



R.3.2.2. Raport

Metodologie de abordare a infecțiilor la animalele de rentă – metodologia SCC din perspectiva analizei flow-citometrice

Raport efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod –PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Conf. Dr. Ioan Huțu și Conf. Dr. Calin Mircu

Membri: Dr. ing. Oana Gavriiliuc, Irina Patrs și Elena Hrițcu

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD- 2017.

1. Analiză diferențială a leucocitelor din probe de lapte cu ajutorul citometriei în flux

Izolarea celulelor somatice din probele de lapte s-a făcut prin centrifugare la rece, într-un interval de maxim 4 ore de la recoltare. Scopul acestor spălări repetate de 3 ori, prin centrifugare la 400 xg, timp de 10 min, urmată de decantare a supernatantului și resuspendare în PBS, fost de a îndepărta grăsimea din lapte. Soluția finală, obținută prin resuspendarea sedimentului într-un volum de 500 ul PBS, a fost filtrată printr-o membrană cu pori de 40 uM pentru a obține o suspensie unicelulară, necesară marcării pentru citometrie în flux.

Imunofenotiparea populațiilor leucocitare s-a realizat prin marcarea cu anticorpi primari monoclonali specifici pentru celulele bovine, anti-CD14, izotip IgG1 murin, și anti-CD11b, izotip IgG2b murin (ambii BioRad), conform instrucțiunilor producătorului, cu soluții de lucru diluate 1/10 din soluțiile stoc de anticorpi de 1mg/mL, rezultând o concentrație de 2.5 ug/mL anticorp per probă. Pentru vizualizarea legării anticorpilor de celule s-au folosit anticorpi policlonali secundari conjugați cu fluorocromi (ambii BD), specifici pentru izotipul fiecărui anticorp primar, astfel: anticorp conjugat cu APC anti-IgG1 murin care se va lega de anticorpul anti-CD14 și anticorp conjugat cu FITC anti-IgG2b murin, care se va lega de anticorpul anti-CD11b. Concentrația de anticorpi secundari folosită pentru marcarea a fost de 2-5 ug/mL per probă.

Achiziția probelor s-a făcut cu ajutorul citometrului în flux, iar analiza datelor de citometrie s-a realizat cu ajutorul programului FloJo 10 (BD), conform strategiei de gating prezentată în Fig.1.

În total, au fost analizate prin citometrie în flux în scopul identificării populațiilor leucocitare, 60 de probe de lapte, dintre care 48 probe de la animale distincte și 12 măsurători repetate la un interval de 2 luni, din probe de lapte provenite de la același animal. Rezumatul analizei diferențiale a populațiilor de leucocite este prezentat în Tabelul 1, iar datele pentru fiecare animal în parte, pentru fiecare eveniment de colectare și analiză citometrică în Tabelele 2-4.

Tabel 1. Statistică descriptivă a probelor de lapte analizate prin citometrie în flux (n=60)

	SCC (x1000 celule/mL)	DCC (%)		
		Ly	Macro	PMN
Media	380.5	63.8	7.6	25.7
SD	706.7	26.2	5.6	23.7
Min	28	2.9	1.4	2.2
Max	4424	94.7	31	87.6

