň – kde se soustřeďují buňky imunitního systému

---

- **lymfatické uzliny, slezina** – obsahují hlavně T-lymfocyty a plasmatické bb.
- **roztrožené lymfoidní tkáň** všude ve sliznicích, někde méně, někde (červovitý výběžek slepého střeva) více
- pro imunitu nepostradatelná **játra**

# Poruchy imunity

---

- **Kvantitativní „mínus“:** imunodeficiency (vrozené či získané)
- **Kvantitativní „plus“:** přemrštěná imunita, alergie a jim podobné reakce
- **Kvalitativní:** imunita působí proti tomu, proti čemu nemá (autoimunita, napadající vlastní buňky)

# Imunodeficiency (některé složky imunitního systému chybějí nebo jsou defektní) – 1

---

- Deficiency nespecifické buněčné imunity (tj. hlavně různých bílých krvinek kromě lymfocytů)
  - sklon ke kožním infekcím a abscesům
  - léčba: transfúze leukocytárních koncentrátů
- Deficiency nespecifické humorální imunity (hlavně komplementu)
  - sklon k bakteriálním infekcím
  - léčba: mražená plasma (obsahuje komplement)

# Imunodeficiency (některé složky imunitního systému chybějí nebo jsou defektní) – 2

---

- Deficiency specifické buněčné imunity (T-lymfocytů)
  - sklon k infekcím virovým, parazitárním, plísňovým, tuberkulóze
  - do této skupiny patří i AIDS
- Deficiency specifické humorální (= protilátkové) imunity
  - chybí některé imunoglobuliny, sklon ke všem infekcím, hlavně bakteriálním
  - léčba: pacientovi se dodají čištěné imunoglobuliny, nejlépe lidské

# Imunologická přecitlivělost

je chorobný stav nadměrné imunity

- Alergie časného typu – atopická onemocnění
  - po kontaktu s alergenem (pyl, prach, roztoči, chlad, plísně, potraviny) se uvolní IgE, histamin a látky rozšiřující cévy
- projevy mohou být různé, i podle typu kontaktu
  - alergická rýma
  - atopické astma ("záducha" v průduškách)
  - atopická dermatitida (kopřivka)
  - průjmy, zvracení, bolesti břicha
  - anafylaktický šok – nejzávažnější, při proniknutí alergenu do krevního oběhu

# Další typy přecitlivělosti

- Přecitlivělost pozdního typu
  - souvisí s buněčnou imunitou
  - po setkání se známým antigenem se projeví se zpožděním (24 – 48 h)
  - neinfekční záněty kůže – např. po chemikáliích; odvrhnutí štěpu (někdy až po letech); využití: tuberkulínová zkouška
- Přecitlivělost cytotoxická a imunokomplexová
  - buňky poškozeny specifickými protilátkami a jejich komplexy s antigenem (imunokomplexy) – např.: transfúzní reakce, sérová nemoc, hemolytické anémie
- Přecitlivělost stimulační
  - přecitlivělost vyvolává nadprodukcí některých hormonů (např. štítné žlázy)

# Nemoci z autoimunity

---

- porušena tolerance vlastních antigenů
- např.: různé krvácivé a revmatické nemoci
- příčina: zpravidla jistá antigenní „podobnost“ některých vlastních struktur s některými mikroby

# Imunoterapie (léčení imunopreparáty)

---

(profylaxe, prevence i léčení chorob)

- **Imunizace** – bude probrána příště
- **Imunosuprese** – potlačení imunitních reakcí - u nadměrné nebo špatné imunity
- **Imunostimulace** – povzbuzení nedostatečné imunity
- **Desenzibilizace** – podávají se mikrodávky antigenu, aby si na ně organismus "zvykl" a nereagoval přehnaně; dávky se postupně zvyšují



# Úvodem k druhé části

- V této části se již budeme zabývat mikrobiologickou diagnostikou, ale využijeme to, co jsme si řekli v části první. Nejvíc si pamatujme to, co jsme se dozvěděli o specifické humorální imunitě: je založena na interakci **antigenů** (v případě mikrobiálních antigenů jde o povrchovou část těla mikroba) s **protilátkou** (imunoglobulinem, který je tvořen makroorganismem).

