

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin  
e-mail: krzysztof.buczek@up.lublin.pl

KRZYSZTOF BUCZEK, MARIUSZ CHEŁMIŃSKI

### **Immunosupresja w zakażeniach bakteryjnych i pasożytniczych pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.)**

Immunosuppression in bacterial infections and parasitic invasions  
of the honey bee (*Apis mellifera* L.)

**Streszczenie.** Skutkiem zaburzenia prawidłowych czynności układu immunologicznego pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.), będącego następstwem immunosupresji są zmiany funkcjonalne i narządowe o różnym nasileniu, często kończące się śmiercią. Infekcje wirusowe i bakteryjne, inwazje pasożytnicze, toksyny grzybicze są silnymi immunosupresorami, których działanie jest skierowane na różne składowe układu immunologicznego owada. Wirusy hamują odczyny komórkowe i humoralne, proteiny *Paenibacillus larvae* obniżają aktywności przeciwbakteryjną hemolimfy typu apidocyn i uszkodzają hemocyty. Aflatoksyny *Aspergillus* zaburzają mechanizmy obronne barier anatomiczno-fizjologicznych i hemocytarne odczyny obronne. Uszkodzający wpływ *Varroa destructor* na układ odpornościowy pszczoły dotyczy poziomu komórkowego i subkomórkowego.

**Słowa kluczowe:** pszczoła miodna, immunosupresja, wirusy, bakterie, grzyby, pasożyty

#### WSTĘP

Układ odpornościowy owadów jest narządem docelowego działania wielu czynników. Układ ten w dużym stopniu skutecznie chroni owada przed infekcjami i inwazjami pasożytów. Jego działanie regulują precyzyjne mechanizmy autoregulacyjne nadzorowane przez układ nerwowy i endokrylny [Gliński i Kostro 2001]. Najważniejszą rolą tych mechanizmów jest utrzymanie homeostazy w obrębie układu odpornościowego pobudzanego przez różnorodne czynniki zakaźne, w mniejszym zakresie przez występujące w środowisku czynniki działające modulująco [Stark i Gliński 1996]. Zaburzenie homeostazy układu odpornościowego jest przyczyną różnorodnych dysfunkcji i zmian patologicznych o różnym nasileniu. Często są one przyczyną śmierci owada.

Immunosupresja, definiowana jako stan osłabionej lub zahamowanej odpowiedzi immunologicznej, może być następstwem działania czynników fizycznych, środków chemicznych, biologicznych, infekcji niektórymi mikroorganizmami lub inwazjami pasożytniczymi. Jedne czynniki cechują się wysoką swoistością działania, ponieważ jest ono ukierunkowane na określone populacje komórek układu immunologicznego, inne wykazują działanie wielokierunkowe, ponieważ wpływają na wiele składowych układu immunologicznego. Mechanizmy działania wielu czynników modulujących układ odpornościowy nadal nie są w pełni poznane [Thompson i Forster 1994].

#### WIRUSY

Wirusy dysponują mechanizmami, które umożliwiają hamowanie komórkowych odczynów obronnych, takich jak fagocytoza, otoczkowanie (enkapsulacja) i tworzenie guzków, oraz zaburzają mechanizmy odpowiedzi humoralnej. Tylko niewielka ilość wirusów o małej zjadliwości jest fagocytowana. W zakażeniach większymi dawkami lub zjadliwymi wirusami replikują się one w fagocytach owadów, powodując ich destrukcję. Dobrze poznano działanie immunosupresyjne wirusów z rodziny Polydnviridae, pozostających w ścisłych związkach z endopasożytniczymi owadami z rodziny Braconidae i Ichneumenidae. Jaja i larwy błonkówek owadziarek i gąsieniczników pasożytujące w organizmie gąsienic motyli nie są enkapsulowane. Wymykają się spod kontroli immunologicznej owada, w którym odbywają rozwój. Ten brak otoczkowania jest spowodowany immunosupresyjnym działaniem wirusów z rodziny Polydnviridae. Można przypuszczać, że polydnawirusy nie tylko uszkadzają bezpośrednio hemocyty, ale upośledzają funkcje znanych modulatorów odporności owada, takich jak lektyny, eikozanoidy, ektopaminy i hemokiny. Brak jednak dowodów na hamujący wpływ polydnawirusów na poziom lizozymu hemolimfy i syntezę indukowalnych białek odpornościowych w organizmie larw owadów porażonych przez endopasożytnicze Hymenoptera [Gliński i Jarosz 1997].

