

Poziom immunoglobulin w surowicy krwi cieląt w zależności od cech fizykochemicznych siary i jej aktywności hamującej działanie trypsyny^{*})

ANDRZEJ ZACHWIEJA, JÓZEFA CHRZANOWSKA*, TADEUSZ SZULC, ALEKSANDER DOBICKI

Zakład Hodowli Bydła Instytutu Hodowli Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Kożuchowska 5b, 51-631 Wrocław

*Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych Wydziału Nauk o Żywności AR, ul. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław

Zachwieja A., Chrzanowska J., Szulc T., Dobicki A.

Immunoglobulin levels in the blood serum of calves in relation to physicochemical properties and trypsin inhibitory activity of the colostrum

Summary

Colostrum samples (83 cows) from the first complete milking were used to determine the following: dry matter, protein, lactose, fat (using Milco Scan 133B Foss Electric), as well as G, M and A classes of immunoglobulins (RID). Colostrum acidity (pH, °SH), coagulation and thermal stability properties were also identified. Samples were divided into 3 groups according to levels of trypsin inhibitory activity of the colostrum: I – less than 21% inhibitory activity; II – 21 to 50%; III – above 50%. Physicochemical traits and composition of cows' colostrum were analysed in relation to levels of its trypsin inhibitory activity. The quantity of trypsin inhibited by 1 ml of colostrum differed significantly between groups ($p \leq 0.05$) and was from 68.97 μg (G I) to 501.6 μg in group III. Dry matter and protein contents were the highest in the colostrum of group III: 26.54 and 16.76% consecutively, while in group I these traits had significantly lower values. Lactose content also differed between groups. Class G immunoglobulin level increased together with increasing inhibitory activity of the colostrum: from 108.79 to 112.21 and 128.30 g/l. Immunoglobulins of class M. and A followed the same pattern. Slightly higher potential acidity (+ 2 °SH) was ascertained in the colostrum of group III, while pH values were similar in all groups (pH from 6.09 to 6.13). Coagulation times of the colostrum of groups II and III were longer than ones found in group I. The level of inhibitory activity and technological properties of colostrum affects immunoglobulin levels in calves' blood serum.

Keywords: colostrum, inhibitory activity, trypsin, calves, immunoglobulin

Zmienność wydajności i składu siary krów warunkowana jest czynnikami genetycznymi i środowiskowymi (9, 12, 16, 17, 20-22, 24). Jej jakość oraz sposób podania determinują poziom wykorzystania, a szczególnie skuteczność absorpcji immunoglobulin u cieląt (1, 2, 4, 23). Niski poziom biernej odporności przeciwważnej (15) jest najważniejszą przyczyną schorzeń i śmiertelności cieląt w pierwszym okresie po urodzeniu (2, 7, 8).

Ważnym czynnikiem ograniczającym rozkład immunoglobulin w procesie trawienia u cieląt jest inhibitor trypsyny (10, 11, 18). Najwyższa jego zawartość występuje w siarze krów bezpośrednio po ociełeniu, a następnie maleje prawie stukrotnie (3, 6, 14). Ustalono dodatnią zależność pomiędzy poziomem i aktywnością inhibitora trypsyny a zawartością białka całkowitego i immunoglobulin w siarze (3, 14, 19). Jego dodatek do siary powodował wzrost absorpcji immunoglobulin siarowych u cieląt do 30% (13).

Celem badań była ocena wpływu aktywności hamującej działanie trypsyny siary krów oraz jej składu i cech fizykochemicznych na poziom immunoglobulin w surowicy krwi cieląt.

Materiał i metody

Próbki siary (200-300 ml) pobierano bezpośrednio po wycieleniu, z pierwszego, pełnego doju od 83 krów rasy czarno-białej. W siarze mierzono zawartość suchej masy, białka, tłuszczu i laktozy (Milko-Scan 133B, Foss Electric). Poziom immunoglobulin klasy G, M i A określano metodą radialnej immunodyfuzji (RID Kit Binding Site). Oznaczono kwasowość (pH, °SH), termostabilność (próbna alkoholowa) oraz krzepliwość (próbna Scherna) siary.

