

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANNA WINNICKA*,
WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI*, ZYGMUNT PEJSAK

Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach nad patogenezą pomoru świń wywołanego przez szczepy o różnej zjadliwości

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Markowska-Daniel I., Winnicka A., Kluciński W., Pejsak Z.

Application of flow cytometry for analysis of classical swine fever virus infection of piglets caused by strains of different virulency

Summary

The aim of the experiment was a FACS analysis of the immune response of porcine leukocyte populations involved in the infection of piglets caused by virulent, low virulent and vaccine strains of classical swine fever virus (CSFV).

Twenty piglets were infected with Washington (W), Alfort (A) and Cellpest (C) strains of CSFV, respectively. The peripheral blood populations of leukocytes were analysed by the following set of specific monoclonal antibodies; anti-CD45, CD14, CD2, CD4, CD8, CD4-CD8-TcR $\gamma\delta$ +, and anti CD19.

Typical clinical and anatomopathological symptoms of CSFV infections were observed in piglets infected with W and A strains, the attenuated vaccine strain did not cause viraemia. In groups infected with W and A strains 40% and 20% of the piglets died, respectively. This was accompanied by a significant change of the leukocyte population. The percentage of lymphocytes decreased significantly 72 hrs after infection. Moreover, lymphopenia, the decreased number of B and T lymphocytes, as well as monocyte and trombocyte populations were observed. Contrary to those, the percent of granulocytes gradually increased. The number of the erythrocytes and the measured parameters of the red blood cells were not significantly different in comparison with the control piglets. At the beginning of the infection the percentage of Th and observed TcR $\gamma\delta$ + lymphocytes increased, then 96 hrs later gradually decreased, while Ts population increased till day 11 of the experiment. Piglets infected with attenuated strain reacted differently, compared with groups infected with W and A strains: an increased number of leucocytes, lymphocytes, granulocytes, trombocytes, as well as B lymphocytes were observed. The influence of the experimental infection on cell immunity were demonstrated by the increased number of T lymphocytes, especially Th population and decreased number of Ts population.

The results observed during the experimental infections of piglets indicate that the immunological response varied greatly depending on the virulency of the strain used for inoculating the swine.

Szczepy wirusa pomoru klasycznego świń (CSFV), który jest czynnikiem etiologicznym najgroźniejszej aktualnie choroby trzody chlewnej – pomoru klasycznego (CSF) różnią się wyraźnie pod względem swoich właściwości biologicznych, czego efektem jest odmienny obraz kliniczny i anatomopatologiczny choroby (8, 17, 19, 23, 24). Różna jest też reakcja immunologiczna organizmu na zakażenie CSFV. Związane jest to z odmienną zjadliwością, a także dawką wirusa, drogą zakażenia, stopniem dojrzałości układu immunologicznego oraz wiekiem i kondycją zwierzęcia (6, 7, 9). Zróznicowana odpowiedź immunologiczna w przebiegu CSF może być również wynikiem dysfunkcji systemu odpornościowego, wynikającej między innymi z interakcji pomiędzy wirusem a komórkami układu odpornościowego (9, 32, 37).

Badaniem immunohistologicznym wykazano zdezcydowane powinowactwo CSFV do układu limfatycznego. Interesujące jest, że przy ostrej postaci CSF (9, 27) głównym miejscem replikacji wirusa są makrofagi i komórki retikulum endoplazmatycznego, podczas gdy w postaci chronicznej namnażanie wirusa ograniczone jest do komórek nabłonkowych w migdałkach, nerkach i jelicie biodrowym (4). Naturalna i doświadczalna, ostra infekcja świń CSFV prowadzi do regresji i zmian histologicznych w tkance limfoidalnej, zamierania limfocytów i w konsekwencji limfopenii (9, 35).

Odpowiedź immunologiczna w przebiegu infekcji CSFV wyraża się przede wszystkim produkcją przeciwciał neutralizujących, odpowiedź komórkowa ma prawdopodobnie wyraźnie mniejsze znaczenie (9). Zazwyczaj, wysoce zjadliwe szczepy CSFV

indukują wyższy poziom odporności humoralnej niż szczepy o niskiej patogenności. Mało zjadliwe szczepy CSFV są zwykle słabo immunogenne i mogą nie indukować produkcji swoistych przeciwciał na wykrywalnym poziomie.

Komórkowa odpowiedź immunologiczna w przebiegu infekcji wirusem pomoru budzi wiele kontrowersji. Corthier stwierdził krótkotrwałą reakcję limfocytów 17 dni po infekcji szczepem Loud, który powoduje infekcje chroniczne (5). Van Oirschot nie obserwował proliferacji limfocytów po zastosowaniu zjadliwego lub naświetlanego promieniami UV antygeny, który zwykle uważany jest za antygen stymulujący limfocyty (35). Bezpośredni efekt w postaci proliferacji limfocytów u świń szczepionych szczepem „chińskim”, po zastosowaniu chemicznej inaktywacji jako procesu stymulującego antygen, w okresie 28 dni po szczepieniu i utrzymujący się przez 8-12 dni zanotował Remond (26). Brak jest natomiast danych odnośnie roli swoistej, komórkowo-zależnej, reakcji cytotoksycznej w przebiegu infekcji CSFV.

Cytometria przepływowa jest jedną z najnowszych metod jakościowej i ilościowej oceny cech morfologicznych (fenotypu) oraz cech biologicznych (stanu fizjologicznego) komórek (1, 14-16, 21, 22). Analiza cytometryczna z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (MAbs) pozwala na odróżnianie limfocytów B i T oraz wśród limfocytów T – komórek Th i Ts, a także subpopulacji komórek TcR $\gamma\delta$, co z kolei umożliwia monitorowanie stanu układu immunologicznego, a w konsekwencji prowadzenie nowoczesnych badań nad immunologią, w omawianym przypadku – zakażeń świń wirusem pomoru klasycznego.

