

Tolerancja endotoksynowa – udział i aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych w krwi koni

WIESŁAW KRUMRYCH, EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI, JOLANTA DĄBROWSKA, JANUSZ DANEK

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach,
Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Krumrych W., Wiśniewski E., Dąbrowska J., Danek J.

Endotoxin tolerance – the role and phagocytic activity of neutrophils in blood of horses

Summary

The object of the study was to determine the influence of experimentally induced endotoxin tolerance on the role and phagocytic activity of neutrophils in horses. The study was carried out on 10 clinically healthy Polish horses (8 experimental and 2 controls). The experimental animals were intravenously injected with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) in physiological salt saline at a dose of 0.1 µg/kg b.w. for three consecutive days (LPS-1, LPS-2 and LPS-3) and after 1 week (LPS-4). The control animals were injected with a physiological salt saline only. The white blood cells count (WBC), number of neutrophils and a micro test of NBT reduction to evaluate phagocytic activity of neutrophils were performed. It was found that just 1 hr after injection of LPS-1 there was a clear decrease of WBC and the number of neutrophils and a simultaneous increase in their phagocytic activity. After the 2nd injection of LPS there was a decreased response of the organism to endotoxin pointing to the endotoxin tolerance of the examined parameters. This tolerance increased after the 3rd dose of LPS. The injection of LPS-4 after a one week break revealed the full restoration of sensitivity of the horses to LPS, indicating a relatively quick cessation of tolerance to the administered dose of endotoxin.

Keywords: endotoxin tolerance, phagocytic activity, horses.

Reakcją organizmu gospodarza na obecność endotoksyny bakteryjnej (LPS) jest aktywacja immunologicznie aktywnych fagocytów oraz komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego do syntezy i uwalniania wielu biologicznie czynnych związków białkowych zwanych cytokinami. Spośród nich najczęściej wymienia się czynnik nekrotyzujący nowotwory (TNF), interferony (IFN) oraz interleukiny (IL) (9, 11, 13, 19). Spektrum działania tych związków jest bardzo szerokie, m.in. stymulują syntezę i uwalnianie przeciwciał oraz białek ostrej fazy, wzmagają proliferację i różnicowanie limfocytów T i B, zwiększają uwalnianie neutrofilów ze szpiku kostnego do krwi oraz powodują wzrost aktywności fagocytarnej komórek żernych (9, 11, 13, 14, 25).

Badania przeprowadzone głównie na zwierzętach laboratoryjnych wykazały, że po kolejnych (takich samych lub niższych) dawkach LPS reakcja organizmu jest coraz mniej intensywna (1, 7, 15, 22). Zjawisko to nazwano tolerancją endotoksynową i jest formą adaptacyjną układu odpornościowego gospodarza na dany antygen. Stopniowo ogranicza ona efekty wzbudzone czynnikiem egzogennym, jednocześnie chroniąc organizm przed koniecznością rozwijania pełnej reakcji

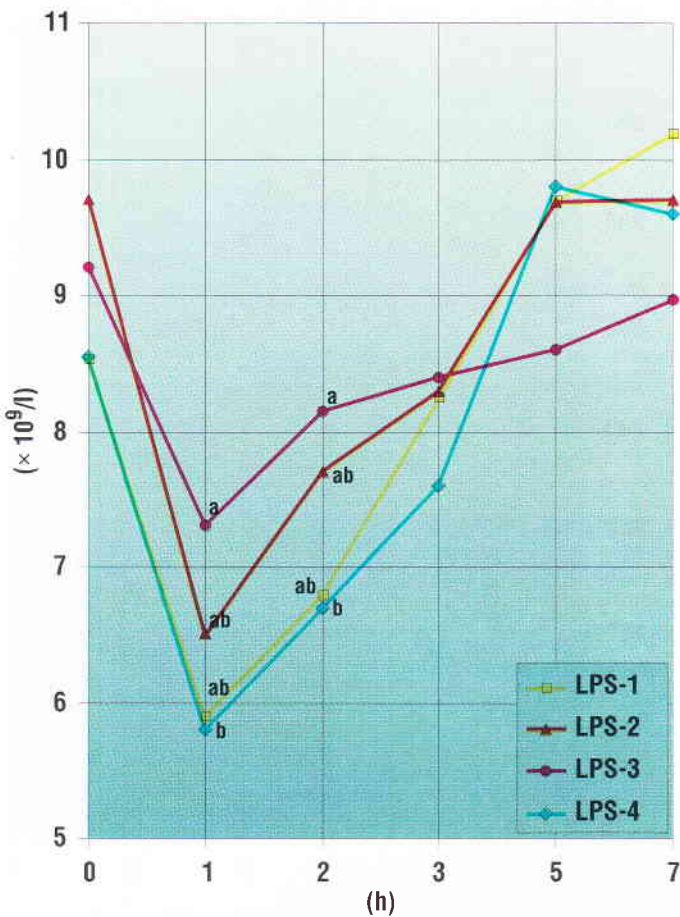
obronnej na każdorazowe wniknięcie danego antygeny, przy zachowaniu pełnej zdolności reagowania na inny antygen (22).

