

NOVÉ MOŽNOSTI PASIVNÍ IMUNOPROFYLAXE INTRACELULÁRNÍCH BAKTERIÁLNÍCH INFEKČÍ

¹Klára KUBELKOVÁ, ²Aleš MACELA

¹Univerzita obrany, Ústav molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

²Univerzita obrany, Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

Infekce způsobené intracelulárními bakteriálními patogeny jsou považovány obecně za vážný problém veřejného zdravotnictví. Vzhledem k neexistenci vakcín pro humánní použití neexistuje u většiny infekcí ani žádná vakcinační strategie. Informace získané z nových studií nabízejí možnost využití polyklonálních nebo monoklonálních protilátek samotných či v kombinaci s cytokiny k pasivní imunoprophylaxi těchto závažných infekčních onemocnění.

Klíčová slova: Protilátky; Bakteriální infekce; Intracelulární bakterie; Protektivní imunita; Pasivní přenos; Cytokiny.

New Potentialities of Passive Immunoprophylaxis of Bacterial Intracellular Infections

Summary

Infections caused by intracellular bacterial pathogens are generally considered as a serious problem for health care services. The vaccination strategy is missing in most of these infections due to the absence of vaccines licensed for human use. The information from newly performed studies revealed the possibility of utilizing the polyclonal or monoclonal antibodies alone, or in combination with cytokines as a tool for passive immunoprophylaxis of these serious infections.

Key words: Antibodies; Bacterial infection; Intracellular bacterium; Protective immunity; Passive transfer; Cytokines.

Intracelulární bakteriální infekce a protilátky – staré téma, nová naděje

Až do nedávné doby převládal názor, že protilátky nejsou schopny podstatnou měrou přispět ke vzniku protektivní imunity proti intracelulárním bakteriálním patogenům. Předpokládaná neschopnost protilátek pronikat do intracelulárních prostor byla častým argumentem proti úloze protilátkami zprostředkované imunity v ochraně proti tomuto typu patogenů. Nicméně tento argument ignoruje fakt, že většina intracelulárních patogenů je dočasně lokalizována také v extracelulárním prostoru jak před svým vstupem do buněk, tak v době přechodné bakteriémie, tedy v době, kdy prvotně infikované buňky se následkem intracelulární multiplikace bakterií rozpadnou a uvolní pomnožené bakterie do extracelulárních prostor infikovaných orgánů. Rovněž fakt, že protilátky jsou multifunkčními molekulami schopnými zprostředkovat různé funkce, jako je opsonizace, neutralizace toxinů nebo změna nitrobuňkové signalizace prostřednictvím navedení mikroorganismu či jeho produktů na Fc receptory, není

tímto argumentem brán v potaz. Kromě toho mohou protilátky vázat antigeny intracelulárních patogenů na povrchu hostitelských buněk, a mohou tak dát vznik na protilátkách závislé buněčné cytotoxické obranné reakci či komplementem zprostředkované lýze namířené proti infikovaným buňkám a tím omezit proliferaci intracelulárního patogenu. V poslední době však některé experimenty prokazují schopnost protilátek vstupovat do buněk, a uplatnit tak vybrané protilátkové funkce v intracelulárním prostoru (9). Navíc protilátky nepracují v systému imunitních reakcí samostatně, vždy kooperují s několika typy buněk a jimi produkovanými cytokiny. Již cross-linking Fc receptorů pomocí komplexů antigen–protilátka podporuje uvolnění cytokinů zvyšujících produkci mikrobicidních oxidantů a fagocytózu se zvýšenou antigenní prezentací, což je rovněž jeden z mechanismů přispívajících k eliminaci mikroorganismů z tkání infikovaných hostitelů. Na druhou stranu je nutno říci, že T-lymfocyty jsou nezbytnou složkou pro rozvoj adekvátních zánětlivých infiltrátů sloužících pro aktivaci fagocytujících buněk, které jsou schopny pohl-

tit a usmrtit protilátkou opsonizované či inaktivované bakterie.

Účinnost humorální imunity proti patogenům je všeobecně založena na demonstraci ochrany po pasivním přenosu specifických protilátek či na korelaci ochrany proti infekci s hladinou sérových protilátek. V imunitních odpovědích, ve kterých protilátky vyvolávají také buněčně zprostředkovanou imunitu, je však poměrně složité určit relativní příspěvek imunity zprostředkované protilátkou nebo buňkami. Úloha protilátek je také testována v experimentech využívajících zvýšené citlivosti k dané infekci u jedinců s protilátkovými deficiencemi. Zvýšená citlivost k infekci u jedinců postrádajících B-buňky bývá rovněž považována za jeden ze zásadních průkazů úlohy protilátek v protekci. Je však diskutabilní, zda sledovaný efekt nepřítomnosti B-buněk je atributem chybějících protilátek nebo neexistencí jiných funkčních projevů B-buněk (např. produkce cytokinů či antigenní prezentace). Poměrně nekonfliktní průkaz poskytuje využití monoklonálních protilátek. Ty se většinou využívají v takových experimentech, v nichž polyklonální imunní sérum obsahující protilátky různých izotypů, specifit a různých protektivních účinností poskytuje negativní či nestálé výsledky.

