

Zachowanie się subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ u kurcząt w przebiegu zakażenia *Salmonella Enteritidis**

ALINA WIELICZKO, MACIEJ KUCZKOWSKI, MICHAŁ MAZURKIEWICZ

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Wieliczko A., Kuczkowski M., Mazurkiewicz M.

Analysis of CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocyte sub-populations in chickens infected with *Salmonella Enteritidis*

Summary

In the present study, a scope of changes in CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocyte sub-populations was assessed in chickens' spleen, peripheral blood and cecal tonsils infected with *S. Enteritidis*. To investigate the response to the *S. Enteritidis* infection, chickens were inoculated on day 14 (group A) and on day 14 and 21 (group B) to the crop, 1×10^7 cfu *S. Enteritidis*. The percentage of lymphocytes was determined by a flow cytometric analysis, using a commercial kit of monoclonal anti-chicken CD3, CD4, CD8 cell surface antigens.

The results of the study indicate an increase in the percentage of CD3+ cell sub-populations in the spleen at 2, 4 and 28 days following primary inoculation and at all dates of the monitoring following secondary inoculation. Similarly, the strongest response of CD4+ and CD8+ lymphocytes sub-populations was recorded in the spleen whereas cecal tonsils showed a significant increase in T lymphocyte sub-populations in the birds after secondary inoculation with *S. Enteritidis* (CD3+ and CD4+ at day 4 after inoculation). The percentage of CD3+, CD4+ and CD8+ sub-populations in the peripheral blood lowered significantly at day 2 following the inoculation in the birds with primary and secondary inoculation and that of CD8+ on day 4 in the birds after secondary inoculation.

Keywords: CD3+, CD4+, CD8+ lymphocytes, chickens, *Salmonella Enteritidis*

Zakażenia i zatrucia pokarmowe wywołane przez pałeczki z rodzaju *Salmonella* stanowią poważny problem epidemiologiczny w wielu krajach, a także w Polsce. Badania prowadzone nad toksoinfekcjami powodowanymi przez salmonelle wykazały, że dominującym w takich przypadkach serowarem jest *Salmonella Enteritidis* (*S.E.*), zaś najczęstszym nośnikiem tego zarazka jest drób i przetwory drobiarskie (4, 20, 25). Celem eliminacji salmoneli z łańcucha epizootyczno-epidemiologicznego prowadzone są szerokie działania, w tym immunoprofilaktyka mająca na celu uzyskanie stad reprodukcyjnych drobiu wolnych od tych zakażeń.

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że większość badań poświęconych jest odpowiedzi humoralnej na zakażenie *Salmonella sp.* tj. oznaczaniu specyficznych przeciwciał anti-*Salmonella* w surowicy, śluzie jelit, żółci czy żółtku jaj (9, 10, 21). Natomiast niewiele jest opracowań dotyczących roli odporności komórkowej w procesach immunologicznych u ptaków zakażonych *Salmonella sp.*

Odporność komórkowa odgrywa istotną rolę w ochronie gospodarza przed wewnątrzkomórkowymi patogenami, do których należy również *S. Enteritidis* (1, 17, 22). Pałeczki *Salmonella* wnikają do nabłonka

jelitowego poprzez mikroosmki enterocytów gospodarza tworząc w nich wakuole, w których po 3-4 godzinach od momentu zakażenia, obserwuje się replikację bakterii. Następnie dochodzi do ich uwalniania i wnikania do układu siateczkowo-śródbłonkowego (w tym do narządów mięsnych). Najwięcej bakterii wnika do nabłonka po 5-7 godzinach od ich wprowadzenia do jelita. Bakterie produkują również enterotoksyny (enterotoksynę termolabilną i cytotoksynę) powodujące biegunkę i uszkodzenie śluzówki jelit (19).

