14. III. 1988

ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU

41

Přihlášeno: 14 07 81 (PO 36-81)
Právo přednosti od 17 02 67
Zveřejněno: 6. výroční sjezd Čs. mikrobiologické společnosti, Folia Microbiologica 12, 4, 380 a 407, 1967

Uděleno: 19 03 87
Vydáno: 14 08 87

MDT 612.017.1

Autoři objevu: REJNEK JAROSLAV RNDr. DrSc., PRAHA,
ŠTERZL JAROSLAV, člen korespondent ČSAV, PRAHA,
TRÁVNÍČEK JIŘÍ ing. CSc., N. MĚSTO n. Metují,
KOSTKA JAROMÍR PRAHA, LANC ALOIS, N. MĚSTO n. Metují

Název objevu: **Lokální ochranné působení mateřských protilátek ve střevním traktu**

Předmět objevu:

Jev, spočívající v tom, že ingesce mateřského kolostra nebo mléka, obsahujícího protilátky v období, kdy se protilátky již nevstřebávají ze střeva do krevního oběhu (u lidského novorozence ihned po narození; u selete po uzavření střevní bariéry), chrání lokálně přímo ve střevním traktu před gastrointestinální infekcí, a to vůči běžně se vyskytujícím i patogenním kmenům Escherichia coli.

Podstatou objevu je zjištění, že protilátky, které jsou ve velkém kvantu zastoupeny v lidském mateřském kolostru a mateřském mléku, mají ochranný účinek a mimo základní výživové funkce významně přispívají k antiinfekční obraně lidského novorozence. Nebylo vůbec jasné, zda mateřské kolostrum přispívá k obraně novorozence a bylo naopak doporučováno v letech 1950-1970, aby mateřské kolostrum a mléko bylo nahrazováno umělou výživou - různými typy modifikovaného kravského mléka. U lidského novorozence je umělá výživa možná proto, že ochrana proti mikroorganismům osídlující novorozence krátce po narození je uskutečňována již v průběhu gestace, přenosem protilátek během vývoje plodu nitroděložně. Řadou autorů bylo prokázáno (Polano O.: Z. Geburtshülfe u. Gynekol. 53, 456, 1904), že protilátky přestupují na plod z matčina krevního oběhu, snadno prostupnou hemochoriální placentou do oběhu plodu. Po narození již lidský novorozenec nemá možnost vstřebávat protilátky obsažené v kolostru a mléce matky do svého krevního oběhu, postnatálně je střevní epitel pro prostup makromolekul, tj. protilátek, uzavřen (Kuttner A., Ratner B.: Am. J. Dis. Children 25, 413, 1923; Cathie I.A.B.: Brit. Med. J. 2, 650, 1947). Tato skutečnost byla později potvrzena dalšími autory (např. Boorman K.E., Dodd B.E., Gunther M.: Arch. Dis. Child. 33, 24, 1958). Tento fakt, že lidský novorozenec protilátky přijímané po narození perorálně ze střevního traktu již nevstřebává, byl podpo-

rou zastáncům umělé výživy, kteří argumentovali, že protilátky přítomné v kolostru a mléku nemají žádný podstatný význam pro zvýšení obranyschopnosti novorozence.

Předmětem objevu je naopak zjištění, že lokální působení protilátek omezené pouze na střevní trakt, bez spoluúčasti protilátek krevního oběhu, uskutečňuje významnou, mnohdy plnou ochranu proti gastrointestinálním infekcím. Objev umožnilo studium imunitních procesů u těch živočišných druhů (prase, kráva, kůň), u kterých je plod od matky oddělen neprostupnou, 6vrstevnou epiteliocholiární placentou, mateřské protilátky během nitroděložního života se do plodu nedostávají (Šterzl J., Silverstein A.M.: Adv. Immunol. 6, 337, 1967). U těchto živočichů jediným zdrojem ochrany jsou mateřské protilátky přenesené po narození kolostrem. Časové období, po které mohou novorozenci resorbovat střevem protilátky obsažené v kolostru, je velmi krátké, pouze 12-36 h po narození (Payne L.C., Marsh C.L., J. Nutrition 76, 151, 1962). Potom se střevní bariéra vlivem v kolostru přítomných bílkovin uzavře. Uzavření bariéry je možné docílit podáváním jakékoliv bílkoviny a potom již ke vstřebávání makromolekul, tedy ani protilátek, do krevního oběhu novorozence nedochází. Jestliže u novorozenců těchto druhů zvířat (selat, telat, hříbat) zabráníme přenosu protilátek tím, že neobdrží kolostrum a jsou krmeny pouze umělou výživou, potom jejich setkání a osídlení běžnou mikrobní flórou (např. kmeny E. coli) vede během krátké doby (24-48 h) k těžkým průjmům, celkové septikémii a smrti (Trnka Z., Šterzl J., Lanc A.: Giornale di Malatie Infective Parasitare II, 330, 1959). Udržet taková mláďata, která neobdržela kolostrum, při životě je možné pouze za bezmikrobních podmínek ve speciálních izolátorech.

