

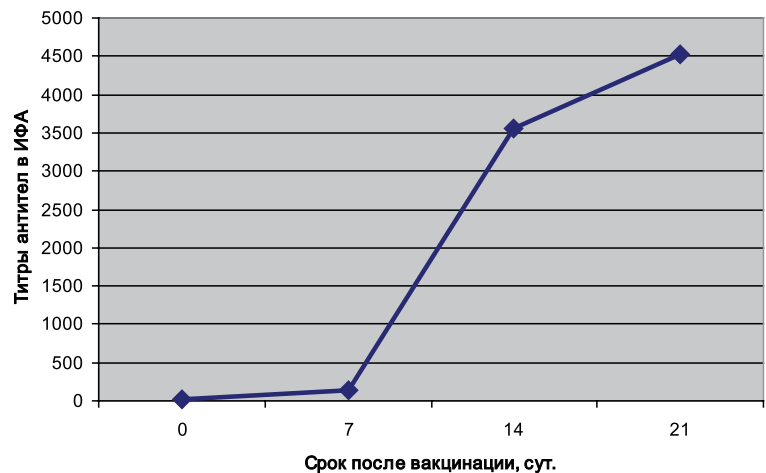


Рис. Выявление антител к аденовирусу птиц FAdV-2 в сыворотках крови цыплят, иммунизированных экспериментальной инактивированной вакциной

ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусы птиц (FAdV) относятся к роду *Aviadenovirus* семейства *Adenoviridae* — это многочисленная, но сравнительно малоизученная группа вирусов. Вирусы данной группы вызывают различные клинические и патологоанатомические признаки при инфицировании птиц, в частности поражения респираторной системы, энтериты, геморрагические воспаления в мышцах и висцеральных органах, могут сопровождаться снижением яичной продуктивности и признаками поражения нервной системы. При этом длительное вирусоносительство обеспечивает продолжительное выделение вируса во внешнюю среду переболевшей птицей, что способствует дальнейшему распространению инфекции [1, 2, 7, 8].

В качестве одной из мер борьбы с инфекцией всегда рассматривается вакцинопрофилактика. Все более часто среди цыплят-бройлеров встречается такое проявление аденовирусной инфекции, как гепатит с тельцами-включениями [4–8]. При этом в последнее время в качестве этиологического агента, связанного с развитием данного синдрома, часто выявляют аденовирус птиц 2 серотипа (FAdV-2) [2, 4–6]. Мониторинг некоторых птицев хозяйств Российской Федерации сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» позволил выявить в них циркуляцию аденовируса 2 серотипа. Смертность среди бройлеров в возрасте 1–7 недель, наиболее восприимчивых к этому возбудителю, может достигать 15% [1, 2]. Отсюда, естественно, возникает интерес к изучению биологических свойств таких изолятов, в том числе и к изучению их иммуногенных свойств в составе профилактического препарата [2, 3].

Таблица
Протективная активность экспериментальной вакцины при заражении цыплят гомологичным (FAdV-2) и гетерологичным (FAdV-4) типами аденовируса птиц
n=3

Аденовирус, используемый для заражения	Иммунный статус цыплят	
	вакцинированные	невакцинированные
изолят FAdV-2	0/5*	5/5
штамм «КР-95» FAdV-4	5/5	5/5

* в числителе — число павших или клинически больных птиц, в знаменателе — общее число зараженных птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали изолят аденовируса птиц FAdV-2 третьего пассажа на СПФ-цыплятах с инфекционной активностью 5,83 lg ЛД₅₀/0,2 см³ и аденовирус птиц FAdV-4 производственный штамм «КР-95» с инфекционной активностью 6,5 lg ЛД₅₀/0,2 см³.

Вакцины. В исследованиях использовали инактивированную сорбированную вакцину, изготовленную на основе изолята аденовируса птиц FAdV-2.

Птица. В опыте использовали 20 коммерческих цыплят яичного направления 20-суточного возраста, не имеющих антител к аденовирусам птиц, которых содержали в изоляторах ИЗОП-6 на рационе согласно зоотехническим нормам.

Схема эксперимента. Опытных цыплят разделили на две группы по 10 голов в каждой. Птиц первой группы иммунизировали вакциной на основе изолята FAdV-2, второй — не вакцинировали и использовали в качестве отрицательного контроля.

