

# Wpływ liczby komórek somatycznych i stężenia środka dezynfekcyjnego na obecność substancji hamujących w mleku

HENRYKA LASSA, BOŻENA SZEJNIUK\*, ANNA KŁOSSOWSKA

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruzdołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

\*Katedra Higieny i Środowiska Wiejskiego Wydziału Zootechnicznego ATR, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Lassa H., Szejniuk B., Kłossowska A.

## Influence of the somatic cell count and a disinfectants concentration on the presence of inhibitory substances in milk

### Summary

The purpose of trials was to determine the influence of the somatic cell count on the results of some screening tests following the addition of different concentrations of selected disinfectants to raw milk. Somatic cell count was determined by Fossomatic 90 and then three disinfectants – Blu-Gard – Henkel, Teat – Jodex, Agrisept – Upjohn were added for the final concentration to be 2%, 1%, 0,5%, 0,1%. Rapid diffusion test (STD) and plate test (Biolacta) were used. The increase in somatic cell count caused the increase of the percentage of positive results of tests used for detecting the inhibitory substances. It can be supposed that in milk with a larger somatic cell count, the combined activity of natural inhibitory factors and residues of disinfecting agents may take place.

**Keywords:** raw milk, inhibitory substances, somatic cells, disinfectants

Pozostałości w mleku antybiotyków i innych leków przeciwbakteryjnych, jak też środków chemicznych stosowanych do dezynfekcji strzyków i mycia urządzeń mleczarskich, a także innych preparatów, które hamują wzrost wybranych drobnoustrojów testowych określa się jako substancje hamujące (sh). Polskie i międzynarodowe przepisy nie dopuszczają ich obecności w mleku i jego przetworach w stężeniach przewyższających dopuszczalne limity. Pozostałości środków przeciwbakteryjnych obniżają bowiem wartość przerobową mleka, stanowiąc jednocześnie poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Zagrożenie to związane jest z wywoływaniem alergii, powstawaniem i narastaniem oporności bakterii na antybiotyki oraz bezpośrednim toksycznym działaniem tych związków. Obecność aktywnego chloru, jodu i detergentów przyczynia się np. do obniżenia aktywności enzymów trawiennych i upośledzenia wchłaniania glukozy (21).

W Polsce odsetek dodatnich wyników w testach wykrywających substancje hamujące jest wysoki. W latach 1993-2000 według różnych autorów (10, 11, 13, 16, 19) wykazywano obecność sh w zależności od stosowanych testów w granicach od 1,74 do 22,6% badanych próbek mleka. Stwierdzone w mleku substancje hamujące są głównie pozostałościami antybiotyków i

chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu stanów zapalnych gruczołu mlekowego oraz innych chorób infekcyjnych (6, 15). Wykrywane są też środki myjące, dezynfekcyjne i myjąco-dezynfekcyjne, wykorzystywane w celu zapobiegania nadmiernemu zakażeniu mikrobiologicznemu mleka na różnych etapach jego pozyskiwania i transportu (14, 21). Wykrywalny ich poziom może być skutkiem nieumiejętnego stosowania tych preparatów lub dodania w celu zafałszowania surowca. Mleko zawiera również naturalne substancje hamujące wchodzące w skład jego układu enzymatycznego. Składnikami tego przeciwbakteryjnego systemu są: laktoferyna, transferyna, lizozym i laktoperoksydaza, a także dopełniacz oraz immunoglobuliny (4, 7, 8, 12, 17).

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie zależności między liczbą komórek somatycznych a wynikami testów na obecność substancji hamujących w mleku zbiorczym po dodaniu do niego wybranych środków dezynfekcyjnych w różnych stężeniach.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 51 próbkach mleka zbiorczego, do którego dodawano trzy środki dezynfekcyjne przeznaczone do przeddojowej i podojowej dezynfekcji

stryków: Teat (Jodex), Blu-Gard (Henkel) i Agrisept (Upjohn). Preparaty te zawierają następujące składniki aktywne: kwas dodecylobenzenosulfonowy (Blu-Gard), dwuchloroizocjanuronian sodowy (Agrisept) i czwartorzędowe sole alkiloamoniumowe (Teat).