Początkowo uważano salmonelle za wyłącznie wewnątrzkomórkowe pasożyty, których penetracja do narządów wewnętrznych odbywa się za pośrednictwem makrofagów (5). Stwierdzono jednak, że bakterie namnażają się także poza komórkami i przenikają do narządów wewnętrznych, wykorzystując przestrzenie międzykomórkowe i zatoki układu siateczkowo-śródbłonkowego (6). Infekcja przewodu pokarmowego wywołana przez pałeczki *Salmonella* powoduje powstanie lokalnej odpowiedzi układu immunologicznego (GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue) manifestującej się infiltracją efektorowych limfocytów *T*, *heterofili* i makrofagów (22). Efektem aktywacji skupisk tkanki limfoidalnej związanej z błonami śluzowymi (GALT) jest również produkcja specyficznych przeciwciał sekrecyjnych klasy IgA (SIgA) kontrolowana przez limfocyty T (11).

*1) Pracę wykonano w ramach projektu badawczego KBN 5 PO6K 035 16

Celem badań było określenie zakresu zmian w subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ w śledzionie, krwi obwodowej i grudkach chłonnych jelit ślepych u kurcząt w przebiegu zakażenia *Salmonella Enteritidis*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 90 kurczętach rzeźnych pochodzących ze stada wolnego od zakażeń *Salmonella Enteritidis*, utrzymywanych systemem klatkowym. Paszę i wodę podawano ptakom *ad libitum*. Do zakażenia kontrolnego użyto szczep *S.E.* wyizolowany z klinicznego przypadku salmonelozы drobiu. Kurczęta zakażano *per os* podając sondą do wola 1 ml zawiesiny *S.E.* o gęstości 1×10^7 jtk (jednostek tworzących kolonie).

Kurczęta podzielono na trzy grupy (A, B, C po 30 ptaków w każdej), z których ptaki grupy A zakażono 1-krotnie *S.E.* w 14 dniu życia, ptaki grupy B zakażono 2-krotnie tj. w 14 i 21 dniu życia; zaś grupa C stanowiła kontrolę doświadczenia (ptaki nie zakażone).

Do badań cytometrycznych pobierano losowo po 6 ptaków w 2, 4, 6 dniu po zakażeniu oraz w dniu uboju, tj. 42 dzień życia. Określano odsetek subpopulacji limfocytów CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej, śledzionie i grudkach chłonnych jelit ślepych.

Krew do badań cytometrycznych pobierano z żyły skrzydłowej zaś narządy limfatycznej (śledzionę i grudki chłonne jelit ślepych) pobierano w trakcie sekcji ptaka po uprzedniej dekapitacji. Pobrane narządy limfatyczne po przetarciu przez nylonową siatkę, zawieszano w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Następnie dla izolacji limfocytów pobierano krew lub przecier z narządów i nawarstwiano na Lymphoflot (Biotest, Niemcy). Po odwirowaniu w gradiencie gęstości przez 30 min., zbierano kożuszki limfocytów i zawieszano go w roztworze PBS – 1% BSA (bufor fosforanowy z 1% albuminą bydlęcą). Limfocyty płukano dwukrotnie PBS – 1% BSA i liczone w komorze Thoma.

Do identyfikacji subpopulacji limfocytów T użyto komercyjnego zestawu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko markerom powierzchniowym CD3, CD4 i CD8 limfocytów kurzych (SEROTEC, Wielka Brytania). Przeciwciała te wykrywano fragmentem F(ab')₂ koziej antymysiej immunoglobuliny, skoniugowanym z FITC (Tioizocyanian Fluoresceiny) (DAKO, Dania).

Próby zawiesiny komórek nakładano na płytkę mikrotitracyjną (Nunc) (w każdym dołku po 1×10^6 limfocytów), a następnie dodawano przeciwciała anti-CD3, anti-CD4 lub anti-CD8 w stężeniu $1 \mu\text{g}/10^6$ komórek. Po 40 minutowej inkubacji próby płukano dwukrotnie buforem PBS. Następnie dodawano przeciwciała drugorzędowe, skoniugowane z FITC (w stężeniu $1,25 \mu\text{g}/10^6$ komórek) i inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej w ciemności. Po kolejnym płukaniu próby zawieszano w 400 μl PBS – 2% PFA (Paraformaldehyd).

