

# Wpływ wybranych czynników na jakość siary klaczy i poziom immunoglobulin siarowych u źrebiąt

ANNA WŁODARCZYK-SZYDŁOWSKA, WOJCIECH NOWACKI, HELIODOR WIERZBICKI\*

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Katedry i Kliniki Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

\*Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Kożuchowska 7, 51-631 Wrocław

Włodarczyk-Szydłowska A., Nowacki W., Wierzbicki H.

## Influence of chosen factors on the quality of mare's colostrums and immunoglobulin level in foals

### Summary

Variations in the total protein and Ig levels in colostrums depend on mares' body weight, breed and individual features. The average level of total protein in colostrums, studied over a period of four seasons, was equal to 112.4 g/l + 33.1. In this study the average percentage content of gamma globulin in 84 samples of colostrums was equal to 58.8% (66.7 g/l + 23.1) and it did not reveal significant differences between the average gamma globulin contents. However, the difference between the average lowest and highest obtained results was 17.4 g/l, and between individual results was 15.64 g/l – 124 g/l. The results of the study also showed that the level of Ig in colostrums fell according to age of the mares.

**Keywords:** mare, colostrums, immunoglobulin

Siara – pierwsza wydzielina gruczołu mlekowego klaczy powstaje w okresie okołoporodowym w objętości około 1,5-2 l. Białko całkowite stanowi około 10% jej składu (4). Wzrost białka całkowitego i towarzyszący mu wzrost immunoglobulin obserwowany jest w siarze w czwartej dobie przed porodem, a sam poród to czynnik pobudzający przekazywanie immunoglobulin do wymienia. Po 20 minutach po porodzie, w wymieniu wzrasta poziom białka i immunoglobulin o 25-45%, w stosunku do poziomu stwierdzonego w wymieniu na 20 minut przed porodem (9). Minimalny poziom immunoglobulin w siarze zapewniający odporność bierną źrebięcia, w przyszłych dniach życia, to 30 g immunoglobulin w 1 l (10). Ilość ta wystarcza źrebięciu na osiągnięcie w 24. godzinie życia prawidłowego zabezpieczenia biernego – przynajmniej 8 g immunoglobulin/l surowicy. Jeżeli w tym czasie zawartość immunoglobulin w jego surowicy mieści się pomiędzy 4 a 8 g/l, to jest to częściowy niedobór odporności bierniej PFPT (partial failure of passive transfer). Wartości poniżej 4 g/l, to niedobór odporności bierniej FPT (failure of passive transfer) (3).

W miarę ssania wymienia przez źrebię zmienia się skład siary, najbardziej drastycznie widoczny w spadku poziomu białka całkowitego do 1,7-3,0% (4). Proces ten wynika ze zmniejszenia się zawartości immunoglobulin w siarze. Kolejne jej porcje są coraz uboższe w przeciwciała. Jest to zmiana dynamiczna i zachodzi głównie w ciągu 24 h po oźrebieniu (5). Wykonanie badania pierwszych partii siary jest podstawą jej oceny, jako źródła immunologicznej ochrony źrebięcia.

Celem badań było określenie wpływu sezonu i miesiąca wyźrebiecia oraz wieku klaczy i liczby porodów na parametry siary, a w szczególności na koncentrację immunoglobulin siarowych oraz ustalenie zależności pomiędzy koncentracją immunoglobulin w siarze a poziomem odporności bierniej źrebiąt.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono w stadninie koni pełnej krwi angielskiej, w czterech sezonach wyźrebień. Badaniem objęto 51 klaczy oraz ich źrebięta. W ciągu 4 lat obserwacji badano 12 klaczy trzykrotnie, 9 klaczy dwukrotnie, 30 klaczy jednorazowo. Łącznie wykonano 84 obserwacje par matka-źrebię. Klacze i źrebięta były klinicznie zdrowe i pozostawały pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną.

Porody odbywały się głównie w godzinach nocnych, od stycznia do maja każdego roku. Analizowane na podstawie dokumentacji stadniny dane odnośnie do czasu trwania ciąży klaczy, masy ciała źrebięcia i czasu wstania od porodu oraz czasu rozpoczęcia ssania od momentu wstania przedstawiono w tab. 1.

Do badań pobierano krew żylną z żyły szyjnej zewnętrznej w 36-48 godzinie życia źrebiąt oraz siarę dojoną bezpośrednio po porodzie (do 30 minut) z lewej połowki gruczołu mlekowego w ilości 10 ml, przed pierwszym ssaniem przez źrebię.