# Pro zopakování:

## Metody lékařské mikrobiologie

---

- **Přímé metody:** detekce mikroba, jeho části nebo produktu. Mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, **průkaz antigenu**. **Pozitivita** = je jisté, že agens je NYNÍ přítomno.
- **Nepřímé metody: detekce protilátek** proti mikrobovi. **Pozitivita** = mikrob potkal hostitele v minulosti (nevíme, zda před týdny / měsíci / roky)

# Typy mikrobiálních patogenů

---

- **Snadno kultivovatelné a mikroskopovatelné** (stafylokoky, escherichie). Stačí poslat vzorek „na bakteriologii“, a ono z něj něco vyroste
- **Kultivovatelné / mikroskopovatelné speciálními metodami** (mykobakteria, mykoplasmata...)
- **Nekultivovatelné** (nebo jen velmi obtížně): **používáme zpravidla nepřímý průkaz** (spirochety, většina virů)

# Antigen a protilátka - opakování

---

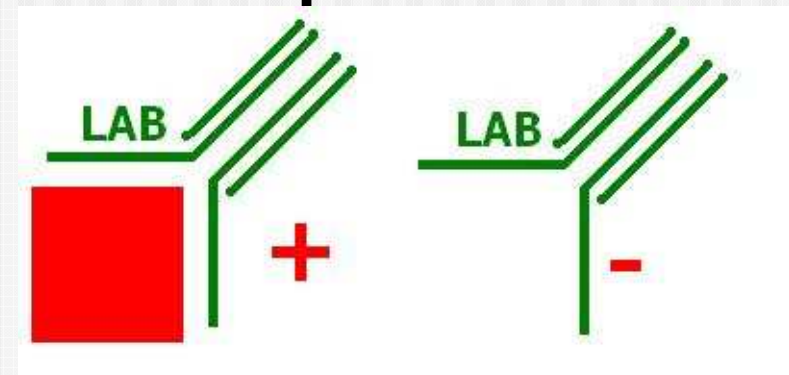
**Antigen** = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

**Protilátka** = imunoglobulin, tvořený v těle hostitele jako odpověď na antigenní výzvu (samozřejmě nejen u člověka, ale i u zvířat)

# Dva způsoby, jak to využít:

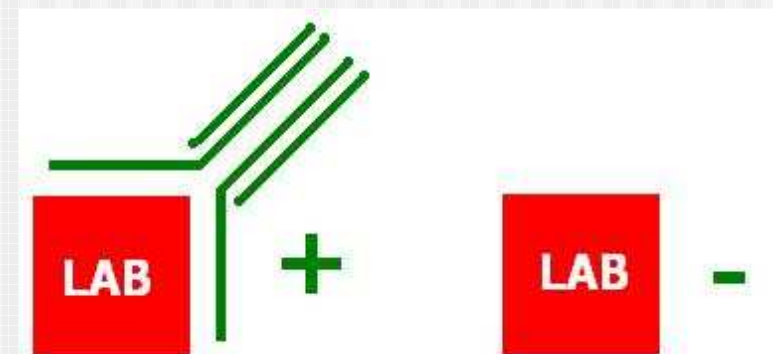
**Průkaz antigenu:** laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

Přímá metoda



**Průkaz protilátky:** laboratorní antigen (mikrobiální) + sérum (výjimečně sliny, likvor) pacienta

Nepřímá metoda



# Průkaz antigenu a antigenní analýza

---

- **V rámci průkazu antigenu** (tedy přímého průkazu) lze ještě dále rozlišit dva podtypy:
  - **Přímý průkaz antigenu ve vzorku**, například ve vzorku mozkomíšního moku
  - **Antigenní analýza (identifikace) kmene**, izolovaného ze vzorku (například kmene meningokoka)
- U **nepřímého průkazu** naopak vždy pracujeme se vzorkem, a to **se vzorkem séra**, kde hledáme protilátky

# Interpretace

- **Průkaz antigenu** (včetně antigenní analýzy) je přímá metoda. Pozitivní výsledek znamená přítomnost mikroba v těle pacienta
- **Průkaz protilátek:** je to nepřímá metoda. Nicméně jsou způsoby, jak alespoň odhadnout, kdy přibližně se mikrob s tělem pacienta setkal:
  - **Množství protilátek** (relativní – **titr**)
  - **Třída protilátek:** IgM/IgG (více v dalších př.)
  - (*Avidita protilátek*)

# Jak tyto informace zjistit

- **Akutní infekce:** velké množství protilátek, převážně třídy IgM 1
- **Pacient po prodělané infekci:** malá množství protilátek, hlavně IgG (imunologická paměť) 2
- *Chronická infekce: různé možnosti*





