

Aktywność lizozymu hemolimfy pszczół robotnic (*Apis mellifera*) w rodzinach porażonych *Varroa jacobsoni* i eksponowanych na lewamizol

RAJMUND SOKÓŁ

Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR-T, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Sokół R.

Haemolymph lysozyme activity in worker bees (*Apis mellifera*) in colonies infested by *Varroa jacobsoni* and exposed to levamisole

Summary

The effect of levamisole on the activity of blood lysozyme of worker bees in colonies infested by *Varroa jacobsoni* was examined. The colonies were divided into three groups and fed levamisole in a sugar syrup from May to September. Group I received levamisole 3 times at a dose of 5 µg/l per month, in the second group levamisole at a dose of 2.5 µg/l was applied twice per month and in group III levamisole at a dose of 5 µg/l was used twice only in August and September. Levamisole increased the level of blood lysozyme and did not negatively affect the development of bee colonies. The highest activity of blood lysozyme was noted in the bees in September (27.8-31.0 µg/l) and the lowest in May (17.8-20.4 µg/l); in June a significant increase of blood lysozyme was found only in bees from the 1st group, compared to the experimental and control groups. The level of blood lysozyme greatly increased in bees from group III in August (the bees received levamisole for the first time during this month).

Keywords: blood lysozyme, *Varroa jacobsoni*, levamisole

Owady do których należy pszczoła miodna (*Apis mellifera*) poza dobrze rozwiniętymi mechanizmami chroniącymi je w sposób mechaniczny przed wtargnięciem patogenów do organizmu, dysponują ponadto dwoma systemami obrony wewnętrznej – odpornością komórkową i humoralną (1, 2, 4, 7-9). W humoralnej odporności przeciwzakaźnej owadów dużą rolę przypisuje się lizozymowi (EC.3.2.1.17; N-acetylmuramid glukanhidrolaza). Lizozym jest najbardziej pierwotnym systemem obrony humoralnej w świecie zwierząt. Uważany jest powszechnie za naturalny czynnik nieswoistej obrony humoralnej przed zakażeniami bakteryjnymi. Niektórzy badacze (9) uważają go za czynnik, który warunkuje pełną odporność humoralną owadów. Według Jolles (cyt. za 9) lizozym różnych gatunków zwierząt, niekiedy różnych narządów tego samego osobnika różni się strukturą chemiczną, a jakościowo wywiera identyczne działanie biologiczne. Poziom lizozymu ulega zmianom pod wpływem temperatury otoczenia, wilgotności powietrza, jakości pokarmu, głodzenia i w trakcie zakażeń (9). Stąd w ocenie stanu odporności u pszczół coraz częściej wykorzystuje się określenie profilów immunologicznych, które uwzględniają aktywność lizozymu (7), apidycyn

(10), skład niskocząsteczkowych frakcji białek hemolimfy (3), jakościowy skład i aktywność fagocytarną hemocytów hemolimfy (5, 6, 13). W weterynarii do zwiększenia odporności u zwierząt powszechnie stosowane są preparaty immunostymulacyjne pochodzenia naturalnego np. biostymina, biotropina, panodyna, preparat FIBS, TFX, niektóre szczepy bakterii oraz związki syntetyczne (nitrogranulogen, izopronazyna), a ostatnio lewamizol w niskich dawkach (11-16).

Mając na uwadze rolę jaką odgrywa lizozym u owadów w procesach odpornościowych oraz obserwowaną zwiększoną podatność pszczół na choroby, postanowiono określić wpływ podawania lewamizolu na kształtowanie się aktywności lizozymu w rodzinach dotkniętych inwazją *Varroa jacobsoni*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 20 rodzinach o wyrównanej sile i zbliżonym wieku matek pszczelich, w okresie od maja do września 1997 r. Użyte do doświadczenia rodziny podzielono na 4 grupy. Pierwszej podawano lewamizol 3-krotnie w odstępach jednodniowych, co miesiąc od maja do września, w dawce 5 mg na rodzinę w 1 litrze syropu; druga grupa otrzymywała lewamizol dwa razy w miesiącu

Tab. 1. Aktywność lizozymu w hemolimfie pszczół robotnic ($\mu\text{g/ml}$)

| Grupa | Maj | Czerwiec | Lipiec | Sierpień | Wrzesień |
|-------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| I | 17,8 \pm 1,3 | 28,8* \pm 3,89 | 23,6 \pm 6,98 | 27,2 \pm 5,33 | 28,0 \pm 4,47 |
| II | 20,0 \pm 1,41 | 21,4 \pm 3,28 | 24,8 \pm 4,81 | 26,8 \pm 2,28 | 27,8 \pm 2,04 |
| III | 20,4 \pm 2,6 | 21,0 \pm 3,39 | 24,8 \pm 4,81 | 29,6 \pm 2,96 | 29,2 \pm 4,38 |
| K | 19,5 \pm 1,78 | 24,2 \pm 4,91 | 26,6 \pm 3,97 | 30,8 \pm 2,28 | 32,0 \pm 2,00 |

Objaśnienie: * $p \leq 0,01$.

