

Subpopulacje limfocytów T we krwi kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka

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

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

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

Subpopulations of T lymphocytes in the blood of chickens vaccinated against Marek's disease

Summary

The aim of the study was the comparison of the percentage of the T lymphocytes subpopulation in the blood of chickens vaccinated against Marek's disease in ovo or during the first day of life. The commercial, lyophilised turkey vaccine strain HVT FC 126 was used in the experiment. A dose of 2400 PFU of the vaccine virus was applied to 28 chicken SPF embryos (group I) on the 18th day of incubation. Group II was constituted by 23 one-day-old chicks, inoculated with the mentioned dose of the virus, three hours after breeding. The control group was represented by twenty-two non vaccinated birds. All the groups were kept in separate rooms. Blood samples were collected on 1st, 3rd, 7th, 10th, 14th, 28th, 42th and 56th days of life. FICT labeled monoclonal mouse antibodies against chicken surface receptors CD3+, CD4+, and CD8+ were applied for determining T lymphocyte subpopulations. A flow cytometer was used for the designation of markers on the cell surface. In the first week of life, a higher percentage of T lymphocytes CD3+, CD4+, and CD8+ was observed in vaccinated birds (group I and II) in comparison to the control group. However, the observed differences were not statistically significant. Later on the examined parameters were similar to the physiological ones, but differentiation between particular groups was noticed. The vaccination with HVT FC 126 strain in ovo or in the first day of life did not result in quantitative changes in T lymphocyte subpopulations in peripheral blood.

Keywords: chickens, Marek's disease virus, vaccination, T lymphocytes

Choroba Mareka (MD) jest nowotworową chorobą drobiu wywołaną przez herpeswirus choroby Mareka. Herpeswirus MD ma właściwości limfotropowe, występuje w formie ściśle związanej z komórką, zakażeniu ulegają limfocyty B oraz T. Cechą charakterystyczną zakażenia, zarówno zjadliwym – terenowym, jak i szczepionkowym wirusem MD jest wiremia utrzymująca się przez całe życie ptaka (1, 5).

W immunoprofilaktyce choroby Mareka stosowane są szczepionki zawierające atenuowane szczepy serotypu 1, szczep herpeswirusa indyjskiego HVT FC 126 (serotyp 3) lub kombinację tych dwóch serotypów (szczepionki biwaletne) (5, 9). Szczepieniu poddaje się jednodniowe pisklęta tuż po wylęgu, a także coraz powszechniej podaje się szczepionkę *in ovo* w 18. dniu inkubacji zarodków. Do szczepień *in ovo* stosuje się najczęściej szczepionki oparte na szczepie HVT FC 126 (5, 9). Szczepienie nie hamuje zakażenia wirusem zjadliwym ani jego namnażania w organizmie, hamuje natomiast powstawanie zmian nowotworowych w narządach wewnętrznych ptaków. Szczepy szczepionkowe zabezpieczają przed wczesną replikacją zjadliwych terenowych wirusów w tkankach lim-

foidalnych, a także obniżają poziom latentnej infekcji (5, 8, 9). Podobnie jak w przebiegu innych zakażeń wirusowych istotną rolę odgrywają mechanizmy odporności komórkowej, a więc populacje limfocytów T, z których najważniejsze są limfocyty cytotoksyczne (Tc) i pomocnicze (Th). Zastosowanie cytometrii przepływowej umożliwia ocenę zmian ilościowych i jakościowych w populacjach limfocytów.

Celem przeprowadzonych badań było porównanie odsetka subpopulacji limfocytów T we krwi kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka *in ovo* lub w pierwszym dniu życia.

Materiał i metody

Zarodki kurze. Zarodki pochodziły z jaj wylęgowych SPF (Lohmann, Niemcy) inkubowanych w aparacie firmy Jamesway, USA.

Szczepionka. Do badań użyto komercyjnej szczepionki liofilizowanej przeciwko chorobie Mareka opartej na szczepie herpeswirusa indyjskiego HVT FC 126 (Merial, Francja). Dawka szczepionki używana do szczepienia zarodków oraz piskląt wynosiła 2400 PFU wirusa.

Populacje limfocytów T. Do oznaczeń subpopulacji limfocytów T 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) (Serotec Ltd.)

