

Hoorcolleges

Patiëntendemonstratie 1: Een patiënt met tuberculose

De ziekte: Tuberculose (tbc)

Tuberculose is wereldwijd infectieziekte nummer 1. Wereldwijd is 1 op de 3 mensen besmet met tuberculose. In Nederland komt het 1.000 keer per jaar voor. Het komt vooral in de grote steden voor, zo heeft Rotterdam 1/6 van alle tuberculose patiënten van Nederland. De incidentie neemt toe de laatste jaren door allochtonen (niet zo zeer door drugsgebruik).

Tuberculose is een chronische infectie en is de oorzaak van circa 2 miljoen doden per jaar.

Vaak ziet een dokter het voor een ander probleem aan, waardoor de diagnose te laat gesteld wordt, dit noem je **doctors' delay**. Gelukkig is tuberculose wel goed te genezen, maar je bouwt geen immuniteit op. Tuberculose kan decennia lang latent blijven. Op de babyleeftijd kan tuberculosebesmetting plaatsvinden, waarbij de tuberculose pas op tachtigjarige leeftijd wanneer het immuunsysteem verzwakt is (door de chemokuur krijg je verlaagd immuniteit en HIV) actief worden.

Een tijdige ontdekking is wel van belang, omdat tbc anders lastig te behandelen is. Tijdig ontdekken is belangrijk omdat het dan goed te genezen is. Ook bij hersenvliesontsteking en HIV is het lastiger om een patiënt te genezen.

Tbc verwekkers

Tuberculose kan door verschillende micro-organismen worden veroorzaakt. Er zijn vier verwekkers die samen het **Mycobacterium tuberculosis-complex** vormen:

- Mycobacterium tuberculosis – meest voorkomend.
- Mycobacterium africanum – bijna identiek aan Mycobacterium tuberculosis.
- BCG = Bacillus Calmette-Guérin; verzwakte bacteriën hiervan gebruiken we voor het vaccin tegen tbc, echter heel soms worden mensen daar ziek van (Immuungecompromiteerden en kleine kinderen).
- Mycobacterium bovis (dit komt door het drinken van niet gepasteuriseerde melk van een besmette veestapel) – hierbij decennia lange latentie (= virus verbergt zich in de cel) mogelijk. (deze vorm vereist een aangepaste behandeling).

Het histologische beeld wordt mede bepaald door de immunrespons. Hoe snel je ziek wordt en hoe lang je ziek blijft is afhankelijk van je afweer (zo zal een AIDS patiënt snel en ernstig ziek worden). Tuberculose is een **granulomateuze ziekte met verkazende necrose**. Tuberculose kent een Miliair beeld = explosief tbc beeld waarbij in 1 klap alle bacteriën de longen bezaaien en er meerdere plekken met grote haarden over het lichaam verdeeld zijn.

Tuberculose is een **stroomziekte**, je ademt het in, maar daarna kan het overal heengaan en hechten. Je wordt pas ziek bij diepe inspiratie, als de bacillen in je alveoli terechtkomen. Na 3 wk bereikt de infectie de lymfebanen, waarna het naar de organen verplaatst. Het kan dus overal zitten, maar de meest voorkomende plek is in de tractus respiratorius. Tuberculose kent een **subacuut-chronisch beloop**.

Wat is de eerste stap bij een hoestende patiënt met verdenking op TB?

1. Isolatie (op de poli doe je dan een masker op)
2. Röntgen foto

Uitgebreide diagnostiek levert niet meteen een diagnose. Er wordt het zetten van een mantoux geadviseerd.

Diagnostiek:

- goudenstandaard: positieve kweek. Geeft ook de mogelijkheid om gevoeligheid van de verschillende bacteriën te bepalen
- Auramine wordt in scores ingedeeld van 1 tot 5, met 5 als hoogste.
- RIVM: moleculaire diagnostiek voor typering van TBC.

Besmetting vindt plaats van **mens op mens** via een **airborne infectie** bij contact met een patiënt met open tuberculose. Zet de patiënt daarom altijd een mondkapje op. Soms vindt de besmetting ook plaats via melk en zelden via een transplantaat of verwonding.

Andere oorzaken kunnen drugsgebruik zijn of via transplantaten (die uit het buitenland komen, vanwaar de donor besmet is).

Test voor besmetting. Een positieve Mantoux betekent nooit dat je de ziekte bewijst, alleen om de besmetting. Je test of er een afweerreactie optreedt bij subcutane injectie van tuberculine. Deze test is als screening bedoeld want de sensitiviteit en specificiteit is slecht. Tegenwoordig kan men ook in bloed kijken. Deze toont recente besmetting aan (IGRA) en hij wordt niet beïnvloed door een vaccinatie. Als je lang genoeg in een vreemd land gaat zal je namelijk toch een vaccinatie krijgen waarschijnlijk. Een positieve mantoux alleen is ook geen indicatie voor isolatie.

Verspreiding binnen het lichaam

Na besmetting kan de bacterie zich in de alveoli vermenigvuldigen, komt daarna in de lymfebanen terug en gaat naar de klieren in het mediastinum. Van daaruit kan de bacterie via de bloedbaan naar alle organen verspreiden.

Symptomen algemene tuberculose:

- Vermoeidheid (gedurende lange tijd)
- malaise
- nachtzweeten
- Anorexie (= geen eetlust) + afvallen
- Koorts

Het is ook een goede imitator en kan daardoor op andere ziektes lijken. Andere klachten worden bepaald door waar de tbc zit (afhankelijk van het aangetaste orgaansysteem).

Symptomen van pulmonale tuberculose:

Hoest (met hemoptoë), pijn thoracaal en/of dyspnoe.

Open versus gesloten tbc:

Open = open verbinding van tbc met de buitenwereld → **besmettelijk**. Tbc is dan aantoonbaar in materiaal dat in contact staat met de buitenwereld (bijv. positief sputum bij longtbc). Door middel van een **auramine-kleuring** kan tbc in sputum worden vastgesteld, Je zit zuurvaste staven onder het microscoop (blauwkleuring = positief). De meest voorkomende tbc is longtbc.

Gesloten = geen contact met de buitenwereld of geen tbc aantoonbaar in materiaal in contact met de buitenwereld (bijv. pleuritis tuberculosa, meningitis tuberculosa of negatief sputum bij longtbc). Deze vorm is **niet besmettelijk**.

Na een tijdje een open longtbc behandeld te hebben bepaal je aan de hand van het sputum of het nog besmettelijk is. Als het sputum negatief is, dan is het niet meer besmettelijk, maar je blijft

het open tbc noemen, want dat was de status bij diagnose. Een goed gevoelige tbc reageert meestal binnen 3 weken op de behandeling.

Grootste kans op tbc op te lopen is in kleine ongeventileerde ruimtes met veel mensen. Van de mensen die tbc besmetting hebben opgelopen (1/3 mensen wereldwijd), wordt **5% binnen 2 jaar, 5% later** (latente tbc) **en 90% helemaal niet ziek**. Dit hangt af de cellulaire immuniteit en dus van de risicofactoren op ziekte (zie later). Besmetting zonder ziekte noemen we latente TBC.

Een *risicogroep* in Nederland = **>50 tbc gevallen per 100.000 mensen per jaar**.

Risicogroepen voor tbc besmetting zijn:

- asielzoekers/ immigranten
- gedetineerden
- drugsverslaafden
- daklozen/thuislozen
- zeelieden
- HIV-geïnfecteerden (= endogene factor)
- Oud-patiënten
- Mensen met een tbc patiënt in hun nabije omgeving

Risicofactoren voor de tuberculoseziekte zijn:

- *Endogene factoren*: Leeftijd en Immuniteit (à alveolaire macrofagen, CD4+-T-cellen)
- *Ziektes*
 - AIDS (geeft een kans op tbc van 10% per jaar, i.p.v 10% per leven)
 - Maligniteit: hematologisch of solide
 - Immunosuppressieve therapie
 - IDDM = insuline dependent diabetes mellitus
 - Nierfalen
 - Malnutritie
 - Alcoholabusus

Diagnostiek

Ter diagnostiek doen we laboratoriumonderzoek en beeldvormend onderzoek (röntgenfoto's). Het lab kan echter volledig normaal zijn bij tbc. Soms is er sprake van anemie, verhoogd CRP, verhoogd BSE en seropositiviteit. Van alle tbc patiënten moet materiaal opgestuurd worden naar het RIVM voor clustering, waarbij clusters van patiënten met dezelfde kenmerken van de ziektes geografisch in kaart worden gebracht.