Вакцину в объеме 0,5 см³ вводили однократно в грудную мышцу. Через 22 суток из вакцинированных и невакцинированных цыплят были сформированы две новые группы, состоящие из 5 вакцинированных и 5 невакцинированных голов. Далее цыплят первой группы заражали аденовирусом птиц FAdV-4 штамм «КР-95» в дозе 7,2 lg ЛД₅₀/см³, а второй группы аденовирусом птиц FAdV-2 в дозе 6,5 lg ЛД₅₀/см³. Клиническое наблюдение за цыплятами вели в течение 14 суток. Кроме того, у всех групп цыплят отбирали кровь через 7, 14, 21 сутки после вакцинации.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Определение титра антител к FAdV-2 проводили в непрямом варианте ИФА с использованием планшетов, сенсibilизированных антигеном аденовируса птиц FAdV-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены результаты исследования сывороток крови цыплят на наличие антител к аденовирусу птиц FAdV-2 после иммунизации экспериментальной вакциной.

Из данных, представленных на рисунке, видно, что вакцинация цыплят вызвала образование гуморальных специфических антител к вирусу FAdV-2 с титрами в ИФА до 4516. Особенно интенсивный прирост антител наблюдался с 7 по 14 сутки после вакцинации.

В таблице представлены результаты устойчивости цыплят к заражению аденовирусами птиц гомологичного (FAdV-2) и гетерологичного (FAdV-4) типов.

Из данных таблицы следует, что цыплята, иммунизированные экспериментальной инактивированной сорбированной вакциной против FAdV-2, были полностью защищены от гибели при заражении гомологичным (FAdV-2) типом аденовируса птиц и не были защищены от заражения гетерологичным (FAdV-4) типом вируса.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная инактивированная вакцина на основе изолята FAdV-2 обладает высокой иммуногенной активностью.

2. Вакцина обладает высокой протективной активностью в отношении антигенно родственного аденовируса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова М.А., Ирза А.В., Бахчин И.В. Иммунный ответ цыплят на экспериментальное заражение изолятом аденовируса птиц FAdV2/1/2012 // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2014. — Т. 12. — С. 121–132.

2. Волкова М.А., Ирза А.В., Лазарева С.П. Идентификация аденовируса птиц, выделенного в Российской Федерации от кур с признаками гепатита, с использованием ПЦР-РВ и ИФА // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2013. — Т. 11. — С. 34–42.

3. Deshmukh V.V., Aziz A., Gujar M.B. Humoral immune response in broilers against inclusion body hepatitis virus // Indian J. Animal Sciences. — 2000. — Vol. 70, № 4. — P. 340–342.

4. El-Attrache J., Villegas P. Genomic identification and characterization of avian adenoviruses associated with inclusion body hepatitis // Avian Dis. — 2001. — Vol. 45, № 4. — P. 780–787.

5. Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses / D. Ojkic, E. Martin, J. Swinton [et al.] // Avian Pathol. — 2008. — Vol. 37, № 1. — P. 95–100.

6. Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: A review / M. Hess // Avian Pathol. — 2000. — Vol. 29, № 3. — P. 195–206.

7. Inclusion body hepatitis outbreak associated with fowl adenovirus type 8b in broilers / M. Zdravec [et al.] // Acta Veterinaria. — 2013. — Vol. 63, № 1. — P. 101–110.

8. Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis / J.B. McFerran [et al.] // Avian Pathol. — 1976. — Vol. 5. — P. 315–324.

УДК 619:616-074:636.52/58

ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ КУР И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА BD FACSVeRSE™

М.А. Волкова¹, И.А. Чвала²

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

² старший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Разработана методика идентификации Т- и В-лимфоцитов кур и их субпопуляций методом проточной цитометрии с использованием прибора BD FACSVeRse™. Определён способ выделения лимфоцитарного гейта под контролем экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 и моноцитарного антигена. Подобраны и испытаны панели антител для иммунофенотипирования лимфоцитов при исследовании клеточного иммунного ответа кур, позволяющие определить относительное количество Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-цитотоксических популяций клеток в крови и лимфоидных органах кур. Показана специфичность и воспроизводимость разработанной методики идентификации субпопуляции лимфоцитов кур.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия, иммунофенотипирование лимфоцитов кур.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проточная цитометрия находит всё большее применение в ветеринарной иммунологии. Использование различных наборов клеточных маркеров позволяет проводить исследования типов клеток и их функционального состояния, определять количественное соотношение различных субпопуляций клеток.

Имунофенотипирование лимфоцитов заключается в обнаружении на их поверхности маркеров дифференциации или CD-антигенов. Классификация CD (*cluster of differentiation antigens*) основана на различиях между кластерами клеток в поверхностных дифференцировочных маркерах.

