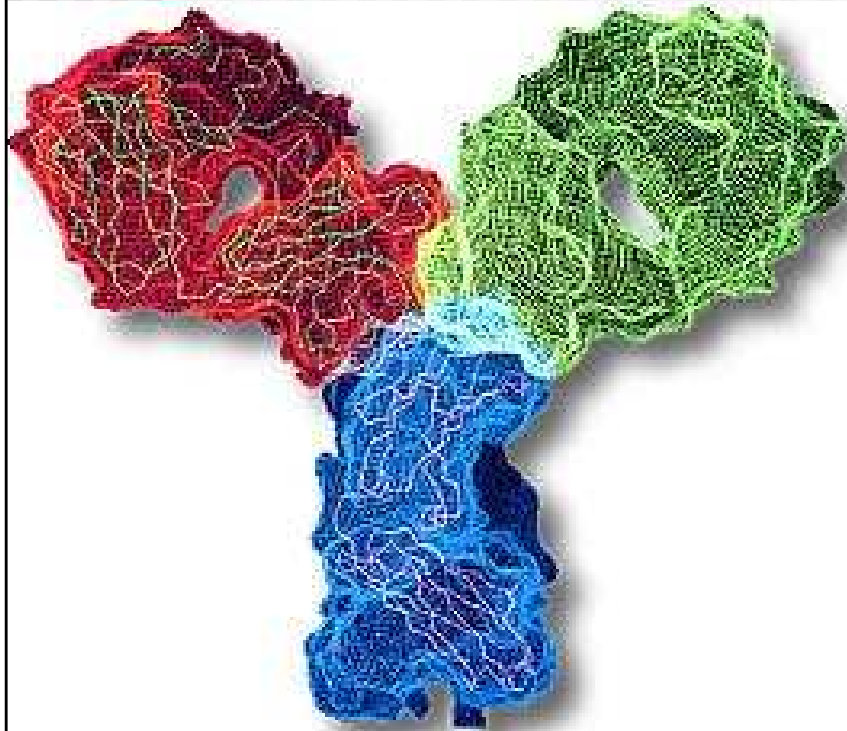


Mikrobiální antigen, protilátka proti němu a jejich využití v diagnostice

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...

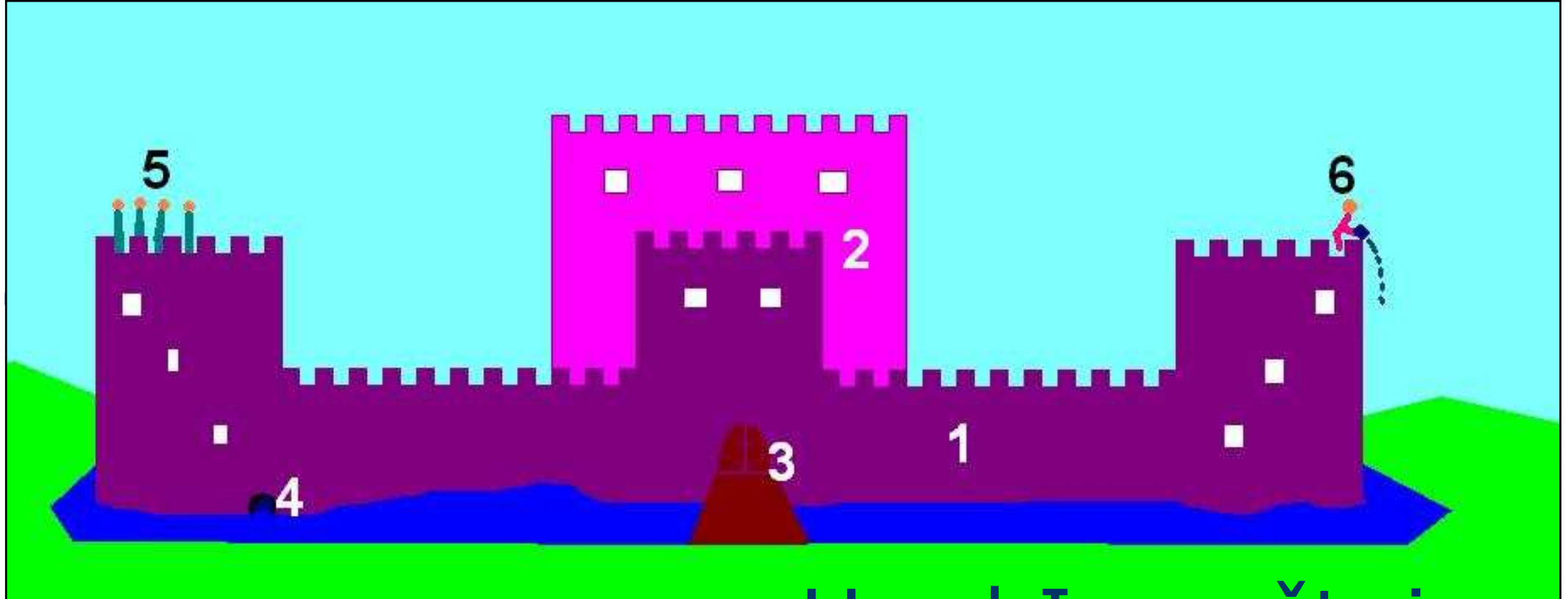
- ... ale neubráním se alespoň **krátkému přehledu mechanismů** obranyschopnosti organismu
- nevím totiž, co vše z této oblasti víte či nevíte
- některé věci z toho, co teď uslyšíte, budeme potřebovat v dalších částech výkladu
- a konec konců, „repetitio mater studiorum“ (opakování matkou moudrosti)

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.