Bacteriologie= het testen van sputum met **Auramine**. Indien positief, dan is het besmettelijk. Bacteriologie passen we toe ter bevestiging van de diagnose, voor het bepalen van de besmettelijkheid en de gevoeligheid voor de behandeling. We testen in een kweek of de bacterie gevoelig is voor de standaard tuberculostatica.

In de differentiaal diagnose aan de hand van beeldvormend onderzoek staan:

- maligniteit (long, lymfoom)
- infectieus
 - § atypische Mycobacterium
 - § Actinomyceten / schimmels
- Sarcoïdose

Therapie

De 5-jaars overleving zonder therapie is 40%.

De doelen van de therapie zijn: curatie, reductie transmissie en voorkomen van resistentie.

Er bestaan 3 vormen van therapie: sanatoria, chirurgie en medicamenteus.

Standaard medicamenteuze therapie voor goed gevoelige tbc is:

- Isoniazide 6 maanden lang
- Rifampicine 6 maanden lang
- Pyrazinamide 2 maanden lang
- Ethambutol 0-2 maanden

Deze medicijnkuren zijn zo langdurig, omdat tbc bacillen erg traag delen en je ze anders niet allemaal dood. Bij **resistentie** vindt aanpassing van de medicatie en de duur plaats.

Bij goede gevoeligheid stop je de ethambutol. Bij immuungecompromitteerden verleng je de isoniazide tot 9 maanden.

Ter **profylaxe** na besmetting van bijvoorbeeld een immunogecompromitteerde patiënt geeft men isoniazide 9 maanden lang, bij een semi- recente besmetting (binnen nu en 2 jaar geleden).

DOT = het slikken van pillen onder toezicht bij de GGD, dit wordt gedaan bij mensen waarvan men verwacht dat ze niet therapietrouw zullen zijn.

Soms wordt er chirurgie toegepast bij ernstige abcessen, empyemen of dreigende fracturen bij wervel-tbc.

Bij baby's die met hun familie meegaan naar een endemisch tbc gebied en voor werkende mensen die langdurig naar zo'n gebied reizen, geven we de BCG-vaccinatie. Deze vaccinatie biedt geen bescherming op lange termijn, maar geeft wel het leven lang een onbetrouwbare Mantoux-test.

Hoorcollege 2: Mycobacteriën

Casus 1

Man, 53 jaar, afkomstig uit Vietnam (= endemisch tbc gebied). VG: hypertensie en palpitaties. Nu leverfunctiestoornissen (ASAT en ALAT verhoogd). Hij rookt en drinkt niet en gebruikt geen medicijnen. HCV positief.

HPB en HPC: PCR gedaan, B is neg, C is positief.

IgG antistoffen geven aan dat de primaire infectie al langer is = Serologisch litteken.

IgM antistoffen geven een recente, primaire infectie aan.

HbS- antigeen geven een actieve ziekte aan.

Op dit moment heeft hij een recente Hepatitis C infectie. Het afgenomen leverbiopt past bij hepatitis B of C, maar toont geen cirrhose (->licht chronisch). Hij wordt 24 weken lang behandeld met PEG-interferon (afweer modulatie: tegen geïnfecteerde cellen) en ribavirine (stopv vermenigvuldiging van het virus) (complicatie: tbc). De kans op succes bij deze behandeling is 40-50%. De man geneest door goede therapierespons, er is geen Hepatitis C RNA meer te vinden met behulp van PCR.

Echter na een tijdje wordt hij toenemend ziek: dyspnoe, meer palpitaties en nog meer leverstoornissen (ASAT en ALAT wat lager, Gamma CT hoger, CRP hoog). Op de X-thorax zien we een diffuus interstitieel infiltraat en cardiomegalie, echo normaal. DD van de radioloog: viraal of medicamenteus. Interstitium is verdikt door ontsteking: diffuus interstitieel beeld op de X-Thorax.

Verdere diagnostiek:

- BronchoAlveolairLavage (BAL) (met bronchoscoop naar gebied van afwijkingen en je doet 250 mL vloeistof erin en haalt meer eruit. Met deze vloeistof kan je diagnostiek doen aan hand van de cellen die erin zitten). Alle kweken en cellen hiervan waren negatief
- Nogmaals een BAL later, hierbij waren de mycobacterien kweek positief. Determinatie: mycobacterium tuberculosis, gevoelig voor antibiotica.

6 dagen later beland de patiënt op de IC vanwege respiratoire insufficiëntie. Men heeft een bronchoalveolaire lavage (BAL) gedaan, maar alles test negatief. Pas 18 dagen later wordt de kweek voor Mycobacterium tuberculosis ineens positief. Hij wordt behandeld met tuberculostatica (zie hoorcollege 1 week 3 voor medicamenten) en geneest uiteindelijk. Door de beademing had hij ook nog een pneumonie (= VAP = ventilator associated pneumonia) opgelopen.

Conclusie casus 1:

De man had op dit moment een actieve hepatitis C infectie en had waarschijnlijk vroeger (asymptomatisch) tbc gehad, die onder de interferontherapie opgevlamd is. De ziekte uitte zich ernstig systemisch en respiratoir.

Casus 2

Man, 56 jaar, sinds 2002 bekend met multiple myeloom stadium IIIA. Hij wordt behandeld met chemotherapie en radiotherapie. In 2003 ondergaat hij een stamceltransplantatie (immunosuppressiva vereist wegens afstoting). In 2004 gaat hij op vakantie naar Italië en komt hij terug met een wondje aan zijn pink rechts door een houten deur. In enkele weken vindt er uitbreiding plaats van de huidlaesies naar meerdere plaatsen op de rechterbovenarm en later ook op het linkerbeen.

Het gram preparaat is negatief, de aërobe kweek is negatief, de anaërobe kweek is negatief en de schimmelkweek is negatief. Histologisch zien we een granulomateuze ontsteking (kazende necrose!)(zie hoorcollege 3 week 3) veel leukocyten, monocyten → denk hierbij direct aan Mycobacterium. Het **Ziehl-Neelsen preparaat en de auramine kleuring** blijken inderdaad positief → Diagnose: Mycobacterium abcessus.

Mycobacteriën

Onder de mycobacteriën vallen vele soorten bacteriën, indeling in typisch en atypisch: een paar voorbeelden van de typische:

- **M. tuberculosis complex** → tuberculose
- **M. leprae** → lepra (niet in NI), groeit en ziet er hetzelfde uit als bovenstaande
- **M. abcessus** → huid abcessen
- **Atypische mycobacteriën:**
 - **M. avium complex** → MAC infectie in AIDS-patiënten
 - **M. kansasii** → tbc-achtig
 - **M. marinum** → huid granulomen (contact met H₂O: zeewater etc.)
 - **M. ulcerans** → Buruli ulcer

Het reservoir van deze bacteriën kan de mens, dieren of het milieu zijn.

Onder een microscoop zien alle mycobacterien hetzelfde eruit.

1. Ziel- Neelsen kleuring: kleurt het mycolzuur van de MB.
2. Auramine kleuring: fluorescerende kleurstof die het mycolzuur van de MB kleurt. Het voordeel van de auramine kleuring is dat je 400x vergroot, en bij de ZN kleuring moet je 1000 keer vergroten. Dat veroorzaakt een tijdrovend proces. Bij de auramine kleuring valt de achtergrond ook nog weg en zie je alleen maar die cellen, die daadwerkelijk mycolzuur hebben.

3. Genotype MTBC: Reactieplaatsen op een strip die kunnen reageren met een specifiek deel van het DNA van de bacterie. Zo kan je de bacteriesoorten bepalen.

Wat maakt mycobacterien zo bijzonder?

Mycobacteriën zijn **zuurvast** → ze nemen kleurstof op, maar laten dit niet meer los door hun **unieke celwand**. De celwand is wasachtig, hydrofoob en heeft een hoog vetgehalte. De celwand bestaat uit een bilipide laag, een laagje peptidoglycanen en daarna een dikke laag **mycolzuren** (60% van het drooggewicht) in plaats van LPS. Eigenschappen van Mycolzuur geven kleuring in Ziel-Neelsen preparaat. Mycolzuur en lipiden zorgen voor de specifieke kleuring.

