

Wpływ szczepienia cieląt rekombinowaną proteazą cysteinywą *Fasciola hepatica* na rozwój i inwazyjność miracydiów*

Influence of vaccination of calves with recombinant cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* on development and infectivity of miracidia

Martyna Dąbrowska¹, Marcin Kaliniak² i Halina Wędrychowicz^{1,2}

¹Zakład Parazytologii i Inwazyjologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

²Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Adres do korespondencji: Halina Wędrychowicz, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa; E-mail: halinwe@twarda.pan.pl

ABSTRACT. The aim of the study was to evaluate an influence of vaccination of the final host on *F. hepatica* development in intermediate hosts. Fluke eggs were isolated from the biliary tracts of calves vaccinated orally with recombinant cysteine proteinase of *F. hepatica* after the challenge infection and from control calves which received the infection only. To assess the effect of the vaccine on egg "hatch rate" the eggs were transferred to the Petri dishes with distilled water and incubated at 25°C for 16–19 days. They were subsequently exposed to light for about 2 h, at a temperature of 27 ± 1°C, to stimulate sprouting of the miracidia and assess the egg hatchability. In order to evaluate infectivity and pathogenicity of the miracidia, single miracidium infections of *Lymnea truncatula* by *F. hepatica* were carried out under laboratory conditions using 4-mm-high snails. The prevalence of snail infections with *F. hepatica* was calculated using the ratio between the number of cercariae-shedding snails in each group and that of surviving snails. It appeared that the eggs isolated from immunized calves demonstrated significantly lower hatchability than the eggs isolated from non-vaccinated control hosts. Also, the proportion of infected snails as well as their mortality were lower after exposition to miracidia originating from vaccinated calves. It is suggested that effectors of the immune response in vaccinated calves inhibited in part biological activity of cysteine proteinases of the fluke which are known to be involved in egg shell formation, penetration of host's tissues and worm feeding.

Key words: *Fasciola hepatica*, miracidia, vaccination.

Epidemiologia fascjolozy związana jest nie tylko z lokalnym występowaniem żywicieli pośrednich — ślimaków słodkowodnych z rodziny *Lymnaeidae*, z których błotniarka moczarowa (*Galba truncatula*) uznawana jest za głównego żywiciela pośredniego motylicy wątrobowej, ale również od jakości jaj przywry wydalanych do środowiska przez żywicieli ostatecznych.

Zaobserwowano, że gatunek żywiciela ostatecznego może odgrywać istotną rolę w rozwoju larwalnym *F. hepatica* w żywicielu pośrednim przez ograniczenie lub wzrost liczby redii i powstających

w nich cercarii. Vignoles i wsp. [1] stwierdzili znacznie wyższą liczbę rozwijających się cercarii w ślimakach zarażonych miracydiami pochodzącymi z jaj izolowanych z wątrób nutrii niż zanotowaną po zarażeniu miracydiami wyklutymi z jaj *F. hepatica* pasożytujących u bydła czy owiec. Również wskaźnik przeżywalności żywicieli pośrednich zarażonych tymi miracydiami był znacznie wyższy niż w pozostałych grupach żywicieli ostatecznych.

Jaja *F. hepatica* wyizolowane z bydła lub owiec są bardziej żywotne, a więc bardziej skuteczne w transmisji pasożyta niż jaja izolowane z wątrób

króliczych. Ekstensywność zarażenia oraz liczba rozwijających się w żywicielach pośrednich cercarii były znacznie wyższe w zarażeniu miracydiami z jaj motylic pochodzących od bydła i owiec w porównaniu z wyizolowanymi od królików. Według Ronde-lauda i Dreyfussa [2] powiązane jest to z osłabionym wzrostem dorosłych pasożytów w ciele królika, ograniczeniem płodności i żywotności jaj. Ma to swoje konsekwencje wyrażające się niskim (30%) wskaźnikiem wylęgania miracydów z jaj, jak również redukcją ekstensywności zarażenia oraz liczby cercarii *F. hepatica*.

