

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW GLIŃSKI

Współczesne poglądy na zjawiska odpornościowe u owadów. II. Nabywanie odporności przez owady

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii AR w Lublinie

Mechanizmów odporności nabytej nie da się ściśle odgraniczyć od mechanizmów odporności naturalnej. Zazwyczaj działają one u owadów podobnie jak i u kręgowców łącznie. Owady nie wytwarzają jednak w następstwie działania bodźca antygenowego substancji odpowiadających ściśle właściwościami fizyko-chemicznymi przeciwciałom kręgowców. Mimo tego wyniki badań wielu autorów upoważniają do stwierdzenia, że w hemolimfie owadów uodpornionych występują substancje o działaniu antytoksycznym, bakteriobójczym i bakteriostatycznym, oraz że w miarę narastania ich poziomu w hemolimfie wzrasta odporność.

Już w 1920 r. Paillot (20) sugerował obecność w hemolimfie owadów uodpornionych przeciwciał, twierdząc że są one wytwarzane przez elementy fagocytujące substancje antygenowe (22). Pionierskie prace nad odpornością nabytą u owadów są zasługą Chorine (6), który w hemolimfie larw *Galleria mellonella* uodpornionych toksoidem *C. dyphtheriae* wykazał obecność substancji neutralizującej toksynę. Ostatecznie badania Chadwick (4, 5) wykazały dobitnie, że odporność antytoksyczna u owadów pojawia się szybko po podaniu toksyny, utrzymuje się przez krótki okres czasu i cechuje się dużą swoistością. Najwyższy poziom odporności uzyskuje się w stosunku do antygeny homologicznego, chociaż u larw *Galleria mellonella* po iniekcjach kompleksu białko-wielocukier-lipid wg Boivin z *E. coli*, *S. typhimurium* i *Sh. flexneri* uzyskano również odporność w stosunku do endotoksyny *Ps. aeruginosa*.

Jednakże natężenie tej odporności w stosunku do antygeny heterologicznej było niskie (5). Oprócz całej cząsteczki endotoksyny właściwości immunogenne wykazywała również część polisacharydowa endotoksyny (4).

Hemolimfa niektórych gatunków owadów uodpornionych drobnoustrojami aglutynuje drobnoustroje homologiczne. Glasser (11, 12) wykazał że hemolimfa pasikoników aglutynuje *Bac. poncei*, zaś Gary i wsp. (8) stwierdzili,

że hemolimfa robotnic z rodzin chorych na zgnilec złośliwy aglutynuje formy wegetatywne *Bac. larvae*. Również hemolimfa robotnic uodpornionych sztucznie szczepionką sporządzoną z form wegetatywnych *Bac. larvae* z dodatkiem fenolu, aglutynuje drobnoustroje homologiczne do miana 1 : 1280 (9).

Owady wykazują duży stopień odporności na zakażenie drobnoustrojami patogennymi dla roślin i zwierząt. Większość owadów jest odporna na zakażenie *P. pestis*, *C. dyphtheriae* i *C. tetani* (18). Drobnoustroje te ulegają w organizmie owadów bardzo szybko bakteriolizie, fagocytozie lub inkapsulacji.

Odporność antybakteryjną u owadów uzyskuje się najczęściej po stosowaniu szczepionek zawierających drobnoustroje zabite (14, 19, 27). Za kryterium uzyskania odporności przyjmuje się niewrażliwość na ponowne zakażenie zjadliwym szczepem. Przyjmując to założenie, brak w hemolimfie owadów przeciwciał analogicznych do przeciwciał kręgowców nie świadczy o braku odporności (3). Briggs (3) stwierdził wzrost tolerancji larw *Bombyx mori* po uodpornieniu do hemocelu homologicznymi szczepionkami inaktywowanymi termicznie na zakażenie zjadliwymi szczepami *Ps. aeruginosa* i *Micr. pyogenes v. aureus*. Ten sam autor wykazał, że podczas uodporniania larw 18 gatunków motyli różnymi drobnoustrojami uzyskuje się względnie specyficzne zwiększenie tolerancji na zakażenie szczepami zjadliwymi.

Zwiększonej tolerancji na zakażenie towarzyszy wzrost poziomu ciepłostajłej substancji w hemolimfie działającej bakteriobójczo zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Substancja ta utrzymuje się w hemolimfie przez cały okres życia larw, nie ulega inaktywacji pod wpływem kwasów, zasad i pepsyny.

