
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXIII, 39

SECTIO EE

2005

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

MAGDALENA POPIOŁEK-PYRZ

*Ocena porównawcza skuteczności działania
wybranych preparatów dezynfekcyjnych
wobec szczepów E. coli izolowanych z gruczołu mlekowego
owiec w badaniach in vitro**

A Comparative Assessment of Chosen Disinfecting Preparations in Relation
to E. Coli Strains Isolated from a Sheep Mammary Gland *in vitro* Examination

Stale rosnące wymogi higieniczno-sanitarne w produkcji zdrowej żywności wiążą się z koniecznością stosowania preparatów dezynfekcyjnych. Stają się one niezastąpione zarówno w trakcie pozyskiwania, jak i przetwarzania mleka. Nie dopuszczają bowiem do szerzenia się infekcji wtórnych gruczołu mlekowego, a także obniżają straty ekonomiczne, wynikające z psucia się wyrobów mleczarskich. Wysoki poziom higieny, czystości fizycznej oraz mikrobiologicznej urządzeń udojowych, schładzalników do mleka, cystern i instalacji przepompowujących zapewnia nie tylko dezynfekcja, ale coraz częściej tzw. sanityzacja, którą przeprowadza się preparatami myjącymi z dodatkiem substancji bakterio-bójczych [2].

Dezynfekcja strzyków w roztworach odpowiednio przygotowanych preparatów spełnia podstawową rolę w zapobieganiu infekcji u krów. Rozróżnia się dezynfekcję przeddojową (*predipping*) i podojową (*postdipping*). Celem jest zniszczenie drobnoustrojów (bakterie, grzyby), które znajdują się na skórze strzyka. Skuteczny *postdipping* likwiduje też drobnoustroje w kropli mleka zalegającego w kanale. Tworzy się przy tym, w zależności od składu i konsystencji użytego płynu, pewien rodzaj aseptycznego korka, co zapobiega penetracji bakterii ze środowiska do wnętrza wymienia. Skutkiem jest ograniczenie zakażeń w czasie, kiedy mięsień zwieracz nie zamyka jeszcze kanału strzykowego, a

* Praca wykonana w ramach tematu 3PO6Z 057 24 finansowanego przez KBN, nr zezwolenia Lokalnej Komisji Etycznej 231/2001

nabłonek nie wytwarza naturalnych składników przeciwbakteryjnych, tj. w ciągu dwu pierwszych godzin po doju. Efektywne dezynfekanty ograniczają zakażenia spowodowane przez bakterie gram-dodatnie, w tym *Staph. aureus* i *Str. agalactiae*, należące do grupy „zakaźnych”. Do praktyki wprowadzono wiele preparatów różniących się składnikami aktywnymi, ich stężeniem oraz kompozycją podłoża. Do dezynfekcji przeddojowej nadają się odpowiednio niższe stężenia tych samych preparatów.

Przeddojowa i podojowa dezynfekcja wymienia nie rozwiązuje wszystkich problemów. Może też tworzyć nowe zagrożenia. *Dipping* nie zapobiega infekcjom czynnikami (drobnoustrojami) środowiskowymi, w tym *Escherichia coli* i *Str. uberis*. Obserwacje naukowców i praktyków upoważniają do sugestii, że nieograniczone stosowanie środków dezynfekcyjnych prowadzi do zaburzeń funkcji obronnych i wzrostu zakażeń. Z tego powodu Lam i wsp. proponują nawet okresową rezygnację z „dipingu” w stadach z niską liczbą komórek, co może ograniczyć odsetek *colimastitis* [5].

