Praca oryginalna *Original paper*

Porównanie wyników pomiaru liczby komórek somatycznych w mleku uzyskanych metodą elektroniczną i mikroskopową

MAŁGORZATA CZERW, JERZY MOLENDA, KATARZYNA KOSEK-PASZKOWSKA, JAROSŁAW BYSTROŃ, MONIKA KOTOWICZ

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Czerw M., Molenda J., Kosek-Paszkowska K., Bystroń J., Kotowicz M.

Comparison of somatic cell count measurement in milk obtained by electronic and microscopic methods

Summary

The somatic cell count (SCC) is a commonly accepted index of udder health and for this reason the correct result of the measurement is so significant. The aim of the study was a comparison of the results of SCC measure in the milk from the same cows, obtained by electronic and microscopic (reference) method performed in two different laboratories. The samples measured in the university laboratory were delivered several hours after sampling and immediately investigated, but the parallel samples directed to the official milk laboratory had usually been examined two or three days later. The results of these examinations obtained in the official milk laboratory were higher in many cases (even by 1402.8%) in comparison to results obtained at the university laboratory. To additionally verify this variance of SCC, samples examined in the university laboratory had also been calculated using the reference (microscopic) method. The verification has confirmed a high percent of compatible results obtained in the university laboratory with both of the methods in contrast to their considerable divergence in the official laboratory. The reason of these divergences is probably the different lapse of time between sampling and examination in both of the laboratories.

Keywords: somatic cell count, milk

Wymagania, które musi spełniać mleko przyjmowane do skupu, stają się coraz wyższe. Producenci, chcąc je spełniać, ponoszą duże koszty związane z dostosowaniem stada do obowiązujących standardów hodowlanych. Z danych wynika, że mimo ogólnej poprawy jakości higienicznej mleka surowego, stany zapalne gruczołu mlekowego stanowią ciągle aktualny i kosztowny problem. Odsetek infekcji podklinicznych w poszczególnych gospodarstwach bydła mlecznego dotyczy 40-80% pogłowia w ciągu roku (7). *Mastitis* jest przyczyną poważnych strat ekonomicznych, bowiem obniża nie tylko wydajność mleka, ale także jego przydatność technologiczną (6, 14-16). Mleko wprowadzone do obrotu i przetwarzania nie może zawierać w 1 ml więcej niż 400 tys. komórek somatycznych i 100 tys. komórek bakterii (13). Za główną przyczynę obniżenia jakości mleka uważane są choroby wymienia i nieprzestrzeganie wymogów higienicznych. Jest to tym bardziej istotne, że ryzyko wystąpienia infekcji u krów rośnie wraz ze wzrostem ich wydajności produkcyjnej (4, 5, 14).

W przebiegu *mastitis* wyróżnia się dwie postacie: kliniczną (choroba diagnozowana jest przez oglądanie i omacywanie wymienia) i podkliniczną, której rozpoznanie oparte jest na ocenie liczby komórek somatycznych (LKS) i wynikach posiewów mikrobiologicznych (1-3, 18, 19). Najczęściej przyczyną choroby jest zakażenie bakteryjne, niekiedy także wywołane innymi drobnoustrojami (grzybami, drożdżami i prawdopodobnie wirusami). Może być również powodowane obrażeniami fizycznymi oraz stresem. W przebiegu *mastitis subclinica* zmianie ulegają parametry jakościowe mleka, natomiast brak jest klinicznych objawów zapalenia, a mleko makroskopowo oceniane jest jako normalne.

