

13. Locker R. H.: Fd Res. 25, 304, 1960.
14. Marsh B. B., Leet N. G.: J. Fd Sci. 31, 450, 1966.
15. Mc Clain P. E.: Chemistry of collagen crosslinking: relationship to aging and nutrition, w: Advances Experimental Medicine and Biology, t. 86, red. Friedman, Plenum Press, New York 1977.
16. Nakamura R., Sekoguchi S., Sato Y.: Poultry Sci. 54, 1604, 1976.
17. Paul P. C., Mandigo R. W., Arthaud V. H.: J. Fd Sci. 35, 505, 1970.
18. Pfeiffer N. E., Field R. A., Varnell T. P., Krugell W. G., Kaiser I. I.: Fd Sci. 37, 897, 1972.
19. Rozier J., Jouve J. L.: Indust. Alim. Argic. 95, 371, 1978.
20. Shimokomaki M., Elsdon D. F., Bailey A. J.: J. Fd Sci. 37, 892, 1972.

Adres autora: dr inż. Maria Sadowska, ul. Kręta 36, 80-217 Gdańsk

PATOLOGIA I TERAPIA

MAREK LESIAK, ANNA KŁOSSOWSKA, KRZYSZTOF JANIĄK, MARIA DROZDŹYŃSKA

Aktywność N-acetyl-B-D-glukozaminidazy w mleku jako wskaźnik występowania mastitis u krów

Zakład Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii Oddział w Bydgoszczy,
ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Obecne metody diagnostyki *mastitis* oparte są na badaniach zawartości komórek somatycznych w mleku (Terenowy Odczyn Komórkowy, liczniki elektroniczne). Wymagają one dla określenia formy zapalenia — również badań bakteriologicznych bardzo pracochłonnych i kosztownych. Bez tych badań nie ma możliwości wykrycia zapaleń podklinicznych, które stanowią około 70% ogółu zapaleń wymion. W celu ograniczenia ilości badań bakteriologicznych podejmuje się próby opracowania innych metod diagnostycznych opartych na zmieniającym się składzie chemicznym mleka (np. laktoza, chloroki, sól, potas) i enzymatycznym (wzrost aktywności katalazy, dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i N-acetylo-B-D-glukozaminidazy (NAGaza)) przy powstającym i toczącym się procesie zapalnym. Szczególnie przydatne do zastosowania w praktyce wydaje się oznaczenie aktywności tego ostatniego enzymu. NAGaza jest enzymem lizosomalnym uwalnianym z uszkodzonych komórek. Stwierdzono, że aktywność tego enzymu wzrasta wraz z nasileniem się procesu zapalnego wymienia (1). Do opracowania szybkiej metody oznaczania aktywności NAGazy wykorzystano fluorometrię (5). Metodę tę zastosowano do wykrywania stanów zapalnych gruczołu mlecznego krów w fermach ppgr i w gospodarstwach indywidualnych na terenie woj. bydgoskiego.

Materiał i metody

Do badań pobierano mleko z poszczególnych ćwiartek wymienia od krów rasy ncb przebywających w kilku różnych oborach na terenie województwa bydgoskiego. Łącznie przebadano 969 prób mleka pobieranych około 4 godziny po doju porannym. Przy wykrywaniu stanów zapalnych wymienia stosowano następujące testy: zawartość komórek somatycznych w mleku, oznaczanie bakterii patogennych w mleku, określanie aktywności NAGazy w mleku.

Zawartość komórek somatycznych w mleku określano testem oborowym z płynem Mastirapid (TOK) oraz metodą zalecaną przez Międzynarodową Federa-

cję Mleczarską (IDF) opracowaną dla elektronicznego liczenia komórek somatycznych w mleku, do której zastosowano aparat Laborscale Analyser typ PSL-1, PSA-1 produkcji węgierskiej. Badanie bakteriologiczne prób mleka wykonywano standardowymi metodami obowiązującymi w Polsce.

