ACTA SCIENTIARUM POLONORUM *Acta Sci. Pol., Zootechnica 9 (4) 2010, 63–70*

NIESPECYFICZNA ODPORNOŚĆ KOMÓRKOWA KLACZY RASY STANDARD BREED KLINICZNIE ZDROWYCH I PO PRZECHOROWANIU ZAKAŻENIA *STREPTOCOCCUS EQUI*

Danuta Czernomysy-Furowicz[1], Helena Masiuk[1], Marek Masiuk[2], Dorota Jankowiak[1], Anna Silecka[1], Paweł Nawrotek[1]

[1] Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
[2] Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Streszczenie. Fagocytoza jest podstawową funkcją neutrofilów, monocytów oraz makrofagów tkankowych. Proces fagocytozy i tym samym jej efektywność ograniczane są znacznie w przypadku zakażeń koni *Streptococcus equi*. Mała efektywność identyfikacji zołz oraz niska skuteczność w leczeniu koni zarażonych *S. equi* związana jest z trudnościami w rozpoznaniu bezobjawowych nosicieli. Celem pracy było porównanie przebiegu procesu fagocytozy neutrofilów i monocytów krwi kłusaków rasy Standard bread klinicznie zdrowych z kłusakami, które przechorowały zakażenie *Streptococcus equi*. Aktywność fagocytarną określano wykorzystując PhagoTest® i cytometrię przepływową. Materiałem do badań była krew pobrana na heparynę od 13 klaczy, które przechorowały streptokokozę wywołaną *S. equi* i od 12 klaczy, u których nigdy nie obserwowano klinicznych objawów tej choroby.Wykazano statystycznie istotnie większą koncentrację monocytów we krwi klaczy zdrowych. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w liczebności limfocytów i neutrofilów. Odnotowano mniejszą aktywność fagocytarną (fluorescencję) zarówno neutrofilów (P = 0,049), jak i monocytów (P = 0,006), a także odsetek eozynofilów we krwi klaczy ozdrowieńców. U tych klaczy zaobserwowano także większą koncentrację komórek *E. coli* wokół fagocytujących neutrofilów i monocytów. Mniejsza aktywność układu immunologicznego klaczy, które przechorowały zakażenie, może wynikać z ich bezobjawowego nosicielstwa *S. equi*, a badanie aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów krwi koni może być pomocne w diagnozowaniu bezobjawowego nosicielstwa *S. equi*.

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, fagocytoza, klacz, *Streptococcus equi*

WSTĘP

Fagocytoza jest typowym elementem obronnym organizmów wielokomórkowych. Jest ona podstawową funkcją neutrofilów, monocytów oraz makrofagów tkankowych, jak również jest głównym powodem obecności tych komórek w ognisku zapalnym.

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr hab. Danuta Czernomysy-Furowicz prof. nadzw., Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, e-mail: danuta.czernomysy--furowicz@zut.edu.pl

W przypadku zakażeń koni *Streptococcus equi* efektywność procesu fagocytozy jest ograniczona. *Streptococcus equi* wypracował różne sposoby ograniczające skuteczność zwalczania infekcji przez atakowany organizm. *Streptococcus equi* (*S. equi ssp. equi*) należy do paciorkowców grupy C Lancefield'a. Powoduje ostre lub przewlekłe zapalenie węzłów chłonnych okolic głowy i szyi. U koni bakteria ta jest przyczyną zołzy, choroby o przebiegu epidemicznym.

Na podstawie badań na poziomie DNA, *S. equi sp. equi* został uznany za archetyp *Streptococcus zooepidemicus* (*ssp. zooepidemicus*), przyczyniający się do powstania pierwotnych schorzeń (ropnych zapaleń) błon śluzowych u wielu gatunków ssaków. Pomimo ogromnego postępu badań nad epizootiologią tego schorzenia oraz opracowania nowych metod identyfikacji i leczenia, zołzy ciągle są jednym z najczęściej odnotowywanych schorzeń koni na całym świecie [Tiwari i in. 2007].