#### BAKTERIE

Proteinazy produkowane przez postać wegetatywną *Paenibacillus larvae larvae* (*Bacillus larvae*), obligatoryjnego patogenu pszczoły miodnej, selektywnie degradują apidycyny, czego skutkiem jest zahamowanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy typu apidycyn. Ponadto uszkadzają one hemocyty. W ten sposób *Paenibacillus larvae* unika kontroli układu immunologicznego, co sprzyja rozwojowi posocznicy w zakażonym czerwiu [Jarosz i Gliński 1990, 1991]. Działanie proteinazy *Paenibacillus larvae* jest bardzo zbliżone do działania inhibitora immunologicznego typu A *Bacillus thuringiensis* (InA).

Można przypuszczać, że enzymy proteolityczne produkowane przez bakterie powodujące posocznice u owadów są ukierunkowane na hemocytarne odczyny obronne i na odpowiedź humoralną, degradując białka odpornościowe hemolimfy.

#### GRZYBY

Toksyny grzybów przez hamowanie odczynów immunologicznych działają jako silne immunosupresory. Aflatoksyny wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* nie

tylko uszkodzają ośrodkowy układ nerwowy pszczoły, ale zaburzają mechanizmy obronne przez bezpośredni wpływ na bariery anatomiczno-fizjologiczne i hemocyty, a także wpływają pośrednio na układ odpornościowy przez wywoływanie zaburzeń systemu endokrynnego owada. Stąd też zejście zakażenia grzybiczego zależy nie tylko od genetycznego potencjału patogenu, który warunkuje szybki wzrost oraz wykorzystanie składników odżywczych zakażonego owada, produkcję enzymów niszczących bariery anatomiczne organizmu, ale zależy również od zdolności patogenu do unikania lub osłabiania mechanizmów odporności przeciwgrzybiczej [Gliński i in. 2001].

Toksyny grzybicze działają destrukcyjnie na dynamikę i efektywność komórkowych odczynów obronnych owada przez wpływ na hemocyty, komórki immunologicznie kompetentne. Toksyczne gatunki grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* produkują toksyny porażające układ obronny, które nie zawsze powodują padanie owadów. Ułatwiają one natomiast rozwój posocznicy bakteryjnych. Aflatoksyna wytwarzana przez *Aspergillus flavus* bezpośrednio działa na ośrodkowy układ nerwowy pszczoły miodnej, a za jego pośrednictwem przez układ hormonalny na odporność.

Toksyczne peptydy wytwarzane przez *Beauveria bassiana* podczas porażenia *Spodoptera exigua* powodują stopniową utratę zdolności fagocytowania przez hemocyty i zmieniają jakościowy i ilościowy obraz hemocytarny. Dzięki temu działaniu rozwijające się mycelium grzyba jest tolerowane przez organizm *Spodoptera* [Hung i in. 1993].

Najsilniejsze działanie na hemocyty i komórki immunologicznie kompetentne wywiera destrukcyjna E *Metarrhizium anisopliae* (DTXE). Dawka LC<sub>50</sub> tej toksyny wywołuje zmiany ultrastrukturalne w plazmatocytach i ziarnistych granulocytach larw *Galleria mellonella*. Granulocyty odgrywają zasadniczą rolę w rozpoznaniu *self* od *non-self*. Porażenie ich aktywności ułatwia kolonizację organizmu owada przez mycelium grzyba. Działanie immunomodulacyjne toksyny jest skutkiem zaburzenia pod wpływem DTXE przemian wapnia w hemocytach. Toksyna powoduje też zaburzenie w tworzeniu otoczek. Toksyna DTXE wykazuje działanie immunosupresyjne już w stężeniu 0,8 µg/g masy ciała owada, a więc w takim, które nie wywołuje paraliżu ciała owada [Vey i in. 2002].

#### INWAZJE PASOŻYTNICZE

Mechanizmy patogennego działania pasożytów pszczoły miodnej są wielokierunkowe i złożone. Można jednak zaobserwować wśród nich ukierunkowane działanie na składowe odporności owada. *Nosema apis*, oprócz działania bezpośredniego na komórki nabłonka jelita środkowego imago pszczoły miodnej, gdzie pasożyt odbywa swój cykl rozwojowy [de Graaf i in. 1994], hamuje rozwój ciała tłuszczowego robotnic pszczoły miodnej – głównego miejsca syntezy białek odpornościowych owada [Fries 1988]. Uszkodzenie nabłonka jelitowego przez *Nosema apis* łącznie ze spadkiem tempa syntezy białek w ciele tłuszczowym porażonego przez pasożyta owada, a tym samym spadek poziomu białek w hemolimfie usposabia do rozwoju wtórnych zakażeń bakteryjnych i inwazji *Malpighamoeba mellificae* [Bailey 1968, Fries 1988].