Hamowanie aktywności trypsyny badano preinkubując 100 μl enzymu z 50 μl inhibitora (siary) w 1350 μl 0,2M buforu TRIS-HCl (pH 8,0), przez 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie dodawano 500 μl substratu i prowadzono reakcję w temperaturze 37°C przez 30 minut. Wynik odnieszono do próby kontrolnej bez dodatku inhibitora. Aktywność trypsyny wyrażono w procentach, przyjmując aktywność enzymu nie hamowanego za 100%.

^{*}) Badania realizowane w ramach grantu KBN 5 P06E 028 17.

Cielęta były pojone siarą dwa razy dziennie. Krew od cieląt pobierano po upływie trzeciej doby życia, a w uzyskanej surowicy metodą refraktometryczną mierzono ilość białka całkowitego i podobnie jak w siarze, metodą radialnej immunodifuzji oznaczono poziom immunoglobulin klasy G, M i A.

W zależności od poziomu aktywności hamującej działania trypsyny próbki siary podzielono na 3 grupy: I – poniżej 20% aktywności hamującej, 25 sztuk, II – od 21 do 50%, 35 sztuk, III – powyżej 50%, 23 sztuki.

Skład siary oraz jej cechy fizykochemiczne analizowano w relacji do jej aktywności hamującej działanie trypsyny za pomocą analizy wariancji i testu Duncana, obliczono także współczynniki korelacji między badanymi cechami.

Wyniki i omówienie

Ilość trypsyny hamowana przez 1 ml siary (tab. 1) mieściła się w przedziale od 68,97 μ g (grupa I) do 501,6 μ g w grupie III i różniła się istotnie statystycznie między grupami ($p \leq 0,05$). Uzyskane wartości są zbliżone do wyników uzyskiwanych przez innych autorów (3, 6, 19).

Oznaczony skład siary był podobny do wartości stwierdzonych w innych badaniach własnych oraz w badaniach innych autorów (19, 22, 23). W siarze krów grupy III stwierdzono najwyższy udział suchej masy i białka całkowitego. Różnice między grupami I i III zostały potwierdzone statystycznie ($p \leq 0,05$). Natomiast zawartość tłuszczu była podobna w siarze krów grup II i III, najniższy udział tłuszczu wystąpił w siarze krów o najniższej aktywności hamującej trypsynę. Zawartość laktozy była statystycznie istotnie niższa ($p \leq 0,05$) w siarze krów grupy III.

Duża buforowość siary i zwiększony udział związków kwaśnych powodowały, że jej kwasowość potencjalna (tab. 2) mieściła się w przedziale od 18,43°SH do 20,18°SH. Odczyn siary był także lekko kwaśny (pH od 6,09 do 6,13), podobnie do wartości oznaczonych w innych badaniach własnych. Współczynnik korelacji między tymi cechami wynosił $r = -0,84$, co wskazuje, że ze wzrostem kwasowości miareczkowej malała wartość pH badanych próbek. Stabilność ciepl-

Tab. 1. Skład siary krów (%) w zależności od poziomu aktywności hamującej działanie trypsyny ($\bar{x} \pm s$; $n = 83$)

Składniki siary	Grupa					
	I		II		III	
Ilość trypsyny hamowana przez 1 ml siary	68,97 ^a	27,60	314,9 ^b	69,64	501,6 ^c	66,03
Sucha masa	23,07 ^a	3,43	25,78	2,97	26,54 ^b	2,76
Białko	13,64 ^a	2,42	14,98	2,02	16,76 ^b	2,62
Tłuszcz	6,14	2,63	7,38	2,90	7,41	3,03
Laktoza	2,17 ^a	0,42	1,91	0,39	1,59 ^b	0,46

Objaśnienie: a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

na siary była niska i wynosiła od 1,72 w grupie I do 2,07 ml w grupie trzeciej. Tak niski poziom termostabilności siary należy wiązać z wyższą zawartością białek serwatkowych i podwyższoną kwasowością. Badane próbki siary wykazywały długi czas krzepnięcia: od 26,45 (grupa I) do 38,67 min. w grupie II. W siarze o najwyższej aktywności hamującej działanie trypsyny czas krzepnięcia wynosił ponad 35 minut. Wydłużony czas krzepnięcia nie wpłynął na obniżenie ilości immunoglobulin w surowicy krwi cieląt, chociaż wyniki badań Cruywagena (5) wskazują na obniżenie efektywności absorpcji immunoglobulin u cieląt z siary o niższej zdolności tworzenia skrzepu. Współczynnik korelacji między poziomem stabilności cieplnej a krzepliwością siary wynosił $r = 0,93$ wskazując na istotną ($p \leq 0,001$) zależność między tymi cechami.