Próby analizowano bezpośrednio po znakowaniu na cytometrze przepływowym (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) przy użyciu programu CellQuest (wersja 3.1f). Wyniki badań poddano analizie statystycznej testem Dunca-na, na poziomie ufności $p \leq 0,05$ oraz $p \geq 0,005$.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań nad zachowaniem się subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ u kurcząt zakażonych *S.E.* przedstawiono w tab. 1-2.

Analiza cytometryczna limfocytów T u kurcząt zakażonych jednorazowo *S. Enteritidis* (w 14 dniu życia) wykazała zmiany w zakresie subpopulacji limfocytów CD3+, CD4+ i CD8+ w obrębie narządów limfatycznych. Zmiany te były najbardziej charakterystyczne w śledzionie. W 2, 4 dniu po zakażeniu stwierdzono zwiększenie odsetka splenocytów CD3+ u ptaków zakażonych.

Istotnemu wzrostowi w stosunku do grupy kontrolnej ($p \leq 0,005$), uległa w 2 dniu po zakażeniu subpopulacja komórek o funkcji indukująco-wspomagającej (CD4+). Podobnie odsetek komórek CD8+ (cytotoksyczno-supresorowych) uległ wzrostowi w 2 dni po zakażeniu i był istotny w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p \leq 0,005$). W podanych terminach (2 i 4 dzień po zakażeniu) zaobserwowane zmiany w subpopulacjach limfocytów T w obrębie komórek krwi obwodowej i grudek chłonnych jelit ślepych nie różniły się istotnie od uzyskanych w grupie kontrolnej. Natomiast 6 dnia po zakażeniu zaobserwowano zmniejszenie odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+ w śledzionie i krwi obwodowej oraz limfocytów T CD4+ w śledzionie i grudkach chłonnych jelit ślepych. Różnice te były statystycznie istotne tylko w śledzionie. W ostatnim terminie badania – w 42 dniu życia (tj. w 28 dniu po zakażeniu), stwierdzono ponownie istotny wzrost ($p \leq 0,005$) subpopulacji splenocytów CD3+, CD4+ i CD8+ oraz limfocytów CD4+ w obrębie krwi obwodowej (tab. 1).

U kurcząt zakażonych 2-krotnie *S. Enteritidis* (w 14 i 21 dniu życia) stwierdzono istotny wzrost odsetka subpopulacji splenocytów CD3+ we wszystkich terminach badań, przy czym w 4, 6 i 21 dniu po drugim zakażeniu (42 dzień życia) był on statystycznie istotny w porównaniu do grupy kontrolnej. W obrębie grudek chłonnych jelit ślepych istotny wzrost subpopulacji komórek CD3+ ($p \leq 0,005$) stwierdzono tylko w 4 dniu po zakażeniu, zaś w 21 dniu wzrost ten nie był statystycznie istotny. Natomiast we krwi obwodowej w 2 dniu po zakażeniu stwierdzono istotny spadek odsetka limfocytów CD3+ w porównaniu do ptaków kontrolnych. W pozostałych terminach badań zarówno we krwi obwodowej jak i grudkach chłonnych jelit ślepych zmiany w zakresie tej subpopulacji limfocytów nie były statystycznie istotne.

W obrębie subpopulacji komórek CD4+ stwierdzono duże zróżnicowanie w zakresie ich reakcji. W 4, 6 i 21 dniu po zakażeniu stwierdzono wzrost odsetka splenocytów CD4 pozytywnych, przy czym tylko w 6 i 21 dniu wzrost ten był statystycznie istotny. Ponadto statystycznie istotny wzrost limfocytów CD4+ zanotowano jeszcze w grudkach chłonnych jelit ślepych w 4 dniu po zakażeniu oraz w 21 dniu po zakażeniu we krwi obwodowej. Natomiast w 2 dniu po zakażeniu

Tab. 1. Odsetek limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ w krwi obwodowej, śledzionie i grudkach chłonnych jelit ślepych kurcząt zakażonych jednorazowo *S. Enteritidis* (n = 6; x ± s)