Przygotowanie próbek krwi. Do 50 μ l krwi dodawano po 5 μ l przeciwciał monoklonalnych, po wytrząsaniu inkubowano je w ciemni o temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie dodawano po 250 μ l buforu lizującego – Optylyse C (Immunotech) i po wymieszaniu pozostawiano w ciemni w temperaturze pokojowej w ciągu 10 min. Po tym czasie dodawano po 250 μ l płynu PBS z dodatkiem 5% surowicy cielęcej inaktywowanej i inkubowano jak uprzednio. Następnie próbki wirowano przez 10 min. przy 1800 obr./min., supernatant usuwano, a osad komórek płukano 3-krotnie. W ostatnim etapie dodawano po 800 μ l 2% roztworu formaldehydu w płynie PBS. Oznaczenia wykonywano w cytofluorometrze przepływowym Coulter Epics XL 4C (Beckman Coulter Company, USA).

Przebieg doświadczenia. 28 zarodkom kurzym w 18. dniu inkubacji, podczas przekładania do komory klujnikowej podano w okolicę grzbietu szczepionkę przeciwko chorobie Mareka. Zarodki inkubowano do wylęgu. Wylęzione ze szczepionych zarodków 23 pisklęta tworzyły grupę I. Grupę II stanowiły 23 pisklęta wyklute z zarodków nieszczepionych, którym szczepionkę podawano w 3 h po wylęgu, domięśniowo w mięśnie udowe. Grupę III kontrolną stanowiły 22 pisklęta nie szczepione. Wszystkie grupy ptaków trzymano w oddzielnych izolowanych pomieszczeniach. W pierwszym dniu życia od piskląt z I i III grupy pobierano próbki krwi, a następnie w 3., 7., 10., 14., 28., 42. i 56. dniu życia od wszystkich ptaków z grup I-III. Oznaczenia wykonywano bezpośrednio po pobraniu próbek krwi.

Odsetek badanych subpopulacji limfocytów T w krwi obwodowej kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka przedstawiono w tabelach, podając średnie arytmetyczne i wartość odchylenia standardowego dla poszczególnych grup doświadczalnych ptaków. Ocenę statystyczną przeprowadzano testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

W pierwszych dniach po podaniu szczepionki, podobnie jak po zakażeniu wirusem terenowym, następuje aktywacja cytokin, takich jak: INF- γ czy IL-8 oraz pobudzenie wytwarzania komórek NK. W nabywaniu odporności poszczepiennej bardzo ważną rolę odgrywają antygenowo-specyficzne limfocyty T cytotoksyczne (Tc), na powierzchni których występuje receptor CD8+. Limfocyty te mają zdolność niszczenia komórek zakażonych wirusem, komórek nowotworowych, a także rozpoznają białka, takie jak: pp38, Meq, glikoproteiny B, C, H oraz I kodowane przez wirus choroby Mareka (2, 5, 10). Odsetek komórek CD8+ we krwi obwodowej ptaków szczepionych zarówno *in ovo* (grupa I), jak i w pierwszym dniu życia (grupa II) był nieznacznie

wyższy do 7. dnia życia w porównaniu do kurcząt z grupy kontrolnej. Jednakże stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne. W późniejszych terminach badań we wszystkich grupach kurcząt średni odsetek tych komórek był na tym samym poziomie i wynosił około 9,0-9,5 (tab. 1). Wartość odchylenia standardowego (SD) wynosiła od 0,93 do 2,9 w obrębie poszczególnych grup ptaków.

Kolejną badaną populacją komórek były limfocyty T pomocnicze (Th) zawierające na powierzchni marker CD4+. Limfocyty te ułatwiają aktywację, proliferację oraz różnicowanie limfocytów B i limfocytów Tc. Rozpoznają one antygeny w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Odgrywają istotną rolę w powstawaniu odporności humoralnej (5, 10). Pomiędzy 3. a 7. dniem życia u piskląt z wszystkich grup odsetek tych limfocytów narastał, jednakże poziom ich był wyższy w grupach piskląt szczepionych. Od 7. dnia do końca doświadczenia odsetek limfocytów CD4+ utrzymywał się na zbliżonym poziomie, nieznacznie wyższym w grupie I i II (12,14-12,86) w porównaniu do grupy III (11,7-12,2) (tab. 2). W czasie całego okresu

Tab. 1. Odsetek limfocytów T CD8+ u kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka

Dni życia	Grupa ptaków			Wartości fizjologiczne
	I – szczepienie <i>in ovo</i> (n = 23)	II – szczepienie w 1. dniu życia (n = 23)	III – kontrola nie szczepiona (n = 22)	
1	7,68 \pm 2,62	nb.*	7,11 \pm 2,14	10,46 \pm 3,52
3	8,30 \pm 1,89	7,80 \pm 2,63	6,92 \pm 1,98	nb.
7	10,82 \pm 2,34	10,90 \pm 1,92	10,11 \pm 0,93	11,11 \pm 2,34
10	8,65 \pm 2,12	8,89 \pm 2,41	9,34 \pm 1,67	nb.
14	8,72 \pm 1,85	8,95 \pm 2,05	9,35 \pm 1,83	10,84 \pm 2,87
28	9,34 \pm 1,42	9,26 \pm 1,95	9,61 \pm 0,95	9,35 \pm 1,29
42	8,97 \pm 2,11	9,12 \pm 2,41	9,43 \pm 1,85	10,25 \pm 2,82
56	8,76 \pm 2,94	8,95 \pm 2,61	9,10 \pm 2,31	12,77 \pm 4,13

Objaśnienie: nb. – nie badano

Tab. 2. Odsetek limfocytów T CD4+ u kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka

Dni życia	Grupa ptaków			Wartości fizjologiczne
	I – szczepienie <i>in ovo</i> (n = 23)	II – szczepienie w 1. dniu życia (n = 23)	III – kontrola nie szczepiona (n = 22)	
1	10,56 \pm 3,11	nb.*	8,95 \pm 2,85	14,50 \pm 2,18
3	9,50 \pm 2,48	8,60 \pm 1,95	8,32 \pm 1,48	nb.
7	13,20 \pm 2,34	12,70 \pm 2,14	11,59 \pm 1,95	11,59 \pm 2,61
10	12,86 \pm 2,11	12,46 \pm 1,85	11,74 \pm 2,24	nb.
14	12,60 \pm 2,50	12,42 \pm 1,94	12,20 \pm 2,31	12,17 \pm 2,78
28	12,14 \pm 1,64	12,40 \pm 2,21	11,82 \pm 1,82	10,79 \pm 1,49
42	12,25 \pm 2,31	12,32 \pm 1,93	11,87 \pm 1,79	12,46 \pm 2,26
56	12,40 \pm 2,60	12,27 \pm 3,12	11,74 \pm 2,32	13,15 \pm 2,43

obserwacji stwierdzone pomiędzy grupami ptaków różnice nie były statystycznie istotne. Natomiast notowano zróżnicowanie pomiędzy ptakami w grupach, wartość SD była wysoka i wynosiła od 1,48 do 3,11.

U ptaków określano również odsetek limfocytów T posiadających marker powierzchniowy CD3+. Jest on obecny na większości dojrzałych limfocytów T, a także na tymocytach. Uczestniczy w przekazywaniu do komórki sygnału w trakcie wiązania antygeny z receptorem MHC na powierzchni komórek prezentujących antygen. Limfocyty T CD3+ stanowią najliczniejszą populację limfocytów T we krwi obwodowej. Odsetek tych komórek jest około dwukrotnie wyższy niż limfocytów CD4+ i CD8+ (2, 8). Do 7. dnia życia stwierdzano wzrost poziomu limfocytów CD3+ w krwi kurcząt wszystkich ptaków doświadczalnych. Jednakże u piskląt szczepionych (grupa I i II) wzrost ten był wyższy w porównaniu do ptaków z III grupy. Stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne. Pomiędzy 7. a 10. dniem następował niewielki spadek poziomu limfocytów CD3+ we wszystkich grupach. Od 10. dnia życia do końca obserwacji odsetek komórek CD3+ był stały i na takim samym poziomie u wszystkich ptaków, niezależnie od grupy (tab. 3). W przypadku tej populacji limfocytów wartość SD w grupach doświadczalnych ptaków wynosiła od 1,85 do 3,92.

Wyniki badań własnych są zbliżone do obserwacji innych autorów (3, 6), którzy oceniali populacje limfocytów u ptaków szczepionych *in ovo* szczepionkami przeciwwirusowymi. Wprowadzenie tą drogą szczepionki przeciwko reowirusom nie powodowało statystycznie istotnych różnic w odsetkach limfocytów Th oraz Tc zarówno we krwi obwodowej, jak też w śledzionie i torbie Fabrycjusza (6). Podobnie u ptaków szczepionych *in ovo* przeciwko chorobie Gumboro nie obserwowano istotnych zmian w subpopulacjach tych limfocytów (3).

