

Wskaźniki odporności u królików eksperymentalnie zakażonych szczepami wirusa RHD o odmiennych właściwościach hemaglutynacyjnych

BEATA TOKARZ-DEPTUŁA, PAULINA NIEDŹWIEDZKA,
BEATA HUKOWSKA-SZEMATOWICZ, WIESŁAW DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Przyrodniczych USz, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Tokarz-Deptuła B., Niedźwiedzka P., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.
Indices of immunity in rabbits experimentally infected with strains of RHD virus differing in haemagglutination properties

Summary

The aim of the study was to monitor alterations in selected indices of innate immunity (the phagocytic index and percent of phagocytes) and acquired immunity (numbers of lymphocytes T and their Th and Tc/Ts subpopulations) in 60 rabbits experimentally infected with haemagglutininogenic Czech strain CAMP V-351 and non-haemagglutinating Polish BLA. The haemagglutininogenic Czech strain CAMP V-351 is active only in select indices of innate immunity, whereas non-haemagglutinating Polish strain BLA is reactive in the parameters of acquired immunity. Therefore, the obtained results permit the conclusion that the examined strains are not only serologically different but they also induce distinct patterns of immune responses, which provides evidence of immunotypes among this virus.

Keywords: RHD virus, haemagglutininogenic strain

Badania wskaźników immunologicznych u królików eksperymentalnie zakażonych i szczepionych różnymi szczepami (francuskimi, polskimi, czeskimi, chińskimi i hiszpańskim) wirusa RHD, wykazały wywoływanie przez nie odmiennej reakcji immunologicznej (3, 6, 7, 10, 12-19). Należy podkreślić, że oprócz znanych szczepów wirusa RHD, które posiadają zdolności hemaglutynacyjne krwinek czerwonych, stwierdzono cztery szczepy – hiszpański Asturias (9), angielski Rainham (2), niemiecki Frankfurt (11) i polski BLA (8), które nie wykazują tej cechy (właściwości), co wskazuje na występowanie w grupie tego wirusa szczepów o odmiennym serotypie.

Materiał i metody

Celem badań było określenie zmian w obrębie wybranych wskaźników odporności naturalnej oraz nabytej, u królików eksperymentalnie zakażonych dwoma szczepami RHDV, o odmiennych właściwościach hemaglutynacyjnych.

Badania przeprowadzono w dwóch seriach na 60 królikach oznaczonych według norm krajowych jako zwierzęta konwencjonalne, będące pod stałym nadzorem weterynaryjno-zoohigienicznym (1). Pierwsza grupa zwierząt (20 sztuk) została zakażona domięśniowo 1 ml rozpuszczone-

go w jałowej wodzie destylowanej liofilizatu hemaglutynogenego szczepu czeskiego CAMP V-351, natomiast druga grupa zwierząt (20 sztuk) otrzymała analogiczną drogą niehemaglutynogeny szczep polski BLA wirusa RHD. Szczep CAMP V-351 wirusa RHD pochodził z Banku Mikroorganizmów Instytutu Weterynaryjnego w Brnie (Czechy), natomiast szczep BLA wirusa RHD z kolekcji Zakładu Pryszczycy w Zduńskiej Woli – Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach i oba pochodziły od padłych naturalnie królików (12). Wirusy użyte do zakażenia zwierząt to 20% homogenizaty wątroby królików zakażonych eksperymentalnie, poddane oczyszczeniu i wirowaniu oraz liofilizacji według procedury podanej wcześniej (12). Miano wirusów określano testem hemaglutynacji HA i wynosiło ono w przypadku szczepu czeskiego CAMP V-351 – 10240. Każdej grupie zwierząt zakażonych odpowiadała grupa zwierząt kontrolnych w ilości 10 sztuk, którym podano domięśniowo jałową wodę destylowaną w ilości analogicznej jak u zwierząt zakażonych, to jest 1 ml.