Siarę konserwowano azydkiem sodu o stężeniu końcowym 0,1%. Tłuszcz usuwano wirowaniem przez 20 minut przy 2800 obr./min. Kazeinę wytrącano w ciągu 24 h, w temp. 37°C, roztworem podpuszczki 150 mg/10 ml wody destylowanej w stosunku objętościowym 1 : 100. Wykrzepioną w temperaturze pokojowej krew wirowano przez 10

minut przy 2800 obrotów/min. Białko całkowite w surowicach oznaczono metodą biuretową. Białko całkowite serwatki oznaczono używając odczynnika Benedicta (11). Rozdziały elektroforetyczne surowicy i serwatki wykonano na paskach bibuły Whatman nr 1, w buforze weronałowym o pH 8,6 (14). Na paski nanoszono po 12 mikrolitrów surowicy źrebiąt i po 4 mikrolitry serwatki siary. Czas elektroforezy: 5 h, napięcie 200 V, natężenie 10 mA na 8 paszków. Określono procentową zawartość poszczególnych frakcji białka w badanej surowicy i wyliczono ich zawartości bezwzględne w białku całkowitym. Zebrany materiał liczbowy opracowano statystycznie metodą analizy wariancji w układzie nieortogonalnym. Istotność różnic oszacowano testem wielokrotnego rozstępu Duncana. Określono korelację pomiędzy badanymi parametrami serwatki i surowicy.

### Wyniki i omówienie

U zwierząt, które mają łożysko rzekome, siara jest jedynym źródłem odporności biernej. Charakteryzuje się wysokim poziomem białka całkowitego, zależnym od zawartych w niej immunoglobulin. W badaniach własnych średni poziom białka całkowitego w serwatce siary klaczy badanych w ciągu 4 sezonów wyźrebień, wynosił 112,4 g/l. Wynik ten jest porównywalny z wy-

Tab. 1. Czas trwania ciąży klaczy, masa ciała źrebięcia i czas wstania od porodu oraz czas rozpoczęcia ssania od momentu wstania źrebięcia

Sezon	n	Ciąża klaczy (dni)	Masa źrebięcia (kg)	Czas wstania od porodu (minuty)	Czas rozpoczęcia ssania od momentu wstania (minuty)
1999	23	335 ± 4,9 (325-341)	50,4 ± 6,8 (40-60)	57,4 ± 28,1 (20-120)	53,5 ± 24,2 (10-85)
2000	19	335 ± 7,1 (321-349)	52,0 ± 7,6 (36-63)	66,4 ± 36,9 (30-160)	64,5 ± 21,9 (35-125)
2001	15	334 ± 8,2 (321-345)	54,7 ± 5,9 (44-66)	58,3 ± 27,1 (20-105)	66,7 ± 29,9 (30-130)
2002	13	332 ± 6,3 (321-341)	52,2 ± 5,0 (46-60)	65,1 ± 32,8 (28-125)	54,6 ± 22,2 (30-100)
Σ	70	335 ± 6,5 (321-349)	52,1 ± 6,4 (36-66)	61,2 ± 31,0 (20-160)	59,5 ± 24,8 (10-130)

Tab. 2. Wpływ sezonu wyźrebienia klaczy na poziom białka całkowitego jego frakcji w siarze (g/l) ( $\bar{x} \pm s$ ; min – max)

Sezon	n	Białko całkowite	Albuminy	Globuliny		
				$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
1999	26	120,5 ± 38,8 (36,5-179,0)	16,6 ± 10,0 (3,5-49,5)	12,7 ± 3,9 (6,0-20,9)	20,9 ± 9,4 <sup>A</sup> (2,8-38,5)	70,3 ± 28,0 (15,6-124,5)
2000	22	111,4 ± 21,6 (29,5-148,0)	16,0 ± 5,1 (2,5-27,1)	13,1 ± 5,3 (5,0-30,5)	19,2 ± 7,7 <sup>A</sup> (2,5-40,2)	63,1 ± 15,5 (17,2-90,8)
2001	22	96,6 ± 30,3 (31,5-155,2)	15,8 ± 6,1 (3,4-27,1)	10,6 ± 4,5 (2,5-23,8)	10,5 ± 3,2 <sup>B</sup> (4,7-16,6)	59,7 ± 19,5 (20,5-92,2)
2002	14	123,5 ± 23,4 (58,0-146,5)	17,4 ± 7,3 (4,4-34,1)	12,5 ± 4,9 (2,5-20,8)	16,5 ± 3,9 <sup>AB</sup> (11,8-23,6)	77,1 ± 21,3 (33,9-113,0)
Σ	84	112,4 ± 33,1 (29,5-179,0)	16,5 ± 7,6 (2,5-49,5)	12,3 ± 4,7 (2,5-30,5)	16,9 ± 8,2 (2,5-40,2)	66,7 ± 23,1 (15,6-124,5)

