

Analiza populacji limfocytów T metodą cytometrii przepływowej u kurcząt zakażonych reowirusami

HANNA CZEKAJ, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, WOJCIECH KOZDRUŃ,
DARIUSZ BEDNAREK*, KATARZYNA KRÓL

Pracownia Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu, *Zakład Chorób Bydła
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruń W., Bednarek D., Król K.

Analysis of T lymphocyte populations in peripheral blood of chickens infected with reoviruses

Summary

The aim of the study was to examine the influence of reovirus infection on the T lymphocyte subpopulations in chicken blood. The study used one-day old SPF chickens divided into 3 groups. The chickens in groups I and II were infected with two strains of reoviruses at a dose of $10^{3.5}$ ELD₅₀ / 0.3 ml. A low pathogen strain (218) was applied in group I and high pathogen strain (K) was used in group II. Blood from the chickens was collected on the 3rd, 7th, 10th, 14th and 21st day following infection. Mice monoclonal antibodies against markers such as CD3 (Clone CT-3), CD4 (Clone CT-4) and CD8 (Clone CT-8) of chickens lymphocytes marked with FITC were used to determine T lymphocyte subpopulations. The lymphocytes were determined by flow cytometry. From day 3 following infection the percentage of T lymphocytes CD3+ was lower than that of the control group. The percentage of these cells increased in group I after the 10th day, and continued to rise in birds of group II compared to the control until the completion of the study. A similar situation was observed on the 3rd and 7th days following infection where the subpopulation of CD4+ constituted a lower percentage of peripheral blood cells than the control group. Reovirus infection also caused a reduction in the percentage of CD8+ lymphocytes.

Keywords: chickens, avian reoviruses, T lymphocytes, flow cytometry

Szczepki reowirusów izolowanych od ptaków w kraju wykazują znaczne zróżnicowanie właściwości patogennych. Obok szczepów o niskiej patogenności, które powodują zakażenia bezobjawowe lub występują jako zakażenia wklajające inne infekcje bakteryjne lub wirusowe, stwierdza się szczepki powodujące schorzenia o przebiegu ostrym połączone z dużą śmiertelnością ptaków (3, 4, 11). Konsekwencją namnażania się reowirusów w torbie Fabrycjusza może być działanie immunosupresyjne (10), które zwiększa wrażliwość ptaków na inne infekcje, a także może być przyczyną zmniejszonej skuteczności szczepień profilaktycznych (9, 10).

W przebiegu infekcji wirusowych istotną rolę odgrywają mechanizmy odporności komórkowej, a zwłaszcza limfocyty Tc. Większość z tych limfocytów rozpoznaje antygeny wirusowe w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I i należy do subpopulacji CD8+. Występują również limfocyty Tc posiadające marker powierzchniowy CD4+, rozpoznające antygeny w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Limfocyty Tc wymagają pomocy ze strony limfocytów wspomagających (Th) i komórek prezentujących antygen – głównie komórek dendrycznych (1, 7, 8). Zastosowanie cytometrii przepływowej pozwala, między innymi, na

ocenę zmian ilościowych i jakościowych w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T.

Ze względu na powszechność występowania zakażeń reowirusami w populacjach drobiu w Polsce (3) podjęto badania mające na celu określenie kształtowania się subpopulacji komórek limfocytów T w krwi obwodowej kurcząt zakażonych różnymi szczepami reowirusów.

Materiał i metody

Szczepki wirusowe. Do badań użyto dwóch szczepów reowirusów ptasich o zróżnicowanej patogenności, wyizolowanych od kurcząt z przypadków terenowych, pochodzących z własnej kolekcji: szczepu 218 o niskiej patogenności o mianie $10^{5.75}$ ELD₅₀ oraz szczepu K o podwyższonej patogenności o mianie $10^{5.5}$ ELD₅₀.

Pisklęta. Do doświadczenia użyto 75 piskląt leżonych z jaj SPF firmy Lohmann, Niemcy, które podzielono na 3 grupy. W pierwszym dniu życia pisklęta z grupy I i II (po 30 sztuk) zakażono dodziobowo szczepami reowirusów w dawce $10^{3.5}$ ELD₅₀ / 0,3 ml płynu fizjologicznego. Pisklętom z grupy I podano zawiesinę szczepu 218, ptaki z II grupy otrzymały zawiesinę szczepu K. Pisklęta w III grupie stanowiły kontrolę negatywną i otrzymały po 0,3 ml płynu fizjologicznego.

Od 10 kurcząt z grup zakażonych i 5 z grupy kontrolnej w 3., 7., 10., 14. i 21. dniu *p.i.* pobierano próbki krwi do wykonywania oznaczeń. Krew pobierano do probówek z antykoagulantem i bezpośrednio po pobraniu przygotowywano do oznaczeń w cytometrycznym przepływowym.