Pochopení role protilátkou zprostředkované imunity proti fakultativním i obligátním intracelulárním patogenům je důležité pro nové definice základní imunologie a z praktického hlediska pro rozvoj pasivní imunoprofylaxe a imunoterapie infekcí. Zájem o tuto staronovou oblast imunologie v posledních letech významně vzrostl a výsledky experimentálních prací na nejrozumnějších infekčních modelech odhalují nové možnosti imunoprofylaxe nebezpečných infekcí. V této práci předkládáme několik příkladů dokumentujících kapacitu protilátek významně ovlivnit schopnosti imunitní obrany infikovaných jedinců.

Brucelóza

Původce brucelózy bakterie rodu *Brucella* patří mezi intracelulární patogeny, které jsou odolné proti usmrcování neutrofily, množí se uvnitř makrofágů a v neprofesionálních fagocytech, *Brucella abortus* i v profesionálních fagocytech. Předpokládá se, že dominantním ochranným mechanismem imunity je buňkami zprostředkovaná imunita vykonávaná prostřednictvím aktivace antigen prezentu-

jících buněk, NK-buněk, CD4+ a CD8+ T-buněk a B-buněk (25). V současné době není k dispozici žádná vakcína s licencí pro humánní použití proti brucelóze, jsou však zkoušeny některé stabilní mutanty, které chrání proti virulentním kmenům (57), experimentuje se s rekombinantními proteiny jako součástmi subjednotkových vakcín (12) nebo pasivním přenosem imunity buňkami či protilátkami.

Při experimentech s pasivním přenosem imunity bylo zjištěno, že jak slezinové T-buňky, tak séra myši infikovaných oslabeným kmenem *Brucella abortus* 19 jsou schopny přenést ochranu na naivní příjemce (1). Ochranný efekt buněk i protilátek je v podstatě stejný, ochranný efekt imunních sér je však výrazně vyšší při následné zátěži příjemců séra oslabeným kmenem 19 než virulentním kmenem 2308 (2). Autoři vysvětlují tento rozdíl tím, že jen virulentní kmen 2308 na rozdíl od kmene 19 přežívá po opsonizaci uvnitř makrofágů a epitopy, jež indukují protektivní, buňkami zprostředkovanou imunitu, se mohou odlišovat. Ještě výraznější ochranný efekt protilátek po pasivním přenosu imunity je prokazatelný u infekcí subtypem *Brucella ovis*, kde protilátky chrání výrazně lépe než přenesené buňky (5, 30). Důvod proč protilátky chrání lépe u infekcí *Brucella ovis* než u infekcí *Brucella abortus* není jasný. Může to však být tím, že *Brucella ovis* má jiný vztah k hostitelským buněčným systémům než fakultativní intracelulární parazitismus (nebyl zatím zcela přesně definován), který jednoznačně dominuje u *Brucella abortus*.

Legionelóza

Z více než padesáti druhů legionel je nejvýznamnějším patogenem člověka *Legionella pneumophila*. Legionelóza u člověka má dvě klinické manifestace – první, tzv. legionářská nemoc je potenciálně letální pneumonie, druhá, tzv. pontiacká horečka je chřipce podobné onemocnění, které po několika dnech samo vymizí. Po inhalaci infikovaných aerosolových částic proniká *Legionella pneumophila* do alveolárních makrofágů a epiteliálních buněk, kde se množí ve fagozomech. Nika, v níž se *Legionella* nitrobuněčně množí, je odvozena z fagozomu, jehož molekulární charakteristiky jsou speciálně upraveny sérií interakcí s mitochondriemi, hladkými vezikuly a ribozomy. Výkonným mechanismem ochranné imunity je právě změna molekulárních charakteristik nitrobuněčné niky, v níž se *Legionella*

množí. Tato změna je dána komplexem mezibuněčných signálů zahrnujících cytokiny IL-12, IL-18, TNF- α a IFN- γ .