Z těchto poznatků jasně vyplývá, že lidský novorozenec je chráněn protilátkami, které obdržel od matky během nitroděložního života. Stála proto v centru otázka: mají pro lidského novorozence ochranný význam protilátky obsažené v kolostru a mléku, když se již po narození ze střeva do krevního oběhu nevstřebávají? Ještě v r. 1969 Porter a Noakes (Porter P., Noakes D.E.: Biochem. J. 113, 68, 1969) konstatovali, že o lokálním působení protilátek obsažených v kolostru není nic určitého známo.

Problém bylo možno řešit pouze na takovém experimentálním modelu, u kterého nejsou protilátky v krevním oběhu a kde by bylo možno zjistit účinek protilátek obsažených v kolostru a mléce pouze v lokálním působení, tj. ve střevě. Bylo využito skutečnosti, že novorozená selata nemají v cirkulaci žádné prokazatelné hladiny protilátek (Šterzl J., Kostka J., Říha I., Mandel L.: Folia Microbiol. 5, 29, 1960; Šterzl J., Rejnek J., Trávníček J.: Folia Microbiol. 11, 7, 1966). Byla získána císařským řezem, neobdržela kolostrum a byla držena ve sterilních podmínkách, aby bylo zabráněno infekci běžnými mikroorganismy. Během prvých dní dostávala tato bezkolostrální, sterilní selata bílkoviny, které neobsahovaly protilátky, ale umožnily uzavřít střevní bariéru. Jestliže jsou v této době podány protilátky, do krevního oběhu novorozenců se již nedostávají. Za těchto experimentálních podmínek se podařilo prokázat, že selata infikovaná perorálně bakteriemi E. coli, která obdrží protilátky, přežívají infekci, zatímco jedinci, kteří nedostanou perorálně protilátky, infekci E. coli podléhají. Tak se podařilo prokázat, a to je předmětem objevu, že protilátky, které neprocházejí ze střevního kanálu do krevního oběhu (a to je situace u lidského novorozence), mají významný lokální ochranný účinek proti střevním infekcím. Je třeba zdůraznit, že tento objev je možný pouze za použití tohoto původního experimentálního modelu, kde nejsou současně protilátky cirkulující v krevním oběhu (jako je to u lidského novorozence), protože v takovém případě nelze rozlišit účinek protilátek v krevním séru a lokální účinek protilátek, které ze střeva již do krevního oběhu neprostupují. Průkaz lokálního působení protilátek v kolostru plně zdůvodňuje nové postupy zaváděné po r. 1970, tj. za všech možných okolností okamžitě podávat lidskému novorozenci mateřské kolostrum, a to ne z důvodů výživových, nýbrž pro vysoký obsah protilátek a jejich lokální působení ve střevě.

Vlastní experimentální průkaz byl proveden tak, že kontrolní skupina selat získaných hysterektomií a chovaných za bezmikrobních podmínek byla po dobu 72 h krmena modifikovaným kravským mlékem, aby došlo k uzavření střevní bariéry. Po této době byla perorálně infikována kmenem E. coli 055 v dávce 10^9 mikrobů. Všechna zvířata uhynula v průběhu 24 h po infekci.

Protektivní účinek kolostra a krevního séra normálních, neimunizovaných prasat byl testován tak, že skupiny zvířat ošetřených stejně jako skupiny kontrolní, obdržely za 2 h po infekci perorálně normální kolostrum nebo sérum v množství 50 nebo 25 ml. Výsledky uvedené v tab. 1 ukazují, že 50 ml normálního séra nebo kolostra vedlo k ochraně, přežití 50 % pokusných zvířat, dávka 25 ml byla příliš nízká a způsobila pouze, že experimentální zvířata hynula později, než zvířata kontrolní. V séru jedinců, kteří infekci přežili, nebyly nalezeny protilátky, a to prokazuje ochranný účinek "přirozených" protilátek přímo v zažívacím traktu.