Mleko w ilości 200 ml pobierano sterylnie z konwi w punktach skupu lub ze zbiorników w gospodarstwach z terenu województwa kujawsko-pomorskiego. Przewożono je w temperaturze 5°C do laboratorium. Następnie określano liczbę komórek somatycznych aparatem Fossomatic 90 i ogólną liczbę bakterii metodą Petrifilm. Obecność substancji hamujących oznaczano przy użyciu dwóch metod mikrobiologicznych – STD-Abiotest i testu płytkowego Biolacta, w których szczepem testowym jest *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Środki dezynfekcyjne Teat i Blu Gard rozcieńczano w mleku, a Agrisept wstępnie w wodzie, tak aby końcowa koncentracja każdego z nich wynosiła 2%, 1%, 0,5% i 0,1%.

Badane mleko podzielono na cztery grupy o różnej zawartości komórek somatycznych: mleko o liczbie komórek do 400 tysięcy w 1 ml, 401-500 tysięcy, 501 tysięcy do 1 miliona i powyżej 1 miliona w 1 ml. Oznaczeń dokonywano bezpośrednio po transporcie próbek do laboratorium. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie obliczając test  $\chi^2$  oraz współczynnik korelacji Pearsona.

### Wyniki o omówienie

Wyniki badań podano w tab. 1-3. Żadna z badanych próbek mleka, niezależnie od liczby komórek somatycznych nie zawierała wyjściowo substancji hamują-

cych na poziomie, który można by było wykryć przy użyciu zastosowanych testów.

Niskie stężenia badanych środków dezynfekcyjnych (0,1%) nie były wykrywalne bez względu na liczbę komórek somatycznych. Wzrostowi stężenia badanych środków (2%, 1%, 0,5%) towarzyszył wzrost dodatnich wyników skorelowany z wysokością liczby komórek somatycznych. Preparat Teat (w stężeniu 2%) wykrywano w mleku grupy I w 60%, w mleku grupy II w 91,7%, a w mleku grupy III i IV w 100% próbek przy użyciu obu testów (STD i Biolacta). Stężenie 1% tego środka nie było wykrywalne w mleku I grupy, a wyniki dodatnie w mleku grupy II, III i IV odnotowano odpowiednio 16,7%, 83,3% i 83,3% (STD) i 25%, 66,7%, 100% (Biolacta). Przy 0,5% stężeniu Teat substancje hamujące wykrywano tylko w mleku o najwyższej liczbie komórek somatycznych.

Blu-Gard w stężeniu 2% wykryto w mleku grupy I w 6,7% próbek przy użyciu testu STD i 13,3% próbek za pomocą testu Biolacta. Więcej dodatnich wyników stwierdzono w przypadku obecności tego środka w mleku grupy II, III i IV. W teście STD we wszystkich tych grupach wykryto sh w 100% próbek, a w teście Biolacta 91,7% w grupie II i po 100% w pozostałych grupach. Dodatek środka Blu-Gard w stężeniu 1% spowodował obecność sh w 25% próbek (STD) i 16,7% (Biolacta) mleka grupy II, w 66,7% próbek (STD) i 58,3% (Biolacta) mleka grupy III, a w mleku grupy IV w 59,3% (STD) i 100% próbek (Biolacta). Niskie stężenie (0,5%) tego środka dawało wyniki ujemne w mleku grup I, II i III, a dodatnie w mleku grupy IV – 16,7% (STD) i 33,3% (Biolacta).

