

Zmiany zawartości kwasu cytrynowego w wydzielinie zapalnej gruczołu mlekowego krów w trakcie terapii antybiotykowej*)

MAGDALENA POPIOŁEK-PYRZ, WIESŁAW PODGÓRSKI

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska AR, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Popiołek-Pyrz M., Podgórski W.

Citric acid content fluctuations in the secretion of acutely inflamed mammary glands in the course of antibiotic treatment

Summary

Changes in the composition of milk from mastitis cows affects all the components of milk, while the intensity of changes depends on the cause and advancement of the disease.

The objective of the research was to determine the dynamics of the citric acid content fluctuations in the secretion of acutely inflamed mammary glands in the course of antibiotic treatment. The fluctuations of the examined component content can provide information about the intensity of the disease process, response to the administered treatment and the exact moment of tissue recovery to its physiological condition. Inflamed mammary gland secretions collected from five cows displaying a clinical form of mastitis formed the sample material.

The introductory research included isolating the pathogenic microorganisms and establishing their immunity to antibiotics in order to administer the antibiotics the isolated pathogens demonstrated the highest sensitivity to. The samples where the citric acid content was examined had been collected before the onset of the antibiotic treatment, as well as on days 3 to 5 and 7 to 10 into the treatment. The return of physiological values of citric acid in milk was observed in samples from the third collection where the average value of the component reached 177.20 mg/100 ml and was significantly higher statistically than in the secretion collected during the inflammatory process.

The research results prove that citric acid can be treated as an indicator of the restoration of the physiological state of the gland formerly covered by an inflammatory process. The increase of the level of the examined indicator to normal values shows a positive reaction to the treatment applied.

Keywords: milk, mastitis, mammary gland

Kwas cytrynowy jest podstawową substancją końcowego etapu spalenia metabolitów powstałych z rozkładu cukrów, tłuszczów i białek. Jako metabolit mitochondrialny jest produktem przejściowym w przemianach komórkowych, w tym także w przemianach komórkowych nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego. Komórki pęcherzyków wydzielniczych otrzymują sole kwasu cytrynowego także z krwi. Na poziom cytrynianów w mleku krów ma więc znaczny wpływ zawartość składników mineralnych we krwi, ale prawdopodobnie także mechanizmy wybiórczego działania błony podstawowej pęcherzyków.

Podczas choroby wymienia, w zależności od nasilenia procesu zapalnego, tkanka gruczołowa jest mniej lub bardziej zmieniona. Podobnie jak w każdym pro-

cesie zapalnym komórki są luźniej ze sobą zespolone, a przestrzenie międzykomórkowe wypełnione osoczem krwi. Dochodzi więc do przesączania się przez warstwę nieszczelnie połączonych komórek gruczołowych, składników osocza krwi do przestrzeni pęcherzyków mlekowych. Procesy destrukcyjne, zachodzące w obrębie samych komórek, obejmujące zmiany strukturalne i czynnościowe organelli, cytoplazmy czy błony komórkowej również mogą oddziaływać na skład wydzieliny gruczołu mlekowego (8, 11, 13).

Zmiany w składzie mleka krów chorych na *mastitis* dotyczą wszystkich składników, przy czym nasilenie tych zmian zależy od przyczyny i stopnia zaawansowania schorzenia. Spada zawartość składników podstawowych, tj. kazeiny, laktozy, tłuszczów oraz alfa-laktoalbuminy, betalaktoglobuliny, witamin, cytrynianów, wapnia, fosforu, potasu, magnezu, krzemu i se-

*) Praca realizowana w ramach projektu badawczego KBN Nr 3 P06Z 057 24.