Основными маркерами CD для оценки состояния клеточного звена иммунитета кур являются CD45, характеризующий общий пул лейкоцитов, и CD3 — маркер зрелых Т-лимфоцитов [3, 6]. Зрелые Т-клетки (тимocyты и Т-лимфоциты) экспрессируют CD3 на клеточной мембране во взаимосвязи с Т-клеточным рецептором (TCR), включая различные цепи Т-клеточного рецептора TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$ (TCR1) [8]. Вместе они образуют так называемый TCR-CD3-комплекс. Другие Т-клеточные маркеры (CD4, CD8 α , CD8 β) позволяют охарактеризовать иммунофенотип Т-клеток на дальнейших этапах дифференцировки. CD4 экспрессируют тимocyты, Т-лимфоциты (Т-хелперы) и моноциты/макрофаги [4]. CD8 α и CD8 β распознают тимocyты, цитотоксические Т-лимфоциты двух различных субпопуляций Т-клеток (гомо α/α - и гетеро α/β -димеры). Гомодимеры выявляют преимущественно у молодых птиц [5, 7].

Bu1a и Bu1b экспрессируются на поверхности клеточной мембраны В-лимфоцитов главным образом инбредных цыплят соответствующих линий (Bu1a и Bu1b). Антиген Bu1 распознаёт В-лимфоциты цыплят обеих линий. Bu1, Bu1a, Bu1b также экспрессируются на поверхности макрофагов и моноцитов, но не эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов. Антиген MHC-II (главный комплекс гистосовместимости II класса) распознаёт В-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки [5, 6].

Метод проточной цитометрии основан на регистрации светорассеяния и флуоресценции отдельных клеток в суспензии, пересекающих одна за другой вместе с потоком жидкости луч монохроматического света (обычно света лазера). Фотометрические каналы используются для оценки размеров клетки и внутриклеточных структур. Флуоресцентный канал применяется для изучения клеточных маркеров, для чего используются моноклональные антитела, меченные различными флуорохромными красителями к мембранным и внутриклеточным компонентам клеток (белкам, ДНК и РНК) [1]. Разработка нового, более совершенного проточно-цитометрического оборудования, использующего многоцветный анализ и компьютеризированные

методы обработки данных, расширила возможности этого метода.

Целью работы была разработка методики идентификации Т- и В-клеток кур и их субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии с использованием BD FACSVerse™.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение лимфоцитов из лимфоидных органов и крови кур. Для выделения лимфоцитов из ткани лимфоидных органов кур (селезёнка, бурса) отобранные в соответствии с правилами асептики органы помещали в фосфатный буферный раствор (0,1М фосфатный буфер с 0,85% NaCl, pH 7,2). Далее готовили суспензию из отдельных клеток, пропуская органы через стерильное нейлоновое сито в соответствующее количество среды RPMI 1640 (1:10 от массы пробы). Клеточную суспензию наслаивали на градиент Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences, Швеция) (плотность 1,007) в соотношении 2:3 и центрифугировали при 453 g в течение 30 мин. Выделенную фракцию лимфоцитов отмывали 1 раз фосфатно-буферным раствором (ФБР) путём центрифугирования при 300 g в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1650. Выделение лимфоцитов из периферической крови кур проводили по стандартной методике [1] с использованием Ficoll-Paque™ PLUS. Подсчет и определение жизнеспособности клеток проводили в счётчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Корея). Концентрацию лимфоцитов доводили раствором ФБР до 10^6 – 10^7 клеток/мл.

Подготовка проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов. К 50 мкл подготовленных проб в нескольких повторностях (в зависимости от количества используемых панелей антител) добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромом (флуоресцеинизотиоционат — FITC, фикоэритрин — PE) в количестве, рекомендованном фирмой-производителем (Southern Biotech, США; Serotec, Англия). Пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 4–8 °C. Отмывали от несвязавшихся антител центрифугированием в ФБР в течение 10 мин при