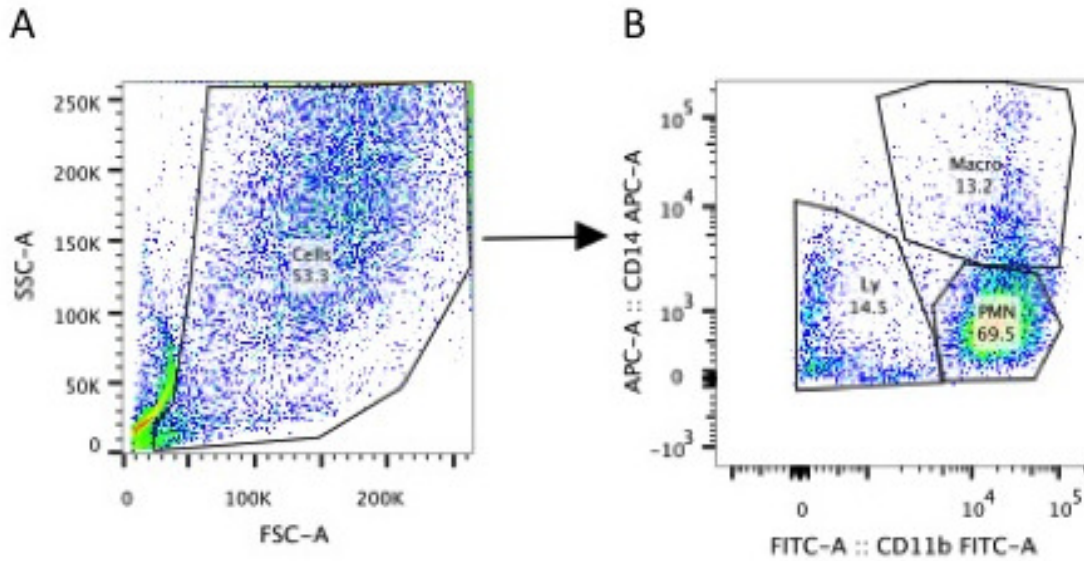


Fig.1 Strategia de gating pentru identificarea leucocitelor din probele de lapte. Din totalitatea celulelor somatice selectate pe baza caracteristicilor de mărime și granularitate din graficul FSC vs. SSC (A), au fost identificate neutrofilele polimorfonucleare (PMN) drept celule CD11b+, macrofagele (Macro) dublu pozitive CD14+CD11b+, iar limfocitele (Ly) prin diferență (B).

În cele 60 de probe de lapte analizate, proporția de limfocite a variat între 2.9 și 94.7%, cu o medie de 63.8% și o deviație standard de 26.2%, macrofagele au variat între 1.4 și 31%, cu o medie de 7.6% și deviație standard de 5.6%, iar neutrofilele polimorfonucleare au variat între 2.2 și 87.6%, cu o medie de 25.7% și o deviație standard de 23.7%.

Datorita limitelor largi în care au variat procentele din fiecare populație leucocitară, am testat statistic corelația dintre numărările diferențiale pentru fiecare populație leucocitară și numărătoarea de celule somatice, obținută din aceleași probe, cu ajutorul echipamentului De Laval Cell couter. Analiza statistică a indicat o corelație semnificativă ($p < 0.0001$) negativă între procentul de limfocite din probe și SCC, în timp ce procentul de polimorfonucleare urmează un trend opus, de corelație pozitivă cu SCC (Fig.2). Nu am găsit corelație între procentul de macrofage și SCC.



Tabel 2. Rezultatele analizei diferențiale de citometrie pentru lotul 1 (1.07.2020)

Lot	Tube	ID	SCC (/ul)	Ly (%)	Macro (%)	PMN (%)
1	1	0047	175	77.8	9.6	8.6
	2	7200	356	87.9	6.69	3.67
	3	7206	35	86.9	4.85	6.36
	4	0048	109	61.8	31	2.5
	5	3925	1538	37.4	11.9	47.5
	6	9696	76	84.9	2.58	11.1
	7	0075	125	88.1	4.72	4.86
	8	7724	873	38.8	8.15	48.7
	9	8034	64	92.7	1.58	3.45
	10	9242	111	89.7	3.55	4.9
	11	6196	223	91.7	1.38	5.6
	12	9630	47	72.9	5.11	18.9
	13	8457	53	88.6	5.86	4.3
	14	7225	42	80.1	7.48	10.6
	15	7880	36	92.9	2.06	2.96
	16	7881	64	75.8	12.7	8.21
	17	9022	57	66.8	10.1	20.7
	18	0049	129	57.2	6.37	33.2
	19	0048	28	92.4	1.89	5.15
	20	0073	48	76.8	7.08	14.2
	21	5825	36	92.9	3.35	2.72
	22	9000	134	94.7	1.72	2.77
	23	9699	189	78.1	2.67	17.9
	25	0907	39	76.9	6.29	14.5
	26	0804	272	87.8	4.23	7.29
	27	9246	214	61.9	8.69	27.4
	28	7872	101	66.3	10.4	19.4
	29	1070	88	86.2	1.82	9.2
	30	9244	137	48.7	12.3	34.3
	31	1064	82	90.7	4.44	3.26
	32	0908	63	91.6	3.04	3.88
	33	1407	197	88.8	6.19	2.9
	34	0802	370	38.2	7.97	52
	35	9241	31	83	10.9	3.4
	36	8696	75	82.6	6.03	6.8
	37	9400	116	32.5	7.33	58.6



