

Występowanie *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka^{*)}

ANNA BERTHOLD, IRENA MOLSKA

Zakład Biotechnologii Mleka Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydziału Technologii Żywności SGGW, ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa

Berthold A., Molska I.

Occurrence of *Bacillus cereus* on milk farms

Summary

The aim of the study was to determine the incidence of *Bacillus cereus* spores in various sources from which this bacterium may contaminate raw milk. Samples were taken in two farms from air (35 samples), soil (15), grass (15), bedding (9), feed (hay, silage, concentrate – 60), feces (105). Samples from teat surface (66) and teat cup surface (68) were taken from one farm.

The highest counts of spores of *B. cereus* were observed in soil (103-105 cfu per g), feces (102-105 cfu per g), in various feed (up to 104 cfu per g). Most of the teat surface samples contained high numbers of spores (up to 104 per 4 teats). Low numbers (< 5 per 10 dm³) of spores were present in the air of the milking parlor.

Keywords: *Bacillus cereus*, milk

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie mikrobiologów i technologów mleczarstwa wzbudza występujący w mleku surowym *Bacillus cereus* należący do bakterii ciepłoopornych. Drobnoustrój ten może być przyczyną wad różnych produktów mleczarskich oraz powodować zatrucia pokarmowe ludzi wskutek wytwarzania w tych produktach enterotoksyn (7). Drobnoustrój ten stanowi trudny do całkowitego wyeliminowania składnik mikroflory mleka surowego. Do mleka dostaje się zarówno w formie komórek wegetatywnych, jak i przetrwalników, głównie podczas i po doju, a więc już w gospodarstwie. *B. cereus* występuje w trawie i innych paszach oraz w kale i ściółce, a liczba jego przetrwalników wynosi 10²-10⁵ w przeliczeniu na 1 g suchej substancji (3, 4, 7, 8). Pierwotnym źródłem zanieczyszczenia jest jednak gleba, w której stwierdzono od 10³ do 10⁷ komórek wegetatywnych i od 10² do 10⁵ jtk w 1 g przetrwalników *B. cereus*. Niepożądanym zjawiskiem jest, że przetrwalniki *B. cereus* występujące w glebie i kale należą do tzw. szybko kiełkujących w mleku i szybko psujących ten surowiec (1, 3, 12, 14). Do zanieczyszczenia mleka może także dochodzić w wyniku stosowania niewydezynfekowanego sprzętu do doju i przetrzymywania mleka (4, 13, 16). Niekiedy drobnoustrój ten występuje w wymieniu, gdyż stwierdza się przypadki (rzadkie) zapaleń wymienia powodowanych przez *B. cereus* (4, 7).

Celem badań było określenie występowania przetrwalników *B. cereus* w różnych próbkach pochodzących ze środowiska gospodarstw, które może być źródłem zanieczyszczenia mleka podczas lub po doju.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na próbkach pobranych z powierzchni strzyków (66 próbek), z wewnętrznych powierzchni kubków udojowych (68), kału (105), ściółki (9), pasz treściwych (31), kiszzonek i sianokiszzonek (11), siana (7), trawy (15), gleby z pastwiska (15) oraz powietrza w hali udojowej (35). Większość próbek pobierano w dwóch oborach wielkostadnych (80 i 100 krów w stadzie), w dwóch wybranych gospodarstwach przez okres jednego roku w odstępach 2-miesięcznych. Próbkę trawy i gleby z pastwiska pobierano tylko przez 6 miesięcy w sezonie, w którym krowy korzystały z pastwiska. Oznaczenia liczby *B. cereus* w powietrzu hal udojowych wykonywano tylko w wybranych 2 miesiącach roku (sezon jesienno-zimowy).

Próbki z powierzchni strzyków pobierano ze względów technicznych tylko w jednej z badanych obór co 2 miesiące od 8-10 krów za każdym razem. Stosowano metodę orientacyjną (9). Polegała ona na zanurzeniu i opłukiwaniu w 80 cm³ jałowego płynu Ringera w butelce Schotta o pojemności 100 cm³ kolejno wszystkich 4 strzyków. Butelkę z płynem zamykano, wstawiano do wody z lodem i przewożono do laboratorium. Przed wykonaniem oznaczeń płyn w butelce uzupełniano jałowym roztworem Ringera do 100 cm³.