Mycobacteriën zijn door hun unieke celwandstructuur **niet gevoelig voor gewone antibiotica**. Identificatie van de verschillende soorten mycobacteriën is mogelijk aan de hand van de verschillen in mycolzuren.

Ze **groeien erg langzaam** in kweek. M. leprae kan helemaal niet gekweekt worden en andere soorten doen er 3 dagen tot 6 weken over. Ze leven vooral **intracellulair in monocytten of macrofagen**, want de celwand helpt de bacterie te overleven. Ze zijn niet gevoelig voor gewone antibiotica.

Tuberculose is ook een mycobacteriële infectie. 35% van de wereldpopulatie is besmet. Elk jaar komen er 9 miljoen nieuwe tuberculose patiënten bij. 80% van alle tuberculose patiënten woont in een ontwikkelingsland. Er sterven wereldwijd per dag 5000 mensen aan tbc. Ongeveer een half miljoen gevallen betreft het multi-drug resistente tbc. In het Erasmus hebben we 30-50 kweekpositieve tbc gevallen per jaar.

MAC infectie en AIDS:

- Non-specifieke ziekte met koorts, malaise en afvallen
- Veroorzaakt door Mycobacterium avium complex; deze veroorzaakt geen ziekte bij gezonde mensen, maar wel bij AIDS-patiënten (8% van alle AIDS-patiënten hebben MAC).
- Mycobacterium avium is invasief; meerdere organen zijn betrokken
- Goed behandelbaar met clarithromycine/rifampicine/fluoroquinolones
- Is vaak niet geïsoleerd tot 1 orgaan

Lepra:

- Veroorzaakt door Mycobacterium Leprae
- Mycobacterium Leprae is niet in vitro in kweek te brengen
- Weinig bekend over transmissie
- Behandelen met antibiotica: dapsonen, rifampicine, clofazimine
- Na tbc en MAC-AIDS de meeste bekende mycobacteriële infectie
- Zes miljoen mensen in derdewereld landen hebben lepra.

Buruli ulcer:

- Ulceratieve huidziekte
- Veroorzaakt door Mycobacterium Ulcerans
- Endemisch in Afrika, Azië en Zuid-Amerika
- Begint met pijnloze zwelling van de huid en veroorzaakt ernstige deforming ulcers
- Complicaties zijn verlies van organen zoals oog, borst, ledematen
- Huidige behandeling: chirurgische excisie

- Doet vooral de ledematen aan
- Behandeling met antibiotica is onsuccesvol
- Huidige behandeling: chirurgische excisie waarbij een lange ziekenhuisopname vereist is
- De manier van transmissie is niet geheel duidelijk

Microscopie

Mycobacteriën kun je onder de microscoop alleen zichtbaar maken met de **Ziehl-Neelsen kleuring**. Dit is een zuurvaste kleuring. Mycobacteriën zijn dan zichtbaar als kleine, rode staafjes onder een vergroting van 1000x. Alle andere cellen kleuren blauw. Echter soms kan rood ook iets anders zijn, bijv. Nocardia of Gordonia of gisten als zuurvaste bollen. Mycobacteriën kunnen we ook zichtbaar maken met **auramine** (groen) onder de **fluorescentiemicroscoop** met een vergroting van 400x.

Mantoux test

Met de Mantoux test kan je dus besmetting van tuberculose aantonen. Bij de Mantoux test spuit je 0.1 mL eiwitsuspensie van de celwand van *M. tuberculosis* intracutaan. Vervolgens moet je 48 of 72 uur wachten. Als je dan gaat kijken moet je niet letten op **erytheem** (rode uitslag), maar op de mate van **induratie** (= onderhuidse verharding van het weefsel door infiltraat van cellulaire reactie). Je kijkt naar de verhevenheid. De induratie laat zien hoeveel infiltratie er is van mononucleaire fagocyten en T-cellen. >10 mm induratie = positieve test, >5 mm vraagt om nader onderzoek. De Mantoux test heeft *geen diagnostische waarde*, maar kan wel goed gebruikt worden voor het vaststellen van infecties in het kader van een contact onderzoek, want de uitkomst is vaak positief bij endemische tbc of BCG vaccinatie.

Delayed type hypersensitivity

Het duurt wel tot 10 weken voor geheugen B- cellen gevormd worden. Er is soms kruisreactie met atypische mycobacteriën. Daarom nieuwe technieken:

Quantiferon test (IGRA is de verzamelnaam voor deze soort testen)

Antigeenspecifieke memory T- cellen. Je voegt antigenen toe (voor virussen/ bacteriën etc.) Ag door APC verwerkt, aan T-cellen aangeboden. Deze gaan vervolgens INF- gamma produceren. Deze kan je meten. De volgende ochtend haal je beetje bloed van de patient uit en bepaal je de INF- gamma. Dit geeft kruisreactie mycobacteriën/ ATP?

Mantoux en IGRA: na besmetting niet direct positief. Veel fout negatieven.

Deze test werkt anders dan de Mantoux test, is gevoeliger en geeft meer correlatie met de klinische ziekte. Je neemt witte bloedcellen uit de patiënt en brengt deze samen met antigeen. Nu kunnen er 2 dingen gebeuren. Als de T-cellen geprimeerd waren (al eerder besmet), dan gaan ze interferon- γ produceren. Anders niet.

Preventie in Nederland vindt voornamelijk plaats door contactopsporing door de GGD. Gevallen die ontdekt zijn, moeten langdurig en adequaat behandeld worden. Gezondheidsmedewerkers en laboranten die in aanraking komen met tbc moeten zich houden aan strenge veiligheidseisen om besmetting met tbc te voorkomen. De patiënten moeten geïsoleerd worden en de hulpverleners moeten speciale tbc-maskers dragen. Elke patient met een positieve uitslag voor tbc wordt vermeld aan de GGD. Deze zal dan onderzoeken waar het vandaan komt/van wie het afkomstig is. Denk hierbij aan de allochtonen of iemand die net terug is van reis.

In het laboratorium moet men werken met sluizen (BSL-3 lab), onderdruk, filters en veiligheidskasten. Alle medewerkers dienen regelmatig gecontroleerd te worden. Vaccinatie met BCG doen we bijna nooit, omdat vervolgens de diagnostiek levenslang onmogelijk is.

Hoorcollege 3: Granulomateuze ontstekingsprocessen

Tissue necrosis factor: een familie van cytokinen verantwoordelijk voor celdood.

- Geproduceerd vooral door macrofagen, maar ook lymfocyten, mestcellen, endotheel en andere cellen.
- LPS (lipopolysaccharide) en ander bacteriele producten en IL-1 uit macrofagen stimuleren de productie van TNF
- Effecten (samen met IL-6 en IL-2) op veel orgaansystemen, o.a.
Hypothalamus: stimulatie CRH, eetlustvermindering en koorts
Lever: stimulatie acute fase eiwitproductie zoals C reactieve protein (CRP, een eiwit die door veel klinische wordt gebruikt om te controleren of de patient een ontsteking heeft), bevorderen insuline resistentie (ook in andere weefsels) chemokine voor neutrofiele granulocyten.
Macrofagen: stimulatie fagocytose, IL- 1 en prostaglandine E2 PGE2 productie.
- Lokale TBF effect o.a. via andere mediators: rubor, tumor, calor en dolor
- Hoge concentraties TNF: symptomen van shock
- Langdurige lage concentraties van TNF: cachexie (bv patiënten met kanker)

Bij de overgang van acute/actieve naar chronische ontsteking vinden er drie stappen een aantal stappen plaats.

Leukocyten (o.a. neutrofiele granulocyten en lymfocyten) zijn betrokken in de volgende acties:

1. Cytokinen en andere ontstekingsmediators komen vrij. Het endotheel wordt gemodificeerd. De bloedstroom gaat wat langzamer. Chemotaxis. De leukocyt zoekt de ontstekingshaard op m.b.v. de toenemende concentratiegradiënt van chemokines en gaat langs het endotheel rollen m.b.v. selectinen.
2. activatie van integrinen.
3. adhereren d.m.v. geactiveerde integrinen en intercellulaire adhesiemoleculen.
4. extravasatie (ook wel transmigratie), de leukocyt dringt tussen de endotheelcellen door.
5. De geïnfilteerde leukocyt wordt geactiveerd door de chemokines.
6. Chemotaxis stopt, omdat de leukocyt de ontstekingshaard heeft bereikt. De leukocyt is immobiel geworden.

