

ANNA KŁOSSOWSKA, JERZY WIŚNIEWSKI

Badanie podatności na sfagocytowanie (in vitro) w mleku szczepów *Sc. agalactiae* i *S. aureus* wyosobnionych z przypadków mastitis u krów

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Puławach,
Oddział w Bydgoszczy, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Fagocytoza i w jej konsekwencji zabijanie bakterii, które dostały się do wnętrza gruczołu mlecznego uważana jest powszechnie za główny mechanizm obronny przeciw mastitis (6). Z obserwacji terenowych wynika, że pomimo jednakowej ekspozycji krów na zakażenie nie wszystkie ćwiartki wymienia są jednakowo podatne, względnie unieszkodliwianie zarazków w wymieniu następuje z różną szybkością. Zjawisko to prawdopodobnie związane jest też z różną zdolnością fagocytarną leukocytów. Za tym przemawiają między innymi wyniki badań Hilla (3), Pappego i Wergina (5) oraz Williamsa i Buncha (6). Badania własne prowadzone nad aktywnością opsoniczną mleka wskazują, że odgrywa ona istotną rolę w fagocytozie. Wyniki tych badań podano w ostatniej publikacji (9). W dostępnym piśmiennictwie brak jest natomiast badań podatności szczepów patogennych dla gruczołu mlecznego na ich sfagocytowanie w obecności opsonin mleka pochodzącego ze zdrowych gruczołów mlecznych i dlatego postanowiono badania takie przeprowadzić. Zastosowano taki model oceny procesu fagocytarnego, w którym wprowadzono jako element stały obce gatunkowo (koń) komórki fagocytujące. Komponentami zmiennymi były różne szczepy bakteryjne i próby mleka (jako źródło opsonin), pochodzące od różnych krów. W takim modelu można było odpowiedzieć na dwa pytania: a) czy różne szczepy będą fagocytowane w obecności tej samej próby mleka jednakowo, czy w różnym stopniu i jak będzie przebiegać fagocytoza wobec prób mleka od in-

nych krów, b) czy różne próby mleka (od różnych krów) będą wykazywać tę samą względnie różną aktywność opsoniczną wobec tego samego szczepu, to znaczy czy jest ona cechą osobniczą krowy różniącą ją od innych krów.

Materiał i metody

Do badań użyto 5 szczepów *Sc. agalactiae* i 5 szczepów *S. aureus*. Ich charakterystykę podano w tab. 1. Szczepy wyosobniono z klinicznych przypadków mastitis u krów w różnych oborach. Do testowania używano 24 godzinnej hodowli bulionowej (odwirowanej i przemytej) o koncentracji 3×10^9 /ml. Jako komórek fagocytujących używano leukocytów krwi obwodowej konia (zdrowy, zawsze ten sam), pobranych w dniu nastawiania testu, doprowadzonych do koncentracji 5×10^7 /ml. Źródłem opsonin było mleko wymieniowe (4/4) od 5 zdrowych krów rasy ncb. Przebywały one w okresie badań w tych samych warunkach żywieniowych i środowiskowych, to jest w tej samej oborze, lecz innej niż obory, z których pochodziły testowane szczepy. Charakterystykę krów podano w tab. 2. Mleko pobierano 10 razy podczas doju porannego, w odstępach 4–5 dniowych, po odrzuceniu pierwszych strug. Do testowania (w dniu pobrania) używano mleka odtłuszczonego za pomocą wirowania. Nie zawierało ono bakterii patogennych dla wymienia, ani patologicznie zwiększonej liczby komórek somatycznych. Stopień sfagocytowania badanych szczepów określano metodą opisaną poprzednio (7) i wyrażano indeksem fagocytarnym. Indeks był średnią ($n=50$) zawartością sfagocytowanych bakterii w 1 leukocycie, obliczoną z preparatu mikroskopowego. W odczynie brały udział 3 komponenty dodawane w równych objętościowo ilościach. Uczulanie bakterii opsoninami (15 minut) i następną fazą fagocytowania (30 minut) następowało w temp. 37°C ; w kontroli opsoniny zastąpiono płynem PBS.

