

## OCENA AKTYWNOŚCI LIZOZYMU W MLEKU JAKO JEDNEGO ZE WSKAŹNIKÓW STANU ZDROWIA WYMIENIA KRÓW

*Andrzej Pietraszek, Ludmiła Janota-Bassalik*

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN Jastrzębiec

Jednym z objawów stanu chorobowego wymienia jest wzrost liczby komórek somatycznych w mleku spowodowany zwiększeniem przepuszczalności naczyń krwionośnych gruczołu mlekowego [15]. Większość komórek somatycznych stanowią leukocyty biorące istotny udział w mechanizmie ochronnym wymienia przed infekcją bakteryjną [15]. Wzrost bakterii w wymieniu może ponadto zależeć od innych czynników obronnych występujących w mleku, jak układ laktoperoksydazy [9, 10], laktoferyna [11], lizozym [18, 20] i immunoglobuliny [3].

Lizozym rozpuszcza ściany komórkowe niektórych bakterii, a jako białko zasadowe przyciągany jest przez ładunki ujemne na powierzchni bakterii. Neutralizacja tych ładunków powoduje zlepianie się komórek bakteryjnych. W związku z tym lizozym przyczynia się do zahamowania wzrostu tych bakterii, których ściana komórkowa nie ulega lizie pod jego wpływem [15]. Zakażenie wymion paciorkowcem bezmleczności powoduje wzrost aktywności lizozymu w mleku [6].

Celem pracy było przeprowadzenie obserwacji nad zmianami aktywności lizozymu w mleku krów zakażonych zarówno gronkowcami jak i paciorkowcami oraz dokonanie oceny aktywności lizozymu jako jednego ze wskaźników stanu zdrowia wymienia.

### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 12 krowach rasy ncb będących w początkowym okresie pierwszej laktacji. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniach na uwięzi, dojono je ręcznie 2 razy dziennie. Krowy żywiono indywidualnie w racjach dziennych wynoszących na krowę 6 kg siana

łąkowego i 3 kg mieszanki B i C. Przed rozpoczęciem eksperymentu nie stwierdzono klinicznych zmian w gruczole mlekowym badanych zwierząt.

Krowy zakażano w 4-7 tygodni po wycieleniu wprowadzając do zatkaności mlekowej, po doju rannym, bakterie odwirowane z 18-godzinnej hodowli bulionowej. Do zakażeń poszczególnych ćwiartek wymion używano komórki *Streptococcus agalactiae* WZHW 801 lub *Staphylococcus aureus* WZHW 74 zawieszane w odtłuszczonej jałowym mleku. Szczepki bakterii stosowane w doświadczeniu były wyizolowane z mleka krów z ostrym stanem zapalnym gruczołu mlekowego.

Próbki mleka do badań pobierano przez 3 dni przed zakażeniem, a po zakażeniu okresowo przez 8 tygodni, z każdej ćwiartki wymienia z rannego doju, po uprzednim umyciu wymienia 1% roztworem sterinolu i strzyków 70% alkoholem.

Analiza mleka: po zdojeniu, z pierwszych porcji mleka każdej ćwiartki wymienia wykonywano terenowy odczyn komórkowy (TOK) metodą Schalma i wsp. [16]. Następne porcje mleka pobrane w warunkach zabezpieczających przed wtórnym zakażeniem używano do oznaczeń laboratoryjnych.

W badaniach mikrobiologicznych próbki mleka wysiewano na podłoże Edwardsa oraz na podłoże T. G. w modyfikacji Sevel i Plommet [17]. Liczbę komórek somatycznych w mleku oznaczano mikroskopową metodą Prescott-Breeda [14]. Stężenie lizozymu w mleku określano za pomocą dyfuzji na żelu agarowym [22], używając *Micrococcus lysodeikticus* (komórki zabite U. V. zliofilizowane) jako organizmu testowego. Stężenie enzymu odczytywano z krzywej wzorcowej, używając jako standardu lizozymu białka jaja kurzego o aktywności 35000 jedn./mg.

Badania kliniczne wymion przeprowadzono po doju rannym wg Kulczyckiego [8].

