

Kształtowanie się poziomu białka C-reaktywnego i neopteryny w surowicy macior z syndromem MMA

KRZYSZTOF KOSTRO, MAREK SZCZUBIAŁ*, TOMASZ PIECH*

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych,

*Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Kostro K., Szczubiał M., Piech T.

Level of C-reactive protein and neopterin in sera of sows with MMA syndrome

Summary

The level of C-reactive protein (CRP) and neopterin (NP) in MMA (Mastitis-Metritis-Agalactia) prognostics, as well as the monitoring of inflammation and efficacy of therapy were evaluated. A key role in MMA syndrome is played by the cellular mechanisms of the immune response; changes in serum concentration of CRP and NP can be used for evaluating the intensity of bacterial infections. During the early phases of MMA syndrome the level of CRP and NP in the sera of sows is increased as a result of developing bacterial infections in the reproductive tract and in mammary glands. In the treated sows the concentration of CRP and NP steadily decreased. By the end of the experiment it appeared the level of CRP and NP in the sera of sows after parturition was a very sensitive factor useful in an early detection of the MMA syndrome and for introducing therapy.

Keywords: C-reactive protein, neopterin, MMA syndrome

Skuteczność zapobiegania syndromowi MMA (*Mastitis-Metritis-Agalactia*) zależy w dużym stopniu od właściwego monitoringu zdrowotności macior w okresie okołoporodowym (9, 10). Prawidłowa koncentracja białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy świń umożliwia ocenę homeostazy organizmu, podczas gdy stale podwyższony poziom CRP świadczy o długotrwałym pobudzeniu układu immunologicznego pod wpływem czynnika infekcyjnego, zapalnego lub uszkadzającego (1, 3-5). Podstawowym wykładnikiem aktywacji komórek układu immunologicznego i aktualnego stanu ich pobudzenia jest zmiana ekspresji i powinowactwa receptorów powierzchniowych oraz poziom w surowicy uwolnionych przez nie cytokin, które są zaangażowane w procesach immunoregulacji. Innym wskaźnikiem wczesnej aktywacji i rozwoju komórkowej odpowiedzi immunologicznej są pterydiny uwalniane przez układ jednojądrzastych komórek fagocytujących MPS (Mononuclear Phagocytes System). Wśród nich ważną funkcję biologiczną pełni neopteryna (NP) (6, 7). Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że jednoczesne oznaczanie CRP i NP umożliwia ocenę przebiegu oraz zejścia niektórych chorób bakteryjnych u świń (6, 11).

Celem badań było określenie przydatności oznaczania stężenia CRP i NP w prognozowaniu wystąpienia syndromu MMA u macior, monitorowaniu natężenia procesów zapalnych w jego przebiegu oraz w ocenie skuteczności zastosowanej terapii.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Badania wykonano w fermie trzody chlewnej o zamkniętym cyklu produkcyjnym. Obsadę fermy stanowiło 265 macior w wieku 1-3 lat i masie ciała 100-200 kg. W fermie tej, w zależności od pory roku, u 20-60% macior występował w okresie poporodowym syndrom MMA. Maciory od momentu pokrycia do 100. dnia ciąży przebywały w kojach bezściółkowych, z betonowym rusztem, po 6-8 sztuk w każdym. Na dwa tygodnie przed porodem maciory przenoszono do porodówki, w której kojce posiadały posadzkę betonową pokrytą ściółką. Budynek porodówki podzielony był na sektory, po 32 kojce w każdym. Maciory żywione były mieszanką pełnoporcjową, dozowaną automatycznie przy stałym dostępie do wody.

Grupę doświadczalną stanowiło 16 macior, u których w ciągu pierwszych 48 godzin po porodzie wystąpiły objawy kliniczne syndromu MMA, w postaci obfitego cuchnącego wypływu ropnego z dróg rodnych i wzrostu wewnętrznej ciepłoty ciała powyżej 39,8°C oraz dodatkowo zapalenia gruczołu sutkowego i obniżonej laktacji. Zwierzęta z syndromem MMA podzielono na dwie grupy po 8 sztuk w każdej. Grupę I stanowiły maciory z syndromem MMA nieleczone, natomiast maciory z grupy II poddano leczeniu. Na podstawie uzyskanych wyników antybiogramu w terapii przyczynowej u macior grupy II stosowano domięśniowo Tarchomiocyn według zalecanych przez producenta dawek przez okres 3-5 dni oraz domacicznie Metrisan AN, dwukrotnie w odstępach 48 godzin. W leczeniu wspomagającym stosowano Calcium borogluconatum (40 ml/szt.) i wi-

taminę C (500 mg/szt.) dożylnie przez dwa kolejne dni oraz oksytocynę (35 j.m.) i Biolactin (prolaktyna 100 j.m.). Grupę kontrolną (grupa III) stanowiło 8 macior, u których badaniem klinicznym nie stwierdzono objawów klinicznych syndromu MMA. Zwierzęta grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej od momentu porodu poddano 10-dniowej obserwacji klinicznej.

