

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**

**Domeniul Medicină Veterinară
Specializarea Microbiologie - Imunologie**

**„CERCETĂRI PRIVIND CITOMORFOLOGIA
LAPTELUI DE VACĂ, OAI E ȘI CAPRĂ ȘI CALITATEA
IGIENICĂ A ACESTUIA”**

**Teză pentru obținerea titlului de „Doctor în științe”
Domeniul Medicină veterinară**

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. CARP – CĂRARE MIHAI**

**Doctorand,
VOICU (UNGUREANU) ELENA**

Iași - 2009

REZUMAT

Laptele reprezintă un produs al secreției glandei mamare și constituie din punct de vedere fizico-chimic, un sistem dispers eterogen, în care lactoza și sărurile minerale formează soluții adevărate, substanțele proteice se găsesc în stare coloidală iar grăsimea sub formă de emulsie. În laptele crud, imediat după mulgere toate aceste componente constituie un amestec omogen.

De mult timp, numeroase statistici acceptă consumul de lapte pe cap de locuitor ca pe un indicator de bună stare și prosperitate.

Prin elementele pe care le conține, laptele reprezintă un aliment complet, fiind alimentul ideal al nou-născuților în primele luni de viață și recomandat copiilor și adulților indiferent de vârstă, condiții de lucru și cu puține excepții, de starea de sănătate. Din această cauză laptele a fost denumit „sângele alb” sau „elixirul vieții și al sănătății copiilor,, Aceasta se datorește faptului că el conține aproape toate substanțele necesare organismului uman și animal, într-o formă ușor asimilabilă.

Se profilează tot mai mult preocuparea consumatorilor spre a prefera un lapte care să nu satisfacă doar dezideratul cantitativ, ci mai ales calitatea igienică (starea de sănătate).

Se acceptă să fie consumat numai acel lapte care se încadrează în limita unui număr determinat de germeni, în limita unui număr stabilit de celule, a unui lapte fără adaos de apă, cu valori bine precizate de aciditate, etc.

Toate aceste condiții nu s-au impus cu ușurință, fiind nevoie de o legislație restrictivă, fundamentată științific, care să convingă atât pe producători, cât și pe procesatorii de lapte, că indicatorii de calitate igienică trebuie să treacă obligatoriu înaintea indicilor de cantitate, când este vorba de consum de lapte și sănătate.

Pentru a stabili calitatea laptelui în funcție de numărul celulelor somatice și a numărului total de germeni din lapte, este necesar să fie identificați factorii ce au influență asupra conținutului lor în lapte și, totodată, care sunt pierderile economice pe care le provoacă nivelul ridicat al acestor celule și germeni.

Teza este alcătuită din două părți distincte. În prima parte, **Stadiul actual al cunoașterii**, redactată în 3 capitole cuprinzând 58 de pagini, pe baza datelor bibliografice, se face o sinteză a literaturii de specialitate privind stadiul actual al cunoașterii în tematica cercetată. Între acestea sunt cuprinse referințe cu privire la morfofiziologia glandei mamare (**capitolul I**), numărul total de germeni (**capitolul II**), numărul de celule somatice (**capitolul III**) și la factorii care influențează acești parametri.

Glanda mamară și funcția ei constituie un extraordinar model biologic, pentru că face posibil studiul organogenezei, relațiilor funcționale între diferitele tipuri de celule,

mecanismele secreției, transmiterii mesajelor hormonale (în special a prolactinei), a receptorilor hormonal, controlului expresiei genetice, metabolismului și comportamentului matern, a mecanismelor imunologice de protecție a mamei și a noului născut.

Importanța numărului total de germeni și a numărului de celule somatice pentru sănătatea glandei mamare și implicit a calității igienice a laptelui s-a conturat relativ târziu, și a intrat în prezent în rândul indicilor de calitate igienică a laptelui destinat consumului uman.

Partea a 2-a “Cercetări proprii” este redactată pe parcursul a 5 capitole, cuprinzând **157** pagini și abordează: scopul și obiectivele cercetării, dinamica nivelului individual al **NTG –ului** din lapte la populațiile de taurine, ovine și caprine, dinamica nivelului individual al **NCS –ului** din lapte, la populațiile de taurine, ovine și caprine, expresia citomorfologică a NCS-ului în populațiilor de taurine, ovine, caprine monitorizate.