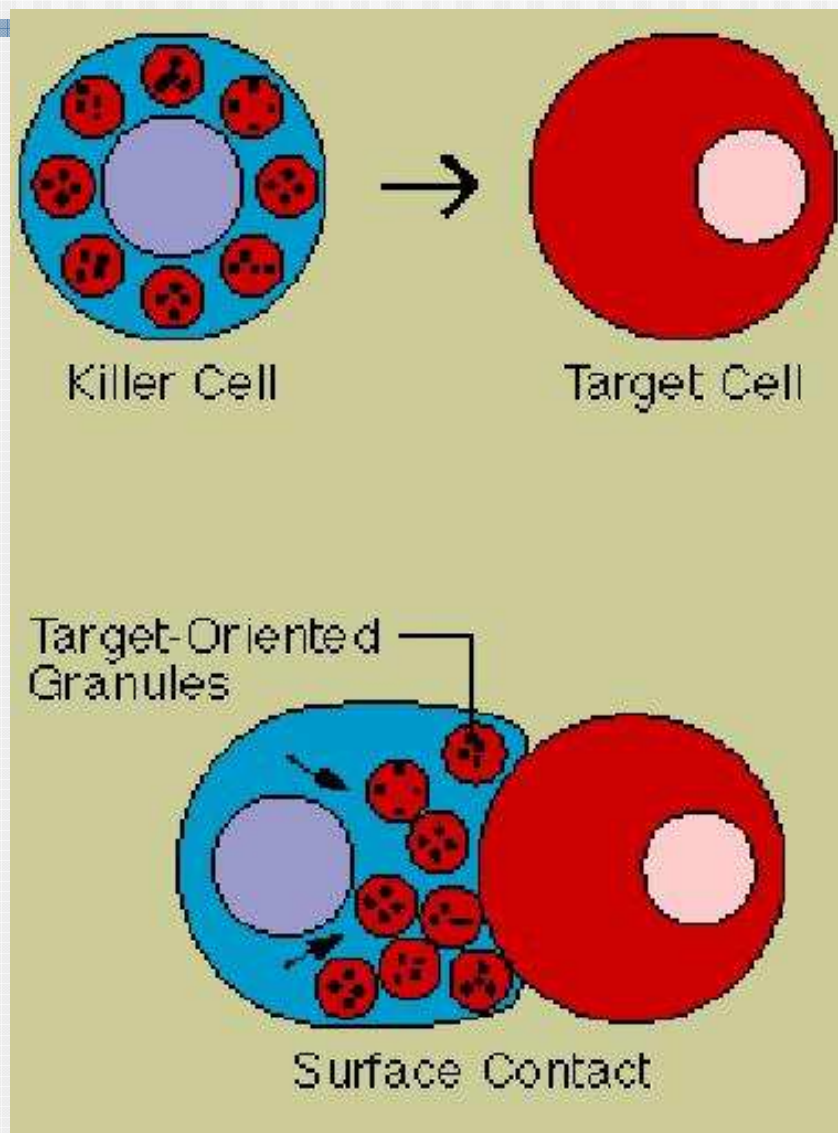
Hrad Imunštejn

- 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

- **neutrofily** – 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 β -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)