lenu. Wzrasta natomiast liczba komórek somatycznych (zapalnych) o różnym stopniu ich uszkodzenia, komórek nabłonkowych, koncentracja albumin i globulin surowiczych, histaminy, serotoniny, prostaglandyny E, prostaglandyny F2 alfa, tromboksanu, leukotrienów, cytokin, lizozymu, laktoferyny, enzymów komórkowych (fosfataza kwaśna, fosfataza zasadowa, lakto-dehydrogenaza, glukuronidaza, N-acetylo-beta-D-glukozaminidaza, arylsulfataza, alfa-mannozydaza) i bakteryjnych (proteinyazy, lipazy, dehydrogenazy), glikokortykosteroidów, żelaza, miedzi, sodu i chloru. Niezwykle istotne znaczenie ma pojawienie się kazomorfina, które wykazuje właściwości opiatowe. *Mastitis* jest głównym powodem występowania w mleku dużej ilości drobnoustrojów patogennych dla zwierząt i człowieka oraz toksyn, w tym endotoksyn i enterotoksyn (2, 6-8, 12).

Celem badań było określenie dynamiki zmian zawartości kwasu cytrynowego w wydzielinie gruczołu mlekowego krów, objętego ostrym procesem zapalnym, zachodzących w trakcie terapii antybiotykowej. Wahania zawartości badanego wskaźnika mogą informować o stopniu nasilenia procesu chorobowego, reakcji na zastosowane leczenie oraz mogą pozwolić na uchwycenie momentu powrotu tkanki gruczołowej do stanu fizjologicznego.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiła wydzielina gruczołu mlekowego pochodząca od 5 krów wykazujących ostrą kliniczną postać *mastitis* oraz mleko od 8 zwierząt zdrowych. Krowy w wieku 5-7 lat, rasy hf × cb pochodziły z gospodarstw indywidualnych Lubelszczyzny. U każdej z chorych krów procesem zapalnym objętych było od jednej do trzech ćwiartek wymienia. Wszystkie chore ćwiartki wykazywały podwyższoną temperaturę skóry, lekkie zaczerwienienie i bolesność. W czterech przypadkach zaobserwowano silny obrzęk, a sześć ćwiartek charakteryzował obrzęk lekkiego stopnia. Wydzielina z czterech ćwiartek miała charakter surowiczo-mleczny, z trzech była silnie wodnista, a z dwóch surowiczo-ropna.

Po badaniu klinicznym pobrano próbki, które poddano ocenie bakteriologicznej, według akceptowanych metod (9). Oznaczono również oporność bakterii na antybiotyki, posługując się metodą krążkową na pożywce Muller-Hinton. Interpretacji wyników dokonano wg zaleceń producenta (bioMérieux-Polska). W postępowaniu terapeutycznym zastosowano antybiotyki, które dobrano w oparciu o antybiotykogram, pod postacią preparatów dowymieniowych: Nafpenzal MC, Synulox LC, Lincomicin F.

Zawartość kwasu cytrynowego oznaczono w próbkach pobranych bezpośrednio przed podaniem leków, po 3-5 dniach, oraz po 7-10 dniach od zastosowania terapii.

W badaniach zawartości kwasu cytrynowego posługiwano się metodą opisaną przez Marier i Boulet-Directa (10), opartą na reakcji kwasu cytrynowego z pirydyną w odwodnionym środowisku kwasu octowego.

Wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Badania kliniczne wszystkich krów wykazujących ostrą kliniczną postać *mastitis* potwierdziły pozytywną reakcję na zastosowane leczenie. Objawy zapalenia dotyczące wymienia oraz mleka zostały całkowicie zniesione w siódmej dobie, bez względu na rodzaj zastosowanego preparatu dowymieniowego.

Tab. 1. Poziom kwasu cytrynowego w mleku pochodzącym ze zdrowego gruczołu mlekowego oraz w wydzielinie gruczołu objętego klinicznym stanem zapalnym (mg/100 ml)

	Mleko z ćwiartek zdrowych	Wydzielina zapalna		
		przed leczeniem	3.-5. dzień po leczeniu	7.-10. dzień po leczeniu
n	30	9	9	9
x	162,30 ^a	48,77 ^b	92,44 ^b	177,22 ^a
s	40,406	39,127	76,857	14,567