În **capitolul IV** intitulat “*Scopul și obiectivele cercetării*” se prezintă importanța studierii parametrilor, număr de celule somatice și număr total de germeni, din punct de vedere a calității igienice a laptelui și obiectivele propuse pentru atingerea scopului urmărit.

În **capitolul V** “*Dinamica nivelului individual al NTG –ului din lapte, la populațiile de taurine, ovine, caprine*” a fost descris materialul biologic cercetat, reprezentat de probe de lapte mulse individual provenite de la taurine, ovine și caprine. Cercetările s-au desfășurat în județele Suceava și Iași. Pentru fiecare specie s-au luat în studiu câte două populații de animale crescute și exploatate în condiții similare.

S-au prezentat de asemenea metodele de lucru, clasică și modernă.

Pentru determinarea prin metoda rapidă a numărului total de germeni, pe eșantioanele de lapte provenite de la taurine s-a folosit aparatul **Bactocount 50**.

Pentru probele de lapte provenite de la capră și oaie s-a utilizat aparatul **BactoCount IBCm**.

Datele obținute în urma analizelor de laborator au fost prelucrate statistic. Pentru prelucrarea statistică s-a utilizat programul S.A.V.C. (Statistica, Analiza Varianței și Covarianței) elaborat în perioada 2000 – 2003 de Conf. Dr. Vasile Maciuc de la Facultatea de Zootehnie USAMV Iași.

Pentru determinarea numărului total de germeni s-au recoltat câte 2 probe lunar, 1200 de probe provenite de la taurine, 652 de la ovine și 664 de la caprine.

Analiza rezultatelor obținute evidențiază că din cele 1200 de probe de la **taurine**, un număr de 1080 (90 %) probe se încadrează în norma recomandată (100000 germeni/ml), iar restul de 120 (10%) probe sunt improprii pentru consumul uman.

Cele mai scăzute valori se observă în lunile de iarnă, iar cele mai crescute în lunile de vară.

Pentru eşantioanele de lapte provenite de la **ovine**, în urma analizei valorilor mediei lunare și a estimărilor variabilității numărului total de germeni, reiese faptul că laptele provenit de la animalele luate în studiu este, în general, un „lapte sănătos”, pentru că numărul mediu de germeni găsit este sub pragul de 1500×10^3 germeni /ml.

Din totalul de 652 de probe, un număr de 49 (7,51%) probe au depășit limitele numărului total de germeni, restul de 603 (92,4%) probe fiind admise pentru consumul uman.

Deși valorile medii se încadrează în limitele unui lapte considerat sănătos, există probe ale căror analize au arătat un conținut în număr de germeni foarte ridicat. Aceste valori au semnalizat, de regulă, existența unor animale bolnave în efectivele de animale. După ce au fost tratate animalele depistate bolnave, în zilele următoare a scăzut și numărul de germeni din lapte.

În ceea ce privește probele de lapte de la **caprine**, în urma analizei rezultatelor obținute prin prelucrarea datelor, se constată că numărul total de germeni calculat lunar a înregistrat valori inferioare față de limita admisă (1500×10^3 germeni / ml).

Din totalul de 664 de probe, un număr de 44 (6,62%) probe depășesc limita normală (1500×10^3 germeni/ml), restul de 620 (93,37%) probe încadrându-se valorilor Ordinului nr. 682 /2006 (1500×10^3 germeni /ml)

În **capitolul VI** s-a urmărit determinarea numărului de celule somatice (**NCS-ului**) din laptele provenit de la populațiile de taurine, ovine și caprine.

Determinarea numărului de celule somatice din lapte s-a realizat atât prin metoda clasică, cât și cea modernă.

Numărul de celule somatice pentru laptele de vacă s-a determinat folosind aparatul **Somacount 150**.

Pentru laptele de oaie și capră s-a utilizat aparatul **BactoCount IBCm**.

Rezultatele au permis după sistematizare și prelucrare o prezentare individuală și în dinamică a numărului de celule somatice pentru fiecare lot, pe durata fiecărei lactații.