Termin badania	Krew obwodowa		Śledziona		Grudki chłonne jelit ślepych		
	zakażone	kontrola	zakażone	kontrola	zakażone	kontrola	
CD3	2 dni po zakażeniu	12,83 ± 1,6	15,83 ± 3,31	54,5 ± 4,59**	32,83 ± 5,19	28,0 ± 8,5	28,16 ± 9,85
	4 dni po zakażeniu	10,83 ± 1,94	16,16 ± 6,94	47,83 ± 7,46**	25,5 ± 9,85	26,33 ± 12,5	25,5 ± 9,85
	6 dni po zakażeniu	13,16 ± 2,48	14,66 ± 3,55	16,16 ± 2,63**	25,83 ± 1,83	20,5 ± 8,48	15,5 ± 3,14
	42 dzień życia	26,0 ± 4,97	23,0 ± 11,0	29,33 ± 2,94**	19,66 ± 2,58	37,66 ± 15,92	30,16 ± 13,99
CD4	2 dni po zakażeniu	8,5 ± 1,97	10,16 ± 3,15	21,33 ± 3,72**	12,66 ± 2,8	15,16 ± 2,22	18,83 ± 4,4
	4 dni po zakażeniu	6,16 ± 1,16	10,5 ± 6,22	18,0 ± 2,6	15,0 ± 5,51	15,5 ± 3,93	15,83 ± 7,33
	6 dni po zakażeniu	7,5 ± 2,07	8,16 ± 1,94	4,66 ± 1,36*	9,33 ± 1,5	11,16 ± 3,71	16,33 ± 4,41
	42 dzień życia	16,5 ± 2,81**	9,0 ± 0,89	8,16 ± 1,33**	5,16 ± 0,75	18,83 ± 4,3	17,33 ± 4,8
CD8	2 dni po zakażeniu	3,7 ± 0,826*	5,14 ± 1,33	29,26 ± 4,3**	16,22 ± 4,77	17,52 ± 6,55	13,72 ± 1,1
	4 dni po zakażeniu	5,35 ± 3,31	6,63 ± 4,48	24,8 ± 4,76*	16,12 ± 7,45	15,23 ± 7,98	14,4 ± 1,37
	6 dni po zakażeniu	6,78 ± 1,68	4,79 ± 1,43	16,44 ± 5,1	14,55 ± 3,73	17,74 ± 6,07	14,69 ± 1,89
	42 dzień życia	8,04 ± 1,86	6,63 ± 4,48	17,06 ± 3,08*	11,49 ± 3,48	17,44 ± 4,64	16,24 ± 7,44

Objaśnienia: *różnice istotne $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$

Tab. 2. Odsetek limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ w krwi obwodowej, śledzionie i grudkach chłonnych jelit ślepych kurcząt zakażonych 2-krotnie *S. Enteritidis* (n = 6; x ± s)

Termin badania	Krew obwodowa		Śledziona		Grudki chłonne jelit ślepych		
	zakażone	kontrola	zakażone	kontrola	zakażone	kontrola	
CD3	2 dni po zakażeniu	6,83 ± 2,23*	9,66 ± 2,06	21,33 ± 3,2*	17,66 ± 1,63	28,33 ± 11,63	32,5 ± 3,83
	4 dni po zakażeniu	12,83 ± 1,6	11,16 ± 2,48	26,5 ± 5,39**	18,16 ± 1,6	44,33 ± 6,08**	33,66 ± 3,38
	6 dni po zakażeniu	12,0 ± 2,96	11,66 ± 5,42	32,83 ± 8,61**	18,66 ± 5,08	26,66 ± 6,28	34,83 ± 6,55
	42 dzień życia	23,0 ± 9,42	23,0 ± 11,0	34,0 ± 6,19**	19,66 ± 2,58	38,66 ± 5,35	30,16 ± 13,99
CD4	2 dni po zakażeniu	4,7 ± 1,0**	7,04 ± 0,94	6,22 ± 1,29	7,21 ± 2,16	12,51 ± 3,84*	16,78 ± 2,3
	4 dni po zakażeniu	10,59 ± 4,22	10,05 ± 2,96	9,0 ± 4,0	7,87 ± 1,42	22,58 ± 5,83**	14,75 ± 1,3
	6 dni po zakażeniu	8,86 ± 3,43	8,21 ± 2,31	18,55 ± 7,0**	6,62 ± 0,44	16,67 ± 6,39	18,64 ± 8,22
	42 dzień życia	17,6 ± 6,23**	8,77 ± 0,77	9,58 ± 2,47**	5,29 ± 0,55	20,81 ± 3,00	17,34 ± 4,89
CD8	2 dni po zakażeniu	2,23 ± 0,61	3,04 ± 1,29	11,7 ± 1,95**	9,25 ± 2,3	6,65 ± 1,78**	12,36 ± 3,22
	4 dni po zakażeniu	4,18 ± 2,22**	6,54 ± 1,09	12,58 ± 2,26**	9,51 ± 1,98	16,74 ± 4,17**	12,76 ± 2,53
	6 dni po zakażeniu	3,22 ± 0,68	3,78 ± 2,39	19,34 ± 7,14**	9,33 ± 1,48	14,15 ± 4,64*	11,22 ± 4,74
	42 dzień życia	7,0 ± 2,99*	5,77 ± 2,21	15,26 ± 1,91**	11,49 ± 3,48	13,33 ± 2,97*	16,24 ± 7,44