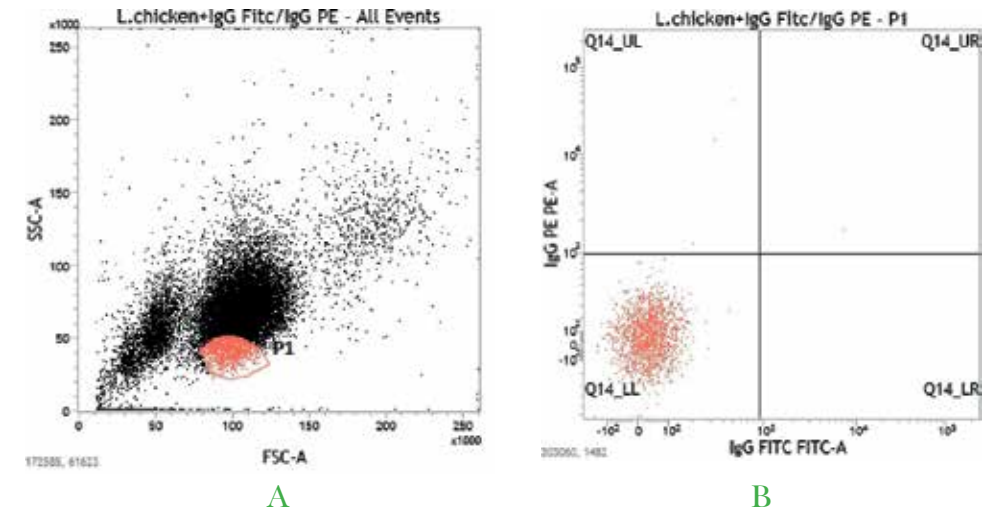


Рис. 2. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови
А — выделение лимфоцитарного гейта P1 по каналам прямого и бокового светорассеяния;
В — определение границ квадрантов для детекторов флуоресценции (FITC и PE) в соответствии с размерами гейта изотипического контроля.

260 g. Осадок ресуспендировали в 1,0 мл проточной жидкости для измерения на цитометре.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Анализ иммунофенотипических особенностей клеток проводили на проточном цитометре BD FACSVerse™ (BD Bioscience, США). После настройки прибора с использованием калибровочных частиц BD FACSuite™ FC Beads-4c Research kit и BD FACSuite™. Research Beads (США) проводили измерение испытуемых проб согласно инструкции к прибору и анализ измеренных популяций клеток с использованием пакета программ: BD FACSuite Software: Worklist Workflow или Expiration Workflow.

Экспериментальные животные. Для отбора проб крови и лимфоидных органов использовали коммерческих цыплят-бройлеров в возрасте от 8 до 21 суток (15 голов) и кур яичного направления в возрасте от 53 до 120 суток (25 голов).

Статистический анализ результатов. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики идентификации Т- и В-клеток кур и их субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACSVerse™ включала несколько этапов.

На первом этапе необходимо было определить способ выделения лимфоцитарного гейта изучаемой клеточной популяции. Согласно данным литературы, существует несколько способов выделения лимфоцитарного гейта [1, 2]. Экспериментальным путём был выбран способ выделения лимфоцитарного гейта под контролем экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 и моноцитарного антигена (рис. 1).

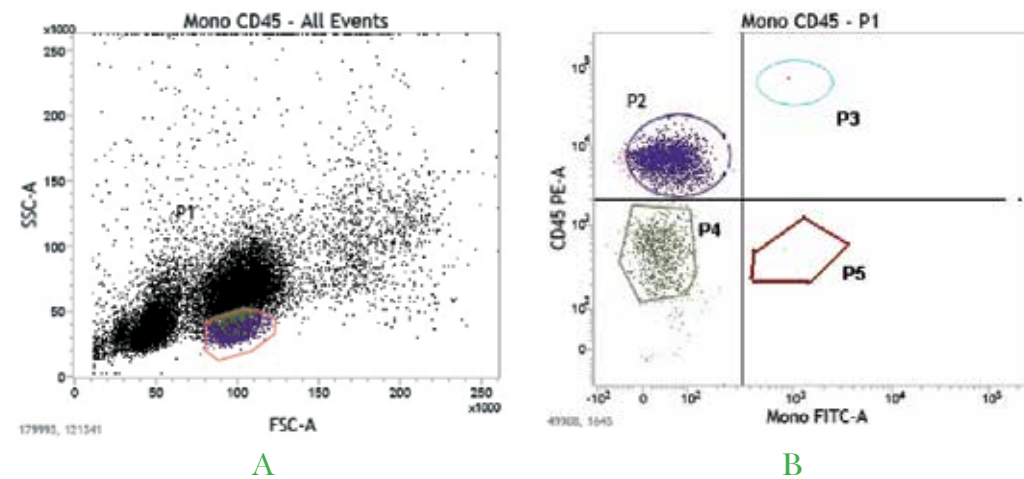


Рис. 1. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови
А — выделение лимфоцитарного гейта (P1) по каналам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния;
В — точечный график распределения клеток на две популяции (моноциты и лейкоциты): P2 (Моно-/CD45-) — лейкоциты, P3 (Моно+/CD45+) — моноциты; P4 (Моно-/CD45-) и P5 (Моно+/CD45-) — дробис.