# Jak provést reakci „kvantitativně“

---

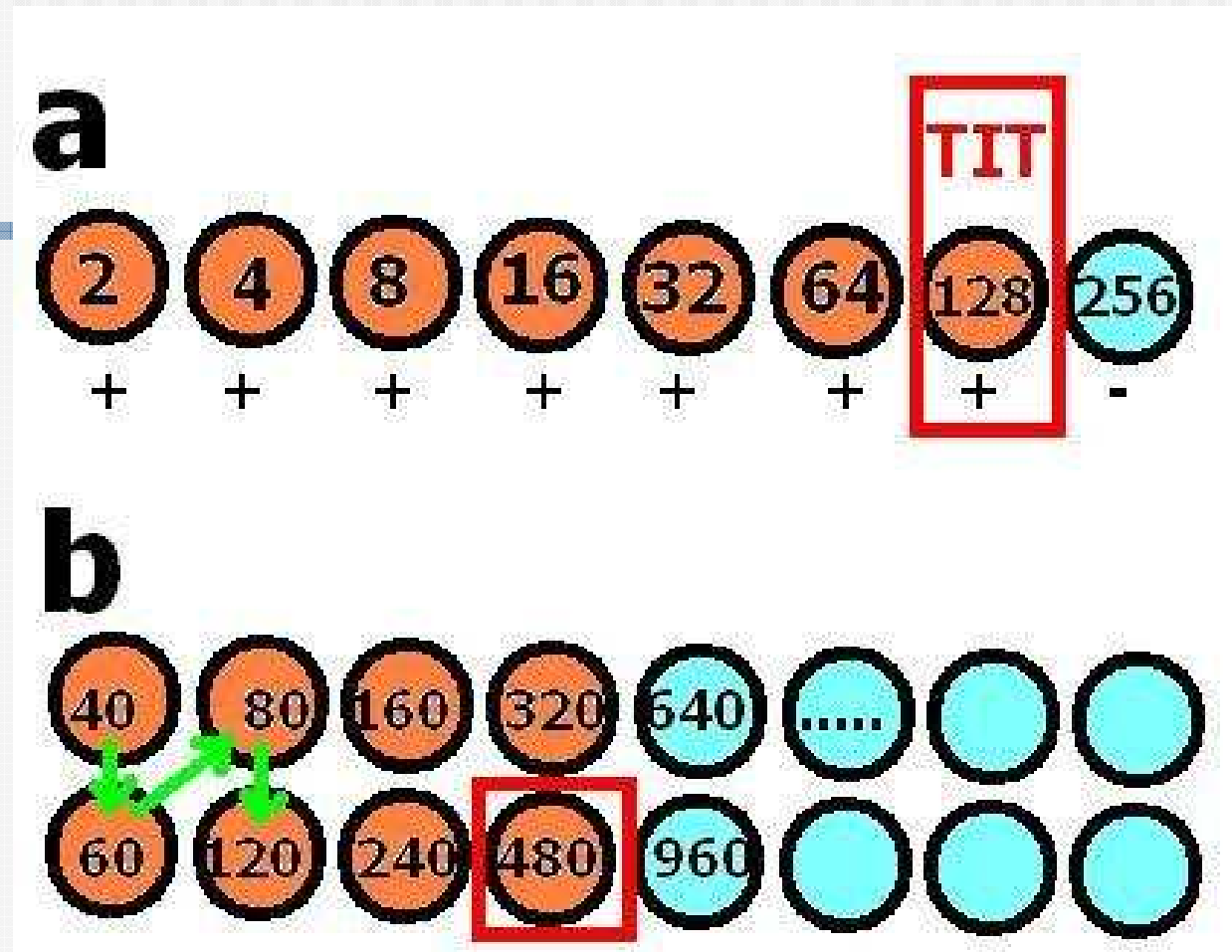
- Je velmi těžké zjistit koncentraci protilátek v jednotkách mol/l, mg/l apod.
- Ale dá se dělat jiná věc: mnohonásobně ředit pacientovo sérum.
  - Reaguje-li i po mnohonásobném ředění → → v séru je velké množství protilátky
  - Reaguje jen při nevelkém zředění séra → → jen malé množství protilátky

# Obvyklý způsob ředění: Geometrická řada

---

- Můžeme vyjít z **neředěného vzorku séra**
  - V první zkumavce smícháme se stejným objemem diluentu (FR),  $\rightarrow$  ředění 1 : 2
  - Polovina ředění 1 : 2 je přemístěna do další zkumavky a smíchána s opět stejným množstvím diluentu  $\rightarrow$  1 : 4
  - Jedna polovina z 1 : 4 .....  $\rightarrow$  1 : 8
- Pokud vyjdeme z **předředěného vzorku séra** (např. 1 : 10), postupuje ředění od tohoto předředění (1 : 20, 1 : 40, 1 : 80).

# Pojem TITR



**Tit** – nejvyšší ředění, kde je pozitivní reakce. Máme-li dvě řady, je titrem nejvyšší ředění z obou řad dohromady.

# Zapamatujte si:

---

- Veškeré „srandičky“ typu titry, třídy protilátek, zjišťování avidity, slouží k odlišení akutní infekce, chronické infekce a stavu po dávno prodělané infekci. Týkají se pouze **nepřímého průkazu!**
- **Přímý průkaz** totiž přímo prokazuje v těle pacienta část patogenova organismu. Není tedy nutné žádné další upřesnění

# Typy serologických reakcí a jejich způsoby využití

	<b>Průkaz antigenu</b>	<b>Antigenní analýza</b>	<b>Nepřímý průkaz</b>
<b>Aglutinace</b>	občas	často	někdy
<b>Precipitace</b>	málokdy	málokdy	občas
<b>KFR</b>	často (viry)	ne	často (viry)
<b>Neutralizace</b>	občas	ne	často
<b>Značené složky</b>	velmi často	výjimečně	velmi často

