

Odporność komórkowa i humoralna u gęsi z amyloidozą

ANDRZEJ GAWĘŁ, BOŻENA OBMIŃSKA-DOMORADZKA*,
MICHAŁ MAZURKIEWICZ, ALINA WIELICZKO

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

*Katedra Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Gawęł A., Obmińska-Domoradzka B., Mazurkiewicz M., Wieliczko A.

The cellular and humoral immune response in geese with amyloidosis

Summary

The studies were carried out on 10 geese (aged 4 years) with amyloidosis, selected at random from a flock. The control group consisted of 10 healthy geese, also aged 4 years. The measurements included: hematology indices, phagocytic and killing activity of peripheral blood neutrophils and proliferative response of blood lymphocytes stimulated *in vitro* with concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide of *E. coli* (LPS). Moreover, the primary humoral response of fowl immunized with sheep red blood cells (SRBC) was defined by determining the number of lymphocytes producing hemolytic anti-SRBC antibodies (PFC) and the total and 2-mercaptoethanol resistant serum agglutination titers.

The data obtained in the present study demonstrate that the hematocrit value and erythrocyte count were lower in geese with amyloidosis as compared to the healthy geese. It has also been discovered that amyloidosis affects the immune system, as manifested by a decreased phagocytic and killing activity of peripheral blood neutrophils and an increased proliferative response of blood lymphocytes stimulated *in vitro* with Con A and LPS. Moreover, the primary humoral response in SRBC-immunized geese with amyloidosis was short-lived as compared to the control group.

Keywords: amyloidosis, geese, immunity

Amyloidozę (skrobiawicę) charakteryzuje pozakomórkowe odkładanie się w różnych narządach, wszędzie tam, gdzie występuje tkanka łączna limfatyczna, białka fibrylarnego nazywanego amyloidem. Jest ona schorzeniem postępującym, w przebiegu którego niezwykle trudno jest zahamować odkładanie się złogów amyloidu. Prowadzi to w konsekwencji do stopniowego zaniku narządów, upośledzenia ich funkcji oraz śmierci organizmu (7).

Amyloidozę poza ptakami wodnymi, u których występuje najczęściej, diagnozowano również u kurcząt, kur, indyków i ptaków w ogrodach zoologicznych (4, 9, 12, 13, 16). Uważa się, że częstotliwość występowania amyloidozy wzrasta wraz z wiekiem ptaków. Zależy ona również od takich czynników jak: predyspozycja genetyczna, czynniki środowiskowe czy też różne zakażenia przewlekłe (3, 9, 12). U zwierząt wywoływano też eksperymentalnie amyloidozę za pomocą związków chemicznych, bakterii i ich toksyn oraz inaktywowanych pasożytów (5, 6, 12, 17, 19). Amyloidozie z reguły nie towarzyszą charakterystyczne objawy kliniczne, a schorzenie diagnozowane jest zazwyczaj pośmiertnie.

Patogeneza amyloidozy nie jest w pełni wyjaśniona. Najczęściej stwierdza się występowanie reaktywnego amyloidu, którego włókna składają się z protein A (AA), powstających w efekcie proteolizy z białek ostrej fazy, surowiczego amyloidu A (SAA). SAA syntetyzowany w wątrobie, uwalniany pod wpływem stymulacji cytokinami, występuje we krwi jako apoproteina (apo SAA) powstająca z wysoce zagęszczonych lipoprotein (cyt. 3). Proces przekształcania się białka SAA w struktury włókniste amyloidu jest słabo poznany. Dużą rolę w tym procesie odgrywa apolipoproteina E i czynnik AEF (Amyloid Enhancing Factor) (7).

Celem prezentowanych badań było porównanie statusu immunologicznego gęsi zdrowych i gęsi z amyloidozą, utrzymywanych w warunkach chowu fermowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na gęsiach stada reprodukcyjnego rasy biała włoska w wieku 4 lat z rozpoznaną histopatologicznie amyloidozą. Do badań wybrano losowo z chrego stada 10 ptaków, zaś grupę kontrolną stanowiło 10 gęsi zdrowych również w wieku 4 lat pochodzących z in-

nej fermy. Zakres badań laboratoryjnych obejmował badanie hematologiczne krwi obwodowej oraz ocenę aktywności proliferacyjnej limfocytów krwi obwodowej stymulowanych mitogenami: konkanawaliną A (Con A) i lipopolisacharydem (LPS) z *E. coli* (szczep O127:B8). Ponadto określano pierwotną odpowiedź humoralną po immunizacji ptaków zawiesiną erytrocytów owcy (SRBC), oznaczając liczbę limfocytów krwi produkujących przeciwciała hemolityczne anti-SRBC oraz miano przeciwciał anti-SRBC w surowicy.