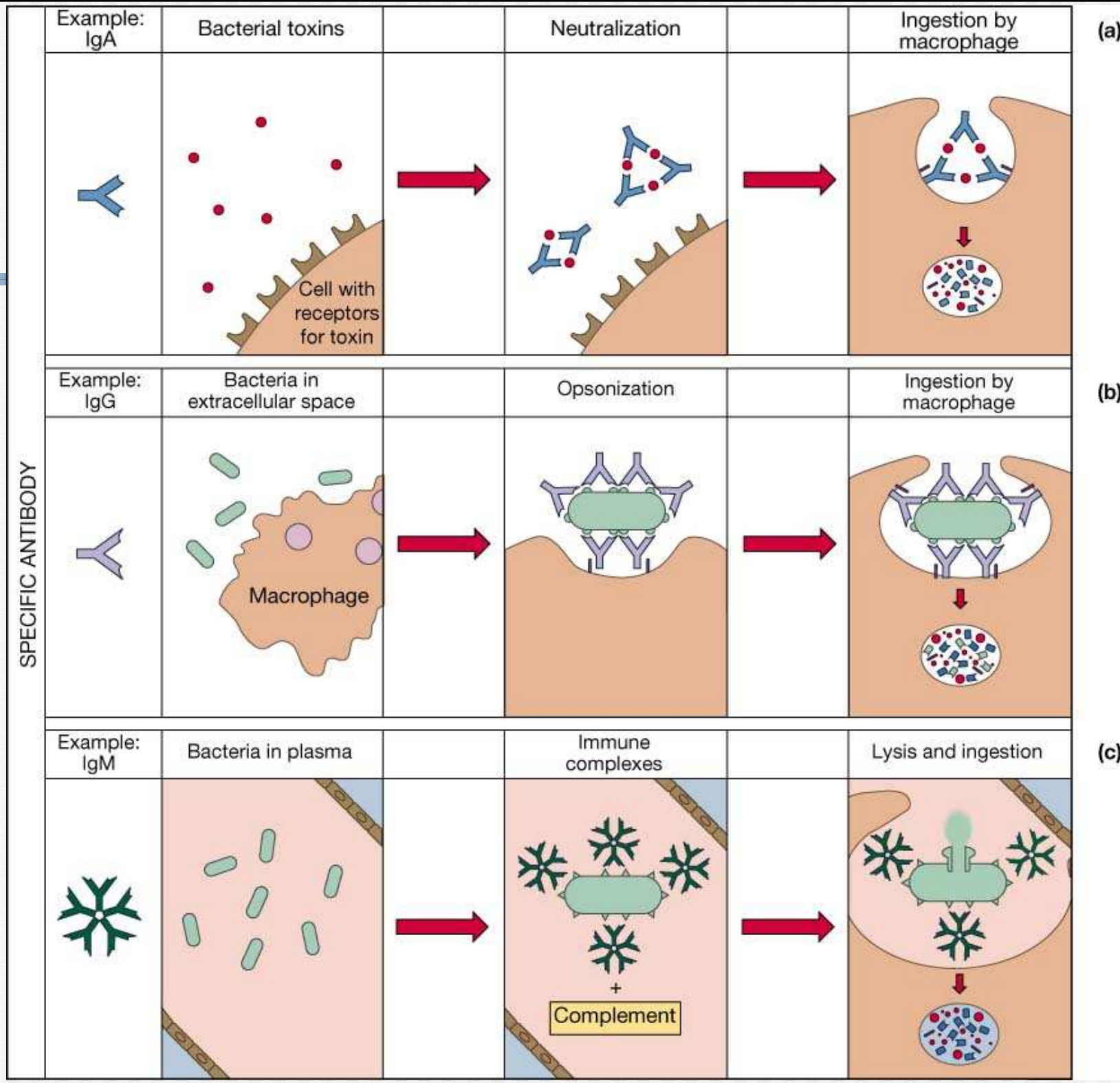
- **protilátky – gama globuliny**, v séru i tkáních, produkovány B-lymfocyty. Protilátka se vždy vytváří jako odezva makroorganismu na podráždění určitým mikroblem.
- **účinky:**
 - **přímé zneškodnění** – možné jen u virů a bakteriálních jedů, ne však (zpravidla) u celých bakterií
 - **opsonizace**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

- **lymfatické uzliny, slezina** – obsahují hlavně T-lymfocyty a plasmatické bb.
- **roztroušené lymfoidní tkáně** 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 alergenem 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 **antigenu** (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

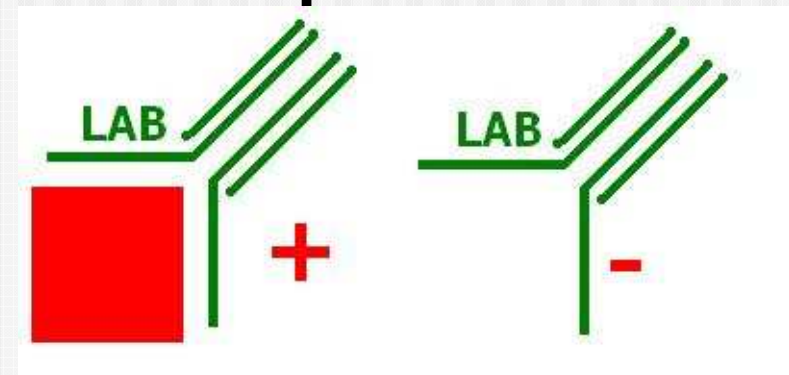
Antigen = makromolekula pocházející z cizího organismu: rostliny, mikroba, jiného živočicha. V mikrobiologii nás zajímají mikrobiální antigeny = části mikrobiálního těla, které vzbuzují v hostiteli antigenní odpověď

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

Dva způsoby, jak to využít:

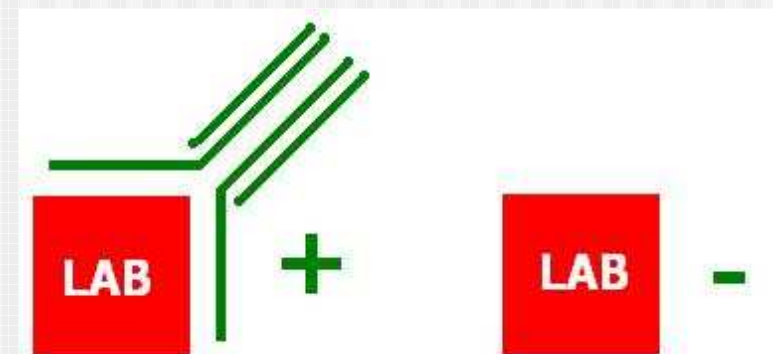
Průkaz antigenu: laboratorní protilátky (zvířecího původu) + vzorek pacienta nebo kmen mikroba.

