

Antigén – ellenanyag reakción alapuló diagnosztikai eljárások

Antigén (Ag)

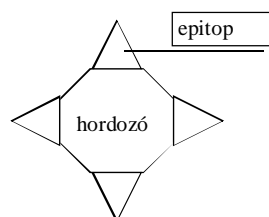
- Azok az anyagok, amelyek immunválaszt váltanak ki és az immunitás effektoráival specifikus reakciókat adnak.

– **Immunogenitás**

– **Specifikus kötődés**

Antigén felépítése

- Hordozó rész – általában fehérje
- Determináns csoportok: **EPITOP**
 - Fajlagosság
 - Valencia




Baktérium antigének

- Protektív antigének
- Diagnosztikai markerek
- Exotoxinok
- Szomatikus O antigén
- Flagelláris H antigén
- Kapszuláris K antigén (Vi)
- Felületi struktúrák

Baktérium antigének

- Heterofil antigén:
 - különböző baktériumfajok antigénjei hasonló kémiai szerkezetű epitóppal rendelkeznek
 - keresztreakció
- Szuperantigén:
 - exotoxin,
 - CD4+ T limfocita aktiválás,
 - toxikus sokk szindróma

Ellenanyagok (Ea)

- Antigén hatására képződött globulinok, amelyek specifikus reakcióba lépnek a megfelelő antigénnel
- Ig M, G, A, E, D
- Reaktív csoport – antigén kötő rész – **PARATOP**
- Valencia 

Antigén ellenanyag reakciók

- Specifikusak
 - Az antigén csak azzal az ellenanyaggal reagál, amelynek képződését kiváltotta.
 - Az ellenanyag csak azzal az antigénnel reagál, amely előidézte képződését

Antigén ellenanyag reakciók

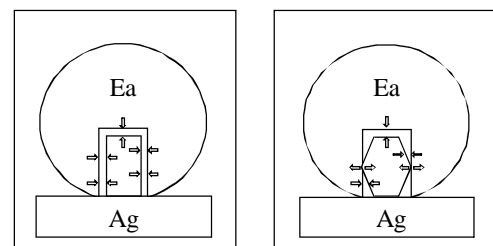
- Komplementaritás – illeszkedés két alakzat között
 - Antigén kis része a determináns
 - Ea kötőhelye
- Minél szorosabb az illeszkedés, annál erősebbek lesznek közöttük a nemkovalens a kötések, annál nagyobb lesz az affinitás

Antigén ellenanyag reakciók

- Ha mindkét kötőhely ugyanazzal az antigénnel tud kölcsönhatásba lépni (pl. sejt felszíne), a kötődés ereje megnő
- a teljes kötési erősséget **aviditásnak** nevezzük

Affinitás

Egy epitop – egy paratop

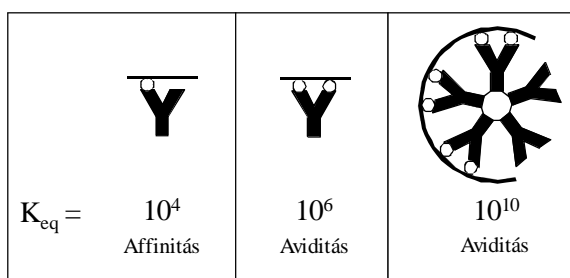


Affinitás – vonzó és taszító erők eredője

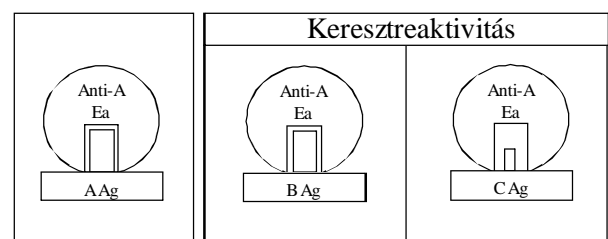
Asszociációs konstans egyensúlyi körülmények között