Wykorzystając przewidziane doświadczeniem wielokrotne badania, wykonywane w okresie ponad 1 mie-

Tab. 1. Charakterystyka szczepów bakteryjnych

Nr szczepu i ćwiartka wymienia	Pałczkowce					Gronkowce				
	hemoliza	CAMP-test	eskulina	hippuran sodu	blekit metyl.	Nr szczepu i ćwiartka wymienia	hemoliza	koagulaza	glukoza	mannitol
1 26218/D	gamma	+	-	+	-	6 67556/B	alfa i beta	+	+	+
2 4864/D	alfa	-	-	+	-	7 66507/C	alfa i beta	+	+	+
3 26189/B	alfa	+	-	+	-	8 1528/C	alfa i beta	+	+	+
4 56389/C	alfa	+	-	+	-	9 1639/D	alfa i beta	+	+	+
5 67690/D	alfa	-	-	+	-	10 6703/B	alfa i beta	+	+	+

Tab. 2. Charakterystyka krów w dniu rozpoczęcia badań

Nr krowy	Laktacja		Dzień ciąży	Wynik badania mleka w każdym dniu pobrania
	wiek	dzień		
I 234	3	9f	57	wszystkie próby cytologicznie i bakteriologicznie ujemne
II 224	3	123	53	
III 198	3	100	0	
IV 272	2	121	0	
V 273	2	115	20	

siąca, przanalizowano dodatkowo wpływ pogody na nasilenie procesu fagocytarnego. Badania takie można było przeprowadzić, ponieważ przez jednorodność warunków w jakich przebywały krowy, wykluczone były wpływy mikrośrodowiskowe. Wykorzystano analizę biometeorologiczną opartą na schemacie Dauberta (cyt. 1) sporządzoną (W. Dubiński, WSSE — Kraków) dla całego okresu, to jest zarówno dla dni badań, jak i dzielących badania. Posłużono się wymiernymi (od 0 do 3) wskaźnikami intensywności biotropowej (WIB),

które ostatnio przyjęły się w biometeorologii człowieka. Wartość zerowa (WfB=0) oznacza brak ujemnego oddziaływania pogody, a stopnie 1-3 wzrastające natężenie zjawisk meteorotropowych. Zagadnienia biometeorologii weterynaryjnej są mało poznane. Istnieje z pewnością wpływ pogody na ustrój zwierząt użytkowych. Trudno jest jednak na obecnym etapie ustalić związek między konkretnymi parametrami pogody a konkretnym objawem ze strony organizmu. Wyczerpujące na ten temat informacje zawiera praca C. Grosse Frie (2).

Wyniki i omówienie

Znaczna liczba danych (n=500) uzasadniała opracowanie statystyczne powszechnie znanymi metodami, przy uznaniu znamienności z błędem 5% (alfa=0,05). Przy obliczeniach (średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe,

współczynnik zmienności, test Studenta) zwraca uwagę mały rozrzut danych (V%), co czyni średnie miarodajnymi. Statystycznie opisane wyniki zamieszczono w tab. 3, a wyniki rejestrowane w danym dniu badania przedstawiono na ryc. 1.