Ostatnio można zaobserwować wyraźną ewolucję w technologii utrzymania higieny w przemyśle mleczarskim. Proces ten stymulowany jest rosnącymi wymaganiami nowoczesnych procesów technologicznych, jak również oczekiwaniami klientów oraz wymaganiami normatywnymi dotyczącymi coraz wyższych standardów higienicznych. Nowoczesne oprzyrządowanie umożliwia z kolei ściśle monitorowanie czystości mikrobiologicznej linii technologicznych i produktów. Nakładają się na to również ograniczenia związane z obciążeniami kosztów produkcji. Te wszystkie elementy stymulują stopniowe zmiany w kierunku optymalizacji stosowanych metod i środków do mycia i dezynfekcji [8].

Zagadnienia związane z dezynfekcją w produkcji mleka krowiego są przedmiotem szerokiego i stałego zainteresowania producentów i przetwórców. Stosowanie środków dezynfekcyjnych w produkcji, pozyskiwaniu i przetwarzaniu mleka owczego jest w Polsce zagadnieniem wymagającym poświęcenia szerszej uwagi. Produkcja mleka, a także wyrobów mlecznych, takich jak bundz i oscypki, często wymyka się spod nadzoru sanitarno-higienicznego. Nie jest to jednak problem, który można traktować marginalnie, zwłaszcza w dobie funkcjonowania rynku mleka w świetle przepisów Unii Europejskiej.

Escherichia coli jako drobnoustrój środowiskowy jest czynnikiem patogenym dla gruczołu mlekowego zarówno krów, jak i owiec. W przebiegu *colimastitis* gwałtownie powstają nieodwracalne zmiany w gruczole mlekowym i całym organizmie. Stąd też w wypadku niepodjęcia leczenia, a także leczenia niewłaściwie prowadzonego lub zbyt późno rozpoczętego dochodzi do trwałej utraty mleczości w zajęтым procesem chorobowym płacie wymienia. Nierzad-

ko, ze względu na ciężkie zaburzenia w stanie zdrowia, zachodzi konieczność kierowania chorych zwierząt do uboju [3].

Celem pracy była ocena skuteczności środków dezynfekcyjnych wobec szczepów *Escherichia coli*, izolowanych z gruczołu mlekowego owiec. W badaniach *in vitro* poddano ocenie preparaty dezynfekcyjne dostępne na krajowym rynku, posługując się metodą cylinderkową.

MATERIAL I METODY

Materiałem badawczym były cztery preparaty dezynfekcyjne, których nazwy handlowe zakodowano odpowiednio: A, B, C, D (nazwy środków dostępne u autorki).

A: preparat o działaniu bakteriobójczym (łącznie z prątkami gruźlicy), grzybobójczym, wirusobójczym (inaktywuje HBV, HIV). Stosowany do odkażania rąk i skóry. W skład preparatu wchodzi: 2 – propanol, diglikanian chlorheksydyny, nadtlenek wodoru 30%, estry polioksoetylenoglicerolu z kwasami tłuszczowymi, substancja zapachowa, woda oczyszczona. Odczyn preparatu mieści się w granicach 6,5–7,5.

B: preparat jodoforowy w postaci płynu do kąpieli poudojowej strzyków. Działa bakterio- i grzybobójczo. Składniki preparatu działają kojąco na spękaną skórę, stymulują proces gojenia się i zmniejszają możliwość występowania *mastitis*. Substancje zmiękczające i pielęgnujące sprawiają, że strzyki są miękkie i elastyczne. Używany do kąpieli poudojowej strzyków i profilaktyki *mastitis*. Skuteczność bakteriobójczą tego preparatu wyznacza poziom wolnego jodu, który wynosi 0,15% oraz substancji zmiękczających.

C: preparat posiada właściwości odkażające i pielęgnacyjne, sprawiające że strzyki są giętkie i miękkie. W skład wchodzi LAS (kwas dodecylobenzosulfonowy) 1,9% oraz substancje zmiękczające 12%.