Ponadto, wyniki niektórych badań sugerują, że na potencjał rozwojowy jaj *F. hepatica* wpływać może status immunologiczny żywiciela ostatecznego, a w szczególności stopień odporności na inwazję tej przywry [3, 4]. W prezentowanych doświadczeniach badano wpływ doustnego szczepienia cieląt liofilizowaną transgeniczną sałatą z ekspresją proteazy cysteinowej *F. hepatica* na liczbę i potencjał rozwojowy jaj przywr zasiedlających wątroby szczepionych zwierząt.

Materiały i metody

Hodowla ślimaków

Galba truncatula pochodziły z hodowli laboratoryjnej z Zakładu Parazytologii i Inwazjologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Ślimaki były hodowane na szklanych płytkach Petriego Ø 10 cm (sterylizowanych w temp. 200°C). Do ich hodowli i pielęgnacji stosowano przegotowaną wodę wodociągową. Po przegotowaniu woda była napowietrzana. Ślimaki karmiono glonami [5] z rodzaju *Oscillatoria* co drugi dzień. Hodowlę prowadzono w stałej temperaturze i fotoperiodzie zależnym od pory roku.

Glony z rodzaju *Oscillatoria* hodowano na płytkach Petriego (szklanych) Ø 10 cm sterylizowanych w temperaturze 200°C. Podłoże do hodowli stanowił il rzeczny wyprażony w temperaturze 200°C. Mieszaniną ilu rzeczno i wody o gęstości ciasta drożdżowego pokrywano dno szalki i наносono kilka fragmentów „murawy glonowej”. Szalki z „nasadzeniem” umieszczono pod świetlówkami FLUORA OSRAM L36W/77 i hodowano przy stałym oświetleniu co najmniej 48 godzin.

Otrzymywanie miracydów

Jaja motylic wyizolowano z pęcherzyków żółciowych cieląt immunizowanych i kontrolnych w 14 tygodniu po zarażeniu dawką 400 mc/zwierzę.

Wyizolowane jaja, po odpłukaniu pozostałości żółci, umieszczono w wodzie hodowlanej w zacienionym naczynku, w temperaturze 25°C. Po upływie 16–19 dni [6] naczynko z jajami umieszczono w lodówce w temperaturze 4°C na 25–30 minut w celu stymulacji klucia miracydów, a następnie wystawiono na światło. Badania wskaźnika wylęgania miracydów przeprowadzono na 16 próbach po 50 jaj. W każdej z prób określono odsetek wyklu-tych jaj.

Zarażenie ślimaków

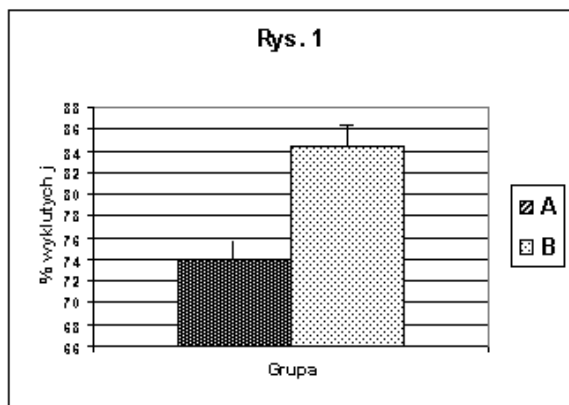
Na 16–19 dni przed planowanym zarażeniem odpowiednią liczbę jaj przenoszono do naczynia z wodą wodociągową i umieszczono w ciemności, w cieplarni w temperaturze 25°C. W dniu zarażenia naczynie z jajami wstawiono na 25–30 minut do 4°C, a następnie ustawiono w pobliżu źródła światła. Po kilku minutach z jaj wylęgały się ruchliwe postaci larwalne motylicy. Przy pomocy pipetki pasteurowskiej wyławiano odpowiednią liczbę miracydów i przenoszono do dołków o pojemności 3 ml w płytkach polipropylenowych. W dołkach umieszczano pojedyncze ślimaki o wysokości muszli 4 mm oraz 2 miracydia. Po upływie 24 godz. ślimaki przenoszono na płytki Petriego z glonami. Łącznie zarażono 100 ślimaków; 5 grup po 10 osobników zarażono miracydiami wyhodowanymi z jaj pochodzących od cieląt immunizowanych proteinazą cysteinową, a kolejne 5 grup zarażono miracydiami wyhodowanymi z jaj pochodzących od cieląt kontrolnych.

