

# Stan układu odpornościowego świń w przebiegu zakażeń układu oddechowego\*)

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANDRZEJ STĘPNICKI\*, ANNA WINNICKA\*

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

\*Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Nowoursynowska 159 C, 01-776 Warszawa

Markowska-Daniel I., Stępnicki A., Winnicka A.

## Immunological status of pigs during respiratory tract infections

### Summary

The study evaluated the status of pig's immunological systems during streptococci and mixed infections of the respiratory tract caused by *S. suis*, Mhp and PRRSV. T lymphocytes, including the proportions of Th and Tc subpopulations, as well as B lymphocytes were examined. Additionally, CD2+ and CD8+ co-expression with the receptor for IL-2 (CD25) was analyzed. Immunodetection was performed using pairs of monoclonal antibodies against CD2 and CD21, CD4 and CD8 as well as CD5 and CD8, with isotype specific polyclonal antibodies conjugated to fluorochromes.

Infections caused by *S. suis* as well as mixed infections of the respiratory tract resulted in an increase in the total blood leukocyte count, noted in the peak of the disease as well as 4 weeks later. However different mechanisms of specific cellular defense were apparent during streptococci and poliethiological respiratory infections in the pigs. An increase in the percentage of Tc lymphocytes and double positive CD4+CD8+ cells without a decrease in the number of B lymphocytes was noted in animals infected with *S. suis*. An increase in the number of Th and Tc double positive lymphocytes as well as NK cells was observed during infections caused by *S. suis*, Mhp and PRRSV. Additionally, a significant decrease of CD2+ and CD8+ activated T cells co-expressed with CD25 was observed in this group of animals accompanied by an increase in the population of the above cells without the expression of IL-2R receptor.

**Keywords:** immunology, pigs, respiratory tract infections

Mieszane zakażenia układu oddechowego obserwowane są u świń znacznie częściej niż infekcje monotetiologiczne (3, 10, 11, 23). Wyrazem tego może być wprowadzenie do piśmiennictwa w latach 90. ubiegłego stulecia pojęcia zespołu oddechowego świń (8, 17). Istota zakażeń mieszanych polega z reguły na synergizmie lub antagonizmie czynników chorobotwórczych, co może wpływać na ich patogenność, a w konsekwencji powodować zmiany funkcjonalne w obrębie układu immunologicznego gospodarza. Według niektórych autorów zakażenie stada wirusem zespołu rozrodczo-oddechowego (porcine reproductive respiratory syndrome virus, PRRSV) (2, 7, 20) czy *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) (7, 19), z uwagi na udokumentowane immunosupresyjne właściwości wymienionych zarazków, predysponuje do ujawnienia się infekcji powodowanych przez drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze, w tym m.in. paciorkowce świń (*Streptococcus suis*, *S. suis*) (20) czy *Haemophilus parasuis* (Hps) (16). Dla przykładu Galina i wsp. (2) podczas eksperymentalnej donosowej infekcji 13-dnio-

wych prosiąt SPF wirusem PRRS, a następnie zjadliwym szczepem paciorkowca świń serotypu 2 stwierdzili wystąpienie gorączki i objawów oddechowych u wszystkich zwierząt oraz objawy zapalenia centralnego układu nerwowego u połowy z nich. Na podkreślenie zasługuje, że z mózgu prosiąt izolowano *S. suis*, co dowodzi bezpośrednio, że przyczyną obserwowanych objawów klinicznych i zmian patologicznych było zakażenie badanym szczepem paciorkowca. Z kolei u zwierząt otrzymujących wyłącznie *S. suis* nie doszło do zapalenia opon mózgowych, a nasilenie objawów ogólnych było zdecydowanie słabsze.

Na ocenę stanu układu odpornościowego składa się aktualnie badanie komórkowej odporności swoistej, mierzone liczbą limfocytów i ich subpopulacji oraz badanie komórkowej odporności nieswoistej, wyrażone liczbą i aktywnością granulocytów obojętnochłonnych i monocytów.