Aviditás

Több antigéndetermináns – multivalens ellenanyag

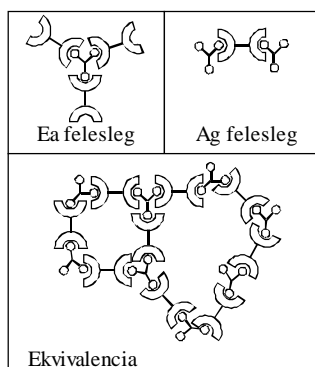


Keresztreaktivitás



Ag-Ea reakciókat befolyásoló tényezők

- Affinitás
- Aviditás
- Ag:Ea arány
- Ag természete



Antigén ellenanyag reakciók

- A két komponens egyikének ismerete esetén azonosíthatjuk az ismeretlent
 - Ag – kórokozók azonosítása
 - Ea – szerológiai diagnózis
- A képződő immunkomplex vizualizálása alapján: különböző módszerek

Ag-Ea reakciók I

- Szabad szemmel is látható térháló kialakulása az antigén-ellenanyag komplex létrejöttékor
 - **Agglutináció** – Ag korpuszkuláris
 - **Precipitáció** – Ag szolubilis

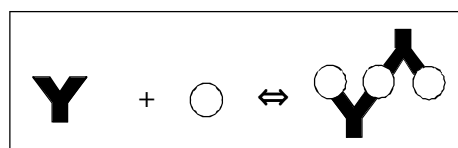
Ag-Ea reakciók II

- Nem térháló kialakulásán alapuló reakciók, antigén-ellenanyag komplex létrejöttét valamilyen **jelzőrendszer** segítségével tesszük láthatóvá
 - **Komplementkötési reakció**
 - **RIA, ELISA, IF, Western-Blot**

Agglutinációs reakciók

Agglutináció/Hemagglutináció

- **Korpuszkuláris antigén – agglutinogén**
- **Ellenanyagok - agglutininek**
- Minőségi meghatározás – tárgylemez agglutináció
 - Ag vagy Ea



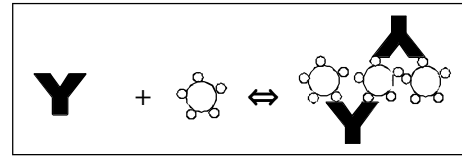
Agglutináció/Hemagglutináció

- Mennyiségi meghatározás - csőagglutináció - Titer

Beteg	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Poz.	Neg.	Titer
1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	64
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	8
3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	<2
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	32
6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	128
7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	32
8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	4

Passzív/indirekt agglutináció/hemagglutináció

- Szolubilis antigének részecskék felszínén

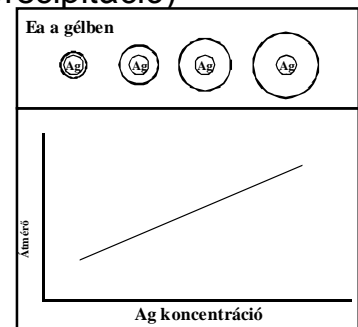


Precipitációs reakciók

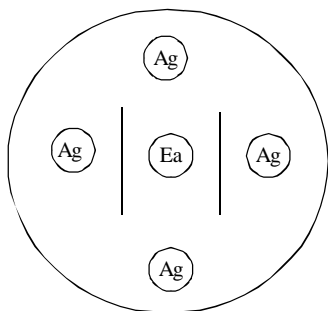
- Folyadékban
 - Gyűrűs precipitáció
 - Flokkuláció
- Gélben
 - Radiális
 - Kétdimenziós
 - Kombinálva elektroforézissel

Mancini féle radiális immundiffúzió (gélprecipitáció)

- Módszer
 - egyik elem a gélben
 - a másik diffundál
- Kiértékelés
 - Precipitációs gyűrű átmérője arányos a koncentrációval



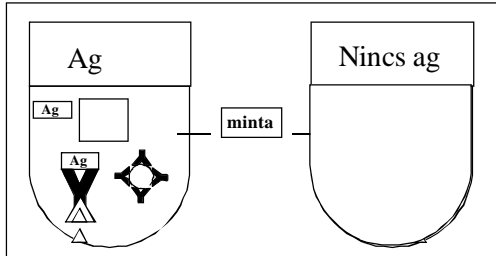
Kettős diffúzió - Ouchterlony



Komplementkötési reakció (KKR)