Oznaczanie subpopulacji limfocytów T. Do oznaczeń stosowano przeciwciała monoklonalne mysie przeciwko markerom powierzchniowym CD3 (Clone CT-3), CD4 (Clone CT-4) oraz CD8 (Clone CT-8) limfocytów kurzych znakowane tioizocjanianem fluoresceiny (FICT) firmy Serotec Ltd.

Przygotowanie próbek krwi.

Do 50 μ l krwi dodawano po 5 μ l poszczególnych przeciwciał monoklonalnych i po wytrząsaniu mieszaniny inkubowano przez 30 min. w ciemni o temperaturze pokojowej. Następnie dodawano po 250 μ l buforu lizującego – Optylyse C firmy Immunotech i po wymieszaniu pozostawiano w ciemni w temp. pokojowej. Do prób dodawano następnie po 250 μ l płynu PBS z dodatkiem 5% surowicy cielęcej inaktywowanej. Po 10 min. inkubacji próbki wirowano przez 10 min. przy 1800 obr./min., supernatant usuwano, a osad komórek płukano 3-krotnie. W ostatnim etapie do wszystkich próbek dodawano po 800 μ l 2% roztworu formaldehydu w płynie PBS. Oznaczenia markerów powierzchniowych wykonywano w cytofluorometrycznym przepływowym Coulter Epics XL 4C (Beckman Coulter Company, USA).

Wyniki przedstawiono, podając średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe subpopulacji limfocytów T. Ocenę statystyczną wyników przeprowadzano testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Kształowanie się subpopulacji limfocytów T w krwi kurcząt zakażonych szczepami terenowymi reowirusów ptasich przedstawiono w tabeli 1 i na rycinach 1-3.

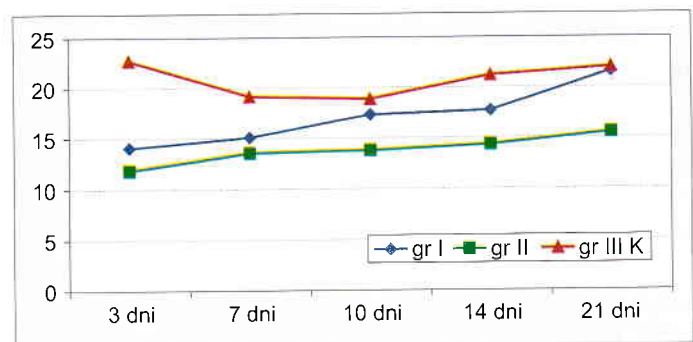
Limfocyty T posiadają na powierzchni receptor CD3+, który występuje na większości dojrzałych limfocytów T, a także na tymocytach. Uczestniczy on w przekazywaniu do komórki sygnału w trakcie wiązania z antygenem i receptorem MHC na komórce prezentującej antygen (8). Odsetek tej populacji komórek w krwi kurcząt zakażonych reowirusami przedstawiono na ryc. 1. Od 3 dnia *p.i.* u ptaków zakażonych z I i II grupy był on znacznie niższy niż u ptaków w grupie kontrolnej. U ptaków zakażonych szczepem 218 (grupa I) od 10 dnia *p.i.* odsetek tych komórek wzrastał i 21 dnia *p.i.* nie stwierdzano różnic w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w krwi obwodowej ptaków zakażonych szczepem K (grupa II) we wszystkich terminach badań stwierdzano znacznie niższy odsetek komórek limfocytów T CD3+ niż u pta-

Tab. 1. Odsetek subpopulacji limfocytów T w krwi kurcząt zakażonych reowirusami

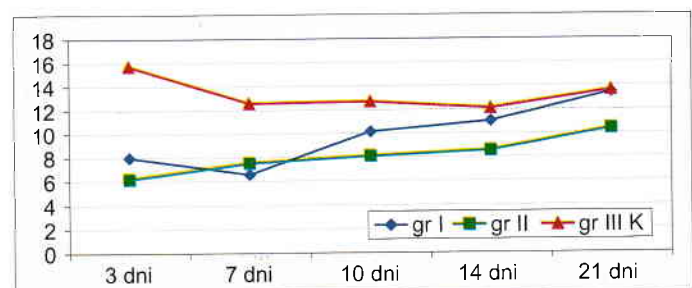
Grupa ptaków	Subpopulacje komórek	Odsetek komórek				
		Dni po zakażeniu				
		3	7	10	14	21
I	CD3+	14,13 \pm 2,36	15,17 \pm 2,44	17,38 \pm 3,38	17,78 \pm 0,94	21,64 \pm 4,43
II		11,87 \pm 0,96	13,58 \pm 2,12	13,82 \pm 1,90	14,35 \pm 1,62	15,55 \pm 2,15
III		22,77 \pm 1,32	19,2 \pm 0,28	18,92 \pm 0,90	21,25 \pm 0,94	22,05 \pm 0,55
I	CD4+	8,03 \pm 1,94	6,62 \pm 3,15	10,22 \pm 2,46	11,08 \pm 1,17	13,50 \pm 3,61
II		6,23 \pm 1,14	7,56 \pm 0,97	8,13 \pm 1,93	8,59 \pm 1,68	10,43 \pm 2,35
III		15,73 \pm 0,42	12,58 \pm 1,18	12,70 \pm 2,41	12,15 \pm 0,85	13,65 \pm 1,63
I	CD8+	5,72 \pm 1,87	5,35 \pm 1,09	5,92 \pm 2,15	6,36 \pm 0,55	7,95 \pm 0,98
II		4,60 \pm 2,10	4,80 \pm 0,47	5,50 \pm 1,87	5,73 \pm 1,12	6,42 \pm 1,60
III		7,05 \pm 1,91	7,25 \pm 0,71	7,90 \pm 2,14	6,85 \pm 0,42	8,76 \pm 0,68