Tabel 3. Rezultatele analizei diferențiale de citometrie pentru lotul 2 (7.07.2020)

Lot	Tube	ID	SCC (/ul)	Ly (%)	Macro (%)	PMN (%)
2	1	2616	154	55.5	3.94	34.1
	2	3480	529	14.5	13.2	69.5
	3	4075	115	57.7	5.92	30.2
	4	Bănescu	2795	23.2	16.6	56.4
	5	8817	355	13.8	4.52	80.1
	6	6032	1364	5.56	5.14	87.6
	7	3381	117	42.8	29.4	18.6
	8	6662	180	8.4	16.3	70.1
	9	392	4424	2.9	10.1	80.6
	10	3559	854	10.6	9.79	77.8
	11	Mărțița	138	61.5	5.36	28
	12	5062	53	53.3	5	38.6

Tabel 4. Rezultatele analizei diferențiale de citometrie pentru lotul 3 (4.09.2020)

Lot	Tube	ID	SCC (/ul)	Ly (%)	Macro (%)	PMN (%)
3	1	3559	470	64.9	2.72	28.9
	2	392	258	53.5	10.3	33.8
	3	6662	105	39.5	7.85	50.6
	4	6032	471	49.8	8.34	39.3
	5	3381	232	81	5.62	11.3
	6	8817	143	52.7	7.62	33
	7	3480	588	41.9	9.34	46.1
	8	Bănescu	1436	53.3	10.1	33.8
	9	Mărțița	664	88.4	4.52	2.22
	10	4075	388	52.3	13.4	30.8
	11	5062	255	84	3.55	11
	12	2616	411	76.1	4.46	17.7

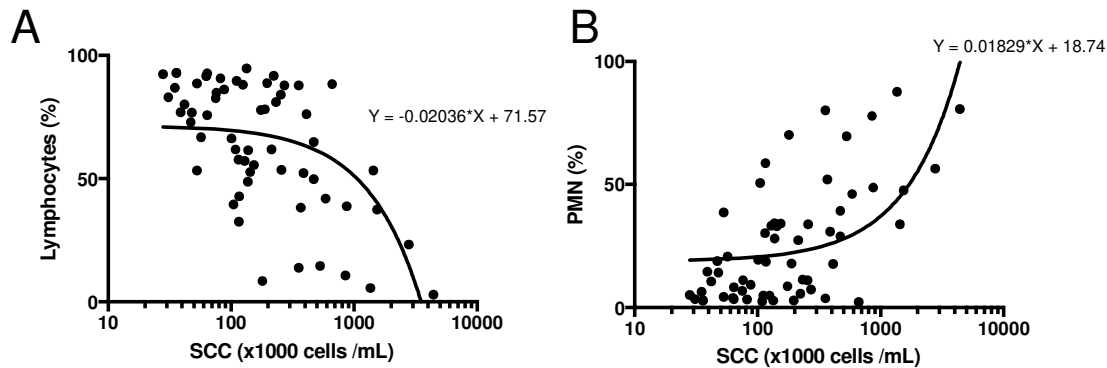


Fig. 2 Corelația dintre numărătoarea diferențială de limfocite, respectiv neutrofile polimorfonucleare (PMN) din probele de lapte și SCC (somatic cell count), reprezentate împreună cu regresia liniară calculată. Fiecare simbol reprezintă o măsurătoare.