De eerste dag van het ontstekingsproces vindt vooral oedeemvorming en inflammatie plaats. De oedeemvorming vind plaats door veranderingen in de hydrostatische druk en doorlaatbaarheid van de capillairen. De tweede dag treden de neutrofiele granulocyten op, welke op de achtergrond verdwijnen tijdens de derde dag. De neutrofielen gaan namelijk dood nadat ze 1 keer geactiveerd zijn. De derde dag treden de monocyt (voorloper van de macrofaag) en macrofagen op de voorgrond. De eerste drie dagen gaan acuut en dan vind de vorming van jong bindweefsel (granulatiweefsel) plaats. Uiteindelijk vind dan toename van collageen en wondcontractie plaats.

Een macrofaag is als 'regisseur' belangrijk om 2 redenen:

- Geeft herstel en groei doordat hij groeifactoren in gang zet (angiogenese en fibroblast-activatie)
- Beschadigt het weefsel door intoxicatie en ontsteking (proteanem, NO)

Stappen in weefselbeschadiging:

- inflammatie
- granulatie weefsel (= rode weefsel) ofwel de bindweefselvorming, vanaf de derde dag accumuleert het collageen tot steeds grotere hoeveelheden

- wondretractie

Na het ontstaan van weefselschade of een ongewenste prikkel treedt eerst acute inflammatie op. Vervolgens kan de prikkel verdwijnen (resolutie), het weefsel abcessen vormen of kan het weefsel genezen.

In meeste gevallen is ons immuunsysteem in staat om de acute ontstekingsreactie binnen een paar dagen te laten stoppen, maar het kan ook zo zijn dat de macrofagen niet in staat zijn om de agens in een keer op te ruimen. Dan krijg je een chronische ontsteking.

Je spreekt van een chronische ontsteking als de ontsteking langer dan zeven dagen duurt. De chronische ontsteking treedt op als de infectie of de toxines persisteren (= aanwezig blijven), of als er sprake is van een auto-immuunziekte.

Een ontsteking kan soms wel maanden duren. Bij een chronische ontsteking zie je onder de microscoop infiltratie van mononucleaire ontstekingscellen (macrofagen, lymfocyten, en niet neutrofiele granulocyten. Omdat lymfocyten en macrofagen een langer uithoudingsvermogen hebben en zo dus langer in staat zijn om het agens aan te pakken), weefseldestructie en bindweefselformatie (angiogenese, fibrose).

Het genezingsproces kan eindigen in regeneratie (de cel heeft de capaciteit beschadigde cellen volledig te vervangen) of in littekenweefsel.

Bij virussen treden acute en chronische inflammatie vaak gelijktijdig op.

Een voorbeeld van een chronische ontsteking is de borstprothese, welke een voortdurende prikkel veroorzaakt waardoor er een fibrotisch kapsel rondom de prothese wordt gevormd. Granulocyten zijn polynucleair.

Macrofagen zijn op veel plaatsen aanwezig. Een aantal orgaanspecifieke macrofagen zijn: Microgliacel, longmacrofaag, de histiocyten (=weefselmacrofaag), peritoneale macrofagen, macrofagen in exsudaat, epitheloïde macrofagen (bij chronische ontstekingen), osteoclasten in bot en meerkernige reuscellen.

Waar komt een macrofaag vandaan?

Een macrofaag stamt uit monoblasten in de beenmerg die vervolgens in het bloed komen. In het bloed heten ze monocyten. Op het moment dat de monocyten (weinig actief, geen celorganellen, dichte chromatine) de bloedbaan verlaten en in weefsels terechtkomen, heten ze macrofagen (heel licht en actief chromatinepatroon waardoor je kunt aflezen dat er veel genen worden afgelezen).

Samenspel tussen macrofagen en lymfocyten bij chronische ontsteking:

Een macrofaag produceert na activatie o.a. IL-1 en TNF en presenteert het antigeen aan een T-cel. De T-cel wordt geactiveerd en produceert IFN- γ , waardoor meerdere macrofagen worden geactiveerd. Dit systeem is dus een zelfversterkende cascade.

Macrofagen induceren zowel scheiden nog andere stoffen uit, met pleiotrope effecten.

Granulerende ontsteking: kan opgevat worden als overgang van de acute ontstekingsreactie naar herstel van weefselbeschadiging door littekenvorming. Fibroblast speelt hoofdrol. Deze worden ook gestimuleerd door verschillende cellen (B-cellen, T-cellen, macrofagen, mestcellen, bloedplaatjes). Deze scheiden diverse stoffen uit die invloed hebben op de collageen/elastine synthese (matrix synthese) en mitose. Ook in de bindweefsel is er een evenwicht tussen afbraak en herstel van de beschadigde bindweefsel.

Histologische kenmerken:

- Veel jonge bloedvaten
- Fibroblastenproliferatie
- Gaat in latere fasen over in celarm bindweefsel (litteken)
- Kan samengaan met/grenzen aan gebieden met acute ontsteking

Dit is niet hetzelfde als **Granulomateuze ontsteking**:

- chronische ontsteking; gif of micro- organisme blijft aanwezig
- geactiveerde macrofaag met epitheloïde aspect (lijkt op epitheel)
- macrofaag speelt de hoofdrol
bv granuloom

Interleukine 1 speelt een belangrijke rol in het ontstekingsproces en kan vele effecten hebben. Enkele effecten van interleukine 1 zijn: koorts, slaap, neutrofielenactivatie, proliferatie van fibroblasten, cytotoxische effecten etc..

Na fagocytose gaat een macrofaag dood, hij verteerd, of als hij het niet alleen aan kan, kan hij fuseren met andere macrofagen waardoor je dus multinucleaire cellen krijgt = **meerkernige reuscel**.

Een **granuloom** is een ophoping van lymfocyten (vooral T-cellen), plasmacellen, epitheloïde macrofagen en reuscellen (Langerhanstype en vreemdlichaamstype). Om deze ophoping van cellen heen zit meestal een wal van fibroblasten. Granuloomvorming is een type IV hypersensitiviteitsreactie. Dit is een reactie van het lichaam op een vreemd lichaam (kan zowel exogeen (prothese) als endogeen (haar) zijn).

Ontstaan van granulomen

Weefselbeschadiging → macrofagen kunnen schadelijke agens niet verteren → hierdoor zowel een immunreactie als aanhechting van macrofagen aan elkaar → granuloom

We kennen 4 typen **hypersensitiviteitsreacties**:

- **Immediate = type I** → allergische reactie, mestcellen zijn hiervoor belangrijk
- **Antistof = type II** → antistoffen tegen antigenen op cellen of tegen ECM, bijv een transfusie reactie
- **Immuuncomplex gemedieerd = type III** → antistof/antigeen complex lokken inflammatie uit, bijv glomerulonefritis
- **Celgemedieerd = type IV** → delayed type (CD4-T-helpercellen, intracellulaire micro-organismen en granulomen) of T-cell gemedieerde toxiciteit (bij cytopathische virussen) (tbc)

Enkele ziektebeelden waarbij granulomen voorkomen:

- tuberculose
- lepra. Veroorzaakt door mycobacterium leprae. Twee vormen: tuberculoïd (meer beperkt tot huid en extremiteiten) en lepromateus)
- syfilis
- schistosomiasis
- sarcoïdose. Het heeft een onbekende oorzaak. Kenmerkend door niet-verkazende granulomen. Alle organen kunnen aangedaan zijn, meestal de longen.
- silicose / talk / asbestose (niet immunologisch)
- ziekte van Crohn

Ook kan je lichaam in reactie op een vreemd lichaam (bijv. hechting, prothese etc) granulomen vormen.

Een granulomateuze ontsteking is een ontsteking met een specifieke histologie, maar redelijk beperkt DD. Alhoewel de oorzaak niet altijd bekend is. Met histologie kan je je DD verkleinen, maar de etiologie wordt niet altijd bekend.