D: środek aktywny wobec bakterii i grzybów, nie zawiera jodu i odtłuszcza skórę. W 100 g roztworu jest: 46,0 g etanolu (96%), 27,0 alkoholu izopropylowego, 1,0 g alkoholu benzylowego, 0,1 g nadtlenu wodoru. Roztwór gotowy do użycia przeznaczony jest do odkażania skóry. Preparatu nie należy stosować do odkażania błon śluzowych oraz w bezpośredniej bliskości oczu. Nie zaleca się stosowania do odkażania ran. Jakiegokolwiek działania uboczne nie są dotąd znane. Jest to środek łatwopalny.

Do określenia stref hamowania wzrostu (shw) użyto szczepów bakterii *Escherichia coli*. Szczepy pochodziły z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego owiec, będących własnością Rolniczej Spółdzielni Produkcyjnej „Płomień” w Milówce, woj. śląskie. Identyfikacji szczepów dokonano na podstawie programu komputerowego API. Szczepy bakterii przechowywano na płytkach z agarem wzbogaconym. Badanie przeprowadzono metodą cylinderkową według Malinowskiego w modyfikacji Witkowskiej [10].

Oznaczenia wykonywano na płytkach Petriego o średnicy 100 mm. Do przygotowania jednej płytki używano 14 ml 2% agaru wzbogaconego („Biomed”), do którego po ostudzeniu do temperatury 48°C dodawano 0,02 ml 18-godzinnej hodowli bulionowej badanego szczepu. Po wymieszaniu agar wylewano na płytkę. Na zastygłe płytki stawiano cylinderki o wymiarach 10x6 mm wykonane ze stali nierdzewnej i kwasoodpornej (1 H 18 N 9 T), które napełniano 0,3 ml badanego roztworu środka odkażającego w odpowiednim rozcieńczeniu. Stosowano 25%, 50%, 75% oraz 100% roztwory. Łącznie wykonano 140 oznaczeń. Po napełnieniu cylinderków płytki inkubowano

w temperaturze 37°C przez 18 godzin, a następnie oceniano wielkości strefy hamowania wzrostu. Dla każdego z preparatów w odpowiednim stężeniu wyliczono średnią ze średnic stref hamowania wzrostu. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie rycin.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

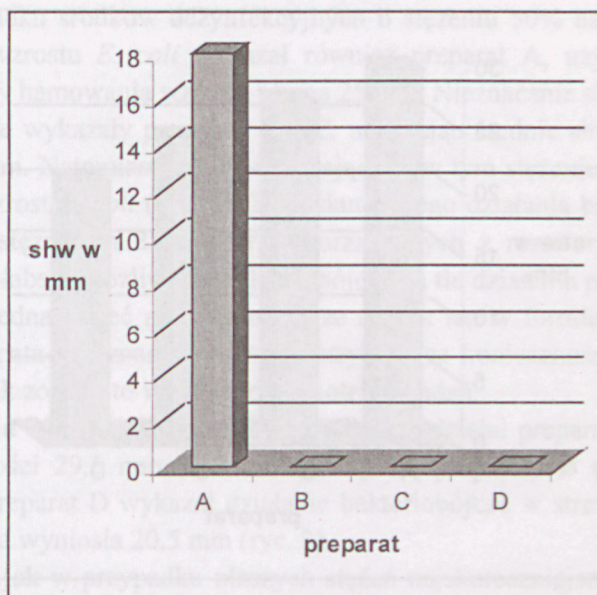
Profilaktyka oparta na stosowaniu preparatów dezynfekcyjnych ma na celu ograniczenie mikroflory patogennej dla gruczołu mlekowego. Istnieje wyraźny związek *mastitis* z obniżeniem produkcji mleka, pogorszeniem jego jakości. Efektem ekonomicznym zapaleń gruczołu mlekowego są rosnące koszty rozpoznania i leczenia, dodatkowe nakłady pracy oraz ponadplanowe wydatki, związane z remontem stada [3].