Wyższa zawartość białka w siarze krów grupy III (tab. 1) łączy się z istotnie wyższą ($p \leq 0,05$) ilością immunoglobulin (tab. 3) – ponad 150 g/l, co stanowi potwierdzenie wcześniejszych badań (4, 9, 20). W siarze krów grupy I wystąpił o prawie 18% niższy udział immunoglobulin – 124,45 g/l, natomiast w grupie II

Tab. 2. Kwasowość, termostabilność oraz krzepliwość siary krów w zależności od poziomu aktywności hamującej działanie trypsyny ($\bar{x} \pm s$; $n = 83$)

Badane cechy	Grupa					
	I		II		III	
Kwasowość (°SH)	18,43	3,23	19,07	3,65	20,18	2,96
Kwasowość (pH)	6,13	0,11	6,11	0,09	6,09	0,07
Termostabilność (ml)	1,72	0,98	1,79	0,84	2,07	1,01
Krzepliwość (min)	26,45	16,48	38,67	19,68	35,82	18,39

Tab. 3. Poziom immunoglobulin (g/l) w siarze krów w zależności od poziomu aktywności hamującej działanie trypsyny ($\bar{x} \pm s$; $n = 83$)

Immunoglobuliny	Grupa					
	I		II		III	
IgG	108,79	19,70	112,21	17,45	128,30	17,44
IgM	13,47 ^a	4,45	17,83 ^b	4,22	19,29 ^b	4,78
IgA	2,19	0,75	2,30	0,82	2,72	0,80

Objaśnienie: jak w tab. 1

Tab. 4. Poziom immunoglobulin (g/l) w surowicy krwi cieląt w zależności od poziomu aktywności hamującej działanie trypsyny ($\bar{x} \pm s$; $n = 83$)

Wyszczególnienie	Grupa					
	I		II		III	
IgG	21,34	7,71	18,56 ^a	8,11	31,43 ^b	9,34
IgM	1,74 ^b	1,02	1,46 ^b	0,89	2,98 ^a	1,28
IgA	0,09 ^b	0,04	0,12 ^b	0,07	0,29 ^a	0,18

Objaśnienie: jak w tab. 1

ilość immunoglobulin wynosiła 132,34 i była o prawie 12% niższa w porównaniu do grupy III.

Wysoki poziom aktywności hamującej działanie trypsyny siary krów łączył się z wyższą zawartością białka i immunoglobulin oraz dłuższym czasem jej krzepnięcia pod wpływem podpuszczki. Jednocześnie wykazał dodatnią zależność z wykorzystaniem immunoglobulin siarowych przez cielęta. Zawartość immunoglobulin klasy G w surowicy krwi cieląt pochodzących od krów produkujących siarę o najwyższej aktywności hamującej działanie trypsyny (tab. 4) wynosiła 31,43 g/l (grupa III), w grupie I – 21,34, a w grupie II – 18,56 g/l. Stwierdzone między grupą II a III różnice były statystycznie istotne ($p \leq 0,05$). Podobne zależności wystąpiły dla immunoglobulin klasy M i A. Istotnie wyższy poziom IgM i IgA odnotowano u cieląt pojonych siarą o najwyższej aktywności hamującej działanie trypsyny.

Przeprowadzona analiza wskazuje na istotne zależności pomiędzy poziomem aktywności hamującej działanie trypsyny w siarze krów a jej składem, czasem krzepnięcia i stabilnością cieplną, co może mieć istotny wpływ na zróżnicowanie przyswajalności immunoglobulin siarowych u cieląt.