Objaśnienia: A, B, C – istotność różnic przy  $p \leq 0,01$

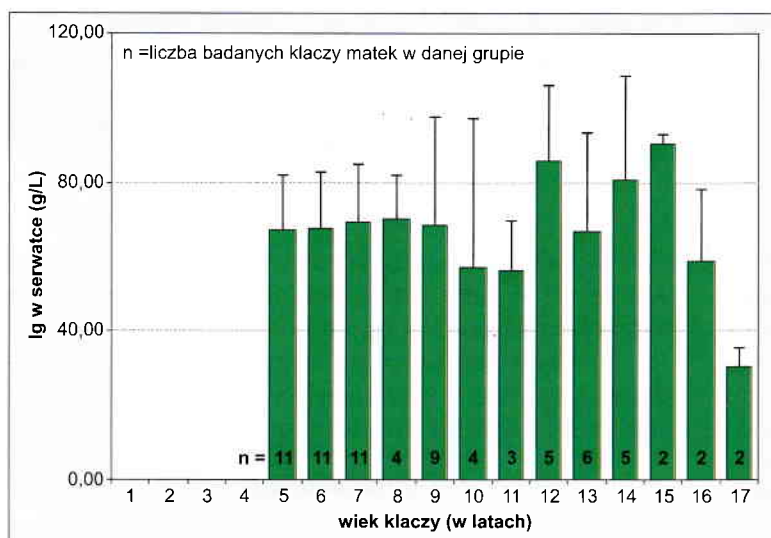
nikami innych autorów: 149 g/l (12), 120,17 ± 35,94 g/l, (13), 150 g/l (2).

Zawartość białka całkowitego w siarze zależy od masy ciała klaczy (2), a także od ich rasy (1, 5). W badaniach własnych odnotowano różnice w poziomie białka całkowitego (tab. 2) pomiędzy średnimi z poszczególnych lat, jednak nie były one statystycznie istotne. Poziom białka całkowitego u poszczególnych osobników był zróżnicowany, dlatego też średnia wartość z poszczególnych sezonów i średnia wszystkich badań charakteryzowały się bardzo dużym rozrzutem i znacznym odchyleniem standardowym. Podobne spostrzeżenia podają również inni autorzy (1, 7). Wydaje się też, że znaczne różnice oznaczanej wartości białka całkowitego w siarze, wynikać mogą z różnych technik oznaczenia i różnego terminu pobrania „pierwszej” siary (12, 13). Również stymulacja układu immunologicznego klaczy w okresie ciąży może powodować różnice w poziomach IgG w siarze (główniej składowej frakcji gamma globulinowej) przy względnie stałych wartościach IgM i IgA (6).

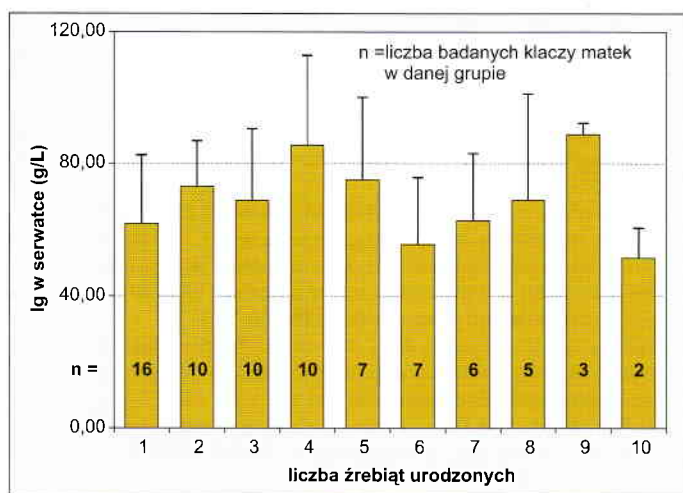
Dominująca w surowicy frakcja albumin, w siarze stanowi znacznie mniejszy procent. W badaniach własnych, albuminy stanowiły średnio 14,5%, alfa globuliny 11,3%, a beta globuliny 15,4%. Średnia wartość bezwzględna albumin w siarze, wynosząca 16,5 g/l, była prawie dwukrotnie wyższa od podawanych przez Curadi i wsp. (5) (8,1 g/l – haflingery, 5,4 g/l – konie pełnej krwi, 8,5 g/l angloaraby). Średnia wartość alfa globulin (12,3 g/L) stwierdzona w badaniach własnych była zbliżona do wyników klaczy rasy haflinger i angloarabów, wyższa natomiast o około 25% od wyników dla klaczy pełnej krwi. Beta globuliny w badaniach własnych wynosiły 16,9 g/l. Był to wynik wyższy od wartości uzyskanych u ras badanych przez Curadi i wsp. (5), z wyjątkiem haflingerów.