Krew do badań pobierano z żyły brzeżnej ucha królika w godzinie „0”, czyli przed podaniem antygeny wirusowego oraz w 4, 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56 i 60 h po zakażeniu. Badania prowadzono do pojawienia się pierwszych objawów klinicznych charakterystycznych dla pomoru królików. Indeks pochłaniania (IP) i procent komórek pochłaniających (%kp) (PMN) określano metodą Ładosza w mo-

Tab. 1. Wybrane wskaźniki odporności naturalnej i nabytej u królików eksperymentalnie zakażonych szczepem polskim BLA

Badane parametry		Wartości parametrów w poszczególnych											
		0		4		8		12		24		36	
		Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 19	K n = 10
Wskaźniki odporności naturalnej	indeks pochłaniania (l.b.)	12,60 0,76	14,30 1,23	13,00 0,98	13,50 1,03	13,70 1,09	13,80 1,00	13,30 0,88	13,20 0,97	13,70 1,00	13,10 0,99	13,20 1,00	13,20 0,98
	% komórek pochłaniających (%kp)	36 7,04	45 7,02	49 8,34	53 8,94	59 9,04	53 8,92	56 10,02	48 7,36	54 7,99	52 8,00	53 8,67	49 9,03
Wskaźniki odporności nabytej	limfocyty T CD5+ (%)	49,22 8,31	51,31 10,01	59,45 6,17	57,50 4,24	59,38 7,61	48,60 7,92	60,00* 6,42	48,05 3,46	53,30 9,42	54,73 11,58	53,20* 7,61	42,70 0,14
	limfocyty Th CD4+ (%)	39,56 6,36	36,60 5,49	48,03 4,67	41,30 3,96	43,28 5,97	41,75 2,05	46,30* 4,22	35,65 5,87	52,91 8,82	42,47 10,73	41,10* 4,26	32,95 7,28
	limfocyty Tc/Ts CD8+ (%)	20,41 5,23	19,40 4,14	13,65 3,55	13,24 1,12	12,27 3,34	9,12 2,51	18,56* 4,17	9,65 1,31	34,12* 4,68	14,33 3,12	32,76* 4,89	9,76 2,21

Objaśnienia: Z – zwierzęta zakażone; K – zwierzęta kontrolne; n – liczba zwierząt; * – różnica statystycznie istotna przy p = 0,05

Tab. 2. Wybrane wskaźniki odporności naturalnej i nabytej u królików eksperymentalnie zakażonych szczepem czeskim

Badane parametry		Wartości parametrów w poszczególnych											
		0		4		8		12		24		36	
		Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 20	K n = 10	Z n = 19	K n = 10
Wskaźniki odporności naturalnej	indeks pochłaniania (l.b.)	6,7 1,4	6,0 1,2	5,9 1,3	7,5* 1,3	5,6 1,2	6,7* 1,2	7,0 1,8	6,4 0,8	7,4 1,9	8,3 2,6	7,2 1,9	8,2 1,7
	% komórek pochłaniających (%kp)	63,9 11,2	66,0 6,1	62,1 11,9	59,6 15,3	60,3 10,2	64,4 14,0	63,2 11,1	68,9 13,8	65,9 12,3	71,6 8,6	72,0 12,4	70,2 11,0
Wskaźniki odporności nabytej	limfocyty T CD5+ (%)	61,6 5,5	68,6 6,5	50,7 8,5	59,1 6,4	48,9 10,2	59,2 7,0	54,2 7,8	58,8 7,6	62,6 7,9	69,1 5,3	67,4 9,6	61,8 14,0
	limfocyty Th CD4+ (%)	43,6 7,5	44,3 1,8	35,5 9,5	36,9 11,6	35,9 7,7	35,5 6,9	35,8 8,6	44,5 9,5	43,2 8,6	43,8 7,6	47,3 13,2	36,2 9,6
	limfocyty Tc/Ts CD8+ (%)	21,2 9,2	24,9 12,1	19,4 5,9	16,6 3,4	14,0 5,0	14,2 3,9	16,0 5,3	15,9 3,1	22,7 5,6	21,5 5,6	23,7 4,8	20,4 4,5

Objaśnienia: jak w tab. 1.

dyfikacji Deptuły i Zemana (12), natomiast liczbę limfocytów T i ich subpopulacji oznaczano na cytometrze przepływowym – FacsScan Calibur company, firmy Becton Dickinson z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (mouse anti-rabbit) firmy Serotec dla identyfikacji CD5+ (limfocyt T), CD4+ (limfocyt Th) oraz CD8+ (limfocyt Tc/Ts) (4).

Wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta wg programu Statistica wersja 6.0 przy p = 0,05 i przedstawiono w tab. 1 i 2 w postaci wartości średnich (\bar{x}) i odchylenia standardowego (SD \pm).