Wyczerpujące badania nad metodami izolowania i właściwościami czynników zawartych w hemolimfie uodpornionych owadów przeprowadzili Hink i Briggs (14, 15) na larwach *Galleria mellonella*. Stwierdzili oni, że u tych larw po uodpornieniu do hemocelu szczepionką z

Ps. aeruginosa pojawia się szybko odporność na ponowne zakażenie zjadliwym szczepem. Odporność ta osiąga maksymalny poziom po 24 godzinach po iniekcji antygeny.

W surowicy uodpornionych larw *Galleria mellonella* występują dwa czynniki (A i B) warunkujące właściwości bakteriobójcze i ochronne surowicy (26). Obydwa czynniki posiadają właściwości przeciwciał w tym sensie, że czynnik B występuje jedynie w hemolimfie owadów uodpornionych, zaś poziom czynnika A wzrasta po szczepieniu. Czynnik A o ciężarze cząsteczkowym około 7000 jest substancją niebiałkową i nie ulega inaktywacji w temp. 100°C przez 5 min. Czynnik A zawarty w hemolimfie owadów uodpornionych odgrywa istotną rolę w przenoszeniu odporności biernej.

Czynnik B posiada zbliżone właściwości do czynnika A z tym, że za jego pośrednictwem nie udaje się przenieść odporności biernej. Komórki wytwarzające czynnik A i B są rozmieszczone w całym ciele larwy *Galleria mellonella* i wykazują najwyższą aktywność w tylnym odcinku ciała larwy (14). Hink i Briggs (14) wykluczili udział hemocytów oraz układu nerwowego głowy i tułowia w powstawaniu odporności nabytej u larw *Galleria mellonella*.

Odporność antybakteryjna u larw *Galleria mellonella* pojawia się nie tylko po iniekcjach szczepionek, ale również po iniekcjach tuszu, wody i jałowego bulionu (16, 17, 30). Stopień odporności indukowanej przez czynniki nieswoiste jest jednak znacznie niższy niż odporności występującej po uodpornieniu drobnoustrojami.

Badania Stephens (24, 25) wykazały natomiast, że iniekcje jałowego bulionu, 0,85% NaCl lub albuminy jaja kurzego nie chronią larw *Galleria mellonella* przed zakażeniem zjadliwymi szczepami *Ps. aeruginosa*. Wydaje się więc, że czynniki A i B wykazują różny stopień swoistości *in vivo*, są bardziej aktywne w stosunku do drobnoustrojów homologicznych niż heterologicznych, przy czym ich względny poziom w hemolimfie zależy od rodzaju bodźca antygenowego.

Niebiałkowe substancje o działaniu bakteriobójczym stwierdzono również w hemolimfie *Oncopeltus fasciatus* (10).

Nieswoiste bakteriolizyny wykazano w hemolimfie larw *Galleria mellonella* po uodpornieniu *S. enteritidis* (29) i w hemolimfie gąsienic motyli (21). Swoiste bakteriolizyny dla *Ps. aeruginosa* wykazał Gingrich (10) w hemolimfie pluskwiaków. Dotychczas w hemolimfie owadów nie stwierdzono występowania precypityn (3, 15, 25).

Odporność bierną u owadów podobnie jak u kręgowców można przenieść za pośrednictwem hemolimfy owadów odpornych (28). Po 24 godz. po iniekcji hemolimfy pochodzącej od larw odpornych na *S. enteritidis* normalnym

larwom *Galleria mellonella* pojawia się u nich odporność na zakażenie letalną dawką homologicznych bakterii. Ten stan odporności biernej utrzymywał się przez okres 5 dni. Stephens (25) uzyskał odporność bierną u larw *Galleria mellonella* przeciwko *Ps. aeruginosa*. Śmiertelność larw po zakażeniu dawką letalną homologicznego drobnoustroju wynosiła po 2 godzinach po iniekcji hemolimfy owadów uodpornionych 60%, po 20 godz. 30%, zaś po 24 godz. jedynie 28% owadów uodpornionych.

Najwyższy stopień odporności biernej uzyskano po iniekcjach do hemocelu pełnej hemolimfy pobranej od owadów odpornych. Odporność bierną można uzyskać również w stosunku do wirusów. Aizawa (1) uzyskał za pośrednictwem hemolimfy pochodzącej od owadów chorych odporność u larw jedwabnika morwowego przeciwko poliedrozie. Odporność bierna cechuje się wyraźną swoistością w stosunku do drobnoustrojów homologicznych.