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*



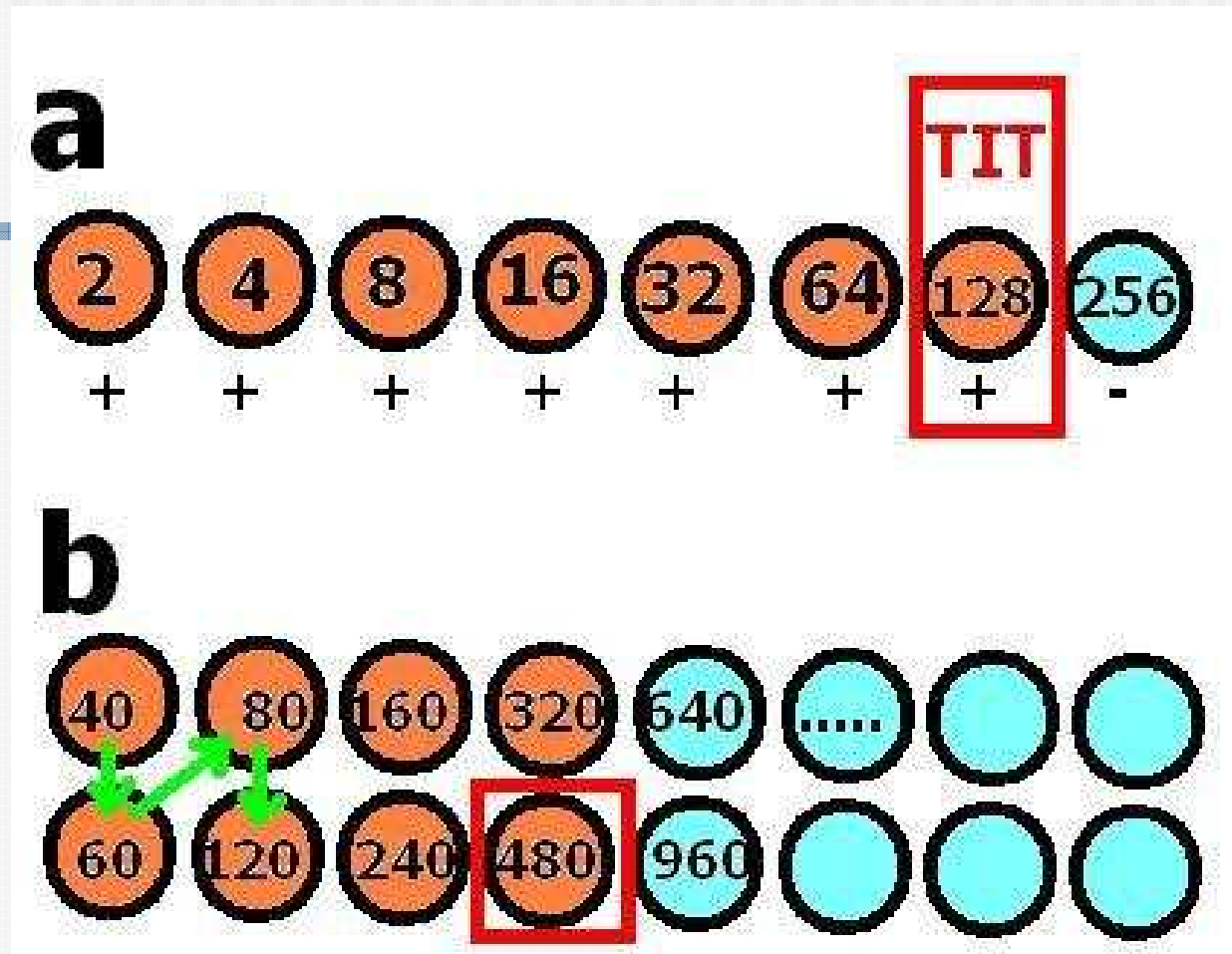
Jak provést reakci „kvantitativně“

- 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

	Průkaz antigenu	Antigenní analýza	Nepřímý průkaz
Aglutinace	občas	často	někdy
Precipitace	málokdy	málokdy	občas
KFR	často (viry)	ne	často (viry)
Neutralizace	občas	ne	často
Značené složky	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