Pentru determinarea numărului de celule somatice din lapte, de la **taurine** s-au recoltat 600 probe, de la ovine 326 și de la caprine 331.

Din valorile medii lunare și estimările variabilității reiese faptul că laptele provenit de la **taurine** în perioada 2007, din punct de vedere al numărului de celule somatice nu se încadrează în limitele impuse de Ordinul nr. 682 /2006 (400000 celule / ml lapte).

Din totalul de 300 de probe de lapte recoltate în 2007, de la **taurine** mai puțin de jumătate, 91 (30,3%) nu îndeplinesc condițiile de igienă impuse de U.E. (400000 celule /ml lapte), fiind improprie pentru consumul uman. Cauza cea mai frecventă pentru laptele

neigienic este starea de sănătate a glandei mamare. Dintre factorii identificați în studiul nostru care ar putea să influențeze valorile numărului de celule somatice din lapte și care apar și în literatura de specialitate putem aminti vârsta animalelor, repausul mamar, știindu-se că valorile numărului de celule somatice crește înainte și după perioada de repaus mamar, mulsul incomplet.

În anul 2008, din totalul de 300 de probe recoltate, un număr de 59 (19,66%) nu corespund din punct de vedere igienic. Acest procent este mult mai mic decât cel obținut în anul 2007, (30,3%).

Numărul mare de celule din laptele recoltat are o dinamică atipică, dat fiind faptul că în tehnologia de creștere și exploatare a animalelor de la care provine laptele sunt suficiente carențe și mai ales din cauza faptului că nu este respectată igiena mulsului și nici verificată sănătatea animalelor.

La analiza probele de lapte provenite de la **ovine**, se constată că numărul de celule somatice depășește limita maximă admisă (750000 celule/ml).

În urma analizării celor 163 probe lapte de **ovine**, în ceea ce privește numărul de celule somatice, s-a constatat că un număr de 56 (34,35) % sunt improprii pentru consumul uman datorită numărului ridicat de celule somatice. Această creștere a numărului de celule somatice se datorează stării de sănătate a glandei mamare, și nu în ultimul rând mulsului defectuos și vârstei înaintate a animalelor.

Din analiza valorilor medii lunare și a estimărilor variabilității, reiese că laptele provenit de la **caprine**, nu se încadrează în limitele admise la noi în țară (1000000 celule/ml).

În anul 2007, din cele 168 de probe recoltate, un procent de 31,54%, sunt improprii pentru consumul uman datorită numărului mare de celule somatice, iar în 2008, din 163 de probe, doar un număr de 114 (69,33%) probe pot fi date spre consum uman, restul fiind improprii din punct de vedere igienic.

Numărul de celule somatice din lapte a prezentat variații în funcție de starea fiziologică a glandei mamare și de la o recoltare la alta. La animalele aflate la prima lactație numărul de celule este mai mic, acesta crescând progresiv cu numărul de lactații.

Creșterea numărului de celule somatice din lapte peste valorile admise este anormală și indică evoluția unui proces inflamator la nivelul glandei mamare. Această creștere a numărului de celule somatice atinge valori maxime la începutul procesului inflamator, iar descreșterea se face treptat, numărul de celule fiind crescut și după vindecare, pe parcursul mai multor zile și chiar săptămâni.

Datorită numărului crescut de neutrofile, 50-70% din NCS față de doar 5-20% în laptele normal de vacă (**Dulin și col., 1983; Poutrel și Lerondelle, 1983**), caprele sunt mai puțin predispuse la infecții mamare.

În **capitolul VII** s-a urmărit **expresia citomorfologică** a laptelui provenit de la cele trei specii luate în studiu, efectuându-se frotiuri din sediment, după tehnica frotiului din sânge.

Metoda de colorare folosită a fost May – Grünwald – Giemsa.

La **taurine**, în urma examenului citomorfologic, în laptele provenit din glanda mamară clinic sănătoasă, s-au evidențiat rare neutrofile cu nucleul multilobat, cu segmente lobulare bine individualizate, hipercromatice și citoplasmă amfofilă.

De asemenea, s-au identificat și macrofage în curs de activare, cu nucleu hipercromatic și citoplasmă vacuolizată. Limfocitele s-au întâlnit relativ rar pe lactosediment și au prezentat nucleu compact, hipercromatic, de formă rotundă, cu citoplasmă bazofilă, sub formă de inel.