Wyniki i omówienie

Wyniki statystycznie istotne z zakresu indeksu pochłaniania (IP) uzyskane przy hemaglutynogennym szczepie czeskim CAMP V-351 wirusa RHD manifestują się wzrostem przypadającym jedynie na 52 h obserwacji oraz spadkiem występującym w 4 i 8 h po zakażeniu, zaś w przypadku procentu komórek pochłaniających (%kp) zarejestrowano tylko jego wzrost w 60 h (tab. 2). W przypadku niehemaglutynogenego szczepu polskiego BLA nie wykazano zmian sta-

tystycznie istotnych we wskaźnikach odporności naturalnej, to jest w wartościach IP i %kp (tab. 1). Natomiast we wskaźnikach odporności nabytej, jak procent limfocytów T, Th i Tc/Ts, w przypadku hemaglutynogenego szczepu CAMP V-351 wirusa RHD nie stwierdzono zmian statystycznie istotnych (tab. 2), zaś parametry te przy niehemaglutynogennym szczepie BLA tego wirusa dawały zmiany statystycznie istotne i charakteryzowały się wzrostem procentu limfocytów T i Th w 12, 36, 52, 56 h oraz limfocytów Tc/Ts w 12, 24, 36, 48, 52, 56, 60 h (tab. 1).

Uzyskane rezultaty badań w zakresie indeksu pochłaniania (IP) i procentu komórek pochłaniających (%kp) przy hemaglutynogennym szczepie czeskim CAMP V-351 i niehemaglutynogennym szczepie BLA można porównać do wyników uzyskanych jedynie przy szczepach hemaglutynogennych, to jest pięciu szczepach polskich (Kr-1, MAŁ, PD, KGM, SGM), dwóch szczepach francuskich (Fr-1, Fr-2) i trzech szczepach czeskich (CAMP V-561, CAMP V-562, CAMP V-558) (3, 7, 12-19). Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, że wcześniej przebadane szczepy wi-

wirusa RHD ($\bar{x} \pm SD$)

godzinach							
48		52		56		60	
Z	K	Z	K	Z	K	Z	K
n = 19	n = 10	n = 19	n = 10	n = 19	n = 10	n = 7	n = 10
13,70	13,20	13,20	13,10	13,20	13,10	13,10	12,90
1,04	0,87	0,67	0,86	0,73	0,99	1,02	0,56
55	57	48	47	47	50	46	37
9,24	6,66	5,98	6,87	7,85	6,98	7,00	5,87
57,40	51,46	60,57*	40,10	49,95*	40,85	56,42	50,30
12,24	12,94	3,15	2,12	12,66	7,71	4,73	10,39
39,82	39,69	50,47*	27,80	47,90*	31,15	43,80	43,72
4,55	8,80	8,35	6,93	5,09	6,01	1,46	7,54
22,83*	10,45	33,19*	7,45	49,11*	9,17	37,98*	18,78
6,23	2,22	6,81	2,25	9,74	2,59	9,36	3,31

CAMP V-351 wirusa RHD ($\bar{x} \pm SD$)

godzinach							
48		52		56		60	
Z	K	Z	K	Z	K	Z	K
n = 19	n = 10	n = 19	n = 10	n = 19	n = 10	n = 7	n = 10
11,3	7,5	11,4*	5,7	5,7	4,9	5,7	5,0
4,4	3,2	3,1	2,3	0,4	2,3	0,4	1,5
77,4	70,0	64,0	74,0	78,0	67,3	80,6*	50,5
8,3	7,5	11,6	8,0	7,9	9,7	8,2	8,4
52,4	55,8	57,8	52,4	58,7	58,2	50,7	45,2
1,5	1,4	6,7	3,0	5,4	0,8	14,4	10,0
41,3	33,1	37,5	36,0	38,1	37,8	36,2	40,7
6,6	1,4	0,4	5,7	3,3	10,2	7,6	3,1
13,3	21,9	18,6	23,0	20,4	24,5	14,0	17,8
7,1	6,6	4,3	4,4	1,8	4,1	1,4	4,9

rusa RHD wykazywały zróżnicowaną reakcję układu immunologicznego tak w zakresie parametrów odporności naturalnej (m.in. proces fagocytozy), jak i nabytej (liczba limfocytów T, B i ich subpopulacji) (15-17, 19). Oceniając wyniki z zakresu IP przy hemaglutynogennym szczepie CAMP V-351 manifestujące się krótkotrwałym wzrostem w 52 h po zakażeniu, należy stwierdzić, że podobne rezultaty zarejestrowano przy szczepie polskim Kr-1 (48 h) (3) i czeskim CAMP V-562 (60 h) (7). Zmiany również w postaci wzrostu IP, ale dłużej trwające rejestrowano przy polskim szczepie MAŁ wirusa RHD (4, 48 h) (18), szczepie PD (8, 52, 56, 60 h) (19), szczepie francuskim Fr-2 (8, 24 h) (18) oraz czeskim szczepie CAMP V-558 wirusa RHD (12, 24 h) (7). Natomiast uzyskany w badaniach własnych przy szczepie czeskim CAMP V-351, spadek wartości IP przypadający na 4 i 8 h doświadczenia, znajduje potwierdzenie w wynikach uzyskanych przy szczepie polskim PD, gdzie zarejestrowano spadek w 4, 8 h (19) oraz w 56 h przy szczepie francuskim Fr-2 (18). Oceniając wyniki uzyskane w zakresie %kp przy badanym obecnie hemaglutynogennym szczepie