Hoorcollege 4: Diagnostiek van infectieziekten

Eerst komt de patiëntenanamnese pas daarna worden labuitslagen beoordeeld. Diagnostiek van infectieziekten begint met:

Anamnese:

- Klachten → gelokaliseerd of gegeneraliseerd?
- Ontsteking? → koorts, zwelling, pijn, roodheid, functieverlies?
- Beloop → acuut, geleidelijk, slepend, chronisch?
- Voorgeschiedenis / onderliggende ziekte (bepaalt immuunstatus).
- Familie en omgevingsanamnese
- Reisanamnese
- Vaccinatiestatus
- Geneesmiddelen (antibiotica) gebruik

Lichamelijk onderzoek:

- Algemene toestand: ziek of niet ziek, mentale status
- Bloeddruk, hartslag, ademhalingsfrequentie
- Temperatuur
- Huid en slijmvliezen → droog, kapot, zweren?
- Palpatie en auscultatie thorax (hart en longen)
- Palpatie en auscultatie abdomen
- Gewrichten

Lichaamstemperatuur

De gemiddelde lichaamstemperatuur is 37°C. Het probleem is echter dat deze niet bij iedereen hetzelfde is en kan verschillen over de dag. De temperatuur kan verschillen in de ochtend en in de avond. Bij kinderen jonger dan 6 maanden is de variatie over de dag vrij klein, maar bij kinderen tussen de 2 en 6 jaar oud kan het 1°C verschillen en bij kinderen boven de 6 jaar zelfs 2°C. De lichaamstemperatuur varieert bij volwassenen weer minder. Echter bij vrouwen is hun lichaamstemperatuur door hun menstruatiecyclus heen soms ook >1°C hoger. De lichaamstemperatuur is in de avond het hoogste.

Koorts:

- Lichaamstemperatuur >38°C (->bloedkweek, want grotere kans op pos uitslag)
- Door verhoogd setpoint in hypothalamus (→ spiercontractie en vasoconstrictie)
- Veroorzaakt door exogene pyrogenen (o.a. bacteriële producten) of endogene pyrogenen (vooral cytokinen).
- Niet uitsluitend bij infectieziekten, ook toxisch of paraneoplastisch.
- CAVE: koortsonderdrukkende middelen zoals corticosteroiden of paracetamol onderdrukken koorts en daardoor is er geen realistisch beeld van de lichaamstemperatuur meer mogelijk en kan de patiënt nog steeds infectieziekte hebben.

Aanvullend onderzoek:

- Beeldvorming, bijv. X-thorax, CT-scan of echo door een radioloog
- Klinische chemisch onderzoek of hematologisch onderzoek door een klinisch chemicus

- Pathologisch onderzoek door een patholoog
- Microbiologisch onderzoek door een arts microbioloog

Klinische chemie bij infectieziekten

De lokale schade door micro-organismen of hun toxinen en de ontstekingsreactie zorgt ervoor dat er allerlei cytokinen en chemokinen vrijkomen. Hier kun je wat mee qua laboratorium onderzoek, bijvoorbeeld:

- CRP = C-reactief proteïne = acuut fase eiwit → meestal verhoogd bij een infectie
- Leukocyten telling → meestal leukocytose van vooral neutrofiële granulocyten
- Leukocyten differentiatie → linksverschuiving door meer voorstadia. Een linksvershuiving door meer voorstadia duidt altijd op een bacteriële infectie.
- Leverfunctie en nierfunctie bepalen
- Hb en stolling bepalen

Microbiologisch onderzoek → belang van het **aantonen van een ziekteverwekker**:

- Inzicht in de prognose
- Bepaalt keuze en duur van antimicrobiële therapie
- Gevolgen voor omgeving (transmissie, vaccinatie) (antibiotica geven)
- Epidemiologisch belang (prevalentie, incidentie, epidemieën)
- Kan wijzen op verminderde afweer

*Waarom is het van belang dat wij als toekomstige artsen de **microbiologische technieken** kennen?*

- Je moet weten **welk materiaal** je af moet nemen bij een patiënt en hoe je dit materiaal naar het laboratorium moet **transporteren**
- Je moet de **vraagstelling** voor het lab goed kunnen formuleren, omdat dit bepaalt welke diagnostische technieken zij moeten toepassen.
- Je moet de **resultaten kunnen interpreteren**:
 - De **sensitiviteit** en **specificiteit** van elke test zijn anders
 - Aan elke test zitten **voordelen** en **nadelen**
 - Sommige **factoren** kunnen het resultaat beïnvloeden
- Je moet weten **hoelang** het duurt voordat de uitslag bekend is
- Je moet weten **hoe duur** de test is.

Bij screening is een hele sensitieve test handig, om dan ter controle een specifieke test te doen. **Prevalentie** beïnvloedt de waarden van een test.

2 x 2 Tabel analyse

	Ziekte aanwezig	Ziekte afwezig
Test pos	A	B
Test neg	C	D

Er bestaan 2 vormen van microbiologische diagnostiek:

- **Aantonen van het agens**
 - isolatie en identificatie van pathogeen na replicatie, bijv in een kweek
 - compleet micro-organisme zichtbaar maken met hulpmiddelen en kleuring (lichtmicroscopie of elektronenmicroscopie)
 - delen van een micro-organisme aantonen (eiwit, suikers, nucleïnezuren) m.b.v. PCR

- **Aantonen van gastheerrespons**
 - door het aantonen van antistoffen: IgG, IgM en IgA

Microscopisch onderzoek:

- Lichtmicroscopie → sputum, urine
- Donker veld microscopie → genitaal ulcus
- Electronen microscopie → faeces, ulcus, orf

De diverse **kleuringen** die je toe kunt passen zijn geschikt om steeds andere dingen duidelijk zichtbaar te maken:

- **Gramkleuring** à bacteriën
- **Ziehl-Neelsen** à zuurvaste bacteriën
- **Giemsa** à parasieten in het bloed, bijv. malaria (protozoa)
- **Zilverkleuring** à hiermee kan je membraanverdikkingen goed zichtbaar maken m.n. bij gisten en schimmels
- **Jodiumkleuring** à Hiermee kan je heel goed ophopingen zichtbaar maken kleurt zetmeel en daarmee dus wormen, eieren, cysten

Serologie

In de acute fase van een infectie kun je een micro-organisme meestal aantonen met specifiek IgM. Later en levenslang kan dit met IgG. Titerstijging van specifiek IgG wijst een recente (re)infectie. Enkele serologische begrippen zijn:

- **titer** = de laatste verdunning uit een verdunningsreeks die een positieve reactie geeft
- **acute fase** = begin van een ziekte
- **convalescentie fase** = herstel fase
- **serumpaars** = één serummonster uit het begin van de ziekte (uit de acute fase) één 10-14 dagen later (uit de convalescentie fase)
- **significante titerstijging** = 4-voudige stijging in antistoftiter tussen het eerste en het tweede serummonster
- **diagnostische titerstijging** = IgG titerstijging of éénmalig positieve IgM

We onderscheiden de volgende **serologische technieken**:

- ELISA (voor eiwitten)
- Complementbindingsreactie
- Immunofluorescentie
- Agglutinatie
- Virus-neutralisatie
- Western blot

Je hebt verschillende soorten microbiologische technieken:

Microscopisch onderzoek (al dan niet met kleuring).

- Voordelen: meerdere micro-organismen kunnen samen gezien worden, het is snel, van grote waarde vooral in steriele materialen (bijv. liquor) en ook niet kweekbare micro-organismen zijn aantoonbaar.
- Nadelen: weinig sensitief, micro-organismen zijn pas zichtbaar in aantallen $>10^5$ per mL en voor nadere determinatie en gevoeligheidsbepaling is een andere techniek nodig.

Kweek:

- Bacteriën, gisten en schimmels zijn vaak goed kweekbaar (op agar). De keuze van de kweekmethode (anaëroob of aëroob) en het medium zijn afhankelijk van het materiaal en de vraagstelling. Virussen kan men alleen indirect aantonen door hun effect op cellen = **cythopathologisch effect**. Virussen kan je niet zomaar zien en kan je niet kweken op een voedingsbodem. Je hebt voor het kweken van virussen cellen nodig. Je kan op een glasje zien dat virussen afhankelijk zijn van andere cellen om verder te voortplanten. In

- gevallen van geen virussen, gaan cellen uitgestrekt als driehoekjes zitten overeen glaasje en in het geval van virussen zien de cellen er afgerond tot rondjes. De microtubuli die nodig zijn om virussen uitgestrekt te houden ontbreken bij virus geïnfecteerde cellen, waardoor ze er afgerond uitzien.
- Als je iets kan kweken kan je ook de gevoeligheid op antibiotica meten.
 - Identificatie van bacteriën doe je op basis van het gebruik van verschillende substraten (kleurindicator), productie van enzymen en de beweeglijkheid. Virussen kun je identificeren met behulp van specifieke antistoffen (immunofluorescentie).
 - Voordelen: je kunt meerdere micro-organismen tegelijkertijd aantonen, aansluitend kun je identificatie en gevoeligheidsbepaling uitvoeren, de techniek is redelijk sensitief en relatief goedkoop.
 - Nadelen: alleen toepasbaar bij kweekbare micro-organismen en soms erg arbeidsintensief.
 - Er zijn factoren die het resultaat beïnvloeden, namelijk anti-microbiële therapie en afname en transport van patiëntenmateriaal.