Analiza krwi: w próbkach surowicy krwi krów oraz w pięciokrotnie zagęszczonym homogenacie leukocytów po uprzedniej hemolizie erytrocytów 1% roztworem saponiny oznaczano za pomocą dyfuzji na żelu agarowym zawartość lizozymu [22].

#### WYNIKI I DYSKUSJA

W mleku krów wykazano obecność lizozymu rozpuszczającego komórki *Micrococcus lysodeikticus*. Lizozym ten różni się budową chemiczną oraz innymi właściwościami od lizozymu w mleku kobiecym i od lizozymu białka jaja kurzego [5]. Ilość lizozymu oznaczona w mleku badanych krów była zbliżona do wartości podawanej przez innych autorów

[4], zgodnie z którymi średnia zawartość lizozymu wynosi 13  $\mu\text{g}$  w 100 ml mleka.

Zakażenie wymion bakteriami chorobotwórczymi spowodowało wzrost zawartości lizozymu. Na podstawie tej obserwacji lizozym można zaliczyć do tych czynników obronnych, które tak jak laktoferyna [21], laktoperoksydaza [7, 13] i immunoglobuliny [25] wzrastają podczas infekcji.

Najwyższa zawartość lizozymu w mleku w drugim dniu po zakażeniu paciorkowcem bezmleczności wynosiła 95  $\mu\text{g}/100$  ml, natomiast w mleku krów zakażonych gronkowcem złocistym wynosiła 319  $\mu\text{g}/100$  ml (tab. 1, 2). Różnice te były prawdopodobnie spowodowane znacznie większym wzrostem gronkowca niż paciorkowca i silniejszym stanem zapalnym. Obserwacja ta jest zgodna z wnioskiem opublikowanym przez autorów na temat zależności wzrostu aktywności lizozymu od liczby patogenów wykrywanych w wymieniu po infekcji [6].

Porównano zmiany zawartości lizozymu w mleku ćwiartek krów równocześnie zakażonych paciorkowcem bezmleczności i gronkowcem złocistym (tab. 3). U krowy 135 wykryto w drugim dniu po zakażeniu 10-krot-

Tabela 1

Wpływ stanu zapalnego wymienia wywołanego infekcją *Streptococcus agalactiae* na wzrost zawartości lizozymu w mleku w drugim dniu po doświadczalnym zakażeniu

Nr krowy	Ćwiartka	Średnia zawartość lizozymu w 3 dni przed zakażeniem [ $\mu\text{g}/100$ ml]	Zawartość lizozymu w drugim dniu po zakażeniu [ $\mu\text{g}/100$ ml]	Charakterystyka stanu zdrowia ćwiartki wymienia		Wyizolowane bakterie chorobotwórcze JTK* w 1 ml mleka	
				TOK	komórki somatyczne [tys./ml]	<i>Str. agalactiae</i>	<i>Staph. aureus</i>
08289	Z	14,9	95,0	++	2912	1470	0
	Z	17,7	60,0	++	1856	1660	0
	N	23,6	27,5	—	256	0	0
373	Z	8,0	11,6	+++	4928	2400	0
	Z	12,0	14,2	+++	6976	560	0
	N	17,5	12,5	—	32	0	0
101	Z	17,6	25,0	++	11524	+	0
	Z	16,4	25,0	++	4768	200	0
	N	16,4	17,5	—	32	0	0
261	Z	25,0	45,8	++	13892	0	0
	Z	31,8	50,0	+++	14464	0	0
	N	25,0	25,0	—	32	0	0

Z — ćwiartka zakażona, N — ćwiartka nie zakażona,

+++ — reakcja wyraźnie dodatnia,

++ — reakcja dodatnia,

+ — obecność komórek *Str. agalactiae* po inkubacji 20 godz. w temp. 37°C.