Objaśnienia: jak w tab. 1.

wykazano istotny spadek odsetka komórek CD4+ we krwi obwodowej oraz w grudkach chłonnych jelit ślepych.

Odsetek splenocytów CD8+ był istotnie wyższy ($p \leq 0,005$) u ptaków zakażonych 2-krotnie *S. Enteritidis* we wszystkich terminach badań w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei w grudkach chłonnych jelit ślepych odsetek komórek CD8 pozytywnych początkowo w 2 dniu po zakażeniu uległ istotnemu zmniejszeniu a następnie w 4 i 6 dniu po zakażeniu nastąpił wzrost, by ponownie w 21 dniu po zakażeniu ulec istotnemu obniżeniu. Również we krwi obwodowej powtórne zakażenie *S. Enteritidis* spowodowało spadek odsetka limfocytów T subpopulacji CD8+ w 2, 4 i 6 dniu po zakażeniu przy czym w 4 dniu po zakażeniu

wartości te różniły się statystycznie istotnie. Natomiast 21 dnia po zakażeniu stwierdzono wzrost odsetka komórek CD8 pozytywnych w porównaniu do kontroli (tab. 2).

W przeprowadzonych badaniach oznaczano subpopulację limfocytów T na podstawie trzech receptorów – CD3, CD4 i CD8 na powierzchni tych komórek. Dotychczasowe badania wskazują, że receptor CD3 bierze udział w przekazywaniu do wnętrza komórki sygnału powstającego w trakcie wiązania się z antygenem i receptorem MHC na komórce prezentującej antygen. Występuje on na wszystkich dojrziałych limfocytach T oraz na tymocytach. Marker CD4 występuje na powierzchni limfocytów pomocniczych (indukująco-wspomagających) i wzmacnia wiązanie receptora z prezentowanym w kontakcie MHC klasy II antygenem. W ten sposób wpływa na zwiększenie czułości pobudzenia limfocyta T. Pobudzone komórki produkują wiele limfokin oddziałujących w ten sposób na inne komórki

układu immunologicznego. Z kolei receptor CD8 występuje na większość komórek cytotoksycznych, rozpoznających antygen, którym jest wewnątrzkomórkowo syntetyzowane białko, zabijających zakażoną komórkę (24).