Bogate piśmiennictwo z zakresu tolerancji endotoksynowej dotyczy badań przeprowadzonych z reguły na zwierzętach laboratoryjnych (18, 21-24, 27). Niewielka liczba prac z tego zakresu u koni obejmowała przede wszystkim obserwacje kliniczne ze szczególnym uwzględnieniem temperatury ciała, a także udział cytokin oraz niektórych wskaźników krzepnięcia krwi (1, 4, 15).

Wyniki wcześniejszych badań u koni wykazały, że LPS w jednorazowej dawce jest bardzo silnym stymulatorem odporności komórkowej (14). Stało się to celem niniejszych badań nad oceną wpływu wielokrotnych dawek LPS na kształtowanie się tolerancji endotoksynowej w zakresie udziału i aktywności granulocytów obojętnochłonnych u koni.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 10 klinicznie zdrowych klaczach rasy konik polski, w wieku od 2 do 9 lat, z których 8 stanowiło grupę doświadczalną, zaś 2 pozostałe były zwierzętami kontrolnymi.



Ryc. 1. Średnia liczba krwinek białych (WBC) u koni doświadczalnych po 4 dawkach 0,1 µg/kg m.c. LPS *E. coli*

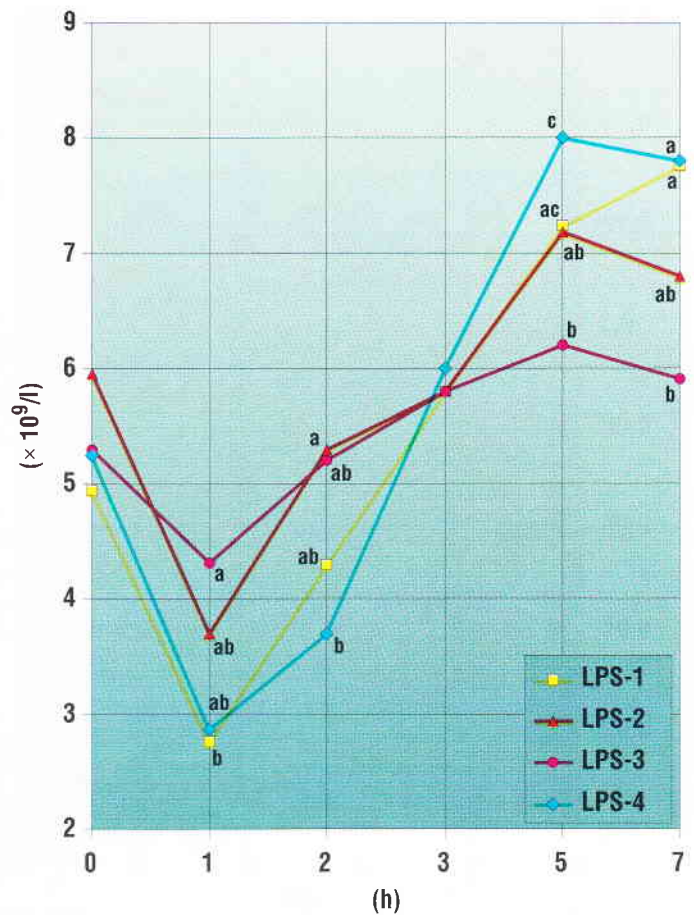
Objaśnienie: a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$.