Określanie stopnia zarażenia ślimaków

Zarażenie ślimaków stwierdzono wykonując ich sekcję po 80 dniach od ekspozycji na miracydia. Ślimaki padłe podczas doświadczeń analizowano na bieżąco. Zbierano również i liczono metacerkarie powstałe z cercarii, które opuściły żywiciela przed dniem sekcji. Podczas sekcji — po rozkruszeniu muszli cercarie wydostawały się do szalki. Rozpreparowane ślimaki oraz wydostające się z nich cercarie przenoszono do probówek z wodą o pojemności 10 ml. Cercarie liczono pod mikroskopem w komorze McMastera. Wyliczano średnią z czterech powtórzeń.

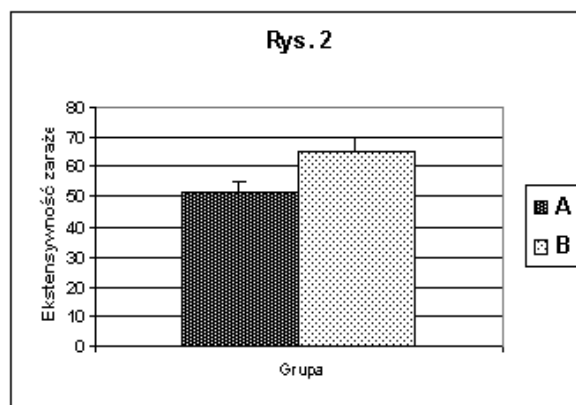
Wyniki

Odsetek jaj zdolnych do rozwoju do postaci miracydium, izolowanych z motylic wątrobowych pochodzących od żywicieli ostatecznych (cielęta) uodpornionych rekombinowaną proteazą cysteinową

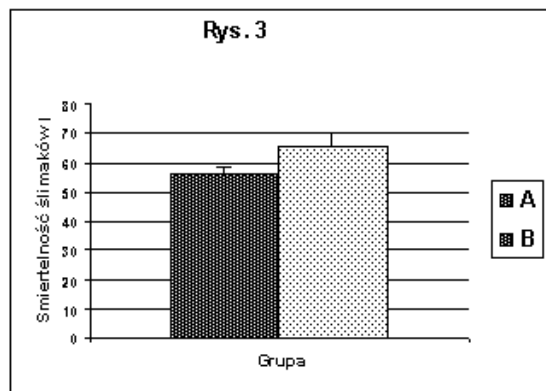


Rys. 1. Odsetek jaj *F. hepatica* rozwijających się w miracydia. A — jaja izolowane po zarażeniu „challenge” z żółci cieląt szczepionych rekombinowaną proteazą cysteinową motylicy, B — jaja uzyskane z żółci cieląt kontrolnych

Fig. 1. Percentage of miracidia hatched from eggs of *F. hepatica* isolated after challenge infection from vaccinated (A) and control (B) calves

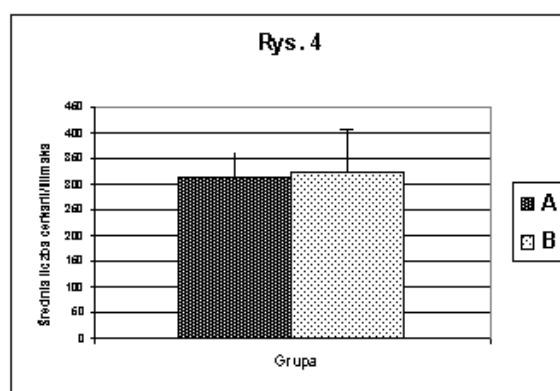


Rys. 2. Ekstensywność zarażenia ślimaków eksponowanych na miracydia wyklute z jaj *F. hepatica* izolowanych z żółci cieląt szczepionych (A) i kontrolnych (B).
Fig. 2. Prevalence of *F. hepatica* infection in snails exposed to miracidia originating from vaccinated (A) and control (B) calves



Rys. 3. Śmiertelność ślimaków eksponowanych na miracydia wyklute z jaj *F. hepatica* izolowanych z żółci cieląt szczepionych (A) i kontrolnych (B).