\*JTK — jednostki tworzące kolonie

Tabela 2

Wpływ stanu zapalnego wymienia wywołanego infekcją *Staphylococcus aureus* na wzrost zawartości lizozymu w mleku w drugim dniu po doświadczalnym zakażeniu

Nr krowy	Ćwiartka	Średnia zawartość lizozymu z 3 dni przed zakażeniem [μg/100 ml]	Zawartość lizozymu w drugim dniu po zakażeniu [μg/100 ml]	Charakterystyka stanu zdrowia éwiartek wymienia		Wyizolowane bakterie chorobotwórcze JTK* w 1 ml mleka	
				TOK	komórki somatyczne [tys/ml]	<i>Str. agalactiae</i>	<i>Staph. aureus</i>
13	Z	5,7	319,3	+++	np	0	75 000
	Z	6,6	319,3	+++	np	0	10 000
	N	6,6	50,0	+	32	0	0
363	Z	18,0	130,00	+++	np	0	2 300
	Z	19,1	100,0	+++	13 248	0	600
	N	18,3	75,0	—	128	0	0
0142	Z	44,0	79,2	+	1 856	0	3
	Z	30,8	105,8	+	576	0	3 200
	N	48,1	83,3	+ / —	32	0	0
320	Z	60,1	180,0	+++	np	0	650
	Z	77,7	163,3	++	7 584	0	1 050
	N	69,3	79,2	—	352	0	0

Z — éwiartka zakażona, N — éwiartka nie zakażona,

+++ — reakcja wyraźnie dodatnia,

++ — reakcja dodatnia,

+ — reakcja słabo dodatnia,

+ / — — reakcja wątpliwa,

np — liczba komórek somatycznych większa niż 200 000 tys.

\*JTK — jednostki tworzące kolonie

nie więcej gronkowca niż paciorkowca, co spowodowało znacznie większy wzrost zawartości lizozymu w mleku éwiartki zakażonej gronkowcem. Szybki zanik bakterii chorobotwórczych po infekcji nie zawsze był związany z równie szybkim spadkiem aktywności lizozymu. Można to było zaobserwować w mleku krów 261 i 207 (tab. 1, 3; rys. 1).

Przeprowadzono porównanie aktywności lizozymu w mleku krów zdrowych zawierających mniej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml mleka i krów chorych charakteryzujących się zwiększoną liczbą komórek somatycznych. Przyjęto w tym przypadku definicję stanu zdrowia wymienia podaną przez International Dairy Federation [23].

Na rysunkach 1-5 przedstawiono zmiany zawartości lizozymu w mleku zdrowych i chorych éwiartek wymienia krów, charakteryzujących się następującym przebiegiem choroby (tab. 4).

Zawartość lizozymu w mleku była uzależniona od stopnia infekcji gruczolu mlekowego (tab. 1, 2, 3). Intensywność procesu zapalnego wpływała na okres, w którym notowano podwyższoną aktywność lizozymu

Tabela 3

Porównanie zmian zawartości lizozymu w mleku ćwiartek wymion krów równocześnie zakażonych *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*

Nr krowy	Ćwiartka	Średnia zawartość lizozymu z 3 dni przed zakażeniem [µg/100 ml]	Zawartość lizozymu w drugim dniu po zakażeniu [µg/100 ml]	Charakterystyka stanu zdrowia ćwiartki wymienia		Wyizolowane bakterie chorobotwórcze JTK* w 1 ml mleka	
				TOK	komórki somatyczne [tys/ml]	Str. <i>agalactiae</i>	Staph. <i>aureus</i>
135	Z	10,0	17,5	+++	6 304	35 000	0
	Z	12,5	100,0	+++	44 064	0	340 000
	N	14,1	10,0	—	224	0	0
59	Z	15,1	100,0	+++	np	4 500	0
	Z	17,5	17,5	+	800	0	0
	N	15,0	17,5	—	64	0	0
207	Z	20,0	75,0	+++	2 048	0	0
	Z	21,3	21,3	—	480	0	0
	N	21,3	21,3	—	0	0	0
455	Z	17,5	10,0	—	576	0	0
	Z	17,5	50,0	++	3 584	0	0
	N	17,5	17,5	—	32	0	0