Identificatie (van bacteriën en virussen) :

Bacteriën

- Gebruik van verschillende substraten (met kleurindicator)
- Productie van enzymen
- Beweeglijkheid

Virussen:

- CPE, specifieke antistoffen
- Immunosluorescentie

Handmatige korte bonte rij:

De biochemische eigenschappen van bacteriën worden bepaald met behulp van een pH-indicator of door een reagens aan de cultuur toe te voegen waarbij een gekleurde verbinding ontstaat. Omdat meestal een aantal verschillende reacties tegelijk worden onderzocht ontstaat er bij de beoordeling een bonte rij buizen.

Tegenwoordig zijn er nieuwe ontwikkelingen die sneller en dieper zijn in de identificatie van bacteriën en andere micro-organismen. Hierbij worden de volgende targets gebruikt;

- Genoom, DNA wordt afgelezen
- transcriptoom, mRNA wordt afgelezen
- proteoom, eiwitten die worden gemaakt worden afgelezen
- metabooloom

DNA/RNA detectie:

- Voordelen: zeer sensitief, ook bruikbaar voor niet kweekbare en dode micro-organismen en kwantitatief resultaat mogelijk (aantal DNA kopieën/mL)
- Nadelen: je mist snel dingen, want je zoekt specifiek maar naar 1 micro-organisme met je primer (1 target, zelfs bij mutatie al negatief resultaat), redelijk arbeidsintensief en niet in alle laboratoria uitvoerbaar. Op dit moment is men bezig met het ontwikkelen van een "virochip" zodat men direct PCR kan uitvoeren voor elk bekend virus tegelijk.

Serologie: serologische reacties doe je altijd in de kliniek.

- Voordelen: snel en eenvoudig, kan sensitief en specifiek zijn, maar dit hangt af van de verwekker
- Nadelen: 1 micro-organisme als target, serologische respons kan nog afwezig zijn in de acute fase (dan 2 monsters nodig) en de serologische respons is afhankelijk van de immuniteit van de gastheer.

- Factoren die het resultaat beïnvloeden zijn: immuniteit, immunosuppressiva en toegediende antistoffen.

Serologische begrippen:

Titer: de laatste verdunning uit een verdunningsreeks, die nog een positieve reactie geeft

Acute fase: begin van ziekte

Convalescentie fase: herstel fase

Serumpaars: een serummonster uit het begin van de ziekte (uit de acute fase) en een 10-14 dagen later (uit de convalescente fase)

Significante titerstijging: viervoudige stijging in antistoftiter tussen eerste en tweede serummonster

Diagnostische is : IgG titerstijging of (eenmalig) positieve IgM

Hoorcollege 5: Immunglobulinen I:

Immunglobulinen I:

case report 1:

De casus betrof een jongetje met een leeftijd van 4,5 jaar. Hij had recidiverende bovenste luchtweginfecties en negentien sepsis episodes waarvan tien door pneumococci. In het bloed waren neutrofielen, lymfocyten en monocytten aanwezig.

Bij nader onderzoek bleek er sprake te zijn van een 'agammaglobulinie'. De jongen had geen immunglobuline. Subcutane infusies deden het jongetje opknappen.

Antistof bestaat uit vier ketens: twee zware keteneiwitten en twee lichte ketens. De ketens worden door disulfidebruggen bij elkaar gehouden, dit zijn covalente bindingen. Elke antistof is uniek, door de drie hoogvariabele delen die elk stuk van de lichte keten bevat.

Immunglobulinen isotypen:

Er zijn vijf verschillende zware keten eiwitten, alle verantwoordelijk voor een Ig-isotype: IgM, IgD, IgG, IgE, IgA. Deze eiwitten hebben een verschillende effectorfuncties. Hun functies vinden plaats in verschillende organen.

IgM komt voor als pentameer. Het zijn vijf identieke moleculen die door disulfidebruggen aan elkaar zitten (covalente binding). De J keten is ook belangrijk, dit is een los eiwit. IgM komt met name in het bloed terecht. Het voordeel van de pentameerstructuur is dat alle plaatsen kunnen samenkomen. Er zijn vaak meerdere epitopen op een virus, in het IgM zijn dan vaak tien bindingsplaatsen beschikbaar. Dit zorgt voor een 5-10 keer zo sterke interactie. IgM is ook verantwoordelijk voor complementactivatie

IgA komt voor als multimeer. Het is meestal monomeer, maar 10% is dimeer. Het eiwit bestaat uit 3 constante ketens en 1 variabele. Het eiwit vervult een functie in het maagdarmkanaal en de longen. IgA wordt aangemaakt door plasmacellen en kan worden opgenomen door epitheelcellen. Het wordt aan de lumenzijde van de darm weer losgelaten. De secretoire component gaat aan het IgA zitten, deze is belangrijk voor de structuur. Er zijn namelijk een hoop bacteriën die de dimeer willen afbreken.

IgE bestaat uit vier constante domeinen. Er zit bijna niets los in het serum. Zit bijna allemaal aan FC epsilon-receptor. De IgE-receptor. IgE die op de receptor vastzit kunnen basofielen antigeen mee herkennen. De cel kan geactiveerd worden en functie kan worden uitgeoefend. De cel rijpt uit tot mestcel.

IgG is eigenlijk de belangrijkste van het setje: komt het meest voor in vier subklassen ingedeeld op de grote van de hingeregion (zie collegesheets):

IgG1:

IgG2

IgG3: langst, minst stabiel

IgG4

De verspreiding van IgG berust niet op passieve diffusie, maar op een actief proces door cellen. Net als IgE kan het aan receptoren binden. FCgamma receptoren. Na het binden, het opnemen, door de cel sluisen laat het weer los. Daarnaast heeft IgG een bijzonder lange halfwaardetijd. Deels vanwege de stabiliteit. Maar ook vanwege recycling. Eiwitten worden wel eens opgenomen en afgebroken. Wanneer IgG echter in een lysosoom zit wordt het gered door de neonatale receptor en toch naar de andere kant vervoerd.

Alleen een plasmacel, een eindstadium B-cel maakt antistoffen. Ze zijn met name belangrijk om bacteriën te neutraliseren. De B-cel antigeenreceptor blijft op de celmembraan zitten (CD79b en a). Ze zijn belangrijk voor het doorgeven van signalen aan de cel.

B-cellen worden aangemaakt in het beenmerg. Voorlopercellen rijpen daar uit voor ze het bloed ingaan. Zodra de b-cel iets herkent wordt hij geactiveerd en gaat hij prolifereren en uitrijpen tot plasmacellen en geheugencellen. Dit vindt met name in de lymfeknopen plaats.

Alle B-cellen hebben eigenlijk een eigen Immunglobuline: het hele spectrum aan antistoffen wordt gemaakt door verschillende cellen. In theorie zijn dit er $1 \cdot 10^{15}$. Alleen degene die antigeen herkennen gaan prolifereren.

Het verschil tussen de primaire en secundaire respons van de humorale afweer is dat er de tweede keer sneller, meer en betere antistoffen worden gevormd.

De baby had een Bruton's tyrosine kinasemutatie, hierdoor konden zijn B-cellen niet uitrijpen.

Hoorcollege 6: Immunglobulinen II:

Antistoffen hebben massale diversiteit. Als antistoffen eenmaal zijn geproduceerd gaan ze toch nog wat veranderen. Verschillende lymfocyten lijken erg op elkaar onder de microscoop, maar B-cellen en t-cellen zijn allemaal verschillend.

Op DNA niveau zijn er V- genen, D genen en J-genen. Gevolgd door zgn constante gensegmenten. Deze worden zoals in week 2 besproken gerecombineerd.