Dodatek środka dezynfekcyjnego Agrisept odmiennie wpłynął na wyniki stosowanych testów. Za pomocą STD stwierdzono wyniki dodatnie w 25% próbek zawierających najwyższe tj. 2% stężenie środka, zawieszonego w mleku cechującym się wysoką liczbą komórek somatycznych (powyżej 1 mln.). Lepszą wy-

Tab. 1. Odsetek wyników dodatnich w teście STD w zależności od liczby komórek somatycznych i stężenia środków dezynfekcyjnych

Grupa	Teat				Blu-gard				Agrisept			
	2%	1%	0,5%	0,1%	2%	1%	0,5%	0,1%	2%	1%	0,5%	0,1%
I n = 15	60,0	0	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
II n = 12	91,7	16,7	0,0	0,0	100,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
III n = 12	100,0	83,3	0,0	0,0	100,0	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IV n = 12	100,0	83,3	33,3	0,0	100,0	58,3	16,7	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0

Tab. 2. Odsetek wyników dodatnich w teście Biolacta w zależności od liczby komórek somatycznych i stężenia środków dezynfekcyjnych

Grupa	Teat				Blu-gard				Agrisept			
	2%	1%	0,5%	0,1%	2%	1%	0,5%	0,1%	2%	1%	0,5%	0,1%
I n = 15	53,3	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0	0,0	0,0	86,7	0,0	0,0	0,0
II n = 12	91,7	25,0	0,0	0,0	91,7	16,7	0,0	0,0	83,3	50,0	0,0	0,0
III n = 12	100,0	66,7	0,0	0,0	100,0	58,3	0,0	0,0	100,0	91,7	8,3	0,0
IV n = 12	100,0	100,0	41,7	0,0	100,0	100,0	33,3	0,0	100,0	100,0	50,0	0,0

Tab. 3. Liczba wyników dodatnich i ujemnych w testach STD i Biolacta po dodaniu Teat, Blu Gard i Agriseptu niezależnie od ich stężenia

Grupa	STD		Biolacta	
	dodatnie	ujemne	dodatnie	ujemne
I n = 180	10	170	24	156
II n = 144	28	116	43	101
III n = 144	42	102	63	81
IV n = 144	50	94	87	57

krywalność preparatu uzyskano przy zastosowaniu testu Biolacta, gdzie 2% stężenie dawało 86,7% wyników dodatnich w mleku I grupy, 83,3% w mleku II grupy i 100% w mleku grup III i IV. Przy stężeniu 1% zanotowano 50% wyników dodatnich w mleku grupy II, 91,7% w mleku grupy III i 100% w mleku grupy IV. W mleku o najniższej liczbie komórek nie stwierdzono obecności pozostałości środka dezynfekcyjnego dodanego w stężeniu 1%. Dodatek tego środka w stężeniu 0,5% nie był wykrywalny w mleku grupy I i II, natomiast w mleku III i IV grupy przy tym samym stężeniu wykryto sh w 8,33% i 50% próbek.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że zależność między liczbą komórek somatycznych a odsetkiem wyników dodatnich w testach nie była przypadkowa. Istnieje związek między tymi cechami przy 2%, 1% i 0,5% stężeniu środków dezynfekcyjnych ( $p < 0,001$ ). Nie stwierdzono natomiast istotności dla stężenia 0,1%. Współczynnik korelacji między liczbą wyników dodatnich a liczbą komórek somatycznych wyniósł 0,58 i był istotny statystycznie (dla  $p < 0,05$ ). Należy dodać, że współczynnik korelacji między ogólną liczbą bakterii w badanym mleku a liczbą dodatnich wyników otrzymanych przy pomocy stosowanych testów wynosił 0,11, co świadczy o niewielkiej zależności między tymi zmiennymi.

