

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dalibor Đud, dr.vet.med.

**METABOLOMIKA U FUNKCIJI PROCJENE MASTITISA U KRAVA
HOLŠTAJN PASMINE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2024.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dalibor Đud, dr.vet.med.

**METABOLOMIKA U FUNKCIJI PROCJENE MASTITISA U KRAVA
HOLŠTAJN PASMINE**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2024.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dalibor Đud, dr.vet.med.

**METABOLOMIKA U FUNKCIJI PROCJENE MASTITISA U KRAVA
HOLŠTAJN PASMINE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Marcela Šperanda

Povjerenstvo za ocjenu:

1. **dr. sc. Mislav Đidara, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
2. **dr. sc. Vesna Gantner, redovita profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, članica**
3. **dr. sc. Marko Samardžija, redoviti profesor Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu**

Osijek, 2024.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dalibor Đud, dr.vet.med.

**METABOLOMIKA U FUNKCIJI PROCJENE MASTITISA U KRAVA
HOLŠTAJN PASMINE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Marcela Šperanda

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 2024. godine pred Povjerenstvom za
obranu:**

- 1. dr. sc. Mislav Đidara, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti
Osijek, predsjednik**
- 2. dr. sc. Vesna Gantner, redovita profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti
Osijek, članica**
- 3. dr. sc. Marko Samardžija, redoviti profesor Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu, član**

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Stočarstvo

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Stočarstvo

Metabolomika u funkciji procjene mastitisa u krava holštajn pasmine

Dalibor Đud, dr.vet.med.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Marcela Šperanda

Metabolomika je jedna od grana „multi-omik“ pristupa, koja se bavi profiliranjem metabolita u različitim tjelesnim tekućinama i tkivima. Mastitis je još uvijek vrlo učestala bolest mliječnog govedarstva i traže se rješenja za rano otkrivanje početka bolesti. Istraživanje je provedeno na 151 kravi holštajn pasmine od 2. do 5. laktacije prosječne proizvodnje mlijeka veće od 30 L. Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost određenih pokazatelja u mlijeku i krvi krava i pojavnosti upale mliječne žlijezde u cilju otkrivanja biomarkera za neinvazivno i brzo otkrivanje promjena u mliječnoj žlijezdi i dijagnozi mastitisa. Cilj je bio utvrditi procijenjene srednje vrijednosti biomarkera u pojedinim četvrtima vimena s obzirom na broj somatskih stanica, pojavnost mikroorganizama, broju liječenja mastitisa i kondiciji. U ovom istraživanju utvrdili smo da postoji povezanost između pojedinih indikatora metaboličkog i zdravstvenog statusa mliječnih krava, te smo utvrditi da niže navedeni istraživani pokazatelji su biomarkeri koji mogu biti korisni prediktori mastitisa: 1. biokemijski pokazatelji u krvi: Ukupni proteini, Fe, Urea, Glukoza, P, LDL i BHB, 2. biokemijski pokazatelji u mlijeku: Fe, Glukoza, Ca i Urea, 3. slobodne aminokiseline određivane u mlijeku: Hidroksiprolin, Histidin, Glutaminska kiselina, Leucin, Lizin, Alanin, Fenilalanin, Glicin, Glutamin, Serin i Triptofan, 4. proteini akutne faze: AGP, CRP, Haptoglobin i SAA3. Možemo zaključiti da su smanjenje dnevnog sadržaja mliječne masti, smanjenje koncentracije Fe u serumu i niska koncentracija ureje u krvi dobri prediktori narušenog zdravlja vimena i mastitisa. Više koncentracije aminokiseline u mlijeku, ukupnih proteina u krvi i najviše koncentracije proteina akutne faze utvrđene su u skupini krava s kliničkim mastitisom.

Broj stranica: 115

Broj slika: 45

Broj tablica: 27

Broj literaturnih navoda: 137

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mastitis, broj somatskih stanica, biomarkeri, proteini akutne faze, aminokiseline mlijeka, biokemijski pokazatelji

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Mislav Đidara, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Vesna Gantner, članica
3. Prof. dr. sc. Marko Samardžija, član

Disertacija je pohranjena u:

Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course: Animal husbandry

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch: Animal husbandry

Metabolomics in the Function of Mastitis Assessment in Holstein Cows

Dalibor Đud, dr.vet.med.

Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: Prof. dr. sc. Marcela Šperanda

Metabolomics, a branch of the "multi-omics" approach, focuses on profiling metabolites in various body fluids and tissues. Mastitis, an inflammation of the mammary gland, remains the most costly disease in intensive dairy cattle farming. This research aimed to identify correlations between specific indicators in the milk and blood of cows and the incidence of mammary gland inflammation to detect biomarkers for non-invasive and rapid detection of changes in the mammary gland and diagnosis of mastitis. The study determined estimated mean values of biomarkers in individual udder quarters based on the number of somatic cells, the presence of microorganisms, the number of mastitis treatments, and overall condition. Conducted on 151 Holstein cows in their 2nd to 5th lactation with an average milk production of over 30 liters, the research identified useful biomarkers for predicting mastitis: biochemical indicators in blood (Total proteins, Fe, Urea, Glucose, P, LDL, and BHB), biochemical indicators in milk (Fe, Glucose, Ca, and Urea), free amino acids in milk (Hydroxyproline, Histidine, Glutamic acid, Leucine, Lysine, Alanine, Phenylalanine, Glycine, Glutamine, Serine, and Tryptophan), and acute phase proteins (AGP, CRP, Haptoglobin, and SAA3). In this research, we have determined that there is a connection between certain indicators of the metabolic and health status of dairy cows, and we have determined that the investigated indicators listed below are biomarkers that can be useful predictors of mastitis: 1. biochemical indicators in the blood: Total proteins, Fe, Urea, Glucose, P, LDL and BHB, 2. biochemical indicators in milk: Fe, Glucose, Ca and Urea, 3. free amino acids determined in milk: Hydroxyproline, Histidine, Glutamic acid, Leucine, Lysine, Alanine, Phenylalanine, Glycine, Glutamine, Serine and Tryptophan, 4. acute phase proteins: AGP, CRP, Haptoglobin and SAA3. We can conclude that a decrease in daily milk fat content, a decrease in serum Fe concentration and a low blood urea concentration are good predictors of impaired udder health and mastitis. Higher concentrations of certain amino acids in milk, total proteins in blood and the highest concentration of acute phase proteins were determined in the group of cows with clinical mastitis.

Number of pages: 115

Number of figures: 45

Number of tables: 27

Number of references: 137

Original in: croatian

Key words: mastitis, somatic cell count, biomarkers, acute phase proteins, milk aminoacids, biochemical indicators

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Mislav Đidara, president
2. Prof. dr. sc. Vesna Gantner, member of the commission
3. Prof. dr. sc. Marko Samardžija, member of the commission

Thesis deposited in:

National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PREGLED LITERATURE	3
1.1.1. Mastitis	3
1.1.1.1. Metode određivanja mastitisa	4
1.1.1.2. Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju mastitis	6
1.1.2. Neki metaboliti u krvi i mlijeku krava	8
1.1.3. Povezanost minerala i mastitisa u mliječnih krava	13
1.1.4. Aminokiseline u mlijeku	14
1.1.5. Proteini akutne faze (APP).....	15
1.1.6. Kondicija	17
1.1.6.1. Ocjena tjelesne kondicije.....	17
1.2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	18
2. MATERIJAL I METODE RADA.....	20
2.1. Određivanje kvalitete mlijeka	20
2.2. Određivanje broja somatskih stanica u mlijeku.....	20
2.3. Bakteriološka pretraga	21

2.4. Metabolički pokazatelji u mlijeku.....	23
2.5. Aminokiselinski sastav mlijeka	23
2.6. Proteini akutne faze u mlijeku	24
2.7. Metabolički pokazatelji u krvnoj plazmi	24
2.8. Statistička analiza	25
 3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	 27
3.1. Proizvodni pokazatelji	27
3.2. Biokemijski pokazatelji u krvi	34
3.3. Biokemijski pokazatelji u mlijeku.....	43
3.4. Aminokiselinski sastav mlijeka	52
3.5. Koncentracija proteina akutne faze u mlijeku	67
 4. RASPRAVA	 75
4.1. Proizvodni pokazatelji	75
4.2. Biokemijski pokazatelji u krvi	78
4.3. Biokemijski pokazatelji u mlijeku.....	81
4.4. Aminokiselinski sastav mlijeka	85
4.5. Koncentracija proteina akutne faze u mlijeku	89
 5. ZAKLJUČCI.....	 94
 6. LITERATURA.....	 96
 7. SAŽETAK	 110
 8. SUMMARY	 113

Popis kratica korištenih u tekstu

AGP – (*eng. alpha(1)-acid glycoprotein*) alfa-1 kiseli glikoprotein

$\bar{x}$ - srednja vrijednost

ALP – (*eng. alkaline phosphatase*) alkalna fosfataza

ALT - (*eng. alanine aminotransferase*) alanin amonotransferaza

ANOVA – (*eng. analysis of variance*) analiza varijance

APP - (*eng. acute-phase proteins*) proteini akutne faze

AST – (*eng. aspartate aminotransferase*) asparat aminotransferaza

BCAAs - (*eng. branched-chain amino acid*) aminokiseline razgranatog lanca

BCS - (*eng. body condition scores*) tjelesna kondicija

BHB – (*eng. beta-hydroxybutyrate*) beta hidroksimaslačna kiselina

Ca – kalcij

CK – (*eng. ceatin kinase*) kreatin kinaza

CRP – (*eng. C-reactive protein*) C reaktivni protein

Cu – bakar

CV - koeficijent varijabilnosti

DKM – dnevna količina mlijeka

DLC – (*eng. differential leukocyte count*) diferencijalni broj leukocita

DMD - Draminski mastitis detektor

DSB – dnevni sadržaj bjelančevina

DSM – dnevni sadržaj mliječne masti

ELISA - (*eng. enzyme-linked immunosorbent assay*) enzimski povezani imunosorbentni test

Fe – željezo

GGT – (*eng. gamma glutamyl transferase*) gama-glutamil transferaza

GLDH – (*eng. glutamate dehydrogenase*) glutamat dehidrogenaza

HCL – (*eng. hydrochloric acid*) klorovodična kiselina, solna kiselina

Hp - (*eng. haptoglobin*) haptoglobin

HPLC - (*eng. high-performance liquid chromatography*) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IL-1 - (*eng. interleukin-1*) interleukin-1

IL-6 - (*eng. interleukin-6*) interleukin-6

Ile - (*eng. isoleucine*) izoleucin

IMI – (*eng. intramammary infection*) infekcija mliječne žlijezde

IP-RP-HPLC - (*eng. ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography*)

K – kalij

LDH – (*eng. lactate dehydrogenase*) laktat dehidrogenaza

LDL - (*eng. low-density lipoprotein*) lipoprotein niske gustoće

Leu - (*eng. leucine*) leucin

LPS – (*eng. lipopolysaccharides*) lipopolisaharidi

LSM – (*eng. least squares means*) procijenjene srednje vrijednosti

M – krave s mastitisom

Max – maksimum

Min - minimum

Mn – mangan

MR – krave s rizikom od mastitisa

M-SAA3 - (*eng. mammary serum amyloid A3*) mamarni amiloid A

Na – natrij

NEFA – (*eng. non-esterified fatty acids*) neesterificirane masne kiseline

P – fosfor

PMN – polimorfonuklearne stanice

SAA – (*eng. serum amyloid A*) serumski amiloid A

SCC – (*eng. somatic cell count*) broj somatskih stanica

SD - standardna devijacija

TBil – (*eng. total bilirubin*) ukupni bilirubin

TG – (*eng. triglycerides*) trigliceridi

TNF α - (*eng. tumor necrosis factor alpha*) tumor nekrotizirajućeg faktora alfa

TP – (*eng. total protein*) ukupne bjelančevine

Tyr - (*eng. tyrosine*) tirozin

Val - (*eng. valine*) valin

Z – zdrave krave

ZMT – zagrebački mastitis test

Zn – cink

1. UVOD

Metabolomika je jedna od grana „multi-omik“ pristupa, koja se bavi analizom cjelokupnog metaboloma organizma. Bavi se profiliranjem metabolita u različitim tjelesnim tekućinama i tkivima. Obuhvaća široki spektar molekula koji se utvrđuju suvremenim analitičkim uređajima, a kasnije se statistički obrađuju i prikazuju se procijenjene srednje vrijednosti da bi se dobila integrirana slika metaboloma (Zhang i sur., 2012). Metoda uključuje određivanje peptida, aminokiselina, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata, vitamina, organskih kiselina i anorganskih komponenti (Vailati-Riboni i sur., 2016). Zajedno sa saznanjima ostalih grana „multi omik“ pristupa, određuje, karakterizira i kvantificira biološke molekule koje određuju strukturu, funkciju i dinamiku stanica, organa ili organizma. Takav integrirani pristup otvara novu dimenziju u razumijevanju fiziologije i patologije organizma, a tako pomaže rano otkrivanje i usmjerenije liječenje krava.

Mastitis, upala mliječne žlijezde, vrlo je učestala i skupa bolest intenzivnog mliječnog govedarstva. Istovremeno, to je i vrlo složena bolest jer su uzroci mnogobrojni i međusobno povezani (uvjeti držanja, smještaj, hranidba, genetske predispozicije, prisutnost drugih bolesti). Stoga i gubitci povezani s ovom bolešću su mnogobrojni: odbačeno mlijeko, manja proizvodnja mlijeka, troškovi liječenja, kraći životni vijek krava, više rada stočara, troškovi lijekova. U dokazivanju i ranom otkrivanju mastitisa, dobrim se pokazateljem uzima broj somatskih stanica (SCC). Ovaj broj je jako ovisan o prisutnosti infekcija mliječne žlijezde (IMI) ili upala u mliječnoj žlijezdi (Harmon, 2001). Na varijabilnost broja somatskih stanica utječu intramamarne infekcije i vrsta patogena (Sumon i sur., 2020), kao i položaj četvrti vimena, paritet i faza laktacije. Pravovremena i točna identifikacija bolesnih četvrti i bolesnih krava od suštinskog je značaja za optimizaciju upravljanja. Ipak, broj somatskih stanica ne koristiti se kao jedini dijagnostički alat za identifikaciju mastitisa (Petzer i sur., 2017). Postoji nekoliko izravnih i neizravnih testova kojima se mogu otkriti subklinički mastitisi (Langer i sur., 2014) te brzi testovi za provjeru stanja pojedine četvrti koji se koriste prije početka mužnje (Kalifornijski mastitis test, Draminski test, Zagreb mastitis test).

Osim mastitisa, u stadima mliječnih krava pojavljuje se vrlo učestalo bolest lokomotornog aparata-šepavost. Ova pojava izravnim je i jasnim znakom narušene dobrobiti životinja. Uzrokuje velike gubitke u stadima jer se zbog otežanog i bolnog kretanja smanjuje proizvodnje mlijeka i plodnost, smanjuje se životni vijek krave, a troškovi liječenja uzrokuju velike ekonomske štete. Uzroci šepavosti su neizbalansirani obroci, loši uvjeti držanja, neodgovarajuće podloge, stresne točke u proizvodnom procesu, hormonalni status. Držanje krava u štali, tvrde površine, nedostatak stelje, loša higijena, kratka ležišta, pridonose pojavi bolesti lokomotornog sustava. Sve vrste stresa i hormonalne promjene povezane s porođajem i laktacijom, te komorbiditeti (mastitis, metritis, zarazne bolesti, metaboličke bolesti) mogu dovesti do šepavosti.

Ocjena tjelesne kondicije koristi se kao vrijedan alat u procjeni držanja životinja i ukazuje na kvalitetu menadžmenta ukupne proizvodnje. Ciljevi ocjene kondicije su imati stalan uvid u stanje i ponašanje pojedinih životinja, što onda govori o stanju cijelog stada. Držanje krava u optimalnoj kondiciji za određeno fiziološko stanje znači izbjeći mnoge bolesti koje napadaju mršave i/ili debele krave. Na početku laktacije ocjena kondicije indikatorom je gubitka tjelesne mase, što je indikatorom razvoja metaboličkih bolesti. Iznadprosječna kondicija ili debljina često je uzrokovana lošom hranidbom ili lošim reproduktivnim menadžmentom. Debele krave sklone su reproduktivnim poremećajima, što je izravno povezano s proizvodnjom mlijeka i ekonomskom isplativošću te krave. Ispodprosječna kondicija, zbog manjka energije i proteina, uzrokuje nižu proizvodnost i niži sadržaj mliječne masti. Uspostava i permanentno korištenje sustava ocjene kondicije dobrim je pokazateljem zdravlja i kontinuirane brige o životinjama, kao i signalom za potrebnu promjenu menadžmenta.

Postojanje mogućnosti uporabe ovih dijagnostičkih alata i pravilno tumačenje rezultata kontrole mliječnosti, kao što su: proizvodni rezultati, biokemijski pokazatelji u mlijeku, aminokiseline mlijeka i proteini akutne faze mlijeka, uz uvažavanje ocjene tjelesne kondicije i prisutnosti druge patologije, mogu omogućiti siguran pristup za rano otkrivanje mastitisa i smanjenje rizika od poremećaja zdravstvenog statusa mliječnih krava (Jožef i sur., 2022.).

1.1. PREGLED LITERATURE

Svakodnevnim povećanjem stanovništva povećava se i potreba za proizvodnjom hrane. Sve se više poljoprivrednih kultura, ali i životinja uzgajaju na intenzivan način, a često uz neodrživo korištenje resursa koje su povećale ekonomske i ekološke troškove (Shanwad i sur., 2002). Precizna poljoprivreda primjenjuje nove tehnologije kako bi povećala ekonomičnost u cilju smanjenja troškova i povećanja profitabilnosti, produktivnosti i održivosti proizvodnje (Beluhova-Uzunova & Dunchev, 2019). Nove tehnologije koje se primjenjuju u mliječnom govedarstvu omogućavaju maksimalno korištenje individualnog potencijala, bolji zdravstveni status i dobrobit životinja uz smanjene troškove proizvodnje, bolju kvalitetu proizvoda i smanjeni negativan utjecaj farme na okolinu. Varijabilnost i povezanost različitih biomarkera u mlijeku mogu biti korisni u ranom otkrivanju i procjeni potencijalnih poremećaja mliječnih krava.

1.1.1. Mastitis

Mastitis, upala mliječne žlijezde, uzrokovan je intramamarnim bakterijskim infekcijama, a antimikrobni lijekovi dugo su bili kamen temeljac kontrole i liječenja mastitisa. Kako raste svijest o rastućoj opasnosti od bakterijske rezistencije na antibiotike, nastoje se iznaći načini uzgoja životinja uz što manje korištenje antimikrobnih sredstava. Brzi testovi za otkrivanje upale mliječne žlijezde dostupniji su i sve je učestalija njihova upotreba na farmama. Osim intramamarnih infekcija povremeni uzroci upale mliječne žlijezde mogu biti mehaničke i kemijske traume (korištenje agresivnih sredstava za čišćenje). Upala mliječne žlijezde i intramamarne infekcije različiti su biološki procesi koji zahtijevaju različite dijagnostičke alate i različite tretmane. Upalu mliječne žlijezde karakteriziraju fizičke i kemijske promjene u mlijeku umjerenog do težeg oblika ili s patološkim promjenama u mliječnoj žlijezdi koji dovodi do poremećaja zdravstvenog stanja cijelog organizma. Klinički mastitis može se otkriti ljudskim osjetilima (vid, dodir, okus i dr.), dok otkrivanje subkliničkog mastitisa zahtjeva dodatna dijagnostička ispitivanja. U idealnom slučaju, liječenje mastitisa temelji se na poznavanju ozbiljnosti uzročnika i prognoze te se protuupalni, antimikrobni i potporni tretmani mogu odabrati i kombinirati s ciljem maksimalne učinkovitosti i minimalnih nuspojava. Brzi mastitis test, također poznat kao zagrebački mastitis test (ZMT) često se preporučuje poljoprivrednicima i farmerima kao jednostavan test koji se može provesti kako bi se brzo identificirale krave

sa visokim brojem somatskih stanica, jer upravo te stanice reagiraju s brzim testom za mastitis tj. uzrokuju stvaranje zadebljale sluzi ili gela.