Aktywność NAGazy określano testem „Eflab Milk NAGaza Test” proponowanym przez fińską firmę Lab-systems. Test ten został zmodyfikowany przez Mattilę (5) i dostosowany do techniki mikromiareczkowania na płytkach przy użyciu fluorescencji, w oparciu o metodę opracowaną przez Leaback i Walker (4) i Kitchen (2) z użyciem 4 metyloumbelliferylu-N-acetylo-B-D-glukozaminidazy (MUAG) jako substratu. Na płytkach do mikromiareczkowania mieszano 10 µl mleka z 50 µl roztworu substratu (2,25 mM MUAG w 0,25 M buforu cytrynianowego) przy pH 4,6. Po 15 min. inkubacji w temp. 25°C zatrzymywano reakcję katalizowaną przez NAGazę mleka, dodając do próby 100 µl 0,2 M buforu (glicyna — NaOH) w celu zmiany pH do 10,5. Następnie dokonywano pomiarów fluorescencji uwolnionego w reakcji 4 metyloumbelliferonu aparatem Fluorocan firmy Labsystems połączonym z mikrokomputerem, co pozwoliło po zastosowaniu odpowiedniego programu na magazynowanie i przetwarzanie danych łącznie z interpretacją wyników. Przeprowadzono analizę otrzymanych wyników. Porównywano procentową zgodność wyników testów komórkowych z aktywnością NAGazy. Badano wzrost aktywności tego enzymu w mleku przy zapaleniach podklinicznych i zapaleniach utajonych wymienia wywołanych przez różne patogeny. Istotność różnic w aktywności tego enzymu w ćwiartkach zakażonych i niezakażonych obliczano testem t-Studenta.

Badanie bakteriologiczne prób mleka prowadzono rutynowymi metodami (Instrukcja Nr 48 Dep. Wet. Min. Rol. z dnia 22 września 1978 r.).

Wyniki i omówienie

Dane zawarte w tab. 1 przedstawiają wyniki badań tych samych prób mleka ćwiartkowe-go trzema testami diagnostycznymi. Procentowy rozkład wyników w poszczególnych przedziałach zawartości komórek jest zbliżony dla wszystkich testów. Jedynie w przypadku TOK zauważa się mniejszą czułość tego testu w przedziale II, co spowodowało wzrost liczby wyników w przedziale I. Jednakże w żadnym z

uwzględnionych przedziałów zawartości komórek zakres różnic pomiędzy rezultatami dla trzech testów nie osiąga 10%. Biorąc pod uwagę różne zasady przeprowadzania porównywalnych testów oraz różne techniki postępowania z mlekiem można przyjąć, że stwierdzany zakres różnic jest niewielki, a w przedziale III wynosi tylko 1,83%. Wyniki te mogą być podstawą do pośredniego wnioskowania o współzależności pomiędzy aktywnością NAGazy a zawartością komórek somatycznych w mleku. O wysoce istotnej i dodatniej tego typu korelacji donoszą Kitchen i wsp. (3) oraz Mattila (5).

Wyniki badań cytologicznych i bakteriologicznych mleka dawały możliwości klasyfikacji *mastitis* według zasad określonych przez Międzynarodową Federację Mleczarską. Do tej klasyfikacji odnoszono wyniki badań mleka testem NAGaza (tab. 2). Zwraca uwagę dość wysoki procent (19,03) wyników niezgodnych (dodatnich) w teście NAGaza w grupie wyników charakteryzujących mleko normalne. Sugerowałoby to większą czułość testu enzymatycznego, czego jednak nie potwierdzają dalsze dane w tabeli (16,02% wyników negatywnych w teście NAGaza w przypadkach zaburzeń sekrecyjnych i 16,90% wyników negatywnych w przypadkach zapaleń podklinicznych). Te odchylenia wydają się być wynikiem różnych stanów czynnościowych badanych wymion, co z pewnością rzutowało na różną koncentrację komórek somatycznych w mleku, jak i na stopień ich uszkodzenia powodując zmiany w aktywności NAGazy. Obecność bakterii patogennych w gruczołach mlekowych także mogła mieć wpływ na aktywność enzymatyczną mleka, chociaż z tej tabeli wnioskować o tym nie można (92,04% infekcji utajonych nie zostało wykrytych testem NAGaza). Należy zaznaczyć, że wyniki testu NAGaza były klasyfikowane jako dodatnie (*mastitis*), bądź ujemne (mleko normalne) za pomocą komputerowej analizy danych.

Nie uwzględniając klasyfikacji komputerowej autorzy niniejszej pracy dokonali porównania aktywności NAGazy w mleku pochodzącym z gruczołów zakażonych oraz nie zakażonych. Rezultaty zestawiono w tab. 3. Porównywano w obrębie tego samego wymienia aktywność NAGazy dla ćwiartki zakażonej danym patogenem z aktywnością tego enzymu w ćwiartce równoległej, bądź innej nie zakażonej. W tabeli przedstawiono średnie arytmetyczne dla poszczególnych grup ćwiartek. Zestawienie uwzględnia infekcje utajone i przypadki podklinicznego *mastitis*. Aktywność NAGazy w przypadkach zakażeń gruczołów szczepami: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus sp. B-hemolityczny*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* była zawsze istotnie wyższa niż w mleku pochodzącym z ćwiartek nie zakażonych. Tylko przy zakażeniach wywołanych przez *Micrococcus sp.* nie stwierdzono istotnych różnic.

Tab. 1. Porównanie wyników badań mleka ćwiartkowego trzema testami diagnostycznymi

| Przedziały zawartości komórek ($\times 10^3$ ml) | TOK | | NAGaza | | Laborscale | |
|---|-----|-------|--------|-------|------------|-------|
| | n | % | n | % | n | % |
| I. ≤ 500 | 530 | 69,19 | 466 | 60,83 | 473 | 61,74 |
| II. (500—1500) | 120 | 15,66 | 185 | 24,15 | 191 | 24,93 |
| III. > 1500 | 116 | 15,14 | 115 | 15,01 | 102 | 13,21 |

Tab. 2. Zestawienie wyników testu NAGaza z zawartością komórek somatycznych i obecnością bakterii patogennych w mleku

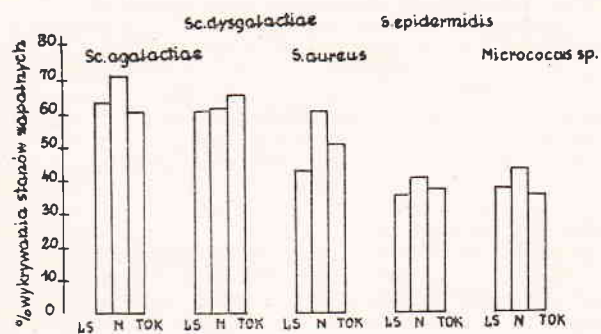
| Charakterystyka mleka i wymienia | n | % niezgodności otrzymanych wyników w teście NAGaza |
|---|-----|--|
| Nie stwierdzono bakterii patogennych liczba komórek $\leq 500 \times 10^3/\text{ml}$ (wymię normalne) | 583 | 19,03 |
| Nie stwierdzono bakterii patogennych liczba komórek $> 500 \times 10^3/\text{ml}$ (zaburzenia sekrecyjne) | 156 | 16,02 |
| Stwierdzono bakterie patogenne liczba komórek $> 500 \times 10^3/\text{ml}$ (zapalenia podkliniczne) | 142 | 16,90 |
| Stwierdzono bakterie patogenne liczba komórek $\leq 500 \times 10^3/\text{ml}$ (infekcje utajone) | 88 | 92,04 |

Tab. 3. Zestawienie średnich poziomów aktywności NAGazy (j.n)* w ćwiartkach zakażonych i nie zakażonych

| Infekcja wywołana przez | Liczba krów | Ćwiartki | | p |
|---------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|-------------|
| | | zakażone | nie zakażone | |
| <i>Sc. agalactiae</i> | 26 | 79,4 ^a | 39,9 ^b | $p < 0,005$ |
| <i>Sc. dysgalactiae</i> | 21 | 65,0 ^a | 26,8 ^b | $p < 0,05$ |
| <i>Streptococcus sp. B hem.</i> | 10 | 114,3 ^a | 45,1 ^b | $p < 0,05$ |
| <i>S. aureus</i> | 33 | 68,6 ^a | 29,7 ^b | $p < 0,01$ |
| <i>S. epidermidis</i> | 130 | 33,9 ^a | 19,8 ^b | $p < 0,001$ |
| <i>Micrococcus sp.</i> | 152 | 49,2 ^a | 28,2 ^a | — |

Objaśnienia: j.n* — jednostki NAGazy; a, b — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie.

Wiąże się to prawdopodobnie z mniejszą patogennością tego rodzaju bakterii dla gruczołu mlekowego.



Ryc. 1. Zestawienie porównawcze skuteczności trzech testów diagnostycznych w wykrywaniu stanów podklinicznych wymienia

Objasnienia: LS — aparat Laborscale — (komórki somatyczne), N — NAGaza test, TOK — Terenowy Odczyn Komórkowy.

Dokonano również porównania stopnia wykrywalności przypadków *mastitis subclinica* za pomocą trzech równocześnie wykonywanych testów diagnostycznych. Jak wynika z rezultatów przedstawionych na ryc. 1 testem NAGaza ujawniono największy procent przypadków *mastitis* wywołanych przez *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*. Być może związane to jest ze szczególną patogennością tych szczepów bakterii dla wymienia, co może powodować intensywniejsze zmiany w błonach komórkowych i uwalnianie enzymu z cytoplazmy komórek do mleka. Są również inne informacje o możliwościach wzrostu aktywności NAGazy w mleku podczas infekcji gruczołów mlecznych przez *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* i *Escherichia coli* (cyt. wg 7). Mattila i wsp. (5) obserwowali zwiększoną aktywność NAGazy w mleku podczas permanentnych infekcji wymion przez *Staphylococcus* i *Micrococcus*. Cytowane publikacje były jednak wynikiem prac doświadczalnych, w których niewielką liczbę krów obserwowano przez dłuższy okres czasu. Rezultaty niniejszej pracy pochodzą z badań masowych, jednorazowych, prowadzonych zgodnie z wymogami rutynowego badania krów i mleka w kierunku *mastitis* w naszym kraju. Przy takim systemie badań tylko przypadkowo można natrafić na okres „permanentnej infekcji” gruczołów mlecznych. Należy także podkreślić, że nie pobierano do badań prób z przypadków klinicznych, a badano tylko mleko z gruczołów, w których stwierdzono subkliniczne formy *mastitis*, a więc proces degradacji komórek mleka i tkanek wymienia przebiegał z niewielkim nasileniem. Można by przypuszczać, że nie znajdowało to odzwierciedlenia w wyraźniejszych zmianach aktywności NAGazy.

Propagatorzy omawianej enzymatycznej metody diagnostyki *mastitis* (6) udowadniają, że test NAGazy jest wierniejszym odzwierciedleniem stanu funkcjonalnego poszczególnych gruczołów mlecznych niż testy cytologiczne. Powołują się przy tym na Kitchena i wsp. (2),

którzy stwierdzili, że ok. 80% aktywności NAGazy w mleku pochodzi z uszkodzonych komórek nabłonkowych, pozostałe 20% z fagocytów. Natomiast wiadomo, że zwiększona liczba komórek somatycznych w mleku pojawia się z chwilą naruszenia tzw. bariery wymieniowej, a więc w stanach zwiększonej przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych sąsiadujących z pęcherzykami sekrecyjnymi gruczołu mlecznego. Ta bariera ulega naruszeniu nie tylko w stanach podrażnienia zapalnego wymienia, stąd stwierdza się duże i częste wahania koncentracji komórek w mleku.

Inną istotną zaletą testu NAGaza jest zastosowanie programu komputerowego do natychmiastowej analizy danych. Program ten przystosowany do badania mleka ćwiartkowego umożliwi określenie aktywności enzymu oddzielnie dla każdej ćwiartki wymienia. Wskazuje równocześnie, w której ćwiartce wymienia nastąpił istotny wzrost aktywności przyjmując jako odniesienie ćwiartkę o najniższej aktywności. Jest to bardzo ważne, gdyż uznanie jednej wartości aktywności enzymatycznej za granicę fizjologiczną dla wszystkich krów nie uwzględnia zmienności indywidualnej, jaką obserwuje się w badaniach składu mleka.

Wyniki niniejszej pracy oraz cytowanych publikacji wskazują, że w masowych badaniach diagnostycznych w stadach problemowych, gdzie niezbędne są badania mleka ćwiartkowego, test NAGaza może być bardzo przydatny. Przemawia za tym także prostota jego wykonania, szybkość pomiarów, prawie natychmiastowa analiza wyników i duże możliwości w sensie ilości badanych prób. Bariery, która może uniemożliwić wprowadzanie testu do praktyki w naszym kraju jest koszt i dostępność aparatury, niezbędnego sprzętu oraz odczynników.

Piśmiennictwo

1. Kitchen B. J.: J. Dairy Res. 48, 167, 1981.
2. Kitchen B. J., Middleton G., Durward I. G., Andrews R. J., Salmon M. C.: J. Dairy Sci. 63, 978, 1980.
3. Kitchen B. J., Middleton G., Salmon M.: J. Dairy Res. 45, 13, 1978.
4. Leaback D. H., Walker P. G.: Biochem. J. 78, 151, 1961.
5. Mattila T.: Diagnostic Problems in Bovine Mastitis. College of Veterinary Medicine, Helsinki 1985.
6. Mattila T., Pyörälä S., Sandholm M.: Vet. Res. Commun. (w druku).
7. Ulberth T., Roissy H., Neumaister E.: Wien. tierärztl. Mschr. 71, 273, 1984.

Adres autora: dr Marek Lesiak, ul. Swierczewskiego 35/51, 85-224 Bydgoszcz

Лесяк М., Клоссовская А., Яняк К., Дрожжинская М. — Активность N-ацетил-B-D-глюкозаминидазы в молоке как показатель появления мастита и коров

При помощи компьютеризованной и автоматизированной системы исследования активности N-ацетил-B-D-глюкозаминидазы в молоке коров (NAG-аза критерий система, Eflab) диагностировали воспалительные состояния (подклинические и открытые инфекции) молочных желез. Критерий NAG-азы определяет активность энзима отдельно для каждой доли относительно доли с наименьшей активностью в пределах вымени исследуемой коровы. Результаты измерений активности NAG-азы сопоставлялись с результатами исследований: клинических

вымени, бактериологических и цитологических молока.

Результаты указывают на положительную взаимозависимость между содержанием соматических клеток в молоке и активностью NAG-азы. Активность энзима была статистически существенно выше в молоке из желез, инфицированных патогенными для вымени микроорганизмами, чем в молоке из желез, свободных от патогенов либо инфицированных *Micrococcus*. Критерием NAG-азы обнаружили наивысший процент инфекции вымени, вызванных *Sc. agalactiae* и *S. aureus*.

Lesiak M., Klossowska A., Janiak K., Drożdżyńska M. — The activity of N-acetyl-B-D-glucosamidase in milk as an index of mastitis in cows

The diagnosis of subclinical and latent infections of udders was carried out by means of a computer system — NAGaza test system, Eflab. — The NAGaza test enables to determine the activity of the enzyme in each quarter in relation to the quarter with the lowest activity within the udder. The results of measurements of the NAGaza were compared with the findings obtained by clinical, bacteriological, and cytological examinations of milk. The result pointed to positive correlation between the content of somatic cells in milk and the activity of NAGaza. The activity of the enzyme was statistically significantly higher in milk from the udders infected with pathogens than in milk coming from normal udders or infected with *Micrococcus*. The highest percentage of infections by *Str. agalactiae* and *Staph. aureus* were revealed by means of the NAGaza test.

ANDRZEJ KONCICKI, ANNA KRASNODEBSKA-DEPTA, JAN JANKOWSKI*, IRENA JANOWSKA

Wpływ Tiamowetu na zdrowotność i produkcyjność niosek indyckich żywionych pełnoporcjową mieszanką dla indyków „IHN” z monenzynem sodowym*)

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego AR-T,
10-957 Olsztyn-Kortowo, bl. 105
*Zakład Hodowli i Technologii Produkcji Drobiu Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji
Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego AR-T, 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37

Wraz z intensywnym rozwojem wielkostadnego chowu drobiu wprowadza się na rynek nowe preparaty służące do walki z chorobami ptaków. Takimi preparatami są kokcydiostatyki jonoforowe, przeznaczone do walki z jedną z groźniejszych chorób pasożytniczych drobiu — kokcydiozą oraz Tiamowet — do zapobiegania i leczenia mykoplazmozy.

Kokcydiostatyczne oddziaływanie antybiotyków jonoforowych na *Eimeria* sp. sprowadza się do tworzenia obojętnych kompleksów tłuszczowych z kationami. Przeniesienie tych kompleksów przez błony biologiczne uszkadza komórkowe gradienty jonowe i prowadzi do osmotycznego uszkodzenia pasożyta. Do tych preparatów zaliczany jest monenzyn sodowy, produkowany przez firmę Elanco na drodze fermentacji ze szczepu *Streptomyces cinamonensis*. Antybiotyk ten jest substancją czynną premiksu Elankoban 100, przeznaczonego do stosowania w paszy dla brojlerów. W zapobieganiu kokcydiozie indyków kokcydiostatyk ten powinien być stosowany w programie ciągłym do 12—16 tyg. odchowu w dawce 100 ppm (2, 3). Jak wykazały badania, antybiotyk ten niejednokrotnie stwierdzano w mieszance IHN, a zatem w paszy dla niosek. Było to przyczyną masowych zatruc indyków po zastosowaniu w tym czasie Tiamowetu Biowet (Tiamulina firmy

Squibb) — antybiotyku produkowanego przez grzyb *Pleuritis mutilis*. Antybiotyk ten bowiem podany równocześnie z monowalentnymi jonoforowymi kokcydiostatykami (monenzyn-Na, salinomycyna-Na czy narasin) powoduje silne zatrucia.

W związku z częstymi przypadkami występowania monenzynu sodowego w mieszance IHN, a także zatruciami indyków po podaniu Tiamowetu, postanowiono określić wpływ tych preparatów na zdrowotność i produkcyjność niosek indyckich.

Materiał i metody

Do badań użyto 45 szt. niosek indyckich WAMA 1 rasy białej szerokopierśnej w wieku ok. 40 tyg., które zgromadzone były w fermie SD i w pomieszczeniach Zakładu Chorób Drobiu. Ptaki podzielono losowo na 6 grup:

grupa I — 10 indyczek żywionych przemysłową pełnoporcjową mieszanką dla indyków IHN, która zawierała 60—80 ppm monenzynu sodowego**). W grupie tej zastosowano Tiamowet jednorazowo w ilości 10 g na 6 litrów wody;
grupa II — 10 indyczek żywionych jak wyżej. Ptakom tej grupy podano Tiamowet przez trzy kolejne dni w dawce 3,3 g na 6 litrów wody;
grupa III — 10 indyczek stanowiących kontrolę, w której stosowano żywienie mieszanką IHN z monenzynem jak wyżej;

*) Pracę wykonano w ramach CPBR 10.3

***) Badania paszy na zawartość monenzynu sodowego przeprowadzono w Instytucie Weterynarii w Puławach.