Celem badań było określenie odporności swoistej w przebiegu zakażenia wywołanego przez *S. suis* oraz zakażenia mieszanego wywołanego przez *S. suis*, Mhp i PRRSV.

\*) Badania wykonano w ramach projektu KBN nr 3 PO6K 001 24.

## Materiał i metody

**Gospodarstwa.** Badania wykonano w trzech chlewniach, oznaczonych symbolami DP, JK i GU, zlokalizowanych na obszarze województwa łódzkiego. Gospodarstwa te zostały wyselekcjonowane na podstawie wyników badań mikrobiologicznych w kierunku zakażeń *S. suis* oraz badań serologicznych w kierunku zakażeń *Mhp* i PRRSV, przeprowadzonych w Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Ferma DP jest tuczarnią odchowującą prosięta pochodzące z dwóch źródeł: z krajowej fermy zarodowej o udokumentowanym statusie zdrowotnym, w której chów odbywa się w cyklu zamkniętym, w systemie „całe pomieszczenie pełne – całe pomieszczenie puste” oraz z importu z Holandii. Zwierzęta te odchowywane są w oddzielnych budynkach inwentarskich. Ogółem obsada tuczarni wynosi około 500 świń. Pomieszczenia inwentarskie tego gospodarstwa są dobrze wentylowane, przy użyciu systemu wentylacji wymuszonej. Zwierzęta utrzymywane są na ruszcie betonowym. W początkowej fazie tuczu stosowane są pasze produkcji Sano, natomiast w końcowej fazie tuczu podawane są pasze produkcji EuroPol, podawane w autokarmnikach, w postaci zraszanej (w systemie „na mokro”). Pojenie odbywa się przy użyciu poidel smoczkowych. W fermie nie stosuje się żadnych programów profilaktycznych. Generalnie nie obserwuje się zachorowań z objawami dysfunkcji układu oddechowego, a straty w sektorze tuczu kształtują się na poziomie ok. 2%.

Stado podstawowe fermy JK składa się z około 120 loch i loszek. Dominującymi rasami są wielka biała polska i polska biała zwisłoucha. Prosięta odsadzane są w wieku 28-30 dni. Średnio od jednej maciory odchowuje się w miocie 11 prosiąt, a w ciągu roku uzyskuje się średnio 2,2 miotu/lochę. Gospodarstwo prowadzi otwarty cykl produkcji. Zasada „całe pomieszczenie pełne, całe pomieszczenie puste” przestrzegana jest w ograniczonym stopniu – wyłącznie w sektorze tuczu. Grupy technologiczne złożone z 28 samic tworzone są w odstępach 30-dniowych. Pomieszczenia gospodarcze są odpowiednio wentylowane, w sektorze warchlakarni i tuczu stosowana jest wentylacja podciśnieniowa, natomiast w pomieszczeniach dla stada podstawowego wentylacja nadciśnieniowa. Lochy prośne oraz karmiące żywione są indywidualnie, zależnie od liczby odchowywanych prosiąt i okresu ciąży, natomiast warchlaki i tuczniaki karmione są *ad libitum*, dozowanymi automatycznie paszami pełnoporcjowymi produkcji własnej wytwarzanymi na bazie komponentów prod. Vitesse. W gospodarstwie stosuje się tzw. żywienie na sucho. Woda do picia dostarczana jest z poidel automatycznych. W fermie nie stosuje się rutynowych szczepień ochronnych, podaje się natomiast żelazo (Suiferrowit, Biowet Puławy) w 3. dniu życia prosiąt oraz prowadzi się odrobaczanie. Od kilku miesięcy w gospodarstwie obserwowano zachorowania zwierząt z objawami typowymi dla streptokokozji. Straty tuczniaków wahały się w granicach 3-4%.