Badania bakteriologiczne. Materiał do badań bakteriologicznych stanowiły wymazy pobrane przy pomocy sterylnych wymazówek ginekologicznych z pochwy od macior z syndromem MMA (grupa I i II). Pobrany materiał przewożono na podłożach transportowych, które wstępnie inkubowano w cieplarni przez 12 godzin w temperaturze 37°C. Następnie posiewano go na bulion z glukozą, agar zwykły, agar z krwią i podłoże McConkeya. Przy braku wzrostu na podłożach stałych dokonywano przesiewów z podłoży płynnych na stałe, po uprzednim wykonaniu preparatów barwionych metodą Grama. Pałeczki Gram-ujemne identyfikowano przy pomocy podłoży różnicujących oraz testów komercyjnych API 20E, natomiast kolonie gronkowców i paciorkowców identyfikowano przy użyciu testów API 20 Strep i API 20 Staph firmy bio-Mérieux. Lekowrażliwość wyizolowanych szczepów bakterii oznaczono metodą krążkową w stosunku do penicyliny, streptomycyny, terramycyny, amoksycyliny, kolistyny, neomycyny, ampicyliny, linkomycyny i enrofloksacyny.

Oznaczenie białka C-reaktywnego. Stężenie CRP w surowicy macior określono metodą immunoturbimetryczną przy użyciu gotowego zestawu diagnostycznego (Cormay, Polska) przeznaczonego do oznaczania tego białka u ludzi (przeciwciała reagują krzyżowo z surowiczym CRP świń). Poziom CRP oznaczono w 3.-4. godzinie oraz w 6. i 10. dniu po porodzie. Stężenie CRP wyliczono w stosunku do wzorca, a uzyskane wyniki wyrażono w mg/L.

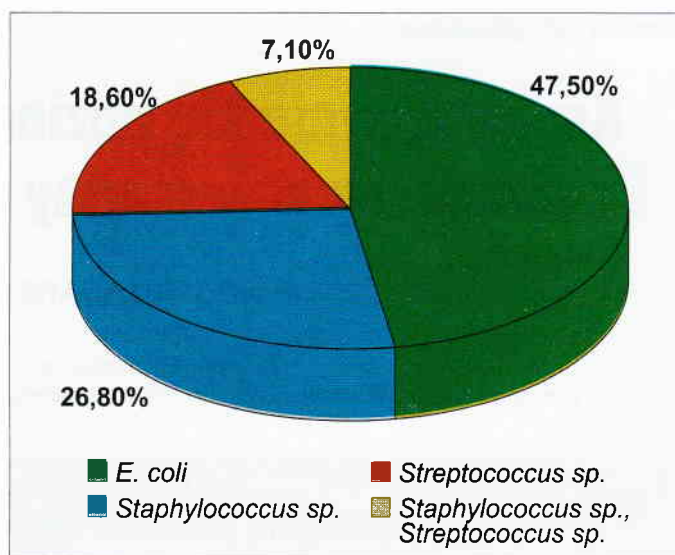
Oznaczenie neopteryny. Stężenie neopteryny określono testem ELISA przy użyciu gotowego zestawu Neopterin in ELISA, firmy Immuno-Biological Laboratories Hamburg. Oznaczenie NP wykonano według procedury podanej przez producenta, a uzyskane wyniki wyrażono w nmol/L. Stężenie NP określono w tych samych terminach jak CRP.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Obliczenia wykonano przy pomocy testu t-Studenta wyznaczając średnią, odchylenie standardowe oraz istotność różnic na poziomie $\alpha < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Obserwacja kliniczna. U wszystkich macior z grup doświadczalnych obserwowano ropny wypływ z dróg rodnych o różnym nasileniu oraz wzrost wewnętrznej ciepłoty ciała powyżej 39,8°C. U 2 samic z grupy I i 3 z grupy II ropny wypływ z dróg rodnych pojawił się już w 8.-12. godzinie, natomiast u pozostałych zwierząt dopiero w drugiej dobie po zakończeniu porodu. U 7 macior w drugiej dobie po porodzie stwierdzono dodatkowo zapalenie gruczołu sutkowego manifestujące się obrzękiem, zaczerwienieniem i bolesnością pakietów oraz brakiem wydzieliny mlecznej.