czeskim CAMP V-351 wirusa RHD, przy którym zarejestrowano jedynie wzrost tego parametru w 60 h doświadczenia, należy zauważyć, że zbliżone były one do wyników uzyskanych przy szczepie polskim KGM (36 h), SGM (36 h) oraz MAŁ (4, 60 h) (18), a także przy szczepie czeskim CAMP V-561 (24 h), CAMP V-562 (48 h) i CAMP V-558 (48 h) tego wirusa (7).

Natomiast analizując wyniki IP uzyskane przy niehemaglutynogennym szczepie BLA wirusa RHD, przy którym nie stwierdzono zmian statystycznie istotnych w badanym parametrze, trzeba stwierdzić, że identyczny obraz rejestrowano przy hemaglutynogennym szczepie polskim KGM, SGM i francuskim Fr-1 (18) oraz czeskim CAMP V-561 (7). Ponadto brak w obecnych badaniach zmian w wartościach %kp uzyskany przy szczepie BLA, zgodny jest z wynikiem otrzymanym przy hemaglutynogennych szczepach polskich Kr-1 (3) i PD (19) wirusa RHD oraz przy szczepach francuskich Fr-1 i Fr-2 (18).

Analizując wyniki badań uzyskane w zakresie odporności nabytej mierzonej liczbą limfocytów T, Th oraz Tc/Ts, uzyskane przy hemaglutynogennym szczepie CAMP V-351 i niehemaglutynogennym BLA wirusa RHD, można porównać do wyników uzyskanych przy hemaglutynogennym szczepie polskim Kr-1 (14), szczepie francuskim Fr-2 (15) oraz trzech szczepach czeskich CAMP V-561, CAMP V-562 i CAMP V-558 (7). Brak istotnych zmian w wartościach limfocytów T, Th i Tc/Ts przy obecnie badanym, hemaglutynogennym szczepie czeskim CAMP V-351 jest zgodny z rezultatami uzyskanymi przy szczepie czeskim CAMP V-558 (7). Ponadto przy szczepie czeskim CAMP V-562 uzyskano brak zmian w procencie limfocytów Tc/Ts (7), zaś przy szczepie francuskim Fr-2 zarejestrowano brak zmian w procencie limfocytów Th i Tc/Ts (14). Stwierdzony przy niehemaglutynogennym szczepie BLA wzrost procentu limfocytów T i Th (12, 36, 52, 56 h) oraz limfocytów Tc/Ts (12, 24, 36, 48, 52, 56, 60 h), jest zgodny z rezultatami otrzymanymi przy hemaglutynogennym szczepie francuskim Fr-2, gdzie także zarejestrowano długotrwały wzrost limfocytów T (12, 36, 52, 56, 60 h), Th (12, 24, 36, 52, 56, 60 h) i Tc/Ts (8, 12, 36, 56 h) (14). Podobny obraz uzyskano przy hemaglutynogennym szczepie polskim Kr-1 (14), przy którym wzrost dotyczył limfocytów T (8, 36, 56 h), Th (36, 48, 52 h) i Tc/Ts (8, 48, 52 h). Zmiany krócej trwające, a także charakteryzujące się wzrostem liczby limfocytów T, Th i Tc/Ts zarejestrowano również przy hemaglutynogennym szczepie czeskim CAMP V-561, natomiast spadek liczby limfocytów T i Th w 52 h powodował szczep CAMP V-562 (7).

Podsumowanie

Reasumując można stwierdzić, że użyte szczepy wirusa RHD różniące się zdolnością hemaglutynacji, powodują odmienną odpowiedź immunologiczną.