1.1.1.1. Metode određivanja mastitisa

Somatske stanice su tjelesne stanice koje se pojavljuju u mlijeku, a njihov broj se povećava, osobito u prisutnosti bakterija. Upala vimena (mastitis) uzrokuje prelazak velikog broj bijelih krvnih stanica (leukocita) u mlijeko kako bi se borile protiv infekcije koje s manjim brojem oštećenih epitelnih stanica vimena zajedno čine somatske stanice mlijeka. Dogovoreno je da je prihvatljiv broj somatskih stanica u mlijeku manji od 200 000 u mL. Ako se u mililitru nalazi više od 200 000 stanica, govorimo o upalnim promjenama. Njihov broj uvelike se povećava kada dođe do ozljede ili infekcije tkiva vimena tj. kod krava oboljelih od mastitisa. Do povišenog SSC dolazi uslijed infekcije mliječne žlijezde, ali i raznih indirektnih pokazatelja kao što su toplinski stres, dob, broj laktacija, problemi s papcima, različite rane i ozljede. Broj somatskih stanica (SSC) u mlijeku određuje se kako bismo bili sigurno da mlijeko potječe iz zdravog vimena i zdrave krave. Posebno je to važno u slučaju otkrivanja subkliničkog mastitisa. U laboratorijima za kontrolu mlijeka brojanje somatskih stanica provodi se analizatorima kao što su Fossomatic 5000 i Fossomatic FC (Foss). Za brzo identificiranje krava sa visokim brojem somatskih stanica prije mužnje mogu se koristiti brzi mastitis testovi kao što su Kalifornijski mastitis test (CMT), Zagrebački mastitis test (ZMT) i Draminski mastitis detektor.

Zagrebački mastitis test (ZMT) dijagnostički je alat koji pomaže u brzom dijagnosticiranju mastitisa kod muznih krava i programu upravljanja zdravljem vimena. Provodi se kako bi se otkrila prisutnost subkliničkih infekcija na početku ili tijekom laktacije kao dio programa upravljanja zdravljem vimena. Također se koristi kao dodatna dijagnostička metoda za krave s kliničkim znakovima upale vimena. Odgovornost za provođenje ovog testa najčešće leži na osoblju koje radi u procesu mužnje krava na farmama, tehničarima i veterinarima. Zagrebački mastitis test pokrenuti će vidljivu reakciju u slučajevima povećanja SSC iznad 400 000 stanica/ml mlijeka. Mlijeko iz inficiranih četvrti vimena ima tendenciju da tvori želatinoznu masu kada se ispituje specifičnim reagensom, a stupanj stvaranja gela ukazuje na prisutnost i ozbiljnost upalnih promjena u vimenu. Promjena boje ukazuje na promjenu pH mlijeka, a time i na razinu same upale vimena.

Draminski mastitis detektor (DMD) dijagnostički je alat za brzo otkrivanje prisutnosti subkliničkih infekcija u vimenu metodom mjerenja električnih otpora u uzorcima mlijeka. Razvojem subkliničkog oblika mastitisa brzo se mijenja sastav mlijeka, posebice udio natrijevih i kloridnih iona čiji se udjeli povećavaju, dok se udio kalija i laktoze smanjuje. Uslijed navedenih promjena u sastavu mlijeka dolazi do pada električne provodljivosti i očitavanja nižih vrijednosti na zaslonu detektora. Uzorci mlijeka iz četvrti s prisutnom subkliničkom infekcijom imaju niže vrijednosti u usporedbi s mlijekom iz zdravih četvrti. Vrijednosti očitavanja iznad 300 jedinica ukazuju na vrlo malu mogućnost pojave subkliničkog mastitisa, vrijednost između 300 i 250 jedinica ukazuju na mogućnost progresivnog povećanja pojavnosti subkliničke infekcije, dok vrijedosti očitavanja ispod 250 jedinica ukazuju na infekciju i prelazak subkliničke u kliničku fazu upale. Kod nekih krava očitavanje vrijednosti između 250 i 300 jedinica smatra se normalnim, dok se kod krava čije normalne vrijednosti prelaze 300 jedinica primijeti nagli pad na razinu od 250 – 300 jedinica, takve krave treba smatrati rizičnim na mastitis. Razlika veća od 40 – 50 jedinica između najvišeg i najnižeg rezultata očitavanja ukazuje na početak subkliničkog mastitisa.

čtvrta A = 370

čtvrta B = 380

čtvrta C = 310

čtvrta D = 370

U navedenom primjeru vrijednost za četvrt C iznosi 310 jedinica što je razlika od 70 jedinica u odnosu na maksimalnu vrijednost (čtvrta B = 380), stoga razlika od 70 jedinica ukazuje na subklinički oblik upale i potrebu za daljnjim ispitivanjima.

U svrhu ranog otkrivanja mastitisa razvijene su novije i modernije metode kao što su: detekcija i analiza čestica u mlijeku, određivanje razine miRNA u mlijeku, automatizirano predviđanje mastitisa metodom strojnog učenja, određivanje razine minerala u mlijeku i krvi, određivanje sadržaja aminokiselina u mlijeku, određivanje proteina akutne faze u mlijeku i dr. Kod detekcije i analize čestica u mlijeku, sadržaj i veličina čestica u mlijeku prati se brojačima čestica u kombinaciji s mikroskopom sa složenim faznim kontrastom. Metoda se temelji na spoznaji da su velike promjene zabilježene u broju ukupnih čestica u mlijeku prije i tijekom pojave mastitisa (tijekom pojave mastitisa povećava se broj ukupnih čestica), dok promjene u veličini i broju kuglica mliječne masti postaju vidljive nekoliko dana prije pojave kliničkih znakova mastitisa. Određivanje razine miRNA u mlijeku je metoda analize RNA. Zabilježeno je progresivno povišenje razine miRNA u mlijeku

usporedo s pozitivnošću CMT (Kalifornijski mastitis test). Određivanjem razine bta-miR-223 i bta-miR-142-5p (miRNA) mogu se identificirati rane upalne promjene u pojedinim četvrtima vimena s visokim točnošću (100% osjetljivost, >81% specifičnost). Automatizirano predviđanje mastitisa metodom strojnog učenja je automatizirani alat namijenjen farmerima i osobama koji nisu specijalizirane i obučene za dijagnostiku da postave brzu dijagnozu mastitisa na razini stada i brzo provedu odgovarajuće mjere kontrole. Metoda se temelji na primjeni klasifikacijskih algoritama strojnog učenja u raznim aplikacijama i odlikuje se visokim stupnjem točnosti i uspješnosti nasumičnih logaritama u repliciranju složenih dijagnoza na razini stada koje su postavili veterinari. U izbornicima na temelju odabranih ili unesenih podataka, računalni program daje dijagnozu.

1.1.1.2. Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju mastitis

Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju mastitis mogu se podijeliti u dvije kategorije: zarazni uzročnici, koji se prenose s krave na kravu, prvenstveno tijekom procesa mužnje, i uzročnici iz okoliša, (National Mastitis Council, 2016). Najvažniji zarazni uzročnici su , *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* i *Corynebacterium bovis*, dok su najvažniji okolišni uzročnici *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* i drugi Gram-pozitivni i katalaza-negativni koki (ostali streptokoki). Stafilocoki, osim bakterije *Staphylococcus aureus*, često u prošlosti opisivani kao koagulaza-negativni stafilocoki, također su važni patogeni mliječnih žlijezda. Stafilocoki su bakterije koje se najčešće izoliraju iz mlijeka zaraženih krava (Leitner i sur., 2011), a *Staphylococcus aureus* česti je uzročnik mastitisa kod krava (Oliveira i sur., 2007). Međutim, koagulaza-negativni stafilocoki postali su najčešći izolat u mnogim zemljama i sada prevladavaju u većini zemalja te bi se stoga mogli opisati kao novi uzročnici mastitisa (Tremblay i sur., 2013). Osim stafilocoka, kod krava s mastitisom često se izoliraju koliformi, enterokoki i streptokoki. Na primjer, u Engleskoj i Walesu, bakterija *Streptococcus uberis* najčešće je izolirana kod kliničkih i subkliničkih slučajeva infekcije (Bradley i sur., 2007). Ponavljajuće infekcije često se pripisuju sposobnošću bakterija da stvaraju biofilmove (Vasudevan i sur., 2003). Stvaranje biofilma popraćeno je značajnim genetskim i kasnijim fiziološkim promjenama u mikroorganizmima što rezultira, između ostalog, nestankom osjetljivosti na gotovo sve skupine antibiotika (Melchior i sur., 2006). Ova činjenica može biti zabrinjavajuća jer u 40% slučajeva mastitis proizlazi iz recidiva prethodnih infekcija

nakon neuspješne terapije (Hillerton i Kliem, 2002). Najvažniji zarazni uzročnici uzrokuju najveće povećanje broja somatskih stanica (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *coliformi* i *Streptococcus spp.* osim *S. agalactiae*), a manje značajni (*Corynebacterium bovis* i koagulaza-negativni stafilocoki) obično uzrokuju samo umjereno povećanje broja somatskih stanica (Souza i sur., 2009). Sumon i sur., (2020) utvrdili su na 360 uzoraka četvrti vimena kod krava, da su inficirane četvrtine imale značajno viši prosječni broj somatskih stanica ($210,52 \times 10^3$ stanica/ml) u usporedbi s neinficiranim ($32,72 \times 10^3$ stanica/ml). Prosječni broj somatskih stanica bio je najveći za infekcije vimena s bakterijama *Enterobacter spp.* ($338,00 \times 10^3$ stanica/ml), a zatim s *Bacillus spp.* ($319,20 \times 10^3$ stanica/ml), koagulaza-negativnim stafilokokom ($268,17 \times 10^3$ stanica/ml), *Staphylococcus aureus* ($218,31 \times 10^3$ stanica/ml) i *Escherichia coli* ($200,75 \times 10^3$ stanica/ml) dok je najniži broj somatskih stanica utvrđen za *Pseudomonas aeruginosa* ($66,33 \times 10^3$ stanica/ml). Mlijeko stražnjih četvrti imalo je značajno viši broj somatskih stanica od prednjih četvrti. Broj somatskih stanica povećava se starošću, paritetom i fazom laktacije, čak i kod krav čije vime nije zaraženo uzročnicima mastitisa. Jačina upale vimena u pozitivnoj je korelaciji s količinom patogena koji se izluče iz zaražene četvrti (Petzl i sur., 2018). Poznate su brojne vrste mikoplazmi, uzročnika mastitisa kod krava, a to su: *M. bovis*, *M. arginini*, *M. alcalescens*, *M. californicum*, *M. bovigentialium*, *M. bovirhinis*, *M. canadense* i dr. Najčešći uzročnik je *M. bovis* (George i sur., 2007) koja djeluje infektivno i u gornjim dijelovima respiratornog sustava zdravih životinja. *M. bovis* može uzrokovati i respiratorne bolesti i bolesti zglobova. U mliječnim stadima mikoplazme mogu uzrokovati klinički, subklinički ili kronični oblik mastitisa (González i sur., 2003), dok je kronični oblik mastitisa rezultat sposobnosti *Mycoplasma spp.* za stvaranje više mikroapscesa unutar inficirane mliječne žlijezde (Jasper, 1982). Al-Farha i sur., (2017) utvrdili su pad mliječnosti i povišenje broja somatskih stanica te značajno povišenje razine mliječnih bjelančevina tijekom mastitisa uzrokovanog mikoplazmama. Navedeni autori zaključili su da infekcije mikoplazmama imaju sličan učinak na sastav mlijeka kao što je to i kod dugih uzročnika mastitisa. Povišenje razine bjelančevina u mlijeku tijekom mastitisa nastaje zbog povećanog priljeva albumina u krvi i imunoglobulina kao imunološkog odgovora (Auldist i sur., 1998; Gráff i sur., 2015), dok se smanjenje proizvodnje mlijeka može pripisati smanjenoj sposobnosti sinteze sekretornog tkiva vimena (Schultz, 1977). Mastitisi uzrokovani mikoplazmama vrlo su otporni na antimikrobnu terapiju i imaju sve značajniji utjecaj u mliječnoj industriji.

1.1.2. Neki metaboliti u krvi i mlijeku krava

Visoka proizvodnja mlijeka rizičnim je čimbenikom za razvoj i nastanak poremećaja koji utječu na cjelokupno zdravlje. Svaki poremećaj koncentracija metabolita znakom je poremećaja stanja i signalizira mogući početak bolesti. Upravo zato test metaboličkog profila mliječnih krava predstavlja znatan doprinos preventivnoj veterinarskoj medicini (Herdt, 2000). Ovim se testom može odrediti ukupni metabolički profil u kojemu se jasno izdvajaju energetske i proteinske status, kao i opskrbljenost organizma makroelementima i mikroelementima (Oltner i Wiktorson, 1983., Herdt, 2000.). Poznato je i uvriježeno da se pomoću metaboličkog profila dobivaju vrijedne informacije o trenutnom hranidbenom i zdravstvenom stanju krave (Aladrović i sur., 2018., Đuričić i sur., 2020). Radi utvrđivanja energetske bilance organizma određuju se koncentracije sljedećih pokazatelja: β -hidroksimaslačne kiseline (BHB), slobodnih ili neesterificiranih masnih kiselina (NEFA) i glukoze.

Glukozu preživač mora najvećim dijelom sintetizirati u jetri procesom glukoneogeneze. Nastaje najviše iz propionske (50%), mliječne kiseline (15%) i glukogenih aminokiselina (25%; Payne i Payne, 1987., Herdt, 2000). Ona je primarnim izvorom energije, neophodna za sve stanice organizma, a posebno živčane stanice, eritrocite, spolne stanice, za stvaranje laktoze u vimenu, za rast fetusa (LeBlanc, 2006). Glukoza je neophodna za sintezu mliječnog šećera laktoze. Sinteza laktoze odvija se na razini od 4,7 % u mlijeku i tako ostaje cijelo vrijeme laktacije (Havranek i Rupić, 2003). Nedostaje li glukoze, smanjuje se proizvodnja laktoze, a odmah zatim i ukupna količina mlijeka. Svakom upalom mliječnog parenhima smanjuje se sintezu laktoze do 20 %. Stoga je i količina laktoze odličnim znakom mogućih poremećaja sinteze laktoze koja je povezana s razvojem subkliničkog oblika mastitisa. Povećani broj somatskih stanica u mlijeku smanjuje količinu laktoze za 10-20%. To se događa zbog smanjenog prijelaza laktoze u ekstracelularnu tekućinu (krv) i smanjena je mogućnost sinteze u mliječnoj žlijezdi. Smatra se da mlijeko koje sadrži manje od 4,5% laktoze potječe iz bolesnog vimena, zahvaćenog upalom. Tijekom upale kroz mliječnu žlijezdu prolazi manja količina krvi, a time i glukoze, koja je jedan od prekursora u sintezi laktoze. Hipoglikemija nastaje zbog povećanja broja obrambenih stanica u vimenu. Tijekom upale, zahtjevi imunskog sustava za glukozom su veći i u izravnoj su vezi s proizvodnjom mlijeka (Habel i Sundrum, 2020). Tijekom upale mliječne žlijezde raste koncentracija glukoze u krvnoj

plazmi, dođ se koncentracija glukoze i laktoze u mlijeku smanjuje što je jedna vrsta zaštite, zbog povećane energetske potrebe imunog sustava mliječne žlijezde (Silanikove i sur., 2014).

Jedno od ketonskih tijela, *β -hidroksimaslačna kiselina* (BHB), pokazatelj je mobilizacije vlastitih masnih zaliha kao izvora energije ako nedostaje glukoze. Vrijednosti manje od 0,6 mmol/L znakom su da životinje ne gube tjelesnu masu i ne mobiliziraju masti u energetske svrhe. Ako je koncentracija između 0,6 i 1 mmol/L, riječ je o blagoj mobilizaciji masti, koja je prihvatljiva u samom početku laktacije. Ako je koncentracija veća od 1 mmol/L, sigurno je riječ o jačoj mobilizaciji masti i takvo stanje utječe na proizvodnju mlijeka. Ako je koncentracija veća od 2 mmol/L, krave trpe od ketoze, metaboličkoga poremećaja u kojemu raste koncentracija ketonskih tijela, a proizvodnja mlijeka i unos hrane smanjuju se. Guan i sur. (2020) utvrdili su da su krave s višim SCC imale i više koncentracije BHB, što je bilo povezano s nastankom metaboličkih poremećaja, ali i razvojem subkliničkog mastitisa. Istvremeno, BHB dobrim je pokazateljem razvoja ketoze, važnog poremećaja koji utječe na smanjenje proizvodnje mlijeka.

Neesterificirane masne kiseline (NEFA) analit je koji predstavlja izravnu mjeru mobilizacije masti zbog neravnoteže između konzumiranih hranjivih tvari i potrošenih za proizvodnju mlijeka i uzdržne potrebe. Optimalna je koncentracija manja od 0,7 mmol/L za krave u laktaciji i 0,4 mmol/L za zasušene krave. Pri tumačenju tog pokazatelja mora se biti

oprezan jer se koncentracija brzo povisi nakon početka mobilizacije masti, ali se brzo i snizi kada stanje negativne energetske ravnoteže još traje. Krave u ketozi imaju vrijednost NEFA višu od 1,5 mmol/L.

Urea je najvažnijim proizvodom razgradnje bjelančevina u organizmu pa se koristi u procjeni bubrežne funkcije i metabolizma bjelančevina. Hrana bogata bjelančevinama ili pojačan metabolizam bjelančevina dovodi do većih koncentracija ureje u krvi. Kod preživača sa zdravim bubrezima, količina ureje u krvi indirektan je pokazatelj koncentracije amonijaka u buragu nastalog razgradnjom dušikovih spojeva. Urea se sintetizira u jetri, djelomično reapsorbira u bubrezima te služi mikroorganizmima u buragu za sintezu njihovih proteina (Goff, 2015). Ako je u hrani više bjelančevina, povećava se količina amonijaka u buragu. Kada hrana sadrži više energije, amonijak i urea se brže troše. Stoga se količina ureje u serumu može koristiti kao pokazatelj odnosa između

bjelančevina i energije (Oltner i Wiktorson, 1983). Pretpostavka je da tijekom upalnih stanja krave glukozu više koriste u energetske svrhe, a manje za proizvodnju mlijeka, dok se masti značajnije iskorištavaju za proizvodnju mlijeka. Zbog katabolizma proteina i viška amonijaka iz buraga u jetri krava povećano se stvara urea. Urea lako prolazi stanične membrane i povišena koncentracije ureje i njen prolazak kroz mliječnu žlijezdu ima negativan utjecaj na proizvodnju i karakteristike mlijeka. Koncentracija ureje u krvi u negativno je korelaciji s količinom proizvedenog mlijeka u krava (Orozco-Hernandez i Brisson, 1995) dok je korelacija ureje i proteina u mlijeku također negativna (Chládek, 2002).