Z — ćwiartka zakażona, N — ćwiartka nie zakażona,

+++ — reakcja wyraźnie dodatnia,

++ — reakcja dodatnia,

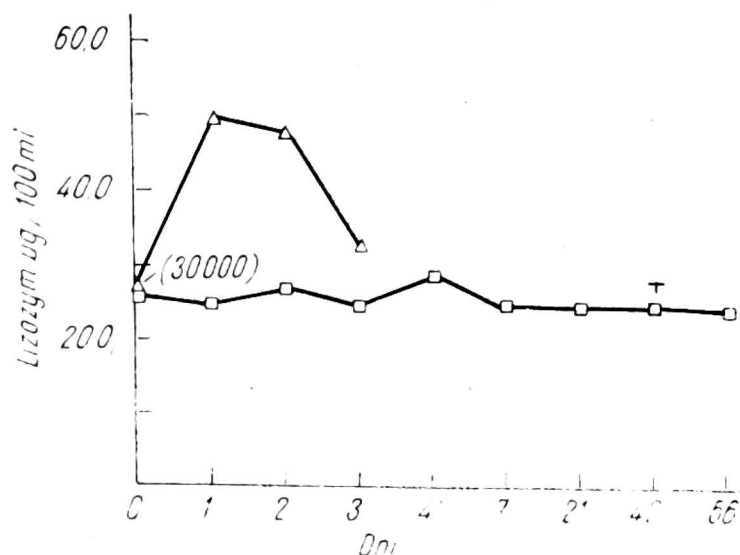
+ — reakcja słabo dodatnia,

np — liczba komórek somatycznych większa niż 200 000 tys.

\*JTK — jednostki tworzące kolonie

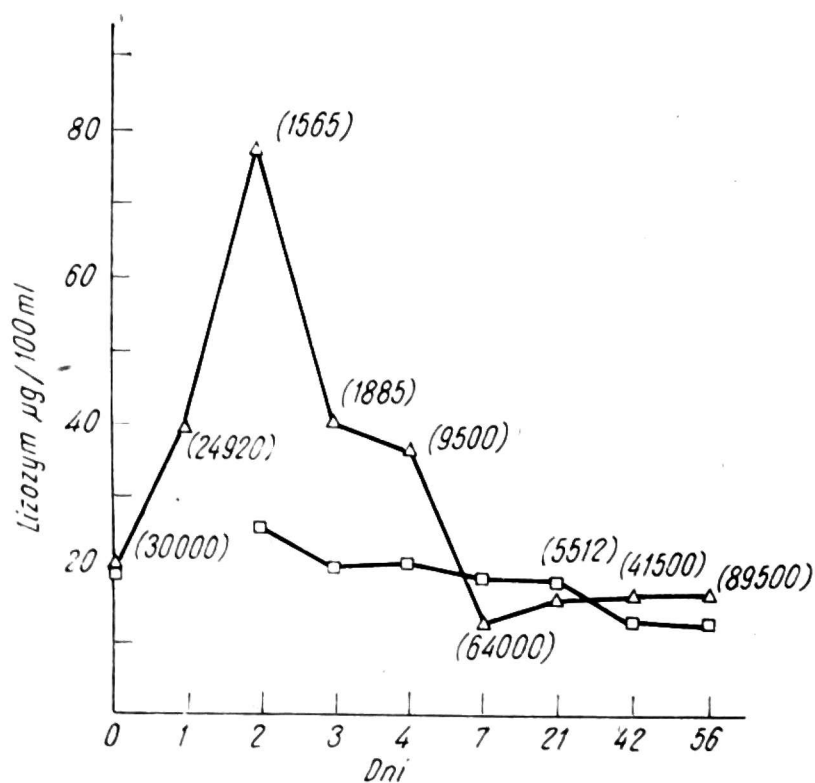
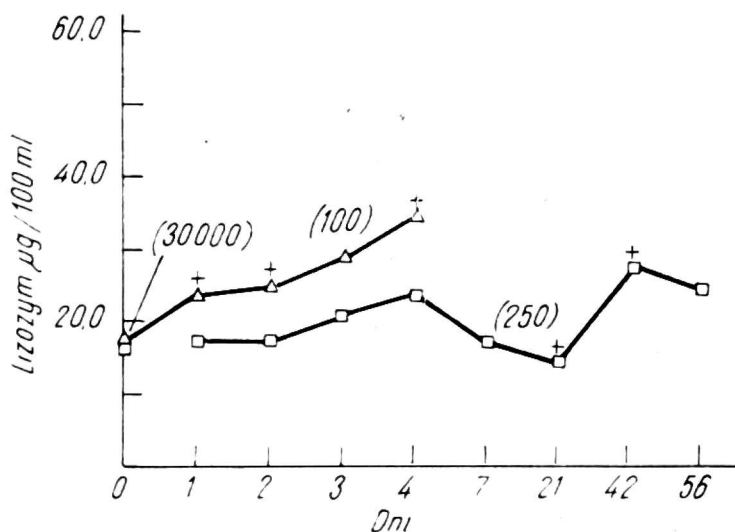
w mleku począwszy od dnia doświadczalnego zakażenia. U krowy 08289 i 363 stan zapalny wymienia spowodował wzrost aktywności lizozymu trwający 4 i 7 dni (rys. 3, 4). Natomiast u krowy 13 ostry kliniczny stan zapalny wymienia, który przeszedł w stan przewlekły, spowodował podwyższoną zawartość lizozymu przez 56 dni (rys. 5). W przypadku krowy 08289 i 363 bakterie chorobotwórcze były wykrywane dłużej niż notowano podwyższenie zawartości lizozymu. Brak danych doświadczalnych nie pozwala wyjaśnić spadku aktywności lizozymu w mleku krów chorych przez długi okres. Należy jednak przypuszczać że spowodowane to jest albo spadkiem syntezy enzymu albo jego unieczynnieniem. U większości organizmów stałocieplnych bogatym źródłem lizozymu są leukocyty [1]. Pierwszą wzmiankę na temat nieobecności lizozymu w leukocytach u krów znaleziono w pracy Padgett i wsp. [12]. W badaniach własnych w homogenacie pięciokrotnie zagęszczonych leukocytów krwi krów nie wykryto aktywności lizozymu. Oznaczono natomiast 300 µg lizozymu w 100 ml surowicy.