Fig. 3. Mortality of snails infected with miracidia which developed from *F. hepatica* eggs isolated from vaccinated (A) and control (B) calves).



Rys. 4. Średnia liczba cercarii uzyskanych ze ślimaków zarażonych miracydiami wyklutymi z jaj *F. hepatica* izolowanych z żółci cieląt szczepionych (A) i kontrolnych (B).

Fig. 4. The mean number of cercariae which developed in snails infected with miracidia originating from vaccinated (A) and control (B) calves

przeciwno inwazji *F. hepatica* i cieląt kontrolnych przedstawia Rys. 1.

Wskaźnik wylęgania miracydiów pochodzących z jaj izolowanych z motylic grupy immunizowanej wykazuje niższą średnią wartość (74,4%) w stosunku do kontroli (81,6%). Analiza statystyczna potwierdziła istotność tej różnicy ($p < 0,05$).

Średnia ekstensywność zarażenia ślimaków eksponowanych na miracydia (Rys. 2) grupy immunizowanej prezentuje niższą wartość (52%) w stosunku do kontroli (60%). Również analiza statystyczna

potwierdza wpływ immunizacji na zarażenie *Galba truncatula* ($p < 0,05$).

Średni wskaźnik śmiertelności (Rys. 3) był istotnie ($p < 0,05$) niższy wśród ślimaków zarażonych miracydiami grupy immunizowanej (56%) w porównaniu do kontroli (65%).

Wpływ statusu immunologicznego żywicieli ostatecznych na rozwój cercarii w *Galba truncatula* przedstawia Rys. 4. Średnia liczba cercarii rozwijających się w ślimakach eksponowanych na miracydia pochodzące z jaj motylic wyizolowanych z wą-

trób immunizowanego bydła (316) nie różniła się znacząco od kontroli (370).

Dyskusja

Ślimaki zarażano dawką dwóch miracydiów gdyż warunkuje ona wysoki współczynnik zarażenia. Zaobserwowano, że przy ekspozycji na dwa miracydia 85% *G. truncatula* ulega zarażeniu [7].

Przeprowadzone badania wykazały, że immunizacja bydła rekombinowaną proteazą cysteinową *F. hepatica* powoduje, że przywry osiągające dojrzałość płciową składają jaja o obniżonym potencjale rozwojowym lub też jaja są uszkodzane w trakcie przebywania w żółci uodpornionych cieląt. Świadczy o tym obniżenie wskaźnika wylęgania miracydiów z jaj motylicy wątrobowej w stosunku do kontroli.

Wcześniejsze badania wykazały, że w żółci immunizowanych przeciwko inwazjom robaków pasożytniczych, jak również naturalnie zarażonych przeżuwaczy, obecne są swoiste przeciwciała [8–10]. Sugeruje się, że za uszkodzenia jaj odpowiedzialne są wytworzone w wyniku immunizacji przeciwciała swoiste dla antygenów szczepionkowych [4]. Można przypuszczać, że za osłabienie zdolności rozwojowych jaj, jak również słabszą inwazyjność i patogenność miracydiów wobec żywicieli pośrednich, obserwowane w trakcie naszych badań, mogą być odpowiedzialne obecne w żółci przeciwciała przeciwko proteazie cysteinowej *F. hepatica*. Proteazy cysteinowe pełnią wiele istotnych funkcji w fizjologii *F. hepatica*. Enzymy te biorą udział w rozkładaniu tkanek żywiciela podczas wędrówki, odżywianiu się pasożyta, walce z odpowiedzią immunologiczną, a także prawdopodobnie w tworzeniu osłonek jaj [11]. W przebiegu cyklu życiowego *F. hepatica* stwierdzono występowanie wielu proteinaz wewnątrzkomórkowych bądź wydzielanych. Dotychczas scharakteryzowano proteinyzyny cysteinowe z grup katepsyn L (podgrupy L1 i L2) i katepsyn B, a także proteinazę serynową, asparaginową i metaloproteinazę [11]. W zastosowanej w prezentowanych badaniach szczepionce, antygen stanowiła jedna z wydzielniczych proteinaz *F. hepatica* zaliczanych do katepsyn L1. Zablockowanie lub osłabienie działania tej proteinyzyny mogło doprowadzić do upośledzenia rozwoju jaj przywry a także upośledzenia zdolności penetracji tkanek ślimaka przez miracydium. W grupie immunizowanej średnia ekstensywność zarażenia (52%) oraz śmiertelność (56%) *G. truncatula* były niższe niż w kontroli, nie stwierdzo-