Próbki wymazów z wewnętrznych powierzchni kubków udojowych pobierano także tylko w jednej oborze, tej sa-

^{*)} Badania wykonano w ramach grantu KBN 6 PO6G 03620.

mej, w której pobierano próbki z powierzchni strzyków. Szczypcami wyjąłowionymi w alkoholu etylowym pobierano ze słoiczka uprzednio przygotowany jałowy wacik, zanurzano go w jałowym płynie Ringera i okrężnymi ruchami zmywano ruchem spiralnym całą wewnętrzną powierzchnię czterech kubków udojowych. Wacik z pobranym materiałem wkładano do jałowej próbki, a po przewiezieniu do laboratorium do próbki tej dodawano 10 cm³ jałowego płynu Ringera i dokładnie mieszano.

Przy pobieraniu próbek w formie stałej (kał, ściółka, pasze treściwe, trawa, kiszonki i sianokiszonki, gleba) w sposób jałowy przenoszono po około 20-30 g badanego materiału do jałowych torebek z polipropylenu. Torebki szczelnie zamykano, wkładano do pojemnika z lodem i niezwłocznie przewożono do laboratorium.

Próbki powietrza z pomieszczeń, w których odbywał się dój, pobierano metodą sedymentacyjną według Polskiej Normy (10) stosując pożywkę MYP (Merck, nr kat. 1.05267). Czas ekspozycji płytek Petriego z tą pożywką wynosił 30 minut.

Próbki pobrane w postaci stałej mieszano z ewentualnym jednoczesnym rozdrobnieniem, a następnie odważano po 10 g do 90 cm³ płynu Ringera i otrzymywano rozcieńczenie 10⁻¹. Wszystkie czynności wykonywano z zachowaniem warunków jałowości. W przypadku próbek kiszonek ich rozcieńczenia 10⁻¹ doprowadzano do pH ok. 7 przy użyciu jałowego roztworu NaOH.

Próbki płynne i przygotowane rozcieńczenia 10⁻¹ próbek stałych ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 80°C ± 1°C przez 10 minut w celu zabicia vegetatywnych komórek bakterii. Następnie próbki schładzano do temperatury około 30°C i sporządzano w miarę potrzeby dalsze dziesięciokrotne ich rozcieńczenia. Z każdej próbki i jej rozcieńczeń posiewano powierzchniowo po 0,1 cm³ do dwóch równoległych płytek Petriego z uprzednio zestaloną i podsuszoną pożywką MYP. Inkubację i liczenie wyrosłych kolonii prowadzono zgodnie z normą (11).

Liczbę przetrwalników *B. cereus* określoną w próbkach z powierzchni strzyków przyjmowano jako orientacyjną liczbę przetrwalników występującą na powierzchni 4 strzyków. Liczbę przetrwalników *B. cereus* określoną w próbkach pobranych z powierzchni kubków udojowych przyjmowano jako orientacyjną liczbę przetrwalników na wewnętrznej powierzchni 4 kubków udojowych. Po policzeniu kolonii pobierano nieco materiału z charakterystycznych kolonii i przesiewano na pożywkę PCSMA (Merck, nr kat. 1.15338) zestaloną w postaci skosów w próbkach. W celu potwierdzenia przynależności bakterii do gatunku *B. cereus* u wszystkich izolatów określono zdolność do fermentacji D-glukozy w warunkach względnie beztlenowych, wytwarzania acetylometrylokarbinolu (acetoiny) i redukcji azotanu (V) według metodyki opisanej w Polskiej Normie (11).

Wyniki i omówienie

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tab. 1.

Na wstępie należy zaznaczyć, że w badaniach ograniczono się tylko do oznaczenia liczby przetrwalników *B. cereus* z tego względu, że formy te mają większą możliwość zanieczyszczenia produktów mlecznych niż komórki vegetatywne, które są niszczone podczas cieplnej obróbki mleka. Ponadto tylko w jednej oborze możliwe było pobieranie próbek z powierzchni strzyków i kubków udojowych.

Po przebadaniu metodą orientacyjną 66 próbek z powierzchni strzyków od 66 krów okazało się, że 71% tych próbek zawierało przetrwalniki *B. cereus*, a ich liczba w przeliczeniu na 4 strzyki mieściła się w granicach 1,0 × 10²-1,3 × 10⁴. Tylko 29% tych próbek nie zawierało ich w ogóle w 1 cm³. Strzyki większości badanych krów były więc silnie zanieczyszczone przetrwalnikami *B. cereus*.