Koncentracija *ukupnih proteina* u serumu dobrim je pokazateljem razine proteina u hrani (Herdt, 2000). Proteini iz krvi izvorom su aminokiselina za procese u mliječnoj žlijezdi i glukoneogenezu u jetri (glukogene aminokiseline), koji su iznimno važni u prvim tjednima laktacije (Castillo i sur., 2005). Ako je unos bjelančevina oskudan, mliječna žlijezda će trošiti aminokiseline za sintezu kazeina, pa će se razina albumina polako smanjivati, jer se ne može nadomjestiti iz bjelančevina hrane. Ukupna se količina proteina u mlijeku kod mastitisa ne mijenja. Međutim, utvrđeno je smanjenje proteina koji se sintetiziraju u sekretornim stanicama (α -kazein, β -kazein, α -laktoglobulin, β -laktalbumin) te povećavanje proteina porijeklom iz krvi (serumski albumini i imunoglobulini). Značajno se povećava količina sirutkinih bjelančevina (albumina i globulina). Proteinski status daje informacije o koncentraciji ukupnih proteina, albumina, globulina i ureje u serumu. Najzastupljenije bjelančevine seruma su albumini i globulini dok u plazmi nalazimo i fibrinogen. Osnovna funkcija bjelančevina plazme je održavanje koloidno osmotskog tlaka, prijenos tvari, održavanje acidobazne ravnoteže, vezanje vode, zaštita od infekcije i procesi hemostaze u slučajevima krvarenja. Koncentracija bjelančevina u krvi ovisi o sintezi i stupnju hidriranosti, a najčešća odstupanja su smanjenje koncentracije albumina i povećanje neke od globulinskih frakcija (Štraus i Barišić, 2009). Nasuprot tome zabilježeno je i značajno povećanje razine ukupnog proteina u slučajevima subkliničkog mastitisa ali s neznačajnim povećanjem kod životinja s kliničkim oblikom, a što bi mogla biti posljedica povišenih razina proteina akutne faze nakon upalnog odgovora. (Sarvesha i sur., 2016). Povećana količina proteina u mlijeku posljedica je povećane sinteze proteina u mliječnoj žlijezdi, dok ukupno smanjenje količine serumskih proteina može biti uzrokovano potrošnjom globulina tijekom upale, zbog sinteze proteina akutne faze (APP).

Iako je glavno mjesto sinteze *albumina* u jetri iz koje oni putem krvotoka ulaze u mlijeko, glavni uzrok povećanja sadržaja albumina u mlijeku tijekom upalnih procesa je sama mliječna žlijezda (Batavani i sur., 2007). Zabilježeno je značajno smanjenje ukupnih serumskih proteina, albumina i globulina u krava s mastitisom (Krishnappa i sur., 2016; Sadek i sur., 2017; Saleh i sur., 2022), za koje navedeni autori smatraju da nastaje zbog povećane vaskularne propustljivosti i istjecanja albumina i drugih serumskih proteina u mlijeko. Albumin je protein negativne akutne faze koji odlazi u tkiva pogođena upalom zbog povećane vaskularne propusnosti. Snažan je antioksidans zbog tiolnih skupina, a smatra se markerom upale (Kaneko i sur., 2008). Tijekom odgovora akutne faze, proizvodnja albumina je smanjena, a aminokiseline u jetri koriste se za sintezu proteina akutne faze. Razgradnja albumina je brža tijekom stresa kada raste koncentracija glukokortikoida pa tako hipoalbuminemija u krvi može biti znakom bolesti ili stresa (Sadek i sur., 2017).

U enzimске pokazatelje zdravlja ubrajaju se aktivnost enzima glutamat dehidrogenaza (GLDH), alkalna fosfataza (ALP), gama-glutamil transferaza (GGT), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) i kreatin kinaza (CK). Aktivnost enzima koju određujemo u plazmi odražava stanje organa u kojemu se taj enzim proizvodi ili nalazi. Najčešće je riječ o oštećenju tkiva koje dovodi do propadanja stanica i pojačane propusnosti kapilara, zbog čega enzimi izlaze iz tkivne tekućine i odlaze u cirkulaciju. Glutamat dehidrogenaza (GLDH) najkorisniji je pokazatelj oštećenja stanica jetre. Hepatocelularno oštećenje nastaje pri svakoj upali jetre (akutnoga, subakutnoga ili kroničnoga tijeka), pri parazitarnim invazijama, trovanjima, pri masnoj infiltraciji jetre i svakom obliku nestašice kisika u jetrima (anemija). Povećana aktivnost tog enzima bit će i pri nekrozi ili zamašćenju jetre ili pri začepljenju žučovoda (kolestaza). Enzim gama glutamiltransferaza (GGT) nalazi se u većini stanica, osim mišićnih, najviše ga ima u četkastome porubu bubrega i epitelu žučovoda. Povećana aktivnost enzima događa se pri kolestazi (začepljenju žučovoda). GGT se nalazi u kolostrumu, pa može koristiti i kao mjera uspješne apsorpcije kolostruma u novorođene teladi. Aspartat aminotransferaza (AST) zadužena je za intracelularni metabolizam, stoga nema specifičnu funkciju u plazmi, ali otpušta se iz jetre ako su oštećene jetrene stanice zbog upala, nekroza, toksikoza. Stoga su povišene vrijednosti tog enzima u serumu znakom akutnoga ili kroničnoga oštećenja jetre. Budući da se nalazi i u mišićima, bubregu, gušterači i eritrocitima, ne možemo sa

sigurnošću znati iz kojeg tkiva potječe povećana aktivnost, ali najčešće je riječ o oštećenjima jetre, eritrocita i mišića. Alkalna fosfataza (AP) je enzim koji se nalazi u crijevu, bubregu, jetrima, kostima, ali je najjača aktivnost izražena u jetri i kostima. Stoga se povećana aktivnost evidentira pri oštećenjima tih tkiva. Fiziološki ćemo naći povećanu aktivnost AP-a u mlade teladi u porastu podrijetlom iz kostiju. Enzim se nalazi u membranama žučnih kanalića, stoga je povećanje aktivnosti više u vezi sa zastojem žuči i oštećenjem jetre povezanim s tim. Kreatin kinaza (CK) u visokim koncentracijama nalazi se u skeletnim mišićima, ali se nalazi i u srčanome mišiću, mozgu, crijevu, mokraćnome mjehuru, bubregu, štitastoj žlijezdi i gravidnoj maternici. Aktivnost enzima povezana je s oštećenjem tih tkiva, ali najvećim dijelom s oštećenjima mišićnoga tkiva. Stoga je taj pokazatelj dobar za indikaciju miopatija i miozitisa.

Aktivnosti navedenih enzima u mlijeku i krvi mliječnih krava Holstein pasmine mogu biti i korisni biomarkeri u ranoj dijagnostici subkliničkih mastitisa. Ovisno o njihovoj primarnoj lokaciji, kemijskoj strukturi i glavnoj funkciji u mlijeku, enzimi mogu biti prisutni u različitim fazama procesa mužnje. Prisutnost enzima u mlijeku može biti posljedica procesa koji uključuju aktivno izlučivanje iz apikalnih regija epitela mliječne žlijezde, spontane difuzije enzima niske mase iz plazme ili oslobađanje enzima iz somatskih stanica u izlučenom mlijeku, često leukocita ili drugih makrofaga (Kocić i sur., 2010). Subklinički mastitis uzrokom je približno 85% gubitaka proizvodnje mlijeka povezanih s mastitisom (Gurbulak i sur., 2009). Tijekom upale povećana je aktivnost enzima povezanih s upalnim odgovorom (Yagci, 2008). U mlijeku bolesnoga vimena povećana je aktivnost plazmina, kisele i alkalne fosfataze, katalaze, lipaze, ksantin-oksidaze, esteraze i laktat-dehidrogenaze (Kitchen, 1981; Harmon, 1994). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između aktivnosti enzima LDH, ALP i GGT u mlijeku i aktivnosti enzima u krvi (ALP i GGT) kod krava sa subkliničkim oblikom mastitisa. Rezultati mnogih istraživanja ukazuju na to da subklinički oblici mastitisa uzrokuju izrazite promjene aktivnosti enzima u mlijeku i krvi zaraženih krava, stoga vrijednosti enzima kao što su LDH, ALP, GGT, AST, ALT i dr. mogu biti korisni biomarkeri u ranoj dijagnostici mastitisa.

U neenzimske pokazatelje mogu se ubrojiti proteini akutne faze kao što su: AGP, CRP, Haptoglobin i SAA3. Proteini akutne faze (APP) su proteini koji se uglavnom proizvode u jetri i otpuštaju u serum, nakon podražaja upalnim citokinima, posebno s interleukinom-1 (IL-1), interleukinom-6 (IL-6) i faktorom nekroze tumora alfa (TNF α) u odgovoru akutne faze kao dijelu urođenog imunosnog odgovora. Prisutnost APP-a u tkivu

ili organu (tekućini) može se smatrati specifičnijim pokazateljem upale lokalizirane u tom organu, osobito kada ne postoji odgovarajući porast serumskog APP-a (Nielsen i sur., 2004). Stoga bi proteini akutne faze u mlijeku mogli biti specifični i osjetljivi pokazatelji intramamarnih infekcija (Gronlund i sur., 2005). Glavni APP su oni čija se koncentracija povećava do i preko 100 puta nakon upale.

1.1.3. Povezanost minerala i mastitisa u mliječnim krava

Vrijednosti minerala (Ca, P, Na, K, Cu, Mn, Fe i Zn) u obranom mlijeku ili u sirutki mogu se značajno promijeniti kao posljedicu poremećaja sekrecije u mliječnim žlijezdama i povećane propusnosti krvnih kapilara (Singh i Mathur, 1990). Dokazano je da infekcija mliječne žlijezde mijenja elemente u tragovima u mlijeku, npr. bakra, cinka i željeza (Middleton i sur., 2004). Verheijden i sur., (1983) otkrili su da mlijeko krave s upalom vimena sadrži nešto manje cinka od mlijeka zdravih životinja. Mohamed i sur., (1999) utvrdili su da promjene u razinama makromineralna u pojedinačnim uzorcima mlijeka mogu biti pokazatelji infekcije vimena ili četvrti. Štoviše, Mohamed i sur., (1999) zaključili su da utvrđivanje i praćenje razina nekih minerala (Ca, Na, K, Mg, P, Fe, Zn i Cu) u uzorcima mlijeka može biti učinkoviti alat za praćenje poremećaja mliječnih žlijezda goveda. Isti autori utvrdili su da se kod subkliničkog oblika mastitisa razina Cu u mlijeku smanjivala, dok se kod kliničkog oblika mastitisa razina povećavala. Također su utvrdili da se razina Zn povećavala kod kliničkog oblika mastitisa, a razina Fe povećavala sukladno težini same infekcije. Erskine i Bartlett (1993) utvrdili su da je eksperimentalno izazvan mastitis s bakterijom *E. coli* rezultirao prosječnom koncentracijom cinka, željeza i bakra u serumu od 28, 35 i 52% koncentracije prije infekcije. Brojna istraživanja ukazuju na to da se koncentracija Fe u serumu može koristiti kao marker akutne upale kod ljudi i nekih drugih životinjskih vrsta (Ward i sur., 1996; Sunder-Plamann i sur., 1999; Neumann, 2003; Borges i sur., 2007). Koncentracija Fe u serumu brzo se smanjuje kao odgovor na upalu. Ovaj obrambeni mehanizam domaćina ima za cilj uskratiti Fe potrebno za bakterijsku virulentnost i replikaciju (Borges i sur., 2007). Također je utvrđeno da se koncentracija Fe u serumu smanjila u životinja s eksperimentalno induciranom respiratornom bolesti goveda i mastitisom, ali nisu nađene povezanosti promjene koncentracije Fe s drugim pokazateljima upale, što ukazuje na to da koncentracija Fe u serumu može biti koristan alat za dijagnostiku upala kod goveda oboljelih od ovih bolesti (Lohuis i sur., 1990). Kalcij je

važnim makroelementom višestaničnih organizama, sudjeluje u brojnim funkcijama u organizmu. Strukturni je element u građi kostiju, a sekundarnimje glasnimkom u prijenost podražaja surjelujući tako u kontrakciji skeletne i glatke muskulature, uključujući sisni sfinkter. Sisni sfinkter i njegova aktivnost vrlo je važna jer pravovremenim zatvaranjem sfinktera nakon mužnje prevenira se ulazak mikroorganizama u vime (DeGaris i sur., 2008). Kimura i sur., (2006) utvrdili su u krava prije teljenja nižu koncentraciju kalcija u mononuklearnim stanicama periferne krvi što dovodi do razvoja hipokalcemije. Kalcij je važan i za aktivaciju imunosnih stanica pa njegov nedostatak vodi do imunosupresivnih stanja. Neki autori smatraju da je subklinička hipokalcemija važan čimbenik predispozicije za infekcije. Ducusin i sur., (2003) dokazali su smanjenu fagocitnu aktivnost neutrofila u slučajevima hipokalcemije. Hisaeda i sur., (2020) utvrdili su hipokalcemiju u krvi krava s perakutnim koliformnim mastitisom. Fosfor je sastavnim dijelom nukleinskih kiselina (DNA i RNA) i sadržan je u visokoenergetskim spojevima kao što je ATP (Grünberg i sur., 2014). Ovaj mineral služi za puferiranje pH tjelesnih tekućina (fosfatni pufer), a važnim je elementom u imunosnom odgovoru. Eisenberg i sur., (2019) utvrdili su da hipofosfatemija smanjuje fagocitnu aktivnost i broj granulocita u periodu tranzicije. Imunosupresija koja se javlja u periodu oko teljenja, razdoblju koje je izrazito stresno u životu krave, dobro je poznat predisponirajući faktor za zarazne bolesti kao što su mastitis ili metritis tijekom perioda rane laktacije (Kehrli i sur., 1989).

1.1.4. Aminokiseline u mlijeku

Razvijena je i validirana brza metoda za mjerenje aminokiselina u mlijeku. Metoda uključuje nekoliko koraka, a prvi korak je hidroliza mliječnih proteina, nakon čega slijedi derivacija i odvajanje aminokiselina tekućinskom kromatografijom (HPLC). Šest kombinacija sredstava za hidrolizu i temperaturno-vremenskih uvjeta uspoređeno je s referentnom metodom i poboljšani su postupci derivacije kao i HPLC separacija. Hidroliza uzoraka mlijeka sa 6 N HCl na 160°C tijekom 60 minuta nije rezultirala značajnim razlikama u odnosu na referentnu metodu, ali je omogućila analizu većeg broja uzoraka mlijeka u kratkom vremenu. Osim toga, brzu metodu za mjerenje aminokiselina u mlijeku karakterizira visoka preciznost, nizak koeficijent ponovljivosti i visoka točnost za sve procijenjene aminokiseline (Marino i sur., 2010). Proučavanjem aminokiselinskog spektra mlijeka u krava zaraženih mastitisom jasno je dokazana ovisnost između pogoršane

kakvoće mlijeka i promjena sadržaja aminokiselina tj. sadržaj aminokiselina se povećavao s povećanjem pozitivnosti mastitis testa. Koncept da se koncentracije metabolita mijenjaju tijekom mastitisa (čak i u subkliničkoj fazi) je dobro poznat (Pyörälä, 2003; Baeker i sur., 2002). Sukladno tome, u prethodnim istraživanjima (Andrei i sur., 2001; Ianni i sur., 2015) utvrđeno je da se ukupni sadržaj aminokiselina u mlijeku značajno povećava kod mastitisa u usporedbi s normalnim mlijekom, a to se posebno odnosi na povećanje nekih aminokiselina, uključujući one razgranatih lanaca i aromatske aminokiseline. Polenska (1991) je utvrdila da je koncentracija svih aminokiselina smanjena u prosjeku za 1,9 posto u mlijeku s 500 000 do 1 milijun somatskih stanica u jednom ml, dok je u prosjeku porasla za 47 posto u mlijeku s 1-5 milijuna somatskih stanica, 87 posto u uzorcima s 5-10 milijuna somatskih stanica, a čak za 100 posto u mlijeku s 10-20 milijuna somatskih stanica u 1 ml mlijeka. Asparaginska kiselina, treonin, serin i alanin pokazali su najosjetljivije odgovore na promjenu broja somatskih stanica, s druge strane, glutaminska kiselina i fenilalanin pokazali su najmanju osjetljivost u svom odgovoru.

Iako je u određenoj mjeri pronađen odnos između vrijednosti broja somatskih stanica i izoleucina, leucina i sadržaja tirozina u kravljem mlijeku, ostaju pitanja u vezi s biokemijskim mehanizmima koji leže u pozadini ovih odnosa. Jasno je da bi mogla postojati velika klinička vrijednost praćenja razine izoleucina i leucina u mlijeku te bi ona mogla predstavljati novi potencijalni alat za brzu dijagnozu subkliničkog mastitisa kod krava.

Vrlo niske koncentracije slobodnih aminokiselina su normalne za sirovo mlijeko. Visoke razine aminokiselina utvrđene su u prvim mlazevima mlijeka sa visokim sadržajem bakterija i u mlijeku krava sa subkliničkim mastitisom. Stoga se može postaviti hipoteza da je sadržaj aminokiselina u sirovom mlijeku povezan s mastitisom i posljedično tome s bakterijskom aktivnošću u vimenu.

1.1.5. Proteini akutne faze (APP)

Proteini akutne faze (APP) već se dugo koriste u humanoj medicini za dijagnozu i prognozu upalnih stanja, a njihova je analiza postala značajan dijagnostički alat u veterinarskoj medicini (Ceciliani, 2012). Proteini akutne faze (APP) su proteini koji se uglavnom proizvode u jetri i otpuštaju u serum, nakon podražaja upalnim citokinima, posebno s interleukinom-1 (IL-1), interleukinom-6 (IL-6) i faktorom nekroze tumora alfa

(TNF α) u odgovoru akutne faze kao dijelu urođenog imunološkog odgovora (Chemonges i sur., 2014; Eckersall i sur., 2001). Glavni APP su oni čija se koncentracija povećava do i preko 100 puta nakon upale. U goveda su glavni APP serumski amiloid A (SAA) i haptoglobin (Hp). Prisutnost APP-a u tkivu ili organu (tekućini) može se smatrati specifičnijim pokazateljem upale lokalizirane u tom organu, osobito kada ne postoji odgovarajući porast serumskog APP-a (Nielsen i sur., 2004). Stoga bi proteini akutne faze u mlijeku mogli biti specifični i osjetljivi pokazatelji intramamarnih infekcija (Gronlund i sur., 2005). Haptoglobin (Hp) je tetramerni protein sastavljen od dvaju α (~20 kDa) i dvaju β lanca (~35 kDa) povezanih disulfidnim vezama. Postoji u goveđem serumu u polimernim oblicima i veže se za slobodni hemoglobin (Hb), prenoseći ga iz krvi u jetru gdje se Hb reciklira (Morimatsu i sur., 1991). Migrirajući neutrofili, tkivo mliječne žlijezde, somatske stanice ili serum mogu biti izvori Hp u mlijeku tijekom mastitisa (Hiss i sur., 2004; Thielen i sur., 2007; Lai i sur., 2009; Thielen i sur., 2005; Thielen i sur., 2006). Haptoglobin se može ispitati izravno detekcijom protutijela pomoću imunotestova kao što je enzimski imunotest (ELISA) i jednostruka radijalna imunodifuzija (Morimatsu i sur., 1992), kao i neizravno mjerenjem aktivnosti Hb peroksidaze iskorištavanjem visokog afiniteta vezanja Hp na slobodni Hb (Eckersall i sur., 1999). Izravni imunotestovi koji koriste protutijela imaju prednost zbog veće osjetljivosti od testova koji koriste vezanje Hb-a. Serumski amiloid A (SAA) je protein akutne faze koji sadrži nekoliko vrsta proteina i poznato je da se prvenstveno proizvodi u jetri kao odgovor na podražaj akutne faze. Studije su također pokazale da se proizvodi iz mnogih drugih ekstrahepatičkih tkiva uključujući mliječnu žlijezdu (McDonald i sur., 2001; Jacobsen i sur., 2005; Eckersall i sur., 2006). To je mali protein molekularne težine između 10-17 kDa s oko 112 aminokiselinskih ostataka (Rossevatn i sur., 1992), a njegovi glavni izoformi su SAA1, SAA2 i SAA3, pri čemu se SAA1 i SAA2 proizvode u jetri, dok se SAA3 proizvodi u ekstrahepatičkim tkivima. Protein akutne faze koji se pretežno nalazi u mlijeku naziva se amiloid A (M-SAA3; McDonald i sur., 2001). Dokazalo se da proteini akutne faze, Hp i M-SAA3 koreliraju s brojem somatskih stanica i bakterijskom infekcijom u slučajevima subkliničkih i kliničkih mastitisa izazvanih prirodnom (Eckersall i sur., 2001; Nielsen i sur., 2004; Kalmus i sur., 2013) i eksperimentalnom (Jacobsen i sur., 2005; Eckersall i sur., 2006; Hirvonen i sur., 1996; Larsen i sur., 2010; Pedersen i sur., 2003) infekcijom, stoga se mogu nazvati dijagnostički markeri upale vimena.