Najskuteczniejszym sposobem zapobiegania zakażeniom wymion jest dezynfekcja strzyków, wykonywana przed i po doju. Jednak nie wszystkie środki dezynfekcyjne jednakowo działają i są jednakowo skuteczne przy zapobieganiu chorobom. Malinowski stwierdza, że środek dezynfekcyjny dobrej jakości powinien posiadać szerokie spektrum przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Przy tym nie może szkodzić zwierzętom, powinien cechować się wydajnością, łatwym zastosowaniem, nie powinien wpływać na smak i zapach produktów spożywczych. Ponadto musi być szybki i silny w działaniu biobójczym [1, 4]. Środki dezynfekcyjne muszą gwarantować skuteczność i bezpieczeństwo, czego dowodem jest Atest Państwowego Zakładu Higieny lub wpis do Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych [7].

Obecnie na polskim rynku pojawia się dużo środków odkażających o różnym składzie i efektywności, opracowanych dla potrzeb medycznych, które mogą znaleźć również zastosowanie w weterynarii [9]. Do praktyki wprowadzono środki zawierające połączenie jodu, chloru, kwasów organicznych, pochodnych kwasów dodecylosulfonowych, czwartorzędowych zasad amonowych i chlorheksydyny. Jodofory są najbardziej aktywne przy pH kwaśnym, podczas gdy chlorheksydyna jest bardziej aktywna w pH alkalicznym. Niektóre jodofory zawierające detergenty mogą powodować wysuszenie skóry strzyków, dlatego wprowadzono dodatki zmiękczające [6].

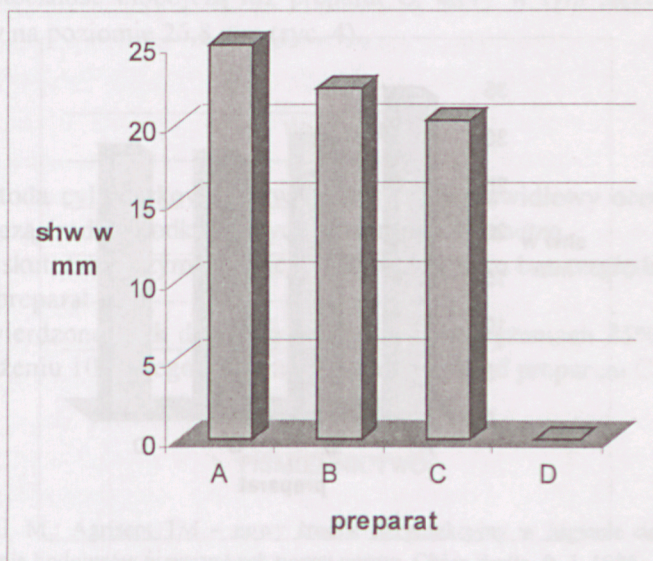
Niniejsze badania przeprowadzone zostały przy użyciu czterech preparatów. Dwa z nich: preparat B i C stosowane są do pielęgnacji i odkażania wymion i strzyków, natomiast A i D mogą być stosowane do odkażania skóry, także przed iniekcjami i punkcjami.

Aktywność bakteriobójcza preparatów dezynfekcyjnych w odniesieniu do szczepów bakteryjnych *E. coli*, mierzona średnicą strefy hamowania wzrostu (w mm), przedstawia się następująco. W stężeniu 25% działanie bakteriobójcze wykazał tylko preparat A (18 mm). Preparaty B, C i D nie wykazały działania wobec danych szczepów (ryc. 1).