Trzecia chlewnia (GU) zajmuje się wyłącznie odchowaniem prosiąt pochodzących z zakupu z różnych źródeł, głównie na targach. Warunki zoohigieniczne panujące w fermie nie są korzystne, budynki gospodarcze są zniszczone, wenty-

lowane wyłącznie grawitacyjnie. Świnie utrzymywane są na ściółce. Zwierzęta w różnym wieku utrzymywane są w tym samym budynku, łącznie jednorazowo odchowuje się około 350 prosiąt. Tucz trwa około 4,5 miesięcy. Padnięcia tuczniaków kształtują się średnio na poziomie 5%.

**Zwierzęta.** Do badań użyto 21 warchlaków w wieku 12-15 tygodni, które podzielono na 3 grupy:

1) świnię klinicznie zdrową z chlewni DP (n = 7), seronegatywną w kierunku *Mhp* i PRRS, od których nie izolowano paciorkowców,

2) świnię chore z chlewni JK (n = 7), wykazującą typowe kliniczne objawy streptokokozji, u których potwierdzono zakażenie *S. suis* szczepem serotypu 2, a także wykluczono zakażenie *Mhp* i PRRSV,

3) świnię chore z chlewni GU (n = 7), u których obserwowano objawy ogólne infekcji, takie jak: podwyższona temperatura, brak apetytu, kaszel, a badaniem laboratoryjnym potwierdzono u nich występowanie zarówno zakażenia *S. suis*, jak i zakażenia *Mhp* i PRRSV.

**Badania laboratoryjne.** Badania bakteriologiczne wykonywano posiewając materiał na standardowe i wybiórcze podłoża wzrostowe. Obecność paciorkowców w pobranym materiale potwierdzano testem PCR (5).

Badania serologiczne wykonywano metodą ELISA. Poziom przeciwciał swoistych dla PRRSV badano testem prod. Idexx, a dla *Mhp* zestawem prod. Dako.

Liczbę krwinek białych oznaczano w analizatorze hematologicznym Abacus (Francja), a badanie cytometryczne wykonano przy pomocy FACScalibur (Becton Dickinson, BD, USA). Analizy te przeprowadzono w Pracowni Cytometrii Przepływowej Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, wykorzystując do tego celu krew obwodową, pobieraną z żyły czczej przedniej, o stałej porze przed karmieniem. Jako antykoagulantu do określania liczby leukocytów i immunofenotypowania używano EDTA-3K.

Wybrane zwierzęta zostały odizolowane i nie stosowano u nich rutynowej antybiotykoterapii. Świnie zakwalifikowane do grup drugiej i trzeciej poddawano badaniu dwukrotnie. Po raz pierwszy krew pobierano po uzyskaniu potwierdzenia zakażenia, zwykle w szczyt choroby. Ponowną analizę przeprowadzono po czterech tygodniach od pierwszego badania. Zwierzęta kontrolne badano jednokrotnie.

Ocenie poddano limfocyty T, z uwzględnieniem proporcji między komórkami pomocniczymi (Th) i cytotoksycznymi (Tc) oraz limfocyty B. Dodatkowo analizowano koekspresję limfocytów CD2+ i CD8+ z receptorem dla IL-2 (CD25). Cząsteczka ta występuje na większości aktywowanych limfocytów T, co pozwala sądzić o ich gotowości do produkcji IL-2 (12, 14, 18). Immunodetekcję przeprowadzono przy pomocy przeciwciał monoklonalnych (MAbs) produkowanych przez VMRD (USA) i odpowiednich izotypowo przeciwciał poliklonalnych skoniugowanych z fluorochromami, z firmy Pharmingen (BD), zgodnie z procedurą opublikowaną uprzednio (4). Szczegółowy wykaz zastosowanych reagentów przedstawiono w tabeli 1. Limfocyty identyfikowano za pośrednictwem par wybranych cząsteczek różnicowania, tzn. CD2 i CD21, CD4