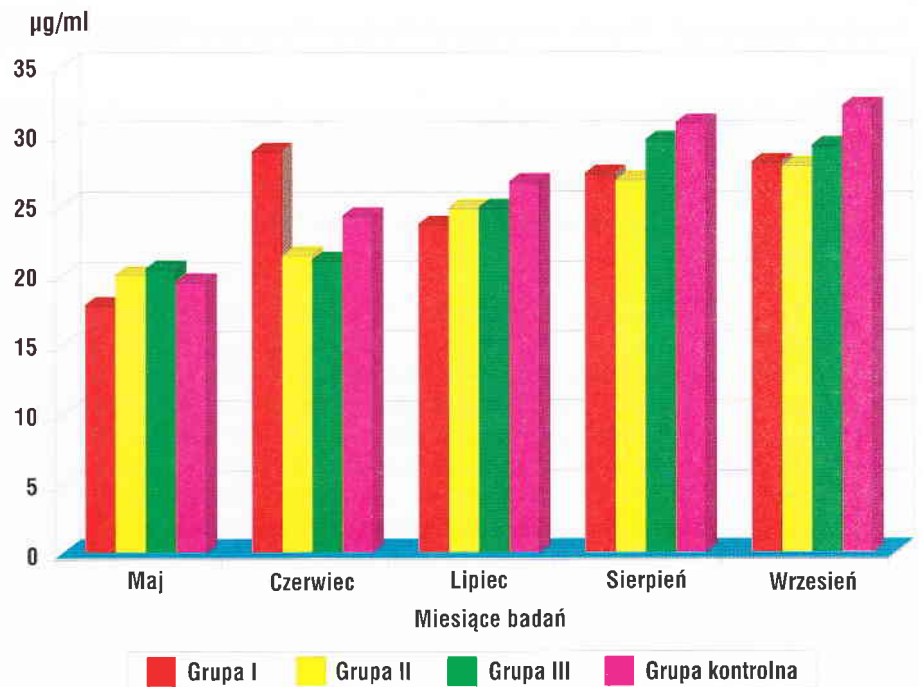
w odstępach jednodniowych w dawce 2,5 mg na rodzinę także od maja do września; trzecią grupę podkarmiono dwa razy w odstępach jednodniowych, w sierpniu oraz wrześniu syropem zawierającym 5 mg lewamizolu. Grupa czwarta – kontrolna otrzymywała syrop bez preparatu, dwa razy w odstępie jednodniowym w każdym miesiącu od maja do września. Syrop podawano zawsze w godzinach popołudniowych do podkarmiaczek powałkowych. Po upływie 10 dni od ostatniego podania syropu pobierano pszczoły do woreczków z siatki oraz zasklepiony 15-17 dniowy czerw pszczeli. Pobrany czerw przewożony był w termosie styropianowym do pracowni, następnie umieszczany w cieplarni w specjalnych klatkach (temp. 34°C i wilgotność względna 80%) do dalszego rozwoju. Od wygryzionych 1-3 dniowych robotnic pobierano z zatoki grzbietowej pipetą pasterowską hemolimfę i przenoszono do probówek z płynem fizjologicznym dla *Lepidoptera* zawierającym tiomocznik (bloker melanizacji). Po wymieszaniu hemolimfy z płynem fizjologicznym materiał zamrażano.

W pobranej hemolimfie badano aktywność lizozymu stosując metodę basenikowo-dyfuzyjną. Podłoże do ilościowego oznaczenia stężenia lizozymu zawierało 0,066 M bufor Sorensena (pH 6,4) agarozę oraz liofilizat komórek *Micrococcus luteus* (Sigma). Średnicę stref bakteriolizy wokół baseników (średnica ok. 3 mm) wypełnionych hemolimfą oceniano po 24 godzinach inkubacji w temp. 35°C. Lizozym białka jaja kurzego EWL (Sigma) posłużył do wykreślenia krzywych kalibracyjnych w celu ilościowej oceny aktywności lizozymu w hemolimfie robotnic.

Wyniki badań zestawiono w tab. 1 i przedstawiono na wykresie. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem analizy wariancji jednoczynnikowej, a dla wykazania istotności różnic pomiędzy grupami zastosowano test Duncana.