Swoistość odporności nabytej u owadów budzi nadal pewne kontrowersje. Zależy ona w dużym stopniu zarówno od gatunku owadów, jak i od rodzajów antygenów stosowanych do uodporniania. Wielkość dawki, stężenie antygeny w szczepionce, jak również stosowanie metody „booster” wywiera raczej niewielki wpływ na poziom odporności nabytej (25). Istnieją nawet doniesienia, że po powtórnym szczepieniu poziom odporności ulega obniżeniu. Wydaje się jednak, że ten spadek odporności nabytej wiąże się z dużymi ubytkami hemolimfy, które mają miejsce podczas powtórnym iniekcji antygeny.

U owadów nie wykazano reakcji na przeszczepy allogeniczne i niektóre przeszczepy ksenogeniczne (2, 7, 13, 23). Ten brak reakcji może być spowodowany albo niezdolnością rozpoznawania przeszczepu jako „not self” przez komórki biorecy, względnie brakiem mechanizmów analogicznych do mechanizmu odrzucania przeszczepów u kręgowców.

Wydaje się, że można doszukać się daleko posuniętych analogii między odpornością nabytą u owadów i odpornością interferencyjną u kręgowców. U owadów odporność nabyta pojawia się szybko, jej natężenie jest niewielkie, trwa krótko i nie jest ona związana z występowaniem przeciwciał.

Wykształcenie odporności u owadów posiada duże znaczenie praktyczne. W przypadku owadów pożytecznych uzyskanie linii odpornych na choroby oraz możliwość stymulowania odporności może przyczynić się do obniżenia strat w hodowli. U owadów szkodliwych natomiast, wystąpienie odporności na działanie mikroorganizmów lub ich metabolitów może przeszkadzać, a nawet zupełnie uniemożliwiać stosowanie metod zwalczania biologicznego. Pojawienie się odporności nabytej może zmienić

w sposób niekorzystny z punktu widzenia człowieka, przebieg naturalnych epizootii w populacjach owadów.

Piśmiennictwo

1. Aizawa K.: *Virus*, Osaka 4, 238, 1954.
2. Bodenstein D.: *J. exp. Zool.* 123, 189, 1953.
3. Briggs J. D.: *J. exp. Zool.* 138, 155, 1958.
4. Chadwick J. F.: *J. Invertebr. Pathol.* 17, 299, 1971.
5. Chadwick J. F., Vilik E. J.: *J. Invertebr. Pathol.* 13, 410, 1968.
6. Chorine V.: *Annls Inst. Pasteur*, Paryż 43, 955, 1929.
7. Gateff E., Schneiderman H. A.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31, 365, 1969.
8. Gary N. D., Nelson C. J., Munro J. A.: *J. Econ. Entomol.* 41, 668, 1948.
9. Gilliam M., Jeter W. I.: *J. Invertebr. Pathol.* 16, 69, 1970.
10. Gingrich R. E.: *J. Insect. Physiol.* 10, 179, 1964.
11. Glasser R. W.: *Psyche*, Cambridge 25, 39, 1918.
12. Glasser R. W.: *J. Immunol.* 10, 651, 1925.
13. Hadorn E.: *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31, 351, 1969.
14. Hink W. F., Briggs J. D.: *J. Invertebr. Pathol.* 13, 303, 1969.
15. Hink W. F., Briggs J.: *J. Insect Physiol.* 14, 1025, 1968.
16. Ishimori N.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 90, 843, 1924.
17. Ishimori N., Metalnikov S.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 178, 2136, 1924.
18. Metalnikov S.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 179, 524, 1924.
19. Mohring W., Messner B.: *Sond. Biol. Zbl.* 87, 439, 1968.
20. Paillet A.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 83, 278, 1920.
21. Paillet A.: *C. r. Acad. Sci. Paryż*, 171, 757, 1920.
22. Paillet A.: *Ann. Epiphyt.* 8, 95, 1924.
23. Sáhota T. S., Edwards J. S.: *J. Insect. Physiol.* 15, 1367, 1969.
24. Stephens J. M.: *Can. J. Zool.* 3, 30, 1952.
25. Stephens J. M.: *Can. J. Microbiol.* 5, 203, 1959.
26. Stephens J. M.: *Can. J. Microbiol.* 8, 491, 1962.
27. Toumanoff K.: *C. r. Acad. Sci. Paryż*, 185, 1078, 1927.
28. Zernoff V.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 97, 1967, 1927.
29. Zernoff V.: *Annls. Inst. Pasteur*, Paryż, 46, 565, 1031.
30. Zernoff V.: *C. r. Soc. Biol. Paryż*, 11, 304, 1934.