Andersen i wsp. (1) wykrywali pozostałości antybiotyków po dowymieniowej infuzji amoksycyliny i penicyliny G u krów chorych na kliniczne zapalenie wymienia. Do oznaczeń użyto sześciu testów skriningowych, a jako metodę referencyjną zastosowano technikę chromatografii cieczowej. Stwierdzono dużą zgodność (94%) między wynikami testów a wskazaniami chromatograficznymi. Wyniki dodatnie odbiegające od wskazań chromatografii uznano za fałszywie dodatnie. Uzyskano je w próbkach mleka o wysokiej liczbie komórek somatycznych, znacznie odbiegającej od innych badanych próbek.

Wyniki badań własnych korespondują z rezultatami otrzymanymi przez autorów innych prac. Istotne statystycznie zależności między liczbą komórek a wynikami dodatnimi w testach skriningowych stwierdzono badając zarówno mleko zbiorcze, jak i mleko ćwiartkowe (3). Różańska (18) określając wpływ pozostałości wybranych środków dezynfekcyjnych stosowanych w przemyśle mleczarskim stwierdziła, że mleko poddane ich działaniu nie wykazywało uchwytanych zmian smaku i zapachu przed i po gotowaniu. Zmniejszyła się jedynie ogólna liczba drobnoustrojów po dodaniu 2 ml ACE do 100 ml mleka. Cullor i wsp. (5) stwierdzili istotną statystycznie zależność między liczbą wyników dodatnich w zastosowanych testach i liczbą komórek somatycznych w próbkach mleka. Ponadto wykazano, że liczba dodatnich wyników pięciu zastosowanych testów (Cite Probe, Delvotest, Lac Tek, Charm Farm i BsDA) w mleku charakteryzującym się liczbą komórek somatycznych powyżej 600 tys. w

1 ml jest około 50% wyższa niż w mleku zawierającym mniej niż 600 tys. komórek w 1 ml. Hillerton i wsp. (9) badali obecność substancji hamujących w mleku indywidualnych krów przy użyciu Delvotestu. Stwierdzili brak wyników dodatnich w próbkach mleka pochodzącego z pojedynczych ćwiartek od krów będących w środkowym stadium laktacji. Delvotest dawał ujemne wyniki zarówno w mleku o zawartości komórek poniżej 400 tys., jak też w wydzielinie z wysoką liczbą komórek – powyżej 4000 tys. Inaczej przedstawiały się wyniki w wydzielinie ćwiartkowej od krów świeżo wycielonych. Przy niskiej liczbie komórek somatycznych (poniżej 400 tys.) wyniki dodatnie stanowiły 4-5% ogólnej liczby zbadanych próbek, zaś przy wysokiej liczbie komórek (powyżej 4000 tys./ml) rezultaty pozytywne dawało około 30% próbek. Autor uważa, że wskazania Delvotestu w próbkach mleka od krów będących krótko po wycieleniu mogą być zakłócone przez naturalne substancje odpornościowe – lizozym lub laktoferynę. Niektóre dane piśmiennictwa (20) potwierdzają związek między odsetkiem wyników dodatnich w stosowanych testach a wysoką liczbą komórek somatycznych w próbkach mleka ćwiartkowego. Badania przeprowadzone na mleku pochodzącym od krów z kliniczną postacią zapalenia wymienia wykazały, że wysoka zawartość komórek somatycznych wpływała istotnie na liczbę dodatnich wyników w zastosowanych testach. Odmienne wyniki uzyskali Andrew i wsp. (2), którzy przeprowadzili badania z użyciem ośmiu testów: Charm Farm, Charm Cowside, Delvotest, Penzym, Cite Probe, Lac Tek, Valio T 101 i Charm BsDA. Czynniki determinującymi wzrost wyników dodatnich były ogólna liczba bakterii w mleku, liczba odbytych przez krowę porodów i wydajność mleka. Nie obserwowano natomiast wpływu liczby komórek somatycznych na wskazania badanych testów.