Do badań użyto liofilizowany lipopolisacharyd z *Escherichia coli* serotyp O55:B5 (Sigma Chemical Co.). Po rozpuszczeniu w 500 ml apirogenego, fizjologicznego roztworu NaCl, endotoksynę podawano dożylnie koniom doświadczalnym. Zwierzęta te otrzymały LPS czterokrotnie w dawkach po 0,1 µg/kg m.c. każda – 3 razy w odstępach 24-godzinnych (LPS-1, LPS-2 i LPS-3) oraz po tygodniu od ostatniego wlewu (LPS-4). Koniom kontrolnym podano tylko fizjologiczny roztwór NaCl według schematu obwiązującego zwierzęta doświadczalne.

Obserwacje kliniczne oraz pozyskiwanie krwi do oznaczeń wykonywano bezpośrednio przed podaniem endotoksyny lub roztworu NaCl (godzina „0”) oraz po 1, 2, 3, 5 i 7 godzinach od wlewu. Zarówno wlewy, jak i pobieranie krwi wykonywano poprzez katetry (Secalon® Kathy 1 firmy Viggo) instalowane każdego dnia badań w żyłach szyjnych zewnętrznych u wszystkich zwierząt.

W uzyskanym materiale oznaczono liczbę krwinek białych (WBC) przy użyciu analizatora Sysmex F800 oraz przeprowadzono ocenę obrazu białokrwińkowego wg Arnettha-Schillinga, co pozwoliło wyliczyć bezwzględną liczbę granulocytów obojętnochłonnych w krwi.

Wykonano ponadto metodą mikroilościową test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) wg Ramana i Polanda (20). Wyniki przedstawiono w postaci pomiaru gęstości optycznej (OD), odczytanej przy długości fali światła wynoszącej 546 nm, zredukowanego NBT (formazanu) przez



Ryc. 2. Średnia liczba granulocytów obojętnochłonnych u koni doświadczalnych po 4 dawkach 0,1 µg/kg m.c. LPS *E. coli*

Objaśnienie: a, b, c – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$.

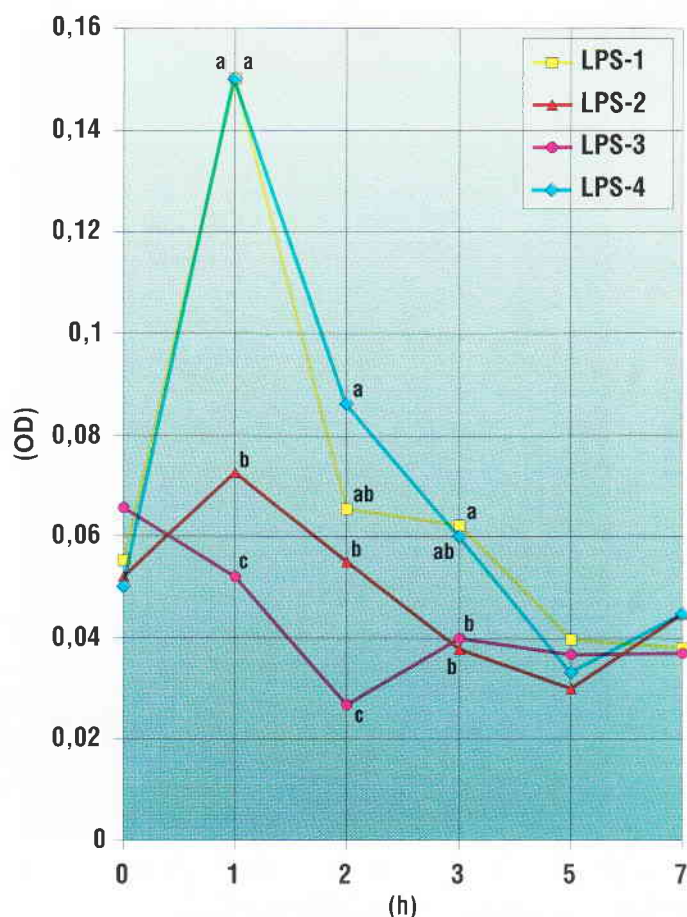
10^6 granulocytów obojętnochłonnych. Wyliczono także, korzystając z poniżej zamieszczonego wzoru, wartości indeksu stymulacji (SI) redukcji NBT spowodowanej podaniem LPS.