Tab. 1. Przeciwciała monoklonalne wykorzystane do immunofenotypowania

Linia komórkowa przeciwciał	Izotyp	Cząsteczka różnicowania	Identyfikowany limfocyt
MSA4	IgG2a	CD2	T
74-12-4	IgG2b	CD4	Th
PG114A	IgG1	CD5	T sub i B sub
76-2-11	IgG2a	CD8	Tc/s
BB6-11C9	IgG1	CD21	B
PGBL25A	IgG1	CD25	receptor dla IL-2

i CD8 oraz CD5 i CD8 (13, 21). Wiązano je z odpowiednimi izotypowo, przeciwciałami poliklonalnymi, tj. anti-mysz IgG2a-FITC lub anti-mysz IgG1-PE. Do znakowania przeciwciał o izotypie IgG2b użyto przeciwciał poliklonalnych skoniugowanych z biotyną (IgG2b-Biotin) i Streptavidin-PE.

Do oceny ekspresji cząsteczki CD25 limfocyty krwi obwodowej izolowano na Gradisolu L o c.w. 1,077. Następnie komórki płukano w MEM z dodatkiem 0,5% gentaminy i 10% surowicy płodowej bydlęcej (FCS). Żywotność komórek wynosiła średnio 94%. Limfocyty stymulowano 5 µg/ml Con A w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, przez 24 godz. Po zakończeniu inkubacji limfocyty znakowano podwójnie, stosując Mabs: anti-CD25 i anti-CD2 oraz anti-CD25 i anti-CD8.

Do zbierania danych i analizy wyników cytometrycznych wykorzystywano program CellQuest (BD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych z odchyleniami standardowymi odsetków komórek cechujących się obecnością wybranych antygenów na ich powierzchni.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 6.0. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami poszczególnych parametrów w grupach świń badano testem U Manna-Whitneya przy  $p < 0,05$  w grupach II i III między 1. a 2. pobraniem oraz  $p < 0,01$  między 1. pobraniem w grupie II i III oraz 2. pobraniem w grupie II i III.

## Wyniki i omówienie

Liczba leukocytów oraz odsetek poszczególnych ich populacji, a także liczba limfocytów we krwi świń w grupie I – kontrolnej mieściły się w zakresie wartości referencyjnych dla tego gatunku zwierząt (tab. 2.).

Tab. 2. Liczba leukocytów i limfocytów oraz odsetek populacji krwinek białych ( $\bar{x} \pm SD$ ) u świń zdrowych oraz po zakażeniu *S. suis* lub zakażeniu mieszanym *S. suis*, *Mhp* i *PRRSV* (n = 7)

Grupa	Liczba leukocytów (10 <sup>9</sup> /l)	Populacje leukocytów (%)				Liczba limfocytów (10 <sup>9</sup> /l)	
		eozynofile	neutrofile	monocyty	limfocyty		
I – kontrolna	15,61 ± 1,94	8,29 ± 2,93	43,43 ± 8,08	4,29 ± 2,56	44,0 ± 6,48	6,93 ± 1,61	
II – <i>S. suis</i>	Dzień 0.	27,83 ± 10,41**	2,43 ± 1,27**	53,86 ± 9,58*	4,00 ± 2,45	39,71 ± 9,55	10,63 ± 3,57*
	Dzień 28.	20,99 ± 4,01**	5,60 ± 3,53 <sup>a</sup>	43,00 ± 16,21	9,30 ± 4,08* <sup>a</sup>	42,10 ± 17,47	8,70 ± 3,50
III – <i>S. suis</i> , <i>Mhp</i> , <i>PRRSV</i>	Dzień 0.	26,51 ± 8,95**	14,25 ± 4,50 <sup>b</sup>	33,00 ± 4,76 <sup>b</sup>	4,00 ± 2,16	48,75 ± 8,26	13,03 ± 5,53*
	Dzień 28.	23,41 ± 6,38*	7,71 ± 3,73 <sup>a</sup>	38,43 ± 6,90	5,14 ± 3,81	48,71 ± 9,91	11,86 ± 5,22*

Objaśnienia: różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej przy \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  w grupach II i III między 1. a 2. pobraniem oraz <sup>b</sup>  $p < 0,01$  między 1. pobraniem w grupie II i III oraz 2. pobraniem w grupie II i III

Przyjęto je za punkt odniesienia dla grup świń chorych (II i III).