Obserwowane w przebiegu doświadczenia nieznacznie wyższe odsetki subpopulacji limfocytów T w pierwszych dniach życia we krwi ptaków szczepionych *in ovo* mogło być spowodowane obecnością wirusa we krwi i tkance płucnej już w dniu wylęgu. Natomiast u piskląt szczepionych w 1. dniu życia wirus szczepionkowy był wykrywany od 7. dnia życia we krwi, płucach i śledzionie (7).

Odsetki subpopulacji limfocytów T u piskląt szczepionych różniły się nieznacznie od średnich wartości fizjologicznych stwierdzanych u zdrowych ptaków, które zostały oznaczone we wcześniejszych badaniach (4). Podobnie jak w przypadku wartości fizjologicznych obserwowano zróżnicowanie badanych populacji komórek u ptaków w grupach doświadczalnych wyrażające się wysoką wartością odchylenia standardowego.

Tab. 3. Odsetek limfocytów T CD3+ u kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka

Dni życia	Grupa ptaków			Wartości fizjologiczne
	I – szczepienie <i>in ovo</i> (n = 23)	II – szczepienie w 1. dniu życia (n = 23)	III – kontrola nie szczepiona (n = 22)	
1	17,05 ± 2,65	nb.*	15,32 ± 2,91	21,47 ± 3,51
3	18,34 ± 3,01	17,40 ± 2,88	15,32 ± 3,12	nb.
7	22,52 ± 2,85	22,12 ± 2,75	20,19 ± 3,92	20,19 ± 4,75
10	19,56 ± 1,96	19,70 ± 3,21	20,63 ± 2,85	nb.
14	19,40 ± 2,74	19,82 ± 3,02	19,85 ± 2,67	20,28 ± 3,40
28	19,70 ± 1,96	19,65 ± 2,07	20,13 ± 1,85	19,91 ± 1,62
42	18,91 ± 2,74	19,20 ± 3,12	19,83 ± 3,21	28,03 ± 5,09
56	19,12 ± 3,05	19,40 ± 2,87	20,10 ± 2,79	24,84 ± 3,95

Przeprowadzone badania wykazały, że podanie szczepionki przeciwko chorobie Mareka *in ovo* lub w pierwszym dniu życia nie powodowało znaczących zmian w populacjach limfocytów T w krwi obwodowej kurcząt.

Piśmiennictwo

1. Baigent S. J., Davison T. F.: Development and composition of lymphoid lesions in the spleens of Marek's disease virus-infected chickens: association with virus spread and the pathogenesis of Marek's disease. *Avian Path.* 1999, 28, 287-300.
2. Baigent S. J., Ross L. J. N., Davison T. F.: Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38 lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 2795-2802.
3. Corley M. M., Giambone J. J.: Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccine by *in ovo* route. *Avian Dis.* 2002, 46, 810-815.
4. Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Bednarek D., Kozdrui W.: Ocena subpopulacji limfocytów w krwi kurcząt metodą cytometrii przepływową. *Mat. XII Kongresu PTNW, Warszawa 2004*, s. 472.
5. Davison F., Kaiser P.: Immunity to Marek's Disease, [w:] Davison F., Nair V.: Marek's Disease an Involving Problem. Elsevier 2004, 126-141.
6. Guo Z. Y., Giambone J. J., Liu Z., Dormitorio T. V., Wu H.: Effect of *in ovo* administered reovirus vaccines on immune responses of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 2004, 48, 224-228.
7. Kozdrui W., Król K., Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H.: Lokalizacja szczepu HVT FC 126 wirusa choroby Mareka w narządach wewnętrznych kurcząt szczepionych *in ovo*. *X Symp. Drobiarskie. „Patologia narządu rozrodczego ptaków – etiologia, diagnostyka zwalczanie”*. Monografia. Polonica Zdrój 16-18.09.2005, s. 100-101.
8. Omar A. R., Schat K. A.: Syngenic Marek's disease virus (MDV) – specific cell-mediated immune responses against immediate early, late and unique MDV proteins. *Virol.* 1996, 222, 87-99.
9. Samorek-Salamonowicz E.: Choroba Mareka, [w:] Mazurkiewicz M. (red.): Choroby drobiu. Wyd. AR Wrocław 2005, 425-445.
10. Schat K. A.: Odpowiedź immunologiczna na zakażenie wirusem choroby Mareka. *Mat. Konf. Choroba Mareka, Puławy 2001*, s. 1-10.

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