Piśmiennictwo

- Besser T. E., Gay C. C., Pritchett L.: Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1991, 198, 419-422.
- Bielecka M.: Badania nad śmiertelnością cieląt. IV. Wpływ poziomu immunoglobulin klasy IgG we krwi cieląt oraz sposób i czas podania pierwszych porcji siary. Roczn. Nauk Rol., Seria B Zootechnika 1988, 103, 77-85.
- Bouda J., Jagos P., Klimes J., Minskova E., Jonakova V.: Aktivita inhibitoru trypsinu V kolostru krav. Vet. Med. 1987, 32, 135-144.
- Bouska J.: Hladiny celkove bilkoviny a immunoglobulinu V krevnim seru telat a imunologicka kvalita kolostra pri odchovu telat napajenim a pri volnem teleni krav v podminkach velkokapacitniho kravina. Veterinarstvi. 1992, 42, 84-87.
- Cruywagen C. W.: Effect of curd forming of colostrum on absorption of immunoglobulin G in newborn calves. J. Dairy Sci. 1990, 73, 3287-3290.
- Honkanen-Buzalski T., Sandholm M.: Trypsin – inhibitors in mastitic milk and colostrum: correlation between trypsin – inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. J. Dairy Res. 1981, 48, 213-223.
- Juszczak J., Hibner A., Ziemiński R.: Badania nad przyczynami i wielkością strat cieląt do wieku 6 miesięcy w chowie wielkostadnym. Medycyna Wet. 1984, 34, 686-689.
- Litwińczuk Z., Borkowska D.: Obserwacje nad wielkością i przyczynami strat jałowic w okresie odchowu. Medycyna Wet. 1984, 34, 689-693.
- Norman L. M., Hohenboken W. D.: Genetic differences in concentration of immunoglobulins G1 and M in serum and colostrum of cows and in serum of neonatal calves. J. Anim. Sci. 1981, 53, 1465-1472.
- Pineiro A., Ortega F., Uriel J.: Trypsin inhibitor from cow colostrum. Isolation, electrophoretic characterization and immunologic properties. Biochem. Biophys. Acta. 1975, 379, 201-206.
- Pineiro A., Brock J. H., Esparza I.: Isolation and properties of bovine colostrum trypsin inhibitor. Ann. Rech. Vet. 1978, 9, 281-286.
- Pritchett L. C., Gay C. C., Besser T. E., Hancock D. D.: Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. J. Dairy Sci. 1991, 74, 2336-2341.
- Quigley J. D., Martin K. R., Dowlen H. H., Lamar K. C.: Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum: effects on serum immunoglobulin concentrations in Jersey calves. J. Dairy Sci. 1995, 78, 886-892.
- Quigley J. D., Martin K. R., Dowlen H. H.: Concentrations of trypsin inhibitor and immunoglobulins in colostrum of Jersey cows. J. Dairy Sci. 1995, 78, 1573-1577.
- Robinson J. D., Stott G. H., De Nise S. K.: Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J. Dairy Sci. 1988, 71, 1283-1287.
- Rzedziński J., Trawińska B.: Wpływ przebytych stanów zapalnych gruczołu mlekowego na poziom immunoglobulin w serwatce siary krów rasy ncb. Medycyna Wet. 1991, 47, 119-123.
- Salih Y., McDowell L. R., Hentges J. F., Mason R. M. Jr., Wilcox C. J.: Mineral content of milk, colostrum, and serum as affected by physiological state and mineral supplementation. J. Dairy Sci. 1987, 70, 608-612.
- Sandholm M., Honkanen-Buzalski T.: Colostral trypsin – inhibitor capacity in different animal species. Acta Vet. Scand. 1979, 20, 469-476.
- Sroka K., Krowarsch D., Szulc T.: The effect of incomplete colostrum milking on its content and on trypsin inhibitor level. Electronic J. Polish Agric. Univ., ser. Anim. Husband. 1998, 1.
- Tyler J. W., Stevens B. J., Hostetler D. E., Holle J. M., Denbigh J. L. Jr.: Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. Am. J. Vet. Res. 1999, 60, 1136-1139.
- Vann R. C., Holloway J. W., Carstens G. E., Boyd M. E., Randel R. D.: Influence of calf genotype on colostrum immunoglobulins in Bos taurus and Bos indicus cows and serum immunoglobulins in their calves. J. Anim. Sci. 1995, 73, 3044-3050.
- Zachwieja A.: Wpływ wieku krów na jakość siary i poziom białek surowicy krwi ich cieląt. Medycyna Wet. 1991, 47, 270-271.
- Zachwieja A.: Uwarunkowania zmienności składu siary krów i poziomu frakcji białkowych w surowicy krwi ich cieląt. Cz. I. Wpływ stada, wieku krów i sezonu ich ocielenia. Zesz. Nauk. AR Wrocław, Zootechnika 1995, 271, 155-175.
- Zachwieja A.: Uwarunkowania zmienności składu siary krów i poziomu frakcji białkowych w surowicy krwi ich cieląt. Cz. II. Wpływ wybranych dodatków paszowych i antybiotyków w żywieniu krów przed porodem. Zesz. Nauk. AR Wrocław, Zootechnika 1995, 271, 177-183.