Astfel, în probele considerate patologice, cu SCC >200 000 celule/mL, neutrofilele cresc de la o valoare medie în probele sănătoase de 18% la o valoare medie de 40%, atingând peste 80% pentru unele dintre probele cu SCC > 1 000 000 celule/mL.

Limfocitele sunt populația majoritară în peste 92% din probele considerate nepatologice, provenite de la glande mamare sănătoase, cu o frecvență medie de 72%, dar scad în probele patologice sub 50%.

În continuare, am verificat statistic dacă profilul imunologic diferă semnificativ între grupuri de animale stabilite pe baza valorilor SCC, pentru a identifica o limită de cut-off între un animal sănătos și unul bolnav. Atât în cazul în care limita de cut-off a fost valoare de 100 000 celule/mL, cât și în cazul în care valoarea de cut-off a fost de 200 000 celule/mL, a existat o diferență semnificativă între frecvența limfocitelor și frecvența PMN în cele 2 grupuri, dar nu și pentru macrofage (Fig.3, A-B). În cazul în care am clasificat probele în 3 grupuri, SCC <100 000, SCC între 100-200 000 și SCC >200 000, nu am obținut diferențe semnificative între grupuri alăturate. Pentru o clasificare mai bună a animalelor sănătoase și stabilirea unui marker prognostic de evoluție a stării de sănătate, considerăm ca sunt necesare mai multe probe, în special cu o numărătoare mai mică a SCC, deși în acest caz va fi mai dificil de realizat o analiză citometrică datorită numărului mic de celule.