Celem pracy było ustalenie metodą cytofluometryczną, które subpopulacje komórek układu białokrwinkowego ulegają zakażeniu przy zakażeniu świń słabo, średnio oraz wysoce zjadliwymi szczepami CSFV oraz określenie dynamiki zakażenia poszczególnych frakcji limfocytów w czasie.

Material i metody

Zwierzęta. Do badań wykorzystano 20 klinicznie zdrowych warchlaków, rasy wielka biała polska w wieku około 2 miesięcy, o masie ciała średnio około 20 kg, odchowywanych w izolatoriach Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Zwierzęta były jednakowo żywione paszą typu Starter (Ibeka-Panto), zawierającą mieszankę pełnoporcjową o składzie dostosowanym do wieku. Świnie znajdowały się w takich samych warunkach utrzymania, stanowiły potomstwo macior nie szczepionych przeciwko CSFV i nie były uodporniane przeciwko w. chorobom.

Warchlaki podzielono na 3 równe liczbowo grupy doświadczalne oraz grupę kontrolną: gr. I – świnię zakażoną wysoce zjadliwym szczepem CSFV (Washington), II – świnię zakażoną zjadliwym szczepem CSFV (Alfort-187), III – świnię zakażoną atenuowanym szcze-

pem szczepionkowym (Cellpest), IV – świnię kontrolną otrzymującą placebo.

Szczepy wirusowe. W badaniach wykorzystano: wysoce zjadliwy szczep Washington CSFV, stanowiący pełnozjadliwą odwłóknioną krew, pobraną od zakażonych zwierząt w szczycie temperatury, o mianie $10^{4.05}TCID_{50}/1$ ml; Alfort-187 CSFV, pasażowany w hodowli komórek nerki świńskiej PK-15, o mianie $10^{-6.8}TCID_{50}/1$ ml; szczep szczepionkowy Cellpest, będący zjadliwym szczepem terenowym, atenuowanym poprzez ponad sto pasażów w hodowli komórek linii ciągłej nerki świni PK-15, o mianie $10^{-4.5}TCID_{50}/1$ ml.

Odczynniki

Przeciwciała monoklonalne. Do identyfikacji, zakażonych odpowiednimi szczepami wirusa pomoru, subpopulacji limfocytów zastosowano, skierowany przeciwko grupowym antygenom różnicującym leukocyty świńskie, komercyjny zestaw MAbs: anty CD45 (74-9-3A1), CD14 (CAM36A), CD2 (PG168A), CD4 (PT90A), CD8 (PT81B) oraz CD4- CD8- TcR $\gamma\delta$ + (VMRD Inc. Pullmann), a także CD19 (MCA633) (Serotec).

Fluorochromy. Do znakowania MAbs stosowano tioizocyjanian fluoresceiny (FITC) i fykoerytrynę (PE) skoniugowane z kozimi anty mysimi immunoglobulinami (Medac, Niemcy).

Do płukania prób z nadmiaru niezwiązanych MAbs oraz nadmiaru przeciwciał skoniugowanych z fluorochromem używano PBS z dodatkiem 2% surowicy końskiej (bez γ -globulin), 10% ACD (dekstroza z dodatkiem dwuwodnego cytrynianu sodu i kwasu cytrynowego) oraz 10 mM kwasu etyleno-2-amino-4-octowy (EDTA) (bufor 1). Próby lizowano przy pomocy buforu lizującego (FACS lysing solution) (Becton Dickinson). Do płukania prób z pozostałości lizatu używano buforu o składzie analogicznym do buforu 1, bez dodatku surowicy końskiej (bufor 2). Próby do analizy cytometrycznej zawieszano w 2% roztworze formaldehydu w PBS (bufor 3). Jako konserwantu do buforów dodawano 0,2% NaN₃.

Postępowanie. Zwierzęta zakażano podając 1 ml odpowiedniego szczepu wirusowego domięśniowo.

Obserwacje kliniczne zwierząt oraz rejestrację wewnętrznej ciepłoty ciała (w.c.c.) prowadzono w odstępach 12-godzinnych, począwszy od 24 godzin po zakażeniu do chwili padnięcia zwierząt lub do 264 godzin (11 dni) po zakażeniu.

Krew do analizy hematologicznej oraz cytometrycznej pobierano od świń z żyły czczej przedniej przed zakażeniem, a następnie począwszy od 24 godzin po zakażeniu 10-krotnie w odstępach 12 godzinnych, po czym do chwili padnięcia zwierząt w odstępach 72-godzinnych lub do 264 godzin (11 dni) po zakażeniu.

Badanie morfologiczne krwi wykonano przy użyciu analizatora hematologicznego Auto Counter AC920 (Swelab Instrument). Oceniano następujące parametry: liczba leukocytów, limfocytów, granulocytów, monocytów, trombocytów i erytrocytów; stężenie hemoglobiny (Hb); hematokryt; wskaźniki czerwonokrwinkowe (średnią objętość erytrocytów, średnie stężenie Hb w krwince oraz średnią masę Hb w krwince) (38).

Skład populacji leukocytów oraz subpopulacji limfocytów oznaczano w cytometrze przepływowym FACStrak (Becton Dickinson). Oznaczano odsetek limfocytów T, Th, Ts, TcR γ δ oraz B.

Krew do badań pobierano do probówek zawierających sól potasową EDTA (EDTA-K, w ilości 1,8 mg/ml krwi) (Medlab).