ków w grupie kontrolnej. Różnice te były statystycznie istotne.

Zakażenie piskląt reowirusami spowodowało również obniżenie odsetka komórek limfocytów T CD4+ (ryc. 2). Receptor CD4 występuje na powierzchni limfocytów pomocniczych (Th), które rozpoznają antygen prezentowany w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Komórki te ułatwiają aktywację, proliferację i różnicowanie limfocytów B, prekursorów limfocytów T cytotoksycznych, a także pobudzają makrofagi poprzez bezpośredni kontakt, jak również przez wydzielane cytokiny (1, 7). W subpopulacji tych komórek największe różnice, w porównaniu z grupą kontrolną, stwierdzono w 3 dni po zakażeniu. Wówczas odsetek tych komórek w krwi kurcząt zakażonych reo-



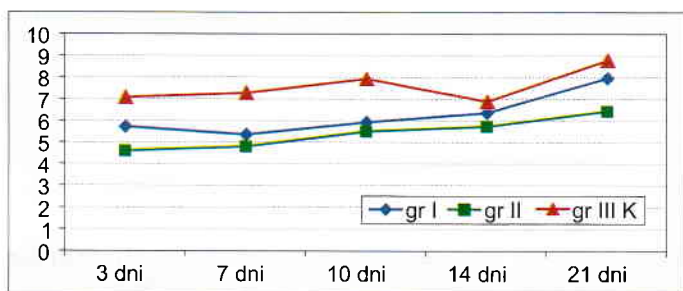
Ryc. 1. Odsetek subpopulacji limfocytów T CD3+ w krwi kurcząt zakażonych reowirusami



Ryc. 2. Odsetek subpopulacji limfocytów T CD4+ w krwi kurcząt zakażonych reowirusami

wirusami (grupa I i II) był dwukrotnie niższy niż u ptaków kontrolnych (grupa III). Również w 7 dni po zakażeniu różnice te były wyraźne i statystycznie istotne. Od 10 dnia *p.i.* w kurcząt w grupie I zakażonych szczepem 218 o małej patogenności odsetek komórek CD4+ wzrastał, a w 21 dni po zakażeniu był na takim samym poziomie jak u ptaków kontrolnych. W krwi kurcząt zakażonych szczepem K (grupa II) do końca obserwacji stwierdzano niższy odsetek subpopulacji komórek CD4+.

Kolejną badaną subpopulacją limfocytów T były komórki posiadające na powierzchni receptor CD8+. Występuje on na limfocytach cytotokosycznych (Tc). Główną ich rolą jest niszczenie komórek zakażonych przez wirusy i inne mikroorganizmy, a także komórek nowotworowych (8). U kurcząt zakażonych reowirusami obserwowano obniżenie odsetka limfocytów CD8+ (ryc. 3). W 3. dniu *p.i.* odsetek tych komórek w krwi kurcząt zakażonych szczepem 218 (grupa I) wynosił 5,72, u kurcząt zakażonych szczepem K (grupa II) – 4,6, a u ptaków w grupie kontrolnej (III grupa) – 7,05. W ciągu 21 dni obserwacji u ptaków zakażonych szczepem K (grupa II) odsetek tych komórek był niższy niż u ptaków w grupie I i III.