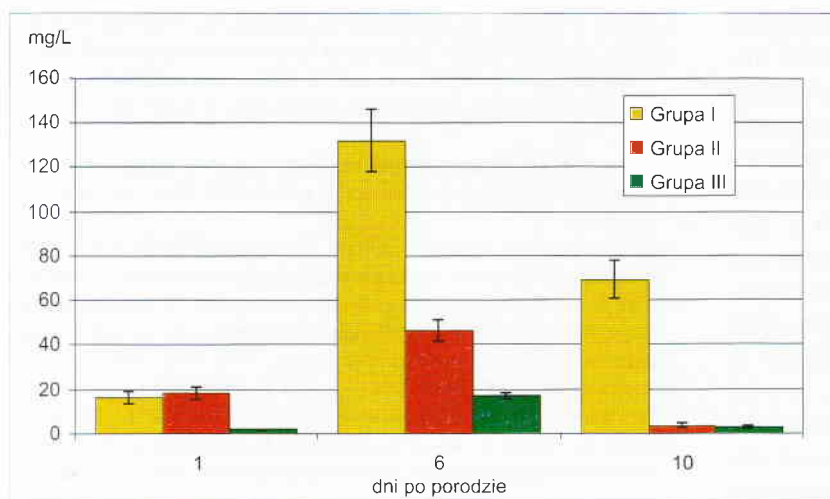
Wyniki badań bakteriologicznych i ocena skuteczności terapii. Wyniki badań bakteriologicznych



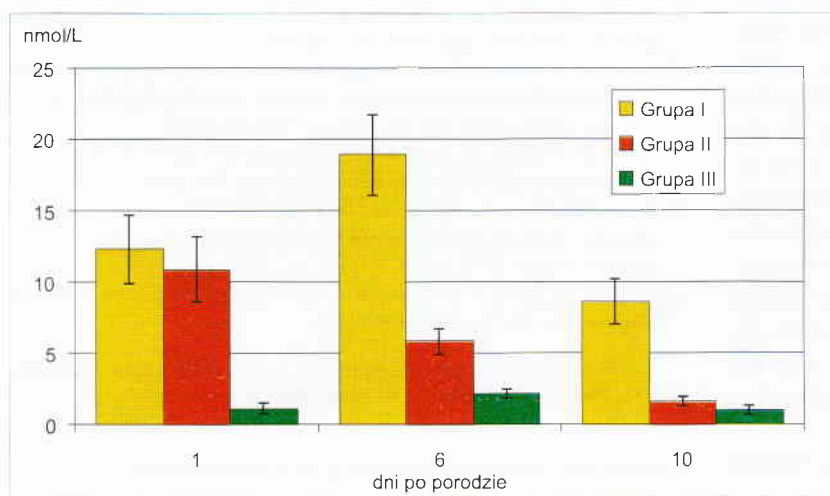
Ryc. 1. Procentowy udział poszczególnych rodzajów bakterii wyizolowanych z dróg rodnych macior z syndromem MMA

wymazów pobranych z dróg rodnych macior z syndromem MMA ilustruje ryc. 1. Z danych przedstawionych na rycinie wynika, że od 47,5% macior z syndromem MMA wyizolowano z dróg rodnych czystą hodowlę *E. coli*, od 26,8% samic – gronkowce, 18,6% – paciorkowce, natomiast od pozostałych 7,1% samic – gronkowce i paciorkowce. Wyizolowane szczepy *E. coli* były najbardziej wrażliwe na streptomycynę (+++) i neomycynę (+++), zaś w mniejszym stopniu na enrofloksacynę (++) . Natomiast paciorkowce i gronkowce były najbardziej wrażliwe na penicylinę (+++). W 6. dniu po porodzie u macior z syndromem MMA poddanych leczeniu (grupa II) objawy kliniczne choroby stwierdzono u 1, natomiast w grupie I nieleczonych u 7 spośród 8 badanych samic. W ostatnim dniu obserwacji u wszystkich macior grupy II objawy kliniczne syndromu MMA całkowicie ustąpiły, natomiast w grupie I utrzymywały się one u 4 samic.