Mała efektywność identyfikacji zołz oraz niska skuteczność w leczeniu koni zarażonych *S. equi* związana jest z trudnościami w rozpoznaniu bezobjawowych nosicieli.

Jedną z metod wykorzystywanych do określenia zdolności fagocytarnych komórek jest cytometria przepływowa [Woźniak-Kosek i in. 2003]. W obrazie cytometrycznym krwi obwodowej można wyróżnić trzy populacje krwinek białych: granulocytów, monocytów i limfocytów. Dzięki możliwości wybrania pewnych obszarów obrazu (tzw. bramek) możliwa jest analiza fluorescencyjna określonych populacji leukocytów [Chanter 1997].

Celem pracy było porównanie przebiegu procesu fagocytozy neutrofilów i monocytów krwi kłusaków rasy Standard bread klinicznie zdrowych z kłusakami, które przechorowały zakażenie *Streptococcus equi*.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była krew pobrana na heparynę od 13 klaczy, u których miesiąc wcześniej zakończono antybiotykoterapię spowodowaną zdiagnozowaną zołzą, i od 12 klaczy, u których nigdy nie obserwowano klinicznych objawów tej choroby. Odporność komórkową niespecyficzną ustalono wykonując test fagocytarny metodą cytometryczną.

Do oceny fagocytozy w komórkach krwi pełnej wykorzystano zestaw PhagoTest® firmy Becton Dickinson (BD). Przygotowane próbki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FASCalibur (BD), wyposażonego w laser niebieski o długości światła 466 nm.

Próby do oceny cytometrycznej przygotowano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta testu.

Analizę danych przeprowadzono w następujący sposób:

1) na wykresie kropkowym (dot plot), przedstawiającym ziarnistości komórek w stosunku do wartości czerwonej fluorescencji PI (SSC *vs.* FL2), wyodrębniono populację komórek krwi obwodowej usuwając z dalszej analizy agregaty bakterii i resztki jąder komórkowych;

2) na podstawie wykresu wielkości i ziarnistości komórek (FSC *vs*. SSC) wyróżniono populację neutrofilów, monocytów oraz nieanalizowanych w dalszych etapach limfocytów;

3) zjawisko fagocytozy oceniano ilościowo (odsetek komórek fagocytujących) i jakościowo (średnia intensywność fluorescencji), oddzielnie dla neutrofilów i dla monocytów

w obszarze wyznaczonym kontrolą negatywną. Za taką przyjmowano wynik analizy próbki inkubowanej w temperaturze 0ºC. Na tym samym wykresie oceniano odsetek komórek fagocytujących i średnią intensywność fluorescencji FITC będącej wyznacznikiem intensywności fagocytozy. Dla ujednolicenia wyników, w oparciu na kontroli negatywnej, ustawiano stały marker M1, w obrębie którego oceniano średnią intensywność fluorescencji oraz odsetek komórek fagocytujących. W celu eliminacji wpływu przypadkowej różnorodności wyników kontroli negatywnej na wynik ilościowy pomiaru, od odsetka komórek fagocytujących w temperaturze 37ºC odejmowano odsetek komórek znajdujących się w obrębie markera M1 z kontroli negatywnej, traktując je jako wynik niespecyficzny.

Z prób krwi przygotowanych do badań cytometrycznych wykonano także preparaty cytologiczne. W tym celu zawiesiny komórek wirowano w cytowirówce CytoSpin3 (1000 obr./min, 5 minut, Shandon, Shandon Scientific Ltd, Anglia), wykonując po jednym preparacie z każdej próbki. Rozmazy suszono w temperaturze pokojowej, a następnie dodatkowo utrwalono, spryskując alkoholem etylowym (80%). Tak przygotowane preparaty przechowywano w temperaturze 4ºC bez dostępu światła. Dokumentację fotograficzną wykonano za pomocą systemu Cell (Imaging Software System, Olympus).