Legionelová infekce vyvolává velice silnou specifickou protilátkovou odpověď (6). Zda tyto specifické protilátky přispívají k protekci není známo. Opsonizace legionel specifickými protilátkami usnadňuje fagocytózu, neinhibuje však nitrobuněčnou proliferaci legionel (27). Nicméně, sérové protilátky jako aktivátor normálních hostitelských buněk v *in vitro* modelu buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách mohou přispět k eliminaci legionel z tkání infikovaných hostitelů. V pokusech s monoklonálními protilátkami proti legionelovému cytolyzinu bylo prokázáno, že tyto protilátky chrání příjemce (morčata) před intraperitoneální infekcí *Legionella pneumophila*, nechrání však před inhační infekcí (54).

Přes potenciální možnost využití protilátek k imunoprophylaxi legionelózy je větší pozornost upřena na vývoj subjednotkových vakcín s využitím dominantních sekretovaných proteinů nebo bičkových flagelinů. Oba typy testovaných molekulárních komponent legionelových těl indukují silnou přirozenou i adaptivní buňkami zprostředkovanou imunitu a silnou humorální odpověď, která může být částečně přenesena do kontrolních naivních příjemců adoptivním přenosem imunních splenocytů, ale ne pasivní imunizací imunními séry (Blander, Horwitz, 1991; Ricci et al., 2005).

Listerióza

Původce listeriózy je fakultativní intracelulární grampozitivní bakteriální patogen *Listeria monocytogenes*. Po pohlcení profesionálním fagocytem jsou listerie enkapsulovány v kyselých fagolysosomech, ze kterých unikají do cytozolu, kde se množí. Pomnožené listerie se pomocí tvorby aktinového chvostu protlačují z buňky do buňky, takže jednou fagocytovaná listerie se již nikdy nedostane do extracelulárních prostor a je charakterizována jako nitrocytoplazmový parazit. Tento způsob intracelulárního parazitismu tak omezuje spektrum funkčních možností protilátek zasáhnout do infekčního procesu. Řada prací však dokazuje, že jak protilátky, tak samotné B-buňky hrají v indukci protektivní imunity významnou roli. B-lymfocyty se účastní imunitní odpovědi nejenom produkcí imunoglobulinů, ale také antigenní prezentací (29), produkcí cytokinů

(39) a expresí kostimulačních faktorů (48). Existuje několik kontroverzních studií zaměřených na úlohu B-buněk v indukci T-lymfocytové odpovědi na solubilní antigeny u myších linií postrádajících B-buňky. Jedny úlohu B-buněk popírají (21, 51), jiné potvrzují (28). Přestože ochranná imunita proti listeriové infekci je závislá na T-lymfocytech, B-buňky mohou ovlivňovat specifickou odpověď T-lymfocytů a regulovat její indukci (34).

Indukční a regulační roli pro T-lymfocyty mohou sehrát v antilisterické imunitě i protilátky. Je možné, že specifické antilisterické protilátky produkované B-lymfocyty v časném stadiu infekce přispívají k indukci specifických T-lymfocytů, některé práce však takovouto roli protilátek zamítají (40).

Protilátky však mohou zasáhnout do ochrany před infekcí i jiným způsobem. *Listeria monocytogenes* secernuje exotoxin listeriolysin (LLO), který jí umožňuje unik z fagolysosomu infikované buňky (23, 47). Monoklonální protilátky proti LLO jsou schopny v *in vitro* systému blokovat listeriolysinem indukovanou tvorbu mebránových pórů a po aplikaci myším zvýšit jejich odolnost k následné zátěži plně virulentním kmenem *Listeria monocytogenes* (15). Díky experimentům provedeným na SCID myších je tak prokázáno, že ochranný efekt protilátek je nezávislý na T a B-lymfocytech příjemce. Jiné studie provedené na myších postrádajících B-buňky prokázaly, že přirozené protilátky v naivních zvířecích jedincích mohou hrát důležitou roli jak v redukci časně diseminace *L. monocytogenes*, tak spolu s B-lymfocyty i na rozvoji protektivní odpovědi a imunologické T-buněčné paměti (45).

Výše zmíněné studie tedy dokazují, že protilátkové molekuly mohou sehrát v indukci ochranné imunity proti listerické infekci významnou roli. Zda se protilátkové molekuly účastní podobně jako samotné B-lymfocyty také regulace sekrece cytokinů nutných pro expresi protektivní imunity (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ), není spolehlivě prokázáno.

Salmonelóza

Za původce salmonelózy lze označit kmeny dvou subtypů salmonel – jednak subtyp *Salmonella enterica* subsp. Enteritidis, ale také subtyp *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium, který je původcem břišního tyfu.