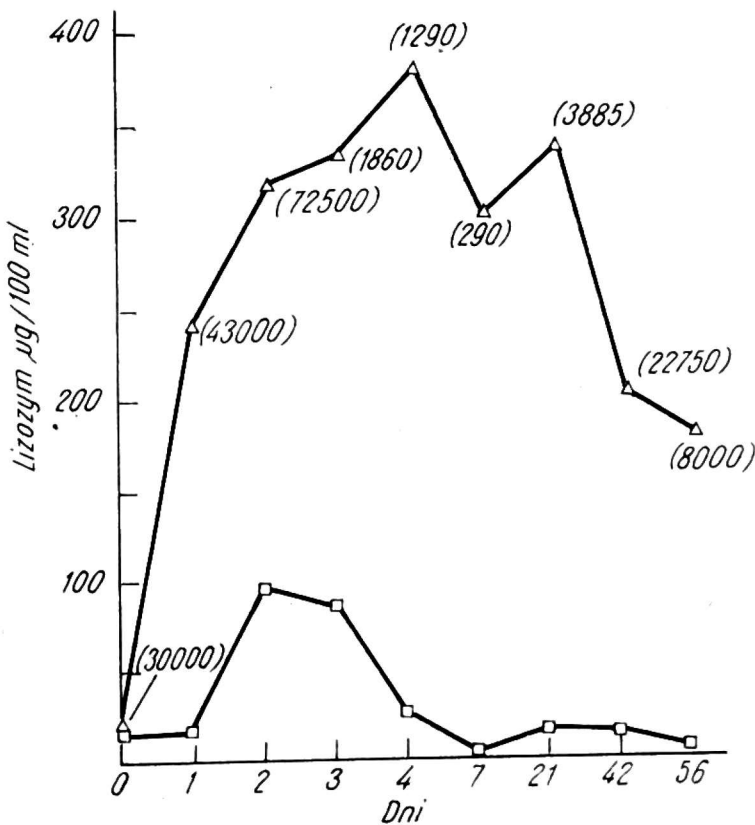
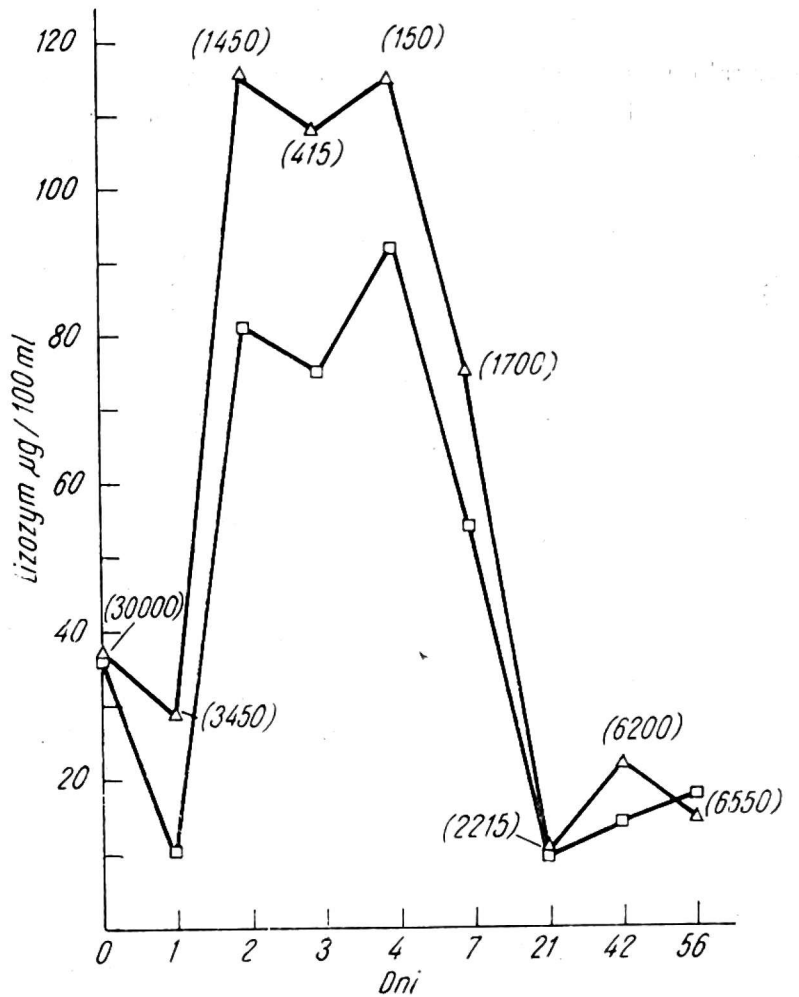
Rys. 1. Zawartość lizozymu w mleku krowy 261, zakażonej *Streptococcus agalactiae*.  $\Delta$  — mleko zawierające więcej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml,  $\square$  — mleko zawierające poniżej 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml, liczba w nawiasie — liczba wyizolowanych komórek *Streptococcus agalactiae* z 1 ml mleka, + — obecność komórek *Streptococcus agalactiae* w mleku po inkubacji przez 20 godz. w temp. 37°C