Ze wszystkich prób krwi wykonano rozmazy na szkiełku podstawowym. Preparaty barwiono metodą Giemzy, a następnie w mikroskopie świetlnym liczono odsetek poszczególnych krwinek białych.

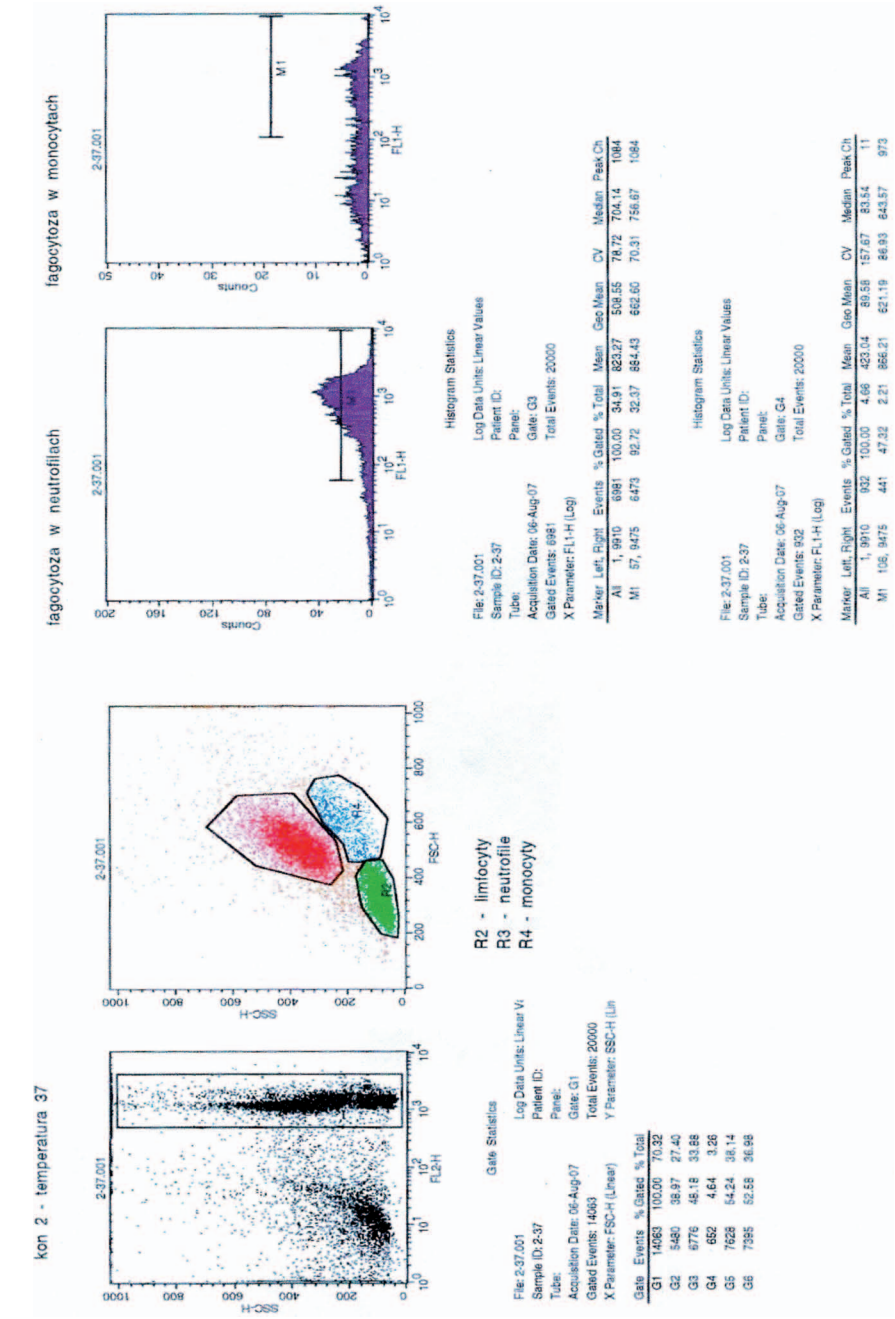
Zgodność rozkładu danych eksperymentalnych z rozkładem normalnym sprawdzano testem Shapiro-Wilksa. Różnice pomiędzy wynikami oceniano za pomocą nieparametrycznego testu U Manna Whitneya. Analizy wykonywano za pomocą oprogramowania Statistica®6.0 (StatSoft). Wartość P poniżej 0,05 uważano za istotną statystycznie.

WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie wyników otrzymanych z cytometru przepływowego (rys. 1) wykazano statystycznie istotne różnice (P = 0,04) w koncentracji monocytów, których było więcej we krwi klaczy zdrowych. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w liczebności limfocytów i neutrofilów we krwi obwodowej badanych grup klaczy. Odnotowano natomiast niższą aktywność fagocytarną [fluorescencję] zarówno neutrofilów (P = 0,049), jak i monocytów (P = 0,006) krwi klaczy, które przechorowały streptokokozę (tab. 1).

Próby krwi, przygotowane zgodnie z zaleceniami cytometrii przepływowej, analizowano także w mikroskopie fluorescencyjnym (rys. 2).

Wykazano, że wokół fagocytujących neutrofilów i monocytów liczba komórek *E. coli* u klaczy zdrowych wynosiła średnio 11, natomiast u ozdrowieńców – 23. Z kolei na podstawie wykonanych rozmazów krwi pełnej obwodowej wykazano statystycznie istotne różnice tylko pomiędzy odsetkiem eozynofilów (P = 0,000004; tab. 2). Ich koncentracja u klaczy, które przechorowały streptokokozę, była czterokrotnie mniejsza.



Rys. 1. Liczebność i aktywność fagocytarna komórek krwi klaczy zdrowej (fagotest z cytometru przepływowego)
Fig. 1. Number and phagocitic activity of heath mare's blood cells. The example of date printout of phagotest after flow cytometry analysis

Tabela 1. Liczebność i aktywność fagocytarna leukocytów klaczy zdrowych (n = 12) i ozdrowieńców (n = 13)

Table 1. Number and phagocytic activity of leucocytes in healthy mares (n = 12) and the recovered ones (n = 13)