1.1.6. Kondicija

Kondicija (lat. *conditio* – stanje) je relativna količina potkožne tjelesne masti ili rezerve energije u kravi. Postoje različite metode procjene i ocjene indeksa tjelesne mase (BCS). Nastojanje stočara i uzgajivača je održati životinju u kondiciji optimalnoj za njihovu dob, namjenu i fiziološko stanje. Ne nasljeđuje se, lako je promjenjiva i može se djelomično utjecati na nju. Na kondiciju najviše utječu hranidba, trening i njega. Wildman i sur. (1982) razvio je sustav bodovanja od 5 točaka (1-5) za mjerenje relativne količine potkožne tjelesne masti. Predebele krave u vrijeme teljenja ($BCS > 4,0$) češće imaju reproduktivnih problema. Nedovoljna priprema pri teljenju ($BCS < 3,0$) često rezultira nižim prinosom mlijeka u vrhu laktacije i manjom ukupnom količinom mlijeka. Krave ne bi trebale izgubiti više od 1,0 bod procjene indeksa tjelesne mase rane laktacije. Pretjerani gubitak indeksa tjelesne mase također smanjuje reproduktivnu sposobnost.

Kondicija se određuje prema vanjskom izgledu životinje. Gleda se prominentnost koštanih izbočina zdjelice, repa, prsnog koša i stanje abdomena. U početku sustav ocjene tjelesne kondicije razvijen je za holštajn frizijsku pasminu, a zatim je, uz manje modifikacije, primijenjen i na ostale pasmine goveda (kombinirane i tovne). Procjena je iznimno korisna jer je npr. stanje krava pri teljenju povezano s duljinom postporođajnog anestrusa, kasnijom laktacijom, kao i zdravljem i snagom novorođene teladi. Sve je to ovisno o hranidbi i držanju krave i poznavanje promjena može ukazati pravovremeno na potrebne promjene i ispravljanje nedostataka.

Vrlo važna razdoblja za procjenu kondicije su teljenje i početak laktacije. To su krizna razdoblja u kojima mnoge stvari mogu krenuti neželjenim tijekom. Ako krava ulazi u partus u optimalnoj kondiciji, veća je vjerojatnost da teljenja biti laka i bez potrebe za upotrebom pojačane snage (pomoć pri teljenju), krava neće gubiti puno tjelesne mase odmah poslije porođaja i brže će se adaptirati na hranidbu u laktaciji. Ocjena kondicije vrlo je korisna za organizaciju suhostaja radi osiguranja lakog teljenja. Tjelesna kondicija svake krave izravno je povezana uz dugovječnost, zdravlje, reproduksijska svojstva i proizvodnju mlijeka.

1.1.6.1. Ocjena tjelesne kondicije

Ocjena tjelesne kondicije vrijednim je pokazateljem rada stočara jer daje informacije o stanju stada prije ocjene, za vrijeme ocjene, te nagovještava mogućnost određenih teškoća u narednom razdoblju. Stoga je postala nezaobilaznim dijelom menadžmenta stada mliječnih krava. Ciljevi ocjene kondicije su imati kontrolu nad promjenama kondicije i mogućnost pravovremenih promjena kako bi se izbjegle štete zbog pogrešaka u hranidbi. U početku laktacije ocjena kondicije indikatorom je pretjeranog gubitka tjelesne mase, što dovodi do metaboličkih problema. Iznadprosječna kondicija ili debljina često je uzrokovana lošom hranidbom ili lošim reprodukcijским menadžmentom. Debele krave češće obolijevaju, imaju više metaboličkih poteškoća i učestalija su teška teljenja. Krave slabe kondicije daju manju količinu mlijeka i niži sadržaj mliječne masti. Mršave krave često i ne pokazuju znakove tjeranja ili imaju tihi estrus. Sustav ocjene tjelesne kondicije koristan je i u menadžmentu hranidbe junica. Mršave junice sporije rastu pa mogu biti premalene u vrijeme teljenja. Debele junice se teško tele, što može dovesti do slabog razvoja mliječne žlijezde. Na taj način junicama je snižen životni proizvodni potencijal.

Dva najvažnija područja ocjene kondicije su:

1. Repno područje – zdjelica sa sjednom kvrgom
2. Leđno područje – slabinski dio

Tijekom godina razvijani su različiti sustavi ocjenjivanja kondicije. Ovisno o sustavu ocjenjivanja ocjene se kreću u intervalu 1 – 5 (Ferguson i sur., 1994). Ocjena 1 označava vrlo mršavu, a ocjena 5 vrlo debelu (masnu) kravu. Ovo su ekstremne ocjene i pojava ovako ocijenjenih krava u stadu vrlo je ozbiljan znak upozorenja uzgajivaču. Preciznije ocjenjivanje može se koristiti dodavanjem + ili – ocjeni ili 0,5 odnosno 0,25 boda između pojedinih ocjena. Ovo dodavanje može se primijeniti tek nakon što se stekne određeno iskustvo u ocjenjivanju.

Berry i sur. (2007) utvrdili su da povećanje indeksa tjelesne mase prilikom telenja povezano sa smanjenjem broja somatskih stanica u primipara, ali dovodi do povećanja SCC u multipara.

1.2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

Glavni cilj planiranog istraživanja je utvrditi povezanost određenih pokazatelja u mlijeku i krvi krava i pojavnosti upale mliječne žlijezde u cilju otkrivanja biomarkera za neinvazivno i brzo otkrivanje promjena u mliječnoj žlijezdi i dijagnozi mastitisa. Cilj je

utvrditi procijenjene srednje vrijednosti biomarkera u pojedinim četvrtima vimena s obzirom na broj somatskih stanica, pojavnost mikroorganizama, broju liječenja mastitisa i kondicije.

Stoga je potrebno realizirati sljedeće ciljeve:

1. utvrditi broj somatskih stanica (SSC) u svakoj četvrti vimena prema referentnoj metodi HRN EN ISO 707 i odrediti razrede broja somatskih stanica. 1. $SCC \leq 200000$; $SCC > 200000 \leq 400000$, 3. $SCC > 400000$,
2. utvrditi metaboličke pokazatelje u krvi i mlijeku,
3. utvrditi slobodne aminokiseline u mlijeku,
4. odrediti proteine akutne faze u mlijeku,
5. utvrditi povezanost između broja somatskih stanica, proteina akutne faze, metaboličkih pokazatelja u krvi i aminokiselina mlijeka,
6. odrediti procijenjene srednje vrijednosti (LSM) istraživanih pokazatelja u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica, porijeklu uzročnika mastitisa, dijagnosticiranih uzročnika vimena, broja liječenja upale vimena i kondicije.

Istraživanje se temelji na hipotezi da neki proteini akutne faze i neke slobodne aminokiseline u mlijeku mogu biti biomarkeri za rano utvrđivanje mastitisa. Pretpostavlja se da postoji povezanost između pojedinih indikatora metaboličkog i zdravstvenog statusa mliječnih krava, pa je cilj utvrditi koji su biomarkeri dobri prediktori mastitisa.

2. MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje je provedeno na 151 kravi holštajn pasmine od 2. do 5. laktacije prosječne proizvodnje mlijeka veće od 30 L. Uzorci mlijeka uzimani su tijekom jutarnje mužnje nakon pranja i dezinfekcije vimena i sisa, metodom uzorkovanja koja je u skladu s hrvatskom normom HRN EN ISO 707 „Mlijeko i mliječni proizvodi – Poduka za uzorkovanje“. Prva dva mlaza mlijeka su odbačena kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka. Jedan uzorak uzet je u sterilne epruvete za mikrobiološku analizu, a drugi je spremljen za određivanje aminokiselina, proteina akutne faze i biokemijske pokazatelje. Tjelesna kondicija (indeks tjelesne mase, BCS, eng. body condition score) utvrđen je prema metodi Wildman i sur. (1982), na proizvodnoj farmi.

2.1. Određivanje kvalitete mlijeka

Uzorke mlijeka za određivanje kvalitete mlijeka (sadržaj mliječne masti, bjelančevina, laktoze, te broj somatskih stanica) uzeli smo u epruvete s konzervansom te analizirali u Središnjem laboratoriju za kontrolu kvalitete mlijeka (SLKM) HAPIH-a. Uzorci su analizirani prema akreditiranim laboratorijskim metodama, infracrvenom spektrofotometrijom za određivanje udjela mliječne masti, bjelančevina, laktoze i ureje. U SLKM koriste se MilkoScan FT 6000 analizator i MilkoScan 7 RM.

2.2. Određivanje broja somatskih stanica u mlijeku

Broj somatskih stanica odredili smo referentnom mikroskopskom metodom HRV EN ISO 13366-1:1999 iz mlijeka uzorkovanog po četvrtima. Nakon pranja i dezinfekcije sise izmuzli smo srednji mlaz mlijeka. Uzorak smo zagrijali na 40°C, zatim ohladili na 20°C. Mikropipetom smo uzeli 0,01 mL uzorka i ravnomjerno nanijeli na predmetno stakalce na površinu od oko 20 mm x 5 mm. Predmetno staklance smo dobro osušili i potopili u obojenu otopinu s metilenskim modrilom 10 minuta, zatim isprali destiliranom vodom. Nakon toga stanice smo izbrojili pod mikroskopom i zapisali rezultat.

Radni faktor smo izračunali po sljedećoj formuli:

$$Wf = 20 \times 100 / d \times b$$

Wf = radni faktor

d = numerička vrijednost promjera mikroskopskog polja u mm

b = ukupan broj izbrojanih traka

Prebrojali smo 5 mm dužine svake trake. Broj somatskih stanica pomnožili smo s radnim faktorom da bi se dobio broj stanica u 1 mL uzorka.

Broj somatskih stanica / mL = broj izbrojanih somatskih stanica $\times$ wf

Iz dobivenog seta podataka, uzorke smo grupirali prema fiksnom efektu broja somatskih stanica u razrede:

1. razred s dozvoljenim brojem somatskih stanica (ispod 200 000), karakterizirane kao zdrave četvrti,
2. razred s povišenim brojem somatskih stanica (200 000- 400 000); karakteriziran kao subklinički mastitis i
3. razred s visokim brojem somatskih stanica ($>400\ 000$ u ml); karakteriziran kao mastitis.

2.3. Bakteriološka pretraga mlijeka

Bakteriološku pretragu uzoraka mlijeka napravili smo prema akreditiranoj metodi SOP Z-II-3-07 Rev.04. Vime smo oprali mlakom vodom, zatim posušili papirnim rupčićem za jednokratnu uporabu i obrisali rupčićem s dezinficijensom. Nakon izmuzivanja prvih nekoliko mlazova mlijeka, vrhove sisa i ruke temeljito smo dezinficirali vatom namočenom 70%-tnim alkoholom. Uzorke iz svake pojedinačne četvrti uzimali smo u prethodno označene sterilne plastične epruvete. Prilikom samog uzimanja uzoraka sekreta vimena epruvetu smo držali u kosom položaju, što više nagnutu vrhom prema vodoravnoj osi kako bismo spriječili moguće zagađenje sadržaja epruvete stajskim zrakom. S jednim ili dva mlaza namuzli smo u epruvetu oko 10 ml sekreta vimena. Uzorke smo transportirali na ledu i do obrade čuvali pri $+4\ ^\circ\text{C}$ i obradili u laboratoriju odmah po zaprimanju. Uzorak svake pojedinačne četvrti nacijepili smo na četvrtinu površine Petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu eskulin krvni agar. Pritom smo koristili mikrobiološku ušicu promjera 10 mm za jednokratnu uporabu. Nacijepljene hranjive podloge inkubirali smo u termostatu pri $37\ ^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata nakon čega smo pristupili kontroli porasta kolonija na površini hranjive podloge. Ostatak uzorka inkubirali smo tijekom noći na $37\ ^\circ\text{C}$. Inkubirane uzorke nacijepljivali smo na polovicu površine hranjive podloge i inkubirali na isti način. Nakon inkubacije nacijepljene hranjive podloge pristupili smo determinaciji poraslih bakterijskih kolonija. Pri tome smo u obzir uzimali morfološke (oblik, veličinu i strukturu kolonija) i fiziološke osobine (stvaranje pigmenta, izazivanje

CAMP fenomena, razgradnja eskulina, sposobnost zgrušavanja kuniće plazme, bojenje po Grammu). Kolonije smo diferencirali prema morfološkim i fiziološkim osobinama: izgledu, veličini, obliku, boji, izraženosti hemolize, površini kolonije i njenim rubovima te sposobnosti tvorbe pigmenta. Porast najmanje triju istovrsnih kolonija smatra se pozitivnim nalazom, a izdvojena bakterijska vrsta ili rod smatraju se uzročnikom. Hranjive podloge bez vidljivih kolonija inkubiraju se 48 sati, a ako nema porasta bakterijskih kolonija, uzorak se smatra negativnim. Porast triju ili više različitih tipova kolonija najvjerojatnije je rezultat zagađenja uzorka te se uzorak proglašava zagađenim. Kolonije koje nije moguće identificirati morfološki na eskulin krvnom agaru, precjepuju se na selektivne i diferencijalne podloge.

Bakterijske kolonije koje su porasle na krvnom agaru s eskulinom, a morfološki su odgovarale streptokokima, podvrgnuli smo CAMP testu na sljedeći način. Na površinu hranjive podloge eskulin krvni agar nacijepili smo u obliku pruge cijelim promjerom Petrijeve ploče beta-hemolitični soj bakterije *Staphylococcus aureus*. Izdvojene sojeve streptokoka nacijepili smo okomito na ovu prugu na udaljenosti 6-12 mm. Petrijeve ploče s nacijepljenim bakterijama inkubirali smo pri 37 °C tijekom 24 sata nakon čega smo pristupili prosudbi porasta bakterija i determinaciji streptokoka prema navedenoj shemi.

Kolonije porasle na krvnom agaru s eskulinom koje su morfološkim osobinama odgovarale stafilokokima precijepili smo na Baird-Parkeru (BP). Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata pri 37 °C istražili smo sposobnost tvorbe koagulaze poraslih kultura. U tu svrhu koristili smo kuniću plazmu. Test smo načinili tako što smo u 2 ml sterilne kuniće plazme suspendirali punu mikrobiološku ušicu kolonija poraslih na BP agaru. Pojavu zgrušavanja ove suspenzije provjerili smo nakon 4 i 24 sata inkubiranja pri 37 °C. Izdvojene sojeve koji su stvarali žućkasti pigment te izazvali zgrušavanje kuniće plazme proglasili smo vrstom *Staphylococcus aureus*.

Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju mastitis mogu se podijeliti u dvije kategorije: zarazni (infektivni) uzročnici, koji se prenose s krave na kravu, prvenstveno tijekom procesa mužnje, i uzročnici iz okoliša. Najvažniji zarazni (infektivni) uzročnici su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Corynebacterium bovis*, dok su najvažniji okolišni uzročnici *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* i drugi Gram-pozitivni i katalaza-negativni koki (ostali streptokoki).

2.4. Metabolički pokazatelji u mlijeku

Pomoću automatskog biokemijskog analizatora Becman Coulter AU 400 odredili smo metaboličke pokazatelje u serumu mlijeka koje smo pripremili nakon odvajanja mlječne masti i homogeniziranja pomoću vortex uređaja. U mlijeku smo izmjerili sljedeće pokazatelje: enzime aspartat aminotransferazu (AST), alkalnu fosfatazu (ALP), gama glutamiltransferazu (GGT), metabolite glukozu, ureju, ukupne proteine, albumin, željezo, kalcij i fosfor.

2.5. Aminokiselinski sastav mlijeka

Slobodne aminokiseline mlijeka odredili smo prema modificiranoj metodi Marino i sur. (2010.) i Uredbi EU HR03-006-2013. Iz uzoraka mlijeka mast smo uklonili centrifugiranjem, mlijeko smo razrijedili 5% sulfosalicilnom kiselinom u omjeru 1:1. Nakon taloženja koekstrahirane dušične makromolekule profiltrirali smo s PES 0,2 µm filterom, a u 180 µL filtrata dodali smo interni standard norvalina 20µL.

Aminokiseline (AA) smo određene tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC, eng. High Performance Liquid Chromatography; serija 1260, Infinity II, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Sustav se sastojao od kvaterne pumpe opremljene mikro vakuumskim degazerom, autosemplerom s termostatom, odjeljkom za kolonu, fluorescentnim detektorom (model G7121B 1260 Infinity II FLD Spectra). Prije injektiranja, AA su derivatizirane koristeći o-ftalaldehid (OPA) za primarne AA i 9-fluorenilmetil kloroformat (FMOC) za sekundarne AA prema modificiranoj metodi Hendersona i sur. (2000), kako bi se optimizirali pokazatelji za analizu mlijeka. Količine koje su injektirane: 26 µL boratnog pufera pomiješanog s 0,1 µL uzorka, 0,3 µL OPA, 0,3 µL FMOC reagensa i 16 µL vode HPLC čistoće. Analize smo izveli koristeći Zorbax Eclipse AAA kolonu (150 × 4.6 mm, punjenu 3.5 µm česticama; Palo Alto, CA); temperatura kolone je bila postavljena na 40°C. Mobilna faza sastojala se od 40 mM NaH₂PO₄·H₂O otopine (faza A) i mješavine vode, metanola i acetonitrila (10:45:45 vol/vol/vol; faza B). Eluciju uzoraka izvedili smo brzinom protoka od 2.0 mL/min pomoću gradijentne elucije, a ukupno vrijeme rada je bilo 30 minuta. Fluorescentnu detekciju proveli smo na 340 nm (ekscitacija) i 450 nm (emisija). Pojedinačne vrhove aminokiselina identificirali smo usporedbom njihovih vremena zadržavanja s onima standarda (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO). Devetsto mikrolitara standardne mješavine otopine 17 AA (Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Cys, Val, Met, Phe, Ile, Leu, Lys, i Pro) u koncentraciji od 1 nmol/ μ L i 100 μ L Asn, Gln, i Trp u 9 nmol/ μ L pomiješali smo u bočici kako bi se dobile standardne otopine s koncentracijom od 900 pmol/ μ L za svaku aminokiselinu. Količina aminokiselina izražena je u μ mol/L.

2.6. Proteini akutne faze u mlijeku

Odredili smo četiri proteina akutne faze: C reaktivni protein (CRP), haptoglobin (HP), mamarni amiloid A (M-SAA3) i alfa 1 kiseli glikoprotein (AGP). Za determinaciju i određivanje koncentracije koristili smo imunenzimske testove (ELISA metoda; Life Diagnostics Inc., West Chester, USA), a prema uputama proizvođača. Koncentracija proteina akutne faze izražena je u μ g/ml.