Eerst vindt herschikking in de zware keten genen plaats. De voorloper B-celreceptor wordt gevormd. Deze bestaat wel uit de zware keten, maar nog niet de lichte keten. Hij moet getest worden. Er zit wel een pseudolichte keten op. Waarschijnlijk dient deze alleen om het geheel stabiel te houden. Als de zware keten is goedgekeurd deelt de cel 1 of 2 keer. Vervolgens gaat pas de lichte ketengenen herschikken. Dan ontstaat het echte antistofcomplex. Uiteraard uit de zware keten en de goed geproduceerde lichte keten. Qua structuur moeten ze in orde zijn. Ze kunnen vanalles herkennen zoals kleine elementen van het eigen lichaam, maar als ze een te grote respons geven worden ze afgekeurd.

Somatische mutaties en IgA classeswitch.

B-cellen komen terecht in hoogendotheliale venulen. Dit zijn verbrede vaten in de lymfeklieren. Het endotheel is wat hobbelig. De bloedstroom in een verbreding wordt trager. Ze treden in de

lymfeklier naar de kiemcentra. Virginal B-cellen komen zo onderin binnen. Na contact met T-cellen en antigeen presenterende cellen gaan ze, indien ze antigeen herkennen, prolifereren. Er wordt opnieuw geplakt op DNA niveau. De specificiteit van de antilichamen kan worden aangepast, niet massaal, maar heel kleinschalig. Er kunnen een paar nucleotiden worden gewijzigd. Hierdoor is de specificiteit net beter of net minder. Zo krijg je betere antistoffen bij de volgende infectie. Dit proces heet somatische hypermutatie.

Klasseswitch.

Klasseswitch is opnieuw een proces op DNA niveau. Er wordt opnieuw geknipt en geplakt. Voor elk van de constante exonen die coderen voor zware ketens zit een switch regio van 1500-2000 baseparen. Medegestuurd door t-cellen kan de b-cel de switchregio's koppelen: Knippen en plakken. Zo kan een B-cel van klasse switchen

Hoorcollege 8: Adaptieve immuunrespons:

We onderscheiden 3 soorten lymfoïde organen:

- **Primaire = centrale** lymfoïde organen:
 - beenmerg en thymus
- **Secundaire = perifere** lymfoïde organen
 - Lymfeklieren, milt, platen van Peyer, tonsillen, adenoïd
- **Tertiaire** lymfoïde organen = fysiologisch, geen echte vaste structuur:
 - MALT, bijv. BALT en GALT
 - Heeft stimulatie nodig door langdurige microbiologische en antigene factoren

Vroeger was je in het laboratorium een uur bezig om 400 cellen onder de microscoop te tellen. Tegenwoordig hebben we voor analyse (tellen) van bloedcellen de **flowcytometer** (= FACS = fluorescente activated cell sorter). Dit werkt als volgt: de cellen zitten in een soort reageerbuisje, worden hieruit opgezogen en passeren een laserbundel.

Nu kunnen er 3 dingen gebeuren, die allemaal geregistreerd worden:

- 1 deel van het licht zal worden geabsorbeerd
- 2 een ander deel wordt verstoord (scatter)
- 3 indien fluorescerende antistof α cel gaat fluoresceren.

Al deze gebeurtenissen worden geregistreerd en direct geanalyseerd. Het systeem is zeer snel: het kan 10.000 cellen per seconde verwerken. Alle gegevens krijg je in detail. Je kunt in procenten onderscheiden hoeveel bloedplaatjes, lymfocyten, macrofagen en neutrofiële granulocyten er in het reageerbuisje zaten. Daarna kun je nog subpopulaties markeren en hierop nadere analyse toepassen, gebaseerd op de membraaneiwitten en/of CD markers.

Migratie van cellen uit de bloedbaan:

Migratie van de lymfocyten naar de lymfeklieren kan via de afferente lymfebanen en via de hoog endotheliale venulen (HEV). Een arterie die via de hilus van de lymfeklier naar binnenkomt, vertakt zich in arteriolen. De arteriolen lopen door de mergstrengen, paracortex omhoog naar de cortex. Hier vormen de arteriolen een capillair netwerk en deze vormen vervolgens de hoog endotheliale venulen. Dit zijn venulen die bestaan uit dikke endotheelcellen en het lumen is sterk verbreed t.o.v. andere lymfeklieren. Dit heeft een bloedsstroomsnelheid bloedstroomsnelheid verlagend effect. Dit maakt het mogelijk dat lymfocyten zich kunnen hechten aan het endotheel (via homing receptoren) en zo kunnen ze migreren naar het parenchym van de lymfeklier. Lymfocyten verlaten de lymfeklier via het afferente lymfevat en sluit vervolgens aan op de ductus thoracicus die uiteindelijk uitmondt in de vena subclavia.

Migratie van lymfocyten de bloedbaan uit:

1. Via capillairen in de weefsels (10%)
2. Via hoogendotheliale venulen (90%)

Migratie van lymfocyten de lymfeklieren in:

1. Via afferente lymfevaten
2. Via hoogendotheliale venulen (HEV)

Het hele proces van het verlaten van de bloedbaan door lymfocyten noemen we **transmigratie**. **Diapedese** is het passeren van het endotheel door de lymfocyten. **Selectinen** zorgen voor het rollen en deels de adhesie. **Integrinen** en **intercellulaire adhesiemoleculen** zorgen voor de adhesie en migratie. Chemokinen veroorzaken **chemotaxie** = het bewegen van de cellen in een concentratiegradiënt migrerend naar de plek waar de hoogste concentratie van die stof is.

Functioneel onderscheiden we **twee verschillende groepen adhesiemoleculen**:

- zij die het **migratiepatroon van cellen bepalen**, (plek):
 - **homingreceptoren** op de lymfocyten
 - **adressinen** op endotheel en epitheelelke homingreceptor bindt aan zijn complementaire adressine
- zij die de **interactie tussen cellen stabiliseren** en daardoor de activatie van cellen leidend tot **specifieke effectorfuncties versterken**, bijv B-cel-T-cel interacties, T-cel-APC interacties, T-killercel-targetcel interacties en leukocyt-endotheel interacties.

Cross talk = cellen praten met elkaar, beïnvloeden elkaar en hebben elkaar nodig.

Voorwaarde voor inductie inductie van goede immuniteit door een agens:

1. Moet als vreemd worden ervaren.
2. Relatief hoog molecuulgewicht (> 10.000 D)
3. Verwerking door macrofagen en/of DC.
4. Complexe structuur (bijv. zijketens)
5. Juiste optische configuratie
6. Juiste fysische toestand (bijv. aggregaten;adjuvans)
7. Geschikte genetische constitutie van responder (vgl. mensen met een allergische constitutie)

Wat gebeurt er in een lymfeklier na infectie, vaccinatie of immunisatie?

Een virginale B-cel komt de lymfeklier binnen met 100.000 dezelfde antistofmoleculen op zijn membraan. Nu kunnen er 2 dingen gebeuren:

- Binnen 3 dagen is zijn antigeen nog niet aanwezig in de lymfeklier → dan gaat hij in apoptose, dit gebeurt in 90% van alle gevallen.
- In 10% van de gevallen is het antigeen wel aanwezig → proliferatie en differentiatie tot plasmacel en geheugencel.

Een plasmacel produceert eerst IgM en na de **klasse switch** IgG, IgA of IgE. Een plasmacel in het beenmerg produceert ruim 3 keer zoveel antistofmoleculen als een plasmacel in de lymfeklier of milt. Dit komt omdat de plasmacellen in het beenmerg altijd zijn ontstaan uit B-geheugencellen.

Subpopulaties van T-lymfocyten → er bestaan 3 soorten T-cellen:

- **T-helper cellen (Th):**
 - Helpen B-lymfocyten bij proliferatie en differentiatie tot antistofvormende cellen
 - Stimuleren macrofagen tot het doden van gefagocyteerde micro-organismen
 - Stimuleren T-killer cellen
- **T killer cellen (Tk):**

- Lyseren virusgeïnficeerde cellen en cellen van een transplantaat. Dit doen ze op twee manieren:
 - § **Perforinen** → prikken gaatje in het celmembraan van de cellen
 - § **Granzymen** (proteases) → induceren apoptose
- **T suppressor/regulator cellen (Treg):**
 - Remmen immuunreacties

Th zijn nodig in *alle fasen van de antistofvorming*, dus niet alleen als beginschot, maar bij de activatie, proliferatie, klasse switch en terminale differentiatie.