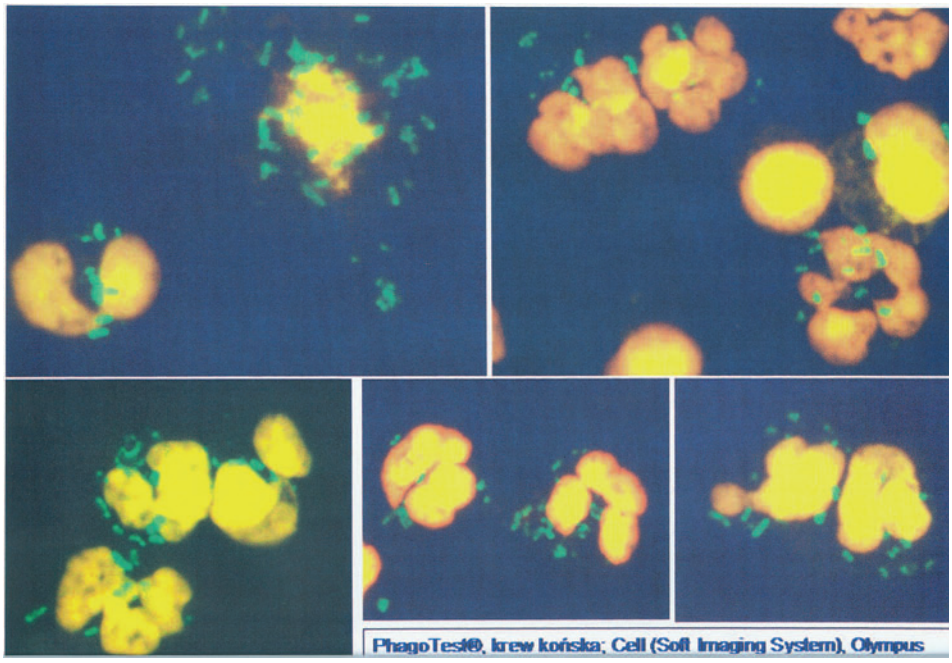
Parametry badane Analysed parameters	Miara statystyczna Statistical measure	Klacze zdrowe Healthy mares	Klacze po przebytej streptokokozie Mares after streptococcal infection	P
Odsetek limfocytów krwi obwodowej Blood lymphocyte percentage	$\bar{x}$ SD	41,14 12,84	38,32 7,93	0,66
Odsetek neutrofilów krwi obwodowej Blood neutrophil percentage	$\bar{x}$ SD	48,58 13,51	49,30 10,29	0,99
Odsetek neutrofilów fagocytujących Phagocytosing neutrophil percentage	$\bar{x}$ SD	84,34 11,70	86,17 8,31	0,87
Średnia intensywność fluorescencji w neutrofilach Mean fluorescence intensity in neutrophils	$\bar{x}$ SD	981,75 380,84	745,86 116,02	0,049
Odsetek monocytów krwi obwodowej Blood monocyte percentage	$\bar{x}$ SD	4,64 1,44	3,68 1,26	0,04
Odsetek monocytów fagocytujących Phagocytosing monocyte percentage	$\bar{x}$ SD	45,08 10,23	44,71 8,98	0,87
Średnia intensywność fluorescencji w monocytach Mean fluorescence intensity in monocytes	$\bar{x}$ SD	871,38 175,90	680,31 120,05	0,006

$\bar{x}$ – średnia arytmetyczna badanego parametru, SD – odchylenie standardowe, P – istotność statystyczna.

$\bar{x}$ – arithmetical mean, SD – standard deviation, P – statistical significance.

Zmniejszona zdolność do pochłaniania drobnoustrojów przez neutrofile i monocyty we krwi obwodowej może wskazywać na niedojrzałość morfologiczną tych komórek. U klaczy ozdrowieńców stwierdzono zmniejszenie liczby monocytów we krwi obwodowej, natomiast nie stwierdzono istotnych zmian w odsetku neutrofilów. Infekcja *S. equi* wywołuje proces zapalny toczący się pierwotnie w obrębie błon śluzowych nozdrzy, a następnie węzłów chłonnych, do których z krwi obwodowej wędrują głównie neutrofile. Mechanizmem kompensującym ubytek neutrofilów we krwi obwodowej jest zwiększona ich produkcja w szpiku kostnym [May i Machesky 2001]. W rozmazach krwi klaczy, które przechorowały streptokokozę, widoczne były liczne neutrofile niedojrzałe morfologicznie. Odsetek neutrofilów krwi obwodowej u klaczy zdrowych i ozdrowieńców nie różnił się statystycznie istotnie, co wskazywałoby na kom-

pensacyjną ich produkcję w szpiku kostnym. Neutrofile u klaczy ozdrowieńców wykazywały mniejszą zdolność do trawienia drobnoustrojów, która charakterystyczna jest dla komórek niedojrzałych czynnościowo. Zmniejszenie liczby monocytów we krwi obwodowej klaczy chorych spowodowane mogło być ukierunkowaną wędrówką tych komórek do miejsca zapalenia, co wykazali również inni autorzy [Bertram i in. 1982].