Přirozený imunitní systém umí do určité míry omezit replikaci salmonel, ale pro efektivní kontro-

lu a likvidaci bakterií z tkání hostitelů je získaná imunita zahrnující jak buněčný, tak specifický humorální typ nezbytná. Nicméně rozhodující mechanismy, které se podílejí na ochranné imunitě proti salmonelóze, nejsou zcela známy. Není přesně známa identita protektivních antigenů a nebyla dosud plně objasněna ani korelace vakcinace vůči stupni dosažené ochrany. Předpokládá se, že v rámci primoinfekcí přispívají k odstraňování bakterií z tkání jak T, tak B-lymfocyty. V rámci následných infekcí je však podíl buňkami zprostředkované imunity a humorální imunity na ochranných reakcích organismu proti salmonelóze stále otázkou.

Poznatky o úloze protilátek v ochraně proti salmonelóze jsou odvozeny z experimentů, ve kterých jsou monoklonální protilátky proti epitopům salmonelových antigenů či séra z preexponovaných myší přeneseny do kontrolních naivních příjemců, kteří jsou následně infikováni letální dávkou virulentních kmenů *Salmonella* subsp. Typhimurium nebo *Salmonella* subsp. Enteritidis. V těchto experimentech bylo prokázáno, že přenos polyklonálního antisalmonelového imunního séra chrání naivní příjemce před následnou infekcí patogenním kmenem (46, 35, 37). V případě monoklonálních protilátek již tak jednoznačného výsledku dosaženo nebylo. Jedná se hlavně o experimenty s přenosem monoklonálních protilátek proti různým epitopům hladkého či hrubého lipopolysacharidu salmonel (10, 58). Důvodem pro některé neúspěchy při pasivní imunizaci monoklonálními protilátkami proti LPS je obrovská variabilita epitopů (18), z nichž některé mohou mít rozhodující úlohu v indukci protektivní reakce, jiné tuto vlastnost nemají. Záleží tedy na tom, proti kterému epitopu LPS je vygenerovaná monoklonální protilátka k experimentům použita. Je to dáno tím, že v případě salmonelového lipopolysacharidu jsou jeho imunogenní epitopy daleko komplexnější, než jsme byli dosud ochotni připustit. Bylo prokázáno, že je možné rozlišit minimálně pět skupin monoklonálních protilátek namířených proti různým skupinám imunogenních epitopů. V testech pasivního přenosu imunity chránila nejúčinnější monoklonální protilátka 2500krát více než protilátka nejméně účinná (8).

Stejně nejednoznačné výsledky byly získány v experimentech s přenosem monoklonálních protilátek namířených proti epitopům proteinových antigenů. V případě proteinových epitopů závisí na tom, který z proteinových antigenů epitopy nese. Zatímco monoklonální protilátky proti porinům nechrání vů-

bec a neprodlužují ani dobu přežití experimentálních zvířat, protilátky připravené proti proteinům vnější bakteriální membrány, jejichž exprese je regulována nedostatkem železa, chrání pasivně imunizované příjemce ze 60 % před zátěží *Salmonella* sérovar Typhi v dávce 9,6 LD₅₀. Dalším důvodem pro nejednoznačnost výsledků experimentů s přenosem pasivní imunity protilátkami je, že stupeň protilátkami navozené protekce závisí na genetickém pozadí příjemců, jinými slovy na jejich vnímavosti k infekci. V případě salmonelových infekcí bylo prokázáno, že pasivní přenos protilátek chrání přirozeně rezistentní kmeny myší, zatímco přirozeně citlivé kmeny k salmonelové infekci chrání podstatně méně (16, 17).

Dá se tedy uzavřít, že salmonelové infekce indukují silnou protilátkovou odezvu infikovaných jedinců k salmonelovým antigenům, na rozdíl od mnoha jiných intracelulárních bakteriálních infekcí se tyto protilátky podílejí na ustavení ochranné imunity (42). Takže ochranná imunita proti salmonelám využívá celou řadu imunitních mechanismů, funkční efekty protilátek jsou pouze jedním z nich. Celou komplexitu mechanismů ochranné imunity proti salmonelám dokládají studie na myších, které jsou deficitní k některým faktorům imunity. Tak se podařilo prokázat, že kromě protilátek jak T, tak B-buňky jsou pro ochranu proti primárním i sekundárním infekcím velice důležité (41). Výsledky studií ukazují, že protektivní imunita výrazně, ne však výhradně, závisí na B-lymfocytech. Tudíž lze říci, že při absenci B-lymfocytů a protilátek existuje částečná protekce s tím, že ani B-lymfocyty ani protilátky nejsou absolutně nezbytné pro kontrolu systémové infekce virulentními salmonelovými kmeny. Základním předpokladem pro ustavení zcela funkční protektivní imunitní odpovědi je samozřejmě cytokinové prostředí. V tom mají dominantní roli IFN γ , TNF α a IL-12, tedy cytokiny Th1 regulační větve (36, 38).