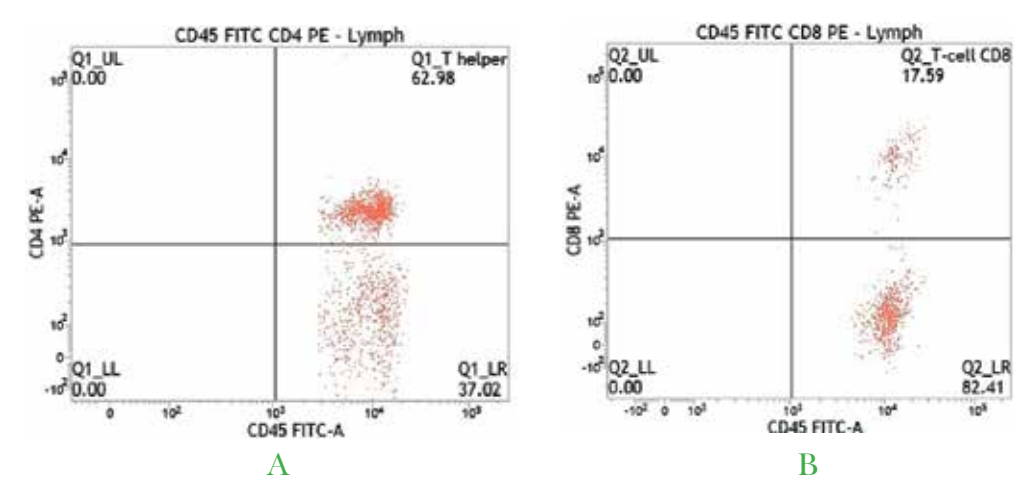


Рис. 3. Определение основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови цыплят с помощью комбинаций моноклональных антител CD45FITC/CD4PE и CD45FITC/CD8PE
А — точечный график, на котором в правом верхнем квадранте расположены CD45+CD4+ лимфоциты (Т-хелперы);
В — точечный график, на котором в правом верхнем квадранте расположены CD45+CD8+ лимфоциты (Т-цитотоксические лимфоциты).

Максимальное количество событий при этом располагалось в левом верхнем квадранте (гейт P2) графика CD45 PE/CD monocyte/macrophage FITC.

Следующий этап заключался в выборе изотипического контроля для установления маркеров интенсивности флуоресценции и неспецифического окрашивания. В качестве оптимального изотипического контроля был выбран IgG FITC/IgG PE, содержащий антимишинные иммуноглобулины G (IgG), меченные FITC и PE (рис. 2).

По данным литературы были составлены и испытаны панели антител для иммунофенотипирования лимфоцитов при исследовании клеточного иммунного ответа кур:

- CD45FITC/CD3PE — Т-лимфоциты;
- CD45FITC/CD4PE — Т-хелперы;
- CD45FITC/CD8PE — цитотоксические Т-лимфоциты;
- TCRαβFITC /TCRγδPE — Т-лимфоциты;
- CD45FITC/МНС-IIPE — В-лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки;
- CD45FITC/Bu1PE — В-лимфоциты.

На рис. 3 представлены результаты определения основных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) в периферической крови цыплят с использованием выбранных панелей антител.

Для определения специфичности метода проводили иммунофенотипическое исследование выделенных из периферической крови лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к поверхностным маркерам человека, крупного рогатого скота, свиньи и кур (рис. 4).

Наличие позитивных событий на точечном графике PE/FITC было выявлено только при исследовании проб

лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к CD45 и CD3 кур (рис. 4D).

Для определения внутрилабораторной воспроизводимости было проведено иммунофенотипическое исследование выделенных из периферической крови лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4 и CD8β кур в 4-х повторностях. Данные анализа представлены на рис. 5.

Коэффициент вариации между полученными результатами в каждой измеряемой популяции клеток не превышал 3%, разница максимальной и минимальной величин в 95% доверительном интервале была не больше 2%, что свидетельствует о воспроизводимости метода [1, 2].

Был проведен ряд исследований субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови и лимфоидных органов кур с использованием разработанной методики. Полученные результаты представлены в табл. 1–2.

Согласно полученным данным процентное содержание основных популяций иммунокомпетентных клеток у цыплят-бройлеров составляло: Т-хелперы — 42–66% в крови и 25–35% в селезенке, Т-цитотоксические клетки — 14–25% в крови и 20–31% в селезенке. В-лимфоцитов в бурсе цыплят-бройлеров было 78–99% (табл. 1).

У цыплят яичного направления содержание Т-хелперов в крови было 35–58%, в селезенке 19–35%. Процент Т-цитотоксических клеток составил 4,5–14% в крови и 25,5–40,5% в селезенке. Содержание В-лимфоцитов в селезенке — 5–20% и в крови 1–7% (табл. 2).

Полученные результаты соответствовали данным по процентному содержанию рассматриваемых попу-

Рис. 4. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови кур

А — точечный график лимфоциты кур/CD3PE человека, в нижнем левом квадранте 100% событий CD3PE-/FITC-;

В — точечный график лимфоциты кур/CD4FITC крупного рогатого скота, в нижнем левом квадранте 100% событий PE-/CD4FITC-;

С — точечный график лимфоциты кур/CD4FITC свиньи, в нижнем левом квадранте 100% событий PE-/CD4FITC-;

Д — точечный график лимфоциты кур/CD45FITC/CD3PE кур, в верхнем правом квадранте 88,01% CD45+/FITC/CD3+PE клеток (Т-лимфоциты).