Bezpośrednio po pobraniu, do probówek wlewano po 50 μ l krwi i dodawano do nich po 0,7 μ l odpowiednich MABs. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po wstępnej inkubacji nadmiar przeciwciał wyplukiwano buforem 1, po czym wirowano przez 5 minut, w temperaturze pokojowej, stosując 200xg obrotów/minutę. Kolejnym etapem było znakowanie prób przy użyciu FITC. W tym celu, z uwagi na fotochemiczny charakter reakcji, inkubowano je w ciemności, przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji próby płukano z nadmiaru przeciwciał związanych z fluorochromem buforem 1, po czym lizowano je przez 5 minut, a następnie wirowano, stosując parametry wirowania analogiczne do przedstawionych powyżej. Pozostałości lizatu płukano buforem 2, odwirowując próby jak wyżej. Gotowy do analizy produkt zawieszano w buforze 3. Do ustalenia „leucogate”, czyli precyzyjnego wybrania limfocytów, a zwłaszcza oddzielenia ich od monocytów, zastosowano dwustopniową inkubację z 2 MABs: anty CD45 znakowanym FITC oraz anty CD14 znakowanym PE. Jako kontrolę użyto próbę inkubowaną z nieznakowanym przeciwciałem anty CD45.

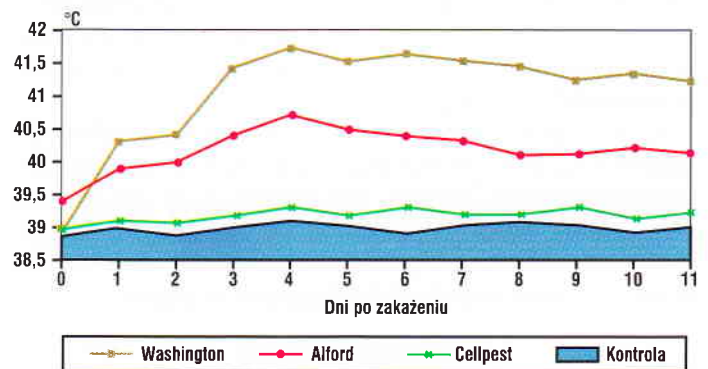
Do analizy wyników stosowano program Simulset i PC Lysys. Do analizy statystycznej wyników wykorzystano test t-Studenta ($p \leq 0,05$).

Wyniki i omówienie

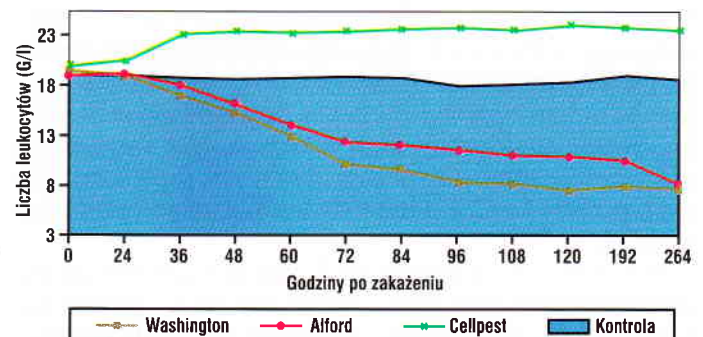
Jak wykazały badania wielu autorów (9, 13, 20, 31) antygenowość i immunogenność szczepów CSFV związana jest z ich zjadliwością. W badaniach własnych uzyskano rezultaty potwierdzające w pełni to spostrzeżenie. Po zakażeniu warchlaków obserwowano, zależnie od zjadliwości szczepu użytego do infekcji, różny obraz kliniczny choroby. Zdecydowanie najcięższy przebieg choroby stwierdzono w grupie zwierząt zakażonych szczepem wysoce zjadliwym. Początkowo, warchlaki zakażane szczepami Washington oraz Alfort (grupa I i II) wykazywały apatię, następnie zmniejszenie lub brak łaknienia. W grupie I już w 24 godziny, a w grupie II w 48 godzin po zakażeniu, obserwowano podwyższenie w.c.c. do 40,3 oraz 40,4°C; szczyt gorączki wystąpił 60 godzin po infekcji osiągając wartość 41,7 i 40,7°C, odpowiednio, podwyższona w.c.c. utrzymywała się do końca okresu obserwacyjnego, tj. do 264 godzin (11 dni) po zakażeniu (ryc. 1). Ciągłej gorączce towarzyszyły objawy ogólne jak niechęć do ruchu oraz zaburzenia w krążeniu, których wynikiem był ciężki stan ogólny i w konsekwencji padnięcia odpowiednio 40 i 20% warchlaków. Badaniem anatomopatologicznym oraz badaniem wiru-

sologicznym wycinków narządów wewnętrznych pobranych w czasie sekcji zwierząt wykazano, że przyczyną padnięć było zakażenie CSFV. W odniesieniu do zwierząt immunizowanych atenuowanym szczepem szczepionkowym (grupa III) oraz kontrolnych (grupa IV), u których nie obserwowano żadnych odchyżeń w stanie klinicznym, a średnia grupowa w.c.c. badanych zwierząt mieściła się przez cały okres obserwacji w granicach norm fizjologicznych (38,0-40,0°C) stwierdzono statystycznie istotne różnice w zakresie analizowanych parametrów klinicznych (ryc. 1).

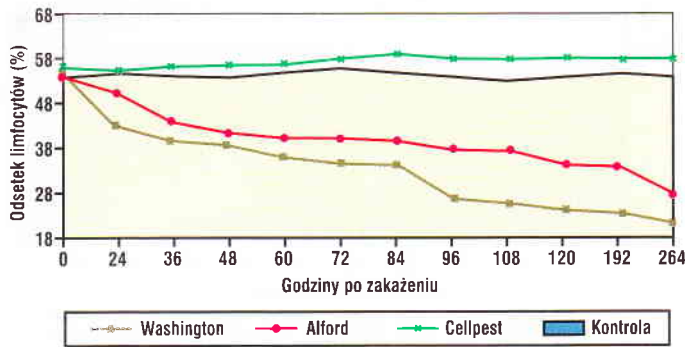
Badaniem morfologicznym oraz cytometrycznym krwi wykazano, podobnie jak poprzednio, wyraźne różnice w poziomie analizowanych parametrów, zależnie od patogenności szczepu użytego do zakażenia zwierząt. Oceniając poziom leukocytów krwi wykazano stopniowy wzrost liczby leukocytów w grupie zakażonej szczepem szczepionkowym. W odniesieniu do kontroli, najwyższą wartość (23,7 G/l) analizowany parametr osiągnął 120 godzin po zakażeniu (ryc. 2). Infekcja warchlaków zjadliwym oraz częściowo atenuowanym szczepem CSFV prowadziła do szybkiej, wyraźnej, leukopenii (ryc. 2). Już 72 godziny po infekcji stwierdzono obniżenie się średniego dla grupy poziomu liczby leukocytów prawie o połowę (z wartości 19,7 do 10,1 w grupie I oraz 19,3 do 12,2 G/l w grupie II), 11 dni po zakażeniu omawiany parametr osiągnął odpowiednio wartość 7 i 8,2 G/l. Przedstawione różnice były sta-