Wyniki i omówienie

Podawany w niskich dawkach lewamizol nie powodował żadnych zaburzeń w rozwoju rodzin pszczelich.



Ryc. 1. Przebieg aktywności lizozymu w hemolimfie pszczół robotnic po podaniu lewamizolu ($\mu\text{g/ml}$)

Ekstensywność inwazji *Varroa jacobsoni* od maja do sierpnia była nieznaczna i nie różniła się pomiędzy grupami doświadczalnymi i grupą kontrolną (wahała się od 0,2% do 0,5%). We wrześniu mimo sierpniowego leczenia pszczół ekstensywność inwazji *Varroa jacobsoni* nieznacznie podniosła się; najwyższą stwierdzono u pszczół w rodzinach grupy kontrolnej (1,3%).

Aktywność lizozymu w hemolimfie pszczół robotnic wyrażona w $\mu\text{g/ml}$ białka kurzego przedstawiała się następująco: w grupie kontrolnej systematycznie rosła od 19,5 $\mu\text{g/ml}$ w maju do 32 $\mu\text{g/ml}$ we wrześniu. Świadczy to o mobilizacji sił obronnych pszczół robotnic podczas przygotowywania się ich do zimowli. Szczególnie wysoki wzrost poziomu lizozymu w tej grupie wystąpił w okresie podawania dużych dawek syropu do zimowego dokarmiania rodzin (tab. 1).

W grupach doświadczalnych w lipcu, sierpniu i wrześniu aktywność lizozymu hemolimfy robotnic była wyrównana. Najniższą stwierdzono u pszczół grupy I po podaniu 5 mg/l lewamizolu. Świadczy to o supresyjnym działaniu preparatu.

U pszczoł grupy II (2,5 mg lewamizolu) – aktywność lizozymu była o 2,2 µg/ml wyższa niż w I grupie i o 0,5 µg/ml wyższa niż w grupie kontrolnej. W czerwcu w grupie I nastąpił statystycznie istotny wzrost poziomu lizozymu hemolimfy robotnic o 4,6 µg/ml w stosunku do grupy kontrolnej, wskazuje to na stymulujący wpływ lewamizolu na mechanizmy obronne pszczoły. W lipcu poziom lizozymu w porównaniu do czerwca podniósł się w II i III grupie; niższy zaś był w I grupie (23,6 µg/ml). W pozostałych miesiącach badań – (sierpień i wrzesień) aktywność lizozymu systematycznie wzrastała (tab. 1).

Najwyższą aktywność lizozymu u pszczoł grup doświadczalnych stwierdzono we wrześniu (27,8-31,0 µg/ml), a najniższą w maju (17,8-20,4 µg/ml); w czerwcu i to tylko u pszczoł grupy I wystąpił istotny wzrost aktywności lizozymu w stosunku do pozostałych grup doświadczalnych i grupy kontrolnej. W sierpniu stwierdzono znaczny wzrost aktywności lizozymu w hemolimfie pszczoł grupy III (rodziny, którym w tym miesiącu po raz pierwszy podano lewamizol) (ryc. 1).

Wyniki badań wydają się wskazywać na złożoność procesów związanych ze stymulacją odporności u pszczoł. Na wzrost aktywności lizozymu wpływa nie tylko dodatkowo zastosowany stymulator odporności nieswoistej (lewamizol), ale i wiele innych czynników, wśród

których najważniejszy wydaje się być dostatek pyłku w sezonie pasiecznym.