Źródłem zarazków najczęściej jest zakażona ćwiartka wymienia. Do transmisji patogennych drobnoustrojów dochodzi przede wszystkim podczas doju, dlatego krowa z podkliniczną postacią *mastitis* stanowi zagrożenie dla całego stada (12). Wielkość zmian w składzie chemicznym mleka zależy od nasilenia stanu zapalnego wymienia, zatem każda krowa z tymi zmianami przyczynia się do obniżenia jego jakości spożywczej i przetwórczej. W takim mleku wzrasta frakcja białek serwatkowych a spada poziom laktozy, zmniejsza się jego termiczna odporność, co m.in. skutkuje osadzaniem się kamienia w pasteryzatorach. Kuleczki tłuszczowe są mniejsze i mniej stabilne, wzrasta aktywność plazminy, co powoduje szybszy rozpad białek i nadaje mleku gorzki smak. Takie środowisko sprzyja rozwojowi mikroflory gnilnej, a zmienione pH uniemożliwia rozwój kultur starterowych drobnoustrojów technologicznych. Skrzep się rozpada i jest o wiele mniej wydajny. Takie mleko jest więc surowcem o znacznie obniżonej przydatności przetwórczej.

Kryteriami oceny jakości higienicznej mleka jest zawartość komórek somatycznych oraz liczba drobnoustrojów w 1 ml. Mleko produkowane przez zdrowe wymię powinno zawierać nie więcej niż 150 tys. kom./ml (7).

LKS jest uważana za jeden z najbardziej właściwych wskaźników oceny mleka i selekcji krów w kierunku odporności na *mastitis* (9, 14). Utrzymanie niskiej wartości LKS w mleku jest głównym celem jego producentów. Obecnie wszystkie gospodarstwa specjalizujące się w hodowli bydła mlecznego objęte są kontrolą użytkowości. W tych comiesięcznych badaniach, oprócz składu biochemicznego mleka, oznacza się także liczbę komórek somatycznych. Jest to dla właściciela stada istotna informacja o stanie zdrowia zwierząt i ich użytkowości, na podstawie której nierzadko podejmuje decyzje o dalszym ich losie. Wymogi, jakie musi spełniać mleko, motywują hodowców do przestrzegania wszystkich rygorów, które mogą wpływać na zdrowie krów i jakość higieniczną mleka. Stąd też dużą wagę przywiązuje się do rzetelności wyników oznaczeń kontrolowanych parametrów.

Badania laboratoryjne zawartości komórek somatycznych w stadach krów wykonywane są metodą elektronicznego pomiaru ich liczby. Metodą referencyjną dla tych oznaczeń jest metoda mikroskopowa. Jednakże ze względu na jej skomplikowanie i czasochłonność nie jest testem rutynowym. Jest natomiast niewątpliwie metodą dokładniejszą, co przy diagnozowaniu *mastitis subclinica* ma duże znaczenie, pozwala bowiem określić nie tylko liczbę, ale także rodzaj komórek somatycznych (10).

Celem badań było porównanie zakresu zgodności wyników oznaczeń liczby komórek somatycznych w mleku tych samych krów, uzyskanych metodą elektroniczną i mikroskopową (referencyjną) podczas badań przeprowadzanych w laboratorium AR z wynikami równoległych pomiarów elektronicznych w ramach urzędowego badania kontroli użytkowości.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w stadzie produkcyjnym liczącym 160 sztuk bydła mlecznego. Do monitoringu wybrano 40 krów, u których w miesiącu poprzedzającym rozpoczęcie badań stwierdzono w kontroli użytkowości liczbę komórek somatycznych > 200 tys./1 ml, przy braku zmian klinicznych w gruczole mlekowym. Badania porównawcze prowadzono przez okres 7 miesięcy, pobierając próbki do badań w tym samym dniu i czasie co próbki do kontroli użytkowości.

Pomiar LKS metodą elektroniczną wykonano w laboratorium AR zgodnie z obowiązującą normą PN-EN-ISO 13366-221 (11), posługując się aparatem firmy Bentley – Bentley Instruments Somacount 150. Badania wykonywano w ciągu 12 godzin od momentu pobrania próbek mleka. W metodzie tej przyjęto, że komórki somatyczne to komórki oznaczane przez licznik po ustaleniu najniższej progowej wartości i eliminacji kuleczek tłuszczowych. Badania metodą mikroskopową (referencyjną) wykonano w ciągu 6 godzin od pobrania próbek mleka, zgodnie z normą PN-EN-ISO-13366-1 (10). Następnie oceniano stopień zgodności wyników poszczególnych oznaczeń poprzez porównanie wyników LKS, wykonanych podczas badań w ramach kontroli użytkowości (metoda elektroniczna) z wynikami pomiaru w laboratorium AR we Wrocławiu. Za zgodne uznawano wyniki, w których różnice wartości porównywanych pomiarów nie przekraczały 10%.