Tuberkulóza

Etiologickým agens tuberkulózy člověka je *Mycobacterium tuberculosis*. Je to obligátní aerobní mikroorganismus charakteru fakultativního intracelulárního patogenu množícího se s pomalým generačním časem (15 až 20 hodin) obvykle v makrofágách. Byť postrádá vnější bakteriální membránu, nezapadá bezvýhradně do kategorie grampozitiv-

ních bakterií, protože se nebarví krystalovou violetí. *Mycobacterium tuberculosis* je proto označováno jako acid-fast grampozitivní bakterie.

Za hlavní mechanismus ochranné imunity proti tuberkulóze lze považovat interferonem gama zprostředkovanou aktivaci mikrobicidních funkcí makrofágů. Klidové monocyty a klidové makrofágy v tkáních nejsou schopny množení mykobakterií omezit. Ke skutečně účinné aktivaci makrofágů, tvorbě granulomů a efektivní antimykobakteriální ochraně jsou nutné, kromě již zmíněného IFN γ , další prozánětlivé a regulační cytokiny, IL-12, IL-18, IL-23, IL-1, TNF α , GM-CSF a další. Kromě aktivovaných makrofágů se na eliminaci mykobakterií z tkání podílejí svými funkcemi i další buněčné typy, především NK-buňky svojí zabíjecí schopností, dendritické buňky antigenní prezentací a konečně také $\gamma\delta$ T-buňky. Vzhledem k tomu, že tuberkulóza představuje skutečně světový zdravotnický problém, je v poslední době otázce imunitní ochrany proti tuberkulóze věnována celá řada souhrnných prací, kde jsou tyto otázky probrány podrobně (14, 22, 31, 44).

Od roku 1895 byly prováděny studie zaměřené na nalezení tzv. terapeutického séra pro tuberkulózu (TB). Přes celou řadu provedených studií je však úloha protilátkami zprostředkované imunity v ochraně proti TB stále nejistá a poněkud kontroverzní. Bylo sledováno mnoho paramentů protilátkové odezvy na infekci *Mycobacterium tuberculosis* a bylo také získáno velké množství poznatků, které ukazují, že pasivní přenos imunity protilátkami poskytuje pouze malou, příp. žádnou ochranu proti tomuto intracelulárnímu patogenu (24). V těchto klasických studiích tak byla protilátkám vyhrazena role opsoninů usnadňujících fagocytózu makrofágy nebo cytotoxické působení zabíječských buněk. Protilátky tak prokázaly schopnost zintenzivnit působení mechanismů jak přirozené, tak získané imunity (13). Tuto jejich roli může potvrzovat i fakt, že v pokročilých fázích onemocnění AIDS, kdy tvorba protilátek významně klesá, dochází často k infekcím atypickými mykobakteriemi (např. *M. avium* (53).

Byly studovány také možnosti monoklonálních protilátek k ochraně před TB. V těchto studiích pak, pokud byl již protektivní efekt zjištěn, byl závislý na izotypu a antigenní specifitě vytvořených monoklonálních protilátek a na cestě vpravení těchto protilátek příjemcům. Monoklonální protilátky izotypu IgA proti alfa-krystalinu podané intranazální cestou poskytují významnou pasivní ochranu proti

časné plicní infekci *M. tuberculosis* v BALB/c myším modelu (59). Monoklonální protilátky izotypu IgG3 specifické pro arabinomannan, který je hlavní polysacharidovou složkou mykobakteriální kapsule, však poskytují pouze částečnou ochranu před respirační nákazou *M. tuberculosis* (43, 56).

Z dalších provedených experimentálních studií dále vyplynulo, že protilátky, které se účastní velice časných interakcí tuberkulózních mikroorganismů s buněčnými systémy hostitelů, jsou schopny do určité míry přispět k navození ochranné imunity. Ta je tak jako v případě všech infekcí regulována cytokiny. Zatímco IL-4 má na vznik protektivní imunity proti tuberkulóze spíše tlumivý vliv, IFN γ ochranou imunitu podporuje. To platí i v případě pasivního přenosu imunity (7, 50). Stále však platí, že významný podíl na úspěšnosti pasivního přenosu protekce protilátkami proti tuberkulóze má genetické pozadí příjemců (26, 55).