Uszkodzający wpływ *Varroa destructor* na układ odpornościowy pszczoły dotyczy poziomu komórkowego i subkomórkowego [Sammataro 1997]. Inwazja hamuje ekspresję genów kodujących białka odpornościowe i enzymy zaangażowane w procesach od-

pornościowych, czego skutkiem jest zahamowanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej [Yang i Cox-Foster 2005]. Podczas inwazji *Varroa destructor* zachodzą zmiany w objętości krwi, stężeniu i frakcjach białek oraz aktywności enzymów hemolimfy, w nasileniu odpowiedzi hemocytarnej i humoralnej. Inwazja pasożyta odpowiada więc zarówno za obniżenie poziomu białek hemolimfy, jak i za spadek aktywności bakteriologicznej lizozymu aż do jej całkowitego zaniku, a także za obniżenie aktywności fagocytarnej [Gliński i Jarosz 1988]. Zmiany te narastają kaskadowo wraz z postępem inwazji i usposabiają do rozwoju posocznicy bakteryjnych, zakażeń wirusowych i grzybic, co prowadzi do masowego padania pszczół w rodzinach porażonych przez *Varroa destructor*.

W hemolimfie robotnic porażonych *Varroa destructor* obniża się aktywność zarówno aminotransferazy asparaginianowej, jak i aminotransferazy alaninowej. Ten spadek jest związany z hamującym wpływem pasożyta na syntezę tych enzymów w komórkach czerwca i pszczół. Zaobserwowane zaburzenia w poziomie białka całkowitego i aktywności enzymatycznej mają charakter przejściowy. Ustępują bowiem po pozbyciu się pasożyta i po rozpoczęciu samodzielnego pobierania pokarmu przez pszczoły [Sokół 1995]. Inwazja pasożyta obniża też znacznie aktywność oksydazy fenolowej, dehydrogenazy glukozy, oksydazy glukozy w hemolimfie pszczół. Te enzymy są związane z odpornością owadów [Yang i Cox-Foster 2005].

W następstwie pasożytowania *Varroa destructor* rozwija się ciąg zdarzeń, w wyniku którego dochodzi do utraty dużej ilości hemolimfy, obniżenia poziomu białek hemolimfy, zaburzenie syntezy „białek odpornościowych” w ciele tłuszczowym [Gliński i Jarosz 1988]. Okazało się, że pasożytowanie 1–3 roztoczy na poczwarcie robotnicy powoduje spadek objętość hemolimfy o około 24%, a 4–6 roztoczy spadek o około 40%. U poczwarek trutni porażonych przez roztocza te wartości wynoszą odpowiednio 18,9 i 21,9% [Weinberg i Madel 1985]. Poziom białek w hemolimfie poczwarek porażonych przez 1–3 pasożyty obniża się o około 27%, a przy porażeniu przez 4–6 pasożytów o około 50%. W hemolimfie czerwca silnie porażonego przez *Varroa destructor* aktywność bakteriologiczna typu lizozymu silnie spada, a w przypadku masowej inwazji nawet całkowicie zanika [Gliński i Jarosz 1988].

Zjawisko przesunięcia obrazu hemocytarne w kierunku zwiększenia odsetkowego składu niektórych typów hemocytów występuje u robotnic pszczoły miodnej w przebiegu naturalnego i eksperymentalnego zakażenia *Varroa destructor*. U robotnic zarażonych na drodze naturalnej średni odsetek neutrofilów wzrastał z  $9,9 \pm 2,8$  do  $17,4 \pm 1,0$ . Temu wzrostowi towarzyszył równoczesny wzrost eozynofilów (z  $28,1 \pm 6,5$  do  $31,04 \pm 0,4$ ) i plazmatocytów (z  $16,4 \pm 5,4$  do  $17,8 \pm 4,4$ ). Znamienne różnice w składzie odsetkowym eozynofilów, neutrofilów, leukocytów normalnych i hialinocytów występują po 24-godzinnej ekspozycji robotnic na *Varroa destructor* (*V. jacobsoni*) [Gliński i Jarosz 1988, 1988a].