W czasie wykonywania badań u kilku krów wystąpiły kliniczne objawy zapalenia gruczołu mlekowego. W tych próbkach mleka, podobnie jak w mleku pobieranym w tym samym czasie od pozostałych krów, oznaczono liczbę komórek somatycznych, ponieważ były one badane także w ramach kontroli użytkowości.

Wyniki i omówienie

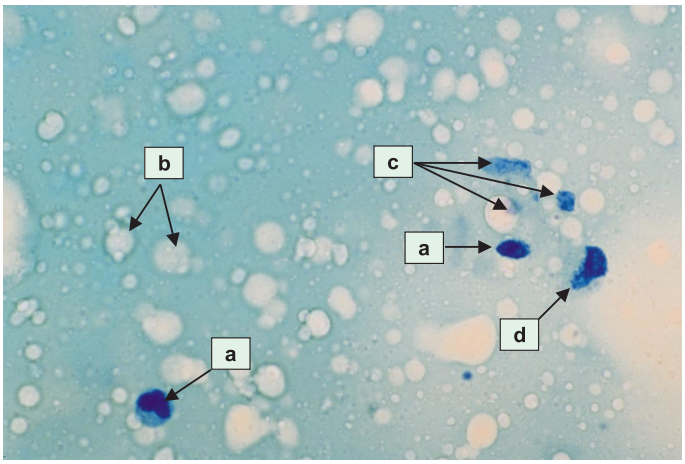
Wyniki badań podano w tab. 1. Stwierdzono duże różnice między wynikami oznaczeń wykonanych w laboratorium AR metodą elektroniczną i referencyjną a laboratorium wykonującym okresowe badania kontrolne. Okazało się, że rezultaty oznaczeń wykonanych w tym ostatnim były w znacznej części przypadków zawyżone w stosunku do wyników uzyskanych w pracowni uczelnianej. Na ogółem zbadanych 311 próbek mleka w 70 przypadkach (22,5%), liczba komórek somatycznych oznaczona metodą elektroniczną (w ramach kontroli użytkowości) była wyższa od 50,7% do 1402,8% od otrzymanej w metodzie referencyjnej. Niezgodności dotyczyły też oznaczeń, w których kierując się wynikami metody mikroskopowej, należałoby u krowy podejrzewać stan zapalny wymienia, czego jednak nie potwierdzał pomiar wykonany podczas kontroli użytkowości (20 przypadków). Różnice wyników oznaczeń LKS stwierdzono także u tych krów, u których w okresie obserwacji wystąpiła kliniczna postać *mastitis* (19 przypadków). W tym przypadku wyniki otrzymane w ramach kontroli użytkowości, mimo że były wyższe od stwierdzonych metodą mikroskopową w przedziale od 6,0% do 90,9%, potwierdzały jednak kliniczną ocenę stanu zdrowia gruczołu mlekowego badanych krów.

Rezultaty badań wskazują na częste występowanie różnic w pomiarach LKS, wykonanych w obu laboratoriach. Dokonane porównanie wykazało znaczący odsetek różnic, najczęściej na korzyść metody referencyjnej w porównaniu z oznaczeniami kontroli użytkowości (met. elektroniczna). Tego rodzaju rozbieżności nie stwierdzono w pomiarach wykonanych obu metodami w laboratorium AR. Prawdopodobnie przyczyną obserwowanych różnic był upływ czasu między pobraniem próbek a wykonaniem oznaczeń w laboratorium kontroli użytkowości. Dla

Tab. 1. Porównanie wyników pomiaru LKS tych samych próbek mleka uzyskanych met. elektroniczną i referencyjną w laboratorium AR i kontroli użytkowości