Infekcja samym paciorkowcem świń (grupa II) oraz zakażenie wieloczynnikowe (grupa III) wywołały istotną leukocytozę, obserwowaną zarówno w szczycie choroby, jak i 4 tygodnie później. Znaczna leukocytoza wynikała m.in. z limfocytozy.

Obraz krwinek białych także był zmienny. Zwierzęta zakażone *S. suis* w szczycie choroby cechowała obniżona liczba eozynofili i neutrofilia. W czasie analizy próbek krwi pozyskanych 4 tygodnie po zakażeniu warchlaków w grupie tej stwierdzono podwojenie odsetka monocytów w porównaniu do kontroli, a także w porównaniu do pierwszego pobrania. Ponieważ monocyty są komórkami, które przenoszą paciorkowce i są miejscem ich rozwoju, należy przypuszczać, że w czasie zakażenia ich pula uległa zmniejszeniu i dopiero po około 2 tygodniach od zakażenia można było zarejestrować procesy naprawcze.

Zakażenie *S. suis* nie spowodowało zmian w proporcjach między odsetkiem limfocytów CD21+, czyli komórek B, a limfocytami CD2+, czyli limfocytami T (tab. 3). W przeciwieństwie do tego omawiane proporcje zostały zachwiane podczas zakażenia mieszanego, szczególnie w szczycie choroby. Nastąpiło wówczas istotne obniżenie odsetka limfocytów B z jednoczesnym podwyższeniem odsetka limfocytów CD2+. Po upływie 4 tygodni od zakażenia odsetek limfocytów B powrócił do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, natomiast odsetek limfocytów CD2+ utrzymywał się nadal na podwyższonym poziomie. Może to wskazywać na różny stopień zużycia komórek w poszczególnych fazach infekcji wieloczynnikowych lub sugerować, że cząsteczka CD2 nie jest markerem wszystkich limfocytów T krwi świń. CD2 wykazuje ekspresję jedynie na połowie komórek linii limfoidalnej – SWC1 (1). Istnieje druga, niejednokrotnie równie liczna, bo szacowana w granicach 10-50% limfocytów, populacja CD2-SWC1+, które są opisywane jako komórki zerowe, bez specyficznych antygenów różnicowania i przez to bez możliwości szybkiej odpowiedzi na antygen (1). Wg Saalmüllera limfocyty T są tylko w 85% CD2+ natomiast wszystkie limfocyty CD2+ wykazują ekspresję TCR $\alpha\beta$  albo TCR $\gamma\delta$  (13).

Tab. 3. Odsetek subpopulacji limfocytów we krwi świń ( $\bar{x} \pm SD$ ) u świń zdrowych oraz po zakażeniu *S. suis* lub zakażeniu mieszanym *S. suis*, *Mhp* i PRRSV (n = 7)

Grupa	Limfocyty (%)							
	CD21+	CD2+	CD4+	CD8+	CD4+CD8+	CD5+	CD5-CD8+	
I – kontrolna	10,94 ± 3,88	48,58 ± 10,86	22,83 ± 8,32	36,51 ± 7,95	11,16 ± 0,91	56,94 ± 4,90	6,41 ± 4,94	
II – <i>S. suis</i>	Dzień 0.	10,24 ± 2,31	53,36 ± 16,14	25,49 ± 7,73	54,28 ± 17,47*	7,98 ± 1,90**	48,13 ± 12,28	11,93 ± 7,63
	Dzień 28.	11,46 ± 6,63	53,24 ± 9,81	26,80 ± 8,87	34,80 ± 11,72 <sup>a</sup>	9,45 ± 2,73**	43,13 ± 11,72*	8,96 ± 5,92
III – <i>S. suis</i> , <i>Mhp</i> , PRRSV	Dzień 0.	1,74 ± 1,23 <sup>ab</sup>	65,42 ± 7,95*	21,80 ± 3,45	50,01 ± 4,49*	10,34 ± 2,19**	55,43 ± 7,30	13,98 ± 4,15*
	Dzień 28.	10,72 ± 3,98 <sup>b</sup>	60,11 ± 9,81*	24,60 ± 7,75	44,39 ± 15,80	15,19 ± 1,15**	65,60 ± 7,72 <sup>ab</sup>	12,88 ± 6,98