T a b u l k a 1

Účinek normálního prasečího kolostra a séra na bezmikrobní selata infikovaná patogenním kmenem E. coli 055

Skupina zvířat	Číslo zvířete	Dávka v ml	Podaná bílkovina	Titr protilátek anti E. coli 055	Titr protilátek v séru selete Před podáním bílkoviny	Titr protilátek v séru selete Po podání bílkoviny	Doba úhynu v hodinách (s = přežití)
I	1	50	norm.kol.	1:32	0	0	S
	2	50	norm.kol.	1:32	0	0	48
	3	50	norm.kol.	1:32	0	0	S
	4	50	norm.kol.	1:32	0	0	48
	5	50	norm.kol.	1:32	0	0	72
	6	50	norm.kol.	1:32	0	0	S
	7	50	norm.kol.	1:32	0	0	S
	8	50	norm.kol.	1:32	0	0	S
II	1	25	norm.kol.	1:32	0	0	24
	2	25	norm.kol.	1:32	0	0	24
	3	25	norm.kol.	1:32	0	0	72
	4	25	norm.kol.	1:32	0	0	24
III	1	50	norm.sérum	1:128	0	0	S
	2	50	norm.sérum	1:128	0	0	72
	3	50	norm.sérum	1:64	0	0	48
	4	50	norm.sérum	1:64	0	0	S
IV	1	25	norm.sérum	1:64	0	0	72
	2	25	norm.sérum	1:64	0	0	24
kontroly	1	-		-	-	-	24
	2	-		-	-	-	24
	3	-		-	-	-	24
	4	-		-	-	-	24

V prvém, popsaném pokuse bylo použito normální kolostrum a sérum s nízkým titrem "přirozených" protilátek proti E. coli a došlo k ochraně pouze 50 % pokusných zvířat. Proto v dalším postupu, který proběhl za stejných podmínek, bylo k ochraně použito imunního kolostra a séra získaného imunizací březích prasnic formalizovanou suspenzí E. coli 055. Kolostrum i sérum bylo podáváno v dávkách 50, 25 a 12,5 ml. Výsledky uvedené v tab. 2 dokládají, že i nejnižší použitá dávka imunního kolostra a séra vyvolala plný ochranný účinek - všechna experimentální zvířata přežila, na rozdíl od kontrol. To dokazuje, že za ochranný efekt jsou zodpovědné protilátky, protože jejich obsah v imunním kolostru a séru byl podstatně vyšší než v kolostru a séru normálních jedinců. Dále skutečnost, že ani po podání kolostra a séra s vysokým obsahem anti-E. coli 055 protilátek nebyly tyto protilátky zjištěny v séru pokusných zvířat (střevní trakt byl učiněn neprostupným), dokazuje, že ochranný účinek je výsledkem

pouze jejich lokálního působení v zažívacím traktu (Rejnek J., Trávníček J., Kostka J., Šterzl J., Lanc A.: Folia Microbiol. 13, 36, 1968).

T a b u l k a 2

Účinek imunního prasečího kolostra a séra na bezmikrobní selata infikovaná patogenním kmenem E. coli 055

Skupina zvířat	Číslo zvířete	Dávka v ml	Podaná bílkovina	Titr protilátek anti E. coli 055	Titr protilátek v séru selete Před podáním bílkoviny	Po podání bílkoviny	Doba úhynu v hodinách (S = přežití)
I	1	50	imunní kol.	1:25 600	0	0	S
	2	25	imunní kol.	1:25 600	0	0	S
	3	25	imunní kol.	1:25 600	0	0	S
	4	12,5	imunní kol.	1:25 600	0	0	S
	5	12,5	imunní kol.	1:25 600	0	0	S
II	1	50	imunní sérum	1:51 200	0	0	S
	2	25	imunní sérum	1:51 200	0	0	S
	3	12,5	imunní sérum	1:51 200	0	0	S
	4	12,5	imunní sérum	1:51 200	0	0	S
kontroly	1	-	-	-	-	-	24
	2	-	-	-	-	-	24
	3	-	-	-	-	-	24
	4	-	-	-	-	-	24

Mimo tento přímý, nezvratný průkaz svědčí pro význam protilátek kolostra a mléka pro ochranu novorozence před infekcemi další poznatky. U člověka jsou v průběhu intrauterinního života přenášeny z matky na plod protilátky třídy IgG, ostatní Ig třídy placentou neprocházejí. Naproti tomu, hlavními složkami kolostra a mléka jsou IgM a IgA (Rejnek J., Škvařil F., Doležal A.: Čs. pediatrie 15, 97, 1960). Kolostrum pro lidské novorozence je tedy zdrojem protilátek těch imunoglobulinových tříd, které neobdržel v průběhu gestace. Naproti tomu u těch druhů, u kterých není intrauterinní přenos protilátek, jsou v kolostru a mléce zastoupeny Ig třídy v poměru, který odráží kvantitativní vztahy v séru (Rejnek J., Kostka J., Trávníček J.: Folia Microbiol. 11, 173, 1966). Jakmile se však u těchto druhů střevní bariéra uzavře, není již hlavní komponentou IgG, ale podobně jako v lidském mléce, IgA a IgM. Právě tyto 2 třídy protilátek mají nejvyšší lokální účinnost proti enterálním infekcím (Miler I., Černá J., Trávníček J., Rejnek J., Kruml J.: Folia Microbiol. 20, 433, 1975). Tyto poznatky ukazují na význam lokálního působení protilátek obsažených v jednotlivých třídách Ig i po uzavření střevní bariéry.