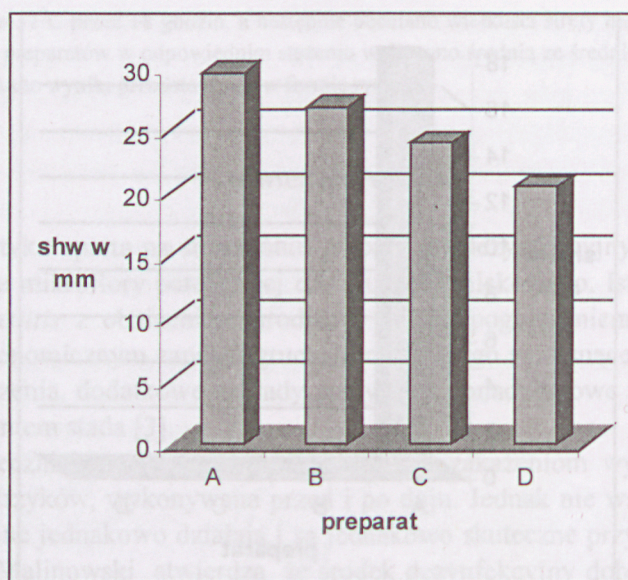
Ryc. 1. Strefy hamowania wzrostu (shw) szczepów *E. coli* (w mm) przez preparaty w stężeniu 25%; A, B, C, D – preparaty dezynfekcyjne

The diameter of growth inhibition (in mm) of *E. coli* strains by preparations in the concentration levels of 25% s



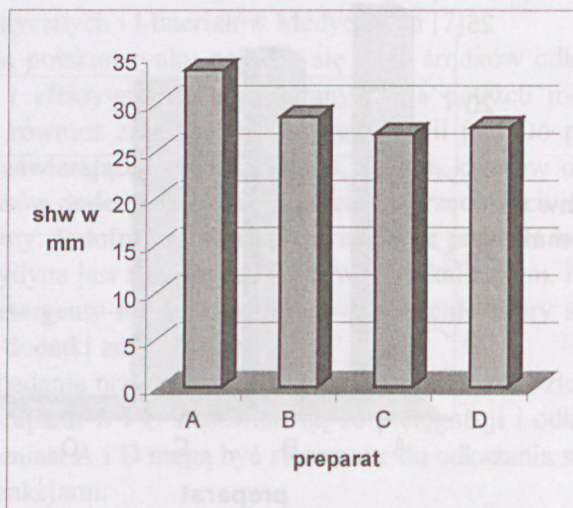
Ryc. 2. Strefy hamowania wzrostu (shw) szczepów *E. coli* (w mm) przez preparaty w stężeniu 50%

The diameter of growth inhibition (in mm) of *E. coli* strains by preparations in the concentration levels of 50%



Ryc. 3. Strefy hamowania wzrostu (shw) szczepów *E. coli* (w mm) przez preparaty w stężeniu 75%

The diameter of growth inhibition (in mm) of *E. coli* strains by preparations in the concentration levels of 75%



Ryc. 4. Strefy hamowania wzrostu (shw) szczepów *E. coli* (w mm) przez preparaty w stężeniu 100%

The diameter of growth inhibition (in mm) of *E. coli* strains by preparations in the concentration levels of 100%

W przypadku środków dezynfekcyjnych o stężeniu 50% największą strefę hamowania wzrostu *E. coli* wykazał również preparat A, uzyskując średnią średnicę strefy hamowania wzrostu równą 25 mm. Nieznacznie słabsze działanie bakteriobójcze wykazały preparaty B i C, uzyskując średnie shw odpowiednio 22,5 i 20,2 mm. Natomiast środek odkażający D w tym stężeniu nie działał hamująco na wzrost *E. coli* (ryc. 2). Brak skutecznego działania biobójczego preparatu D w stężeniach 25% i 50% sporządzonych z roztworu oryginalnego wskazuje na słabsze możliwości bakteriobójcze na tle działania preparatów A, B i C. Należy jednak mieć na uwadze to, że środek ten w formie produkowanej przez producenta przeznaczany jest do użytku bez konieczności sporządzania roztworów, jak zostało to wykonane dla potrzeb badań.