Ryc. 1. Wewnętrzna ciepłota ciała po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości



Ryc. 2. Liczba leukocytów po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

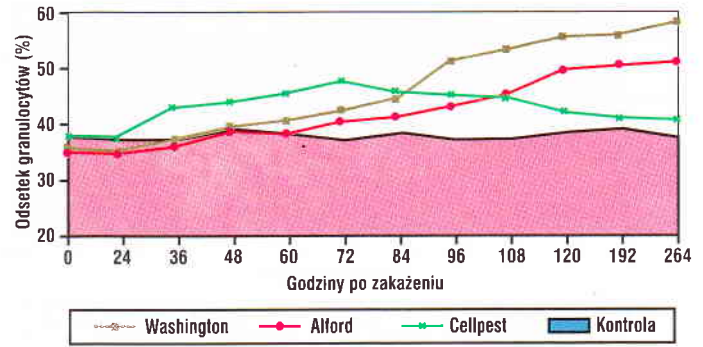


Ryc. 3. Odsetek limfocytów po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

tystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Z danych przedstawionych przez Susa (31), Ehrenspergera (9), a także Van Oirschota (36) również wynika, że infekcja świń CSFV powoduje bardzo silną depresję czynności układu białokrwinkowego oraz leukopenię.

Oceniając skład odsetkowy populacji krwinek białych wykazano wzrost odsetka limfocytów w grupie III oraz stopniowo pogłębiającą się limfopenię w grupach I oraz II (ryc. 3). W grupie warchlaków zakażanych szczepem Washington limfopenia była bardziej nasiloną niż w grupie zakażanej szczepem Alfort, odsetek limfocytów zmniejszył się wskutek infekcji CSFV z poziomu 55,6 do 21% w grupie I oraz z poziomu 55,7 do 27% w grupie II. W tym samym czasie w grupie warchlaków zakażanych szczepem atenuowanym poziom limfocytów wzrósł z 56,5 do 59,4%. Wykazane różnice były statystycznie istotne. Uzyskane rezultaty były zgodne z wynikami innych autorów (11, 34, 35), którzy stwierdzili, że eksperymentalna, śmiertelna infekcja świń powoduje regresję i zmiany histologiczne w tkance limfoidalnej i w konsekwencji limfopenię. Wykazana w badaniach własnych dysfunkcja układu odpornościowego, zwłaszcza silna limfopenia związana była prawdopodobnie z większą ilością wirusa namnażającego się w tkankach zainfekowanych warchlaków, co potwierdza rezultaty uzyskane m.in. przez Loana (18). W przeprowadzonym doświadczeniu powodzeniem zakończyły się próby izolacji wirusa pomoru z limfocytów krwi, co potwierdza jego powinowactwo do układu limforetikularnego oraz wrażliwość limfocytów i innych leukocytów na infekcję. Bezpośrednie działanie destrukcyjne wirusa na limfocyty jest jednak mało prawdopodobne, z uwagi na fakt, że CSFV sporadycznie powoduje pojawienie się efektu cytotatycznego w hodowli limfocytów lub innych komórek w warunkach *in vitro*, a u zwierząt z limfopenią nie wykazano zdolności do odpowiedzi immunologicznej na CSFV (9).

Odmienne tendencje zaobserwowano analizując odsetek granulocytów, po zakażeniu zwierząt szczepami CSFV. U warchlaków grupy I oraz II obserwowano stopniowe, statystycznie istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej, zwiększanie się odset-

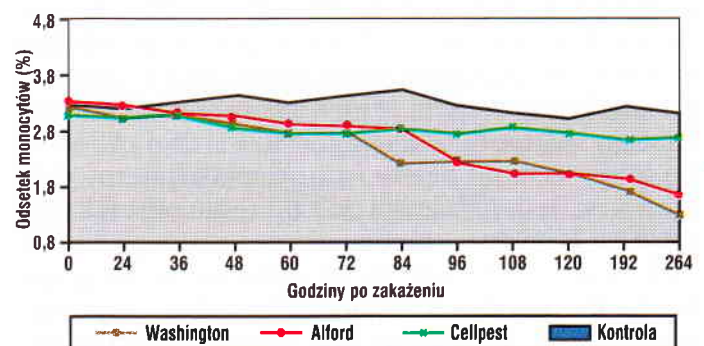


Ryc. 4. Odsetek granulocytów po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

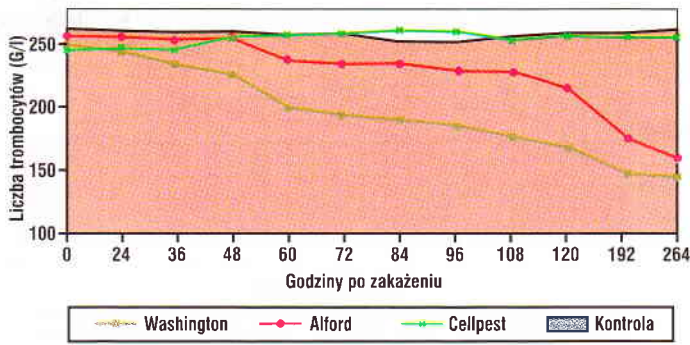
ka neutrofilii z wartości wyjściowej przed zakażeniem 36 oraz 35,5% odpowiednio w grupach I i II do wartości 57,2 oraz 50,3% 11 dni po infekcji. We krwi świń zakażanych szczepem szczepionkowym (grupa III) początkowo obserwowano wzrost odsetka granulocytów z wartości 37,5 do 47%, 84 godziny po aplikacji antygeny wirusowego odsetek granulocytów zaczął się stopniowo obniżać osiągając wartość 40,2% 11 dni po infekcji (ryc. 4). Uzyskane wyniki były zgodne z danymi przedstawionymi przez Susa i wsp. (31).