Porównywane metody	Liczba próbek (ogółem)	Wyniki				
		zawyżone > 10%	wpływ na ocenę infekcji	zaniżone > 10%	wpływ na ocenę infekcji	zgodne
KU met. elektr./ AR met. ref.	311	156	27	75	11	80
AR met. ref./ AR met. elektr.	199	10	0	4	0	185
KU met. elektr./ AR met.elektr.	176	107	19	54	11	15

Objaśnienia: KU – kontrola użytkowości, met. elektr. – metoda elektroniczna, met. ref. – metoda referencyjna



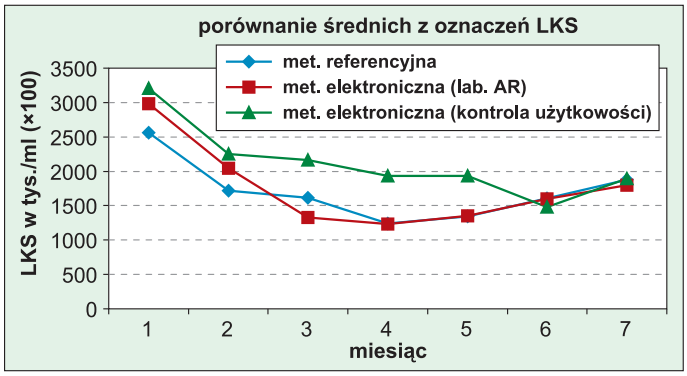
Ryc. 1. Komórki somatyczne mleka i ich fragmenty
Objaśnienie: a – granulocyt obojętnochłonny, b – kuleczki tłuszczu, c – złuszczone komórki nabłonkowe, d – makrofagi

części próbek był on dłuższy niż 48 godzin. W tym okresie, mimo stosowania konserwantów, może dojść do rozpadu komórek, a fragmenty komórkowe (ryc. 1) przy pomiarze elektronicznym mogą być, i często są liczone jako pojedyncze komórki, zawyżając wynik badania.

Analizując otrzymane wyniki, można zatem założyć, że czas upływający od momentu pobrania próbki do chwili wykonania analizy jest główną przyczyną obserwowanych różnic. Potwierdza to porównanie wyników oznaczeń wykonanych metodami elektronicznymi w obu laboratoriach. Okazały się one zgodne jedynie w 15 przypadkach. W większości pozostałych próbek wyniki kontroli użytkowości były wyraźnie wyższe od otrzymanych w oznaczeniach wykonanych w laboratorium AR. Potwierdza to również porównanie wyników pomiaru LKS uzyskanych metodą referencyjną z wynikami pomiaru elektronicznego, wykonanego w obu laboratoriach (ryc. 2).

Reasumując – aż 91% wyników otrzymanych z laboratorium kontroli użytkowości nie było zgodnych z pomiarem elektronicznym wykonanym w laboratorium AR. W 79% tych próbek porównywane wyniki różniły się o więcej niż 10% wartości pomiaru AR. Z kolei takie różnice wyników badań wykonanych metodą referencyjną i elektroniczną w laboratorium AR, stwierdzono jedynie w 7% próbek.

Liczba komórek somatycznych odzwierciedla stan zdrowia wymienia, gdyż najczęściej czynnikiem powodującym jej wzrost ponad normę fizjologiczną są stany infekcyjne tego gruczołu (17). Zmiany w genetyce, żywieniu oraz ogólnym systemie zarządzania stadem wpływają na epidemiologiczny model infekcji gruczołu mlekowego (19). Od krów wymaga się przede wszystkim doskonałej jakości mleka i możliwie największej jego ilości (4, 5, 8, 14). LKS jest istotnym wskaźnikiem stanu zdrowia wymienia, zatem rzetelność ich oznaczania ma podstawowe znaczenie w działaniach podejmowanych dla przeciwdziałania infekcjom, szczególnie podklinicznym (1). Wyniki oznaczeń LKS prowadzonych w ramach kontroli użytkowości są też źródłem informacji dla lekarza opiekującego się fermą, wykorzystywanym m.in. przy podejmowaniu decyzji o leczeniu. Dane te również nie są bez znaczenia przy określeniu wartości krowy w przy-