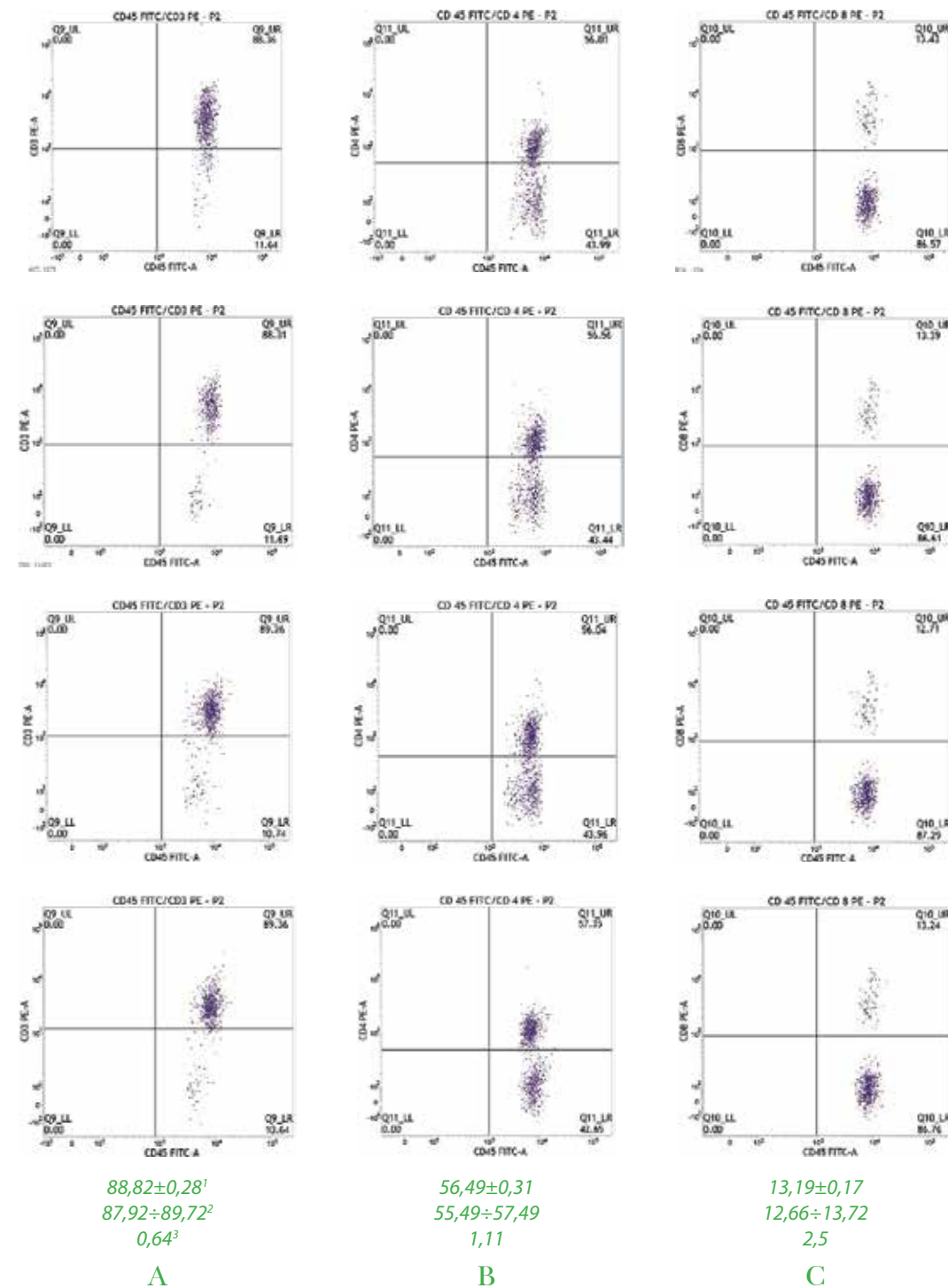
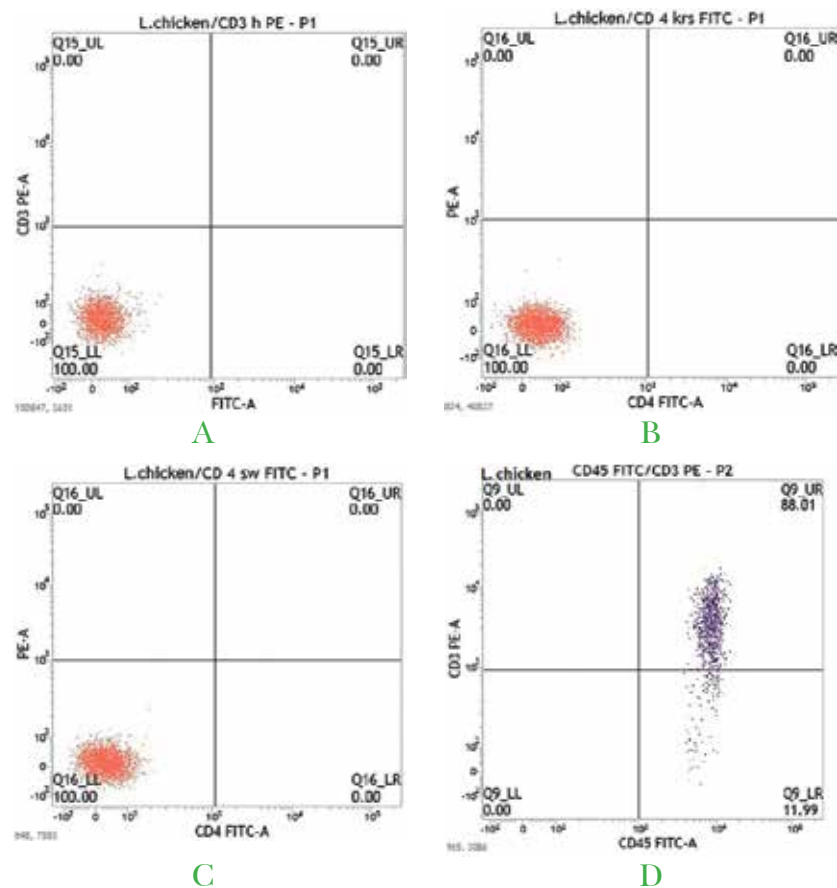