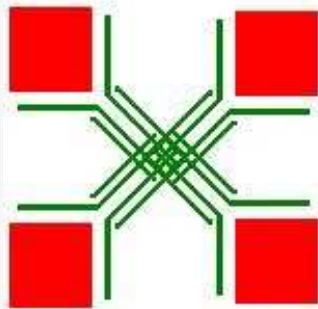
1 – precipitace

2 – aglutinace

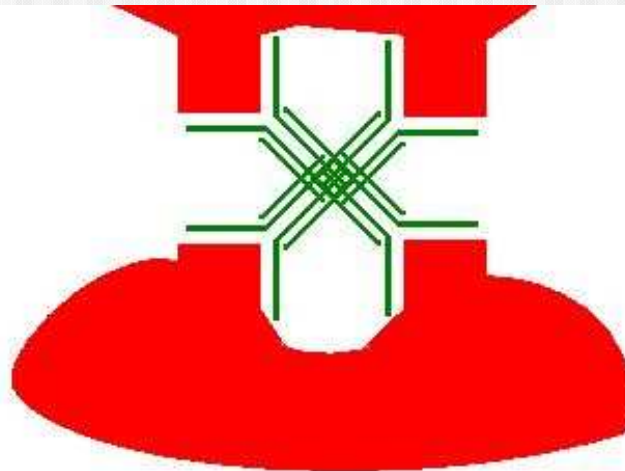
3 – aglutinace na nosiči



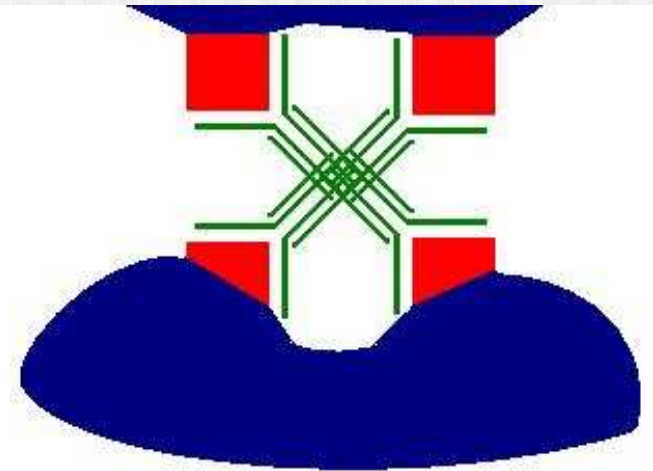
1



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?*