# Precipitace, aglutinace, aglutinace na nosičích

---

- **Precipitace:** Antigeny jsou ve formě izolovaných makromolekul (koloidní antigen)
- **Aglutinace:** Antigen je součástí buňky mikroba (pracujeme tedy s celými mikroby)
- **Aglutinace na nosičích:** Původně izolované antigeny jsou navázány na nosič (latex, erytrocyt, polycelulóza)

# Schematické rozdíly

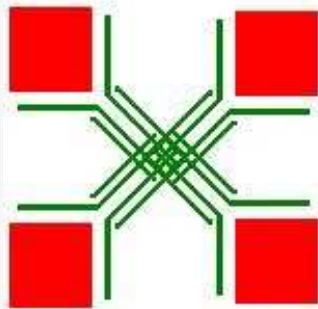
1 – precipitace

2 – aglutinace

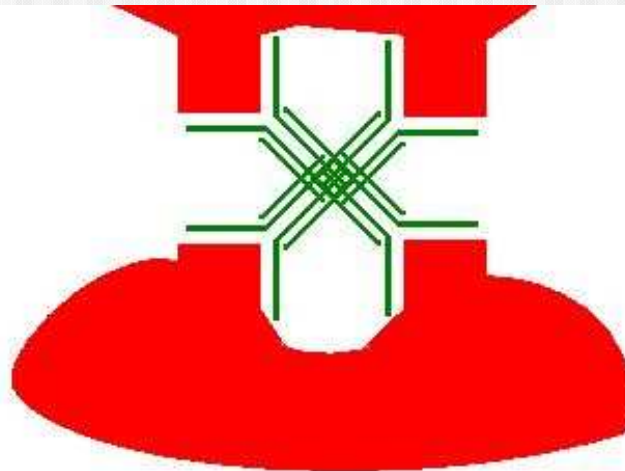
3 – aglutinace na nosiči



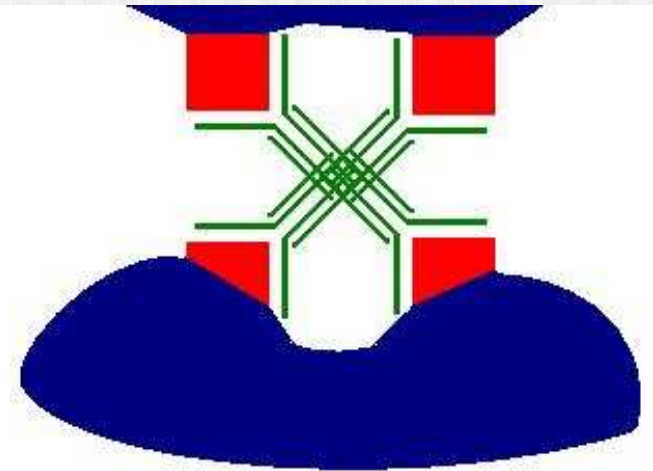
1



2



3



# Aglutinace k přímému průkazu

---

- Průkaz antigenu ve vzorku
  - Aglutinace mozkomíšního moku pomocí komerčně dodávané soupravy (v praktiku uvidíte video)
- Antigenní analýza kmene
  - Sklíčková aglutinace či modernější na kartonových kartičkách (salmonely, EPEC, hemofily, meningokoky...)



# Příklad: Antigenní analýza Enteropatogenní *Escherichia coli*

- Většina kmenů *Escherichia coli* je „hodných“
- Ze všech antigenních typů *E. coli* je asi 12, které jsou „enteropatogenní“ – mohou dělat novorozenecké průjmy
  - Použijeme polyvalentní séra: nonovalentní obsahuje protilátky proti devíti typům EPEC, trivalentní proti dalším třem. Zákal = pozitivita
  - Pokud jedno ze sér (A či B) je „+“, musíme pokračovat s tri- a monovalentními séry
- *Je vám jasné, proč tu neurčujeme titry?*