Rola elementów odpowiedzi immunologicznej chroniącej organizm ptaków przed infekcją *S. Enteritidis* nie jest jednak do końca wyjaśniona. Zakażenie bakteryjne stymuluje odpowiedź humoralną, jak też komórkową, przy czym ta ostatnia według wielu autorów odgrywa zasadniczą rolę w eliminacji pałeczek *Salmonella* z organizmu (16, 17, 22). Odporność komórkowa u ptaków, tak jak i u ssaków zależna jest od udziału limfocytów T charakteryzujących się obecnością markera CD4 na powierzchni, pełniących funkcje

indukująco-wspomagającą (2, 12, 15). Pobudzone limfocyty wydzielają cytokiny oddziaływujące na inne komórki układu odpornościowego. Wydzielają między innymi interleukinę 2 (IL-2), która pobudza ekspansję klonalną innych limfocytów CD4+, CD8+ oraz NK (Natural Killers). Odgrywa także istotną rolę w regulacji odpowiedzi humoralnej poprzez kierowanie aktywacją i proliferacją limfocytów B (2, 23). Wyniki badań własnych wskazują na wzrost odsetka subpopulacji komórek CD4 pozytywnych, przede wszystkim w śledzienie w 2 i 4 dni po zakażeniu *S. Enteritidis*, zarówno w grupie zakażonej jednorazowo, jak też i 2-krotnie.

Limfocyty T, głównie komórki CD4+ i CD8+, produkują czynnik aktywujący makrofagi IFN- γ (Interferonu gamma), jedną z cytokin decydujących o wytwarzaniu ochrony przed wewnątrzkomórkowymi patogenami (18). Pobudzone limfocyty wytwarzają także ILK (*Salmonella Enteritidis*-immune T lymphokine). Limfokina ta powoduje lokalną akumulację leukocytów heterofilnych uważanych za istotny czynnik ochrony przed zakażeniem *S. Enteritidis* (14). Udowodniono, że kurczęta którym podawano ILK i następnie zakażono *Salmonella Enteritidis*, odpowiadały znacznym wzrostem krążących (we krwi obwodowej) polimorfonuklearnych leukocytów (PMNs), do których należą między innymi komórki heterofilne. Heterofile ptasie są odpowiednikami leukocytów obojętnochłonnych ssaków i posiadają zdolność fagocytozy i chemotaksji (7, 14). Kogut i wsp. (14) wykazali, że zwiększona liczba tych komórek wywołała wzrost odporności kurcząt na kolonizację ich narządów wewnętrznych przez pałeczki *Salmonella*.

Uważa się, że limfocyty CD8+ przy pomocy mechanizmów zależnych od IFN pośredniczą w cytolizie komórek zakażonych *Salmonella* (13) eliminując w ten sposób pałeczki *Salmonella* z organizmu. Fakt ten wydaje się tłumaczyć wykazany przez nas wzrost odsetka komórek CD8 pozytywnych w śledzienie oraz guzków chłonnych jelit ślepych kurcząt w przebiegu zakażenia.

Infekcja salmonelozowa może wywołać także immunosupresję u ptaków. Przyczyna tego zjawiska nie jest wyjaśniona, ale Hassan i Curtis (8) stwierdzili, że *Salmonella Typhimurium* może zahamować proliferację limfocytów u jednodniowych i 4-tygodniowych kurcząt. Podobnie Arnold (1) wykazał, że zakażenie *S. Enteritidis* powoduje zahamowanie proliferacji splenocytów oraz immunosupresję w okresie 1-2 tygodni po zakażeniu. W trakcie własnych badań zaobserwowano spadek odsetka subpopulacji limfocytów CD3+ i CD4+ w 6 dniu po infekcji w śledzienie oraz krwi obwodowej.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że zakażenie kurcząt *S. Enteritidis* istotnie rzuca na reaktywność limfocytów T subpopulacji CD3+, CD4+ i CD8+. Przy tym jednokrotne zakażenie kurcząt *S.E. per os* wywoływało statystycznie istotne zmiany w populacji splenocytów. Natomiast przy dwu-

krotnym zakażeniu ptaków poza śledzioną zmiany ilościowe ocenianych subpopulacji limfocytów T dotyczyły guzków chłonnych jelit ślepych i krwi obwodowej.