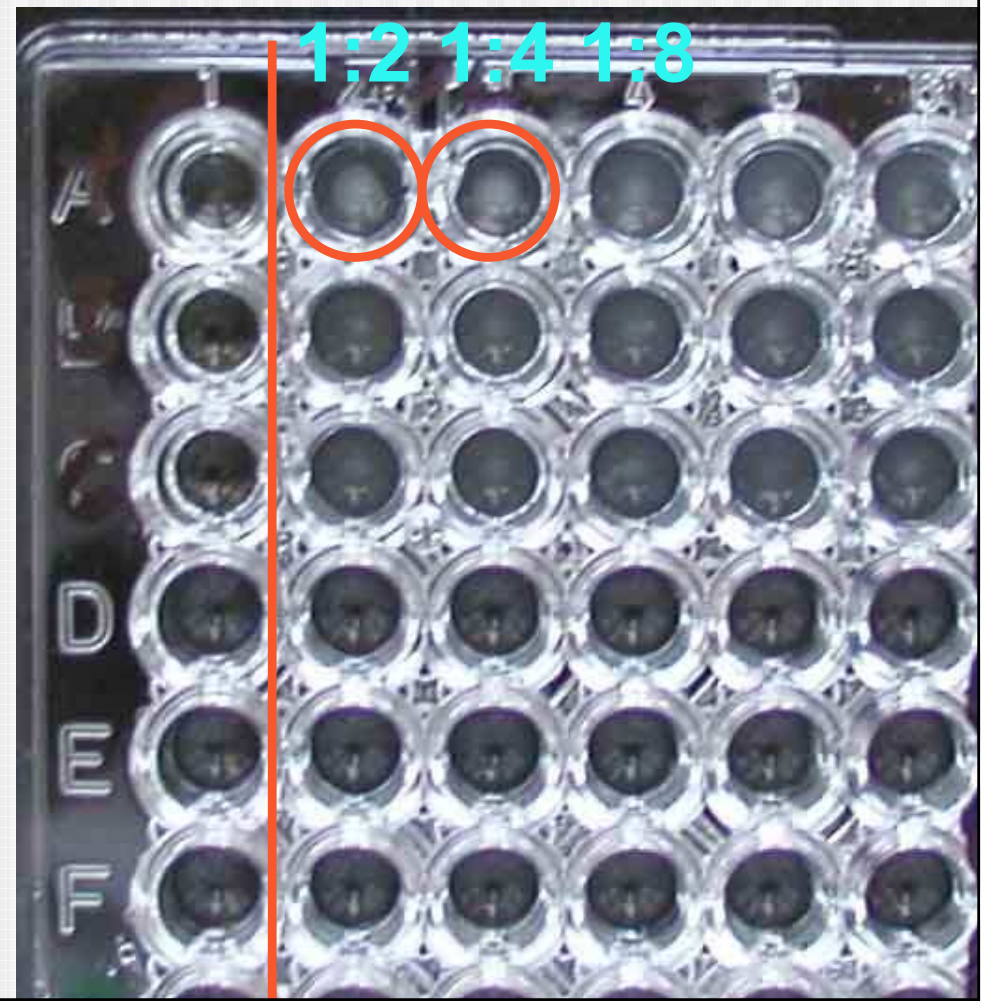
Aglutinace k nepřímému průkazu

- 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

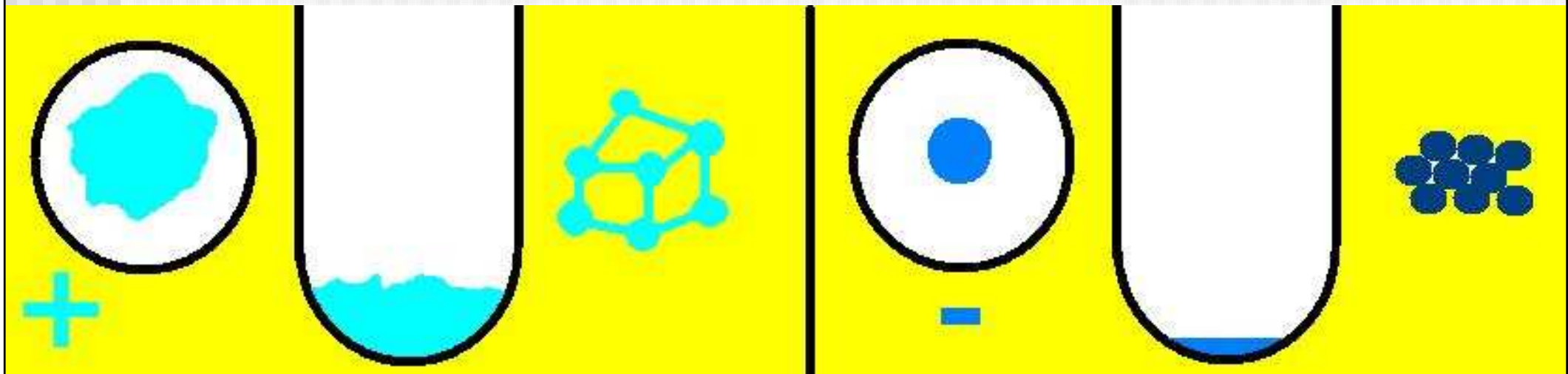
Příklad: aglutinační reakce na průkaz protilátek u tularemie

(ze stránky www.medmicro.info):