# Aglutinace k nepřímému průkazu

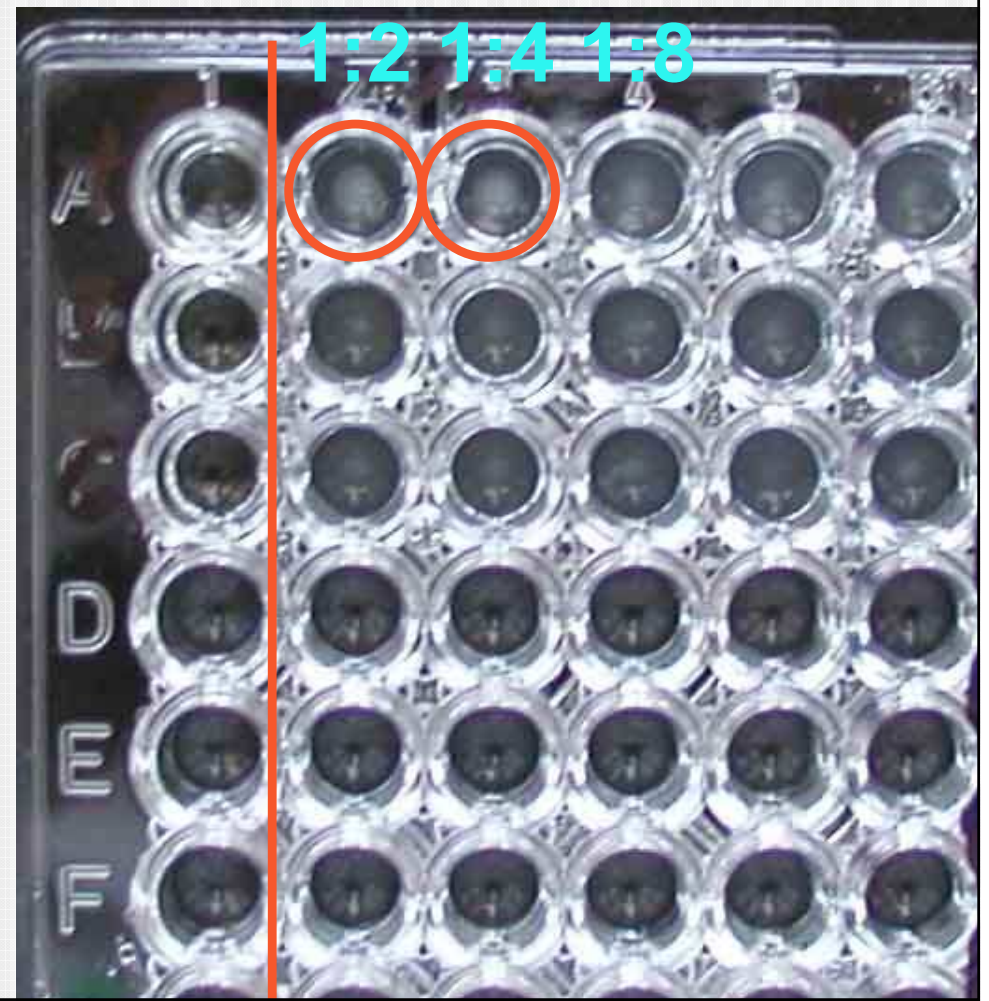
---

- Reakce ve zkumavkách
  - Kdysi klasická, dnes spíše výjimečně, např. Widalova reakce u břišního tyfu
- Mikroreakce v plastové mikrotitrační destičce
  - Ve většině situací nahradila klasické zkumavkové reakce. Používá se např. u tularémie, yersinií a mnoha dalších
  - Používá se i v případě **aglutinace na nosičích**, např. u TPHA

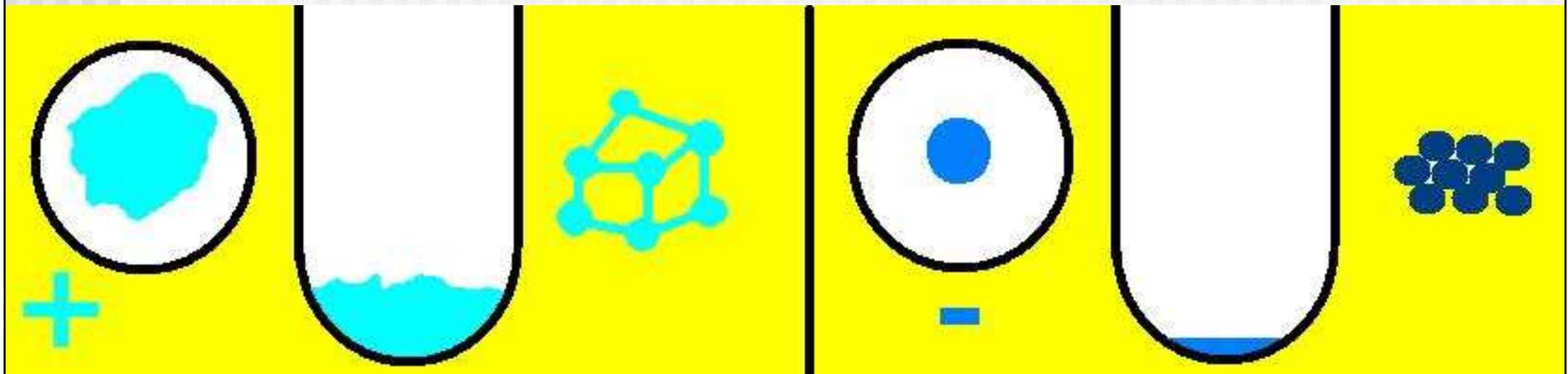
# Příklad: aglutinační reakce na průkaz protilátek u tularemie

(ze stránky [www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)):