Obserwując kształtowanie się poziomu odsetka monocytów stwierdzono tendencję do spadku jego wartości we wszystkich grupach zwierząt zakażanych, w odniesieniu do grupy kontrolnej (ryc. 5). Zjawisko to najwyraźniej wyrażone było w grupie warchlaków zakażanych wysoce zjadliwym szczepem wirusa pomoru. W omawianej grupie odsetek monocytów zmniejszył się w czasie trwania infekcji z 3,2 do 1,2%. Podobnie przedstawiał się analizowany parametr w grupie świń zakażanych szczepem Alfort, gdzie stwierdzono spadek jego wartości z 3,3 do 1,6% oraz szczepem Cellpest – z 3 do 2,6%. Stwierdzone różnice były istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do wartości notowanych u warchlaków kontrolnych.

W trakcie badań dotyczących kształtowania się poziomu trombocytów (ryc. 6) wykazano wyraźne zmniejszenie się liczby krwinek płytkowych w przebiegu infekcji CSFV wywołanej przez wysoce zja-



Ryc. 5. Odsetek monocytów po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

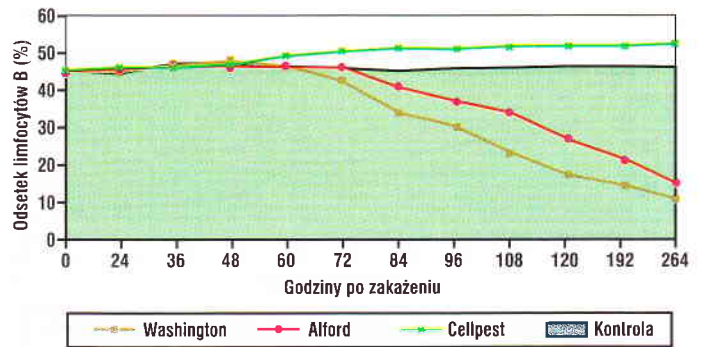


Ryc. 6. Liczba trombocytów po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

dliwy oraz częściowo atenuowany szczep tego wirusa. W przebiegu infekcji CSFV liczba trombocytów obniżyła się statystycznie istotnie z poziomu wyjściowego 250 oraz 256 G/l w grupach I i II do wartości 145 oraz 158,2 G/l w okresie 11 dni po infekcji. Odmienne rezultaty uzyskano w grupie zakażonej szczepem atenuowanym, gdzie zaobserwowano nieznaczny w odniesieniu do kontroli wzrost liczby trombocytów, z 247 do 251 G/l.

Analizując liczbę erytrocytów oraz parametry układu czerwono krwinkowego (średnią objętość erytrocytów, stężenie Hb, średnie stężenie oraz masę Hb w erytrocycie, hematokryt) nie wykazano istotnego wpływu omawianej infekcji na kształtowanie się wartości analizowanych parametrów, w odniesieniu do wartości obserwowanych u warchlaków kontrolnych.

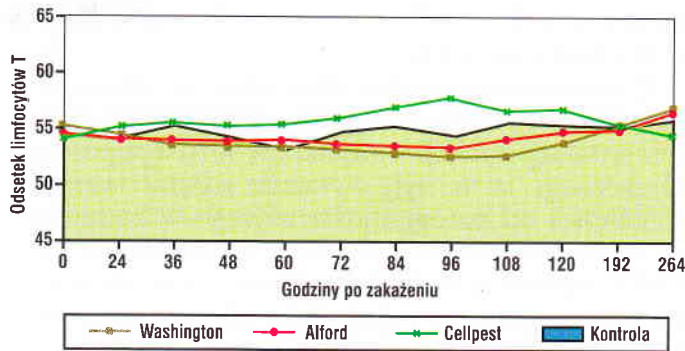
W toku analizy cytometrycznej z zastosowaniem MAbs dla CD2, CD19, CD4, CD8 oraz CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ monitorowano stan układu immunologicznego w przebiegu doświadczalnej infekcji świń wywołanej szczepami CSFV o zróżnicowanej patogenności. Oceniano zachowanie się limfocytów B, T, subpopulacji Th i Ts oraz limfocytów TcR $\gamma\delta$. Stwierdzono, że zakażenie wysoce zjadliwym lub częściowo atenuowanym szczepem wirusa pomoru spowodowało początkowo stopniowy, nieznaczny wzrost odsetka limfocytów B. Tendencja ta utrzymywała się u badanych zwierząt przez 48 godzin w grupie I oraz 72 godziny w grupie II, kiedy to omawiany parametr osiągnął wartość 46,9 i 45,8%; przed zakażeniem kształtował się on odpowiednio na poziomie 44,6 oraz 44,7%. Już w 60 godzin po infekcji warchlaków szczepem Washington oraz 84 godziny po infekcji szczepem Alford zaobserwowano nieznaczny spadek odsetka limfocytów B do 41,9 i 40%, po czym nastąpił dalszy istotny spadek liczby tych komórek. Jedenaście dni po zakażeniu odsetek limfocytów B wynosił odpowiednio w grupach I i II – 10,1 oraz 13,9% (ryc. 7). W odniesieniu do grupy kontrolnej uzyskane różnice były istotne statystycznie ($p \leq 0,05$). Zakażenie świń szczepem szczepionkowym spowodowało nieznaczne pobudzenie humoralnych mechanizmów odpornościowych, utrzy-