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Tab. 4. Odsetek limfocytów T aktywowanych Con A ( $\bar{x} \pm SD$ ), wykazujących koekspresję antygenów CD2 i CD8 z receptorem dla IL-2 (CD25), we krwi świń zdrowych oraz po zakażeniu *S. suis* lub zakażeniu mieszanym *S. suis*, *Mhp* i PRRSV (n = 7)

Grupa	Limfocyty aktywowane (%)						
	CD25+CD2-	CD25+CD2+	CD25-CD2+	CD25+CD8-	CD25+CD8+	CD25-CD8+	
I – kontrolna	25,18 ± 6,92	32,02 ± 20,86	19,31 ± 10,17	38,72 ± 9,73	14,90 ± 13,22	11,85 ± 7,58	
II – <i>S. suis</i>	Dzień 0.	8,12 ± 1,73 <sup>***a</sup>	33,23 ± 29,55	25,02 ± 14,97	25,79 ± 17,60	20,02 ± 17,94	12,62 ± 9,39
	Dzień 28.	5,81 ± 3,90 <sup>***</sup>	32,36 ± 14,76	35,40 ± 10,09*	17,65 ± 11,54 <sup>**</sup>	15,42 ± 7,07	23,10 ± 7,99 <sup>a</sup>
III – <i>S. suis</i> , <i>Mhp</i> , PRRSV	Dzień 0.	4,00 ± 1,30 <sup>***a</sup>	7,93 ± 1,90*	45,72 ± 5,35 <sup>***a</sup>	4,74 ± 3,13 <sup>***b</sup>	5,69 ± 1,55*	30,03 ± 3,77 <sup>a</sup>
	Dzień 28.	13,87 ± 6,35 <sup>ab</sup>	38,35 ± 9,52 <sup>b</sup>	25,75 ± 9,63 <sup>a</sup>	41,82 ± 11,64 <sup>b</sup>	14,76 ± 5,46 <sup>b</sup>	9,47 ± 5,55 <sup>b</sup>

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Uzyskane wyniki badań własnych stanowią uzupełnienie prac Nielsena i wsp. (6) oraz Shimizu i wsp. (15), którzy prowadzili analizy podobnych wskaźników, ale bezpośrednio po szczepieniu i po eksperymentalnym zakażeniu PRRSV.

Drugim markerem limfocytów T była glikoproteina CD5, wykazująca ekspresję na limfocytach T SWC1+ świń oraz także, choć sporadycznie, na niektórych limfocytach B. Limfocyty T świń są w 64% CD5+ (13). Antygen CD5 o wysokiej ekspresji występuje na komórkach TCR $\alpha\beta$ +, a o niskiej na TCR $\gamma\delta$ + (13). Odsetek komórek CD5+ zmieniał się istotnie tylko w czasie drugiego badania, przy czym należy zaznaczyć, że zmiany te były różne w obu grupach, a mianowicie w wyniku zakażenia paciorkowcowego wartość omawianego wskaźnika obniżyła się, natomiast w konsekwencji zakażenia mieszanego podwyższyła się. Wyjaśnienia tego typu zmian można dopatrywać się, analizując proporcje między Th (CD4+) i Tc (CD8+). Zarówno cząsteczka CD4, jak i CD8 występuje na limfocytach T CD2+, CD5+ i TCR $\alpha\beta$ +. Analizując dane przedstawione w tab. 3 można zauważyć, że w szczycie choroby spowodowanej czynnikiem wyłącznie bakteryjnym, jak i w czasie zakażenia mieszanego dominowały limfocyty cytotoksyczne, natomiast po 4 tygodniach w obu grupach ich odsetek istotnie się obniżył.