Adres autora: dr hab. Zdzisław Gliński, Lublin, Akademia

WITOLD GOLNIK

Izolacja szczepów wirusa CELO (Chick-Embryo-Lethal-Orphan*)

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii AR w Warszawie

Adenowirusy ptaków reprezentowane są głównie przez wirusa CELO (Chick-Embryo-Lethal-Orphan) oraz wirus GAL (Gallus adenolike), które mimo wielu cech wspólnych z pozostałymi przedstawicielami grupy różnią się brakiem wspólnego z nimi antygenu grupowo-swoistego.

Wirus CELO ma kształt dwudziestościanu o kapsydzie składającym się z 252 kapsomerów, zawierającym kwas dezoksyrybonukleinowy. Replikacja wirusa zachodzi w jądrze komórkowym; średnica wirionu wynosi 70 milimikronów (8, 10). Wirus CELO był izolowany po raz pierwszy z zarodków kury zakażanych zawiesinami tkankowymi (19), dalsze jego szczepy wyosobniono z przewodów pokarmowego i układu oddechowego kurcząt (9, 11, 17). Jeden ze szczepów został wyizolowany z hodowli komórek nerki zarodka kury, w których pasażowany był wirus zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy kur (5). Wyosobnienie wirusa CELO z rozwijających się zarodków kury (6) oraz tkanek pochodzenia zarodkowego (2, 5) wskazuje, że jedną z dróg rozprzestrzeniania się zakażeń tym wirusem mogą być infekcje endogenne jaj.

Szczepy wirusa CELO wywołują zmiany cytopatyczne w jednowarstwowych hodowlach komórki nerki zarodka kury, czemu towarzyszy powstawanie ciałek wtępowych typu B (Cowdry) (5, 15). Wirus CELO jest patogenny dla rozwijających się zarodków kury, wywołując zaburzenia rozwojowe i śmierć embrionów między 3 a 11 dniem po zakażeniu (19). Infekcje wirusem CELO są szeroko rozpowszechnione w dużych stadach kur, ponadto stwierdzono je u przepiórek japońskich i bażantów (1, 4, 7, 18). Sarma i wsp. (16) donieśli o wywoływaniu guzów nowotworowych u chomików po podskórnym wprowadzeniu wirusa

CELO oseskom. Obecności wirusa w guzach nie udało się wykazać.

Celem badań były próby wyosobnienia szczepów wirusa CELO oraz ich identyfikacja serologiczna.

Materiał i metody

Materiał do izolacji wirusa. Próbkę kału pobrano od 86 kurcząt w wieku od 10–12 tygodni życia, klinicznie zdrowych, pochodzących z 5 różnych stad. Wymazów ze steku dokonywano wacikami, które przenoszono do probówek zawierających płyn Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy i antybiotyków. W celu uwolnienia wirusa z materiału, próby wstrząsano, zamrażano w temp. -20°C i rozmrażano w temp. 37°C , powtarzając zabieg trzykrotnie. Po ostatnim rozmrożeniu zawiesinę kałową wirowano przy 6000 obr./min. przez 30 min. Supernatant otrzymany w wyniku wirowania poddano działaniu chloroformu.

Śluz tchawicy pawia pobrano od ptaka, który padł na kilka godzin przed przesłaniem go do badania. Wyścięk tchawicy umieszczono w probówce zawierającej płyn Hanksa i postępowano z nim dalej jak w przypadku prób kałowych.

Zarodki kury zamarłe w okresie inkubacji. Przebadano 400 jaj zawierających zarodki zamarłe między 9 a 18 dniem inkubacji. Z embrionów nie wykazujących zmian gnilnych pobrano 40 prób płynu owodniowo-omocznioowego i poddano je działaniu chloroformu.

Płyn owodniowo-omocznioowy zarodków kury z namrożonym szczepem LaSota wirusa choroby Newcastle pochodził z prób zbiorczych poszczególnych serii produkcyjnych szczepionki L przeciw pomorowi rzekomemu ptaków. Próby te nie były liofilizowane. Przebadano 26 prób oznaczonych numerami od 33 do 58. Powyższy materiał poddano działaniu chloroformu.

Hodowle jednowarstwowe komórek nerki zarodka kury przygotowano wg metody Buthal i Mathews (3). Źródło tkanki nerkowej stanowiły 16–18-dniowe zarodki kury, pochodzące z jaj kur wolnych od zakażeń wirusem CELO. Rozdrobnioną tkankę nerkową

*) Cz. I. pracy doktorskiej: Izolacja i identyfikacja krajowych szczepów wirusa CELO (Chick-Embryo-Lethal-Orphan), SGGW, Warszawa 1969.