Tularémie

Původcem tularémie je fakultativní intracelulární gramnegativní bakterie *Francisella tularensis*. Množí se uvnitř makrofágů a hepatocytů. Existuje v několika subtypech lišících se ve virulenci. Vzhledem k člověku lze podle virulence seřadit tyto subtypy od nejvirulentnějších k nejméně virulentním takto: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*. Dosud není k dispozici žádná vakcína, kterou by bylo možné použít plošně k imunoprophylaxi tularémie. Ve speciálních případech lze použít živý vakcinační kmen odvozený ze subtypu *F. tularensis holarctica*, který však nechrání proti inhalačním infekcím subtypem *tularensis*.

Typickým příkladem rozpaků nad úlohou protilátek v ochranné imunitě proti infekcím iniciovaným intracelulárními bakteriálními patogeny je právě tularémie. V osmdesátých letech minulého století bylo v těchonínských laboratořích prokázáno, že pasivní přenos protilátek je schopen ochránit liniové myši s různým genetickým základem před letální infekcí oslabeným kmenem *Francisella tularensis holarctica*. Schopnost protilátek navodit jistý stupeň ochrany proti letální tularémické infekci následně potvrdila i studie švédské skupiny (52). Přesto americká skupina Karen Elkinsové publikovala řadu prací, ve kterých se snažila dokázat, že

ochranná imunita sice závisí na B-buňkách, nikoli však na jimi produkováných protilátkách (11, 19, 20). To podnítilo švédskou skupinu k realizaci široce pojatých experimentů, ve kterých použili pro průkaz možnosti pasivního přenosu imunity protilátkami kmeny myši rezistentních k tularémii (myši kmene C57Bl/10) a myši postrádající B-buňky. Pro infekční intradermální zátěž použili jak vakcinační kmen *F. tularensis* LVS, tak plně virulentní kmen *F. tularensis holarctica*. Tyto experimenty jednoznačně prokázaly, že přenesené protilátky jsou schopny ochránit myši deficitní na B-buňky proti jinak plně letální zátěži kmenem LVS a myši C57Bl/10 i proti zátěži plně virulentním kmenem *F. tularensis holarctica*, ne však zcela proti *F. tularensis tularensis* (52).

Tři recentní publikace dvou skupin amerických autorů z Memphisu a Albany (3, 32, 33) však dokazují, že úlohu protilátkami zprostředkované imunity nelze řešit odtrženě od úlohy buňkami zprostředkované imunity. Oba mechanismy mají na ochranné imunitě proti tularémii svůj podíl, přičemž je téměř jisté, že klíčovou roli hraje souhra produkce cytokinů, protilátek a cytokiny vystupňovaná cidní aktivita fagocytů. Již tepelně usmrcené bakterie vakcinačního kmene LVS podané intranazálně spolu s IL-12 plně chrání proti letální intranazální zátěži LVS kmenem a tato ochrana je závislá na schopnosti produkovat protilátky izotypu IgA. Myši, jež schopnost produkce IgA nemají, chráněny nejsou (3). V jiné studii bylo prokázáno, že séra získaná z myši imunizovaných tepelně usmrcenými bakteriemi vakcinačního kmene, tedy podobně imunizovaných jako v předcházející studii, jsou schopna přenést stoprocentní ochranu proti letální zátěži LVS kmenem. Pokud byl použit k imunizaci usmrcený transpozonový mutant LVS postrádající schopnost tvořit O-antigen, byl výsledek stejný, tedy kompletní ochrana příjemců séra. Z toho vyplývá, že protilátkami přenesená ochrana není závislá na protilátkách namířených proti O-antigenu LPS kmene *F. tularensis* LVS (33). Konečně třetí studie prokazuje, že ochranná imunita proti tularémii navozená přenesenými protilátkami je zcela závislá na produkci IFN γ a následném vystupňování cidní aktivity makrofágů zaměřené na protilátkami opsonizované francisely (32). Neschopnost tvořit IFN γ v prvních dnech po infekci vysoce virulentními kmeny *F. tularensis* považují autoři této studie za jedno z možných vysvětlení, proč není ochrana protilátkami proti kmenům *F. tularensis* subtypu *tularen-*sis úspěšná.

V případě pasivního přenosu imunity proti tularémické infekci se dá tedy uzavřít, že protilátky bezesporu přispívají k navození ochranné imunity svými funkčními parametry, nicméně sami o sobě bez spoluúčasti aktivovaných buněk nejsou schopny zajistit eliminaci tularémických mikrobů z tkání infikovaných hostitelů.