Na szczególną uwagę zasługuje odsetek komórek podwójnie dodatnich CD4+CD8+. U świń jest to wyjątkowo liczna populacja, stanowiąca, na podstawie badań własnych, około 11% wszystkich limfocytów

krwi. Według Pescovitza (9) od 8% nawet do 68% komórek może wykazywać podwójną ekspresję CD4+CD8+. Jak wskazują na to dane przedstawione w tab. 3, w grupie II liczebność tej populacji komórek istotnie się zmniejszyła, natomiast w zakażeniu mieszanym w szczycie choroby zmniejszyła, po czym, po 4 tygodniach po infekcji znacznie wzrosła. Może to sugerować, że w zakażeniu paciorkowcowym nastąpił bardziej trwały ubytek komórek wykazujących zarówno cechy cytotoksyczności, jak i regulacji, w porównaniu do zakażenia mieszanego, w którym pula tych komórek dość szybko się odnowiła.

Komórki o fenotypie CD8+ to nie tylko limfocyty cytotoksyczne i supresorowe, ale także komórki NK. Nie posiadają one na swojej powierzchni cząsteczki CD5. Wobec braku swoistych dla świń przeciwciał monoklonalnych identyfikujących komórki NK w prezentowanej pracy jako marker omawianych komórek zastosowano koekspresję CD5-CD8+. Istotny wzrost odsetka komórek CD5-CD8+ zaobserwowano w szczycie choroby wywołanej zakażeniem mieszanym. Wskazuje to na dominujący udział komórek NK w pierwszej fazie zakażenia mieszanego, w tym także wirusowego, czego konsekwencją nie był niedobór tej populacji komórek w szczycie choroby. Przeciwnie, mobilizacja szpiku do odtworzenia puli komórek NK spowodowała wzrost ich odsetka, nawet w porównaniu do wartości obserwowanych u zwierząt zdrowych.

W tab. 4 przedstawiono wyniki koekspresji antygenów CD2 i CD8 z receptorem dla IL-2. Istotne zmiany, polegające na obniżeniu odsetka limfocytów CD2+

i CD8+ o ekspresji CD25, w porównaniu do zwierząt zdrowych z grupy kontrolnej, stwierdzono jedynie w ostrym stadium zakażenia mieszanego. Natomiast odsetek limfocytów CD2+ nie wykazujących ekspresji CD25 istotnie wzrósł w szczycie infekcji wieloczynnikowej, na co miał wpływ wzrost odsetka limfocytów CD8+. Pośrednio można sądzić, że w procesie tym miały także udział komórki CD4+, odgrywające istotną rolę w stymulacji odpowiedzi humoralnej. Komórki regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+ stanowią bowiem rezerwę w przygotowaniu puli limfocytów B do produkcji przeciwciał (18, 22).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano różny mechanizm komórkowej obrony swoistej w zakażeniu pojedynczym patogenem bakteryjnym i w zakażeniu wieloczynnikowym. W obu przypadkach w szczycie zakażenia i po 4 tygodniach obserwowano limfocytozę. Różnice stwierdzono dopiero w badaniu subpopulacji limfocytów. W zakażeniu paciorkowcowym odnotowano jedynie wzrost odsetka limfocytów Tc oraz obniżenie odsetka komórek CD4+CD8+, bez równoczesnego obniżenia limfocytów B, co zaobserwowano w zakażeniu mieszanym. W tym jednak przypadku wzrósł jedynie odsetek limfocytów Th i Tc podwójnie pozytywnych oraz komórek NK. Jednocześnie w tej grupie nastąpiło istotne obniżenie odsetka limfocytów T i Tc z koekspresją CD25, a wzrost populacji komórek bez ekspresji IL-2R. Taki wynik sugeruje, że wprawdzie układ odpornościowy zwierząt odbudował zużyte populacje komórek zaangażowanych w zwalczanie infekcji mieszanej, jednak czynność tych komórek, wyrażająca się zdolnością do odpowiedzi na cytokiny i do ich produkcji, pozostała zachwiana.