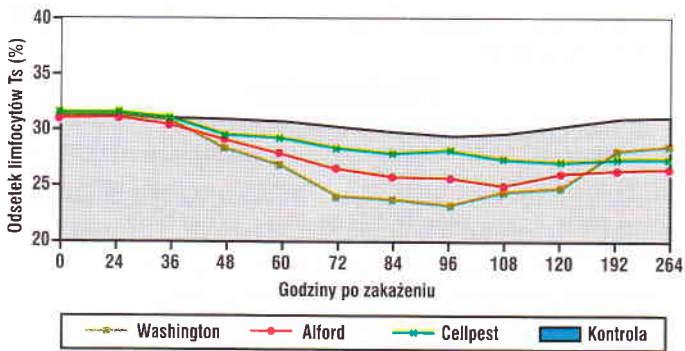
Ryc. 7. Odsetek limfocytów B (CD19+) po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

mujące się przez cały okres trwania obserwacji. U zwierząt tej grupy stwierdzono wzrost odsetka limfocytów B z wartości wyjściowej 44,6% do poziomu 51,3%. Uzyskane rezultaty zgodne są z wynikami otrzymanymi przez innych autorów, aczkolwiek jak podaje Ressay (27) w ostrej postaci pomoru przeciwciała neutralizujące nie pojawiają się we krwi aż do chwili leukopenii, tylko w ostrym przebiegu choroby, pomiędzy 13 a 16 dniem po zakażeniu można obserwować minimalny poziom przeciwciał neutralizujących klasy IgM. Prawdopodobnie, zastosowanie analizy cytometrycznej pozwoliło na rejestrację zmian w układzie odpornościowym w okresie wcześniejszym, niż jest to możliwe przy zastosowaniu metod konwencjonalnych. Takie przypuszczenie nasuwają także opublikowane przez Ressay i wsp. (27) wyniki prac, w których autor podaje, że specyficzne dla wirusa pomoru świń globuliny wykrywano w komórkach techniką fluorescencyjną już w 3 dni po infekcji. Susa i wsp. (31) w swoich pracach wykazali bardzo silną leukopenię w układzie krwionośnym oraz narządach limfatycznych, zwłaszcza w zakresie limfocytów B, 9 i 16 dni po inokulacji zwierząt zjadliwym szczepem CSFV. Wymienieni autorzy wykazali, że niedobór limfocytów B związany jest z destrukcją tkanki limfoidalnej i jest najbardziej istotną patoimmunologiczną konsekwencją ostrej formy infekcji CSFV.

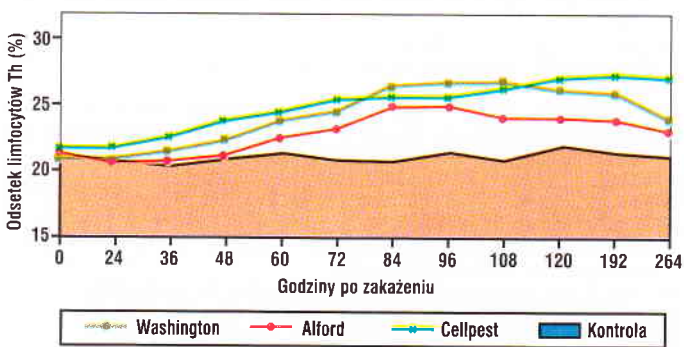
Nieco inaczej przedstawiała się sytuacja w zakresie komórkowych mechanizmów immunologicznych (ryc. 8-11). Odsetek limfocytów T oraz subpopulacji Ts obniżył się po infekcji świń CSFV już w 24 godziny po zakażeniu, po czym zarówno w grupie I i II odsetek limfocytów T spadł nieznacznie z poziomu 54,3 i 54% do 51,7 oraz 52,9%, odpowiednio w okresie do 108 oraz 96 godzin po inokulacji wirusa. Po tym czasie obserwowano stopniowy wzrost jego wartości do poziomu zbliżonego u świń kontrolnych, wynoszącego odpowiednio 55,8 oraz 55,2%. Odsetek subpopulacji Ts w omawianym okresie czasu obniżył się znacząco z wartości 31,4 oraz 31,3% do 23 i 24,5%, po czym nastąpił jego wzrost; 11 dni po zakażeniu kształtował się w grupach I i II na poziomie 28 i 26%.



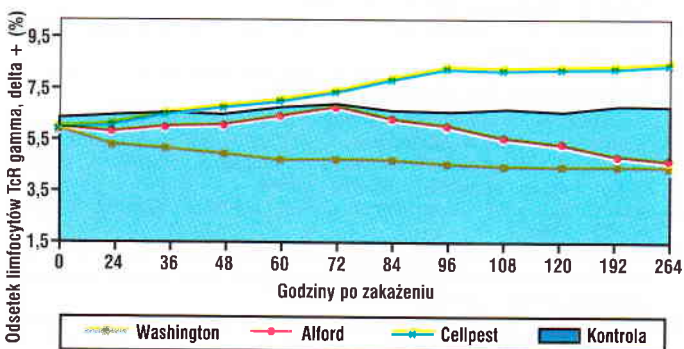
Ryc. 8. Odsetek limfocytów T (CD2+) po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości



Ryc. 9. Odsetek limfocytów Ts (CD8+) po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości



Ryc. 10. Odsetek limfocytów Th (CD4+) po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości



Ryc. 11. Odsetek limfocytów TcR gamma, delta+ po zakażeniu świń szczepami wirusa pomoru o różnej zjadliwości

W grupie świń zakażonych szczepem atenuowanym obserwowano odmienną sytuację. Odsetek limfocytów T zwiększał się przez okres 4 dni po infekcji, z poziomu 54 i 57,3%, a następnie nieznacznie,

stopniowo się obniżał osiągając 11 dni po infekcji wartość wyjściową. W omawianej grupie zwierząt można było także obserwować wyraźną limfopenię, w zakresie subpopulacji Ts. Stwierdzono spadek wartości odsetka komórek Ts utrzymujący się aż do 192 godzin po infekcji, z wartości 31,6 do 26,6%, po czym nieznaczny jego wzrost; 11 dni po zakażeniu omawiany wskaźnik osiągnął wartość 27,1%.