Elementy morfotyczne krwi obliczano metodą Natta-Herricka (18) w komorze Thoma-Zeissa, hemoglobinę oznaczano kolorymetrycznie jako cjanohemoglobinę, wskaźnik hematokrytowy – przy użyciu kapilar oraz wirówki mikrohematokrytowej „Unipan” typ 316, a leukogram oznaczano metodą Schillinga z rozmazów krwi barwionych metodą Peppenheima (14).

Aktywność bójczą neutrofilów krwi obwodowej określano testem NBT (test z błękitem nitrotetrazolowym) według metody Raman i Poland (11) oraz jako indeks zabijania według metody podanej przez Kostro i Wołoszyna (2). Ponadto określano zdolność pochłaniania przez neutrofile *Staphylococcus aureus* Oxford 209P. Badanie to wykonano według metodyki opisanej przez Szewczyka (15), a wyniki przedstawiono w formie procentu komórek fagocytujących oraz indeksu fagocytarnego (IF).

$$IF = \frac{\text{liczba sfagocytowanych bakterii}}{\text{liczba makrofagów fagocytujących}}$$

Metodą chemiluminescencji (Chl) zależną od luminolu określano aktywność fagocytarną neutrofilów stymulowanych opsonizowanymi cząsteczkami zymosanu A według metodyki podanej przez Müller-Peddinghaus (10).

Odpowiedź proliferacyjną limfocytów krwi oznaczano po ich stymulacji *in vitro* mitogenami: Con A i LPS. Limfocyty krwi izolowano przez wirowanie krwi heparynizowanej (10 j.m./1 ml) w temp. 4°C przez 20 min. przy 2000 obrotów/min. Zebraną frakcję limfocytów przemywano 0,83% sterylnym chlorkiem amonu w celu lizy erytrocytów i kolejno dwukrotnie płynem MEM. Następnie limfocyty zawieszano w medium hodowlanym, które stanowił płyn RPMI – 1640 z dodatkiem 100 j.m. penicyliny/ml, 100 µg streptomycyny/ml i 0,1% roztwór fungizonu, tak aby w 1 ml zawiesiny było 4×10^6 komórek. Żywotność otrzymanych zawiesin limfocytów określano przez barwienie przygotowanych *ex tempore* 1% roztworu błękitu trypanu z dodatkiem 4,25% roztworu chlorku sodowego w stosunku 4:1. Hodowle limfocytów zakładano w sterylnych, 96-dołkowych, okrągłodennych płytkach titracyjnych (GIBCO). Do każdego dołka o pojemności 200 µl dodawano zawiesinę przygotowanych limfocytów o gęstości 4×10^6 komórek tj. 10×10^5 limfocytów/dołek. Każdą hodowlę zakładano w czterech powtórzeniach. Do stymulacji *in vitro* limfocytów używano mitogenów Con A i LPS, które dodawano do każdej hodowli odpowiednio w stężeniach 1 µg/ml. Równolegle dla każdej zawiesiny stymulowanej *in vitro* Con A lub LPS prowadzono hodowle limfocytów bez dodatku mitogenu.

Hodowlę prowadzono *in vitro* przez 72 godz. w inkubatorze w temperaturze 37°C ze stałym 5% dodatkiem CO₂.

Na 6 godzin przed zakończeniem inkubacji do każdej hodowli limfocytów dodawano trytonowaną tymidynę (6-³H-Thymidine, Praga) w stężeniu 1 µCi/200 ml hodowli. Po inkubacji hodowle harwestowano przy użyciu harwestera komórkowego (Skatron) na specjalne filtry bibułowe. Po wysuszeniu krążki bibuły umieszczano w probówkach do scyntylacji, zalewano płynem scyntylacyjnym i mierzono poziom wbudowanej tymidyny znakowanej trytem, w syntetyzujące DNA limfocyty przy użyciu licznika scyntylacyjnego (Packard). Odpowiedź proliferacyjną limfocytów oceniano stopniem inkorporacji 6-³H-tymidyny i wyrażono liczbą impulsów na minutę (cpm-counts per minute) oraz przedstawiono w postaci indeksu stymulacji (IS).

$$IS = \frac{\text{średnia cpm próby stymulowanej}}{\text{średnia cpm próby kontrolnej}}$$

Swoistą pierwotną odpowiedź humoralną określano w stosunku do antygeny grasiczozależnego, jakim są erytrocyty owcy (SRBC). Immunizacji gęsi dokonano podając dożylnie 1 ml 10% zawiesiny SRBC w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), którą uprzednio pobrano w sposób sterylny do płynu Alsevera i przechowywano w nim co najmniej przez trzy doby w temp. 4°C.