Tab. 1. Występowanie przetrwalników *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka

Badane próbki	Liczba próbek	% próbek dodatnich	Zakres liczby przetrwalników	Liczba próbek				
				10 ^{-10²}	10 ^{2-10³}	10 ^{3-10⁴}	10 ^{4-10⁵}	10 ^{5-10⁶}
Powierzchnia strzyków, jtk/4 strzyki	66	71	1,0 × 10 ² -1,3 × 10 ⁴	0	31	16	0	0
Wewnętrzna powierzchnia kubków udojowych, jtk/4 kubki udojowe	68	54	1,0 × 10 ¹ -6,4 × 10 ²	28	9	0	0	0
Powietrze hali udojowej (liczba <i>B. cereus</i> ogółem), jtk/10 dm ³	35	100	0,26-4,72	-	-	-	-	-
Kał, jtk/g	105	100	1,0 × 10 ² -1,2 × 10 ⁵	0	12	51	41	1
Ściółka, jtk/g	9	100	2,5 × 10 ¹ -7,1 × 10 ³	3	5	1	0	0
Pasza treściwa, jtk/g	31	65	1,0 × 10 ¹ -2,1 × 10 ⁴	15	3	1	1	0
Mieszanki paszowe, jtk/g	11	90	1,0 × 10 ¹ -3,6 × 10 ³	3	3	4	0	0
Kiszonki i sianokiszonki, jtk/g	11	64	1,0 × 10 ¹ -6,0 × 10 ²	5	2	0	0	0
Siano, jtk/g	7	100	1,0 × 10 ¹ -7,4 × 10 ²	3	4	0	0	0
Trawa, jtk/g	15	87	4,0 × 10 ¹ -1,2 × 10 ³	5	7	1	0	0
Gleba, jtk/g	15	100	1,0 × 10 ³ -2,0 × 10 ⁵	0	0	2	10	3

W 37 próbkach (54%) spośród 68 próbek pobranych z wewnętrznej powierzchni kubków udojowych były obecne przetrwalniki *B. cereus* w 1 cm^3 , a ich liczba wynosiła od $1,0 \times 10^1$ do $6,4 \times 10^2$ jtk w przeliczeniu na 4 kubki udojowe. W pozostałych 31 próbkach (46%) nie stwierdzono przetrwalników *B. cereus*. Te dane wskazują, że przetrwalniki *B. cereus* występują wewnątrz kubków udojowych i mogą z nich przedostawać się do mleka podczas doju. Należy podkreślić, że zastosowana orientacyjna metoda oznaczania przetrwalników *B. cereus* zarówno na powierzchni strzyków, jak i we wnętrzu kubków udojowych nie dawała możliwości dokładnego oznaczenia ich liczby. Podczas doju do mleka może więc dostawać się ich więcej niż stwierdzono. Określenie dokładnej liczby tych form zarówno na powierzchni strzyków, jak i kubków udojowych jest jednakże niezwykle trudne i brak jest odpowiedniej metody.

Ze względu na stwierdzoną podobną liczbę przetrwalników *B. cereus* w próbkach pobranych ze środowiska obu obór wyniki oznaczeń ujęto w tabeli sumarycznie. W halach udojowych obu badanych obór stwierdzono obecność *B. cereus* w powietrzu. Liczba *B. cereus* wahała się od 0,3 jtk do 4,7 jtk w 10 dm^3 powietrza (średnio 2,3 jtk w 10 dm^3).

Po przebadaniu 105 próbek kału przetrwalniki *B. cereus* wykryto we wszystkich próbkach, a ich liczba wahała się w większości próbek w granicach 10^2 - 10^5 jtk/g. Tylko w jednej próbce liczba ta przekraczała 10^5 w 1 g ($1,2 \times 10^5$ jtk/g). Wiadomo, że kał łatwo zanieczyszcza powierzchnię strzyków krów i stanowi poważne źródło przetrwalników rodzaju *Bacillus* w mleku. Stała ich obecność w tym środowisku stanowi więc znaczne zagrożenie dla jakości mleka.