$$SI (\%) = \frac{OD \text{ stymul.}}{OD \text{ spont.}} \times 100$$

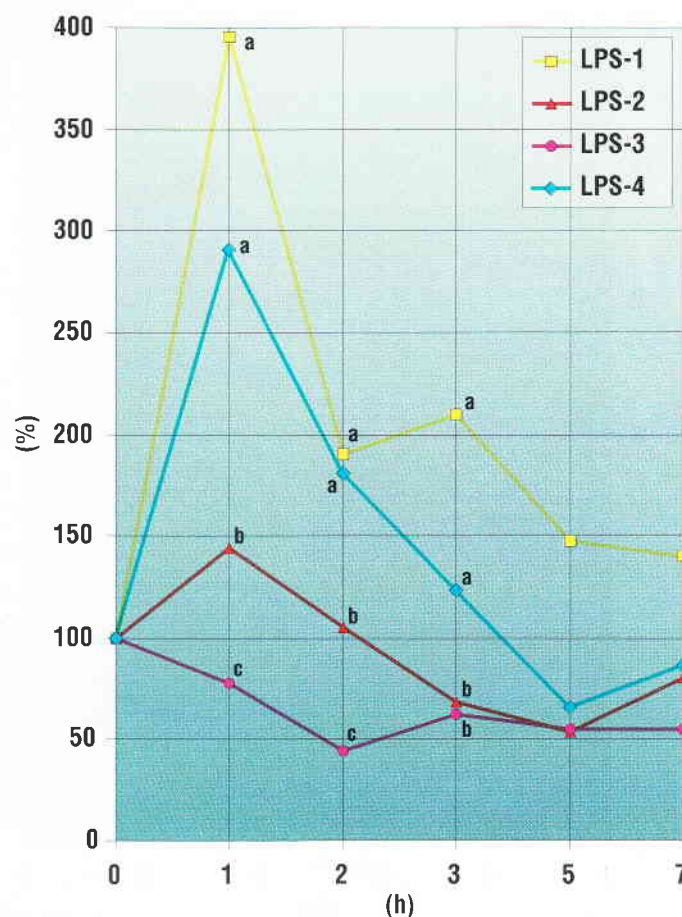
Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych ($\bar{x} \pm s$), a następnie poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przyjmując różnicę pomiędzy dwoma wynikami za statystycznie istotną przy $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały już w godzinę po każdym podaniu LPS *E. coli* spadek liczby krwinek białych (WBC), przy czym najbardziej zaznaczył się on po dawkach LPS-1 (z $8,50 \pm 0,82$ na $5,89 \pm 1,50 \times 10^9/l$) i LPS-4 (z $8,55 \pm 0,97$ na $5,74 \pm 0,92 \times 10^9/l$) zaś po LPS-3 (z $9,19 \pm 0,79$ na $7,34 \pm 1,43 \times 10^9/l$) był najmniejszy (ryc. 1). W późniejszych godzinach zarejestrowano stopniowe zwiększenie liczby tych krwinek (po LPS-1 i LPS-4 w 5 i 7 godzinie nawet powyżej wartości wyjściowych). Porównanie średnich wartości WBC po kolejnych dawkach endotoksyny w odpowiednich przedziałach czasowych wykazało statystycznie istotne różnice jedynie między LPS-3 a LPS-4 w 1 i 2 godzinie badania.



Ryc. 3. Średnia gęstość optyczna (OD) zredukowanego NBT u koni doświadczalnych po 4 dawkach 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. LPS *E. coli*.
Objaśnienie: jak w ryc. 2.