Hemaglutynogeny szczepu czeski CAMP V-351 wykazuje aktywność jedynie we wskaźnikach odporności naturalnej (indeks pochłaniania i % komórek pochłaniających), która jest podobna do tej, jaką uzyskano przy szczepach Kr-1 i CAMP V-562 wirusa RHD, natomiast niehemaglutynogeny szczepu polski BLA wzbudza tylko aktywność w zakresie odporności nabytej (ilość limfocytów T, Th, Tc/Ts), która najbardziej jest zbliżona do szczepu Fr-2 tego wirusa. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że szczep wirusa RHD różniące się pod względem serologicznym (serotypy), różnią się także pod względem immunologicznym, co potwierdzałyby rezultaty wieloletnich badań własnych (3, 7, 12-19), że w obrębie tego wirusa prawdopodobnie występują immunotypy (13), na co nie zwraca się uwagi przy jego charakterystyce biologicznej i systematyce (5).

Piśmiennictwo

1. Anon.: Karty informacyjne do założeń technologicznych produkcji zwierzęcej: Zwierzęta laboratoryjne, [w:] Mat. Informacyjno-Szkoleniowe ds. Zwierząt Laboratoryjnych ZG SITR, Warszawa 1987, 2, 26-77.
2. Chasey D., Lucas M. H., Westcott D. G., Sharp G., Kitching A., Hughes S. K.: Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.* 1995, 137, 158-160.
3. Deptuła W., Kęsy A., Tokarz-Deptuła B., Stosik M., Travnicek M.: Dynamics of selected parameters in rabbits infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Folia Vet.* 1999, 42, 17-22.
4. Deptuła W., Kostrzewa A., Stosik M., Tokarz-Deptuła B., Wiktorowicz K.: Subpopulacje limfocytów krwi obwodowej u królików. *Nowiny Lekarskie* 1998, 67, 377-382.
5. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A.: *Virus Taxonomy*. Elsevier Academic Press, Amsterdam 2005.
6. Huang Do Hai-Bo: Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991, 10, 481-498.
7. Hukowska-Szematowicz B.: Charakterystyka immunologiczno-genetyczna wybranych szczepów wirusa RHD (rabbit haemorrhagic disease). Praca doktorska, Wydz. Nauk Przyrod. Uniw. Szczecin., Szczecin 2006.
8. Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski W., Paprocka G., Walkowiak B.: A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbits virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1996, 15, 1029-1035.
9. Prieto J. M., Martin J. M., Espi A.: A new non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus. *Mat. Konf. 5 Int. Cong. Europ. Soc. Vet. Virol.* 2000, s. 204-205.
10. Ramiro-Ibanez F., Martin-Alonso J. M., Garcia Palencia P., Parra F., Alonso C.: Macrophage tropism of rabbit haemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res.* 1999, 60, 21-28.
11. Schirmer H., Reimann I., Köllner B., Granzow H.: Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.* 1999, 144, 719-735.
12. Tokarz-Deptuła B.: Kształtowanie się wybranych wskaźników odporności nieswoistej u królików po zakażeniu wirusem VHD (viral haemorrhagic disease). Praca doktorska, PIW Puławy 1998.
13. Tokarz-Deptuła B.: Obraz odpornościowy u królików po zakażeniu różnymi szczepami i dawkami wirusa RHD (rabbit haemorrhagic disease) i po podaniu rekombinowanego TNF- α . Rozprawa habilitacyjna, US Szczecin 2006 (w przygotowaniu).
14. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Dynamic alterations in peripheral blood lymphocytes in rabbits experimentally infected with VHD (viral haemorrhagic disease) virus – Polish strain Kr-1. *Pol. J. Vet. Sci. (Suppl. 3)* 2003, 6, 67-69.
15. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: T and B lymphocytes and their subpopulations in peripheral blood in rabbits experimentally infected with Fr-2 strain of viral haemorrhagic disease (VHD) virus. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2004, 48, 367-370.
16. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: The immunity during immunization with the viral haemorrhagic disease (VHD) in rabbits. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2004, 29, 58-62.
17. Tokarz-Deptuła B., Deptuła W., Kęsy A.: Pomór królików ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk odpornościowych. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 497-500.
18. Tokarz-Deptuła B., Hukowska B., Deptuła W.: Ingestion capacity of PMN cells in peripheral blood of rabbits experimentally infected with VHD (viral haemorrhagic disease) virus strain originating from various biotopes. *Pol. J. Vet. Sci. (Suppl. 3)* 2003, 6, 271-274.
19. Tokarz-Deptuła B., Nowaczyk P., Hukowska B., Deptuła W.: Kształtowanie się wskaźników nieswoistej odporności komórkowej u królików zakażonych wirusem VHD (viral haemorrhagic disease) – szczep polski PD. *Post Mikrobiol. (Supl. I)* 2004, 43, 426.

Adres autora: prof. dr hab. Wiesław Deptuła, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@sus.univ.szczecin.pl