2.7. Metabolički pokazatelji u krvnoj plazmi

Krv smo izvadili iz repne vene u epruvete s Li-heparinom, centrifugirali ju, odvojili plazmu i smrznuli na -80 °C do analiza. Metabolički pokazatelji u plazmi određuju se u cilju utvrđivanja grešaka u hranidbi koje pogoduju razvoju mastitisa.

Primjenom biokemijske analize odredili smo metabolite, enzime i minerale u plazmi biokemijskim automatskim analizatorom Becman Coulter AU 400. Odredili smo sljedeće pokazatelje: glukozu, ukupne proteine, albumine, trigliceride i beta hidroksimaslačnu kiselinu (BHB), enzime aspartat aminotransferazu (AST), alkalnu fosfatazu (ALP), gama glutamiltransferazu (GGT), minerale Ca, P, Fe. Metaboliti glukoza, ukupni protein, albumini, trigliceridi i beta hidroksimaslačna (BHB) indikatori su energetske opskrbe organizma. Aktivnost enzima ukazuje na stanje jetre, a minerali pomažu u dijagnostici zdravlja i kontroli hranidbenih potreba.

2.8. Statistička analiza

Za statističku analizu utvrđenih pokazatelja, odnosno utvrđivanje varijabilnosti, analiziranju varijanci za procjenu značajnosti utjecaja zdravstvenog statusa životinje na analizirane grupe svojstava koristili smo SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2019).

Tijekom analitičkog dijela istraživanja, temeljem statističke analize prikupljenih i objedinjenih baza podataka utvrdili smo sljedeće:

- varijabilnost i kovarijabilnost dnevnih proizvodnih svojstava (dnevna količina mlijeka, dnevni sadržaj mliječne masti i proteina i biokemijskih pokazatelja u uzorcima krvne plazme i mlijeka krava iz svake pojedine četvrti,
- distribucija aminokiselina i ostalih pokazatelja te se upotrijebila najbolja statistička metoda za određeni pokazatelj,
- utvrđena je povezanost istraživanih pokazatelja i prikazane su tablično procijenjene srednje vrijednosti s obzirom na razrede broja somatskih stanica,
- utvrđena je varijabilnost i postojanje statističkih razlika u koncentracijama aminokiselina, metaboličkih pokazatelja i proteina akutne faze u mlijeku zdravih, subkliničkih i klinički bolesnih četvrti,
- utvrđena je varijabilnost metabolita u krvi krava s obzirom na broj zahvaćenih četvrti, prisutnost uzročnika, kondiciju, broj liječenja i SCC.

Rezultate smo prikazali s obzirom na različite fiksne efekte pojedinih razreda: s obzirom na SCC, tri različita razreda ($SCC \leq 200000$ –zdrave četvrti; $SCC > 200000$ i $SCC \leq 400000$ – četvrt sa subkliničkim mastitisom; $SCC > 400000$ – četvrti s mastitisom). Nadalje, obzirom na pojavnost mikroorganizama u mlijeku, uzorke smo prikazali u dva različita razreda (N – uzorak bez detektiranog uzročnika, D – uzorak sa detektiranim uzročnikom). U ovisnosti o porijeklu mikroorganizama u uzorku, uzorke smo podijelili u dva razreda (O – uzročnici iz okoliša, I – infektivni uzročnici). Ovisno o broju tretmana mastitisa, uzorci su podijeljeni u tri razreda (1 – jedan tretman mastitisa, 2 – dva tretmana mastitisa, 3 – tri tretmana mastitisa). U ovisnosti o ocjeni kondicije (BCS) životinje smo podijelili u dva razreda ($BSC < 3.5$ –niža ocjena, $BSC \geq 3.5$ –viša ocjena kondicije). Uzimajući u obzir redoslijed laktacije, na raspolaganju su nam bila tri različita razreda: 2., 3., i 4.+.

Utjecaj razreda sukladno SCC; razreda pojavnosti mikroorganizama u mlijeku; razreda prema porijeklu mikroorganizama; razreda prema broju tretmana mastitisa; te razreda prema ocjeni tjelesne kondicije na analizirane skupine svojstava utvrdili smo pomoću sljedećeg statističkog modela:

$$y_{ijkl} = \mu + b_1(d_i/305) + b_2(d_i/305)^2 + b_3 \ln(305/d_i) + b_4 \ln^2(305/d_i) + P_j + E_k + e_{ijkl}$$

Gdje je:

y_{ijkl} = svojstvo procijenjeno modelom;

μ = intercept;

b_1, b_2, b_3, b_4 = regresijski koeficijenti;

d_i = stadij laktacije ($i = 6$ to 300 dan);

P_j = fiksni efekt redoslijeda laktacije j ($j = 2., 3., 4$);

E_k = fiksni efekt testiranih razreda k (ovisno o broju somatskih stanica (SCC); razreda pojavnosti mikroorganizama u mlijeku; razreda prema porijeklu mikroorganizama; razreda prema broju tretmana mastitisa; te razreda prema ocjeni tjelesne kondicije);

e_{ijkl} = pogreška modela.

Signifikantnost razlika između procijenjenih srednjih vrijednosti testirali smo Scheffeovom metodom višestrukih usporedbi koristeći GLM proceduru SAS (SAS Institute Inc., 2019) i rezultati su prikazani na razini značajnosti od $P < 0,05$.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Proizvodni pokazatelji

Od proizvodnih pokazatelja pratili smo prosječne vrijednosti dnevne količine mlijeka izražene u kilogramima, dnevnom sadržaju mliječne masti izraženog u postotcima, dnevnom sadržaju bjelančevina izraženog u postotcima i broju somatskih stanica. U Tablici 1. prikazani su osnovni statistički pokazatelji dnevnih svojstava mliječnosti svih krava koje su sudjelovale u pokusu. Prikazane su: srednja vrijednost, standardna devijacija, koeficijent varijabilnosti te minimalne i maksimalne vrijednosti svih krava koje su bile u pokusu.

Tablica 1. Osnovni statistički pokazatelji dnevnih svojstava mliječnosti krava u pokusu

Pokazatelj	$\bar{x}$	SD	CV, %	Min	Max
Dnevna količina mlijeka, kg	36,73	9,93	27,04	10,70	55,70
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	4,07	1,36	33,29	2,29	8,64
Dnevni sadržaj bjelančevina, %	3,31	0,36	10,78	2,66	4,01
Broj somatskih stanica	2.615.649,65	3.343.826,72	127,83	14.772,73	10.844.296,59

$\bar{x}$ = srednja vrijednost; SD = standardna devijacija; CV = koeficijent varijabilnosti; Min = minimum; Max = maksimum

Vrijednosti koeficijenta korelacije između dnevne količine mlijeka, dnevnog sadržaja mliječne masti, dnevnog sadržaja bjelančevina i broja somatskih stanica pokazuju značajnu i jaku povezanost (Tablica 2).

Tablica 2. Koeficijenti korelacije između dnevnih svojstava mliječnosti krava u pokusu

	DKM	DSM	DSB	SCC
DKM	0.902 <.0001	0.908 <.0001	0.920 <.0001	0.921 <.0001
DSM		0.912 <.0001	0.873 <.0001	0.891 <.0001
DSB			0.870 <.0001	0.901 <.0001
SCC				0.899 <.0001

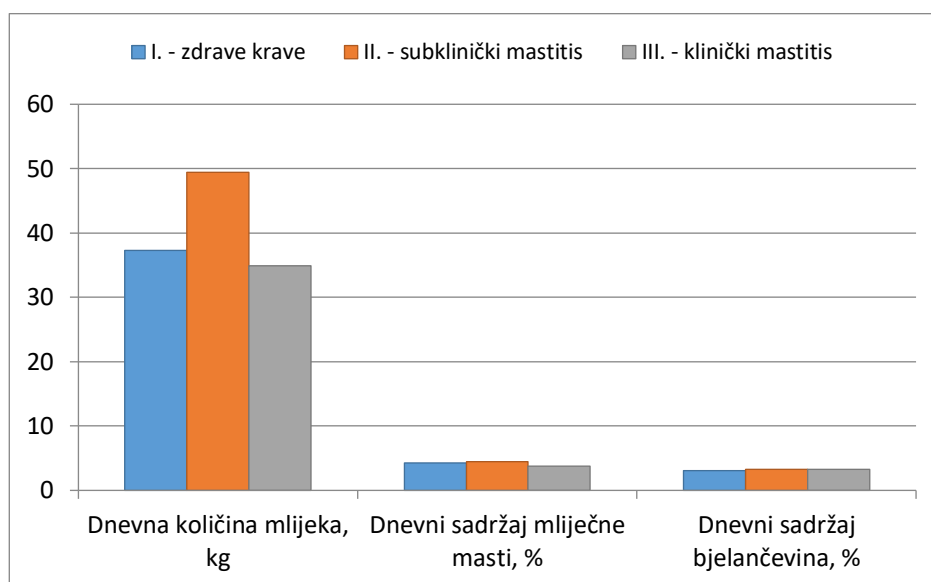
DKM – dnevna količina mlijeka, kg; DSM – dnevni sadržaj mliječne masti, %; DSB – dnevni sadržaj bjelančevina, %; SCC – broj somatskih stanica

U Tablici 3. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je najviša dnevna količina mlijeka (49,44 kg), najviši dnevni sadržaj mliječne masti (4,43 %) i najviši dnevni sadržaj bjelančevina (3,24 %) zabilježen kod krava iz II. skupine koje su na mjesečnoj kontroli mliječnosti imale povišen broj somatskih stanica (200 000 - 400 000 u ml).

Tablica 3. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

Pokazatelj	I. NB < 200.000	II. PB 200.000– 400.000	III. VB > 400.000
Dnevna količina mlijeka, kg	37,32	49,44	34,88
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	4,25	4,43	3,80
Dnevni sadržaj bjelančevina, %	3,10	3,25	3,24

I. NB – krave s normalnim brojem SS; II. PB – krave s povišenim brojem SS; III. VB – krave s visokim brojem SS



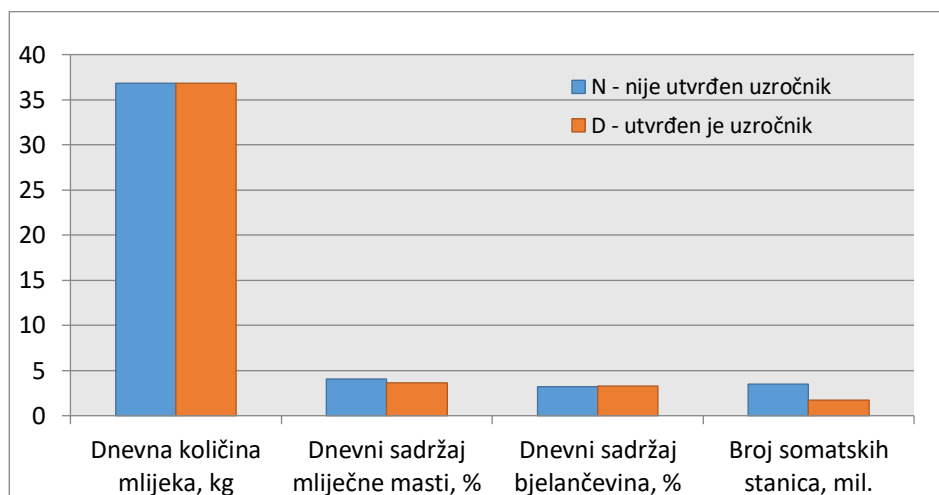
Grafikon 1. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

U Tablici 4. i Grafikonu 2. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Dnevni sadržaj mliječne masti (4,05 %) bio je viši kod I. skupine krava kod kojih nije utvrđen uzročnik u mlijeku. Također broj somatskih stanica (3.502.535,89) viši je kod I. skupine krava. Viši dnevni sadržaj bjelancevina (3,27 %) zabilježen je u skupini krava kod kojih je utvrđen uzročnik u mlijeku.

Tablica 4. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

Pokazatelj	I. N	II. D
Dnevna količina mlijeka, kg	36,81	36,81
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	4,05	3,64
Dnevni sadržaj bjelancevina, %	3,20	3,27
Broj somatskih stanica, mil.	3.502.535,89	1.664.170,24

N – nije utvrđen uzročnik; D – utvrđen je uzročnik



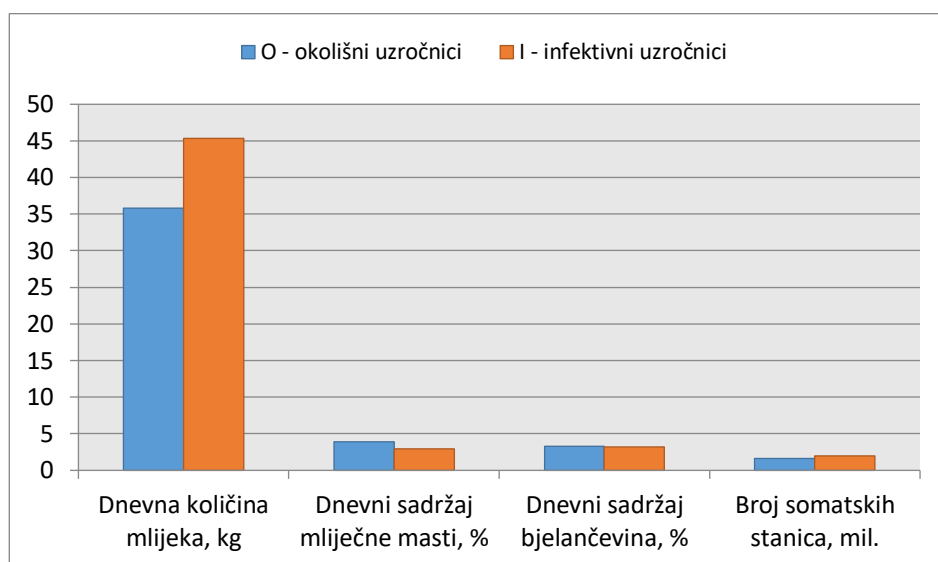
Grafikon 2. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

U Tablici 5. i Grafikonu 3. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Viša dnevna količina mlijeka (45,31 kg) i viši broj somatskih stanica (1.997.464,32) zabilježen je kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici), dok je viši dnevni sadržaj mliječne masti (3,93 %) i viši dnevni sadržaj bjelančevina (3,29 %) zabilježen kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

Tablica 5. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

Pokazatelj	I. O	II. I
Dnevna količina mlijeka, kg	35,83	45,31
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	3,93	2,91
Dnevni sadržaj bjelančevina, %	3,29	3,21
Broj somatskih stanica, mil.	1.619.071,60	1.997.464,32

O – okolišni uzročnici; I – infektivni uzročnici



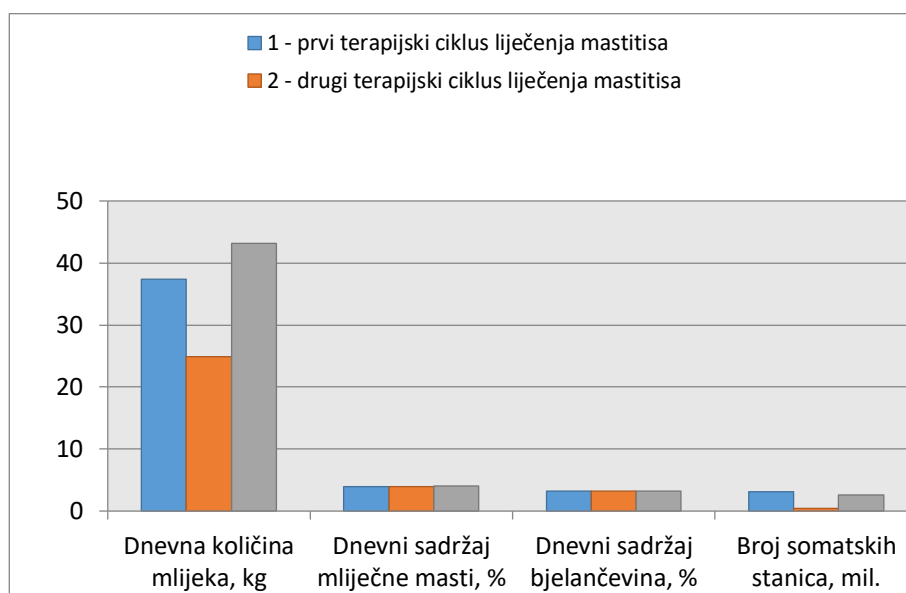
Grafikon 3. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

U Tablici 6. i Grafikonu 4. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Značajno ($P < 0,05$) manja dnevna količina mlijeka (24,90 kg) utvrđena je kod krava na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa u odnosu na ostale dvije skupine, dok je najviši broj somatskih stanica (3.098.146,87) zabilježen kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

Tablica 6. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Pokazatelj	1	2	3
Dnevna količina mlijeka, kg	37,43 ^a	24,90 ^b	43,19 ^a
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	3,93	3,95	4,02
Dnevni sadržaj bjelančevina, %	3,22	3,21	3,20
Broj somatskih stanica, mil.	3.098.146,87	429.545,45	2.555.216,72

1 – prvi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 2 – drugi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 3 – treći terapijski ciklus liječenja mastitisa



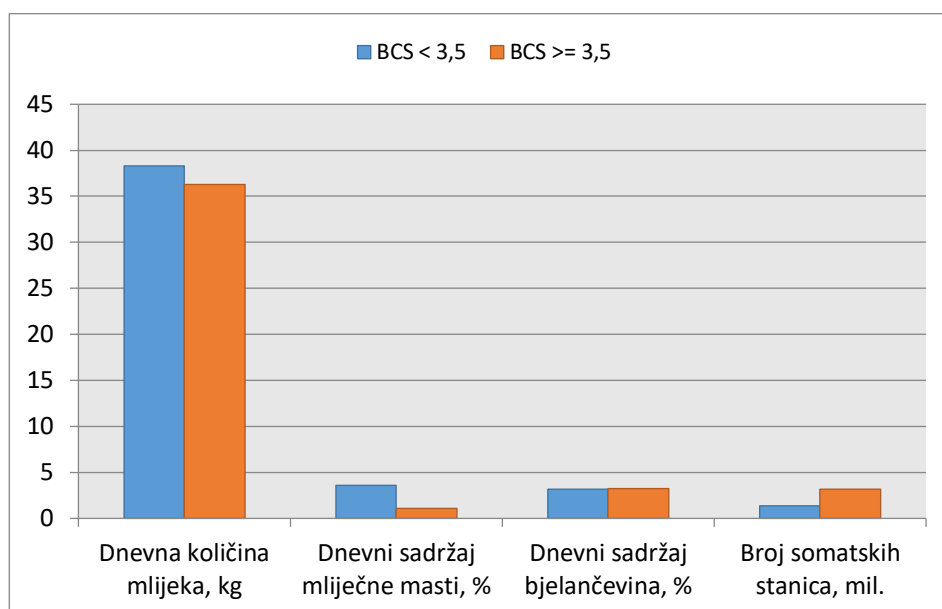
Grafikon 4. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Tablica 7. i Grafikon 5. prikazuju procijenjene srednje vrijednosti dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 zabilježena viša dnevna količina mlijeka (38,30 kg), viši dnevni sadržaj mliječne masti (3,57 %) i niži broj somatskih stanica (1.368.012,47), dok je kod krava koje su imale BCS ≥ 3,5 zabilježena niža dnevna količina mlijeka (36,27 kg), niži dnevni sadržaj mliječne masti (1,12 %) i viši broj somatskih stanica (3.210.542,41).