Ryc. 4. Średnia wartość indeksu stymulacji redukcji NBT (SI) u koni doświadczalnych po 4 dawkach 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. LPS *E. coli*.
Objaśnienie: jak w ryc. 2.

Przedstawiona odpowiedź leukocytna była wywołana głównie zmianami liczby granulocytów obojętnochłonnych (ryc. 2). Po podaniu LPS-1 zarejestrowano bowiem w 1 godzinie spadek liczby tych krwinek z $4,93 \pm 0,62$ do $2,72 \pm 1,08 \times 10^9/\text{l}$. W późniejszych godzinach wystąpił sukcesywny wzrost ich wartości, aż do $7,72 \pm 1,33 \times 10^9/\text{l}$ w 7 godzinie. Iniekcja drugiej, a zwłaszcza trzeciej dawki endotoksyny wywołała podobne, ale mniej intensywne, zmiany liczby neutrofilów. Spadek liczby omawianych krwinek po godzinie od podania LPS-3 był relatywnie niewielki (z $5,35 \pm 0,76$ do $4,36 \pm 0,95 \times 10^9/\text{l}$), zaś najwyższą wartość tego wskaźnika zarejestrowano w 5 godzinie ($6,19 \pm 0,52 \times 10^9/\text{l}$). Zmiany wartości tego wskaźnika po 4 iniekcji LPS były zbliżone do obserwowanych po podaniu LPS-1 (spadek po godzinie z $5,26 \pm 0,66$ do $2,87 \pm 1,61 \times 10^9/\text{l}$ oraz stopniowy wzrost aż do wartości szczytowej w 5 godzinie – $8,01 \pm 0,96 \times 10^9/\text{l}$). Zestawienie średnich wyników liczebności tych krwinek w kolejnych przedziałach czasowych wykazało statystycznie istotne różnice w 1 godzinie między LPS-1 a LPS-3, w 2 godzinie między LPS-2 a LPS-4, w 5 między LPS-1 a LPS-3 i LPS-2 a LPS-4, zaś w 7 godzinie pomiędzy LPS-1 a LPS-3 oraz LPS-3 a LPS-4.

Spadek liczby neutrofilów w krwi obwodowej spowodowany jest przyleganiem komórek do śródbłonna

naczyń krwionośnych oraz ich migracją do otaczających tkanek i przestrzeni międzytkankowych (12). Dopiero w późniejszym czasie dochodzi do uruchomienia rezerw tych krwinek ze szpiku kostnego, a co za tym idzie – wzrost WBC.

Dla oceny najważniejszej funkcji czynnościowej granulocytów obojętnochłonnych, jaką jest fagocytoza posłużono się testem redukcji NBT do barwnego formazanu. Reakcja ta wskazuje bowiem na aktywność energetyczną komórek fagocytujących, co z kolei jest niezbędnym warunkiem prawidłowego zniszczenia wchłoniętych bakterii.

Podanie LPS-1 spowodowało u koni już po godzinie bardzo wyraźny, szczytowy wzrost redukcji NBT wyrażający się zwiększeniem gęstości optycznej formazanu z $0,055 \pm 0,041$ do $0,151 \pm 0,052$ (ryc. 3). W późniejszym czasie wartość ta obniżała się aż do $0,038 \pm 0,008$ w 7 godzinie. Po iniekcji LPS-2 zarejestrowano niewielki wzrost wartości tego wskaźnika w 1 godzinie (z $0,052 \pm 0,004$ do $0,074 \pm 0,041$), a następnie spadek do $0,029 \pm 0,007$ w 5 godzinie. Iniekcja LPS-3 nie spowodowała, obserwowanego po poprzednich dawkach, wzrostu aktywności fagocytarnej neutrofilów. Po podaniu LPS-4 zaobserwowano natomiast zmiany zbliżone do wyników po pierwszej dawce LPS. W 1 godzinie wystąpił silnie zaznaczony wzrost ak-

tywności fagocytarnej z $0,050 \pm 0,013$ do $0,151 \pm 0,080$, a następnie stopniowy spadek. Porównanie średnich wartości tego wskaźnika po kolejnych dawkach LPS w odpowiednich przedziałach czasowych wykazało różnice statystycznie istotne między LPS-1 i LPS-4 a LPS-2 i LPS-3 w 1 godzinie, między LPS-1 a LPS-3 oraz między LPS-4 a LPS-2 i LPS-3 w 2 godzinie, a także między LPS-1 a LPS-2 i LPS-3 w 3 godzinie.