Zachowanie się CRP. Z danych przedstawionych na ryc. 2 wynika, że statystycznie istotny wzrost stężenia białka CRP w surowicy macior z syndromem MMA w stosunku do grupy kontrolnej nastąpił już w pierwszej dobie po porodzie. Średnie wartości stężenia CRP u macior nieleczonych (grupa I) i leczonych (grupa II) były zbliżone, natomiast były one statystycznie istotnie wyższe od wartości w grupie kontrolnej (grupa III). Po tym czasie u macior z MMA poddanych leczeniu następował stopniowy spadek poziomu CRP i w ostatnim terminie oznaczeń osiągał średnią wartość zbliżoną do średniej wartości w kontroli. Natomiast u macior nieleczonych (grupa I) w 6. dniu po porodzie notowano dalszy istotny wzrost stężenia CRP i w tym terminie oznaczeń osiągał on najwyższe średnie wartości w toku całej obserwacji. W ostatnim dniu badań stężenie CRP w surowicy macior grupy I w dalszym ciągu utrzymywało się na wysokim poziomie i było ono istotnie wyższe od wartości w grupie II i III.



Ryc. 2. Stężenie CRP ($\bar{x} \pm s$) w surowicy macior z syndromem MMA nieleczonych (grupa I) i leczonych (grupa II) oraz u zwierząt klinicznie zdrowych (grupa III)



Ryc. 3. Stężenie NP ($\bar{x} \pm s$) w surowicy macior z syndromem MMA nieleczonych (grupa I) i leczonych (grupa II) oraz u zwierząt klinicznie zdrowych (grupa III)

Zachowanie się NP. Stężenie neopteryny w surowicy macior z syndromem MMA oraz w grupie kontrolnej przedstawiono na ryc. 3. U macior z syndromem MMA istotny wzrost średniej wartości NP, podobnie jak białka CRP, w stosunku do grupy kontrolnej nastąpił już w pierwszej dobie po porodzie. W 6. dniu badań u macior z MMA nieleczonych (grupa I) stwierdzono dalszy istotny wzrost stężenia NP i w tym terminie oznaczeń osiągnął on najwyższą średnią wartość w toku całej obserwacji. W ostatnim dniu badań stężenie NP u macior z MMA nieleczonych w dalszym ciągu utrzymywało się na dość wysokim poziomie, natomiast w grupie zwierząt leczonych osiągało wartości zbliżone do kontroli. W grupie kontrolnej (grupa III) stężenie NP utrzymywało się na zbliżonym i niskim poziomie przez cały okres badań.

Monitoring stał się obecnie jedną z najbardziej racjonalnych metod, umożliwiającą ocenę epidemiologiczną stada i zminimalizowanie strat ekonomicznych, a także prognozowanie zmian w stanie odporności

zwierząt. Centralną rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywają limfocyty pomocnicze Th, pełniąc zarówno funkcje regulacyjne, jak i efektorowe. Komórki Th1 pośrednicząc w wielu funkcjach związanych z cytotoksycznością i miejscowymi reakcjami zapalnymi, pełnią ważną rolę w odporności komórkowej. Natomiast limfocyty Th2 będące stymulatorami wzrostu i proliferacji limfocytów B wzmagają odpowiedź humoralną. W procesie aktywacji oraz regulacji aktywności limfocytów Th, a tym samym odpowiedzi immunologicznej, zasadniczą rolę odgrywają komórki MPS z uwagi na zdolność wytwarzania wielu cytokin, szczególnie TNF- α , IL-1 i IL-6, które są głównymi induktorami syntezy białek ostrej fazy (bof) w hepatocytach (6, 7). Silnym induktorem syntezy białek ostrej fazy jest lipopolisacharyd (LPS) zawarty w ścianie bakterii Gram-ujemnych oraz enterotoksyny wytwarzane przez bakterie Gram-dodatnie, zwłaszcza z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus*. LPS oraz enterotoksyny o właściwościach superantygenów zaburzając funkcje makrofagów, są przyczyną niekontrolowanej przez te komórki syntezy cytokin prozapalnych (IL-1 i TNF- α), jako głównych induktorów syntezy bof w hepatocytach (2, 8).