Po 6 dniach od immunizacji ptaków SRBC oznaczano liczbę limfocytów krwi produkujących przeciwciała hemolityczne anti-SRBC przy użyciu metody „lysinek hemolitycznych” (PFC – plaque forming cells) – według metody miejscowej hemolizy w żelu agarowym opisanej przez Mishella i Duttona (8). Krew pobierano na heparynę (10 j.m./1 ml), a następnie nawarstwiano na mieszaninę izolacyjną (Ficoll – 400 + Uropolina 75%) o gęstości 1,072 w stosunku 1:3. Po odwirowaniu (30 min. 3000 obrotów/min. w temp. 4°C) zbierano limfocyty z interfazy i dwukrotnie płukano w płynie Hanksa. Oznaczano żywotność komórek przy użyciu błękitu trypanu. Następnie 0,5 ml roztworu 0,5% agarozu o temp. 45°C mieszano z 0,1 ml 10% zawiesiny SRBC i 0,1 ml zawiesiny limfocytów o gęstości 1×10^6 komórek/ml. Po wylaniu na agarowane szkiełka inkubowano komórki przez 2 godziny w komorze wilgotnej w temp. 37°C ze stałym 5% przepływem CO₂ (Haereus). Następnie zalewano szkiełka komplemmentem świnki morskiej (Biomed), rozcieńczonym płynem Hanksa 1:10 i ponownie inkubowano przez 2 godz. w w/w inkubatorze. Po ostatniej inkubacji liczono miejsca hemolizy (lysinki), których liczba odpowiada liczbie komórek tworzących przeciwciała anti-SRBC.

Miano przeciwciał anti-SRBC w surowicy oznaczano po 6, 10 i 14 dniach od immunizacji SRBC. Po pobraniu krwi żyłnej otrzymywano surowicę przez odwirowanie próbki krwi przez 60 min. przy 4000 obrotów/min. Otrzymane surowice inaktywowano przez 30 min. w temp. 56°C. Oznaczano miano hemaglutynin całkowitych, które odpowiada klasie IgM przeciwciał oraz opornych na 2-merkaptopetanol (2-ME) odpowiadających klasie IgG przeciwciał, według metody hemaglutynacji czynnej przy użyciu mikro-płytek (1).

Każdą badaną surowicę przed i po redukcji 2-ME rozcieńczano przy użyciu PBS w szeregu geometrycznym od 1:2 do 1:4096. Następnie w stosunku 1:1 dodawano 1% zawiesinę SRBC. Po 2 godz. inkubacji w temp. 37°C

Tab. 1. Wskaźniki hematologiczne gęsi z amyloidozą i ptaków kontrolnych

| Grupa | Hemoglobina (mmol/l) | Hematokryt („jeden”) | Erytrocyty ($10^{12}/l$) | Leukocyty ($10^9/l$) |
|------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| I Gęsi z amyloidozą | 13,81 ± 0,44 | 39,30 ^A ± 0,74 | 2,37 ^a ± 0,08 | 29,9 ± 38,3 |
| II Kontrola | 14,83 ± 0,46 | 44,22 ^B ± 0,78 | 2,65 ^b ± 0,09 | 33,3 ± 40,4 |

Objaśnienia: a, b – $p \leq 0,05$; A, B – $p \leq 0,01$.

Tab. 2. Wybrane wskaźniki odporności komórkowej u gęsi w przebiegu amyloidozy

| Grupa | % komórek fagocytycznych | Indeks fagocytny | Indeks zabijania | Test NBT | Odczyn ChI |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| I Gęsi z amyloidozą | 36,67 ^a ± 2,06 | 13,89 ^a ± 1,40 | 9,85 ^a ± 8,61 | 0,96 ^a ± 0,18 | 75,02 ^a ± 11,75 |
| II Kontrola | 45,13 ^b ± 2,18 | 15,29 ^a ± 1,49 | 31,01 ^b ± 9,13 | 0,60 ^a ± 0,19 | 57,92 ^a ± 12,39 |

Objaśnienie: a, b – $p \leq 0,05$.