Kolejnym analizowanym parametrem był odsetek limfocytów T pomocniczych. Zaobserwowano, że po zakażeniu zwierząt nastąpił nieistotny statystycznie wzrost poziomu tego wskaźnika, w każdej analizowanej grupie. W grupie III proces ten rejestrowano do końca doświadczenia, kiedy to omawiany wskaźnik osiągnął wartość ok. 27%. W dniu „0”, przed zakażeniem zwierząt, kształtował się on w grupach I, II i III na poziomie 21,2, 21,5 oraz 21,9%. W grupie zakażonej wysoce zjadliwym szczepem wirusa pomoru odsetek limfocytów Th osiągnął wartość maksymalną – 26,7% – 108 godzin po zakażeniu, w grupie II – 24,8% – 96 godzin po infekcji. Po tym czasie obserwowano w omawianych grupach stopniowe obniżanie się jego wartości do poziomu 23,9 i 23%.

Badanie komórkowych mechanizmów odpornościowych, podobnie jak w przypadku odporności humoralnej, uwidacznia różnice wyników własnych w stosunku do prac opublikowanych przez innych autorów. Uważa się, że odpowiedź komórkowa w przypadku infekcji wirusem pomoru jest znikoma (9). Susa i wsp. (31) oraz Trautwein (33) podają, że infekcja CSFV może prowadzić do atrofii grasicy, co bez wątpienia ma wpływ na poziom odpowiedzi komórkowej na zakażenie. W przeprowadzonej analizie wykazano nieznaczny wzrost odsetka limfocytów T u badanych zwierząt; w odniesieniu do grupy kontrolnej uzyskana różnica wynika prawdopodobnie z większej czułości zastosowanej metody analizy, w odniesieniu do metod konwencjonalnych wykorzystywanych przez innych autorów.

Ostatnim ocenianym wskaźnikiem aktywności mechanizmów komórkowej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie CSFV był odsetek limfocytów T z receptorami $\gamma\delta$. Powstają one w grasicy wcześniej, a część z nich różnicuje się i podlega selekcji także poza grasicą (2, 12, 25). Większość z nich nie posiada receptorów CD4 ani CD8 i rozpoznaje antygeny nie połączone z cząsteczkami MHC (28, 29). Traktowane są one jako najbardziej prymitywne limfocyty T. Równocześnie komórki TcR $\gamma\delta$ przejawiają zdolność do spontanicznej cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych oraz cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Dlatego traktuje się je jako komórki o cechach pośrednich między limfocytami T i komórkami NK (12). W badaniach własnych wykazano, że infekcja warchlaków szczepem wysoce zjadliwym spowodowała już w 24 godziny po zakażeniu, obniżenie się

wartości wspomnianych limfocytów, po czym nastąpił stopniowy dalszy spadek odsetka omawianych komórek z poziomu 5,8 do 4,1%. W grupie II obserwowano stan nieznacznego pobudzenia aktywności limfocytów $\gamma\delta$ utrzymujący się przez 72 godziny po infekcji, kiedy stwierdzono wzrost z 5,9 do 6,4%, po czym nastąpiło stopniowe zahamowanie tej aktywności, wyrażone spadkiem odsetka do 4,2% w okresie 264 godzin po infekcji. W grupie immunizowanej szczepem szczepionkowym rejestrowano wzrost aktywności limfocytów $TcR\gamma\delta$ z 5,8 do maksymalnie 7,9% przez cały okres obserwacji zwierząt.

Ellis i wsp. (10) analizowali czynność układu immunologicznego w przebiegu doświadczalnej infekcji bydła, należącymi do pestiwirusów, zjadliwym oraz atenuowanym szczepem szczepionkowym wirusa biegunki i choroby błon śluzowych (BVDV). W przeprowadzonym eksperymencie wymienieni autorzy wykazali utrzymującą się leukopenię, wyrażoną szczególnie spadkiem odsetka limfocytów T, a zwłaszcza T4+ i T8+ (subpopulacji Th i Ts), a także limfocytów B i granulocytów obojętnochłonnych, w przebiegu infekcji zjadliwym szczepem BVDV. Nie obserwowali oni natomiast istotnych, w odniesieniu do kontroli, zmian w obrębie odsetka limfocytów „0” oraz monocytów. W przebiegu infekcji atenuowanym szczepem BVDV nie odnotowano istotnych zmian w zakresie składu odsetkowego komórek układu białokrwinkowego (10). Podobnie Bolin i wsp. (3) prowadząc badania nad dynamiką odpowiedzi immunologicznej w przebiegu doświadczalnej infekcji bydła cytopatycznym szczepem BVDV stwierdzili istotne obniżenie się odsetka limfocytów B oraz T. Z kolei Narita i wsp. (20) zakażając donosowo małą zjadliwym szczepem wirusa pomoru świń 4-dniowe gnotobiotyczne prosięta obserwowali brak typowych objawów klinicznych, natomiast badaniem laboratoryjnym wykazali istotny wzrost poziomu subpopulacji CD4+ i CD8+ limfocytów T oraz ich lokalizację w miejscach replikacji wirusa. Wymienieni autorzy stwierdzili ponadto wzrost liczby limfocytów B w śledzionie, migdałkach oraz węzłach chłonnych krezkowych. Już 7 dni po infekcji obserwowali oni wzrost poziomu IgG i IgM. U jednego zakażonego prosięcia poziom immunoglobulin w migdałkach był 15-60 razy wyższy niż u zwierząt w grupie kontrolnej. Autorzy ci sugerują ponadto, że reakcja limfocytów Ts (CD8+) jest związana z przetrwałą infekcją CSFV. Shimizu i wsp. (30) dokonali cytometrycznej analizy zmian czynnościowych układu odpornościowego w przebiegu infekcji wirusem PRRS. Podobnie jak w przypadku innych infekcji wirusowych, w tym infekcji CSFV, stwierdzili oni występowanie limfopenii, spadek odsetka limfocytów T oraz subpopulacji Th, w okresie do 14 dni po zakażeniu. Ci sami autorzy badając przebieg naturalnej infekcji PRRSV u świń obserwowali tendencję wzrostową w odniesieniu do

limfocytów T oraz Ts, natomiast obniżenie się odsetka limfocytów Th.