W badaniach własnych wykazano przydatność oznaczania CRP w monitorowaniu przebiegu syndromu MMA u macior oraz w ocenie skuteczności zastosowanej terapii. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że wczesne etapy rozwoju syndromu MMA indukują odczyn zapalny w drogach rodnych i gruczole sutkowym

wywołany infekcją *E. coli* lub gronkowcami i paciorkowcami. Następstwem tego jest pobudzenie komórek MPS do uwalniania cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za zmiany w tempie biosyntezy CRP w hepatocytach. Zatem istotny wzrost poziomu CRP w surowicy macior doświadczalnych już w 1. dobie po porodzie przy braku klinicznych objawów syndromu MMA w porównaniu z grupą kontrolną jest odzwierciedleniem rozwoju procesów zapalnych w drogach rodnych oraz gruczole sutkowym (3, 5, 11).

Pobudzone komórki MPS, oprócz cytokin, uwalniają czynniki regulujące wzrost, takie jak: PDGF, FGF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF oraz szereg innych mediatorów biochemicznych, wśród których istotne znaczenie posiadają pterydyny będące biochemicznymi markerami wczesnej aktywacji i wzmożonej immunologicznej odpowiedzi komórkowej organizmu. W patogenezie chorób, w których podstawową rolę odgrywają mechanizmy komórkowe, kształtowanie się poziomu NP w surowicy i moczu odzwierciedla rozwój proce-

su chorobowego. Istnieje ścisła korelacja pomiędzy wzrostem stężenia NP a nasileniem odpowiedzi immunologicznej (6, 11). Zatem stwierdzony w badaniach własnych istotny wzrost stężenia NP u macior przed wystąpieniem klinicznych objawów MMA w porównaniu z kontrolą już w pierwszej dobie po porodzie świadczy o wczesnej aktywacji komórek MPS w wyniku rozwijającej się infekcji w układzie rozrodczym. Z badań własnych wynika, że u macior z MMA stężenie neopteryny w poszczególnych terminach oznaczeń ściśle korelowało z poziomem białka CRP. Dane te świadczą, że ekspresja syntezy NP u macior z MMA jest wyznacznikiem wzmożonej komórkowej odpowiedzi immunologicznej organizmu, natomiast wzrost stężenia białka CRP jest odzwierciedleniem natężenia zmian zapalnych w drogach rodnych i pakietach gruczołu sutkowego powstałych w wyniku infekcji (6). Uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają opinię Schrödl i wsp. (11), że jednoczesne oznaczanie CRP i NP jest przydatnym markerem w ocenie natężenia stanów zapalnych w przebiegu infekcji bakteryjnych u świń. U macior kontrolnych (grupa III) przez cały okres badań stężenie NP utrzymywało się na stałe niskim i zbliżonym poziomie, co wskazuje, że u samicy z prawidłowym przebiegiem okresu poporodowego aktywność komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej jest dość niska. Natomiast utrzymujący się do 6. dnia po porodzie u zwierząt grupy kontrolnej podwyższony poziom CRP jest odzwierciedleniem natężenia procesu zapalnego w macicy związanego z porodem i okresem poporodowym (9, 10).

Normalizację stężenia CRP i NP u macior z MMA leczonych obserwowano w 10. dniu po porodzie, co świadczy o likwidacji procesu zapalnego w drogach rodnych w wyniku zastosowania skutecznej terapii. Natomiast stale utrzymujący się wysoki poziom białka CRP i NP u macior nieleczonych (grupa I) w ostatnim terminie badań wskazuje na utrzymujący się w dalszym ciągu stan zapalny w drogach rodnych oraz pakietach gruczołu sutkowego związany z syndromem MMA. Warto podkreślić, iż w ostatnim terminie badań u 4 spośród 8 badanych macior z grupy I występowały kliniczne objawy syndromu MMA.

Wnioski

1. Stężenie CRP i NP jest przydatnym wskaźnikiem do monitoringu okresu poporodowego u macior, którego oznaczenie może uzupełnić i poszerzyć diagnostykę syndromu MMA.

2. W oparciu o wartość stężenia CRP i NP w surowicy macior w pierwszej dobie po porodzie jest możliwe wczesne wykrycie syndromu MMA jeszcze przy braku objawów klinicznych i szybkie podjęcie terapii.