Tab. 3. Odpowiedź humoralna u gęsi immunizowanych dożylnie 1 ml 10% zawiesiny erytrocytów owcy (SRBC)

| Grupa | Liczba PCF/ 10^6 limfocytów krwi po 6 dniach od immunizacji SRBC | Miano przeciwciał anti-SRBC | | | | | |
|------------------------|--|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | całkowite IgM (log2) | | | oporne na 2-ME (log2) | | |
| | | 6 dzień | 10 dzień | 14 dzień | 6 dzień | 10 dzień | 14 dzień |
| I Gęsi z amyloidozą | 185,5 ^b ± 74,5 | 8,8 ^a ± 1,12 | 9,1 ^a ± 0,83 | 6,0 ^b ± 0,89 | 7,6 ^b ± 1,42 | 6,7 ^b ± 1,18 | 3,1 ^b ± 1,13 |
| II Kontrola | 298,5 ^a ± 90,1 | 8,85 ^a ± 1,12 | 8,57 ^a ± 0,49 | 7,58 ^a ± 0,34 | 5,28 ^a ± 1,66 | 7,71 ^a ± 0,88 | 8,57 ^a ± 0,72 |

Objaśnienie: jak w tab. 2.

umieszczano płytki titracyjne w temp. 4°C i po 24 godz. inkubacji odczytywano wielkości miana badanych surowic przyjmując za wynik dodatni największe rozcieńczenie surowicy, które powoduje aglutynację krwinek. Wyniki badań wyrażano wielkością \log_2 miana.

Uzyskane w badaniach dane liczbowe opracowano statystycznie metodą analizy wariancji według programu STATGRAPHICS 3.0. Istotność różnic pomiędzy średnimi oceniano przy poziomie ufności $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

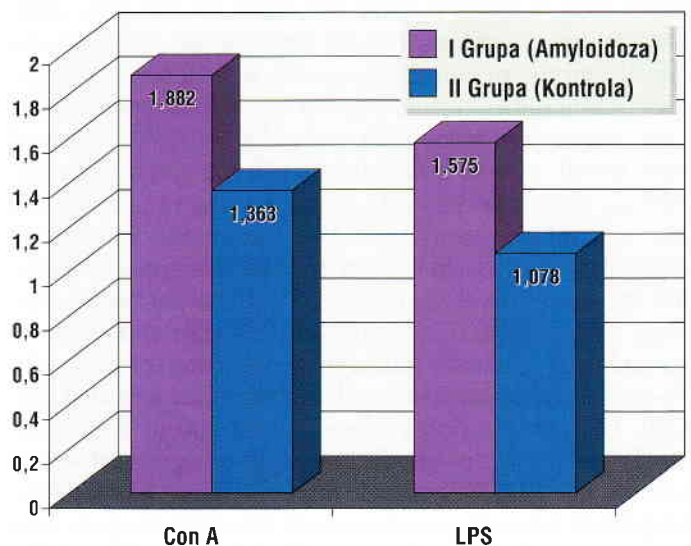
Wyniki i omówienie

Wyniki badań hematologicznych gęsi przedstawiono w tab. 1. Nie odnotowano pomiędzy ocenianymi grupami ptaków statystycznie istotnych różnic co do zawartości hemoglobiny oraz ilości leukocytów w krwi. Natomiast statystycznie istotne różnice między grupami gęsi stwierdzono w wartości hematokrytu oraz liczby erytrocytów. U gęsi z amyloidozą wskaźniki te były niższe, w porównaniu do grupy kontrolnej o około 11%.

Zachowanie się wybranych wskaźników nieswoistej odporności u gęsi w przebiegu amyloidozy ilustruje tab. 2. W grupie ptaków z amyloidozą odsetek komórek

fagocytycznych był zdecydowanie mniejszy aniżeli u ptaków grupy kontrolnej i wyniósł odpowiednio 36,67% i 45,13% ($p \leq 0,05$). Z kolei średnie wartości indeksu fagocytnego kształtowały się na zbliżonym poziomie, a odnotowane różnice nie były statystycznie istotne. Wartość indeksu zabijania w grupie gęsi dotkniętych amyloidozą wyniosła 9,85 wobec 31,01 w grupie kontrolnej.