Ryc. 2. Porównanie wyników pomiarów LKS wykonanych w laboratorium AR i kontroli użytkowości
Objaśnienie: * – wartości przeciętne dla badanej grupy w kolejnych miesiącach badań

padkach zakupu lub sprzedaży. Dlatego istotne jest, aby wynik pomiaru komórek somatycznych odzwierciedlał rzeczywistą ich zawartość i nie skutkował błędnymi decyzjami. Stąd organizacja tych badań powinna uwzględniać istniejące zagrożenia i przestrzeganie koniecznych rygorów przy ich wykonywaniu, także ze względu na fakt, że koszty z nimi związane ponoszą hodowcy.

Piśmiennictwo

1. *Anakalo Shitandi, Gathoni Kihumbu*: Assessment of the California mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues. J. Vet. Sci. 2004, 5, 5-9.
2. *Blood D., Henderson J., Rodostis M.*: Veterinary Medicine. ELBS London 1990, s. 501-550.
3. *Blovey R., Edmondson P.*: Mastitis Control in Dairy Herds. Farming Press, Ipswich, UK 1995, s. 77-89.
4. *Chassagne M., Barnouin J., Chacornac J. P.*: Biological predictors for early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. Prev. Vet. Med. 1998, 35, 29-38.
5. *Gröhn Y. T., Eicker S. W., Hertl J. A.*: The association between previous 305-day milk yield and disease in New York state dairy cows. J. Dairy Sci. 1995, 78, 1693-1702.
6. *Jakubczak A., Dziekiewicz M., Kleczkowski M.*: Czynniki mikrobiologiczne mastitis u krów w regionie podlaskim. XII Kongres PTNW, Warszawa 2004, 1, 614.
7. *Malinowski E.*: Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów w Polsce. XII Kongres PTNW, Warszawa 2004, 1, 610.
8. *Malinowski E.*: Znaczenie i profilaktyka mastitis – perspektywy. Życie Wet. 2001, 76, 467-471.
9. *Mrode R. A., Swanson G. J. T.*: Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. Anim. Breed. Abstr. 1996, 64, 847-857.
10. Polska Norma PN-EN-ISO-13366-1: Mleko. Oznaczanie liczby komórek somatycznych. Metoda mikroskopowa.
11. Polska Norma PN-EN-ISO 13366-221: Mleko. Oznaczanie liczby komórek somatycznych. Część 2: Metoda z użyciem elektronicznego licznika cząstek.
12. *Peeler E. J., Green M. J., Fitzpatrick J. L., Morgan K. L., Green L. E.*: Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. J. Dairy Sci. 2000, 83, 2464-2472.
13. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie wymagań weterynaryjnych dla mleka oraz produktów mlecznych z dn. 18.08.2004 r. Dz. U. Nr 188, poz. 1946.
14. *Rupp R., Beaudeau F., Boichard D.*: Relationship between milk somatic-cell in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. Prev. Vet. Med. 2000, 46, 99-111.
15. *Sandholm M.*: Detection of inflammatory changes in the milk, [w:] Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S.: The Bovine Udder and Mastitis. Gummerus, Jyväskylä, Finland 1995, 89-104.
16. *Shook G. E., Schutz M. M.*: Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. J. Dairy Sci. 1994, 77, 648-658.
17. *Skrzypek R.*: Liczba komórek somatycznych w mleku zbiorczym w zależności od czynników organizacyjnych i technologicznych. Medycyna Wet. 2002, 58, 632-635.
18. *Sol J., Sampimon O. C., Hartman E., Barkema H. W.*: Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. Vet. Microbiol. 2002, 85, 241-249.
19. *Zecconi A.*: Intramammary infections and udder defences: the search for a new equilibrium. Flem. Vet. J. 1997, 66, 85-91.

Adres autora: dr Małgorzata Czerw, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: mczerw@ozi.ar.wroc.pl