Celulele polimorfonucleare neutrofile s-au întâlnit alături de celulele epiteliale. Aceste celule apar în lapte datorită descuamării fiziologice a epiteliului mamar – alveolar, canalicular, cisternal.

În formele de mamită incipientă de la **taurine**, s-a observat creșterea numărul total de germeni și al celulelor somatice, până la valori de 856979 germeni/ml, respectiv 989576 celule/ml. La examen microbiologic s-a evidențiat *Escherichia coli*.

Din punct de vedere citomorfologic, s-a observat preponderența celulelor PMN neutrofile și a macrofagelor, activate pentru microfagocitoza germenilor.

Populația celulară este numeroasă cu intensă activitate de fagocitare, celulele macrofage activate și hiperactivate aflându-se în diferite stadii de necrocitoză.

În mamita cronică streptococică, numărul de celule somatice atinge valori de 867567 celule /ml, iar numărul total de germeni ajunge până la 598567 germeni/ml. Populația celulară este numeric crescută, toate categoriile celulare fiind în intensă activitate fagocitară. Morfologic s-a constatat prezența unui număr crescut de PMN neutrofile și macrofage cu intensă activitate fagocitară.

La **ovine**, laptele cu aspect normal și procesat în condiții igienice, a prezentat lactosedimentul în cantitate foarte redusă, uneori abia vizibil, care s-a etalat cu ușurință dând un frotiu omogen, fără aglomerări și precipitate.

La examenul citologic, frotiul conține o populație celulară rară și dispersată, cu celule în grupuri de câte 2 – 3, alcătuită din neutrofile, cu nucleu intens segmentat, limfocite, chiar și eozinofile, cu nucleul colorat intens bazofil.

În laptele provenit de la **caprele** clinic sănătoase, la examinarea frotiului s-a observat un număr crescut de neutrofile cu nucleu multilobat, macrofage neactivate și în curs de activare, rare limfocite.

În faza subacută a mamitei streptococice la **caprine**, este interesant faptul că apar pe lângă celulele polimorfonucleare neutrofile și celule eozinofile într-un procent de 10 – 15 % din populația de PMN. Probabil, acestea apar datorită distrucțiilor masive epiteliale prezente la nivelul glandei mamare.

În contextul populației celulare din laptele mamitic, monocitele – macrofage hiperactivate se găsesc în grupuri de 2-3 celule în care se stabilesc punți citoplasmatiche bine consolidate.

Prin examen citomorfologic s-a constatat asocierea procesului infecțios de tip streptococic cu germeni stafilococici, procesul căpătând caracter de mamită acută streptococică și stafilococică. Examenul citomorfologic al sedimentului a confirmat și în acest caz relația directă cu numărul mare de celule. Morfologic s-a constatat de asemenea prezența unui număr crescut de PMN neutrofile cu intensă activitate fagocitară și numeroase celule epiteliale în diferite stadii de necrocitoză și numeroase microorganisme.

Pe probele de lapte respective s-au făcut determinări în ceea ce privește NCS-ul și NTG-ul.

În această situație valorile celor doi parametri depășesc valorile admise la noi în țară, respectiv, NCS –ul- 1132000 celule/ml față de 1000×10^3 celule /ml și NTG-ul – 1132000 germeni/ml față de 1500×10^3 germeni /ml.

Examenul citomorfologic al lactosedimentului realizat din laptele de retenție, întâlnit la sfârșitul perioadei de lactație, a scos în evidență faptul că aspectele morfologice ale celulelor nu diferă în mare parte de cele prezente în laptele normal.

Citosedimentul a fost semnificativ crescut ca și în cazul mamitelor, dând un frotiu bogat cu aspect omogen.

Se întâlnesc celule mamare în diferite stadii de necrocitoză, rare PMN cu nucleul intens segmentat, macrofage activate, toate prinse într-o masă de proteină ce formează microcoaguli care înglobează celulele.

În **capitolul VIII “Concluzii finale”**, sunt sintetizate rezultatele cercetărilor efectuate pe probe de lapte provenite de la taurine, ovine și caprine, lucrate prin metode clasice și moderne, conform normativelor în vigoare.