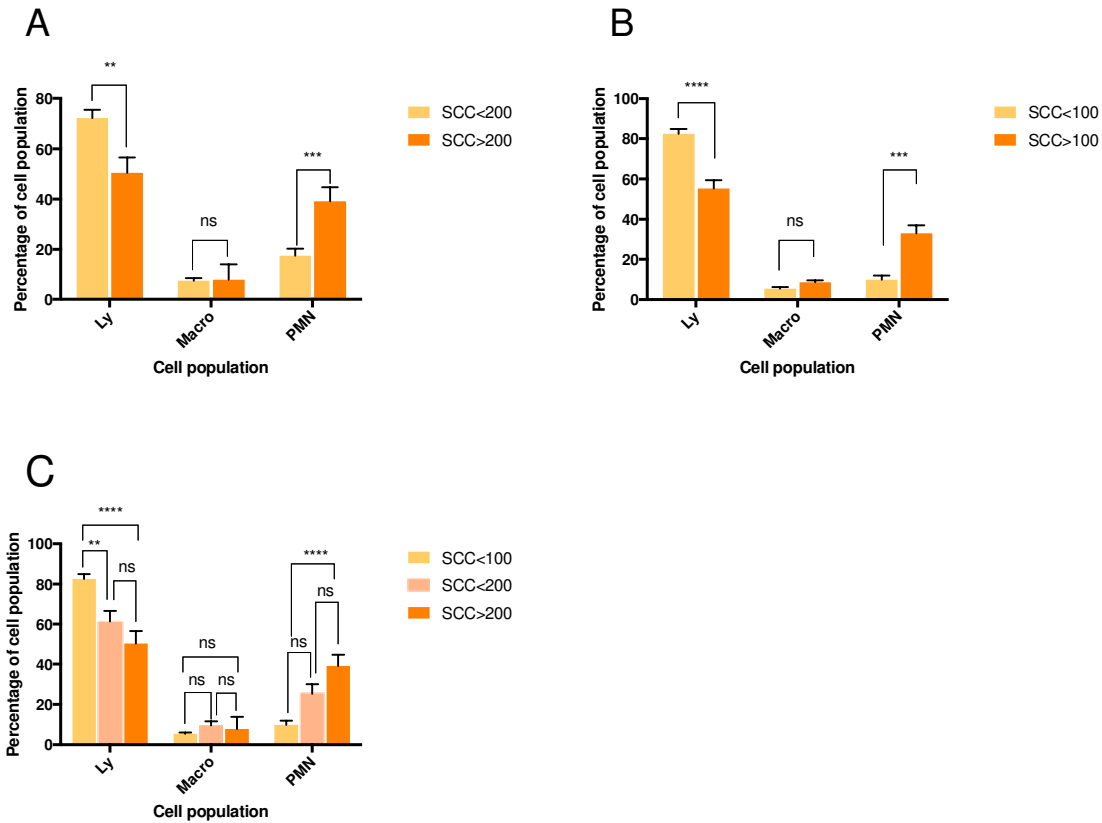


Fig.3 Comparație între determinările diferențiale de leucocite, în cazul în care probele sunt împărțite în 2 grupuri (A,B) sau în 3 grupuri (C) în funcție de valorile de SCC. Valorile pentru fiecare populație și grup sunt reprezentate ca valoare medie și S.E.M. **** P<0.00001; **P<0.001; NS P>0.05.

Pentru un grup de 12 animale, am făcut determinări diferențiale de leucocite prin citometrie în flux la un interval de 2 luni și le-am clasificat în 2 grupuri, în funcție de trendul modificărilor SCC: (I) în care a crescut SCC, n=6; (II) în care a scăzut SCC, n=6 (Fig.4A). În grupul în care am înregistrat o evoluție pozitivă a SCC, au fost vizibile modificări semnificativ statistice între valorile frecvenței limfocitelor și neutrofilelor (Fig.4B).

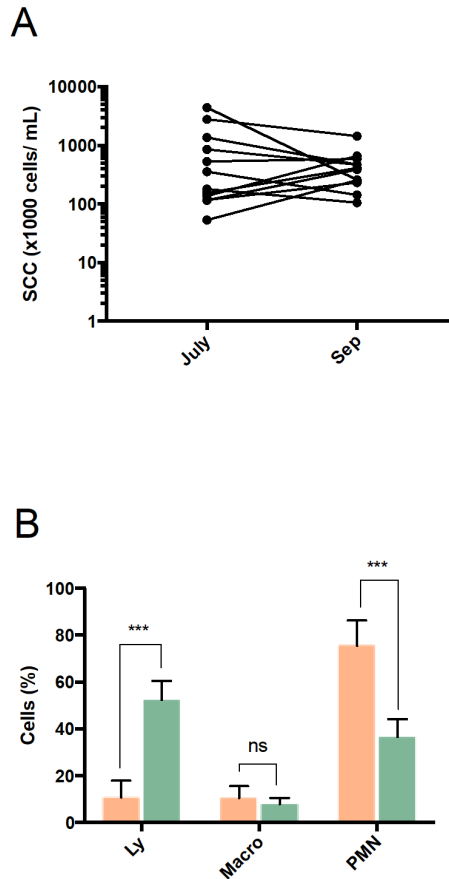


Fig. 4 Evoluția în timp a parametrilor SCC și DCC într-un lot de 12 animale, de la care s-au colectat probe de lapte la un interval de 2 luni. A Modificarea SCC. B Modificarea frecvenței leucocitelor în cadrul grupului de animale care au avut o modificare pozitivă a SCC.

2. Analiza diferențială a leucocitelor din probe de sânge periferic

Pentru un grup de 12 animale, pe lângă probele de lapte recoltate, am obținut și probe de sânge periferic colectat pe EDTA, pentru care am efectuat imunofenotiparea leucocitelor cu anticorpi anti-CD14 și anti-CD11b, în mod similar cu protocolul aplicat pentru probele de lapte. Suplimentar, a fost introdus un pas de liză a eritrocitelor, care ar fi interferat cu analiza citometrică datorită numărului mare de elemente. Analiza și identificarea leucocitelor s-a realizat conform strategiei de gating prezentată în Fig. 5.