Závěry

Ze všech výše uvedených studií vyplývá, že pesimismus, který provázel úlohu protilátek v ochraně před fakultativními i obligátními intracelulárními bakteriálními patogeny, nebyl na místě. Ukazuje se, že protilátky fungují při eliminaci intracelulárních bakteriálních patogenů z infikovaných hostitelů v úzké součinnosti se systémy buněčné imunity a zajišťují kritické funkce při kontrole infekce. Prostřednictvím opsonizace usnadňují fagocytózu funkčně aktivovanými makrofágy, změnou mezibuněčné signalizace spouštějí expresi cytokinů TNF α a IL-12, které následně zintenzivňují produkci IFN γ , tedy cytokinu nutného k funkční aktivaci jak antigen prezentujících buněk, tak buněk s cidní kapacitou.

Nové studie provedené v rámci infekčních modelů s využitím intracelulárních bakteriálních patogenů dokazují, že specifické antibakteriální protilátky podané spolu s některými z výše uvedených cytokinů úspěšně chrání před následnou infekcí. V některých případech chrání i v rámci terapeutického schématu, tj. při podání až do 48 hodin po infekci (viz např. 32). Všechny tyto studie tak jednoznačně odkrývají nové možnosti bezpečné pasivní imunoprofylaxe nebezpečných bakteriálních nákaz.

Literatura

1. ARRAYA, LN. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, p. 3330–3337.
2. ARRAYA, LN. – WINTER AJ. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cell or serum. *Infect. Immun.*, 1990, vol. 58, p. 254–256.
3. BARON, SD., et al. Inactivated *Francisella tularensis* LVS protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an IgA-dependent fashion. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, p. 2152–2162.
4. BLANDER, SJ. – HORWITZ, MA. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella* induces humoral and

- cell-mediated immune response and protective immunity across different serogroups of *Legionella pneumophila* and different species of *Legionella*. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, p. 285–291.
5. BOWDEN, RA., et al. Identification of protective outer membrane antigen of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microb. Infect.*, 2000, vol. 2, p. 481–488.
 6. BREIMAN, RF. – HORWITZ, MA. Guinea pigs sublethally infected with aerosolized *Legionella pneumophila* develop humoral and cell-mediated immune response and are protect against lethal aerosol challenge. A mouse for studying host defense against lung infections cause by intracellular pathogens. *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 165, p. 799–811.
 7. BUCCHERI, S., et al. IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, p. 729–737.
 8. CARLIN, NI., et al. Role of monoclonal O-antigen antibody epitope specificity and isotope in protection against experimental mouse typhoid. *Microb. Pathog.*, 1987, vol. 2, p. 171–183.
 9. CASADEVALL, A. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol.*, 1998, vol. 6, p. 102–107.
 10. COLWELL, DE., et al. Monoclonal antibodies to *Salmonella* lipopolysaccharide: anti-O-polysaccharide antibodies protect C3H mice against challenge with virulent *Salmonella*. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, p. 950–957.
 11. CULKIN, SJ., et al. A novel role of B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, p. 3277–3284.
 12. DELPINO, MV., et al. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, 2007, vol. 25, p. 6721–6729.
 13. De VALLIERE, S., et al. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, p. 6711–6720.
 14. DOHERTY, TM. – ANDERSEN P. Vaccines for tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress. *Clin. Microb. Rev.*, 2005, vol. 18, p. 687–702.
 15. EDELSON, BT., et al. Cutting edge: paradigm revisited: Antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, p. 4087–4090.
 16. EISENSTEIN, TK., et al. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: mouse strain differences in vaccine and serum mediated protection. *J. Immunol.*, 1984, vol. 150, p. 425–435.
 17. EISENSTEIN, TK. Mucosal immune defense: the *Salmonella typhimurium* model. In Y. PATERSON (ed.). *Intracellular bacterial vaccine vectors*. New York, Wiley-Liss, 1999, p. 51–109.
 18. ELKINS, K. – METCALF, ES. Monoclonal antibodies demonstrate multiple epitopes on the O antigen of *Salmonella typhimurium* LPS. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, p. 2255–2260.
 19. ELKINS, KL, et al. T-cell independent resistance to infection and generation of immunity to *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, p. 417–421.
 20. ELKINS, KL., et al. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, p. 6002–6007.
 21. EPSTEIN, MM., et al. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, p. 915.
 22. FERRAZ, JC., et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazil. J. Med. Biolog. Res.*, 2006, vol. 39, p. 1387–1397.
 23. GAILLARD, JL., et al. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.*, 1987, vol. 55, p. 2822.
 24. GLATMANN, A. – CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: Reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, vol. 11, p. 514–532.
 25. GOLDING, B., et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbiol. Infect.*, 2001, vol. 3, p. 43–48.
 26. HERNANDEZ-PANDO, R., et al. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur. J. Immunol.*, 2004, vol. 34, p. 174–183.
 27. HORWITZ, MA. – SILVERSTEIN, SC. Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. *J. Exp. Med.*, 1981, vol. 153, p. 398–406.
 28. CHOWDHURY, MG., et al. Antigen-specific B cell are required for the secondary response of T cells but not for their priming. *Eur. J. Immunol.*, 1996, vol. 26, p. 1626.
 29. INABA, K. – STEIMANN, RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J. Exp. Med.*, 1984, vol. 160, p. 1717.
 30. JIMENEZ DE BAGUEZ, P., et al. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, p. 632–638.
 31. KAUFMANN, SH., et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *JEM*, 2005, vol. 201, p. 1693–1697.
 32. KIRIMANJESWARA, GS., et al. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. *J. Immunol.*, 2007, vol. 179, p. 532–539.
 33. LAVINE, CL. et al. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, p. 3007–3020.
 34. MACKANESS, GB. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*, 1962, vol. 116, p. 381.
 35. MARECKI, NM., et al. Cellular and humoral aspect of host resistance in murine salmonellosis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1975, vol. 56, p. 231.
 36. MASTROENI, P., et al. Role of T cells, TNF α and IFN- γ in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro-*Salmonella* vaccines. *Microb. Pathog.*, 1992, vol. 13, p. 477–491.