Podsumowując można stwierdzić, że analizowane parametry immunologiczne, w przebiegu eksperymentalnej infekcji warchlaków wirusem pomoru klasycznego świń, były wyraźnie zróżnicowane, w zależności od patogenności użytego w badaniach szczepu. Stwierdzono również, że zakażenie świń CSFV wpływa w stopniu istotnym na kształtowanie się poszczególnych wskaźników odporności humoralnej i komórkowej. Wykazano ponadto, że analiza cytometryczna jest metodą przydatną w rejestracji czynnościowych oraz ilościowych zmian w obrębie układu immunologicznego zainfekowanych CSFV zwierząt.

Piśmiennictwo

- Bauman J. G., Bentvelzen P.: Cytometry 9, 517, 1988.
- Bianchi A. T., Zwart R. J., Jeurissen S. H., Moonen-Leusen H. W.: Vet. Immun. Immunopathol. 33, 201, 1992.
- Bolin S. R., McClurkin A. W., Coria M. F.: Am. J. Vet. Res. 46, 884, 1985.
- Chevillat N. F., Mengeling W. L.: Lab. Invest. 20, 261, 1969.
- Corthier G.: Am. J. Vet. Res. 39, 1841, 1978.
- Depner K. R., Greiser-Wilke I., Liess B., Moennig V.: Proc. Int. Symp. Diagnostic procedures and measures to control classical swine fever in domestic pigs and the European wild boar. Puławy, 1996, s. 43.
- Dahle J., Liess B., Frey H. R.: J. Vet. Med. B 34, 729, 1987.
- Edwards S.: Proc. Int. Symp. Diagnostic procedures and measures to control classical swine fever in domestic pigs and the European wild boar. Puławy, 1996, s. 25.
- Ehrensperger F.: Immunological aspects of the infection, w: Classical swine fever and related infections, red. B. Liess. Martinus Nijhoff Publ., Boston Dordrecht Lancaster, 1988.
- Ellis J. A., Davis W. C., Belden E. L., Pratt D. L.: Vet. Pathol. 25, 23, 1988.
- Hermanns W., Trautwein G., Meyer H., Liess B.: Zbl. Med. Vet. B 28, 669, 1981.
- Jakóbsiak M.: Immunologia, Wyd. PWN Warszawa, 1996, s. 167.
- Kamolsiriprichaiporn S., Hooper P. T., Morrissy C. J., Westbury H. A.: Austr. Vet. J. 69, 10, 1992.
- Kawiak J., Skierski J.: Post. Biol. Kom. 19, 239, 1992.
- Kawiak J., Hoser G.: Post. Biol. Kom. 21, 39, 1994.
- Kraj P.: Immunologia Polska 16, 91, 1991.
- Liess B.: Proc. Regional Biotechnology Workshop on diagnosis of classical swine fever, Puławy, 1994, s. 1-6.
- Loan R. W., Rodabaugh D. E.: Am. J. Vet. Res. 27, 1333, 1966.
- Lowings P., Iyata G., Needham J., Paton D.: J. Gen. Virol. 77, 1311, 1996.
- Narita M., Kawashima K., Shimizu M.: J. Comp. Pathol. 114, 257, 1996.
- Niezabitowski A., Lackowska B.: Diagn. Lab. 27, 1, 1991.
- Pajdak W.: Immunologia Polska 21, 269, 1996.
- Pejsak Z., Truszczyński M.: Rozpoznawanie i zwalczanie chorób świń. Wyd. IWet., Puławy, 1995, s. 27-33.
- Pejsak Z.: Medycyna Wet. 51, 191, 1995.
- Reddehase M. J., Saalmuller A., Hirt W.: Curr. Top. Microbiol. Immunol. 173, 113, 1991.
- Remond M., Plateau E., Cruciere C.: Zbl. Vet. Med. B 28, 743, 1981.
- Ressang A.: Zbl. Vet. Med. B 20, 272, 1973.
- Saalmuller A., Reddehase M. J.: Res. Vet. Sci. 45, 311, 1988.
- Saalmuller A., Hirt W., Reddehase M. J.: Eur. J. Immunol. 19, 201, 1989.
- Shimizu M., Yamada S., Kawashima K., Ohashi S., Shimizu S., Ogawa T.: Vet. Immun. Immunopathol. 50, 19, 1996.
- Susa M., König M., Saalmuller A., Reddehase M. J., Thiel H.: J. Virol. 66, 1171, 1992.
- Terpstra C.: Epizootology of hog cholera, w: Classical swine fever and related infections, red. B. Liess, Martinus Nijhoff Publ., Boston Dordrecht Lancaster, 1988, s. 201-216.
- Trautwein G.: Pathology and pathogenesis of the disease, w: Classical swine fever and related infections, red. B. Liess. Martinus Nijhoff Publ., Boston Dordrecht Lancaster, 1988, s. 27-53.
- Van der Molen E. J., Van Oirschot J. T.: Zbl. Med. Vet. B 28, 89, 1981.
- Van Oirschot J. T.: Vet. Microbiol. 4, 321, 1983.
- Van Oirschot J. T., De Jong D., Huffels N.: Vet. Microbiol. 8, 81, 1983.
- Westergaard J. M.: Proc. Int. Symp. Diagnostic procedures and measures to control classical swine fever in domestic pigs and the European wild boar. Puławy, 1996, s. 119.
- Winnicka A.: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wyd. SGGW, Warszawa, 1997.

Adres autora: dr Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy