

LUDWIK MERESTA, TADEUSZ MERESTA

Wrażliwość na ekstrakt propolisu drobnoustrojów wywołujących mastitis u bydła w badaniach *in vitro*

Instytut Weterynarii, ul. Al. Partyzantów 57, 21-100 Puławy

Schorzenia wymion są ciągle zagadnieniem aktualnym i otwartym, tak ze względu na złożoność przyczyn, jak i wynikających skutków. Z samej istoty rzeczy są do tego stopnia zagadnieniem skomplikowanym, iż w zwalczaniu i zapobieganiu tych schorzeń bierze udział wiele specjalności związanych z produkcją zwierzęcą, a w szczególności produkcją mleczną. Choroby wymienia, bez względu na ich rodzaj i tło, ogólnie określane są jako zapalenie gruczołu mlekowego — *mastitis*. Gruczoł mlekowy u bydła hodowlanego z uwagi na swoją funkcję nie jest całkowicie skorelowany z cyklem rujowo-ciążowym. Poddawany powtarzającym się bodźcom dojenia jest narządem stale czynnym, gdyż wydzielanie mleka odbywa się przez całą dobę w ciągu wielu miesięcy okresu międzyciążowego. Jest więc narządem wybitnie obciążonym pracą, powodującą w konsekwencji wysoką jego wrażliwość na czynniki zewnętrzne, uszkodzenia mechaniczne i podatność na działanie drobnoustrojów. Leczenie zapalenia gruczołu mlekowego na tle bakteryjnym wymaga poznania wrażliwości zarazka na chemioterapeutyki lub antybiotyki.

Według autorów amerykańskich (20) większość zakażeń bakteryjnych wymion powodują paciorkowce bezmleczności (*Streptococcus agalactiae*) oraz gronkowce (*Staphylococcus*). Spośród innych drobnoustrojów wywołujących to schorzenie około 2—3% przypada na *Pseudomonas aeruginosa*, 2% *Escherichia coli*, 1—2% na *Corynebacterium pyogenes*. Poniżej zaś 0,5% przypadków wywoływanych jest przez *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira pomona*, drożdże — *Cryptococcus* lub *Candida*. W podobnym odsetku występują zapalenia wymion na tle zakażenia *Clostridium perfringens* (11), *Proteus morgani*, *Nocardia asteroides*, *Spherophorus necrophorus*, *Diplococcus pneumoniae*, pałeczkami *Brucella* oraz *Mycobacterium tuberculosis*.

Z wieloletnich badań wykonywanych w pracowniach chorób wymion Zakładów Higieny Weterynaryjnej i Weterynaryjnych Laboratoriach Diagnostycznych wynika, że w Polsce schorzenia wymion tła bakteryjnego wywołwane są w 50% przypadków przez paciorkowce bezmleczności (*Streptococcus agalactiae*). Pozostała część wywoływana jest w kolejności przez *Staphylococcus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* i *Corynebacterium pyogenes*. Spora-

dycznie notuje się przypadki na tle beztlenowców lub innych drobnoustrojów (5).

Wprowadzenie antybiotyków i chemioterapeutyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych zwierząt, znalazło również zastosowanie w leczeniu chorób wymion (1, 2, 3, 4, 14, 18, 21). Znajomość wrażliwości flory bakteryjnej izolowanej z przypadków chorobowych gruczołu mlekowego na stosowane antybiotyki lub chemioterapeutyki pozwala osiągnąć lepsze wyniki w leczeniu tego schorzenia. Jednakże często pomimo właściwego postępowania lekarsko-weterynaryjnego i zootechnicznego, podawanie wybranych leków nie daje spodziewanych rezultatów. Ma to miejsce szczególnie wówczas, kiedy na skutek długotrwałego stosowania antybiotyków dochodzi do powstawania szczepów antybiotykoopornych. Niekiedy zaś wraz ze znikaniem bakterii będących pierwotną przyczyną schorzenia, pojawiają się inne drobnoustroje, przeważnie grzyby. Najczęściej mamy wówczas do czynienia z zapaleniem wymienia, wywołanym przez *Candida albicans*. Grzyb ten nie jest wrażliwy na większość stosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków. W takich przypadkach niekiedy wartościowe, wysoko mleczne krowy, na skutek *mastitis* na tle kandydozy, są eliminowane z hodowli. Pociąga to za sobą określone straty zarówno w produkcji mleka, jak i w pogłowiu krów. Choroby wymion powodując zmniejszoną, upośledzoną laktację lub jej całkowity zanik, pociągają za sobą wymierne straty ekonomiczne. Dlatego też poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych od obecnie stosowanych preparatów do leczenia chorób wymienia jest zagadnieniem wciąż aktualnym i celowym.

Z licznych badań wynika, że ekstrakty propolisu wykazują właściwości przeciwbakteryjne wobec takich drobnoustrojów, jak: *Staphylococcus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* (6), *Trichophyton gypseum* (8), *Bacillus cereus* (9), *Aspergillus sulphureus* (17). Ponadto wyniki doniesień autorów radzieckich (7) wskazują, że w trakcie działania tego ekstraktu na drobnoustroje nie dochodzi do powstawania szczepów propolisoopornych. Dane z piśmiennictwa radzieckiego świadczą również o tym, że można osiągnąć dobre wyniki leczenia przy pomocy ekstraktów propolisu w przypadkach występowania gronkowców antybiotykoopornych (16).

Biorąc pod uwagę fakt, że ekstrakty propolisu — poza aktywnością przeciwbakteryjną — posiadają również zdolności znieczulające i biostymulacyjne (19), podjęto badania zmierzające do zastosowania tego preparatu w leczeniu stanów zapalnych gruczołu mlekowego u krów.

Materiał i metody

Do badań użyto ekstraktu propolisu otrzymanego w niżej podany sposób. Surowiec propolisu ekstrahowano mieszaniną rozpuszczalników: alkohol metylowy, eter etylowy, aceton i octan etylowy w stosunku 1:1:1:1, w temperaturze pokojowej $\pm 20^{\circ}\text{C}$, przez okres 48 godzin. Mieszaninę rozpuszczalników stosowano wagowo w stosunku do surowca propolisu jak 10:1. Uzyskany ekstrakt przesączało przez bibułę filtracyjną Whatmanna. Z przesącza wytrącono substancje woskowe rozpuszczalne w wym. mieszaninie rozpuszczalników i ponownie sączono przez bibułę filtracyjną. Otrzymany klarowny roztwór ekstraktu propolisu odparowywano następnie pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia rozpuszczalników. Proces odparowywania przeprowadzano do momentu uzyskania stałej wagi. Uzyskaną ciemną, ciągliwą substancję ekstraktu propolisowego o specyficznym swoistym zapachu, rozpuszczano w określonej objętości 90% alkoholu etylowego. Tak przygotowany roztwór o określonym stężeniu ekstraktu propolisu wyrażony w miligramach (mg) ekstraktu na 1 ml alkoholu etylowego (mg/ml), służył od określenia jego aktywności przeciwbakteryjnej: MIC (minimal inhibition concentration) najmniejsze stężenie bakteriostatyczne i MBC (minimal bactericidal concentration) najmniejsze stężenie bakteriobójcze. Jako wzorca użyto szczepu gronkowca złocistego — *Staphylococcus aureus* 209P (Oxford).

Zastosowano podłoża: a) stałe o składzie — Bactocasitone Difco 4 g, wyciąg drożdżowy Difco 3 g, wyciąg mięsny 500 ml, NaCl 3,5 g, agar Oxoid nr 1 15 g, wodę dest. 500 ml, b) płynne wg Grove i Randała nie zawierające glukozy i fosforanów. Podłoża posiadały pH 6,5–6,8, gdyż w tych granicach pH (od 6,0 do 6,8) właściwości antibakteryjne ekstraktów propolisowych wykazują wartości niezmiennie (15). Technika badania MIC i MBC była identyczna jak w pracy poprzedniej (15). Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu propolisu wynosiła MIC=100 $\mu\text{g/ml}$ podłoża, zaś MBC=160 $\mu\text{g/ml}$ podłoża wobec standardowego szczepu gronkowca.

W pierwszym etapie pracy używając wyżej opisanego ekstraktu określono jego aktywność wobec szczepów (Ośrodek Kolekcji Szczepów Bakteryjnych Instytutu Weterynarii w Puławach): *Streptococcus agalactiae* 4, *Corynebacterium pyogenes* 518, *Escherichia coli* 353, *Escherichia coli* 354, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Następnie ustalono aktywność przeciwbakteryjną tegoż ekstraktu wobec 34 szczepów terenowych *Streptococcus agalactiae* i 35 szczepów *Staphylococcus aureus*. Szczepy terenowe paciorkowca bezmleczności i gronkowca złocistego zostały wyizolowane z prób mleka nadsyłanych do pracowni badania chorób wymion ZHW w Lublinie. Identyfikacje szczepów przeprowadzano zgodnie z instrukcją Min. Rol. Dep. Wet. Nr 48 z dnia 22 września 1978 r. (WET. Sp II-640/8/78) w sprawie rutynowego rozpoznawania drobnoustrojów patogennych dla gruczołu mlekowego krów. Dla wszystkich badanych szczepów bakteryjnych — zarówno muzealnych, jak i terenowych — określono MIC i MBC wym. ekstraktu propolisu.

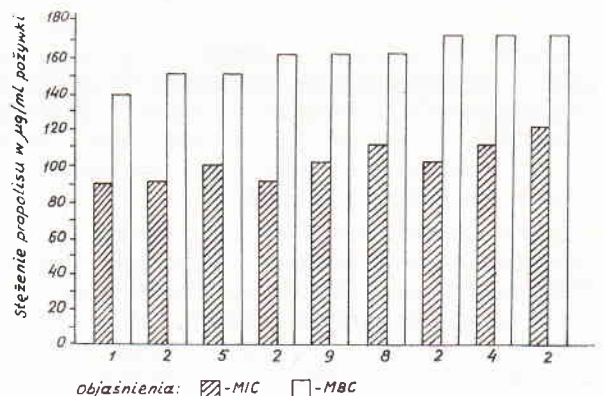
Wyniki i omówienie

Badaniem objęto łącznie 75 szczepów bakteryjnych, w tym 6 szczepów pochodziło z O-

Tab. 1. Wrażliwość muzealnych szczepów bakteryjnych na ekstrakt propolisu

Nazwa szczepu	Wartość		Stosunek MIC : MBC
	MIC	MBC	
<i>Str. agalactiae</i>	70	80	1 : 1,1
<i>Candida albicans</i>	80	90	1 : 1,1
<i>Coryn. pyogenes</i> 518	80	270	1 : 3,4
<i>E. coli</i> 353	260	580	1 : 2,2
<i>E. coli</i> 354	260	580	1 : 2,2
<i>Pseudomonas aerug.</i>	680	1320	1 : 1,9

środką Kolekcji Drobnoustrojów Instytutu Weterynarii w Puławach, a 69 szczepów zostało wyosobnionych w ZHW z przypadków *mastitis* u krów. Spośród 6 muzealnych szczepów zbadanych we wstępnym etapie pracy (tab. 1) *Streptococcus agalactiae* okazał się najbardziej wrażliwy na ekstrakt propolisu, przy czym dawka bakteriostatyczna wynosiła 70 $\mu\text{g/ml}$, a bakteriobójcza 80 $\mu\text{g/ml}$ podłoża. Również szczep *Candida albicans* był bardzo wrażliwy na działanie propolisu (MIC=80 $\mu\text{g/ml}$ a MBC=90 $\mu\text{g/ml}$), a stosunek wartości MIC do MBC wynosił jak 1 : 1,1. Jest to ciekawe i cenne spostrzeżenie, gdyż dotychczas nie jest znany preparat, który tak skutecznie działałby na ten drobnoustrój. Bakteriostatyczne działanie propolisu w stosunku do szczepu *Corynebacterium pyogenes* miało miejsce przy 80 $\mu\text{g/ml}$ i było identyczne jak u *Candida albicans*. Jednakże dla osiągnięcia efektu bakteriobójczego potrzeba było aż 270 $\mu\text{g/ml}$ podłoża. Tak więc wymagane jest ponad trzykrotnie większe stężenie propolisu dla zabicia tego drobnoustroju, niż dla zahamowania jego wzrostu. Znaczną opornością na działanie propolisu odznaczały się szczepy *Escherichia coli*, dla których wartość MIC wynosiła 260 $\mu\text{g/ml}$ a MBC 580 $\mu\text{g/ml}$ podłoża. Najbardziej opornym na działanie propolisu okazał się *Pseudomonas aeruginosa*, gdyż działanie bakteriostatyczne osiągnano dopiero przy stężeniu 680 $\mu\text{g/ml}$, a bakteriobójcze przy 1320 $\mu\text{g/ml}$. Stosunek wartości MIC w przypadku tego zarazka wynosił jak 1 : 1,9.



Ryc. 1. Wrażliwość na ekstrakt propolisu szczepów *Staphylococcus aureus*

Objaśnienie: cyfry pod słupkami określają liczbę szczepów o jednakowej wrażliwości.

Tab. 2. Wrażliwość terenowych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z prób mleka na działanie ekstraktu propolisu

Nazwa szczepu	Liczba szczepów	Wartość		Stosunek MIC : MBC
		MIC	MBC	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	90	140	1 : 1,5
	2	90	150	1 : 1,7
	2	90	160	1 : 1,8
	5	100	150	1 : 1,5
	9	100	160	1 : 1,6
	2	100	170	1 : 1,7
	8	110	160	1 : 1,4
	4	110	170	1 : 1,5
	2	120	170	1 : 1,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	50	60	1 : 1,2
	3	50	70	1 : 1,4
	10	60	70	1 : 1,2
	5	60	80	1 : 1,3
	8	70	80	1 : 1,1

W drugim etapie badań określono wrażliwość na propolis drobnoustrojów najczęściej wywołujących zapalenia wymion u krów. Na przebadanych 69 szczepów bakteryjnych wyizolowanych z prób mleka (tab. 2), 35 stanowiły gronkowce złociste, a 34 paciorkowce bezmleczności. Spośród 35 szczepów gronkowca złocistego u 5 (14,2%) zahamowanie wzrostu występowało już przy stężeniu 90 μg propolisu na ml podłoża. Szesnaście szczepów (45,7%) wykazywało wartość MIC 100 μm na ml, a więc na poziomie standardowego szczepu 209P (Oxford). U 12 szczepów (34,2% z tej grupy) wartość MIC wynosiła 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a tylko u 2 szczepów (5,7%) MIC była na poziomie 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Działanie bakteriobójcze propolisu na szczepy gronkowca złocistego wyizolowane z mleka było następujące: u 8 szczepów (22,8%) osiągnięto wartość MBC=170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a więc nieco wyższą jak standardowego szczepu. W 19 przypadkach wartość ta była na poziomie szczepu standardowego, a u 8 szczepów niższa.

Co się tyczy drobnoustrojów z gatunku *Streptococcus agalactiae* u wszystkich 34 szczepów

wartość MIC była niższa o 30—50% od standardowego szczepu gronkowca. Również wartość MBC u paciorkowców bezmleczności była niska (od 60 do 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i nie przekraczała 50% poziomu MBC standardowego szczepu gronkowca złocistego. Korzystny był również stosunek wartości MIC do MBC u tego gatunku drobnoustrojów i nie przekraczał 1 : 1,4. Ponieważ mechanizm działania propolisu na drobnoustroje nie jest należycie poznany, zagadnienie powyższe wymaga dalszych badań.

Wnioski

Analiza wartości MIC oraz MBC wszystkich badanych szczepów wyizolowanych z prób mleka, jak i stosunek MIC : MBC, wykazanych w tab. 2, a także szczepów przedstawionych w tab. 1, pozwala na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Ekstrakt propolisu wykazuje silne działanie bakteriobójcze w stosunku do muzealnych szczepów *Streptococcus agalactiae* i *Candida albicans*, znacznie słabsze w stosunku do *Corynebacterium pyogenes* i *Escherichia coli*, a najslabiej działa na *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Szczepy *Str. agalactiae* i *Staph. aureus*, wyizolowane z przypadków zapalenia wymienia krów, są podobnie lub bardziej wrażliwe na propolis, niż standardowy szczep *Staph. aureus* 209P (Oxford).

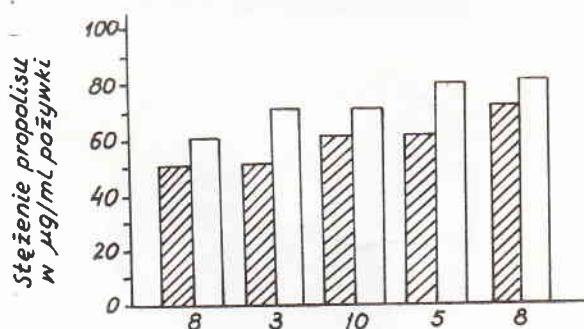
Piśmiennictwo

1. As Van J. L., Balken de Koff, Kraan H. P. M.: Tijdschr. Diergeneesk., 101, 781, 1976.
2. Christie G. J., Strom P. W.: Vet. Med. small Anim. Clin., 71, 429, 1976.
3. Daniel R. C. W., Steffert I. J.: Aust. Vet. J. 45, 530, 1969.
4. Graczyk S., Satora J.: Medycyna Wet., 33, 398, 1977.
5. Jasper D. E., Bushnell R. B., Dellinger J. D., Stang A. M.: J. vet. med. Assoc. 160, 750, 1972.
6. Jóźwik Z., Baraniecka — Włoszycka A.: Annales UMCS Sec. Biol. 31, 143, 1973.
7. Kirilin S. A., Szamrai T. E.: Vest. Otorinolaryngol. 34, 57, 1972.
8. Kivalkina V. P., Gulkina N. J., Gerasim I. M., Talan V. A., Dubarenko Z. V., Smidt E. N.: Antybiotyki, Moskwa 21, 422, 1976.
9. Kivman G. Ja., Kagramowa K. A., Szub T. A.: Antybiotyki, Moskwa 23, 792, 1978.
10. Kotowski K.: Medycyna Wet. 25, 166, 1970.
11. Kurek Cz., Chyliński G., Chybański R.: Medycyna Wet. 25, 529, 1970.
12. Lepekbrin V. N., Leonov T. A.: Stomatologia 49, 16, 1970.
13. Lolin M., Panjevic T., Dimitrievic M., Tobic.: Aplmndii XXVII Intern. Blenzzüchtenkongress, Athen 1974, s. 87.
14. Longley O. H., Meaney W. J., Cullen N. P., Cunningham J. F.: Vet. Record 89, 315, 1971.
15. Meresta L., Meresta T.: Bull. vet Inst. Puławy 24, 21, 1980.
16. Orkin V. F.: Vrac. Delo 1, 110, 1971.
17. Peplijnjak S., Jalsenjak J., Maysinger D., Kovaceta A.: Pharmazie 37, 439, 1982.
18. Redaelli G., Nami S., Ruffo G., Socci A., Guallini L.: Vet. Record 88, 297, 1971.
19. Stojko A.: Doświadczalne i kliniczne badania nad stosowaniem ekstraktu propolisu. Praca hab., Instytut Wet. Puławy 1978.
20. Wiśniowski J. (red.). Aktualne poglądy na zwalczanie schorzeń wymienia. PWRiL, Warszawa 1986.
21. Zabolicki K., Kowalczyk S., Krzywoszyński W.: Medycyna Wet. 36, 564, 1980.

Adres autora: dr Ludwik Meresta, ul. Karpińskiego 5 m 60, 24-100 Puławy

Мереста Л., Мереста Т. — Попытки применения экстракта прополиса в лечении воспаления молочной железы коров

Исследовали „in vitro” чувствительность 75 бак-



objaśnienia jak na ryc. 1

Ryc. 2. Wrażliwość na ekstrakt propolisu szczepów *Streptococcus agalactiae*

териальных штаммов к экстракту прополиса. Среди 75 штаммов, 69 происходило (из вида *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*) из проб молока, изолированных от коров с воспалением вымени. Полученные результаты исследований указывают на большую чувствительность „местных” штаммов *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* к экстракту прополиса. Эта чувствительность близка или даже больше стандартной штамма золотистого стафилококка 209P (Oxford).