Rys. 2. Zawartość lizozymu w mleku krowy 101, zakażonej *Streptococcus agalactiae*.  $\Delta$  — mleko zawierające więcej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml,  $\square$  — mleko zawierające poniżej 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml, liczba w nawiasie — liczba wyizolowanych komórek *Streptococcus agalactiae* z 1 ml mleka, + — obecność komórek *Streptococcus agalactiae* w mleku po inkubacji przez 20 godz. w temp. 37°C



Rys. 3. Zawartość lizozymu w mleku krowy 08289 zakażonej *Streptococcus agalactiae*.  $\Delta$  — mleko zawierające więcej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml,  $\square$  — mleko zawierające poniżej 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml, liczba w nawiasie — liczba wyizolowanych komórek *Streptococcus agalactiae* z 1 ml mleka

Rys. 4. Zawartość lizozymu w mleku krowy 363, zakażonej *Staphylococcus aureus*.  $\Delta$  — mleko zawierające więcej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml,  $\square$  — mleko zawierające poniżej 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml, liczba w nawiasie — liczba wyizolowanych komórek *Staphylococcus aureus* z 1 ml mleka



Rys. 5. Zawartość lizozymu w mleku krowy 13 zakażonej *Staphylococcus aureus*.  $\Delta$  — mleko zawierające więcej niż 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml,  $\square$  — mleko zawierające poniżej 500 tys. komórek somatycznych w 1 ml, liczba w nawiasie — liczba wyizolowanych komórek *Staphylococcus aureus* z 1 ml mleka

Tabela 4

Charakterystyka stanu zapalnego ćwiartek wymienia wywołanego infekcją *Streptococcus agalactiae* lub *Staphylococcus aureus* przez okres 8 tygodni po doświadczalnym zakażeniu