Uzyskane w badaniach własnych wartości bezwzględne, podobnie jak i ich udział procentowy, wykazywały zróżnicowanie w sezonach. Najwyższe wartości procentowe i bezwzględne obserwowano w pierwszym roku badań, natomiast najniższe w 2001 r.

Najważniejszym dla źrebiąt składnikiem siary jest frakcja gamma globulinowa. Ma ona w siarze największy udział procentowy i bezwzględny w całej zawartości białka, w przeciwieństwie do surowicy klaczy, w której dominuje frakcja albumin. W wykonanych badaniach, wartość procentowa gamma globulin wynosiła 58,8%, co odpowiada wartości bezwzględnej 66,7 g/l. Wyższe wartości bezwzględne immunoglobulin – 111 ± 38 g/l – stwierdził Tischner i wsp. (13). Podobnie jak w przypadku białka całkowitego również zawartość immunoglobulin w siarze zależy od masy ciała klaczy, jej



Ryc. 1. Zawartość gamma globulin w surowicy klaczy w zależności od ich wieku



Ryc. 2. Zawartość gamma globulin w surowicy klaczy w zależności od liczby urodzonych źrebąt

rasy, a także od indywidualnych predyspozycji (1, 5, 8, 13). W przeprowadzonych badaniach nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi wartościami immunoglobulin z poszczególnych lat, jednak różnica pomiędzy średnimi skrajnymi wynikami min. i max. w badanych latach wynosiła aż 17,4 g/l (tab. 2). Natomiast przedział pomiędzy wynikami osobniczymi, min. i max. wynosił 15,64 g/l-124,5 g/l.

Korelacja pomiędzy wartością bezwzględną gamma globulin, a ilością białka całkowitego była wysoka  $r = 0,88$  ( $p < 0,001$ ). Wynik ten świadczy o istotnej zależności pomiędzy tymi parametrami siary. Określono również stopień zależności pomiędzy poziomem IgG wchłoniętych z jelita do surowicy źrebęcia, a poziomem w niej białka całkowitego  $r = 0,71$  ( $p < 0,001$ ). Potwierdza to dużą zależność, poziomu białka całkowitego w surowicy źrebęcia od immunoglobulin wchłoniętych z siary.

Wykazana w badaniach własnych zależność pomiędzy zawartością immunoglobulin w surowicy, tj. ich dostępnością dla źrebęcia a ich poziomem w surowicy

źrebąt po absorpcji, wynosiła jedynie  $r = 0,39$  ( $p < 0,001$ ). Świadczy to, że wynik absorpcji jelitowej nie jest wprost proporcjonalnie zależny od ilości immunoglobulin w siarze i że o wysokości odporności posiarowej decyduje transport białek odpornościowych przez błonę śluzową jelit.

Dodatkowo zwraca uwagę fakt, że poziom immunoglobulin w surowicy źrebąt, po zakończonym okresie wchłaniania, był istotnie skorelowany z poziomem Ig w surowicy matek,  $r = 0,32$  ( $p < 0,01$ ).

Analiza statystyczna wpływu miesiąca porodu na poziom białka całkowitego i jego frakcji, nie wykazała żadnych istotnych zależności.

Wykonano również analizę statystyczną wpływu wieku klaczy i urodzenia kolejnego źrebęcia na zmiany koncentracji immunoglobulin w surowicy pierwszych partii siary. Stwierdzone wyniki ujemnej korelacji wskazują na spadek zawartości immunoglobulin w surowicy wraz z wiekiem klaczy i rosnącą liczbą rodzonych źrebąt.