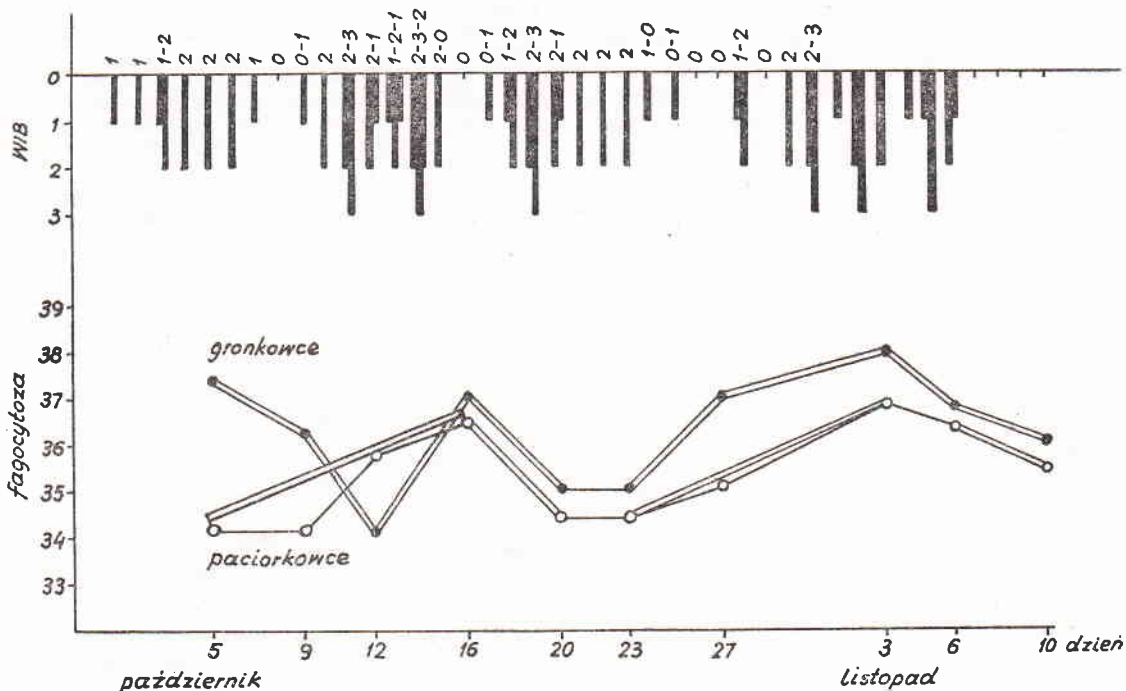
Tabela 3 zawiera 50 średnich. Każda z nich pochodzi z sumy wyników uzyskanych w 10 dniach (n=10). Celem było wyeliminowanie ewentualnego wpływu dnia badania na wynik, co — jak się później okazało — było uzasadnione.

Analizując dane tab. 3 wierszami, oceniono różnice w sfagocytowaniu poszczególnych szczepów w obecności opsonin mleka tej samej krowy. Przy analizowaniu danych tab. 3 ko-

Tab. 3. Stopień sfagocytowania (\bar{x} , s, V, n=10)

Nr krowy	Paciorkowce (liczby szczepów)					Gronkowce (liczby szczepów)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	36,08	35,09	34,24 ^a	35,53	35,75 ^a	35,54 ^b	37,00 ^b	36,29	36,67	35,93
	1,78	2,59	2,99	2,73	1,87	1,03	1,99	2,07	1,95	2,77
	4,95	7,39	8,73	7,56	5,09	2,91	3,77	5,70	5,33	7,73
II	36,16 ^a	35,08 ^b	33,67 ^a	37,04 ^c	35,36 ^a	35,60	36,12	36,99	35,83	37,35 ^A
	2,40	1,96	2,70 ^b	1,42	2,31	2,42	2,18	2,21	2,59	2,12
	6,65	5,44	8,01 ^{cd}	3,84	6,37	6,76	6,05	5,99	7,23	3,58
III	35,35	34,32	34,93	35,12	34,71	35,64	36,22	36,65 ^a	36,87 ^b	34,82 ^A
	2,07	1,05	4,65	3,80	2,83	1,90	2,57	1,93	1,88	2,88 ^a
	5,87	3,03	11,61	10,81	8,16	5,30	7,11	5,26	5,10	7,70 ^b
IV	35,50	35,29	34,85	35,87	35,44	36,69	35,68	36,80	35,70	36,22
	2,05	1,65	3,60	3,33	2,48	1,50	1,83	1,34	3,25	2,75
	5,64	4,69	10,35	8,29	7,01	4,11	5,12	3,65	9,10	7,60
V	36,23 ^a	34,38 ^a	35,45	35,55	35,58	36,16	35,79 ^a	36,08	37,62 ^a	35,85 ^b
	1,77	2,72	1,45	2,19	2,36	2,33	1,97	1,83	1,61 ^b	2,54
	4,90	7,23	4,12	6,16	6,69	6,44	5,53	5,23	4,29	7,09

Objaśnienie: para średnich różniących się znamiennością (w obrębie gatunku bakterii i w wierszu) oznaczona jest parą tych samych małych liter, natomiast w kolumnie dla szczepu nr 10 parą dużych liter.