37. MASTROENI, P., et al. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, p. 3981.
38. MASTROENI, P., et al. Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, p. 189–196.
39. MATTHES, T., et al. Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-10, and transforming growth factor beta 1 mRNAs. *Exp. Med.*, 1993, vol. 178, p. 521–528.
40. MATSUZAKI, G., et al. The role of B cells in the establishment of T cell response in mice infected with an intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*. *Cell. Immunol.*, 1999, vol. 194, p. 178–185.
41. MITTRUCKER, H., et al. Cutting edge: Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.*, 2000a, vol. 164, p. 1648–1652.
42. MITTRUCKER, H. – KAUFMANN, SHE. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leuko. Biol.*, 2000b, vol. 67, p. 457–463.
43. NAVOA, JA., et al. Specificity and diversity of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* Arabidomannan. *Clin. Diagnos. Labor. Immunol.*, 2003, vol. 10, p. 88–94.
44. NICOD, LP. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med. Wkly*, 2007, vol. 137, p. 357–362.
45. OCHSENBEIN, AF., et al. A comparison of T cell memory against the same antigen induced by virus versus intracellular bacteria. *PNAS*, 1999, vol. 96, p. 9293–9298.
46. ORNELLAS, EP., et al. The specificity and importance of humoral antibody in the protection of mice against intraperitoneal challenge with complement-sensitive and complement-resistant *Salmonella*. *J. Infect. Dis.*, 1970, vol. 121, p. 113.
47. PORTNOY, DA., et al. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 167, p. 1459.
48. RENHEIM, EA. – KIPPS, TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cell through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 177, p. 925–935.
49. RICCI, ML., et al. Induction of protective immunity by *Legionella pneumophila* flagellum in an A/J mouse model. *Vaccine*, 2005, vol. 23, p. 4811–4820.
50. RODRÍGUEZ, A., et al. B- and T-cell response to the mycobacterium surface antigen *PstS-1* in the respiratory tract and adjacent tissues, role of adjuvants and routes of immunization. *Vaccine*, 2003, vol. 21, p. 458–467.
51. RONCHESE, F. – HAUSMANN, B. B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cell but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 177, p. 679.
52. STENMARK, S., et al. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Microb. Pathog.*, 2003, vol. 35, p. 73–80.
53. SCHNITTMANN, S., et al. Host defense against *Mycobacterium-avium* complex. *J. Clin. Immunol.*, 1988, vol. 8, p. 234–243.
54. SPITSYN, SV., et al. The biological properties of monoclonal antibodies to the cytolysin of *Legionella pneumophila*. *Zh. Mikrob. Epidemiol. Immunobiol.*, 1990, vol. 11, p. 72–75.
55. SUGAWARA, I., et al. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, 2000, vol. 44, p. 971–979.
56. TEITELBAUM, R., et al. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *PNAS*, 1998, vol. 95, p. 15688–15693.
57. VEMULAPALLI, R., et al. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet. Microbiol.*, 2002, vol. 90, p. 521–532.
58. WARD, DC., et al. Monoclonal antibodies to salmonella lipopolysaccharide: functional analysis of anti-lipid A antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, vol. 72, p. 157–163.
59. WILLIAMS, A., et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculosis early infection of the lungs. *Immunology*, 2004, vol. 111, p. 328–333.

Korespondence: Mgr. Klára Kubelková
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Ústav molekulární patologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: kubelkova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 24. 1. 2008