Komplementkötési reakció

- Ea + Ag
- Komplement hozzáadása
- Vörösvértestek + specifikus Ea
- Hemolízis jelenléte vagy hiánya



Fizikai, kémiai, biológiai tényezők hatása a baktériumokra

Mikroorganizmusok számának csökkentése

- **Steril:** élő mikroorganizmustól mentes
- **Sterilizálás** – azon módszerek összessége, amelyek segítségével csíramentes állapot hozható létre
- **Fertőtlenítés** (dezinficiálás) – mikroorganizmusok (főként patogén ágensek) számának csökkentése

Mikroorganizmusok számának csökkentése

- Antiszepszis – bőr, nyálkahártyák, sebek élő mikróbai számának csökkentése
- Aszepszis – mikroorganizmusok csíramentes közegbe való bejutásának megakadályozása

Semmelweis Ignác



Mikroorganizmusok számának csökkentése

- **Bakteriosztatikus** – baktériumok szaporodását gátló, reverzibilis hatású
- **Baktericid** – baktériumokat elpusztító hatású, időegység alatt a mikroorganizmusok azonos hányada pusztul el

Sterilizálás

- Fizikai módszerek
 - Mechanikus hatások
 - Hőhatás
 - Szűrés
 - Sugárzások
- Kémiai módszerek
 - gázsterilizés

Hőhatás

- Alacsony hőmérséklet - bakteriosztatikus
 - a baktériumok megőrzik életképességüket
 - konzerválás
- Magas hőmérséklet - baktericid
 - nyílt láng
 - száraz hő – hőlégenderilizátor
 - nedves hő
 - túlnyomásos telített vízgőz – autokláv

Fertőtlenítés

- Fizikai módszerek
 - Frakcionált hőkezelés (tyndallozás)
 - Kifőzés
- Kémiai módszerek
 - Sejtmembrán károsítása
 - Fehérjekicsapó szerek – savak és lúgok
 - Fehérjék és nukleinsavak funkciócsoportjaira ható szerek

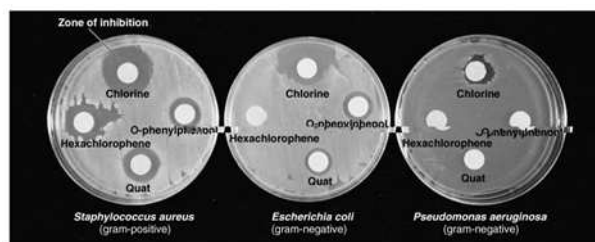
Sejtmembrán károsítása

- Felületaktív vegyületek
 - Anionaktív detergens
 - Kationaktív detergens (kvaterner ammóniumvegyületek)
- Fenol, krezol, hexaklorofén, klórhexidin
- Alkohokok

Fehérjék és nukleinsavak funkciócsoportjaira ható szerek

- Nehézfém-sók – higany- és ezüstvegyületek
- Oxidálószerke – jód- és klórtartalmú szerek
- Hidrogén peroxid
- Anilinfestékek
- Aldehyd tartalmú vegyületek – formaldehyd, glutáraldehyd

Fertőtlenítőszerke antibakteriális hatásának vizsgálata



Biológiai tényezők hatása a baktériumokra

- Bakteriocinek – baktériumok által termelt, baktericid hatású anyagok
- Bakteriofágok – baktériumok vírusai
- Antibiotikumok

Antibiotikumok, kemoterápiás szerek

Paul Ehrlich:
szelektív toxicitás elve



Alexander Fleming

- penicillin – 1928:
Penicillium notatum
- első alkalmazás: 1941



Antibiotikum = „csodaszer”

- Súlyos, életveszélyes fertőzések gyógyítása
- Krónikus lefolyású fertőző betegségek gyógyítása (szifilisz, tuberkulózis, stb.)
- Élettartam növekedése

The TIMES Magazine, 1966

„Most experts agree that by the year 2000 bacterial and viral diseases will have been wiped out. Arteriosclerotic heart diseases will probably also have been eliminated.”