Nr krowy	Ocena stanu zdrowia wymienia	Dodatni terenowy odczyn komórkowy dni	Komórki somatyczne >500 tys. dni	Obecność komórek <i>Str. agalactiae</i> dni	Obecność komórek <i>Staph. aureus</i> dni	Okres podwyższonej zawartości lizozymu dni
13	Ostry kliniczny — przewlekły	56	56	0	56	56
363	Podostry — podkliniczny	56	56	0	56	7
08289	Podkliniczny — chroniczny	56	56	56	0	4
101	Utajony — chroniczny	7	4	56	0	4
261	Podrażnienie	7	3	0	0	3

Podobieństwo sekwencji aminokwasów w dużej części łańcucha peptydowego lizozymu i  $\alpha$ -laktoalbuminy [2, 24], która wchodzi w skład systemu syntetyzującego laktozę w gruczole mlekowym krów wskazuje na możliwość wydzielania lizozymu do mleka bezpośrednio z gruczołu.

Aktywność lizozymu waha się nie tylko między próbami mleka różnych krów, lecz między próbami z różnych udojów czy różnych ćwiartek wymienia [19]. Dlatego też przeprowadzono porównanie zawartości lizozymu w próbkach mleka krów doświadczalnych zawierających ponad 500 tys. komórek somatycznych a próbami mleka o mniejszej liczbie komórek somatycznych. Stwierdzono, że średnia zawartość lizozymu w 327 próbkach mleka krów zdrowych wynosiła 29,8  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ , a w 132 próbkach mleka od krów chorych 78,7  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ . Różnice zawartości lizozymu w mleku krów chorych i zdrowych były wysoce istotne ( $P \geq 0,01$ ). Wydaje się, że po zbadaniu zawartości lizozymu w dużej grupie krów produkcyjnych wraz z oceną stanu zdrowia wymienia można będzie ustalić pewne granice wartości lizozymu, który stanowiłby jedno z kryteriów stanu zdrowia wymienia.

#### LITERATURA

1. Barnes J. M.; The enzymes of lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes. Brit. J. Exp. Pathol. 21, 264, 1940.
2. Bres K., Vanaman T. C., Hill R. L.: Comparison of the amino acid of bovine  $\alpha$ -lactoalbumin and hens egg white lysozyme. J. Biol. Chem. 242, 3747, 1967.



3. Butler J. E., Winter A. J., Wagner G. G.: Symposium Bovine Immune System. J. Dairy Sci., 54, 1309, 1971.
4. Chandan R. C., Shahani K. M., Holly R. C.: Lysozyme content of human milk. Nature, 204, 76, 1964.
5. Eitenmiller R. R., Friend B. A., Shahani K. M.: Relationship between composition and stability of bovine milk lysozyme J. Dairy Sci., 59, 834, 1976.
6. Janota-Bassalik L., Piotrowska E., Zajac M., Wojtaszkiewicz M.: Studies upon resistance factors in the mammary gland of the cow. II Lysozyme (muramidase) in cows milk from udder experimentally infected with *Streptococcus agalactiae*. Prace i Mat. Zoot., 8, 125, 1975.
7. Janota-Bassalik L., Zajac M., Pietraszek A., Piotrowska E.: Bacteriostatic activity in cows milk from udders infected with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*. Acta Microbiol. Polon. 4, 1977.
8. Kulczycki J.: Wymię krowy i jego najważniejsze schorzenia Wet. Inst. Wyd. Lublin, 1948.
9. Mickelson M. N.: Effect of lactoperoxidase and thiocyanate on the of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined culture medium. J. Gen. Microbiol. 43, 3, 1966.
10. Oram J. D., Reiiter B.: The inhibition of streptococj by lactoperoxidase, thiocyanate and the nature of the inhibitory compound. Biochem. J. 100, 382, 1966.
11. Oram J. D., Reiter B.: Inhibition of bacteria by lactoferin and other iron-chelating agents. Bioch. Biophys. Acta, 170, 351, 1968.
12. Padgett G. A., Hirsch J. G.: Lysozyme: its absence in tears and leucocytes of cattle. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 45, 569, 1967.
13. Pietraszek A., Piotrowska E., Jędra M., Zagulski T., Witkowski A. Janota-Bassalik L.; Niektóre układy enzymatyczne mleka hamujące wzrost bakterii chorobotwórczych w gruczole mlecznym krów. XVIII Zjazd Pol. Tow. Microbiol, Lublin, 1975.
14. Prescott S. C., Breed R. S.: The determination of the number of body cell in milk by a direct method. J. Inf. Dis., 7, 632. 1910.
15. Schalm O. W., Carrol E. J., Jain N. C.: Bovine Mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia, 1971.
16. Schalm O. W., Norrland D. O.; Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. J. Am. Vet. Med. Ass., 130, 199, 1957.
17. Sevel B., Plommet M.: Adaptation d'un milieu selectif a l'isolement des *staphylocoques* de mammite. Application en diagnostic detable. Lait, 40, 2, 1960.
18. Shahani K. M.: Milk enzymes: their role and significance J. Dairy Sci., 49, 907, 1966.
19. Shahani K. M., Chandan R. C., Kelly P. L., MacQuiddy E. L.: Determination of lysozyme in milk and factors affecting its concentration and propertis. 16th Inter. Dairy Congr. 8, 285, 1962.
20. Smith V. R.; Physiology of Lactation. Ed. Constable and Comp., LTD London, 1959.
21. Smith K. L., Harmon R. J., Feguson L. C., Schenbacher F. L.: Concentration of lactoferrin in milk and changes during bovine mastitis. Dairy Res. Develop., August, 10, 1974.
22. Ślopek S.: Immunologia praktyczna. PZWL, Warszawa, 1970.
23. Tolle A.: A monograph on bovine mastitis. I Economics, aetiology and diagnosis. Ann. Bull. Dairy Fed., 2, 3. 1971.
24. Warne P. K., Momary F. A., Rumball S. V., Tuttle R. W., Scherage H. A., Com-