Objaśnienie: Linie podwójne łączą średnie (n=25) znamiennie różne

Ryc. 1. Zmiany w nasileniu fagocytozy na tle oddziaływania biotropowego pogody

lumnamy odczytano, jak dany szczep był fagocytowany w obecności opsonin mleka różnych krów. Wyniki w powyższej kolejności interpretacyjnej są następujące: 1. wprawdzie wobec tej samej próby mleka niektóre szczepy są fagocytowane w różnym stopniu, ale przy zmianie próby mleka różnice dotyczą innych szczepów. Nie wykazano prawidłowości, że dany szczep niezależnie od próby mleka jest fagocytowany w większym lub mniejszym stopniu. 2. Różnic w aktywności opsonicznej badanych prób mleka w odniesieniu do danego szczepu nie stwierdzono. Wyjątek stanowi szczep gronkowca nr 10 silniej fagocytowany wobec opsonin mleka krowy nr II niż nr III.

Z powyższego wynika, że przy zastosowanym modelu fagocytozy: a) poszczególne szczepy bakteryjne są fagocytowane w mniejszym lub większym stopniu w obecności opsonin mleka tej samej krowy; b) aktywność opsoniczna mleka normalnego nie różni się u poszczególnych krów (z jednym wyjątkiem).

Po stwierdzeniu, że między próbkami mleka brak różnic w aktywności opsonicznej oraz różnic między stopniem sfagocytowania szczepów, które można by ująć w jakąś prawidłowość — przeanalizowano wyniki opracowywujących średnie dla danego dnia badania ($n=25$) oddzielnie dla paciorkowców i gronkowców. Wyniki przedstawiono na ryc. 1, na której też podano wartość WIB. Ogólnie można powiedzieć, że nasilenie procesu fagocytarnego było znamienne różnie w poszczególnych dniach badania. Stanowi to potwierdzenie wielu obserwacji dokonanych w odniesieniu do zmienności nawet dobowej różnych wskaźników czy składników biochemicznych. Zestawienie tych publikacji podał w swej pracy Lesiak (4).

Oddzielnym spostrzeżeniem jest natrafienie na ślad oddziaływania pogody na proces fagocytozy. Porównując na ryc. 1 wahania poziomu fagocytozy z nasileniem natężenia biotropowego wyrażonego WIB, daje się zauważyć pewien trend. Można dopatrzeć się nasilania sfagocytowania bakterii w okresie znacznej niestabilności pogody z silniejszym negatywnym jej oddziaływaniem. Ta interpretacja nie jest pozabawiona uzasadnienia. Znajduje ona potwierdzenie w jednej z poprzednich prac (8). Badając wówczas u krów aktywność opsoniczną surowicy krwi wykazano, że nasilenie fagocytowania było istotnie największe w niekorzystnych warunkach biometeorologicznych.

Piśmiennictwo

1. Assman D.: Die Wetterföhligkeit des Menschen, Jena 1963.
2. Grosse Frie C.: Zur Biometeorologie ovariieller Dysfunktionen beim Rind. Praca dokt., Bonn 1981.
3. Hill A. W.: Res. vet. Sci. 31, 107, 1981.
4. Lesiak M.: Pol. Arch. wet. 1983 (w druku).
5. Paape M. J., Wergin W. P.: J. Am. vet. med. Ass. 170, 1214, 1977.
6. Williams M. R., Bunch K. J.: Res. vet. Sci. 30, 298, 1981.
7. Wiśniowski J., Romaniukowa K., Grajewski H.: Bull. Vet. Institute, Puławy 9, 140, 1963.
8. Wiśniowski J., Drożdżyńska M., Rożankiewicz E.: Pol. Arch. wet. 16, 473, 1973.