Na ryc. 4 przedstawiono krzywe wartości indeksu stymulacji redukcji NBT (SI) po kolejnych dawkach endotoksyny. Wynika z nich, że największe pobudzenie neutrofilów wystąpiło w godzinę po iniekcji LPS-1 (ze $100 \pm 0,00$ do $397,86 \pm 210,41\%$), w późniejszych godzinach zarejestrowano stopniowy spadek wartości tego wskaźnika. Podanie LPS-2 spowodowało po godzinie znacznie mniejszą stymulację neutrofilów ($144,08 \pm 87,39\%$), natomiast po LPS-3 nie stwierdzono jej wcale ($78,25 \pm 23,34\%$). Z kolei iniekcja LPS-4 spowodowała ponowny wzrost SI ($292,89 \pm 180,08\%$) w 1 godzinie, aczkolwiek był on mniejszy niż po LPS-1. Statystycznie istotne różnice w wartościach tego indeksu między kolejnymi dawkami endotoksyny stwierdzono w czasie 3 pierwszych godzin po iniekcjach. Dotyczyły one z reguły znacząco wyższych wartości po LPS-1 i LPS-4 w porównaniu do LPS-2 i LPS-3.

Po podaniu LPS-1 zaobserwowano kliniczne objawy endotoksemii, tj. wzrost temperatury rektalnej, przyspieszenie liczby uderzeń serca oraz oddechów, anoreksja, posmutnienie, drżenie zadu oraz oddawanie luźnego, cuchnącego kału. Kolejne dawki endotoksyny w znacznym stopniu niwelowały te objawy (15).

Zmiany wartości oznaczonych wskaźników u koni kontrolnych były w całym przebiegu doświadczenia niewielkie i w statystycznym ujęciu nieistotne.

Reakcja badanych koni po pierwszym podaniu lipopolisacharydu wykazała jego silne działanie immunostymulujące. Początkowy spadek WBC oraz liczby neutrofilów, a także stymulacja aktywności fagocytarnej są typowymi objawami endotoksemii obserwowanymi wcześniej u koni i innych gatunków zwierząt (5, 12, 14, 26). Aktualnie uważa się, że w wyniku bezpośredniego działania endotoksyny na m.in. polimorfonuklearne i mononuklearne komórki układu fagocytyjnego, następuje wydzielanie całej gamy silnie i wielokierunkowo działających cytokin. Wykazano, że efekty obserwowane po podaniu LPS są wynikiem skoordynowanego działania wielu uwolnionych białek, a nie żadnego z nich pojedynczo (3). Już po kilkunastu minutach od podania LPS obserwowano wzrost zawartości cytokin w surowicy, przy czym ich stężenie jest zależne od dawki endotoksyny (1, 8, 16).

Podanie drugiej, a zwłaszcza trzeciej dawki LPS spowodowało wyraźny spadek odpowiedzi organizmu w zakresie oznaczonych wskaźników, co wskazuje na wzbudzenie tolerancji endotoksynowej. Rezultat ten jest zbliżony do wyników uzyskanych przez Mackensena i wsp. (16). Autorzy ci podczas 5 codziennych

iniekcji $4,0 \text{ ng/kg m.c.}$ LPS zarejestrowali u ludzi m.in. malejący odsetek zmian liczby granulocytów po kolejnych wlewach z równoczesnym spadkiem zawartości m.in. TNF- α , IL-6, IL-8. Te, oraz wiele innych badań wskazujących na spadek zawartości cytokin w surowicy po drugiej i kolejnych iniekcjach endotoksyny (1, 8, 16) zdają się wskazywać na kluczową rolę omawianych białek w stanie tolerancji. Wydaje się, że może być to wynikiem bezpośredniego działania glikokortykosteroidów, których obecność blokuje syntezę i uwalnianie m.in. TNF, IFN, IL-1 (2, 10). U zwierząt poddanych chirurgicznemu usunięciu nadnerczy nie obserwowano bowiem wzbudzenia tolerancji (6). Jednocześnie uważa się, że omawiany proces może polegać także na obniżeniu wrażliwości komórek docelowych na stymulację cytokinami (22).