## Piśmiennictwo

1. Binns R. M.: The null/ $\gamma\delta$  TCR+ T cell family in pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 43, 69-77.
2. Galina L., Pijoan C., Sitjar M., Christianson W. T., Rossow K., Collins J. E.: Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet. Rec.* 1994, 134, 60-64.
3. Higgins R., Gottschalk M.: *Streptococcal Diseases*, [w:] *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa USA 1999, 8, 563-578.
4. Markowska-Daniel I., Pejsak Z., Winnicka A., Collins R. A.: Phenotypic analysis of peripheral leukocytes in piglets infected with classical swine fever virus. *Res. Vet. Sci.* 1999, 67, 53-57.
5. Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.: Identyfikacja drobnoustrojów z gatunku *Streptococcus suis* testem PCR. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 522-525.
6. Nielsen J., Botner A.: Hematological and immunological parameters of 4,5-month old pigs infected with PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 289-294.
7. Pejsak Z., Markowska-Daniel I.: Upośledzenie mechanizmów obronnych – ważna przyczyna zespołów chorobowych świń. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 559-563.
8. Pensaert M., Van Reeth K., Van Gucht S., Labarque G.: Poznanie patogenez zespołu oddechowego świń podstawą opracowania skutecznych metod zwalczania choroby. *Magazyn Wet. Suppl. Świnie* 2002, 13-16.
9. Pescovitz M. D., Sakopoulos A. G., Gaddy J. A., Husmann R. J., Zuckermann F. A.: Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 43, 53-62.
10. Pol J. M., van Leengoed L. A., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G.: Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 259-264.
11. Reams R., Glickman L. T., Harrington D. D., Thacker H. L., Bowersock T. L.: *Streptococcus suis* infection in swine: A retrospective study of 256 cases.

- Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 326-334.
12. Rodriguez F., Ramirez G. A., Sarradell J., Andrada M., Lorenzo H.: Immunohistochemical labeling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 2004, 130, 306-312.
  13. Saalmüller A., Bryant J.: Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 43, 45-52.
  14. Sipos W., Duvinneau J. C., Willhelm M., Schilher F., Hartl R. T., Hofbauer G., Exel B., Pietschmann P., Schmoll F.: Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 99, 63-71.
  15. Shimizu M., Yamada S., Kawashima K., Ohashi S., Shimizu S., Ogawa T.: Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 50, 19-27.
  16. Solano G. I., Segales J., Collins J. E., Molitor T. W., Pijoan C.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 247-257.
  17. Stevenson G. W.: Bacterial contributors to porcine respiratory disease complex (PRDC). *Proc. 24 Meeting Am. Assoc. Swine Pract.* 1993, s. 351-366.
  18. Suradhat S., Sada W., Buranapraditkun S., Damrongwatanapokin S.: The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, 106, 197-208.
  19. Thacker E. L., Thacker B. J., Young T. F., Halbur P. G.: Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 2000, 18, 1244-1252.
  20. Thanavongnuwech R., Brown G. B., Halbur P. G., Roth J. A., Royer R. L., Thacker B. J.: Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Vet. Pathol.* 2000, 37, 143-152.
  21. Thome M., Hirt W., Pfaff E., Reddehase M. J., Saalmüller A.: Porcine T-cell receptors: molecular and biochemical characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 43, 13-18.
  22. Vahlenkamp W. T., Tompkins M. B., Tompkins W. A. F.: The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, 108, 219-225.
  23. Vecht U., Wisselink H. J., van Dijk J. E., Smith H. E.: Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.* 1992, 60, 550-556.

Adres autora: doc. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: iwonamd@piwet.pulawy.pl