9. Wiśniowski J., Drożdżyńska M., Klossowska A.: Milchwissenschaft 33, 740, 1978.

Adres autora: dr Anna Klossowska, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Клоссовская А., Висьнёвский Е. — Исследование податливости к фагоцитации (in vitro) в молоке штаммов *St. agalactiae* и *S. aureus*, выделенных из случаев мастита у коров

Наблюдали за процессом фагоцитации бактерий макрофагами периферической крови лошади. Источником опсонинов было молоко, происходящее из здоровых молочных желез 5 коров 14-й породы, преобладающих в тех же самых условиях окружающей среды. Бактерии (по 5 штаммов) были изолированы из молока из клинических случаев мастита коров из других коровников. Тестировали бактерии и молоко каждые несколько дней, в общем 10 раз. Различий между коровами по опсонической активности молока в принципе не обнаружили. Исключением являлись 2 коровы и фагоцитация 1 штамма. Разницы в податливости к фагоцитации между штаммами (в пределах вида бактерии) относились исключительно к данной пробе молока. С другими пробами молока не было различий или касались они других пар штаммов. Фагоцитарная активность зависела от дня исследования. Отметился биометротропизм. Интенсивность отрицательного воздействия погоды активировала процесс фагоцитоза.

Klossowska T., Wiśniowski J. — Susceptibility of *St. agalactiae* and *Staph. aureus*, isolated from cow milk, to phagocytosis

The process of bacterial cells phagocytosis by phagocytes of the equine peripheral blood was examined. Milk taken from normal five cows served as a source of opsonins. Five strains of each two species were isolated from cases of cow mastitis. The bacterial cells and milk were tested every few days (together 10 times). No significant differences regarding opsonic activity was found with exception of two cows and phagocytosis of one strain. The differences among strains to phagocytic susceptibility concerned a given sample of milk only. Other samples of milk did not show any differences or they affected other pairs of the strains. Phagocytic activity depended upon a day of examination. Biometrotropism was noted. A negative influence of weather made the process of phagocytosis more active.

FARAHAT A. A., YOUNIS M., AREF H.: Poziom kortykosteronu i FSH u dojrzalych sameców szczura po iniekcji prolaktyny i hormonu adrenokortykotropowego. (Corticosterone and follicle stimulating hormone levels after injection of prolactin and adrenocorticotrophic hormone into mature male rats). Acta Vet. (Beograd), 33, 15—20, 1983 (1).

Prolaktynę w dawce 5 jm lub ACTH w dawce 10 jm względnie obydwaj hormony podano dojrzalym samcom szczurów przez 6 kolejnych dni. Szczury z grupy kontrolnej otrzymały w iniekcji jałowy płyn fizjologiczny. Po 24 godzinach po ostatniej iniekcji zwierzęta dekapitowano i określano poziom kortykosteronu i FSH. Iniekcje ACTH względnie ACTH i prolaktyny zwiększały znamienne poziom kortykosteronu w płazmie do $56,25 \pm 1,97$ ug/ml i $51,75 \pm 1,7$ ug/ml (kontrola $41,25 \pm 1,68$ ug/ml). Iniekcje samej prolaktyny nie wpływały na stężenie kortykosteronu w płazmie szczurów. ACTH hamował wydalanie FSH z przesyłki mózgowej. Stężenie FSH w przysadce i w surowicy w grupie kontrolnej wynosiło odpowiednio 0,11 i 0,08 jm/ml, po iniekcji prolaktyny $0,13 \pm 0,02$ i $0,36 \pm 0,05$ jm/ml, po podaniu ACTH $0,41 \pm 0,09$ i $0,05$ im/ml i po iniekcji ACTH + prolaktyna $1,00 \pm 0,18$ i $0,09$ jm/ml.

G.