Rys. 2. Fagocytoza komórek krwi klaczy. Fagocyty ozdrowieńca – strona lewa, klaczy zdrowej – strona prawa i środek

Fig. 2. Phagocytosis performer by mare's blood cells. Phagocytosis by blood cells of convalescent mare – left site, phagocytosis by blood cells of heath mare – right site

U klaczy, które przechorowały streptokokozę, stwierdzono zmniejszoną zdolność do pochłaniania drobnoustrojów przez komórki żerne we krwi obwodowej (tab. 1), ale chemotaksja *E. coli* w kierunku fagocytów była większa (rys. 2). *Streptococcus equi* wiąże się z odpowiednimi ligandami do komórek gospodarza, co doprowadza do zablokowania receptorów, niezbędnych komórkom fagocytującym do skutecznego przeprowadzenia procesu niszczenia bakterii [Sweeney i in. 2005].

Ograniczenie zdolności fagocytarnej neutrofilów spowodowane jest współdziałaniem czynników zjadliwości patogenu. W efekcie tworzą się kolonie paciorkowców w postaci długich łańcuchów oraz stwierdza się obumierające neutrofile [Timoney 2004]. Czynnikiem zjadliwości *S. equi*, który mógł wpłynąć na ograniczenie fagocytozy końskich neutrofilów, jest otoczka wytwarzana przez szczepy powodujące zołzy. Otoczka znacznie zmniejsza liczbę rozpoznawanych a następnie trawionych przez neutrofile komórek bakteryjnych. Zwiększa ona także ładunek negatywny oraz hydrofilność powierzchni komórki bakteryjnej, stwarzając środowisko

chroniące aktywne proteazy oraz toksyny, takie jak streptolizyna S. Otoczka odpowiedzialna jest także za aktywność białka SeM, jak i prawdopodobnie innych białek powierzchniowych *S. equi*. Szczepy bezotoczkowe o zmniejszonej zjadliwości, wykazujące normalny poziom ekspresji białka SeM, są efektywniej fagocytowane niż otoczkowe. Neutrofile końskie inkubowane z otoczkowym supernatantem *S. equi* stawały się niezdolne do chemotaksji [Timoney 2004].

Tabela 2. Leukogram białokrwinkowy klaczy zdrowych (n = 12) i ozdrowieńców (n = 13)
Table 2. Leukogram of healthy mares (n = 12) and the recovered ones (n = 13)

Parametry badane Analysed parameters	Miara statystyczna Statistical measure	Klacze zdrowe Healthy mares	Klacze po przebytej streptokokozie Mares after streptococcal infection	P
Neutrofile Neutrophils	$\overline{x}$ SD	45,49 8,40	42,30 9,36	0,30
Eozynofile Eosinophils	$\overline{x}$ SD	7,05 2,48	1,71 1,23	0,000004
Bazofile Basophils	$\overline{x}$ SD	0,03 0,11	0,00 0,00	0,34
Monocyty Monocytes	$\overline{x}$ SD	0,25 0,58	0,07 0,16	0,59
Duże limfocyty Large limphocytes	$\overline{x}$ SD	4,78 3,24	3,91 1,03	0,30
Małe limfocyty Small limphocytes	$\overline{x}$ SD	41,93 12,28	51,62 10,10	0,05
Suma limfocytów Total limphocyte count	$\overline{x}$ SD	46,73 10,94	55,53 10,30	0,05

$\overline{x}$ – średnia arytmetyczna badanego parametru, SD – odchylenie standardowe, P – istotność statystyczna.
$\overline{x}$ – arithmetical mean, SD – standard deviation, P – statistical significance.

Receptory integrynowe warunkujące wędrówkę komórek żernych do miejsca zapalenia wymagają uprzedniego związania z fibronektyną. Zdolność *S. equi* do wiązania fibronektyny może, z jednej strony, wpływać na adhezję bakterii do komórek gospodarza, z drugiej tworzyć pomost pomiędzy komórką bakterii a fagocytem. Połączenie fagocytu z fibronektyną powoduje unieruchomienie leukocytów w miejscu zapalenia. Zatem cały cykl przemian monocytów krwi obwodowej w fagocyty tkankowe zależy m.in. od aktywacji receptorów integryny i warunkuje funkcje żerne powstałych z nich makrofagów [Meehan i in 2001].