W stężeniu 75% najaktywniej bakteriobójczo działał preparat A, uzyskując shw o wielkości 29,5 mm. Słabsze okazały się preparaty B (26,8 mm) i C (24,0 mm). Preparat D wykazał działanie bakteriobójcze w strefie hamowania, której średnica wyniosła 20,5 mm (ryc. 3).

Podobnie jak w przypadku niższych stężeń najskuteczniejszym preparatem w stężeniu 100% okazał się środek odkażający A. Natomiast preparaty B, C i D wykazały słabsze działanie bakteriobójcze względem szczepów *E. coli*. Preparat A w stężeniu 100% uzyskał średnią strefę hamowania o średnicy 33,5 mm. Zaznaczyć jednak należy, iż w stężeniu 100% środek dezynfekcyjny D wykazał wyższą skuteczność biobójczą niż preparat C, który w tym stężeniu osiągnął średnią shw na poziomie 26,8 mm (ryc. 4).

WNIOSKI

1. Metoda cylinderkowa pozwala w sposób prawidłowy ocenić zdolność bakteriobójczą środków odkażających w warunkach *in vitro*.
2. Najskuteczniejszym środkiem dezynfekcyjnym bez względu na stężenie okazał się preparat A.
3. Stwierdzono brak działania preparatu D w stężeniach 25% i 50%, jednakże w stężeniu 100% jego aktywność była wyższa od preparatu C.

PIŚMIENNICTWO

1. Branicki M.: Agrisept TM – nowy środek dezynfekcyjny w higienie doju, spełniający oczekiwania hodowców w warunkach nowej normy. Chów Bydła, 9, 7, 1998.
2. Jureczak M.: Mleko – produkcja, badanie, przerób. SGGW, Warszawa 1999.
3. Malinowski E.: Przyczyny, leczenie, i zapobieganie *mastitis* u krów. PIWet., Puławy 1997.

4. Malinowski E.: Znaczenie dezynfekcji wymienia i rodzaje środków. Med. Wet., 11, 710, 2000.
5. Malinowski E., Kłossowska A.: Stan zdrowia wymienia krów punktem krytycznym w produkcji mleka. Przegl. Mlecz., 9, 308, 2000.
6. Malinowski E., Kłossowska A., Kuźma K., Kaczmarowski M.: Przydatność preparatu „Teta” do podojowej dezynfekcji strzyków u krów. Przegl. Mlecz., 2, 216, 2003.
7. Mikołajczyk A., Szteyn J.: Problemy mycia i dezynfekcji urządzeń udojowych. Przegl. Hod., 12, 9, 1997.
8. Piechowiak J., Hreczek W.: Ewolucja technologii mycia w przemyśle mleczarskim. Przegl. Mlecz., 3, 93, 2003.
9. Wiśniewski J., Rotkiewicz T., Rotkiewicz Z., Święch-Grabowska G., Wiśniewski M., Bomba G.: Przydatność preparatów Lyzoformin 3000, Trichlor i Desoform do dezynfekcji w obiektach produkcji zwierzęcej. Życie Wet., 71, 348, 1996.
10. Krukowski H., Majewski T., Popiołek M., Witkowska M.: Próba zastosowania metody cylinderekowej do oceny preparatów dezynfekcyjnych. Mat. Symp. Nauk. „Problemy higieny w ekologizacji rolnictwa” Wyd. Fundacja „Rozwój SGGW”, 32, 1997.

SUMMARY

A comparative assessment was performed of the effectiveness of disinfecting preparations towards *E. coli* strains isolated from the sheep mammary gland. The study material comprised four disinfectants with their brand names coded respectively A, B, C and D. The method of radial diffusion in the agar gel was adopted in the study. This method facilitated an accurate assessment of the bactericidal effectiveness of the disinfectants *in vitro*. The most effective, irrespective of the concentration level, was disinfectant A. Disinfectant D showed no effectiveness with the concentration level of 25% and 50%; however, with 100% concentration its effectiveness was higher than that of disinfectant C.