Oslabienie, a w krańcowych przypadkach całkowite zahamowanie odpowiedzi immunologicznej ma duże znaczenie praktyczne, ponieważ usposabia do chorób wywołanych przez drobnoustroje oportunistyczne oraz indukuje latentne zakażenia wirusowe. Dysfunkcja układu immunologicznego umożliwia saprofitom, występującym obficie w niszach ekologicznych zasiedlanych przez owady, przełamanie działania ochronnego i rozwój zakażenia, kończącego się z reguły padaniem owada [Ball 1985].

Następstwem osłabienia humoralnych i komórkowych odczynów obronnych pszczoły przez żerujące roztocze *Varroa destructor* jest indukcja latentnych zakażeń wirusowych [Ball 1985], rozwój posocznicy bakteryjnych i grzybic [Kauko i Gliński 1994], a także rozwój zakażeń wywołanych przez drobnoustroje, których wektorem jest pasażujące roztocze [Gliński i Jarosz 1992].

#### PIŚMIENNICTWO

- Bailey L. 1968. The measurement and interrelationships with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honey bee populations. *J. Invert. Pathol.* 12, 175.
- Ball B. V. 1985. Acute paralysis virus isolated from honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J. Apicult. Res.* 24, 115.
- De Graaf D. C., Raes H., Saabe G., de Rycke P. H., Jacobs F. J. 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.* 63, 74.
- Fries I. 1988. Contribution to the study of *Nosema disease* (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Swedish Univ. Agricult. Sci. Rep.* 166, 1988.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda M. 2001. Immunostymulacja i immunosupresja a występowanie i przebieg grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. *Mat. XXXVIII Naukowej Konferencji Pszczelarskiej, Puławy 2001*, 29–30.
- Gliński Z., Jarosz J. 1988. Deleterious effects of *Varroa jacobsoni* on the honey bee. *Apiacta* 23, 42.
- Gliński Z., Jarosz J. 1988a. *Varroa jacobsoni* invasion and the level of cell-free immunity in upright larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Folia Vet. (Košice)* 32, 39.
- Gliński Z., Jarosz J. 1992. *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* 23, 25.
- Gliński Z., Jarosz J. 1997. Polydnawiruses of hymenopteran endoparasitoids knock out the host immune response. *Folia Biologica* 44, 87.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.* 26, 43.
- Hung S.Y., Boucias D.G., Vey A.J. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. *J. Invert. Pathol.* 61, 179.
- Jarosz J., Gliński Z. 1990. Selective inhibition of cecropin-like activity of insect immune blood by protease from American foulbrood scales. *J. Invert. Pathol.* 56, 143.
- Jarosz J., Gliński Z. 1991. More on pathogenesis of American foulbrood of the honey bee. *Apiacta* 26, 8.
- Kauko L., Gliński Z. 1994. Hafnia alvei-bakterin aiheutamma septikemia mehilaisissa. *Suomen Finsk Veterinartidskrift* 5, 314.
- Sammataro D. 1997. Report on parasitic honey bee mites and disease associations. *Am. Bee J.* 137, 301.
- Sokół R. 1995. Wybrane wskaźniki biochemiczne hemolimfy w przebiegu inwazji *Varroa jacobsoni* u pszczół. *Rozprawa dokt. ARiT, Olsztyn*.
- Stark J.A., Gliński Z. 1996. Defense strategies of the honeybee (*Apis mellifera* L.) against hostile organisms. *Apiacta* 31, 6.
- SummarVey A., Matha V., Dumas C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficacy of the multicellular immune reactions. *J. Invert. Pathol.* 80, 177.
- Thompson A. W., Forrester J. V. 1994. Therapeutic advances in immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 351.

- Weinberg K. P., Madel G. 1985. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. On the protein concentration and the haemolymph volume of the blood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 16, 421.
- Yang X., Cox-Foster D.L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral infection. *PNAS* 102, 74709.

**Summary.** Functional disorders and pathological lesions of different intensities, and eventually causing death, are the result of dysfunctions of the immunological system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Viral and bacterial infections, parasitic invasions and fungal toxins are potent suppressants of various parts of the immune system. Viruses destroy cellular and cell-free immune responses. Proteinases of *Paenibacillus larvae* decrease the antibacterial activity of haemolymph humoral factors of the apidaecine type. Aflatoxins of *Aspergillus* sp. destroy the anatomical and physiological barriers of the honey bee haemocoel and haemocytic responses. Deleterious effects of *Varroa destructor* are realized on cellular and subcellular levels of the immune system.

**Key words:** honey bee, immunosuppression, viruses, bacteria, fungi, parasites