Piśmiennictwo

1. Bane D. P., Funk J. A., Neumann E. J., Ackerman M. A.: Correlation of serum acute phase proteins with gross pathology in market swine. Proc. 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand 1994, s. 26.

2. Dritz S. S., Owen K. Q., Goodband R. D., Nelssen J. L., Tokach M. D., Chengappa M. M., Blecha F.: Influence of lipopolisaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute-phase protein production in segregated early-weaned pigs. J. Anim. Sci. 1996, 74, 1620-1628.
3. Ekersall P. D.: Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. Rev. Med. Vet. 2000, 151, 577-584.
4. Heegaard P., M. H., Klausen J., Nielsen J. P., Gonzales-Ramon N., Piñeiro M., Lampreave F., Alava M. A.: The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, Major Acute Phase Protein and serum Amyloid A protein are sensitive indicators of infection. Comp. Biochem. Physiol. 1998, 119B, 365-373.
5. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.: Białka ostrej fazy jako markery chorób u zwierząt. Medycyna Wet. 2001, 57, 539-544.
6. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.: Pterydyny – markery wczesnej aktywacji odpowiedzi komórkowej organizmu. Medycyna Wet. 2001, 57, 156-161.
7. Kostro K., Gliński Z., Wojcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.: Białka ostrej fazy jako ligandy komórek układu immunologicznego. Medycyna Wet. 2002, 58, 929-933.
8. Morkoc A., Backstrom L., Lund L., Smith A. R.: Bacterial endotoxin in blood of dysgalactic sows in relation to microbial status of uterus, milk and intestine. J. Am. Vet. Med. Ass. 1983, 183, 786-789.
9. Pejsak Z., Tarasiuk K.: Bacteriological examination of milk, feces, urine and smears from the reproductive tract of gilts and sows showing symptoms of coliform mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy 1985, 28, 35-41.
10. Ross R. F., Orning A. P., Woods R. D., Zimmermann B. J., Cox D. F., Harris D. L.: Bacteriologic study of sows agalactia. Am. J. vet. Res. 1981, 42, 949-955.
11. Schrödl W., Kunze R., Krüger M.: Determination of C-reactive protein and neopterin in serum of diseased and bacterially infected pigs. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1998, 111, 321-325.
12. Stang B. V., Koller L. D.: Neopterin values in selected groups of normal animals. Res. Vet. Sci. 1998, 65, 87-88.

Adres autora: dr hab. Krzysztof Kostro, prof. nadzw. AR, ul. Sikorskiego 3/81, 20-814 Lublin; e-mail: kkostro@hoga.pl

ZORIC M., STERN S., LUNDEHEIM N., WALLGREN P.: Czteroletnie badania nad kulawizną prosiąt w stacji badawczej. (Four-year study of lameness in piglets at a research station). Vet. Rec. 153, 323-328, 2003 (11)

Częstotliwość i przyczyny występowania kulawizny u prosiąt w okresie do 9. tygodnia życia badano przez 4 lata w stadzie liczącym 110 macior w stacji Funbo-Lövsta Szwedzkiego Uniwersytetu Nauk Rolniczych w Uppsali. W stadzie nie występowały choroby z listy A OIE ani choroba Aujeszky'ego, zakaźne zanikowe zapalenie nosa, zakażenie *Brachyspira hyodysenteriae*, epidemiczna biegunka prosiąt, PRRS, salmonelloza i koronawirusowe zapalenie żołądka i jelit (TGE). W okresie badań urodziło się w stadzie 941 żywych prosiąt, z których 9,8% leczono z powodu kulawizny. W miotach loszek kulawizna występowała u 9,9% prosiąt, w miotach macior w 3. ciąży u 11,4% i w miotach macior w 4.-7. ciąży u 8% prosiąt. Kulawizną było dotkniętych około 75% prosiąt w wieku do 3. tyg. życia. Prawdopodobieństwo wystąpienia kulawizny spadło z 27% w pierwszym tygodniu życia do 0,3% po odsadzeniu. Średnia masa prosiąt chorych w wieku 8 tyg. była o 8% niższa od masy prosiąt zdrowych. Śmiertelność prosiąt z kulawizną była wyższa niżeli prosiąt zdrowych. Największy odsetek prosiąt z kulawizną występował w miotach liczących 11 lub więcej sztuk. Iniekcja preparatu zawierającego żelazo 2., 3. lub 4. dnia życia nie wpływała na wystąpienie kulawizny.