Adres autora: dr inż. Andrzej Zachwieja, ul. Kożuchowska 5b, 51-631 Wrocław

MOLAN A. L., WAGHORN G. C., MCNABB W. C.: Wpływ skondensowanych tanin na wyklucie z jaj i rozwój larw *Trichostrongylus colubriformis*. (Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis*). Vet. Rec. 150, 65-69, 2002 (3)

W badaniach *in vitro* określono wpływ tanin w stężeniach 50, 100, 200, 400, 600 i 900 µg/ml otrzymanych z 7 gatunków roślin na żywotność zarodków w jajach i pierwszego stadium larwalnego (L1) *Trichostrongylus colubriformis*. Taniny wyekstrahowano z *Latus pedunculatus* (LP), *L. corniculatus* (LC), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *D. rectum* (DR), *Hedysarum coronarium* (Sulla), *Onobrychus viciifolia* (esparceta) i *Rumex obtusifolius* (P). Wszystkie wyciągi w stężeniu od 200 do 500 µg/ml obniżały procent larw wyklutych z jaj. Wyciągi LP, DR, DP, P w stężeniu 200 µg/ml hamowały rozwój zarodków w jajach. Tylko 13% larw trzeciego stadium (L3) uzyskano po 7 dniach działania LC. Przy stężeniu tanin wynoszącym 400 µg/ml nie uzyskano L3z jaj *T. colubriformis*. Po eksponowaniu na wyciągi LP, LC, Sulla, esparceta, DP, DR i doc otrzymano z L1 odpowiednio 14%, 18%, 17%, 15%, 14%, 16% i 4% larw L3.

G.

ANZIANI O. S., ZIMMERMANN G., GUGLIELMONE A. A., VAZQUEZ R., SUAREZ V.: Oporność *Cooperia pectinata* na iwermektynę u bydła w Argentynie. (Avermectin resistance in *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina). Vet. Rec. 149, 58-59, 2001 (2)

Badania wykonano na cielętach rasy hereford w 6 grupach eksperymentalnych, każda licząca 12 osobników, które wydalaly z kałem jaja *Cooperia pectinata* pomimo stosowania iwermektyny. W badaniach zastosowano 1% iwermektynę w iniekcji w dawce 200 µg/kg (grupa 1), iwermektynę A3 15% w dawce 630 µg/kg (grupa 2), iwermektynę B3 15% w ilości 630 µg/kg (grupa 3), 1% doramektynę w dawce 200 µg/kg (grupa 4), 1% moksydektynę w ilości 200 µg/kg (grupa 5). Nie leczone cielęta stanowiły grupę kontrolną. Liczba jaj nicieni w kale 12 dnia po leczeniu wynosiła odpowiednio 224, 136, 201, 105, 42 i w kontroli 395. Procent redukcji liczby jaj *Cooperia pectinata* w kale wynosił 40, 65, 49, 73, 89 i 0. Po 35 dniach utworzono 3 grupy cieląt, w których zastosowano w iniekcji lewamizol w dawce 7,5 mg/kg (grupa 1), fenbendazol w dawce 5,0 mg/kg (grupa 2). Grupa 3 nie leczona stanowiła kontrolę. Po 12 dniach po leczeniu nie wykryto w kale jaj *C. pectinata*.

G.