Wzmoczoną aktywność fagocytną neutrofilów (tab. 2) odnotowano w teście chemiluminescencji (ChI) u gęsi z amyloidozą. Średnia wartość cpm/1000 neutrofilów u ptaków tej grupy wyniosła 75,02 wobec 57,92 u ptaków grupy kontrolnej. Również w teście NBT odnotowano wyższą żerność neutrofilów, wyrażoną war-



Ryc. 1. Indeks stymulacji limfocytów krwi obwodowej gęsi mitogenami Con A i LPS

tością ekstynkcji przeliczoną na 1000 neutrofilów u ptaków z amyloidozą, jednak różnice te okazały się statystycznie nieistotne. Wyniki odpowiedzi prolife-

racyjnej limfocytów krwi obwodowej gęsi stymulowanych mitogenami Con A i LPS przedstawiono na ryc. 1. Jak wynika z uzyskanych danych, zarówno Con A jak i LPS silniej stymulowały limfocyty gęsi z amyloidozą, a odnotowane różnice okazały się statystycznie istotne.

U gęsi zdrowych po immunizacji 1 ml 10% SRBC występuje w krwi obwodowej istotnie większa ilość limfocytów B produkujących przeciwciała hemolityczne anty-SRBC niż u gęsi ze stwierdzoną amyloidozą (6 dzień po immunizacji).

U gęsi z amyloidozą zwiększeniu liczby limfocytów krwi obwodowej produkującej przeciwciała hemolityczne anty-SRBC towarzyszyło w 6 dniu po stymulacji antygenem wyższe miano hemaglutynin anty-SRBC opornych na 2-merkaptopetanol (frakcja IgG). Z kolei po 10 i 14 dniach od immunizacji antygenem miano przeciwciał anty-SRBC opornych na 2-ME u gęsi chorych na amyloidozę ulegało istotnemu obniżeniu w porównaniu do grupy ptaków kontrolnych, co świadczy o szybszym wygasaniu pierwotnej odpowiedzi humoralnej po stymulacji swoistym antygenem.

W przebiegu amyloidozy następuje w krwi obwodowej spadek ilości erytrocytów oraz obniżenie wskaźnika hematokrytowego. Generalnie amyloidoza rzutuje na reaktywność immunologiczną gęsi, co wyraża się: zmniejszeniem aktywności fagocytarnej neutrofilów krwi obwodowej przy równoczesnym obniżeniu ich zdolności bójczej, pobudzeniem odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T i B krwi obwodowej stymulowanych mitogenami Con A i LPS oraz szybszym wygasaniem swoistej pierwotnej odpowiedzi humoralnej po stymulacji antygenem grasiczozależnym, jakim są erytrocyty owcy (SRBC).

Piśmiennictwo

1. Adler F. L.: Studies on mouse antibodies II. Mercaptoethanol sensitive 7S antibodies in mouse antisera to protein antigens. J. Immunol. 1965, 95, 26-47.
2. Kostro K., Wołoszyn S.: Porównanie wybranych parametrów odporności u lisów srebrzystych i polarnych. Medycyna Wet. 1996, 52, 255-257.
3. Landman W. J. M., Gruys E., Gielkens A. L. J.: Avian amyloidosis. Avian Pathol. 1998, 27, 437-449.
4. Landman W. J. M., Gruys E., Dwars R. M.: A syndrome associated with growth depression and amyloid arthropathy in layers: a preliminary report. Avian Pathol. 1994, 23, 461-470.
5. Ling Y. S., Mao H. P., Zhong A. C., Guo Y. C.: The effects of *Escherichia coli* and its endotoxin on amyloidogenesis in ducks. Vet. Pathol. 1991, 28, 519-523.
6. Ling Y.: Experimental production of amyloidosis in ducks. Avian Pathol. 1992, 21, 141-145.
7. Madej J. A., Rotkiewicz T.: Patologia ogólna zwierząt. Wyd. ART Olsztyn 1988, s. 101-106.
8. Mishell R. J., Dutton R. N.: Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. Exp. Med. 1967, 126, 423-442.
9. Moriguchi R., Izawa H., Soekawa M.: Histopathology of spontaneous amyloidosis in duck. Kitasato Arch. Exp. Med. 1974, 47, 4, 211-226.
10. Muller-Peddinghaus R., Hoppe G., Schumacher W.: Comparative chemiluminescence studies with elicited peritoneal and spleen cells of different strains of mice and rats and the guinea pigs. Zbl. Vet. Med. B 1983, 30, 456-466.
11. Raman U., Poland R. L.: A new micro-quantitative nitroblue tetrazolium test. Pediatric Res. 1975, 9, 334.
12. Rigdon R. H.: Amyloidosis: spontaneous occurrence in white pekin ducks. Am. J. Pathol. 1961, 39, 369-378.
13. Sato A., Koga T., Inoue M., Goto N.: Pathological observations of amyloidosis in swans and other Anatidae. Jap. J. Vet. Sci. 1981, 43, 509-519.
14. Stankiewicz W.: Badania laboratoryjne w diagnostyce weterynaryjnej. PWN, Warszawa 1973, s. 33-34.
15. Szewczyk K.: Fagocytoza. w: Ćwiczenia z immunologii. T. Gościcka (red.), PWN, Warszawa 1979, s. 129-131.
16. Tablante N. L., Vaillancourt J. P., Julian R. J.: Necrotic, haemorrhagic, hepatomegalic hepatitis associated with vasculitis and amyloidosis in commercial laying hens. Avian Pathol. 1994, 23, 725-732.
17. Thompson K. J., Freund J., Sommer H. E., Walter A. W.: Immunization of ducks against malaria by means of killed parasites with or without adjuvant. Am. J. Trop. Med. 1947, 27, 79-105.
18. Wachnik Z.: Choroby drobiu. PWN, Warszawa 1982, s. 486-496.
19. Wang D. H., Di B. C.: Pathological study on amyloidosis in chickens. Acta Vet. Zoot. Sin. 1992, 23, 256-261.