Wyniki badań przeprowadzonych po podaniu LPS-4 były zbliżone do rezultatów zarejestrowanych po pierwszej iniekcji LPS. Fakt ten zdaje się wskazywać na wygaśnięcie mechanizmów tolerancji endotoksynowej (w zakresie oznaczonych wskaźników) po tygodniowym zaprzestaniu iniekcji przyjętych dawek LPS *E. coli*.

Tolerancja endotoksynowa przebiega w dwóch fazach: wczesnej i późnej (22). Pierwsza – związana jest ze wzrostem aktywności elementów odporności komórkowej, pojawia się już w kilka godzin po podaniu endotoksyny. Faza późna występuje po kilku dniach (17) lub nawet tygodniach (cyt. 16) stosowania LPS i wiąże się ze wzrostem odporności humoralnej w wyniku pojawienia się w surowicy przeciwciał skierowanych przeciw części O-swoistej LPS. Zaznaczyć należy, że intensywność indukowanej tolerancji zależy od dawki endotoksyny oraz częstotliwości jej podawania. Za optymalne uważa się 24-godzinne przerwy między kolejnymi iniekcjami (cyt. 22). Tolerancja endotoksynowa nigdy nie jest całkowita, tzn. organizm zawsze, choćby w niewielkim stopniu, reaguje na podany LPS. Jest to proces przejściowy, a podstawowym warunkiem jej podtrzymania jest ciągle podawanie endotoksyny. Po zaprzestaniu, zanika stopniowo, a po około 3 tygodniach nie stwierdza się oznak tolerancji (cyt. 22).

Przedstawione wyniki wykazały, że wielokrotny kontakt koni z endotoksyną bakteryjną prowadzi do uruchomienia mechanizmów tolerancji endotoksynowej w zakresie udziału oraz aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych. Po tygodniu od ostatniego podania LPS *E. coli* w dawce $0,1 \text{ } \mu\text{g/kg m.c.}$ stwierdzono wygaśnięcie tolerancji endotoksynowej, co sugeruje stosunkowo krótki czas utrzymywania się tego zjawiska u koni. Wydaje się, że szybkie uzyskiwanie pełnej zdolności reagowania na LPS może być związane z dużą wrażliwością tych zwierząt na działanie endotoksyn bakteryjnych. Przeprowadzone obserwacje zwracają także uwagę na praktyczny aspekt w planowaniu badań z wykorzystaniem LPS *E. coli* u koni. W przypadku stosowania tej endotoksyny należy bowiem zachować odpowiedni odstęp czasu pomię-

dzy kolejnymi iniekcjami LPS, niezbędny dla przywrócenia pełnej zdolności reagowania na tę endotoksynę.