Objaśnienia: a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Zmiany zawartości kwasu cytrynowego obrazuje tab. 1. Średnia zawartość badanego składnika w mleku z ćwiartek zdrowych jest zgodna z wynikami Charjan i wsp. (1). Przed zastosowaniem terapii antybiotykowej poziom kwasu cytrynowego w wydzielinie zapalnej był porównywalny z wynikami badań innych autorów stwierdzających znaczny spadek tego składnika w klinicznej, a także podklinicznej postaci *mastitis* (1, 4, 7). Reakcję wzrostu zawartości kwasu cytrynowego na zastosowane leczenie zaobserwowano w 3.-5. dniu terapii. Zawartość kwasu cytrynowego w wydzielinie pobranej przed terapią antybiotykową oraz po zastosowaniu leczenia była istotnie niższa w porównaniu z poziomem stwierdzonym w mleku pochodzącym z ćwiartek zdrowych ($p \leq 0,05$). Powrót do fizjologicznych wartości kwasu cytrynowego w mleku stwierdzono w 7.-10. dniu po zastosowaniu terapii, gdy średnia zawartość tego składnika była statystycznie istotnie wyższa niż w wydzielinie pobieranej w trakcie trwania procesu zapalnego. Nie zaobserwowano różnic w poziomie badanego składnika zależnych od zastosowanego leczenia w poszczególnych przypadkach.

Rola kwasu cytrynowego bądź jego połączeń w formie cytrynianów w procesach zapalnych tkanki gruczołowej wymienia jest dyskusyjna. Jednym z czynników warunkujących nieswoistą odporność wymienia jest laktoferyna, która wiąże żelazo w różnych wydzielinach, w tym także w mleku. Pochodzi z komórek wydzielających mleko i z fagocytów, a jej poziom znacznie wzrasta podczas zapalenia. Laktoferyna wyraźnie ogranicza wzrost gronkowców i bakterii z grupy *coli*, zaś mniej efektywnie działa na paciorkowce, gdyż ich wymagania w odniesieniu do żelaza są mniejsze (14). Antybakteryjny wpływ laktoferyny zależy od zawartości żelaza oraz od koncentracji jonów dwu-

węglowych i cytrynianowych. Dwuwęglany wzmagają działanie laktoferyny, natomiast cytryniany – ograniczają. Wpływ cytrynianów jest następstwem ich zdolności do tworzenia kompleksów z żelazem, które dla bakterii są dobrym źródłem tego pierwiastka. Zależność między laktoferyną, dwuwęglanami i cytrynianami zmienia się podczas cyklu laktacyjnego. Najbardziej efektywne działanie antybakteryjne ma miejsce w okresie zasuszenia. Stężenie dwuwęglanów jest wtedy najwyższe przy wysokim poziomie laktoferyny. W tym czasie cytryniany są absorbowane z wymienia do krwi, a dwuwęglany przedostają się w kierunku odwrotnym. Dlatego wymię zasuszone jest szczególnie odporne na bakterie tlenowe (np. *E. coli*), które wymagają dużej ilości żelaza. Natomiast już w czasie porodu często dochodzi do *colimastitis* – być może wskutek wysokiego poziomu cytrynianów w nabłonku wymienia. Należałoby więc zgodzić się z tezą, że wysoka zawartość kwasu cytrynowego w mleku z gruczołu objętego stanem zapalnym jest czynnikiem negatywnie wpływającym na humoralne mechanizmy odporności nieswoistej. Inne zdanie prezentują Dillon i wsp. (4), którzy wyszli z założenia, że niska zawartość kwasu cytrynowego jest jednym z czynników sprzyjających patogenezie *mastitis*. Stwierdzili oni, że podawanie cytrynianu trójsodowego w dawce dziennej 30 mg/kg masy ciała w 250 ml wody znacznie skraca czas trwania zapalenia wymienia. Odnotowano spadek pH mleka z 7,5-8,0 do 6,5 i zmniejszenie liczby bakterii aż o 49,03%. Konsystencja mleka wracała do normy po 2-3 dawkach, a całkowity zanik objawów zapalnych obserwowano po 8-11 dawkach. Zawartość kwasu cytrynowego w mleku istotnie wzrasta ze średnich poziomów 29,00-48,50 mg/100 ml przed postępowaniem terapeutycznym do 84-134 mg/100 ml po doustnym zastosowaniu cytrynianu trójsodowego. Tego rodzaju postępowanie zastosowano także z powodzeniem u bawolic w ostrym i podoстрыm *mastitis*, podając zwierzętom dzienną dawkę 12 g w 250 ml wody (3, 5).