Tablica 7. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevni svojstava mliječnosti u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

Pokazatelj	BCS < 3,5	BCS ≥ 3,5
Dnevna količina mlijeka, kg	38,30	36,27
Dnevni sadržaj mliječne masti, %	3,57	1,12
Dnevni sadržaj bjelančevina, %	3,14	3,22
Broj somatskih stanica, mil.	1.368.012,47	3.210.542,41

BCS – body condition scores; indeks tjelesne mase



Grafikon 5. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

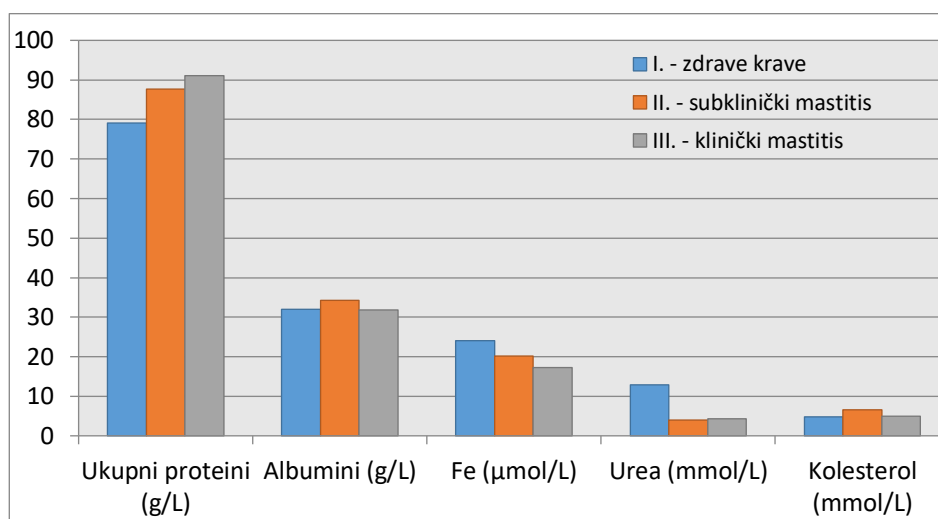
3.2. Biokemijski pokazatelji u krvi

U Tablici 8. i Grafikonima 6a. i 6b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica. Najviši sadržaj glukoze (3,34 mmol/L) i ukupnih proteina (91,00 g/L) utvrđen je kod III. skupine krava, dok je najviši sadržaj ureje (12,89 mmol/L) te najviši sadržaj Fe (24,11 μ mol/L) i Ca (2,32 mmol/L) zabilježen kod I. skupine krava. Najviši sadržaj albumina (34,33 g/L), kolesterola (6,54 mmol/L), LDL-a (2,89 mmol/L) i BHB-a (0,56 mmol/L) zabilježen je kod II. skupine krava.

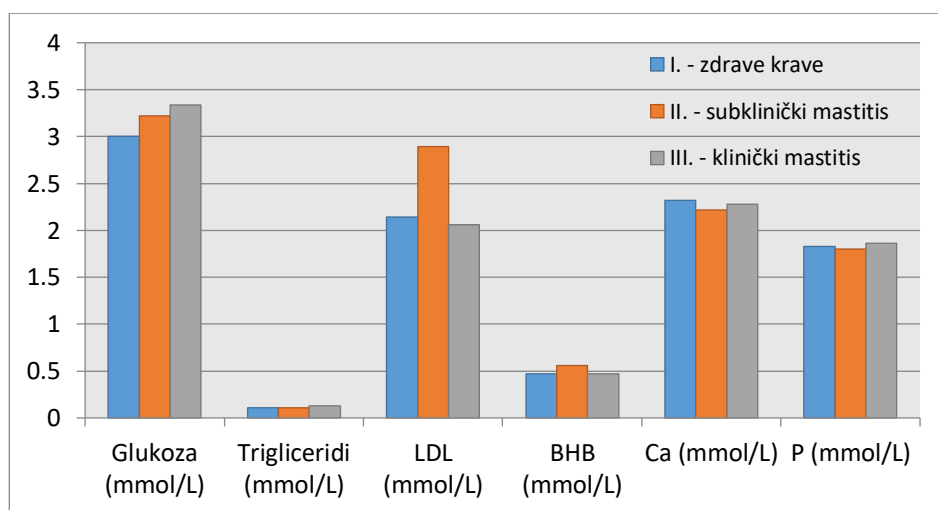
Tablica 8. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

Pokazatelj	I. NB < 200.00	II. PB 200.00 – 400.00	III. VB > 400.000
Glukoza (mmol/L)	3,00	3,22	3,34
Urea (mmol/L)	12,89	4,04	4,25
Ukupni proteini (g/L)	79,03	87,75	91,00
Albumini (g/L)	31,92	34,33	31,90
Trigliceridi (mmol/L)	0,11	0,11	0,13
Kolesterol (mmol/L)	4,78	6,54	4,93
LDL (mmol/L)	2,14	2,89	2,06
BHB (mmol/L)	0,47	0,56	0,47
Fe (μ mol/L)	24,11	20,21	17,22
Ca (mmol/L)	2,32	2,22	2,28
P (mmol/L)	1,83	1,80	1,86

I. NB – krave s normalnim brojem SS; II. PB – krave s povišenim brojem SS; III. VB – krave s visokim brojem SS



Grafikon 6a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica



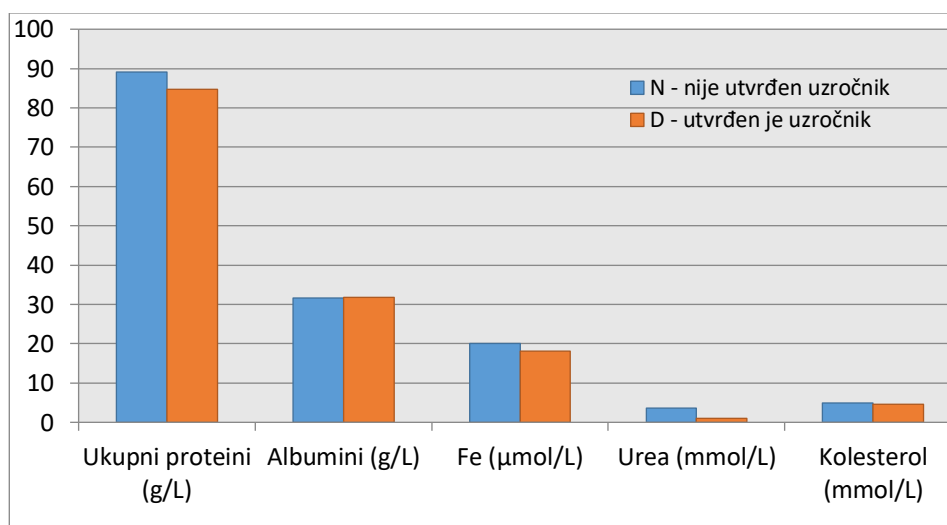
Grafikon 6b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

U Tablici 9. i Grafikonima 7a. i 7b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Viši sadržaj glukoze (3,35 mmol/L), ureje (3,64 mmol/L), ukupnih proteina (89,07 g/L), kolesterola (4,88 mmol/L), LDL-a (2,05 mmol/L), BHB-a (0,55 mmol/L), Fe (20,02 μmol/L) i P (1,97 mmol/L) zabilježen je kod krava iz I. skupine kod kojih u mlijeku nije utvrđen uzročnik. Viši sadržaj albumina (31,82 g/L) zabilježen je kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku utvrđen uzročnik.

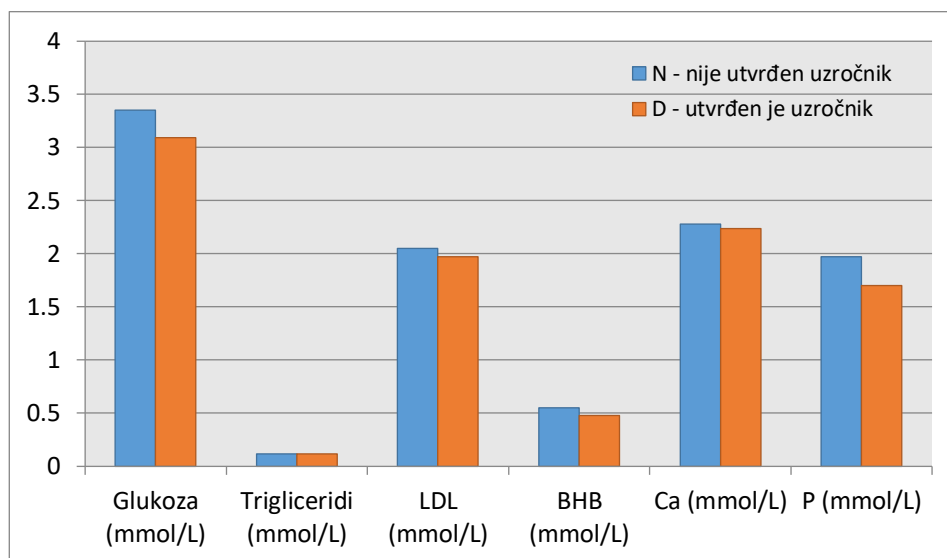
Tablica 9. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

Pokazatelj	I. N	II. D
Glukoza (mmol/L)	3,35	3,09
Urea (mmol/L)	3,64	1,00
Ukupni proteini (g/L)	89,07	84,64
Albumini (g/L)	31,68	31,82
Trigliceridi (mmol/L)	0,12	0,12
Kolesterol (mmol/L)	4,88	4,60
LDL (mmol/L)	2,05	1,97
BHB (mmol/L)	0,55	0,48
Fe (μ mol/L)	20,02	18,06
Ca (mmol/L)	2,28	2,24
P (mmol/L)	1,97	1,70

N – nije utvrđen uzročnik; D – utvrđen je uzročnik



Grafikon 7a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama



Grafikon 7b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama

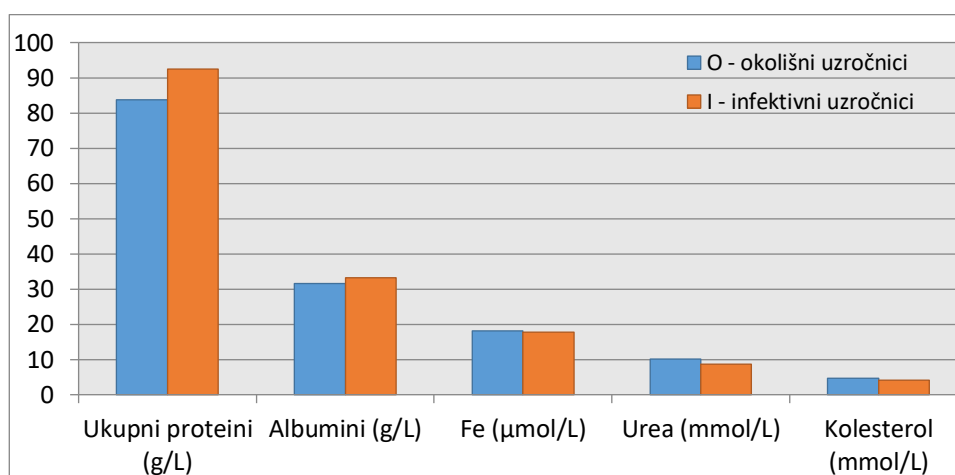
U Tablici 10. i Grafikonima 8a. i 8b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viša razina ukupnih proteina (92,42 g/L), albumina (33,23 g/L), BHB-a (0,78 mmol/L) i P (1,89 mmol/L) zabilježena kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici), dok je viša razina ureje (10,16 mmol/L), kolesterola (4,67 mmol/L), LDL-a (2,02 mmol/L) i Fe (18,11 μ mol/L) zabilježena kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

Tablica 10. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

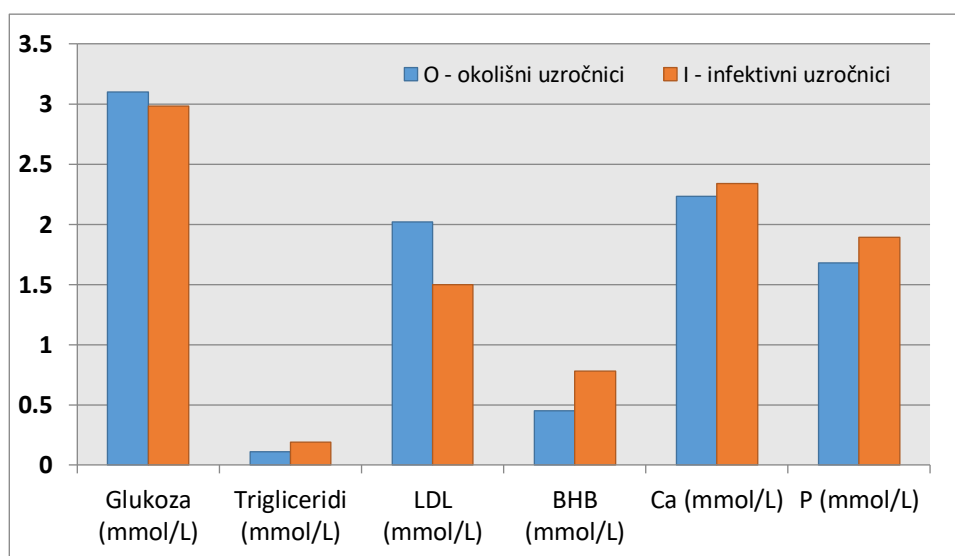
Pokazatelj	I. O	II. I
Glukoza (mmol/L)	3,10	2,98
Urea (mmol/L)	10,16	8,59
Ukupni proteini (g/L)	83,72	92,42
Albumini (g/L)	31,65	33,23
Trigliceridi (mmol/L)	0,11	0,19
Kolesterol (mmol/L)	4,67	4,09

LDL (mmol/L)	2,02	1,50
BHB (mmol/L)	0,45	0,78
Fe (μ mol/L)	18,11	17,67
Ca (mmol/L)	2,23	2,34
P (mmol/L)	1,68	1,89

O – okolišni uzročnici; I – infektivni uzročnici



Grafikon 8a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o porijeklu mikroorganizama



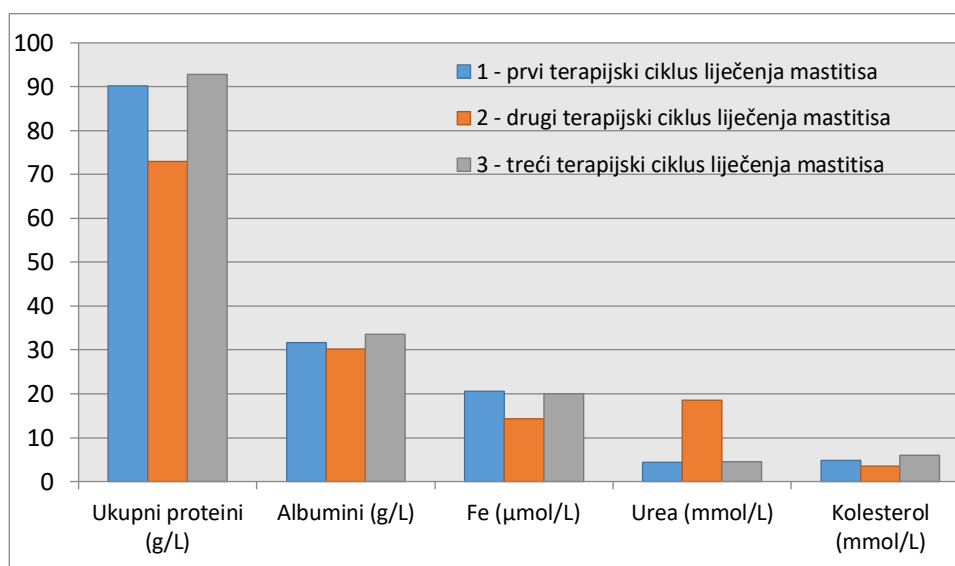
Grafikon 8b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o porijeklu mikroorganizama

U Tablici 11. i Grafikonima 9a. i 9b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata vidljivo je najviši sadržaj glukoze (3,40 mmol/l), ukupnih proteina (92,78 g/L), albumina (33,64 g/L), triglicerida (0,15 mmol/L), kolesterola (6,01 mmol/L), LDL-a (2,68 mmol/L), Ca (2,47 mmol/L) i P (2,14 mmol/L) zabilježen kod krava iz skupine na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa, dok je najviši sadržaj Fe (20,61 μ mol/L) zabilježen kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa. Najviši sadržaj ureje (18,53 mmol/L) zabilježen je kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa.

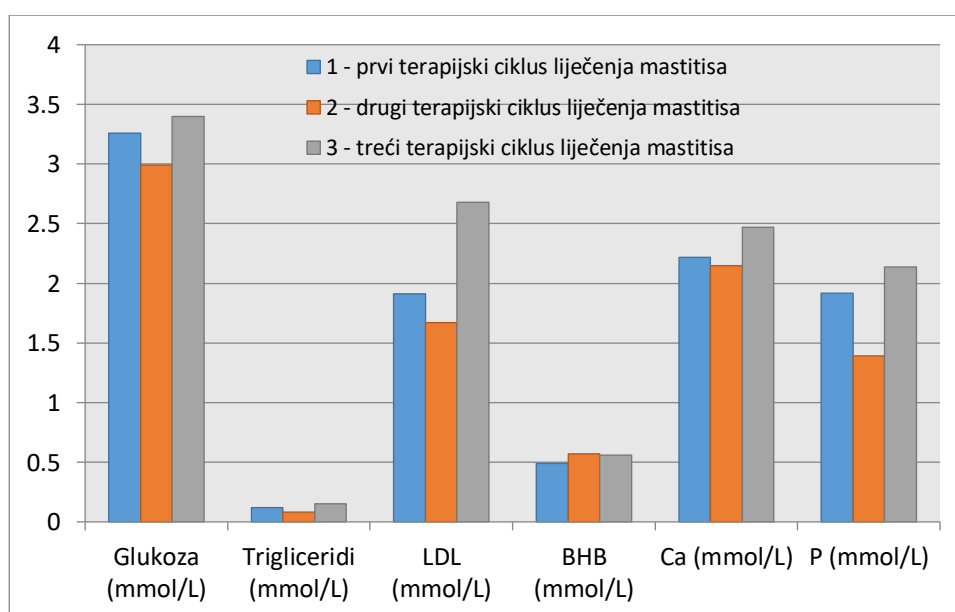
Tablica 11. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Pokazatelj	1	2	3
Glukoza (mmol/L)	3,26	2,99	3,40
Urea (mmol/L)	4,45	18,53	4,55
Ukupni proteini (g/L)	90,18	73,01	92,78
Albumini (g/L)	31,64	30,16	33,64
Trigliceridi (mmol/L)	0,12	0,08	0,15
Kolesterol (mmol/L)	4,77	3,49	6,01
LDL (mmol/L)	1,91	1,67	2,68
BHB (mmol/L)	0,49	0,57	0,56
Fe (μ mol/L)	20,61	14,28	19,97
Ca (mmol/L)	2,22	2,15	2,47
P (mmol/L)	1,92	1,39	2,14

1 – prvi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 2 – drugi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 3 – treći terapijski ciklus liječenja mastitisa



Grafikon 9a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o broju tretmana mastitisa



Grafikon 9b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

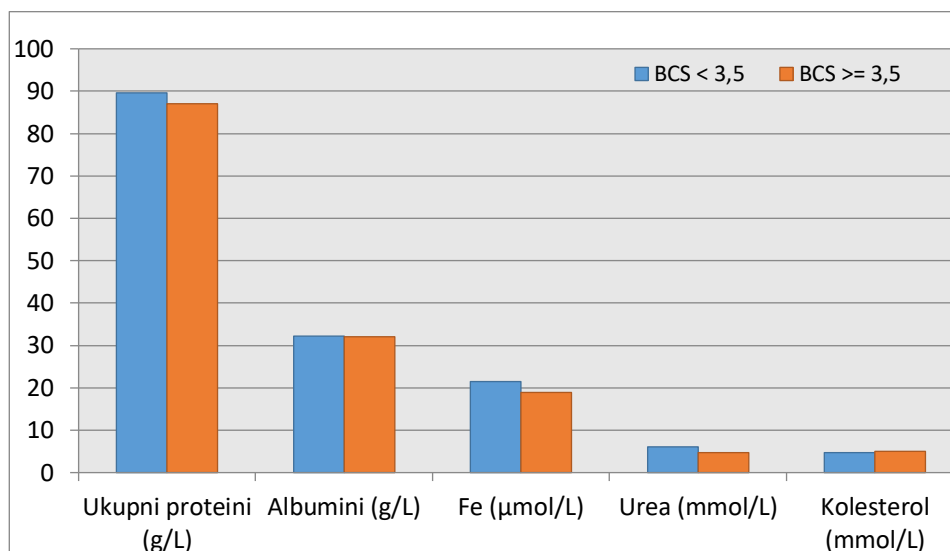
U Tablici 12. i Grafikonima 10a. i 10b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 zabilježen viši sadržaj ureje (6,03 mmol/L), ukupnih proteina (89,66 g/L), albumina (32,18 g/L), Fe

(21,53 $\mu\text{mol/L}$) i Ca (2,40 mmol/L), dok je kod krava koje su imale BCS $\geq 3,5$ zabilježen viši sadržaj glukoze (3,25 mmol/L), kolesterola (5,07 mmol/L), LDL-a (2,18 mmol/L), BHB-a (0,48 mmol/L) i P (1,88 mmol/L).