V prvním sloupci jsou kontroly, vlastní reakce začíná od druhého sloupce



# Vzhled pozitivních a negativních jamek u tohoto typu aglutinace

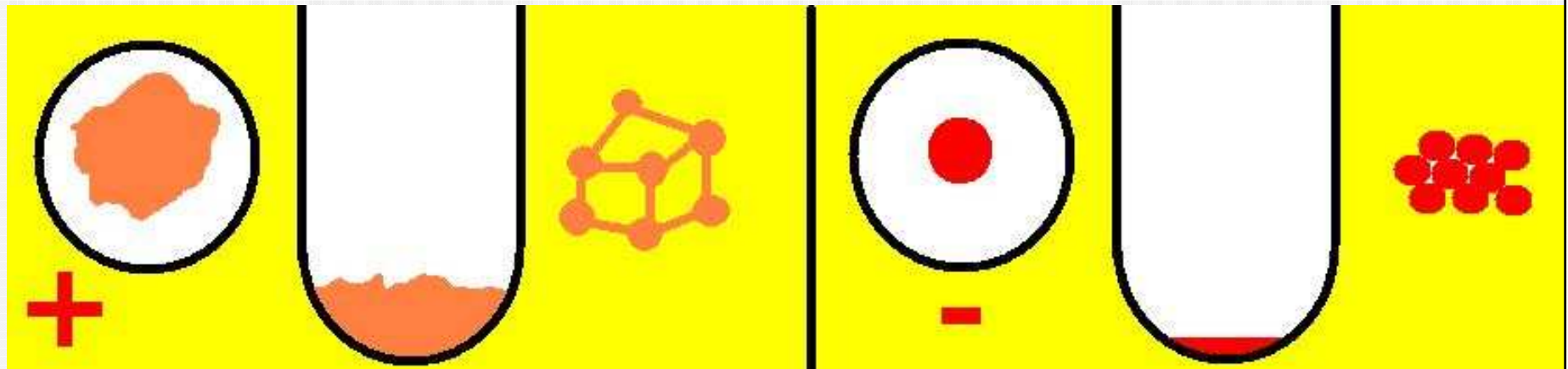


**Pozitivní** – nepravidelný chuchvalec

**Negativní** – malé pravidelné kolečko

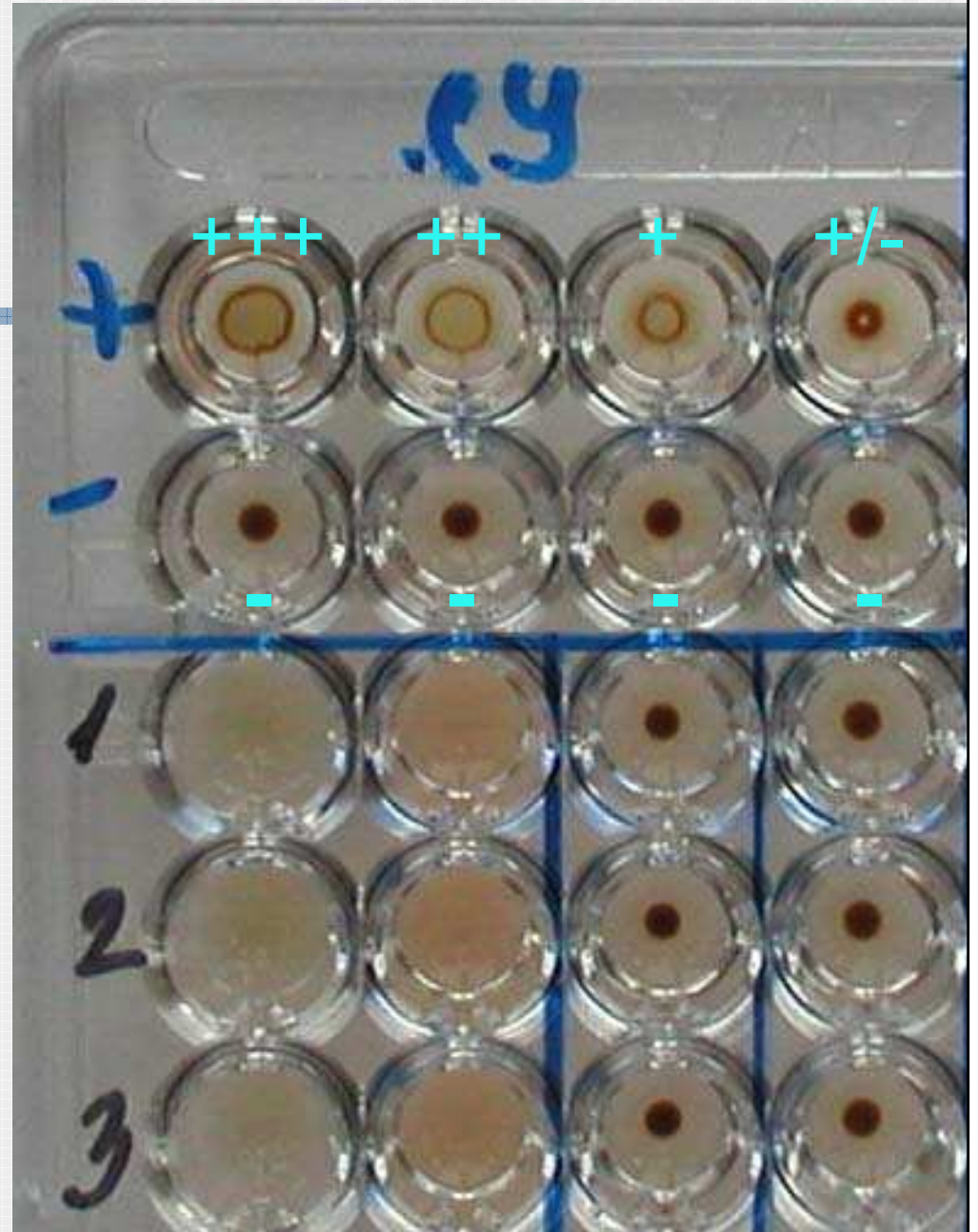
# Treponema pallidum haemaglutinace (TPHA)