Meresta L., Meresta T. — An attempt to use the extract from propolis in the treatment of mastitis of cows

The sensitivity of 75 strains to propolis extracts has been examined. Out of the bacteria 69 were isolated from cows with mastitis and were classified as belonging to *Staphylococcus* and *Streptococcus* sp. The findings showed a high sensitivity of the bacterial cells to propolis extracts; it was of the same magnitude or even higher than that of the standard strain *Staphylococcus aureus* 209 P (Oxford).

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

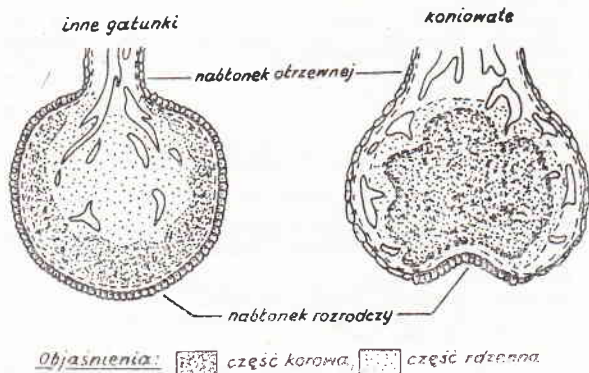
ADAM OKÓLSKI

Częstotliwość owulacji mnogich u klaczy^{*)}

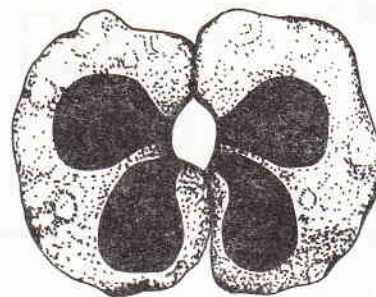
Katedra Rozrodu Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Klaczce cechują się najniższą wydolnością rozrodczą wśród zwierząt gospodarskich. Niewiele ponad 50% krytych każdego roku klaczy wydaje na świat zdrowe, zdolne do życia potomstwo. Odmienność procesów rozrodu klaczy zaczyna się już w budowie morfologicznej jajnika. Warstwa pęcherzykowa jajnika klaczy znajduje się wewnątrz jajnika i osłonięta jest od zewnątrz warstwą naczyniową. Część korowa styka się z powierzchnią jajnika tylko na bardzo ograniczonej przestrzeni w tzw. dołku owulacyjnym. Ryc. 1 przedstawia zasadnicze różnice w budowie jajnika koniowatych i pozostałych gatunków zwierząt (3). Taka budowa morfologiczna pozwała na kliniczną kontrolę rozwoju pęcherzyka Graafa i zdiagnozowanie owulacji, która może się odbywać tylko w jed-

nym miejscu jajnika, a mianowicie od strony dołka owulacyjnego. Wzrastający pęcherzyk musi osiągnąć dołka owulacyjnego w momencie owulacji. W czasie luteinizacji ciała żółtego, kliniczna ocena stanu fizjologicznego jajników klaczy jest bardzo utrudniona. Również prawie niemożliwe staje się odróżnienie fazy lutealnej od stanu spoczynku płciowego na podstawie jednorazowego badania klinicznego jajnika. Ciało żółte zlokalizowane jest wewnątrz jajnika i nie wystaje ponad jego powierzchnię (ryc. 2). Taka budowa morfologiczna jajnika nie eliminuje mnogich owulacji u klaczy, a także — co za tym idzie — również i ciąży bliźniaczych. Owulacje mnogie są zaburzeniami cyklu rujowego u klaczy, a szczególnie niekorzystna jest sytuacja, jeżeli dochodzi także do ciąży bliźniaczych. Kończą się one z reguły poronieniem, porodem przedwczesnym, martwo urodzonym lub cherlawym potomstwem. W krajowej hodowli koni pełnej krwi angielskiej tylko 5 źrebiąt (3,1%) ze 157 ciąży bliźniaczych



Ryc. 1. Schemat wzajemnego ułożenia warstwy korowej i rdzennej w jajnikach koniowatych i pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich wg. Mossmana i Duke (cyt. 3)



Ryc. 2. Schemat przekroju jajnika klaczy z dwoma ciałkami żółtymi po owulacji dwóch pęcherzyków

^{*)} Praca wykonana w ramach problemu M.R. II.