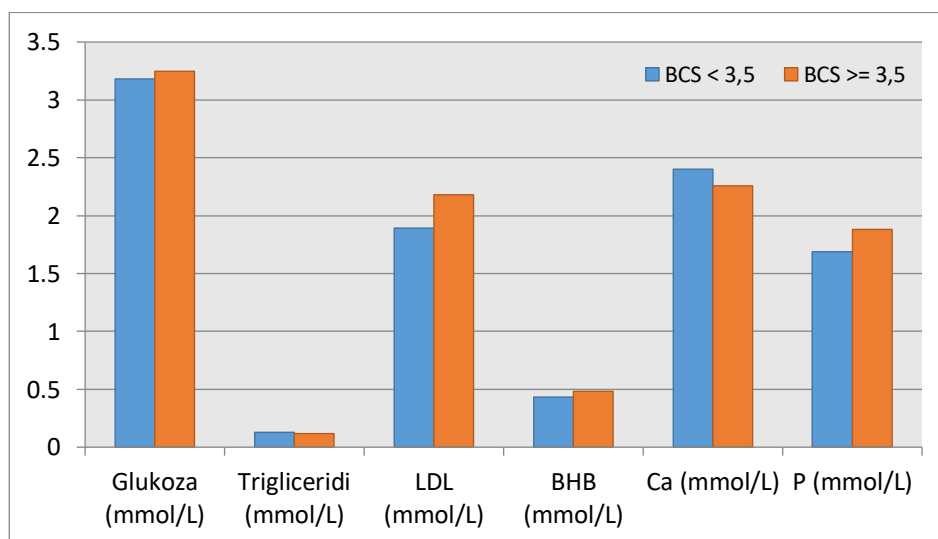
Tablica 12. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

Pokazatelj	BCS < 3,5	BCS $\geq 3,5$
Glukoza (mmol/L)	3,18	3,25
Urea (mmol/L)	6,03	4,71
Ukupni proteini (g/L)	89,66	87,07
Albumini (g/L)	32,18	32,05
Trigliceridi (mmol/L)	0,13	0,12
Kolesterol (mmol/L)	4,64	5,07
LDL (mmol/L)	1,89	2,18
BHB (mmol/L)	0,43	0,48
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	21,53	18,91
Ca (mmol/L)	2,40	2,26
P (mmol/L)	1,69	1,88

BCS – body condition scores; indeks tjelesne mase



Grafikon 10a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava



Grafikon 10b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

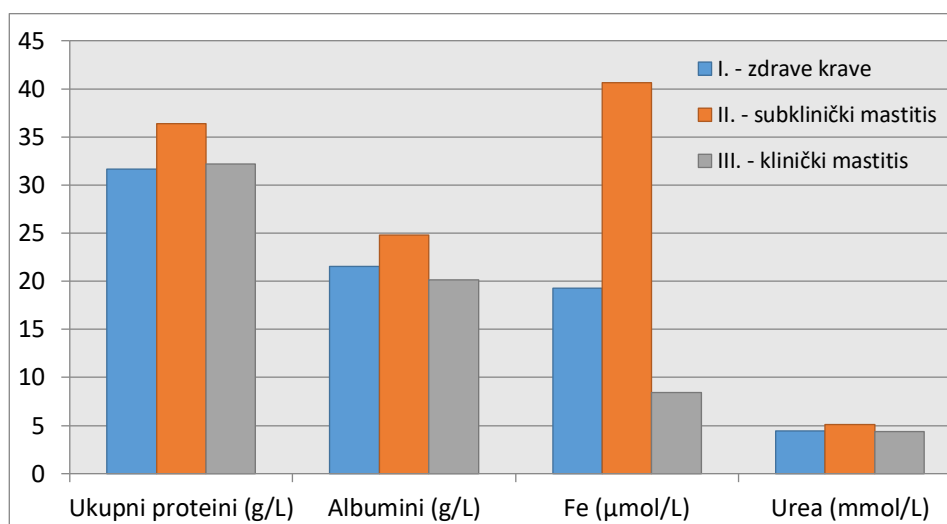
3.3. Biokemijski pokazatelji u mlijeku

U Tablici 13. i Grafikonima 11a. i 11b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je najviši sadržaj glukoze (0,55 mmol/L) zabilježen kod I. skupine krava, dok je najviši sadržaj ureje (5,09 mmol/L), ukupnih proteina (36,40 g/L), albumina (24,80 g/L), Fe (40,66 μ mol/L), Ca (3,44 mmol/L) i P (3,29 mmol/L) zabilježen kod II. skupine krava tj. skupine sumnjive na mastitis.

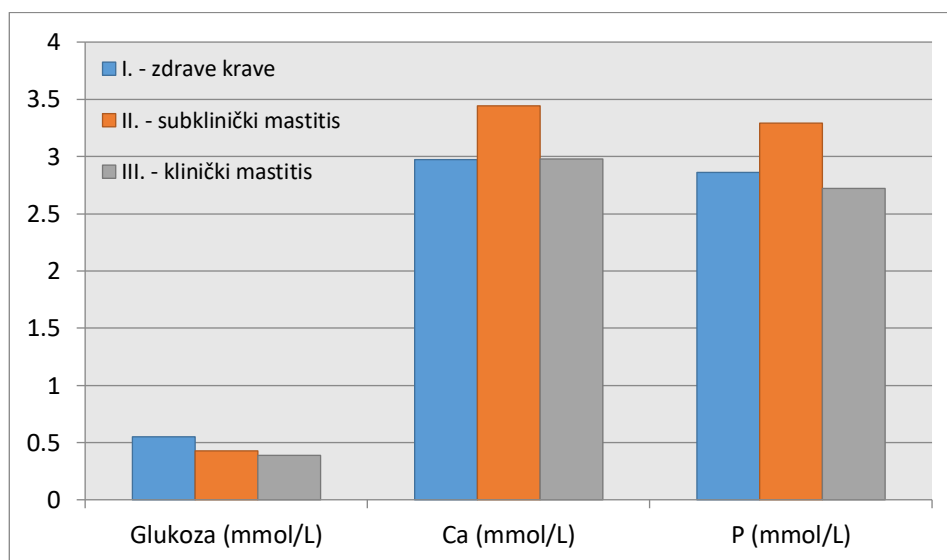
Tablica 13. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

Pokazatelj	I. < 200.00	II. 200.00 – 400.00	III. > 400.000
Glukoza (mmol/L)	0,55	0,43	0,39
Urea (mmol/L)	4,45	5,09	4,39
Ukupni proteini (g/L)	31,66	36,40	32,16
Albumini (g/L)	21,54	24,80	20,12
Fe (μ mol/L)	19,29	40,66	8,45
Ca (mmol/L)	2,97	3,44	2,98
P (mmol/L)	2,86	3,29	2,72

I. – NB – krave s normalnim brojem SS; II. PB – krave s povišenim brojem SS; III. VB– krave s visokim brojem SS



Grafikon 11a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica



Grafikon 11b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

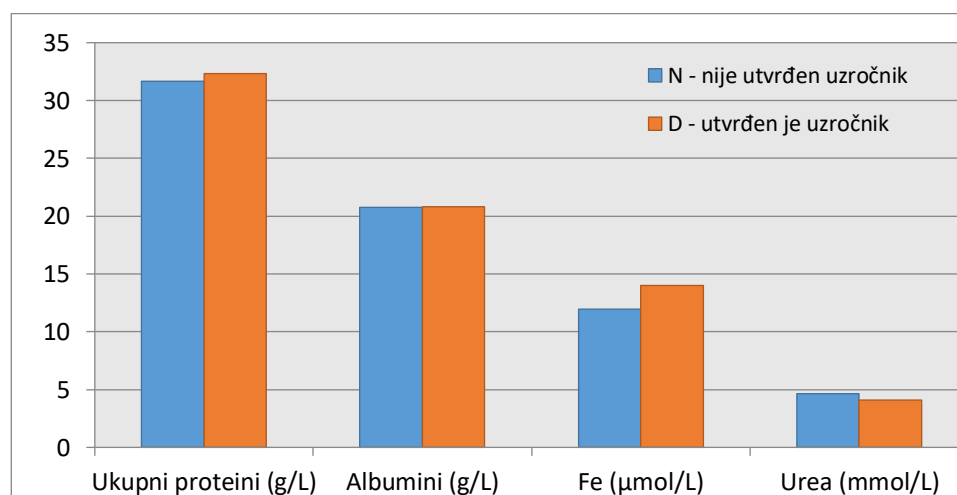
U Tablici 14. i Grafikonim 12a. i 12b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viši sadržaj glukoze (0,45 mmol/L), ukupnih proteina (32,32 g/L), albumina (20,84 g/L), Fe (13,99 μmol/L) i Ca (3,08 mmol/L) zabilježen kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku utvrđen uzročnik, dok je viši

sadržaj ureje (4,67 mmol/L) zabilježen kod krava iz I. skupine kod kojih nije utvrđen uzročnik u mlijeku.

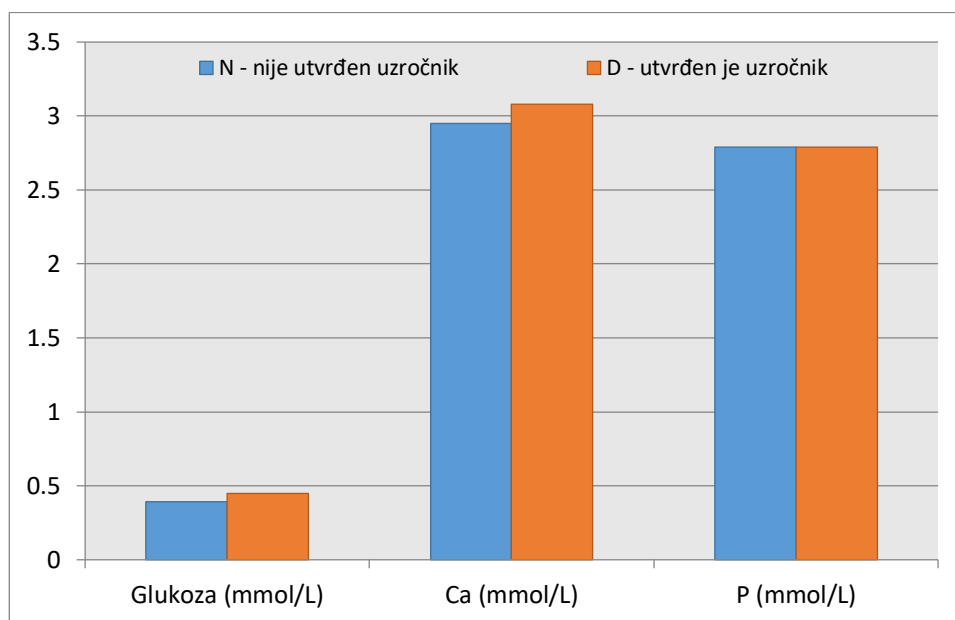
Tablica 14. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

Pokazatelj	I. N	II. D
Glukoza (mmol/L)	0,39	0,45
Urea (mmol/L)	4,67	4,12
Ukupni proteini (g/L)	31,69	32,32
Albumini (g/L)	20,73	20,84
Fe (μ mol/L)	11,93	13,99
Ca (mmol/L)	2,95	3,08
P (mmol/L)	2,79	2,79

N – nije utvrđen uzročnik; D – utvrđen je uzročnik



Grafikon 12a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama



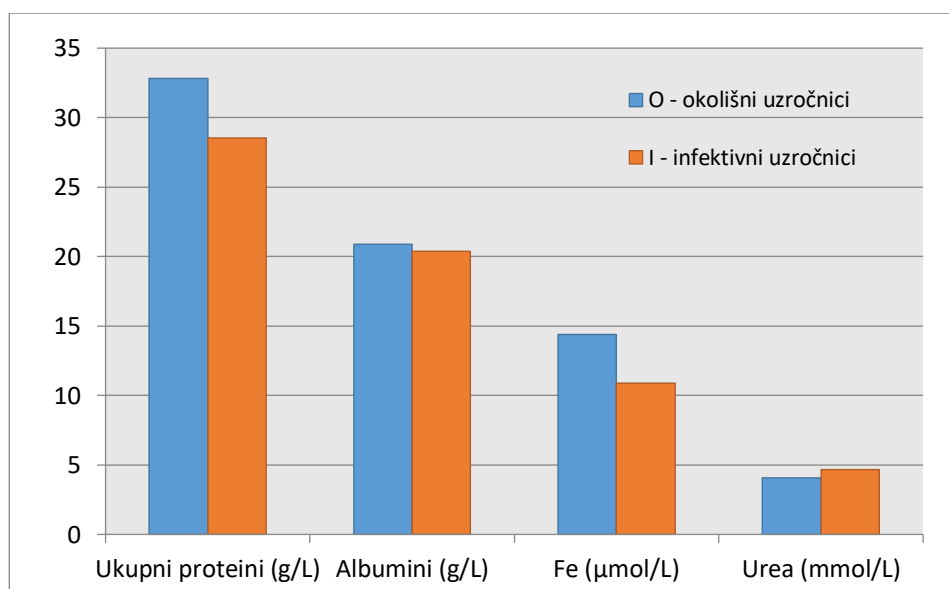
Grafikon 12b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama

U Tablici 15. i Grafikonima 13a. i 13b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Viša razina glukoze (0,46 mmola/L), ukupnih proteina (32,83 g/L), albumina (20,91 g/L), Fe (14,41 μ mol/L), Ca (3,11 mmol/L) i P (2,81 mmol/L) zabilježena je kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici), dok je viša razina ureje (4,65 mmol/L) zabilježena kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici).

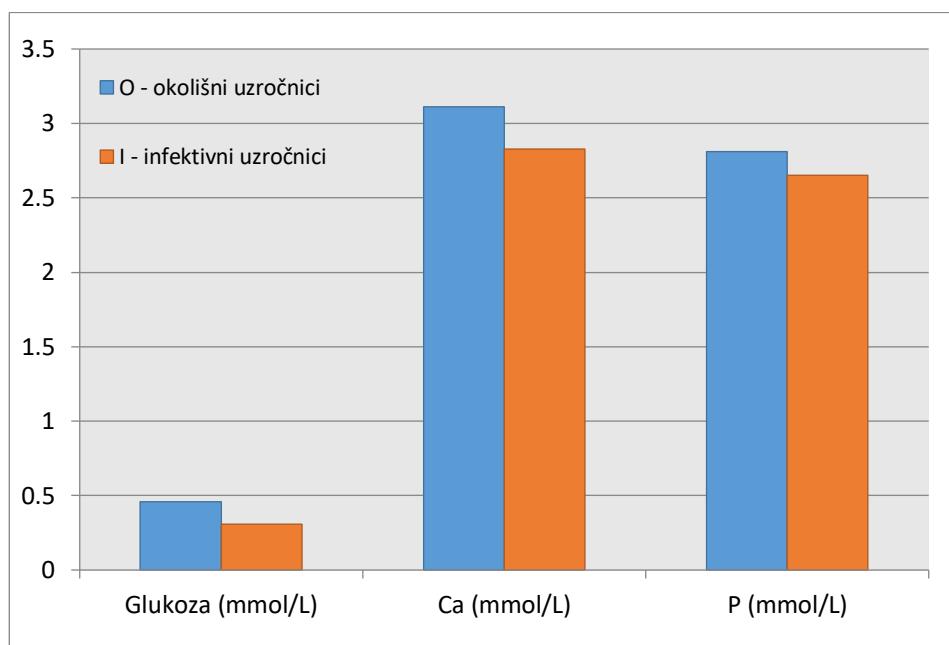
Tablica 15. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

Pokazatelj	I. O	II. I
Glukoza (mmol/L)	0,46	0,31
Urea (mmol/L)	4,05	4,65
Ukupni proteini (g/L)	32,83	28,52
Albumini (g/L)	20,91	20,36
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	14,41	10,89
Ca (mmol/L)	3,11	2,83
P (mmol/L)	2,81	2,65

O – okolišni uzročnici; I – infektivni uzročnici



Grafikon 13a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizama



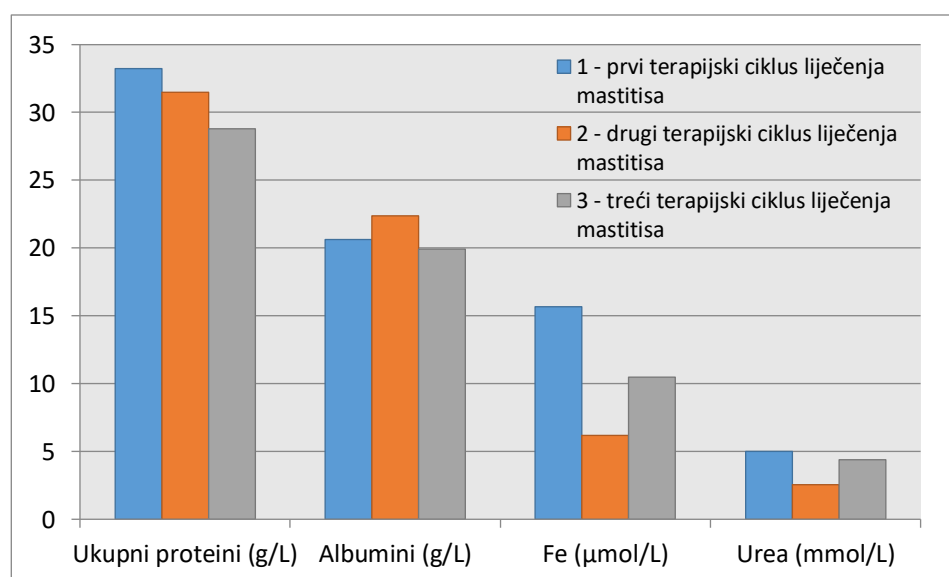
Grafikon 13b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizama

U Tablici 16. i Grafikonima 14a. i 14b. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata vidljivo je najviši sadržaj glukoze (0,56 mmol/L), albumina (22,37 g/L), Ca (3,26 mmol/L) i P (3,13 mmol/L) zabilježen kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa. Najviši sadržaj ureje (5,01 mmol/L), ukupnih proteina (33,24 g/L) i Fe (15,66 μ mol/L) zabilježen je kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