- Použijeme červené krvinky, na které je teprve navázán vlastní antigen *T. pallidum* (*Dnes se v tomto testu červené krvinky nahrazují polycelulózovými částicemi – v tom případě jde o TPPA (T. p. polycelul. aglut.)*)
- Tato reakce je sice nepřímý průkaz, ale nepoužívá se ředění a nezjišťují titry. Je to totiž screeningová reakce a případná pozitivita se ověřuje spolehlivějšími metodami



# Demonstrate TPHA

([www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))



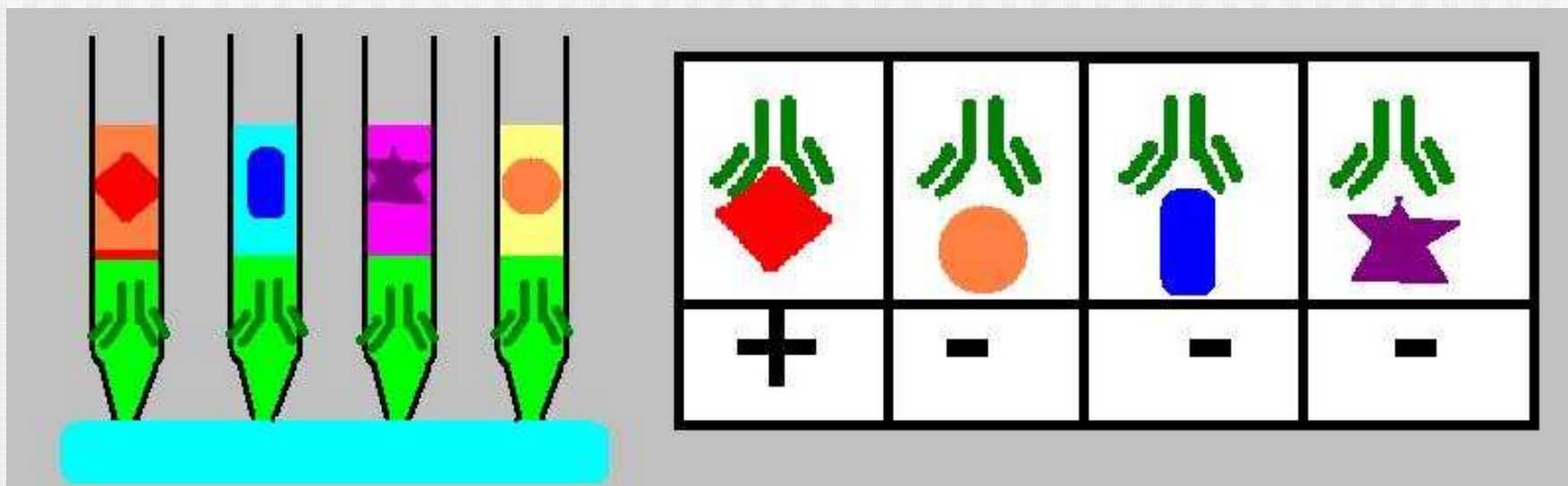
# Precipitace k přímému průkazu

---

- Dnes už se prakticky nepoužívá. Jen pro zajímavost uvádíme dnes už historickou reakci k antigenní analýze kmene streptokoka
- Tímto testem se z několika kmenů vybíralo, který je pozitivní v reakci se specifickým antisérem (tj. který náleží k dané séroskupině)

# Prstencová precipitace

- Precipitace k detekci antigenu:
  - 1) zvířecí sérum s protilátkami
  - 2) čtyři různé extrakty kmenů
  - 3) pozitivita: na styku tekutin prstenec