We wszystkich badanych próbkach ściółki, siana i gleby, w 64-90% próbkach paszy treściwej, kiszonek i sianokiszonek oraz mieszanek paszowych i trawy występowały przetrwalniki *B. cereus*. Ich liczba w większości próbek nie przekraczała 10^3 , a w niektórych tylko (pasze treściwe) wynosiła nieco ponad 10^4 jtk/g. Z kolei w glebie liczba ta zawierała się w granicach 10^3 - 10^5 jtk/g.

Podczas badań potwierdzających wykazano u izolatów *B. cereus* zdolność do fermentacji D-glukozy w warunkach względnie beztlenowych, redukcji azotanu (V) oraz do wytwarzania acetylometylokarbinolu (acetoiny). Na tej podstawie potwierdzono ich przynależność do gatunku *Bacillus cereus* według Polskiej Normy (11).

B. cereus łatwo dostaje się do mleka surowego z różnych źródeł. W naszym kraju brak jest danych odnośnie do występowania tego drobnoustroju na przykład w kale krów, paszach czy ściółce, skąd może dostawać się na powierzchnię wymion i do mleka. Wyniki badań przeprowadzonych w innych krajach wykazały, że zabrudzone wymię stanowi (obok brudnej instalacji udojowej) główne źródło zanieczyszczenia mleka tym drobnoustrojem (3, 4, 12). Strzyki łatwo ulegają

zanieczyszczeniu kałem czy glebą, zawsze zawierającymi przetrwalniki różnych gatunków bakterii. Dlatego powinny być one przed każdym dojem starannie myte i dezynfekowane. Jak podają Van Heddeghem i Vlaemynck (4), nawet małe ilości kału czy gleby pozostające na strzykach mogą zanieczyścić mleko znaczną liczbą przetrwalników bakterii. Przy starannym umyciu strzyków w 67% próbek mleka spośród 90 badanych liczba przetrwalników *B. cereus* wynosiła nie więcej niż 1 w 10 cm^3 . Z kolei w mleku pozyskanym bez mycia strzyków w 33% próbek stwierdzono ponad 5 przetrwalników *B. cereus* w 10 cm^3 . Te Giffel i wsp. (3) określali zanieczyszczenie powierzchni strzyków w kilku oborach wielkostadnych po standardowym umyciu wymion. Obecność przetrwalników *B. cereus* stwierdzili w 17-50% próbek. Slaghuis i wsp. (12) wykazali obecność przetrwalników *B. cereus* tylko w 11% próbek wymazów ze strzyków. Liczba przetrwalników wynosiła od poniżej 4 do 10 w przeliczeniu na 4 strzyki.

W porównaniu z danymi piśmiennictwa wyniki badań własnych świadczą o mniejszej skuteczności mycia i dezynfekcji strzyków w badanej oborze. Obecność przetrwalników *B. cereus* stwierdzono bowiem aż w 71% próbek z powierzchni strzyków, a ich liczba była znacznie większa niż obserwowana przez innych autorów. Strzyki niektórych krów były więc silnie zanieczyszczone. Należy mieć także na uwadze fakt, że nie wszystkie przetrwalniki *B. cereus* zostały zmyte i ich rzeczywista liczba była prawdopodobnie większa.

Źródłem zanieczyszczenia mleka przetrwalnikami *B. cereus* jest także brudny sprzęt do doju i przetrzymywania mleka (4, 8). W niniejszych badaniach na 68 próbek pobranych z wewnętrznej powierzchni kubków udojowych w 54% próbek stwierdzono występowanie przetrwalników *B. cereus*. Ich liczba wynosiła 10^1 - 10^2 jtk w przeliczeniu na 4 kubki udojowe. Brak jest jednak aktualnych danych piśmiennictwa na temat występowania tego drobnoustroju na instalacji do doju, co uniemożliwia porównanie wyników otrzymanych w niniejszych badaniach. Dane z tego zakresu zawiera jedynie publikacja Labots i wsp. (8). Autorzy ci wykazali w 25% badanych kubków udojowych i przewodów dojarek przetrwalniki *B. cereus* w liczbie 10^2 - 10^4 na 1 cm^2 powierzchni kubków. Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach wskazują na zanieczyszczenie większego odsetka kubków udojowych, co może być przyczyną przedostawania się do mleka podczas doju znacznej liczby przetrwalników *B. cereus*.