Ze względu na coraz bardziej powszechne stosowanie środków dezynfekcyjnych problemem staje się ich obecność w mleku. Mogą one znaleźć się w nim przypadkowo lub być świadomie podane w celu fałszowania np. liczby bakterii. Z badań własnych wynika, że niskie ich stężenia mogą być niewykrywalne za pomocą testów skriningowych. Dodatnie wyniki tych testów mogą być skutkiem obecności naturalnych czynników obronnych oraz śladowych ilości środka dezynfekcyjnego.

## Wnioski

1. Wraz ze wzrostem liczby komórek somatycznych wzrasta odsetek dodatnich wyników testów STD i Biolacta po wprowadzeniu do mleka środków dezynfekcyjnych.

2. W mleku o wyższej liczbie komórek somatycznych może dochodzić do zsumowanego działania naturalnych czynników obronnych oraz pozostałości zastosowanych środków dezynfekcyjnych.

## Piśmiennictwo

1. *Anderson K. L., Moats W. A., Rushing J. E., O'Carroll J. M.*: Detection of milk antibiotic residues by use of screening tests and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicillin or penicillin G in cows with clinical mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 1998, 59, 1096-1100.
2. *Andrew S. M., Frobish R. A., Paape M. J., Maturin L. J.*: Evaluation of selected antibiotic residue screening tests from milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 3050-3057.
3. *Anonim.*: Antibiotic residue violations associated with elevated BTSCC. *Udder Topics* 1999, 22, 4.
4. *Carlsson A., Bjorck L., Persson K.*: Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect of Delvotest P. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 3166-3175.
5. *Cullor J. S., VanEenennaam A., Gardner I., Perani L., Dellinger J., Smith W. L., Thompson T., Payne M. A., Jensen L., Guterbock W. M.*: Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. *J.A.O.A.C. Int.* 1994, 77, 862-870.
6. *Cullor J. S., VanEenennaam A., Gardner I., Smith W. L., Perani L., Dellinger J., Jensen L., Guterbock W. M.*: Problems associated with cowside and bulk tank antibiotic residue testing. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting National Mastitis Council, Inc., part 5 of 7.
7. *Gaunt S. N., Raffio N., Kingsbury E. T., Damon R. A., Johnson W. H., Mitchell B. A.*: Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities. *J. Dairy Sci.* 1980, 63, 1874-1880.
8. *Harmon R. J., Schanbacher F. L., Ferguson L. C., Smith K. L.*: Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 1975, 36, 1001-1007.
9. *Hillerton J. E., Halley B. L., Neaves P., Rose M. D.*: Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 704-711.
10. *Kłossowska A., Malinowski E., Biegała T.*: Ocena jakości higienicznej mleka odbieranego od rolników indywidualnych. *Życie wet.* 1993, 8, 183-186.
11. *Kotowski K., Smardz W.*: Ocena jakości higienicznej mleka surowego w południowej Wielkopolsce. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 282-284.
12. *Kurek Cz.*: Pozostałości substancji hamujących w surowcu mlecznym pozytywnym w warunkach krajowych a interpretacja wyników badań nad ich występowaniem. *Kraj. konf. nauk.: Substancje chemiczne w mleku działające hamująco*, Olsztyn 1992, 3-4.
13. *Majewski T., Popiołek M., Krukowski H.*: Obecność mikroflory patogennej i substancji hamujących w mleku surowym. *BTN, Prace Wydziału Nauk Przyrodniczych, seria B* 2000, 46.
14. *Mikołajczyk A., Sztejn J.*: Problemy mycia i dezynfekcji urządzeń udojowych. *Przeł. hod.* 1997, 12, 9-11.
15. *Oliver S. P., Duby R. T., Prange R. W., Tritschler J. P.*: Residues in colostrums following antibiotic dry therapy. *J. Dairy Sci.* 1984, 67, 3081-3084.
16. *Pelczyńska E.*: Jakość higieniczna mleka w Polsce. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 447-451.
17. *Persson K., Carlsson A., Hambleton C., Guidry A. J.*: Immunoglobulins, lysozyme and lactoferrin in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. *Zntbl. VetMed B* 1992, 39, 165-174.
18. *Różańska H.*: Wpływ pozostałości wybranych środków myjąco-dezynfekcyjnych na cechy organoleptyczne i jakość mikrobiologiczną mleka surowego. *Annales UMCS sec. DD*, 2000, LV/A, 248.
19. *Rybińska K., Postupolski J., Szczęśna M., Sionek B., Karłowski K.*: Oznaczenie zawartości antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku – system zapewniania jakości. *Rocz. PZH*, 1997, 48, 359-369.
20. *Van Eenennaam A. L., Cullor J. S., Perani L., Gardner I. A., Smith W. L., Dellinger J., Guterbock W. M., Jensen L.*: Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 3041-3053.
21. *Wieczorek J., Smoczyński S.*: Częstość występowania substancji hamujących w mleku z rejonu Olsztyna oraz czułość testów mikrobiologicznych na obecność detergentów. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 129-131.