Konie, które wyzdrowiały, mogą stać się stałymi bezobjawowymi nosicielami *S. equi* i zarażać wrażliwe osobniki, przyczyniając się tym samym do rozprzestrzeniania choroby [Lewis i in. 2008]. Mniejsza aktywność układu immunologicznego klaczy, które przechorowały zakażenie, może wynikać z ich bezobjawowego nosicielstwa *S. equi*.

Badanie aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów krwi może być pomocne w diagnozowaniu bezobjawowego nosicielstwa *S. equi* u koni.

Składamy podziękowania dla Pana Profesora dr. hab. n. med. Wenancjusza Domagały i Pana Lesława Łukawskiego, lekarza weterynarii za udzieloną pomoc w zrealizowaniu pracy.

PIŚMIENNICTWO

Bertram T.A., Coignoul F.L., Jensen A.E.,1982. Phagocytosis and intracellular killing of the contagious equi metritis organism by equine neutrophils in serum. Inf. Immunol. 37 (3), 1241–1247.

Chanter N., 1997. Streptococci and enterococci as animal pathogens. J. Appl. Microbiol. Symp. (Suppl.) 83, 100S–109S.

Lewis M.J., Meehan M., Owen P., Woof J.M., 2008. A common theme in interaction of bacterial immunoglobulin binding proteins with immunoglobulins illustrated in the equine system. J. Biol. Chem. 14, 34–39.

May R.C., Machesky L.M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. 114, 1061–1077.

Meehan M., Lynagh Y., Woods C., Owen P., 2001. The fibrinogen-binding protein (FgBP) of Streptococcus equi subs. Equi additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. Microbiology 147, 3311–3322.

Sweeney R., Timoney J.F., Newton J.R., Hines M.T., 2005. Streptococcus equi Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control and Prevention of Strangles. J. Vet. Int. Med. 19, 123–134.

Timoney J.F., 2004. The pathogenic equine streptococci. Vet. Res. 35, 397–409.

Tiwari R, Qin A., Artiushin S., Timoney J.F., 2007. Se18.9, an anti-phagocytic factor H binding protein of *Streptococcus equi*. Vet. Microbiol. 33, 105–115.

Woźniak-Kosek A., Reiss J., Kawiak J., 2003. Cytometria przepływowa w klinicznych analizach bakteriologicznych. Postępy Mikrobiol. 42 (2), 235–254.

INNATE NON-SPECIFIC IMMUNITY IN CLINICALY HEALTHY STANDARD BREED MARES AFTER *STREPTOCOCCUS EQUI* INFECTION

Abstract. Phagocytosis is an elementary function of neutrophils, monocytes and tissue macrophages. The process on its own as well as its efficiency is significantly limited in case of *Streptococcus equi* infections in horses. Strangles diagnosis and poor effectiveness of treatment is due to difficulties in identification of asymptomatic hosts. The aim of this study was to compare the course of neutrophil and monocyte phagocytosis in clinically healthy horses after *Streptococcus equi* infection versus control group. The phagocytosis activity was determined by means of PhagoTest® and flow cytometry. The blood was obtained from 13 mares recovered from streptococcal infection caused by *S. equi* and 12 mares which never demonstrated clinical symptoms of this disease. A statistically significant difference was shown in blood monocytes concentration in control group. There were no statistically significant differences between the amount of lymphocytes and neutrophils. Lower phagocytosis activity (fluorescence) was observed among neutrophils ($P = 0.049$) and monocytes ($P = 0.006$) in recovered mares. Moreover, the percentage of eosinophils was also lower in this group, while the chemotaxis was enhanced. Limited immunological response in the recovered mares may be due to asymptomatic carrier state of *S. equi*. Therefore, the determination of neutrophil and monocyte phagocytic activity may be useful in diagnosis of asymptomatic *S. equi* infections.

Key words: flow cytometry, mare, phagocytosis, *Streptococcus equi*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 26.10.2010