Powierzchnia przetrwalników *B. cereus* jest silnie hydrofobowa w porównaniu z powierzchnią komórek vegetatywnych, a także powierzchnią przetrwalników innych gatunków z rodzaju *Bacillus* (2, 5, 6). Dzięki temu przetrwalniki te wykazują silną zdolność do przywierania do różnych powierzchni (tworzenie biofilmu), na przykład gumy (kubki udojowe), stali kwasoodpornej i tworzyw sztucznych (linie technologiczne). W połączeniu z wysoką opornością na środki myjące i de-

zynfekujące oraz kiełkowaniem przetrwalników w sprzyjających warunkach (w biofilmach), zanieczyszczenia urządzeń do doju oraz urządzeń technologicznych w zakładach mleczarskich tym drobnoustrojem nie należą do rzadkości i są wyjątkowo trudne do usunięcia.

Wszystkie badane próbki kału krów, który może zanieczyszczać powierzchnię strzyków zawierały 10^2 - 10^5 jtk przetrwalników *B. cereus*. Z innych danych (1, 3, 4, 12) wynika, że liczba ta wahała się w podobnych granicach, tj. od 10^2 do $> 10^5$ w 1 g. Należy więc wnioskować, że kał krów może być przyczyną znacznego zanieczyszczenia mleka przetrwalnikami *B. cereus*.

W niniejszych badaniach wykazano, że liczba *B. cereus* w pomieszczeniach, gdzie odbywał się dój, wynosiła od poniżej 100 do około 500 jtk w 1 m³ powietrza. Podobne wyniki otrzymał Christiansson i wsp. (1), natomiast znacznie mniejszą liczbę *B. cereus* stwierdzili Te Giffel i wsp. (< 10 -28 jtk w 1 m³) (3). Trudno jest określić bezpośredni wpływ zanieczyszczenia komórkami *B. cereus* powietrza hali udojowej na jego liczbę w mleku. Tym niemniej należy zgodzić się z opinią wielu autorów (1, 3, 4), że jest on mały przy doju mechanicznym. Wszyscy jednak podkreślają, że dój powinien odbywać się w wydzielonych, wietrzonych i utrzymanych w czystości pomieszczeniach.

Liczba przetrwalników *B. cereus* stwierdzona w ściółce i paszach była zbliżona do wyników uzyskanych przez Te Giffel i wsp. (3) oraz Slaghuis i wsp. (12). Liczba przetrwalników *B. cereus* w 1 g próbek trawy i gleby również była zbliżona do danych piśmiennictwa (3, 12). W niniejszych badaniach stwierdzono dobrą jakość kiszzonek i sianokiszzonek, gdyż liczba przetrwalników *B. cereus* była w nich na poziomie 10 - 10^2 jtk w 1 g, podczas gdy inni autorzy (3, 12) obserwowali większe zanieczyszczenie (od 10 do 10^5 jtk/g).

Podsumowanie

Bacillus cereus występuje powszechnie i w znacznej liczbie w środowisku pozyskiwania mleka. Największa liczba przetrwalników *B. cereus* znajduje się w glebie (10^3 - 10^5 jtk/g) oraz w kale (10^2 - 10^5 jtk/g). Większość (64-90%) pasz także zawiera przetrwalniki *B. cereus*, a ich liczba mieści się w granicach 10 - 10^4 jtk w 1 g. Powszechne występowanie *B. cereus* w miejscu pozyskiwania mleka stwarza niewątpliwie trudności w całkowitym zabezpieczeniu mleka przed zanieczyszczeniem tym drobnoustrojem. Ograniczenie stopnia tego zanieczyszczenia jest możliwe tylko dzięki przestrzeganiu odpowiedniego poziomu higieny doju. Występowanie przetrwalników *B. cereus* w 71% próbek z powierzchni strzyków czy w 54% próbek z powierzchni kubków udojowych oraz ich brak w pozostałych próbkach wskazuje, że jest możliwe przeprowadzenie zabiegów higienicznych przed dojem w sposób zapewniający eliminację przetrwalników z tych powierzchni.