Wnioski

1. Lewamizol w dawkach 2,5 mg/l i 5 mg/l syropu nie powoduje zaburzeń w rozwoju rodzin pszczelich.

2. Lewamizol podawany rodzinom pszczelim zwiększa aktywność bakteriologiczną lizozymu hemolimfy.

Piśmiennictwo

1. Ball B. V. J.: Apicult. Res. 24, 115, 1985.
2. Ball B. V.: Allg. Dtsch. Imker. 17, 177, 1983.
3. Craigsheim K.: Apidologie 21, 417, 1990.
4. Dandeu J. P., Lux M., Coliin M. E., Rabillon J., David B.: Apidologie 22, 37, 1991.
5. Gliński Z., Gacek G., Grzegorzczak K.: Medycyna Wet. 49, 121, 1993.
6. Gliński Z., Jarosz J.: Folia Vet. Koszyce. 32, 39, 1988.
7. Gliński Z., Jarosz J.: Medycyna Wet. 47, 442, 1991.
8. Gliński Z., Jarosz J.: Post. Mikrobiol. 30, 107, 1991.
9. Gliński Z., Rzedzicki J.: Medycyna Wet. 12, 719, 1979.
10. Gliński Z., Jarosz J.: Pol. J. Immunology, 20, 123-134, 1995.
11. Kościński W., Szlagiewicz M., Chmielewski A.: Medycyna Wet. 51, 477, 1995.
12. Markowska-Daniel I.: Medycyna Wet. 47, 306, 1991.
13. Siwicki A.: Wpływ ksenobiotyków na układ odpornościowy. Wydawnictwo IRS, 1997, s. 161.
14. Sopińska A., Lutnicka H., Guz L.: Medycyna Wet. 50, 612, 1994.
15. Stosik M.: Medycyna Wet. 52, 53, 1996.
16. Wiśniewski J., Grabowska G., Trybała E., Rotkiewicz Z.: Medycyna Wet. 49, 66, 1993.

Adres autora: dr Rajmund Sokół, ul. Sikiryckiego 4/13, 10-686 Olsztyn

VAN WOENSEL P. A. M., LIEFKENS K., DEMARET S.: Wpływ szczepienia serotypem amerykańskim i europejskim PRRSV na wiramię po zakażeniu dzikimi europejskimi szczepami tego wirusa. (Effect on viraemia of an American and an European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus). Vet. Rec. 142, 510-512, 1998 (19)

Grupy liczące każda 10 sztuk prosiąt SPF w wieku 6 tyg. zaszczepiono domięśniowo (105,5 TCID₅₀) zmodyfikowaną żywą szczepionką zawierającą serotyp europejski, trzy grupy zaszczepiono szczepionką (105,5 TCID₅₀) komercyjną zawierającą żywy zmodyfikowany serotyp amerykański wirusa PRRSV (wirus rozrodzono-oddechowego zespołu chorobowego świń). Trzecia grupa nie szczepiona stanowiła kontrolę. Po 4 tyg. po szczepieniu określono miano przeciwciał dla PRRSV, a następnie każdą grupę zakażono terenowym szczepem wirusa PRRSV wyizolowanym w Hiszpanii, Niemczech lub Danii. Szczep szczepionkowy europejski i amerykański należały do różnych serotypów. Szczepienie serotypem amerykańskim wirusa PRRSV w niewielkim stopniu redukowało natężenie wirēmii po zakażeniu terenowym szczepem europejskim tego wirusa. Jedynie po zakażeniu szczepem izolowanym w Hiszpanii statystycznie znacząco obniżała się wirēmia. Natomiast szczepienie prosiąt serotypem europejskim całkowicie hamowało rozwój wirēmii po zakażeniu szczepem izolowanym w Niemczech oraz bardzo silnie obniżało jej nasilenie po zakażeniu szczepem terenowym izolowanym na terenie Hiszpanii i Danii.

G.

HIGUCHI T., TAKARAGUCHI S., HASHIKURA S., HAGIWARA S., GAJO C., SATOH S., YOSHIDA M., TAKAI S.: Badanie kliniczne i serologiczne źrebiąt w wieku 30 i 45 dni celem ustalenia wczesnego rozpoznania *Rhodococcus equi* w fermach zakażonych endemicznie. (Physical and serological examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of *Rhodococcus equi* infection on endemically infected farms). JAVMA 212, 976-981, 1998 (7)

Celem badań była ocena kliniczna i serologiczna występowania u źrebiąt w wieku 30 i 45 dni endemicznych względnie sporadycznych zakażeń wywołanych przez *Rhodococcus equi*. Ogółem przebadano 144 źrebięta wśród których 36 pochodziło z gospodarstw w których w ostatnich 2 latach zakażenia wywołane przez *R. equi* występowały endemicznie, natomiast 71 źrebiąt pochodziło z gospodarstw gdzie zakażenia tym zarazkiem występowały sporadycznie podczas gdy 37 źrebiąt pochodziło z gospodarstw wolnych od zakażenia. Rozpoznanie oparto o badanie fizykalne klatki piersiowej, badanie parametrów biochemicznych surowicy i hematologicznych oraz o odczyn ELISA. Do badań bakteriologicznych pobierano aspirat z tchawicy od 14 z 32 źrebiąt z klinicznymi objawami choroby oraz od 7 z 41 źrebiąt seropozytywnych ale bez objawów chorobowych. Częstotliwość występowania chorób układu oddechowego była znacząco wyższa u źrebiąt w wieku 45 dni pochodzących z gospodarstw gdzie zakażenia *R. equi* występowały endemicznie lub sporadycznie. *R. equi* izolowano od źrebiąt seropozytywnych nawet w przypadku braku objawów klinicznych choroby.

G.