Рис. 5. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови кур

А — точечный график CD45FITC/CD3PE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD3+ лимфоциты (Т-лимфоциты);

В — точечный график CD45FITC/CD4PE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD4+ лимфоциты (Т-хелперы);

С — точечный график CD45FITC/CD8βPE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD8+ лимфоциты (Т-цитотоксические клетки)

¹ среднее значение плюс-минус стандартная ошибка среднего;

² 95% доверительный интервал;

³ коэффициент вариации.

ляций иммунокомпетентных клеток в периферической крови и лимфоидных органах кур, которые представлены фирмами-производителями моноклональных антител для проточной цитофлуориметрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, был разработан специфичный и воспроизводимый метод иммунофенотипирования клеток крови и лимфоидных органов кур методом проточной

Таблица 1
Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови, бурсы и селезёнки цыплят-бройлеров
n=3

Возраст птиц, сут.	В-лимфоциты, %		Т-лимфоциты, %		
	бурса		кровь		селезёнка
	CD45+Bu1a+		CD45+CD4+	CD45+CD8α +	CD45+CD4+ CD45+CD8α +
8	80,91±2,88		45,41±3,38	16,14±1,57	25,93±4,38 22,49±0,3
10	96,43±1,4		49,5±1,12	13,68±0,39	29,32±1,2 24,93±4,74
13	97,26±0,02		59,39±6,53	18,15±1,73	30,32±5,47 21,25±0,18
16	94,11±2,06		50,06±4,36	20,1±4,17	30,14±2,81 23,55±3,78
21	97,08±0,98		46,29±2,91	20,06±4,67	29,81±5,08 26,07±5,22

Таблица 2
Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови и селезёнки цыплят яичного направления
n=5

Возраст птиц, сут.	В-лимфоциты, %		Т-лимфоциты, %			
	кровь		селезёнка		селезёнка	
	CD45+MHCII+		CD45+CD4+	CD45+CD8β+	CD45+CD4+	CD45+CD8β+
53	5,38±1,73	10,17±5,16	45,54±10,2	5,78±1,18	28,55±5,49	34,79±3,0
57	1,21±0,13	13,95±3,29	47,43±0,49	8,76±3,77	31,5±3,93	33,75±6,82
62	1,11±0,18	14,36±5,84	54,66±3,12	8,1±2,33	27,31±5,35	32,5±5,77
70	2,29±1,0	12,37±0,86	55,06±3,28	12,91±1,36	27,33±8,02	25,19±0,59
120	2,45±0,43	н/д	53,41±2,6	13,36±1,05	н/д	н/д

н/д — нет данных.