Piśmiennictwo

1. Christiansson A., Bertlison J., Svensson B.: Bacillus cereus spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J. Dairy Sci. 1999, 82, 305-313.
2. Faille C., Fontaine F., Benezech T.: Potential occurrence of adhering living Bacillus spores in milk product processing lines. J. Appl. Microbiol. 2001, 90, 892-900.
3. Giffel Te M. C., Beumer R. R., Slaghuis B. A., Rombouts F. M.: Occurrence and characterization of (psychrotrophic) Bacillus cereus on farms in the Netherlands, Neth. Milk Dairy J. 1995, 49, 125-137.
4. Heddeghem Van A., Vlaemynck G.: Factors affecting the growth of Bacillus cereus. Bull. IDF 1992, 275, 26-29.
5. Husmark U., Rönner U.: Forces involved in adhesion of Bacillus cereus spores to solid surfaces under different environmental conditions. J. Appl. Bacteriol. 1990, 69, 557-562.
6. Jui Sen Peng, Wei Chong Tsai, Cheng Chun Chou: Surface characteristics of Bacillus cereus and its adhesion to stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 2001, 65, 105-111.
7. Kramer J. M., Gilbert R. J.: Bacillus cereus and other Bacillus species. Foodborne Bacterial Pathogens. (wyd.) M. P. Doyle, Marcel Dekker Inc., New York, Bassel 1989, 21-70.
8. Labots H., Hup G., Galesloot Th. E.: Bacillus cereus in raw and pasteurized milk. III. The contamination of raw milk with Bacillus cereus spores during its production. Neth. Milk Dairy J. 1965, 19, 191-221.
9. McKinnon C. H., Pettipher G. L.: A survey of sources of heat resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. J. Dairy Res. 1983, 50, 163-170.
10. Polska Norma PN-93/A-86034/02. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań.
11. Polska Norma PN-93/A-86034/14. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Bacillus cereus – oznaczanie liczby metodą płytkową w temperaturze 30°C.
12. Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer R. R., Andre G.: Effect of pasturing on the incidence of Bacillus cereus spores in raw milk. Int. Dairy J. 1997, 7, 201-205.
13. Slaghuis B. A., de Vries T., Verheij J. G. P.: Bacterial load of different materials which can contaminate milk during production. Milchwissenschaft 1991, 46, 574-578.
14. Stadhouders J., Hup G., Langeveld L. P. M.: Some observations on the germination, heat resistance and outgrowth of fast-germinating and slow-germinating spores of Bacillus cereus in pasteurized milk. Neth. Milk Dairy J. 1980, 34, 215-228.
15. Świąciecka J., Hauschild T.: Rodzaj Bacillus – występowanie i znaczenie w środowiskach naturalnych. Post. Mikrobiol. 1996, 35, 27-43.
16. Waes G.: Sources of contamination of the milk with Bacillus cereus. Bull. IDF 1993, nr 287, 16.

Adres autora: dr inż. Anna Berthold, ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa; e-mail: anna.berthold@wp.pl

HELLSTRÖM L. E., CARLSSON C., BOUCHER J. F., MICHANEK P.: Dostawowe iniekcje wysoko cząsteczkowego hialuronianu sodu w leczeniu zapalenia stawów u psów. (Intra-articular injections with high molecular sodium hyaluronate as a therapy for canine arthritis). Vet. Rec. 153, 89-90, 2003 (3)

U ludzi w terapii zapalenia kości i stawów coraz powszechniej stosuje się dostawowe iniekcje wysoko cząsteczkowego hialuronianu sodu (HMWSH). Badania przeprowadzono na 36 psach w wieku 1-11 lat o średniej masie ciała 7-55 kg, u których występowało zapalenie stawu łokciowego, nadgarstka i stawów kregów. HMWSH o masie cząsteczkowej 4 000 000 podawano w iniekcji do chorych stawów, dwukrotnie w dawce 3-18 mg w odstępie 3 tygodni. Kontrola otrzymywała karprofen w dawce 2 mg 2 razy dziennie przez okres 4 tygodni. Właściciele psów oceniali nasilenie kulawizny w skali od 0 do 100 przed leczeniem oraz po 3 i 6 tygodniach po leczeniu. U 77% chorych psów w chorych stawach występowały zmiany radiologiczne. Całkowite wyleczenie uzyskano po stosowaniu HMWSH po 3 tygodniach u 32% a po 6 tygodniach u 58% psów, wyraźną poprawę po 3 tygodniach u 79% a po 6 tygodniach u 90% psów. W grupie kontrolnej wartości te wynosiły odpowiednio 27%, 27%, 53% i 53%.