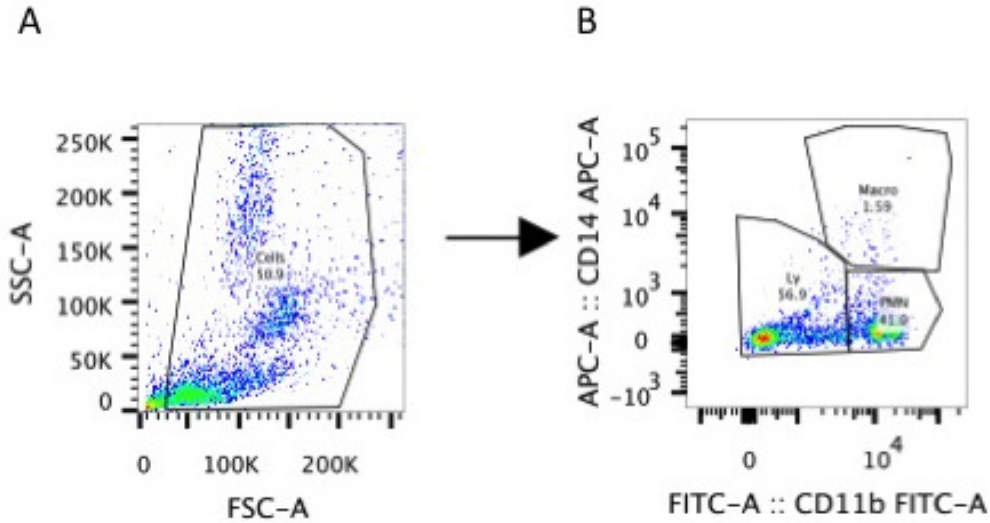


Fig.5 Strategia de gating pentru identificarea leucocitelor din probele sânge periferic. Din totalitatea celulelor somatice selectate pe baza caracteristicilor de mărime și granularitate din graficul FSC vs. SSC (A), au fost identificate neutrofilele polimorfonucleare (PMN) drept celule CD11b+, macrofagele (Macro) dublu pozitive CD14+CD11b+, iar limfocitele (Ly) prin diferență (B).

Analiza statistică nu a indicat o corelație între frecvența populațiilor leucocitare din sângele periferic și frecvența lor în probele de lapte. De asemenea, nu am obținut corelație între valoarea SCC și frecvența limfocitelor sau frecvența PMN. Pe baza acestor rezultate, putem concluziona că statutul imun determinat la nivelul probelor de sânge nu este relevant pentru starea de sănătate a animalului. Totuși, datorită numărului mic de probe caracterizate (n=12) considerăm necesare investigații viitoare suplimentare înainte de o concluzie finală definitivă.



Bibliografie

1. Meredith BK, Kearney FJ, Finlay EK, Bradley DG, Fahey AG, Berry DP, et al. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genet.* 2012;13:21
2. Oliphant A, Barker DL, Stuelpnagel JR, Chee MS (2002) BeadArray Technology: Enabling an Accurate, Cost-Effective Approach to High-Throughput Genotyping. *Biotechniques*, 32:56-61
3. Sahana G, Guldbbrandtsen B, Thomsen B, Lund MS. Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle. *Anim Genet.* 2013;44(6):620-6
4. Tiezzi F, Parker-Gaddis KL, Cole JB, Clay JS, Maltecca C. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One.* 2015;10(2):e0114919
5. Welderufael BG, Løvendahl P, de Koning DJ, Janss LLG, Fikse WF. Genome-Wide Association Study for Susceptibility to and Recoverability From Mastitis in Danish Holstein Cows. *Front Genet.* 2018; 9:141
6. Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. A whole-genome assembly of domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009; 10(4):R42
7. VCFtools v0.1.16
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3137218/>)
8. BCFtools v1.9
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3198575/>)
9. PLINK v1.90b6.16 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701901/>)
10. fastSTRUCTURE v1.0 (<https://www.genetics.org/content/197/2/573>)
11. rrBLUP v4.6.1
(<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3835/plantgenome2011.08.0024>)
12. qqman v0.1.4 (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/005165v1>)
13. <http://www.1000genomes.org/>
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
15. <https://www.ensembl.org>