Szczegółowa analiza za pomocą analizy graficznej i regresji liniowej, zależności najistotniejszej, z punktu widzenia tych badań, frakcji gamma globulinowej od wymienionych czynników, pozwoliła na określenie dynamiki stężeń Ig w surowicy. Analiza graficzna spadku Ig w surowicy z wiekiem klaczy (od 5 do 17 lat), pozwoliła podzielić badane klacze na dwa tworzące się samoistnie przedziały wiekowe ryc. 1. Pierwszy przedział to klacze w wieku od 5 do 9 lat, u których zawartość Ig w surowicy w poszczególnych grupach wiekowych była podobna i nie wykazywała znacznych różnic pomiędzy osobnikami danej grupy. Wartości średnie poszczególnych grup wiekowych były zbliżone. Regresją liniową, w pierwszym przedziale, wykazano nieznaczny wzrost stężenia Ig w surowicy wraz z wiekiem, o 0,47 g/l ( $b = 0,47$ ). Drugi przedział wiekowy utworzył się z matek w wieku od 10 do 17 lat. W tym przedziale wiekowym wyniki osobnicze immunoglobulin w surowicy klaczy były w poszczególnych grupach wiekowych, bardzo zróżnicowane. Charakterystyczna dla tego przedziału wiekowego była jednak wyraźna tendencja spadkowa koncentracji Ig w surowicy wraz z wiekiem o 1,72 g/l ( $b = -1,71$ ). Powyższe wyniki wskazują jednoznacznie na zmniejszającą się z wiekiem matek zawartość immunoglobulin w surowicy. Najniższy poziom immunoglobulin stwierdzono w surowicy dwóch klaczy 17-letnich. Wynosił on 33,9 g/l i 26,6 g/l, co pozwoliło im źrebętom uzyskać po zakończonej absorpcji jelitowej poziomy 14,0 g/l i 7,3 g/l w surowicy.

Analiza metodą regresji liniowej koncentracji immunoglobulin surowicy wykazała ich spadek o 0,43 g/l ( $b = -0,43$ ) wraz z rosnącą liczbą urodzonych źrebąt. Dodatkowo zaobserwowano, że wraz z kolejnym urodzonym źrebęciem koncentracja immunoglobulin w surowicy zmienia się, będąc raz wysoką, raz niską (ryc. 2).

**Tab. 3. Poziom immunoglobulin w siarze klaczy rodzących trzykrotnie oraz poziom immunoglobulin w surowicy źrebiąt po zakończonej absorpcji jelitowej**

Numer klaczy	Sezon	Zawartość immunoglobulin (g/L)	
		Siara	Surowica źrebięcia
1	1999	53,28	17,06
	2000	47,18	12,78
	2002	90,01	16,40
4	1999	80,52	8,98
	2001	71,70	10,85
	2002	97,46	7,68
6	1999	38,54	5,69
	2000	70,46	11,36
	2001	54,09	6,82
7	1999	75,97	8,72
	2000	69,92	11,20
	2001	65,19	15,96
11	1999	105,2	15,62
	2000	47,76	15,84
	2001	70,44	16,77
13	1999	85,40	13,62
	2000	58,04	13,10
	2002	88,52	15,72
15	1999	74,96	18,00
	2000	68,07	13,10
	2002	91,63	12,93
24	1999	58,27	25,12
	2000	78,12	13,88
	2001	35,32	14,99
31	2000	48,52	10,89
	2001	61,81	6,81
	2002	61,59	10,82

Dzięki czteroletniej obserwacji klaczy matek w jednej stadninie zgromadzono do analiz materiał od 12 klaczy, które trzy razy rodziły źrebięta w omawianym okresie. Szczegółowe wyniki badań 9 wybranych klaczy matek przedstawiono w tab. 3. Porównanie skuteczności immunologicznego zabezpieczenia źrebiąt urodzonych przez wyżej omówione klacze pozwala zauważyć, że zawartość Ig w siarze nie miała decydującego wpływu na odporność posiarową źrebięcia w poszczególnych latach. Szczególnie wyraźnie widać to na przykładzie klaczy nr 11, której źrebięta z kolejnych trzech lat uzyskały podobne poziomy immunoglobulin – 15,62 g/l, 15,84 g/l, 16,77 g/l, chociaż zawartość Ig w siarze tej klaczy w poszczególnych latach była bardzo zróżnicowana i wynosiła kolejno 105,2 g/l, 47,76 g/l, 70 g/l. U sześciu klaczy (nr 4, 7, 11, 15, 24, 31) niższe wartości immunoglobulin w siarze w jednym z sezonów pozwoliły na lepsze immunologiczne za-