Piśmiennictwo

1. Arnold J.W., Nielsen D.W., Annable C.R., Hess C.B., Asuncion M., Cho Y.J., Peterson J.W., Kimpel G.R.: Tumor necrosis factor- α mediates the early pathology in *Salmonella* infection of the gastrointestinal tract. *Microb. Pathog.* 1993, 14, 217-227.
2. Arstila T., Väinö O., Lassila O.: Central role of CD4+ T cell in avian immune response. *Poult. Sci.* 1994, 73, 1019-1026.
3. Binek M., Błaszczak B.: Zakażenie kurcząt *Salmonella Enteritidis* – znaczenie odporności komórkowej. *Post. Mikrob.* 1995, 4, 403-416.
4. Blaser M.J.: How safe is our food? – Lessons from an outbreak of *Salmonellosis*. *N Engl. J. Med.* 1996, 334, 1225-1324.
5. Collins F.M., Campbell S.G.: Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1982, 3, 5-66.
6. Gast R.K., Beard C.W.: Production of *Salmonella Enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.* 1990, 34, 438-446.
7. Genovese L.L., Lowry V.K., Genovese K.J., Kogut M.H.: Longevity of phagocytic activity of heterophil in neonatal chickens following administration of *Salmonella Enteritidis*-immune lymphokines to chickens. *Avian Pathol.* 2000, 29, 117-122.
8. Hassan J.O., Curtis III R.: Virulent *Salmonella typhimurium*-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. *Infect. Immun.* 1994, 62, 2027-2036.
9. Hassan J.O., Mockett A.P.A., Catty D., Barrow P.A.: Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: Bacteriology and immune responses. *Avian Dis.* 1991, 35, 809-819.
10. Holt P., Gast R., Porter jr. R.E., Stone H.D.: Hyperresponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* at one day of age. *Poult. Sci.* 1999, 78, 1510-1517.
11. Jeurissen S.H.M., Velvelde L., Jansen E.M.: Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poultry Sci. Rev.* 1994, 5, 183-207.
12. Kauffman S.H.E.: Immunity to intracellular bacteria. *Ann. Rev. Immunol.* 1993, 11, 129-163.
13. Kauffman S.H.: CD8+ T lymphocytes in intercellular microbial infection. *Immunol. Today* 1988, 9, 168-174.
14. Kogut M.H., McGruder E.D., Hardis B.M., Corrier D.E., Delauch J.R.: Dynamics of the avian inflammatory response to *Salmonella*-immune lymphokines: changes in avian leukocyte population. *Inflammation* 1994, 18, 373-388.
15. Kreukniet M.B., Gianotten N., Nieuwland M.G.B., Parmantier H.K.: Research note: In vitro T-cell activity in two chicken lines divergently selected for antibody response to sheep erythrocytes. *Poult. Sci.* 1994, 73, 336-340.
16. Lee G.M., Jackson G.D.F., Cooper G.N.: The role of serum and biliary antibodies and cell-mediated immunity in the clearance of serotype S. typhimurium from chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1981, 2, 233-252.
17. Lillehoj H.S.: Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. *Avian Cellular Immunology*. J. M. Sharma (wyd.) CRD press, Boca Raton, FL, 1991, s.155-190.
18. Mosmann T.R., Coffman R.L.: TH1 and TH2 cells; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989, 7, 145-173.
19. Popiel I., Turnbull P.C.B.: Passage to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through the chick ileocaecal mucosa. *Infect. Immun.* 1985, 47, 786-792.
20. Przybylska A.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 1999 roku. *Prz. Epid.* 2001, 55, 93-103.
21. Rzedzicki J., Pilaszek J., Tokarzewski S., Szulowski K., Iwaniak W.: Przeciwciała dla *Salmonella enteritidis* w surowicy, żółtku i tkance mięśniowej ptaków wykrywane metodą ELISA. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 235-240.
22. Shat K.A.: Cell-mediated immune effector function in chicken. *Poult. Sci.* 1994, 73, 1077-1081.
23. Sundick R.S., Gill-Dixon C.: A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J. Immunol.* 1997, 159, 720-725.
24. Väinö O., Toivanen P.: Chicken T cell coreceptors. *Folia Biol. (Praha)* 1994, 40, 497-504.
25. Zee H., van der Boer E.: *Salmonella* spp. and *Salmonella enteritidis* in poultry products and raw egg material in the Netherlands. *Proc. Inter. Symp.: Salmonella and salmonellosis*. Ploufragan, France, 1997, s.377-382.