# Precipitace k průkazu protilátek

---

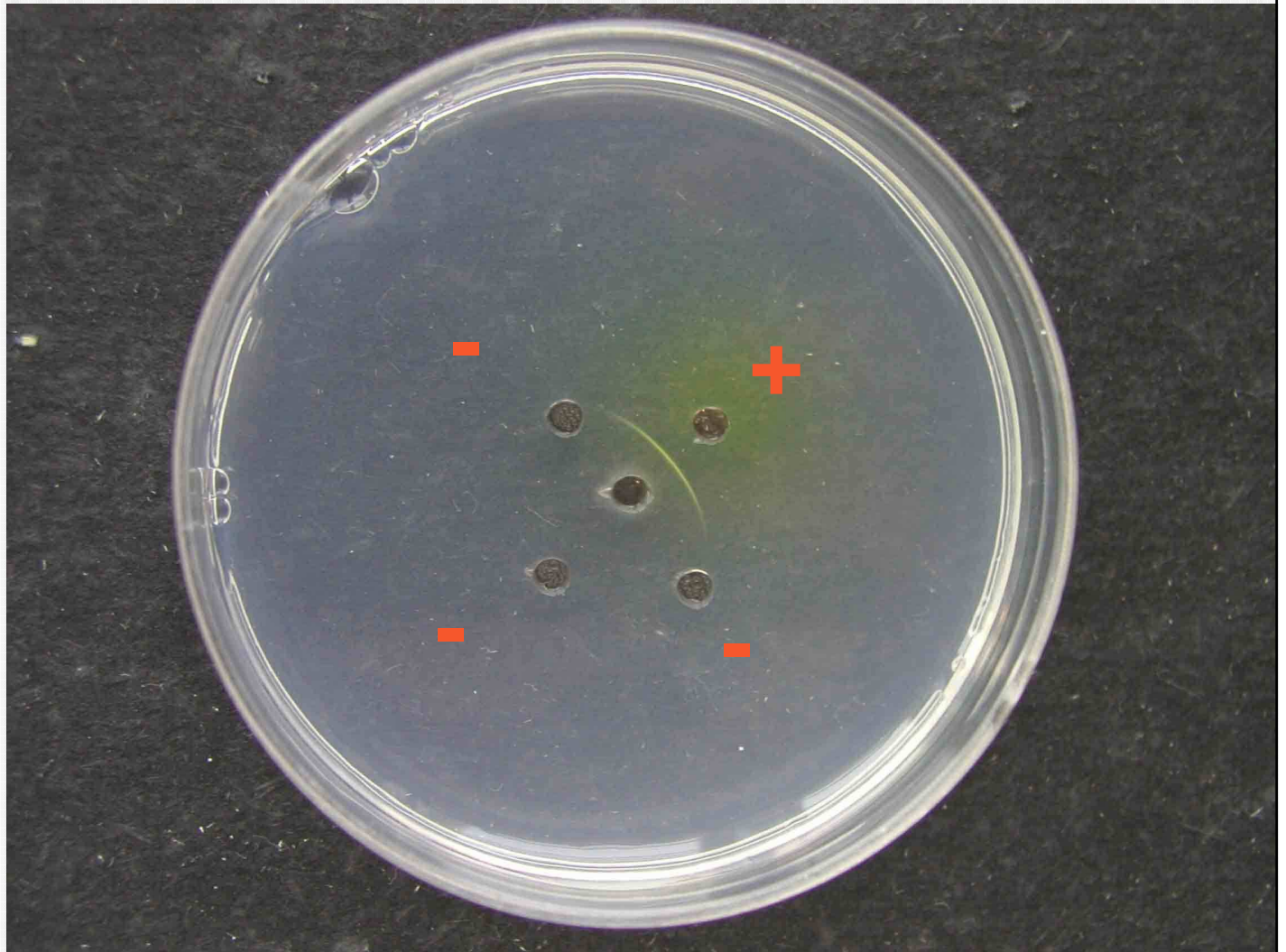
- Dnes už se také používá mnohem méně než dříve, přesto nějaká uplatnění jí ještě zůstala
  - Precipitace v důlcích panelu, např. RRR (zvláštností jsou zde tzv. heterofilní protilátky)
  - Precipitace v agaru, např. dle Ouchterlonyho

# Příklad precipitace: RRR (rychlá reaginová reakce)

- Detekce protilátek, které jsou pozitivní u syfilis, ačkoli to nejsou protilátky proti *Treponema pallidum*, nýbrž proti kardiolipinu (látko, která se objevuje u syfilitiků)
- Takovým reakcím říkáme **průkaz heterofilních protilátek** – jsou to tedy protilátky, které nejsou zaměřené proti antigenu mikroba, ale proti jinému antigenu, který je v době výskytu mikroba přítomen v těle pacienta

# Demonstrace jiného typu precipitace

Tzv. mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho



# Pro dnešek děkuji za pozornost