- putation of structures of homologous proteins  $\alpha$ -lactoalbumin from lysozyme. *Biochem.*, 13, 768, 1974.
25. Zając M., Piotrowska E., Pietraszek A., Witowski A., Janota-Bassalik L., Immunoglobuliny w mleku krów zakażonych *Staphylococcus aureus*. XVIII Zjazd Pol. Tow. Mikrobiol. Lublin, wrzesień, 1971.

A. Петрашек, Л. Янота-Бассалик

## ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЛИЗОЗИМА В МОЛОКЕ КАК ОДНОГО ИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗДОРОВЬЯ ВЫМЕНИ КОРОВ

### Резюме

В молоке опытных коров обнаружено наличие лизозима растворяющего клетки *Micrococcus lysodeikticus*. Его содержание в молоке было обусловлено степенью заражения молочной железы и продолжительностью болезни. Сравнивали активность лизозима в 327 образцах молока здоровых коров, содержащих меньше чем 500 тыс. соматических клеток в 1 мл и в 132 образцах молока коров с высшим количеством соматических клеток. Активность лизозима составляла соответственно 29,8  $\mu\text{g}$  и 78,7  $\mu\text{g}$  на 100 мл молока. Вышеуказанные различия были высоко-существенными ( $P > 0,01$ ). В лейкоцитах изолированных из крови коров не выявлено активности лизозима, тогда как установлено 300  $\mu\text{g}$  лизозима в 100 мл сыворотки крови.

A. Pietraszek, L. Janota-Bassalik

## ESTIMATION OF LYSOZYME ACTIVITY IN MILK AS ONE OF THE HEALTH STATE INDICES OF UDDER OF COWS

### Summary

In milk of experimental cows the occurrence of lysozyme dissolving the *Micrococcus lysodeikticus* cells has been proved. Its content in milk depended on the mammary gland infection degree and the disease duration. A comparison of the lysozyme activity in 327 milk samples of healthy cows, containing less than 500 thous. of somatic cells in 1 ml and in 132 milk samples of cows containing higher numbers of somatic cells was carried out. The lysozyme activity was accordingly 29.8 and 78.7  $\mu\text{g}$  per 100 ml milk. The above differences were highly significant ( $P > 0.01$ ). In leucocytes isolated from blood of cows no lysozyme activity was detected, while 300  $\mu\text{g}$  of lysozyme were found in 100 ml of blood serum.