Th herkennen peptiden gebonden aan HLA-II en T_k herkennen peptide gebonden aan HLA-I. Maar dit is niet genoeg om te zorgen voor activatie; er is namelijk ook **co-stimulatie** nodig → de APC moet **IL-1** produceren.

Dus: binding van **peptide in combinatie met HLA-molecuul + IL-1** → activatie.

- **geactiveerde Th** gaat IL-2 produceren (alleen T_{h1}, zie hieronder) en de IL-2-rec tot expressie brengen. Binding van **IL-2** zorgt voor proliferatie = **autocriene stimulatie**. Ook B-cellen en T_k worden tot proliferatie aangezet, dus als Th wordt uitgeschakeld is dit een groot probleem.
- **geactiveerde T_k** kan zelf geen IL-2 produceren, maar brengt de IL-2 rec wel tot expressie. Binding van IL-2 zorgt ook hier voor proliferatie = **paracriene stimulatie**.

Cytokinen

- eiwitten geproduceerd door bepaalde cellen en die andere cellen beïnvloeden ten aanzien van proliferatie, differentiatie en of functionele activiteit.
- Meer dan 100 verschillende bekend; werken vaak in combinatie met elkaar: ofwel synergistische (elkaar versterkend) ofwel antagonistisch (tegengestelde werking)
- Beïnvloeden andere cellen uitsluitend via specifieke cytokine-receptoren
- Zeer sterke biologische activiteit → weinig cytokine heeft al groot effect
- Korte halfwaardetijd (enkele minuten)
- Vaak sterke locale functie (in tegenstelling tot hormonen)

Er bestaan 2 soorten Th die verschillen in het soort cytokinen dat ze produceren:

- **T_{h1}**: produceren interferon- γ , IL-2, IL-12 en lymfotoxine
- **T_{h2}**: produceren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 en IL-10, maar geen IL-2.

Beide soorten T-helpercellen produceren TNF- α , GM-CSF, IL-3 en IL-13. En ze zijn beide CD4+ en dus gevoelig voor HIV. CD8+ is het geval bij cytotoxische T-cellen..

De subpopulaties reguleren elkaars proliferatie en activiteit, zodat ze in evenwicht blijven.

Interferon- γ van T_{h1} houdt de T_{h2} onder controle en **IL-10** van T_{h2} houdt de T_{h1} onder controle.

Cytokinen → effect in de onmiddellijke omgeving.

Hormonen → effect op afstand.

Leishmania infecteren de macrofagen zelf en bevinden zich intracellulair. Als zowel T_{h1} als T_{h2} cytokinen gaan produceren en zo de macrofagen proberen te activeren, dan heeft dit alleen maar een negatief effect (parasieten zullen nog harder vermenigvuldigen). Als de macrofaag alleen wordt gestimuleerd door interferon- γ van T_{h1} dan kan de macrofaag de parasiet doden. Kortom alleen T_{h1} helpt, T_{h2} werkt juist averechts.

Er zijn nog meer voorbeelden van bacteriën en parasieten die in macrofagen leven:

- Mycobacterium tuberculosis
- Mycobacterium leprae
- Mycoplasma pneumoniae
- Neisseria gonorrhoeae

- Leishmania soorten
- Plasmodium malariae

Altijd zijn T_h1-cellen met hun interferon- γ productie nodig voor het doden van deze bacteriën en parasieten door macrofagen.

Het is belangrijk dat het lichaam ervoor zorgt dat de juiste soort Th aanwezig is op een bepaald moment. Factoren invloed hebben op de *differentiatie naar beide soorten Th* zijn:

- soort antigeen
- porte d'entree van het antigeen
- concentratie van het gepresenteerde antigeen
- aard van antigeen presenterende cellen op die plek
- cytokinen die gemaakt zijn door andere cellen (inclusief andere T-cellen)
- hormonen en andere regulerende factoren. (stress)

Dus het is niet van te voren te voorspellen hoe iemand reageert op besmetting.

Antibacteriële immuunrespons

- humoraal \rightarrow lysozym, antistoffen, complement, transferrine, lactoferrine, CRP
- innate immunity \rightarrow natural killer cellen, macrofagen, dendritische cellen
- fagocytose en opsonisatie
- activatie van het dodend en verterend vermogen van macrofagen door T_h-cellen.
- Lysis door T-k cellen (geldt slechts voor enkele bacteriën)
- Koorts (door IL-1, TNF α , PGE₂) \rightarrow remt groei van bacteriën.

We kennen 3 manieren om de *fagocytose door macrofagen te bevorderen* (=opsonisatie):

- PRR herkennen PAMP
- Fc-receptoren kunnen IgG uit het bloed en vervolgens antistoffen binden
- Complementsysteem: granulocyten hebben C3b receptor en C3b heeft de neiging om bacteriën te binden.

Deze 3 mechanismen zorgen voor snellere, efficiëntere fagocytose en doding van deeltjes. De twee laatste mechanismen versnellen het proces allebei 100 keer; dus in totaal 100*100=100.000 keer sneller doden van bacteriën hierdoor.

Fc-receptoren (FcR) op cellen

- de receptoren herkennen het Fc-deel van antistoffen en kunnen dit binden.
- Er bestaan 3 typen Fc-receptoren voor IgG: Fc γ R1, Fc γ R2 en Fc γ R3
- Via FcR en antistof kunnen cellen antigenen herkennen en binden

Antivirale immuunrespons

- humoraal \rightarrow antistoffen, complement
- innate immunity \rightarrow nk cellen, macrofagen, dendritische cellen
- *interferon α , β en γ* \rightarrow interfereren met virusrePLICATIE in virusgeïnfecteerde cellen zonder deze cellen daarbij te beschadigen
- fagocytose en opsonisatie van aggregaten van virussen en antistoffen
- Doden van virusgeïnfecteerde cellen door T-killer cellen
- Koorts remt groei van bacteriën

Enkele definities:

Autocrien: stimuleren zichzelf

Paracrien: stimuleren cellen in de onmiddellijke omgeving (de burens dus)

Endocrien(humoraal): stimuleren cellen op afstand.

Tot slot even handig om te weten: belangrijke cytokinen en hun functies

- IL-1: geproduceerd door o.a. macrofagen, endotheelcellen en mestcellen. Stimuleert expressie van
- adhesiemoleculen op endotheelcellen. Hierdoor betere leukocyt binding om weefsel in te komen.
- Werkt in op de hypothalamus en 't limbisch systeem (depressie/apathie/psychose).
- Stimuleert de release van CRH = cortisolproductie = inhibitie mφ
- IL-2: geproduceerd door DC, pro-inflammatoir, algemeen proliferatiesignaal
- IL-3
- IL-4: geproduceerd door DC, pro-inflammatoir, proliferatiesignaal Th2
- geproduceerd door Th2, pro-inflammatoir, activeren B-cellen
- IL-5: geproduceerd door Th2, pro-inflammatoir, activeren B-cellen, stimuleren eosinofielen
- IL-6: geproduceerd door mφ, zowel pro- als anti-inflammatoir, veroorzaakt koorts en is belangrijk in de
- acute fase van ontsteking. Remt echter IL-1 en TNF-α
- IL-7 Groeifactor voor immature B en T cellen --> is vaak aangedaan bij SCID
- IL-8 Stimuleert productie van histamine
- IL-9: geproduceerd door CD4+ helpercellen, stimuleert cel proliferatie en remt apoptose
- IL-10: geproduceerd door Th3 en Treg, anti-inflammatoir
- IL-12: geproduceerd door DC, pro-inflammatoir, proliferatiesignaal Th1
- IL-13: geproduceerd door Th2, pro-inflammatoir, activeren B-cellen, activeert mucosa epitheel
- IL-17: geproduceerd door Th17
- IFN-α: geproduceerd door vrijwel alle leukocyten, remming virale replicatie, activatie CD8+, mφ en DC, versterking antistofrespons
- IFN-γ: geproduceerd door Th1/NK-cel/CD8+, pro-inflammatoir, activeren mφ
- TGF-β: geproduceerd door Th3 en Treg, anti-inflammatoir
- TNF-α: geproduceerd door macrofaag, stimuleert de ontstekingsreactie in het lichaam. Enkele bekende TNF-α remmers zijn infliximab, adalimumab en etanercept.
- Macrofagen produceren na activatie: IL-1, TNF-α, IL-6 (allen pro-inflammatoir)