цитофлуориметрии с использованием прибора BD FACSVerse™. Проведенные исследования показали возможность использования разработанного метода для определения и количественной оценки различных популяций и субпопуляций лимфоцитов кур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. А.И. Карпищенко. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — Т. 2. — С. 274–314.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнёв В.А. Многоцветный цитометрический анализ. Идентификация Т-клеток и их субпопуляций по экспрессии αβ-TcR и γδ-TcR // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2–3. — С. 115–124.
3. Evaluation of CD45+ cells kinetics in the blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine / M. Popovic, M. Balenovic, A.E. Kabalin [et al.] // Veterinarski Arhiv. — 2010. — Vol. 80, № 1. — P. 61–69.

4. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution / T.S. Dalgaard, L.R. Norup, D. Rubbenstroth [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2010. — Vol. 138, № 1–2. — P. 85–94.
5. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges / B.C.B. Beirao, C. Favoro Jr., L.S. Nakao [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2012. — Vol. 145, № 1–2. — P. 32–41.
6. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability / Y. M. Fair, K.J. Taylor-McCabe, Y. Shou, B.L. Marrone // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2008. — Vol. 125, № 3–4. — P. 268–273.
7. Kapczynski D.R. Detection of cell-mediated immune response to avian influenza viruses / Animal Influenza Virus: Methods Mol. Biol. — 2014. — Vol. 1161. — P. 199–215.
8. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens / B.W. Bridle, R. Julian, P.E. Shewen [et al.] // Can. J. Vet. Res. — 2006. — Vol. 70. — P. 183–190.

UDC 619:616-074:636.52/.58

IDENTIFICATION OF T- AND B-LYMPHOCYTES IN CHICKENS AND THEIR SUBPOPULATIONS BY FLOW CYTOFLUOROMETRIC ANALYSIS USING FLOW CYTOMETER BD FACSVeRSE™

M.A. Volkova¹, Ir.A. Chvala²

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

² Leading Researcher, FGBI “ARRIAH”, Vladimir

SUMMARY

Method of identification of T- and B-lymphocytes in chickens and their subpopulations by flow cytofluorometric analysis using BD FACSVerse™ was developed. Method of lymphocytic gate extraction with control of leukocyte common antigen CD45 and monocytic antigen expression was determined. Antibody panels for immunophenotyping lymphocytes when testing chicken cell mediated immune response were selected and tested. They enable to determine a relative number of T- and B-lymphocytes, T-helpers and T-cytotoxic cell populations in blood and chicken lymphoid organs. The paper demonstrates specificity and reproducibility of the developed method of identification of chicken lymphocyte subpopulation.

Key words: flow cytofluorometric analysis, immunophenotyping of chicken lymphocytes.

INTRODUCTION

In the present time flow cytometry is increasingly applied in veterinary immunology. Usage of different sets of cell markers enables testing of different types of cells and their functional status and determination of proportion of different cell subpopulations.

Lymphocyte immunophenotyping is detection of differentiation markers or CD-antigens on their surface. CD classification (cluster of differentiation agents) is based upon differences between cell clusters in surface and differentiation markers.

Basic CD markers for assessment of cell component of chicken immunity are CD45 characterizing common pool of leucocytes and CD3-marker - mature T-lymphocytes [3, 6]. Mature T-cells (thymocytes and T-lymphocytes) express T-cell receptor (TCR) together with CD3 on cell membrane including different chains of T-cell receptor TCR TCRAβ and TCRγδ (TCR1) [8]. Together they form a so called TCR-CD3-complex. Other T-cell markers (CD4, CD8α, CD8β) make it possible to characterize immunophenotype of T-cells during further differentiation stages. CD4 express thymocytes, T-lymphocytes (T-helpers) and monocytes/macrophages [4]. CD8α and CD8β recognize thymocytes, cytotoxic T-lymphocytes of two different subpopulations

of T-cells (homo α/α- and getero α/β-dimers). Homodimers are detected mostly in young birds [5, 7].

Bu1a and Bu1b are expressed on the surface of cell membrane of B-lymphocytes mostly of corresponding inbred chickens lines (Bu1a и Bu1b). Bu1 antigen recognizes B-lymphocytes of both chicken lines. Bu1, Bu1a, Bu1b are also expressed on the surface of macrophages and monocytes but not erythrocytes, granulocyte and thrombocyte. MHC-II antigen (major histocompatibility complex, II class) recognizes B-lymphocytes and antigen presenting cells [5, 6].

Flow cytometry is based on registration of light scattering and fluorescence of cells in suspension, one after another passing through homogeneous beam of light with the stream (usually laser light). Photometric channels are used for assessment of cell size and cell structure. Fluorescent channel is used for studying cell markers. For this purpose fluorochrome labeled monoclonal antibodies to membrane and intracellular components (proteins, DNA and RNA) are used [1]. Development of a new modern multicolor flow cytometry technique and computer based methods of data processing expanded opportunities of this method. The investigation was aimed at devel-