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



Vzhled pozitivních a negativních jamek u tohoto typu aglutinace

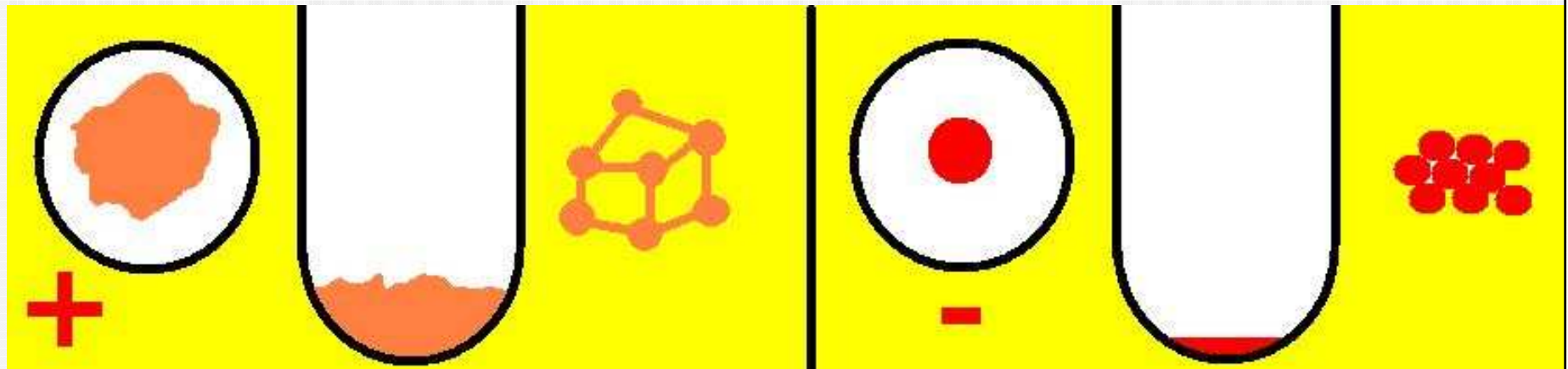


Pozitivní – nepravidelný chuchvalec

Negativní – malé pravidelné kolečko

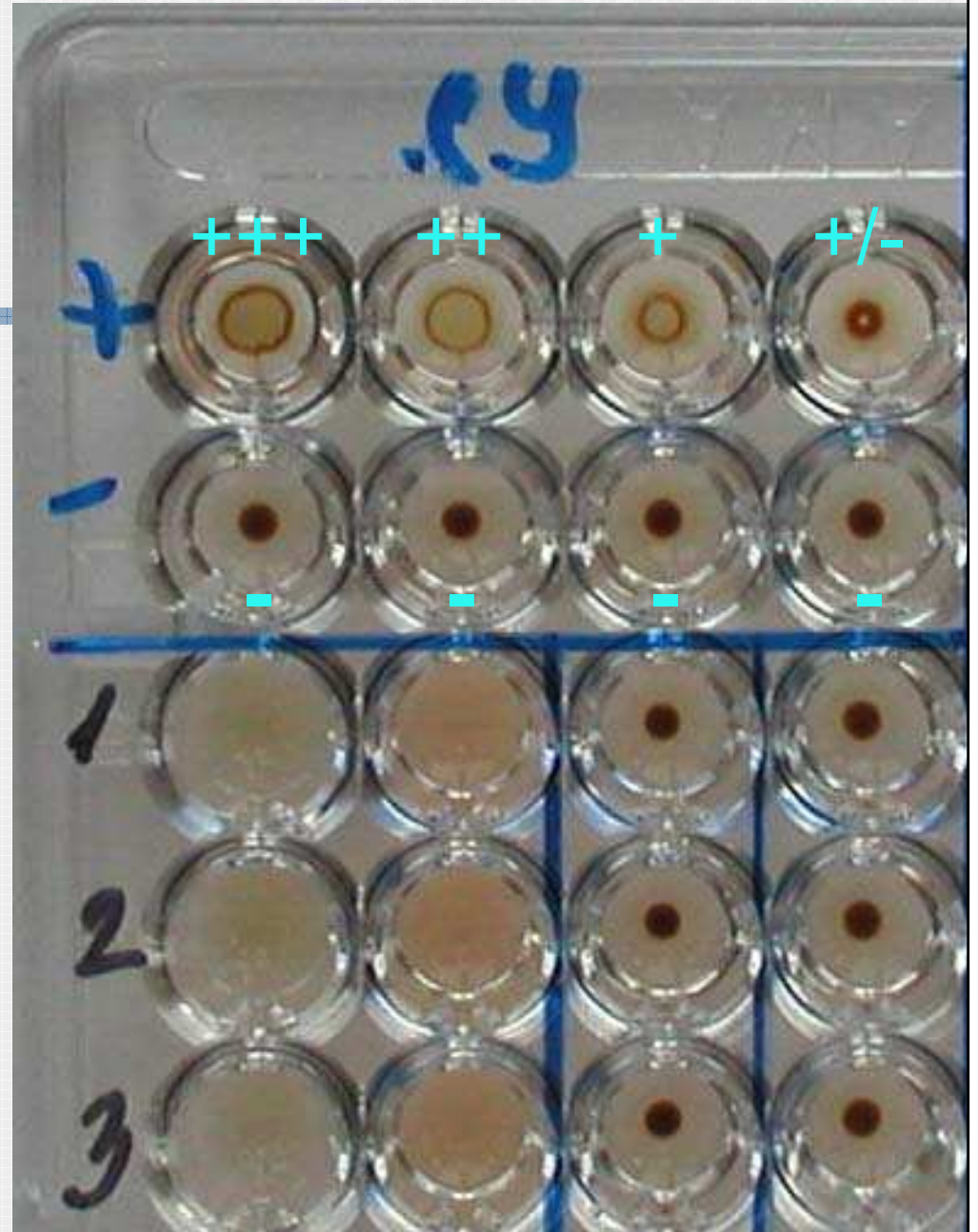
Treponema pallidum haemaglutinace (TPHA)

- 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)