Antibiotikum = „csodaszer”?

- Fleming: rezisztens baktériumtörzsek szelektálása
- Kezdeti látványos hatást követően, gyakorlatilag minden egyes antibiotikummal szemben kialakultak rezisztens mutánsok
- Rezisztencia terjedése

Staphylococcus aureus példája...

- antibiotikumok alkalmazása előtt: *S. aureus* bacteriaemia 80%-ban fatális
- penicillin bevezetése: súlyos fertőzések gyógyítása
- 1943: penicillin-rezisztens *S. aureus* törzsek
- 1960: törzsek 80% penicillin rezisztens
- 1961 methicillin bevezetése – methicillin-rezisztencia egyidejű megjelenése

Folytatásként:

- Rezisztencia más antibiotikumokkal szemben: aminoglikozidok, makrolidok, tetraciklinek, stb.
- Fluoroquinolonok: 1980-as évek elején (rezisztencia 0%-ról 70 %-ra emelkedett 1 év alatt)
- Sokáig: glikopeptid - az egyetlen hatásos antibiotikumcsoport
- 1997: csökkent érzékenység glikopeptidekkel szemben
- 2004: rezisztencia glikopeptidekkel szemben

Problémát okozó baktériumok

Gram-pozitív

- csökkent penicillin-érzékenységű, fluoroquinolonrezisztens *Streptococcus pneumoniae*
- MRSA (methicillin-rezisztens *S. aureus*), VISA, VRSA
- vancomycin-rezisztens *Enterococcus* (VRE)

Problémát okozó baktériumok

Gram-negatív

- széles spektrumú β -laktamázt (ESBL) termelő enterobaktériumok
- carbapenem rezisztens (MBL termelő) *Pseudomonas*, *Acinetobacter*

Rezisztencia megjelenése

- Antibiotikumok alkalmazása előtt
 - rezisztencia gének: kromoszomiális lokalizáció
 - alacsony szintű antibiotikum rezisztencia
- Antibiotikumok bevezetése után:
 - rezisztencia gének: mobilis genetikai elemekre jutottak át
 - terjedés
 - magas szintű rezisztencia

Rezisztencia terjedése

Szelekciós hatás következtében!

- antibiotikum abúzus
- helytelen antibiotikum terápia



Antimikróbás szerek osztályozása Kémiai szerkezet szerint:

- β -laktám antibiotikumok
 - penicillinek
 - cephalosporinok
 - carbapenemek
 - β -laktamáz gátlót tartalmazó kombinációk

Antimikróbás szerek osztályozása Kémiai szerkezet szerint:

- Aminoglikozidok
- Glikopeptidok
- Lincosamidok
- Makrolidok
- Streptograminok
- Polipeptidok
- Tetraciklinek
- Phenicol
- Oxazolidinon
- Fluoroquinolonok
- Szulfonamidok

Antimikróbás szerek osztályozása Hatásmechanizmus függvényében

- Sejtfa szintézis gátlása (β -laktám antibiotikumok, glikopeptid, bacitracin)
- Protein szintézis gátlása (50 S: makrolidok, lincosamidok, streptograminok, chloramfenicol, 30 S: tetraciklinek, aminoglikozidok)

Antimikróbás szerek osztályozása Hatásmechanizmus függvényében

- Nukleinsav szintézis gátlása (quinolonok, rifampin)
- Sejtmembrán funkciójának megzavarása (polimyxin)
- Folatek metabolizmust gátló anyagok (szulfonamidok, trimethoprim)

Baktériumok antibiotikum rezisztenciája

Természetes rezisztencia (intrinsic)

- Genetikai, szerkezeti, fiziológiai tulajdonságok határozzák meg
- Öröklődik, jellemez egy baktérium genust vagy speciest
- Megjósolható, a baktérium azonosítása elegendő a megállapításához (Gram-negatív – rezisztens vancomycinre)