Piśmiennictwo

1. Allen G. K., Campbell-Beggs C., Robinson J. A., Johnson P. J., Green E. M.: Equine vet. J. 28, 269, 1996.
2. Besedovsky H., del Rey A., Sorkin E., Dinarello C. A.: Science 233, 652, 1986.
3. Cochran F. R., Finch-Arietta M. B.: Immunopharmacology 73, 450, 1991.
4. Dąbrowska J., Wiśniewski E., Krumrych W.: Medycyna Wet. (w druku).
5. Deldar A., Naylor J. M., Bloom J. C.: Am. J. vet. Res. 45, 670, 1984.
6. Evans G. F., Zuckerman S. H.: Eur. J. Immunol. 21, 1973, 1991.
7. Exton M. S., Bull D. F., King M. G.: Physiol. Behav. 57, 401, 1995.
8. Fraker D. L., Stovroff M. C., Merino M. J., Norton J. A.: J. Exp. Med. 168, 95, 1988.
9. Green E. M., Adams H. R.: J. Am. vet. med. Ass. 200, 1834, 1992.
10. Guyre P. M., Girard M. T., Morganelli P. M., Manganiello P. D.: J. steroid Biochem. 30, 89, 1988.
11. Izdebska-Szymona K., Sitnicka E.: Post. Hig. 41, 211, 1987.
12. Jain N. C., Lasmanis J.: Res. vet. Sci. 24, 386, 1978.
13. Klink M., Kaca W.: Post. Hig. 50, 333, 1996.
14. Krumrych W., Wiśniewski E., Danek J.: Medycyna Wet. 52, 584, 1996.
15. Krumrych W., Dąbrowska J., Danek J., Soszyński D.: Bull. vet. Inst. Pulawy (w druku).
16. Mackensen A., Galanos Ch., Wehr U., Engelhardt R.: Eur. Cytokine Netw. 3, 571, 1992.
17. Madonna G. S., Peterson J. E., Ribi E. E., Vogel S. N.: Infect. Immun. 52, 6, 1986.
18. Mengozzi M., Ghezzi P.: Eur. Cytokine Netw. 4, 89, 1993.
19. Nowicki A., Szwech P.: Immunol. Pol. 19, 263, 1994.
20. Raman U., Poland R. L.: Ped. Res. 9, 334, 1975.
21. Roth J., McClellan J. L., Kluger M. J., Zeisberger E.: J. Physiol. 477, 177, 1994.
22. Soszyński D.: Fizjologiczne mechanizmy tolerancji pirogenowej u królików. Praca dokt., Akademia Medyczna, Bydgoszcz 1991.
23. Soszyński D., Kozak W., Kluger M. J.: Physiol. Behav. 63, 689, 1998.
24. Spolarics Z., Spitzer J. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 211, 340, 1995.
25. Walczak M.: Immunol. Pol. 16, 169, 1991.
26. Wiśniewski E., Krumrych W.: Medycyna Wet. 41, 483, 1985.
27. Zuckerman S. H., Evans G. F., Butler L. D.: Infect. Immun. 59, 2774, 1991.

Adres autora: dr Wiesław Krumrych, ul. Juhasów 4/14, 85-792 Bydgoszcz

STAN ZARAŻLIWYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE według zgłoszenia Głównego Inspektoratu Weterynarii do Międzynarodowego Biura Epizootii, OIE za okres 1-28 lutego 1999 r.

1) Wścieklizna zwierząt domowych – wystąpiła w 6 województwach (w nawiasach podano liczbę zapowietrzonych zagród) a mianowicie: kujawsko-pomorskim (4), małopolskim (2), mazowieckim (1), podkarpackim (1), podlaskim (1), wielkopolskim (1). Wściekliznę stwierdzono u 3 psów, 4 kotów i 3 szt. bydła.

2) Wścieklizna zwierząt dzikich – wystąpiła w 10 województwach: kujawsko-pomorskim (9), lubelskim (3), łódzkim (2), małopolskim (3), mazowieckim (4), podkarpackim (5), podlaskim (11), świętokrzyskim (1), warmińsko-mazurskim (18), wielkopolskim (2). Zanotowano ją u 53 lisów i 5 jenotów.

3) Choroba Aujeszkyego – wystąpiła w 2 województwach: kujawsko-pomorskim (1) i wielkopolskim (1).

4) Myksomatoza – wystąpiła w województwie opolskim (1).

5) Leptospiroza świń – wystąpiła w województwie podkarpackim (1).

6) Wirusowa krwotoczna choroba królików – wystąpiła w województwie wielkopolskim (1).

7) Zakaźne zapalenie oskrzeli u kur – wystąpiło w województwie małopolskim (1).

8) Salmoneloza drobiu – wystąpiła w 14 województwach: dolnośląskim (1), kujawsko-pomorskim (1), lubelskim (10), lubuskim (7), łódzkim (3), małopolskim (1), mazowieckim (2), podkarpackim (1), podlaskim (2), śląskim (3), świętokrzyskim (3), warmińsko-mazurskim (2), wielkopolskim (40), zachodnio-pomorskim (4).

9) Zgnilec amerykański – wystąpił w województwie śląskim (1).