no natomiast znaczącego wpływu immunizacji na średnią liczbę cercarii rozwijających się w żywicielu pośrednim. Ogólna liczba cercarii uwalnianych przez pojedyncze ślimaki była w obydwu grupach podobna i zbliżona do wcześniej opublikowanych danych [12].

W piśmiennictwie brak jest szerszych opracowań dotyczących wpływu statusu immunologicznego żywiciela ostatecznego na rozwój larwalny *F. hepatica*.

Większość dostępnych prac dotyczy raczej wpływu gatunkowo swoistych czynników biochemicznych i fizjologicznych różnych żywicieli ostatecznych (bydło, owce, króliki, nutrie) na ekstensywność zarażenia, śmiertelność ślimaków oraz liczbę rozwijających się w nich cercarii. Rondelaud i Dreyfuss [2] wykazali, że miracydia motylicy wykluwające się z jaj pochodzących od bydła i owiec są bardziej efektywne w transmisji fascjolozy niż jaja *F. hepatica* pochodzące od królików. Podobne wyniki uzyskali Vignoles i wsp. [1]. Jaja motylicy pochodzące od królików charakteryzowały się bardzo niskim, 30%, wskaźnikiem wylęgania miracydiów, podczas gdy dla jaj uzyskanych od bydła wskaźnik ten wynosił 60–85%.

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach stwierdzono pewien wpływ szczepienia na osłabienie możliwości transmisji fascjolozy poprzez mniejszą liczbę miracydiów rozwijających się z jaj wydalonych przez uodpornionych żywicieli ostatecznych, a także słabszą inwazyjność miracydiów, które zdołały opuścić osłonki jajowe.

Literatura

- [1] Vignoles P., Menard A., Rondelaud D., Chauvin A., Dreyfuss G., 2001. *Fasciola hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitology Research* 87: 945–949.
- [2] Rondelaud D., Dreyfuss G., 1995. *Fasciola hepatica*: the influence of the definitive host on the characteristics of infection in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* 2: 275–280.
- [3] Piacenza L., Acosta D., Basmadjian I., Dalton J.P., Carmona C. 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection & Immunity* 67: 1954–61.
- [4] Spithill T.W., Smooker P.M., Sexton J.L. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: *Fasciolosis* (Ed. J.P. Dalton). Oxon, CABI Publishing London: 377–410.

- [5] Osborn G.D., Gron N., Simmons D. 1982. Maintenance and infection of the mud snail *Lymnaea truncatula* for *Fasciola hepatica* studies. *Journal of Institute of Animal Techniques* 33: 1–5.
- [6] Ollerenshaw C.B. 1971. Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Veterinary Research* 98: 152–164.
- [7] Preveraud–Sindou M., Rondelaud D. 1995. Localization and outcome of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* subjected to mono- or plurimicrobial exposures. *Parasitology Research* 81: 265–267.
- [8] Wędrychowicz H., Górski P., Ducommun D., Pfister K. 1995. Somatic antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* recognised by bile antibodies of naturally infected cattle. *Veterinary Parasitology* 56: 47–56.
- [9] Wędrychowicz H., Tait A., Bairden K., Dunlop E., Holmes P.H. 1995. Immune response of lambs to vaccination with *Ostertagia circumcincta* surface antigens eliciting bile antibody responses. *International Journal for Parasitology* 25: 1111–1121.
- [10] Ferre I., Ortega-Mora L.M., Rojo-Vazquez F.A. 1997. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Parasitology* 68: 261–267.
- [11] Tort J., Brindley P.J., Knox D., Wolfe K.H., Dalton J.P. 1999. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology* 43: 161–265.
- [12] Belfaiza M., Abrous M., Rondelaud D., Moncef M., Dreyfuss G. 2004. The use of Tetraphyll as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 94: 86–90.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 4 września 2006