Przedstawione wyniki badań dowodzą, iż kwas cytrynowy może być traktowany jako wskaźnik powrotu do stanu fizjologicznego tkanki gruczołowej zajętej uprzednio procesem zapalnym. Wzrost poziomu badanego wskaźnika do wartości normatywnych obrazuje pozytywną reakcję na zastosowane leczenie.

Piśmiennictwo

1. Charjan P. Y., Mangle N. S., Kalorey D. R., Kotheekar M. D.: Effect of udder health on lactose, citric acid and chloride levels in cow milk. *Indian J. Vet. Res.* 2001, 10, 43-46.
2. Cifrian E., Guidry A. J., Bramley A. J., Norcross N. L., Bastiola-Corcuera F. D., Marquardt W. W.: Effect of staphylococcal B toxin on cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 187-198.
3. Dillon K. S., Sandhu H. S., Singh T. J., Gill B. S.: Novel mastitis therapy in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 1991, 61, 1262-1264.
4. Dillon K. S., Sandhu H. S., Singh T. J., Divedi P. N., Sodhi S. S., Singh J., Gill B. S.: Treatment of mastitis with trisodium citrate and milk bacteriology in crossbred cows. *Indian J. Dairy Sci.* 1994, 47, 28-30.
5. Dillon K. S., Singh T. J., Sodhi S. S., Sandhu H. S., Dwivedi P. N., Singh J., Gill B. S.: Milk bacteriology pre- and post-trisodium citrate mastitis treatment in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 1995, 65, 9-11.
6. Guidry A. J., Pearson R. E., Paape M. J., Williams W. F.: Relationship among leukocyte phagocytosis, milk immunoglobulins and susceptibility to intramammary infection. *Am. J. Vet. Res.* 1980, 41, 997-1001.
7. Majewski T., Tietze M.: Wpływ stanów subklinicznych *mastitis* na jakość higieniczną mleka. *Biul. Inf. Inst. Zoot.* 2002, 40, 181-186.
8. Malinowski E.: Przyczyny, leczenie i zapobieganie *mastitis* u krów. PIWet, Puławy 1997.
9. Malinowski E., Klossowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. PIWet, Puławy 2002.
10. Marier I. R., Boulet-Direct M.: Determination of citric acid in milk with improved pyridine – acetic anhydride method. *Intern. Dairy Sci.* 1958, 12, 1983-1986.
11. Palminger Hallén I.: Lead excretion in breast milk and transfer to suckling offspring. *Acta Univ. Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 1995, 134, 9-12.
12. Pelczyńska E.: Jakość higieniczna mleka w Polsce. *Medycyna Wet.* 1993, 49, 447-451.
13. Rauluszkiwicz St., Butra A., Dejneka J.: Zastosowanie preparatu Uterotonic-Polfa w leczeniu ostrego zapalenia gruczołu mlekowego u krów. *Mat. Konf. Nauk.: Aktualne kierunki profilaktyki i terapii schorzeń gruczołu mlekowego oraz aspekty higieny mleka.* Bydgoszcz – Puławy 1994, s. 40-45.
14. Reinard P.: Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitis bacteria. *Vet. Microbiol.* 1986, 11, 387-392.

Adres autora: dr Magdalena Popiołek-Pyrz, ul. Graniczna 7/3, 20-010 Lublin

STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w grudniu 2003 r.*)

1. **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 8 województwach: dolnośląskim (1-1), kujawsko-pomorskim (1-1), lubelskim (3-4), lubuskim (1-1), podkarpackim (2-2), podlaskim (1-1), warmińsko-mazurskim (1-3), wielkopolskim (2-2). Zanotowano ją u 13 lisów i 2 jenotów.

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