Adres autora: dr Andrzej Gawel, pl. Grunwaldzki 45, 50-305 Wrocław;
e-mail: gawel@ozi.ar.wroc.pl

BOND R., WREN L., LLYOD D. H.: Adherencja *Malassezia pachydermatis* i *Malassezia sympodialis* do keratynocytów psa, kota i człowieka *in vitro*. (Adherence of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia sympodialis* to canine, feline and human keratinocytes *in vitro*). Vet. Rec. 147, 454-455, 2000 (16).

Adherencja patogennych grzybów do komórek gospodarza posiada istotne znaczenie w kolonizacji organizmu ssaków. Różnice w zdolności do adherencji dotyczą zarówno miejsca kolonizacji jak i gatunku zwierzęcia. W badaniach nad adherencją użyto 2 szczepy *Malassezia pachydermatis* wyizolowane od psa z zapaleniem ucha zewnętrznego (CBS 1879) z lojotokowego zapalenia skóry w okolicy pach (BH4α) oraz dwa szczepy *M. sympodialis* pochodzące od zdrowych ludzi. Keratynocyty pochodziły od człowieka, psów i kotów. Ilość komórek *Malassezia* adsorbowanych na keratynocytach określono w mikroskopie świetlnym. *M. pachydermatis* CBS 1879 cechował się najlepszą adherencją do keratynocytów kota i człowieka, najniższą do keratynocytów psa. Natomiast *M. pachydermatis* BH4α cechowała najwyższą adherencją do keratynocytów psa i człowieka. Natomiast adherencja *M. sympodialis* była najwyższą w przypadku keratynocytów psa.

KELLER M., KREHON S., STANEK C., ROSENGARTEN R.: Keratynopatogenne grzyby pleśniowe i dermatofity występujące w zdrowych i chorych kopytach koni. (Keratinopathogenic mould fungi and dermatophytes in healthy and diseased hooves of horses). Vet. Rec. 147, 619-622, 2000 (22).

Przebadano mikologicznie próbki pobrane z koronki, warstwy zewnętrznej i środkowej kopyta zdrowych koni oraz koni ze zmianami patologicznymi w kopycie. Dermatofity i grzyby pleśniowe zidentyfikowano na podstawie charakteru wzrostu na podłożu Sabourauda z glukozą i właściwości mikroskopowych. Wśród 732 izolatów zidentyfikowano 26 gatunków grzybów pleśniowych. Wyróżniono trzy grupy grzybów: grzyby keratynopatogenne takie jak *Acremonium blochii*, *Alternaria alternata*, *A. chlamydospora*, *Geotrichum candidum*, *M. ferrugineum*, *M. gypseum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton sp.*, *T. mentagrophytes T. schonleinii*. Do grupy drugiej należały 223 izolaty o nieokreślonej patogenności, zaś do grupy trzeciej zaliczono 452 izolaty niepatogenne należące do 20 rodzajów. Grzyby pleśniowe o właściwościach keratynopatogennych występowały u 18% koni ze zmianami patologicznymi puszczy kopytowej i u 66,7% koni z nieznacznymi zmianami chorobowymi w puszczy kopytowej. Izolowano je też od 8,9% koni bez zmian w kopycie.

G.

G.