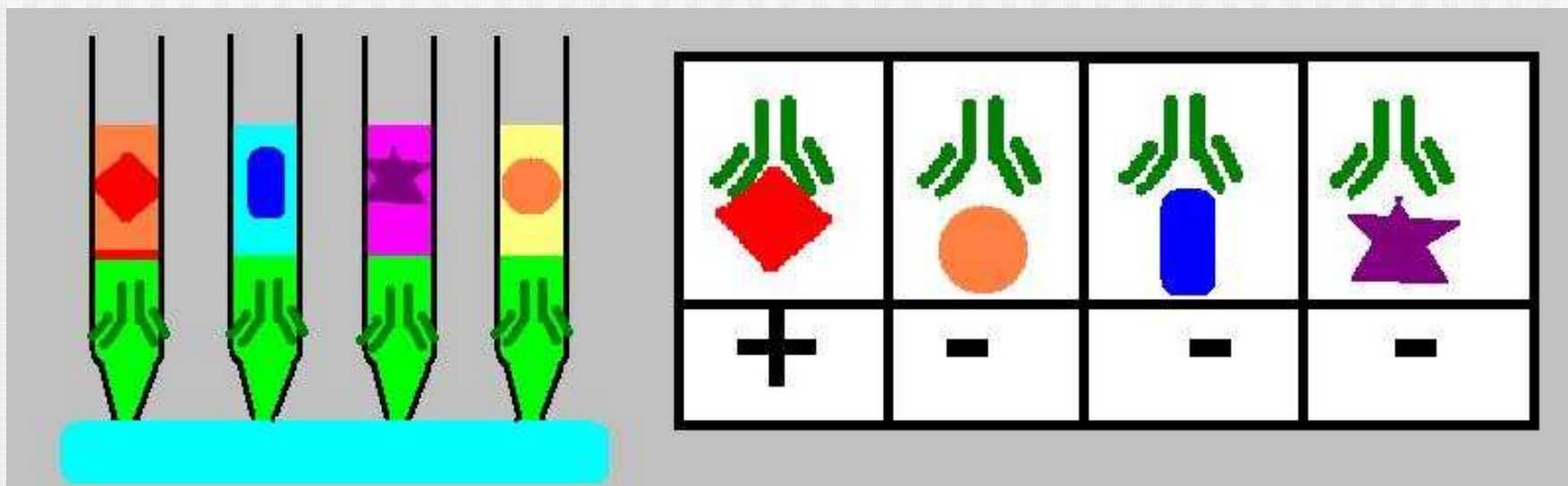


Precipitace k přímému průkazu

- 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

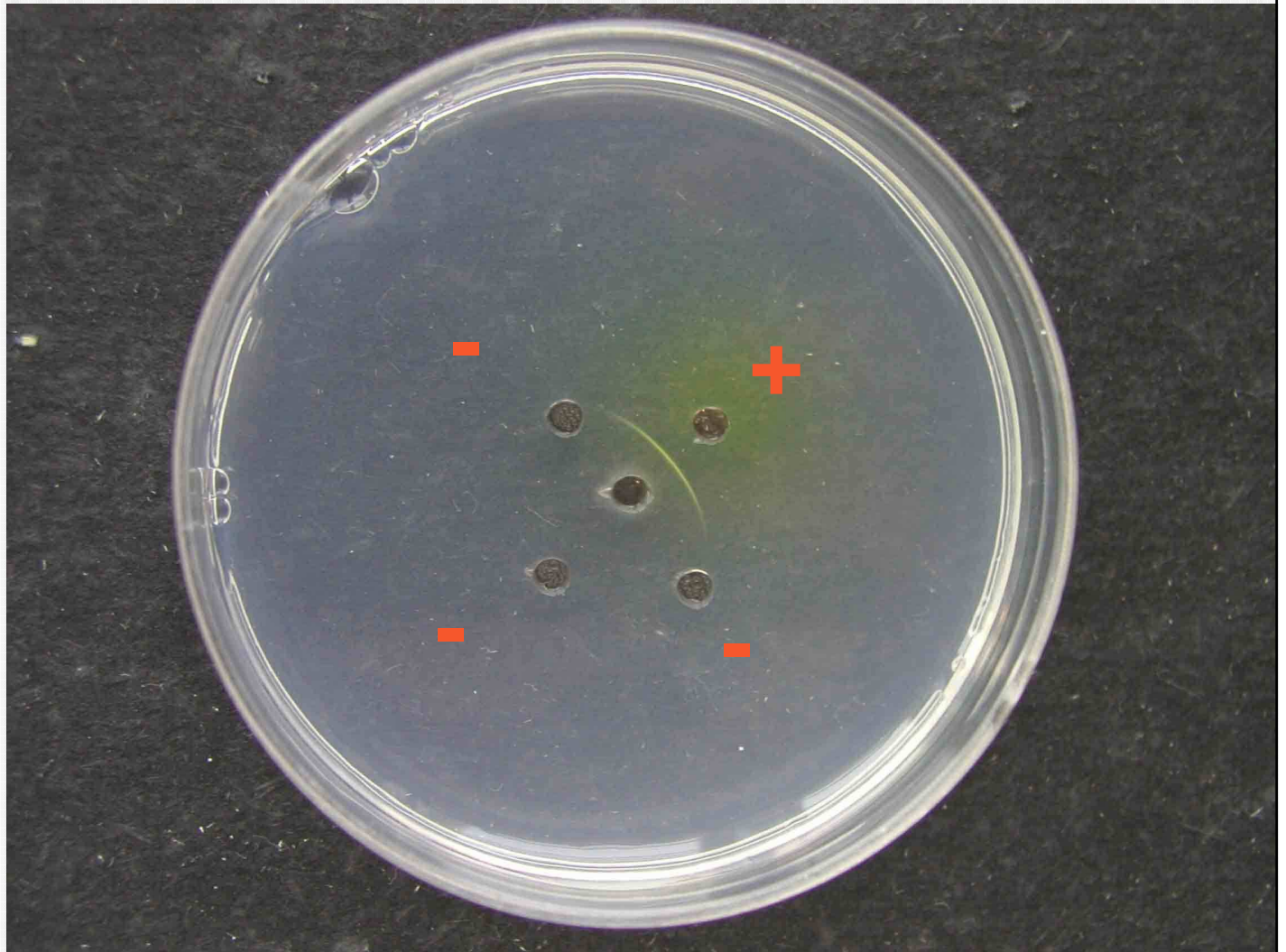
- Dnes už se také používá mnohem méně než dříve, přesto nějaká uplatnění jí ještě zůstala
 - Precipitace v důlcích panelu, např. RRR (zvláštností jsou zde tzv. heterofilní protilátky)
 - Precipitace v agaru, např. dle Ouchterlonyho

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