Průkaz lokálního ochranného účinku protilátek obsažených v kolostru a mléce má významné uplatnění v humánní medicíně, kde přímo indikuje podání kolostra a časného mateřského mléka v průběhu ustavení rovnováhy mezi kolonizujícími mikroby E. coli a novorozeneckým organismem i pro prevenci vzniku enterálních infekcí v době, kdy novorozenec má zvýšenou vnímavost. (Problematice byly věnovány referáty a shrnuty v monografii Human milk banking, Hradec Králové 1982). Heterologní čištěné kolostrální protilátky, získané po imunizaci dojnic, byly použity v léčbě a prevenci gastrointestinálních infekcí u nedonošených dětí a kojenců. Léčba perorálním podáním byla úspěšná u 73 % dětí, aniž bylo nutno aplikovat antibiotika. Tato metoda představuje bezpečný a účinný způsob prevence a terapie gastrointestinálních infekcí, zvláště v případech, kdy není možné uplatnit přirozený ochranný vliv kojením (Lodinová-Žádníková R., Korych B., Bartáková Z.: Souhrny 4. kongres čs. imunol., str. 183, 1985). Podávání kolostra

pro prevenci enterálních infekcí bylo schváleno Poradním sborem MZd pro pediatrii (předseda akademik Houštěk) 31. 1. 1985 v rámci St. plánu RVT P-17.

Objev lokální účinnosti protilátek má značný význam i v oblasti chovu hospodářských zvířat. Z ekonomických důvodů je ve velkochovech prováděn předčasný odstav selat ve stáří 21 až 28 dní. V té době většina protilátek získaných od matky sáním kolostra je katabolisována a vlastní protilátky se netvoří dosud v dostatečném množství. U selat odstavených v tomto období se objevují průjmy, dochází k oslabení organismu, ztrátám na přírůstcích i k úhynu selat. Lokální ochranný účinek protilátek v zažívacím traktu byl úspěšně aplikován ve velkokapacitní odchovně Společného zemědělského podniku Rychnov nad Kněžnou - farma Brocná. Došlo k výraznému zlepšení zdravotního stavu u těch selat, kterým bylo perorálně podáno krevní sérum získané z jatečních prasnic uvedené farmy. Použití takového séra je výhodné nejen ekonomicky, ale obsahuje protilátky proti mikroorganismům, které převažují mezi jedinci příslušné farmy. Ochranný účinek vykazuje však i krevní sérum běžných jatečních prasat (Trávníček J., Mandel L.: Čs. fyziol. 29, 372, 1980). Použití krevního séra místo kolostra, jako zdroje protilátek, má mnoho výhod, je jednodušší při získání materiálu, při uchovávání ve zmrzlém stavu i při aplikaci. Byla použita rovněž hyperimunní séra získaná imunizací jatečních zvířat specifickou mikroflórou. V tomto případě je možné dávky séra podstatně snížit.

Další veterinární aplikace byla použita při ozdravovacím procesu, při umělém odchovu selat získaných hysterektomií nebo císařským řezem. Cílem tohoto postupu je přerušit koloběh infekcí. Získaná selata jsou chována za sterilních podmínek a jejich rezistence vůči infekcím je podmíněna podáním krevního séra. Po získání váhy 5-7 kg jsou převedena jako základ nového zdravého jádra do jednotlivých farem (Trávníček J., Mandel L.: Čs. fysiol. 29, 372, 1980). Tento postup je používán v repopulačních stanicích a postup využívají i zahraniční pracoviště, např. Bezirksinstitut für Veterinärwesen Bad Langensalza, NDR, který odchovává tímto způsobem selata pro potřeby zemědělské praxe (Sattler H.G., Mh. Vet. Med. 37, 53, 1982). Jako zdroje protilátek využívají radiačně sterilizované prasečí nebo kravské kolostrum, ochranného účinku je možné dosáhnout i podáváním kravského kolostra (Talafantová M., Koukal M., Mandel L., Trávníček J.: Veterinářství 35, 11, 1985).