Ryc. 3. Odsetek subpopulacji limfocytów T CD8+ w krwi kurcząt zakażonych reowirusami

Zakażenie reowirusami ptasimi było przyczyną obniżenia odsetka badanych subpopulacji limfocytów T w krwi obwodowej. U ptaków zakażonych szczepem o podwyższonej patogenności (szczep K, grupa II) stwierdzano niższe odsetki badanych subpopulacji limfocytów T w porównaniu z ptakami zakażonymi szczepem o niskiej patogenności (szczep 218, grupa I). Wirus anemii zakaźnej, wirus zakaźnego zapalenia torby Fabryjusza, wirusy białaczki czy wirus choroby Mareka powodują immunosupresję (6, 10). Badania Wieliczko i wsp. (12) wykazały supresyjne działanie *S. Enteritidis* na subpopulacje limfocytów T. Potwierdzono eksperymentalnie immunosupresyjne działanie wirusa anemii zakaźnej oraz wirusa choroby Gumboro na elementy odpowiedzi komórkowej u ptaków (6). Wyniki badań enteropatogennych szczepów reowirusów pochodzących z Holandii i Niemiec wykazały obniżenie liczby komórek T CD4+, a wzrost liczby komórek CD8+ w kosmkach jelit cienkich u ptaków zakażonych takimi szczepami (11).

Wykazane w badaniach obniżenie subpopulacji limfocytów T CD4+, które biorą udział w aktywacji, pro-

liferacji i różnicowaniu limfocytów B potwierdza wcześniejsze wyniki badań własnych, w których stwierdzono, że szczepy reowirusów o mniejszej patogenności stymulują powstawanie większej ilości swoistych przeciwciał niż szczepy bardziej patogenne (3).

Zastosowanie cytometrii przepływowej umożliwia praktyczne wykorzystywanie jej do określania zmian w subpopulacjach limfocytów T spowodowanych zakażeniami reowirusowymi u ptaków.

Piśmiennictwo

1. Astila T., Vainio O., Lassila O.: Central role of CD4+ T cell in avian immune response. *Poultry Sci.* 1994, 73, 1019-1026.
2. Burges S. C., Davison T. F.: Counting absolute numbers of specific leukocyte subpopulations in avian whole blood using a single-step flow cytometric technique: comparison of two lines of chickens. *J. Immunol. Meth.* 1999, 227, 169-176.
3. Czekaj H.: Właściwości krajowych szczepów reowirusów kur. Praca dok. Puławy 1997, s. 53.
4. Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrzeń W., Kozaczyński W.: Patogenność szczepów reowirusów izolowanych w kraju. *Zesz. Nauk. AR Wrocław* 2000, 376, 105-114.
5. Erf G. F., Bottje W. G., Bersi T. K.: CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 62, 339-348.
6. Hu L. B., Lucio B., Schat K. A.: Depletion of CD4+ and CD8+ lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.* 1993, 37, 492-500.
7. Kauffman S. H.: CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infection. *Immunol. Today.* 1988, 9, 168-174.
8. Schat K. A.: Cell-mediated immune effector function in chicken. *Poultry Sci.* 1994, 73, 1077-1081.
9. Samorek-Salamonowicz E., Kozdrzeń W., Czekaj H.: Wpływ zakażenia reowirusami na skuteczność szczepień przeciwko chorobie Mareka. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 455-459.
10. Sharma J. M., Karaca K., Pertile T.: Virus-induced immunosuppression in chickens. *Poultry Sci.* 1994, 73, 1082-1088.
11. Songserm T., van Roozelaar D., Kant A., Pol J., Pijpers A., Huurne A.: Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet. Res.* 2003, 34, 285-295.
12. Wieliczko A., Kuczkowski M., Mazurkiewicz M.: Zachowanie się subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ u kurcząt w przebiegu zakażenia *Salmonella Enteritidis*. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 527-530.

Adres autora: dr Hanna Czekaj, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: H.Czekaj@piwet.pulawy.pl

JACKSON R., PITE L., KENNARD R., WARD D., STACK J., DOMI X., RAMI A., DEDUSHAJ I.: Badania nad częstotliwością występowania dodatnich wyników serologicznych w kierunku brucelozy u przeżuwaczy w Kosowie. (Survey of the seroprevalance of brucellosis in ruminants in Kosovo). *Vet. Rec.* 154, 747-751, 2004 (24)

Badania dotyczące epidemiologii brucelozy u bydła, owiec i kóz w Kosowie przeprowadzono w styczniu 2001 r. Ogółem przebadano w teście z czerwienią bengalską (RBT) 7941 próbek surowic bydła, 3548 próbek surowic od owiec i kóz. Surowice reagujące dodatnio lub wątpliwie w tym teście badano w teście iELISA i cELISA. Wyniki dodatnie we wszystkich 3 testach uzyskano z 6,25% surowic owiec, 7,24% surowic kóz i 0,58% surowic bydła. Badaniem objęto zwierzęta z terenu 26 na 29 jednostek administracyjnych kraju. Zwierzęta reagujące pozytywnie występowały w 25% spośród 162 badanych wsi. Wyższe ryzyko występowania brucelozy było na terenach, gdzie hodowano owce i bydło aniżeli na terenach, gdzie hodowano samo bydło. W Kosowie dominują zakażenia wywołane przez *Brucella melitensis*.