Adres autora: mgr inż. Henryka Lassa, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

## STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE,

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w lipcu 2001 r.\*)

- 1) **Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w 9 województwach, a mianowicie: kujawsko-pomorskim (1-1), lubelskim (4-4), małopolskim (2-2), mazowieckim (1-1), podkarpackim (4-7), podlaskim (3-3), śląskim (1-1), warmińsko-mazurskim (4-4), wielkopolskim (3-4). Wściekliznę stwierdzono u 7 psów, 12 kotów i 9 szt. bydła.
- 2) **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 10 województwach: kujawsko-pomorskim (8-14), lubelskim (12-27), małopolskim (3-5), mazowieckim (8-12), podkarpackim (10-19), podlaskim (3-7), pomorskim (1-1), świętokrzyskim (5-7), warmińsko-mazurskim (9-17), wielkopolskim (12-36). Zanotowano ją u 120 lisów, 8 jenotów, 6 kun, 4 borsuków, 4 nietoperzy i 2 tchórzy.
- 3) **Wirusowe zapalenie tętnic koni** – wystąpiło w województwie mazowieckim (1-1) i warmińsko-mazurskim (1-1).
- 4) **Leptospiroza bydła** – wystąpiła w województwie pomorskim (1-1).
- 5) **Salmoneloza bydła** – wystąpiła w województwie kujawsko-pomorskim (1-1).
- 6) **Leptospiroza świń** – wystąpiła w województwie pomorskim (1-1) i warmińsko-mazurskim (1-1).
- 7) **Salmoneloza świń** – wystąpiła w województwie kujawsko-pomorskim (1-1).
- 8) **Wirusowa posocznica krwiotoczna ryb łososiowatych** – wystąpiła w województwie pomorskim (1-1) i zachodnio-pomorskim (2-2).
- 9) **Choroba Mareka** – wystąpiła w województwie warmińsko-mazurskim (1-1)
- 10) **Salmoneloza drobiu** – wystąpiła w 12 województwach: dolnośląskim (1-1), kujawsko-pomorskim (2-4), lubelskim (1-1), lubuskim (3-4), małopolskim (2-2), mazowieckim (2-2), podkarpackim (1-1), śląskim (2-2), świętokrzyskim (2-4), warmińsko-mazurskim (1-1), wielkopolskim (10-23), zachodnio-pomorskim (1-1).
- 11) **Myksomatoza królików** – wystąpiła w 3 województwach: mazowieckim (1-1), świętokrzyskim (1-2) i warmińsko-mazurskim (1-1).
- 12) **Zgnielec amerykański** – wystąpił w 6 województwach: kujawsko-pomorskim (1-1), mazowieckim (1-1), podlaskim (1-1), pomorskim (1-1), śląskim (1-1) i wielkopolskim (1-1).

\*) w nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.