bezpieczanie źrebięcia w porównaniu z sezonem z wyższą koncentracją Ig w siarze. Potwierdza to, że poziom immunoglobulin zabsorbowanych przez źrebięta nie był wprost proporcjonalny do zawartości tych immunoglobulin w siarze. Pozwala to sformułować tezę, że zawartość immunoglobulin w siarze powyżej 30 g/l nie wpływa już znacząco na odporność posiarową źrebięcia, szacowanego wg trójprzedziałowej oceny koncentracji immunoglobulin surowicznych po zakończonej absorpcji jelitowej. Poziom Ig w siarze poniżej 30 g/l nie wystarcza do właściwej ochrony immunologicznej źrebięcia (10). W siarach klaczy badanych w 3 sezonach stwierdzono przemienne wystę-

powanie wysokiego i niskiego stężenia gamma globulin. Prawdopodobnie ta dotyczyła 8 z 9 badanych klaczy. Tylko u jednej matki w dwóch kolejnych sezonach siara miała prawie identyczną zawartość gamma globulin (tab. 3).

## Wnioski

- Poziom immunoglobulin w siarze klaczy jest stabilny do 9. roku życia, później zaznacza się duże zróżnicowanie osobnicze z tendencją spadkową.
- Brak jest wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy poziomem immunoglobulin w drugiej dobie życia źrebiąt a stężeniem immunoglobulin w siarze.

## Piśmiennictwo

- Balbierz H., Nikolajczuk M., Poliwoada A., Ruda M.: Badanie białek siary i mleka klaczy w okresie karmienia. Pol. Arch. Wet. 1975, 18, 456-465.
- Chavatte P.: Lactation in the mare. Equine Vet. Educ. 1997, 9, 62-67.
- Clabough D. L., Levin J. F., Grant G. L., Conboy H. S.: Factors associated with failure of passive transfer of colostral antibodies in Standardbred foals. J. Vet. Inter. Med. 1991, 5, 335-340.
- Csapó-Kiss Zs., Stefler J., Martin T. G., Makray S., Csapó J.: Composition of mares' colostrums and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and microelements. Int. Dairy J. 1995, 5, 393-402.
- Curadi M. C., Orlandi M., Greppi G. F., Toppino P. M., Barzaghi S.: Identification of protein fractions in mare's colostrum and milk. Milchwissenschaft 2000, 55, 446-449.
- Krakowski L., Krzyżanowski J., Wrona Z., Siwicki A. K.: The effect of non-specific immunostimulation of pregnant mares with 1,3/1,6 glucan and levamisole on the immunoglobulins levels in colostrum, selected indices of non-specific cellular and humoral immunity in foals in neonatal and postnatal period. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999, 68, 1-11.
- LeBlanc M. M., McLaurin B. I., Boswell R.: Relationships among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity, and colostral immunoglobulin concentration. JAVMA 1986, 189, 57-60.
- LeBlanc M. M., Tran T. Q.: Relationships among colostral electrolytes, colostral IgG concentrations and absorption of colostral IgG by foals. J. Reprod. Fert. Suppl. 1987, 35, 735-736.
- Leadon D. P., Jeffcott L. B., Rossdale P. D.: Mammary secretions in normal spontaneous and induced premature parturition in the mare. Equine Vet. J. 1984, 16, 256-259.
- Mękarska A., Tischner M., Wieczorek E.: Zmiany ciężaru właściwego i stężenia immunoglobulin w siarze klaczy. Zesz. Nauk. ART Olsztyn 1996, 23, 111-117.
- Richterich R.: Chemia kliniczna. PZWL, Warszawa 1971.
- Rouse B. T., Ingram D. G.: The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. Immunology 1970, 19, 901-907.
- Tischner M., Niezgoda J., Wieczorek E., Mękarska A., Lisowska A.: Ocena jakości siary klaczy. Medycyna Wet. 1996, 52, 381-383.
- Zieliński J.: Badanie wpływu różnych sposobów odchowu cieląt na proces ontogenezy białek surowicy krwi w okresie neonatalnym. Praca dok., AR Wrocław 1975.

Adres autora: dr Anna Włodarczyk-Szydłowska, ul. Więckowskiego 23/16, 50-431 Wrocław; e-mail: aws@poczta.fm