Baktériumok antibiotikum rezisztenciája

Intrinsic rezisztencia

- Esetenként a rezisztencia megállapítása diagnosztikus értékű (novobiocin)
- Mechanizmus
 - Célpont hiánya
 - Permeabilitás hiánya
 - Lebontó enzim termelése

Baktériumok antibiotikum rezisztenciája

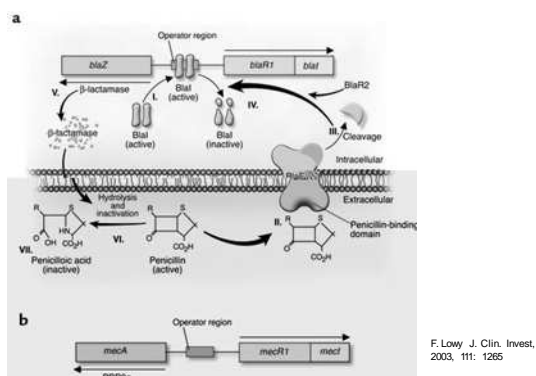
Szerzett rezisztencia

- Nem megjósolható
- Jelenlétét vizsgálni kell
- Szerkezeti és funkcionális változások eredményezik
 - Kromoszóma mutáció
 - Plazmidokon levő rezisztencia gén
 - Rezisztencia gének transzpozonokon

Rezisztencia-mechanizmusok

- Megváltozott támadási hely
- Megváltozott drogfelvétel
 - Permeabilitás változása
 - Efflux-mechanizmus
- Enzimatis inaktiválás

Staphylococcus aureus - β -laktámokkal szemben kialakuló rezisztencia



Antibiotikumok mikrobiológiai értékmérése

- rezisztencia tesztelése
 - mennyiségi
 - minőségi eljárásokkal
- nemzetközi standardok követése

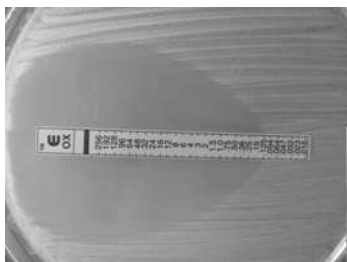
Mennyiségi meghatározások

- **MIC** – minimális bakteriosztatikus koncentráció
- **MBC** – minimális baktericid koncentráció
- Módszerek:
 - mikrohígítási eljárás
 - agarhígítási eljárás
 - E-teszt

MIC érték meghatározása

- kvantitatív
- csak bizonyos esetekben indokolt
 - súlyos fertőzések
 - olyan baktérium fajok esetében, amelyeknél a kvalitatív antibiogram nem elvégezhető

E-teszt (AB Biodisk, Solna)



Antibiogram – korongdiffúziós eljárás

- kvalitatív
- rutinszerűen alkalmazott
- mikrobiológus dönti el, mely izolátumok esetében végzendő el az antibiogram
 - szignifikáns izolátum?
 - etiológiai szerep?
 - NEM készül antibiogram olyan fajok esetében, amelyeknél nem létezik rezisztencia

Antibiogram - standardizált!

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) – évente frissített adatok
 - milyen kórokozókra milyen antibiotikumot tesztlünk
 - tesztelési körülmények
 - kiértékelési algoritmus
 - kritikus átmérők
 - eredmények közlése
 - minőségi ellenőrzés

Korongdiffúziós eljárás

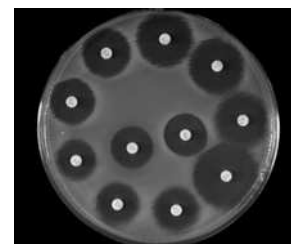
Átmérők: standard
átmérőkhöz való
viszonyítás

Eredmények közlése:

S = érzékeny

I = mérsékelt érzékeny

R = rezisztens



Kiértékelés

- Rezisztencia fenotípusokat követünk!
- Kritikus szemmel! Nem valószínű rezisztencia adatok újvizsgálása
- Szinergizmus
- Antagonizmus

Antagonizmus - induktibilis clindamycin rezisztencia



Szinergizmus - széles spektrumú
 β -laktamáz termelés vizsgálata