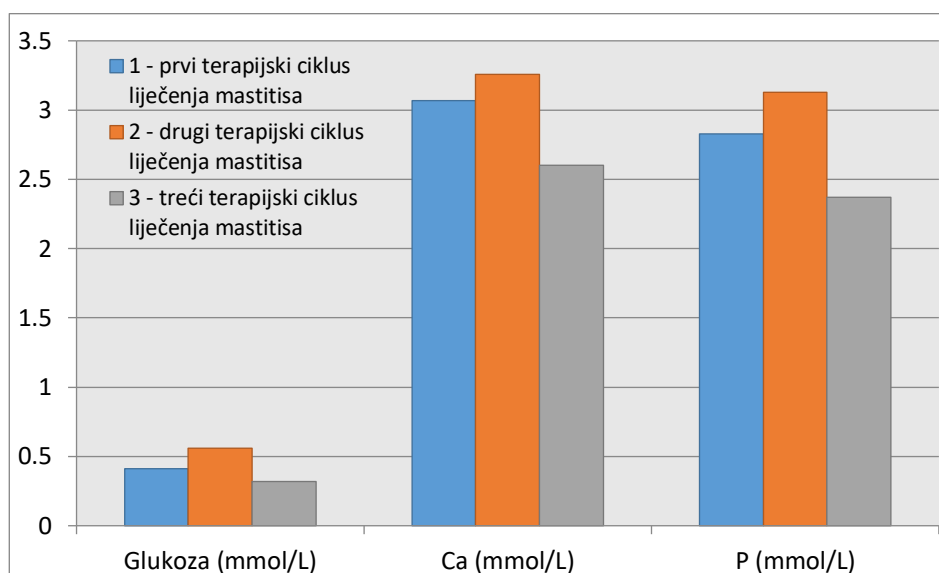
Tablica 16. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Pokazatelj	1	2	3
Glukoza (mmol/L)	0,41	0,56	0,32
Urea (mmol/L)	5,01	2,56	4,39
Ukupni proteini (g/L)	33,24	31,50	28,78
Albumini (g/L)	20,61	22,37	19,92
Fe (μ mol/L)	15,66	6,19	10,50
Ca (mmol/L)	3,07	3,26	2,60
P (mmol/L)	2,83	3,13	2,37

1 – prvi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 2 – drugi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 3 – treći terapijski ciklus liječenja mastitisa



Grafikon 14a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa



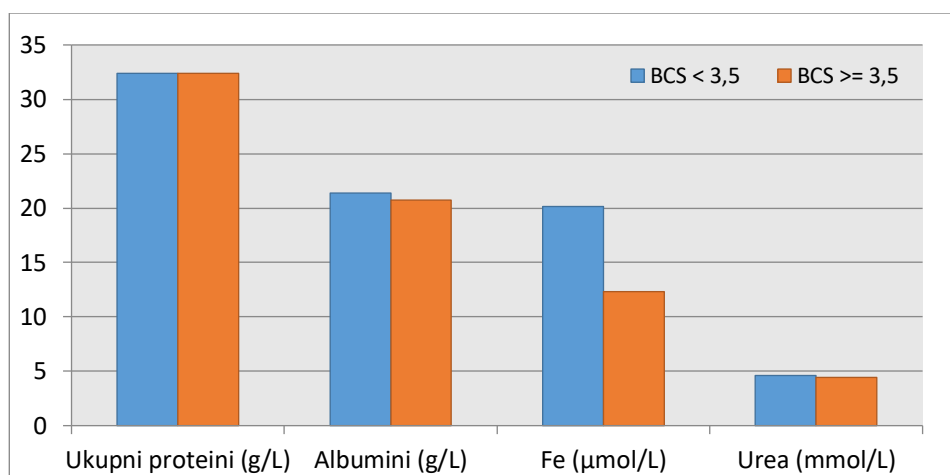
Grafikon 14b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

U Tablici 17. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj glukoze (0,48 mmol/L), ureje (4,62 mmol/L), ukupnih proteina (32,40 g/L), albumina (21,38 g/L) i Fe (20,17 μ mol/L).

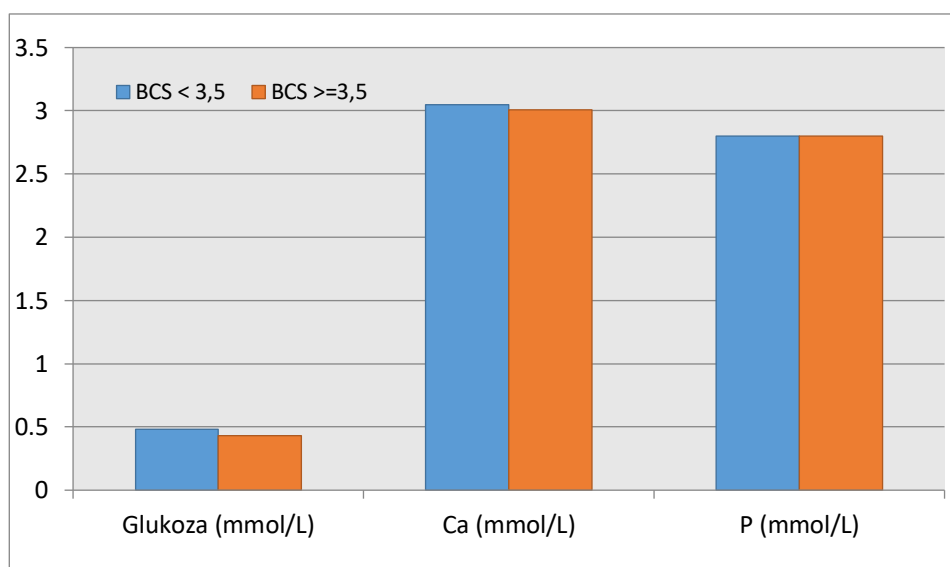
Tablica 17. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

Pokazatelj	BCS < 3,5	BCS $\geq$ 3,5
Glukoza (mmol/L)	0,48	0,43
Urea (mmol/L)	4,62	4,42
Ukupni proteini (g/L)	32,40	32,36
Albumini (g/L)	21,38	20,72
Fe (μ mol/L)	20,17	12,31
Ca (mmol/L)	3,05	3,01
P (mmol/L)	2,80	2,80

BCS – body condition scores; indeks tjelesne mase



Grafikon 15a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava



Grafikon 15b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

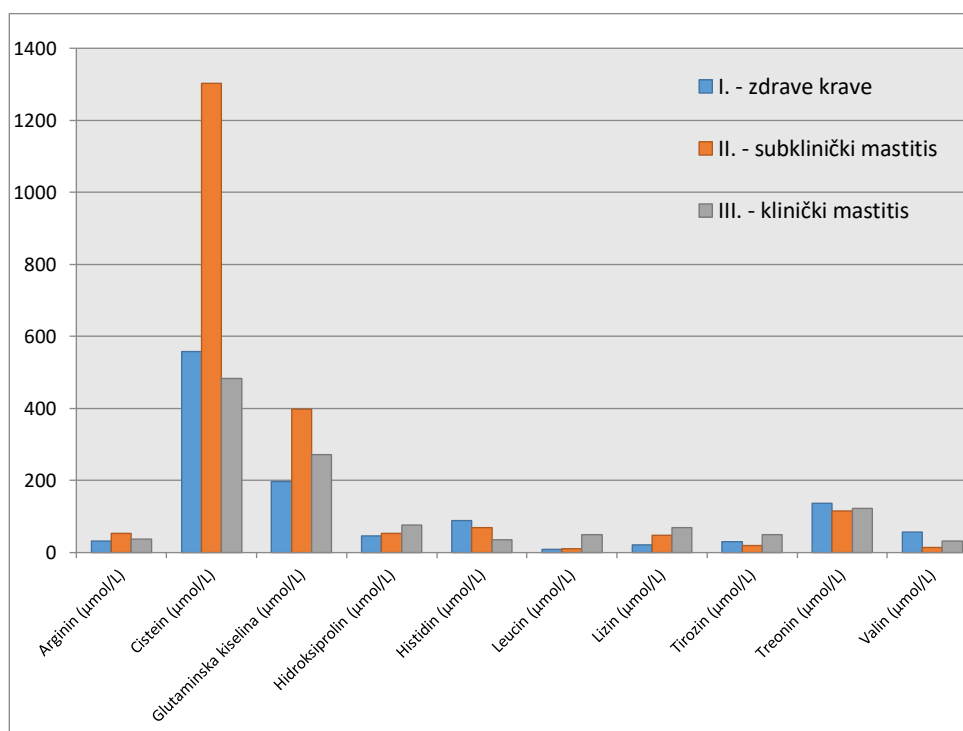
3.4. Aminokiselinski sastav mlijeka

Iz pregleda rezultata procijenjenih srednjih vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica (Tablica 18.), vidljivo je da je kod I. skupine krava (zdrave krave) zabilježen najviši sadržaj histidina (88,63 $\mu\text{mol/L}$), treonina (137,34 $\mu\text{mol/L}$), valina (57,28 $\mu\text{mol/L}$) i metionina (16,50 $\mu\text{mol/L}$), dok je kod II. skupine krava (subklinički mastitis) zabilježen najviši sadržaj asparaginske kiseline (16,66 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (398,46 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (21,53 $\mu\text{mol/L}$), serina (13,54 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (40,86 $\mu\text{mol/L}$), arginina (53,72 $\mu\text{mol/L}$) i cisteina (1302,24 $\mu\text{mol/L}$). Kod III. skupne krava (klinički mastitis) zabilježen je najviši sadržaj glicina (35,88 $\mu\text{mol/L}$), alanina (43,11 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (49,03 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (33,08 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (26,13 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (9,64 $\mu\text{mol/L}$), leucina (49,51 $\mu\text{mol/L}$), lizina (70,15 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolina (76,72 $\mu\text{mol/L}$).

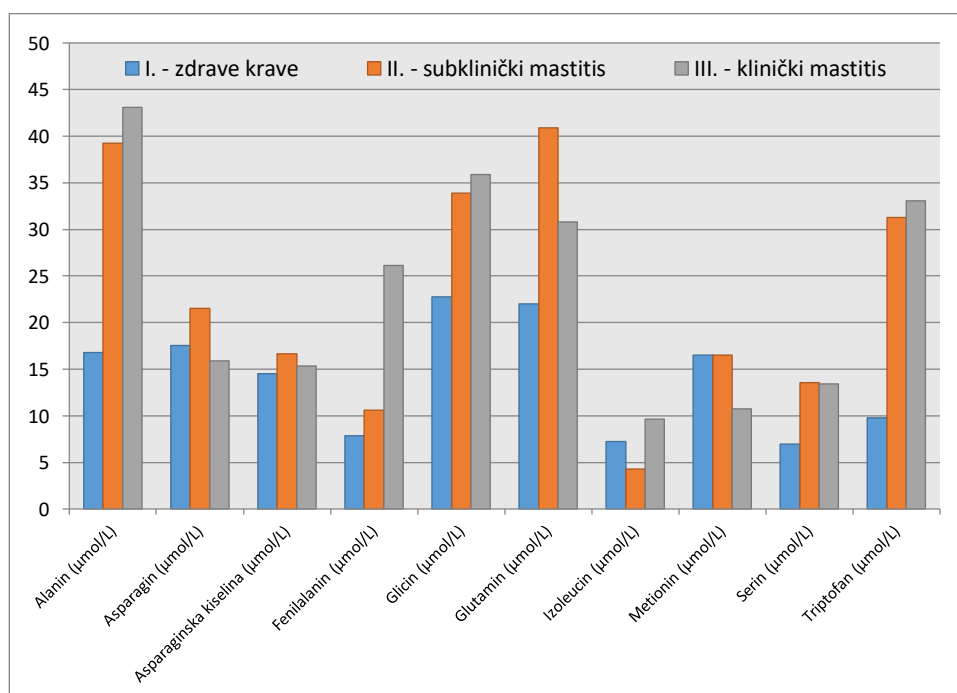
Tablica 18. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

Pokazatelj	I. < 200.00	II. 200.00 – 400.00	III. > 400.000
Asparaginska kiselina (μmol/L)	14,55	16,66	15,34
Glutaminska kiselina (μmol/L)	197,71	398,46	272,58
Asparagin (μmol/L)	17,52	21,53	15,89
Serin (μmol/L)	6,95	13,54	13,44
Glutamin (μmol/L)	21,98	40,86	30,82
Histidin (μmol/L)	88,63	70,01	35,05
Glicin (μmol/L)	22,79	33,87	35,88
Treonin(μmol/L)	137,34	115,20	123,26
Arginin (μmol/L)	32,33	53,72	37,26
Alanin (μmol/L)	16,80	39,27	43,11
Tirozin (μmol/L)	30,37	19,61	49,03
Cistein (μmol/L)	557,39	1302,24	483,63
Valin (μmol/L)	57,28	14,34	32,19
Metionin (μmol/L)	16,50	16,49	10,71
Triptofan (μmol/L)	9,75	31,29	33,08
Fenilalanin (μmol/L)	7,83	10,61	26,13
Izoleucin (μmol/L)	7,27	4,26	9,64
Leucin (μmol/L)	9,05	10,44	49,51
Lizin (μmol/L)	21,12	47,88	70,15
Hidroksiprolin (μmol/L)	46,62	52,93	76,72

I. – zdrave krave; II. –subklinički mastitis; III. – klinički mastitis



Grafikon 16a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica



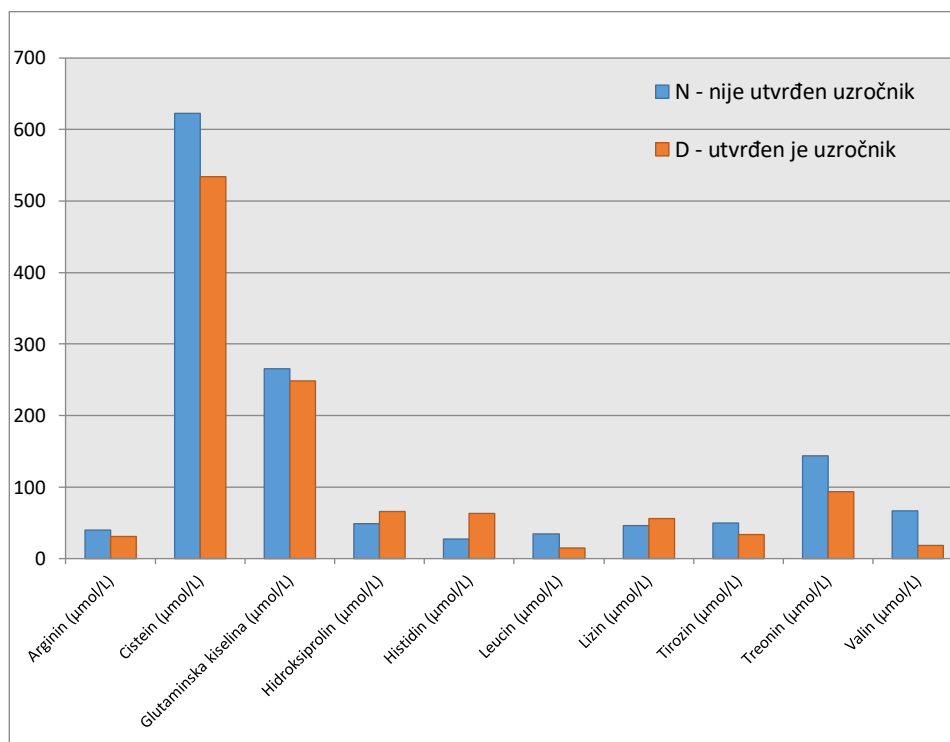
Grafikon 16b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

U Tablici 19. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viša razina asparaginske kiseline (16,82 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (16,01 $\mu\text{mol/L}$), histidina (63,13 $\mu\text{mol/L}$), metionina (12,88 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (7,62 $\mu\text{mol/L}$), lizina (56,07 $\mu\text{mol/L}$), hidroksiprolina (66,00 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz II. skupine tj. kod krava kod kojih u mlijeku nije utvrđen uzročnik, dok je viša razina glutaminske kiseline (265,60 $\mu\text{mol/L}$), serina (12,35 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (30,93 $\mu\text{mol/L}$), glicina (40,20 $\mu\text{mol/L}$), treonina (143,65 $\mu\text{mol/L}$), arginina (39,92 $\mu\text{mol/L}$), alanina (34,51 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (49,80 $\mu\text{mol/L}$), cisteina (662,83 $\mu\text{mol/L}$), valina (66,65 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (31,38 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (19,58 $\mu\text{mol/L}$) i leucina (34,18 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz I. skupine tj. kod krava kod kojih je u mlijeku utvrđen uzročnik.

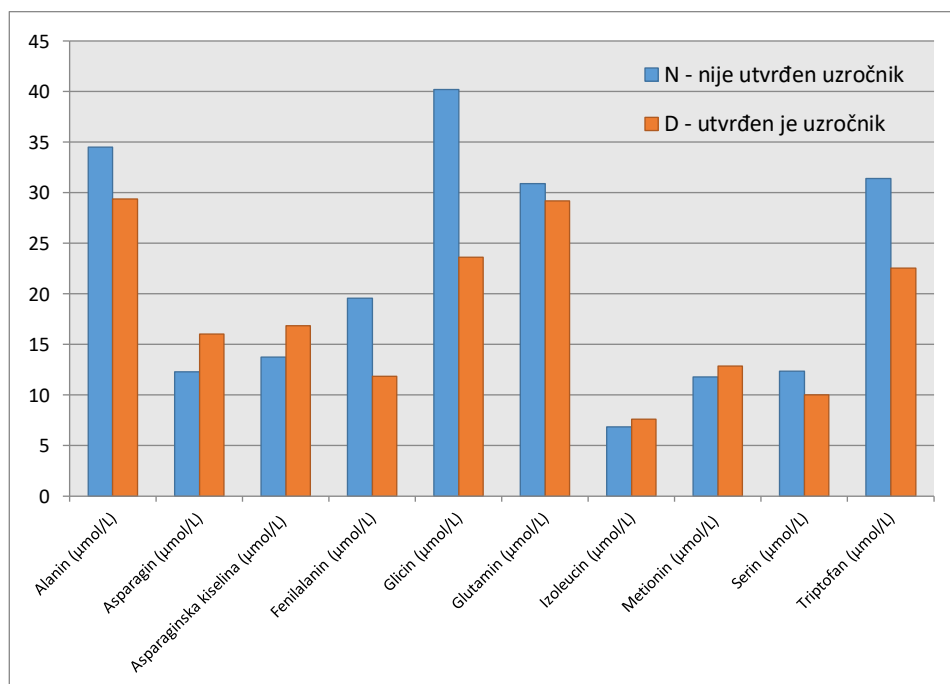
Tablica 19. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

Pokazatelj	I. N	II. D
Asparaginska kiselina (μmol/L)	13,76	16,82
Glutaminska kiselina (μmol/L)	265,60	248,44
Asparagin (μmol/L)	12,32	16,01
Serin (μmol/L)	12,35	10,02
Glutamin (μmol/L)	30,93	29,21
Histidin (μmol/L)	27,76	63,13
Glicin (μmol/L)	40,20	23,61
Treonin (μmol/L)	143,65	93,20
Arginin (μmol/L)	39,92	30,84
Alanin (μmol/L)	34,51	29,36
Tirozin (μmol/L)	49,80	33,25
Cistein (μmol/L)	622,83	533,63
Valin (μmol/L)	66,65	18,30
Metionin (μmol/L)	11,78	12,88
Triptofan (μmol/L)	31,38	22,52
Fenilalanin (μmol/L)	19,58	11,87
Izoleucin (μmol/L)	6,88	7,62
Leucin (μmol/L)	34,18	15,22
Lizin (μmol/L)	46,46	56,07
Hidroksiprolin (μmol/L)	48,76	66,00

N – nije utvrđen uzročnik; D – utvrđen je uzročnik



Grafikon 17a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijek



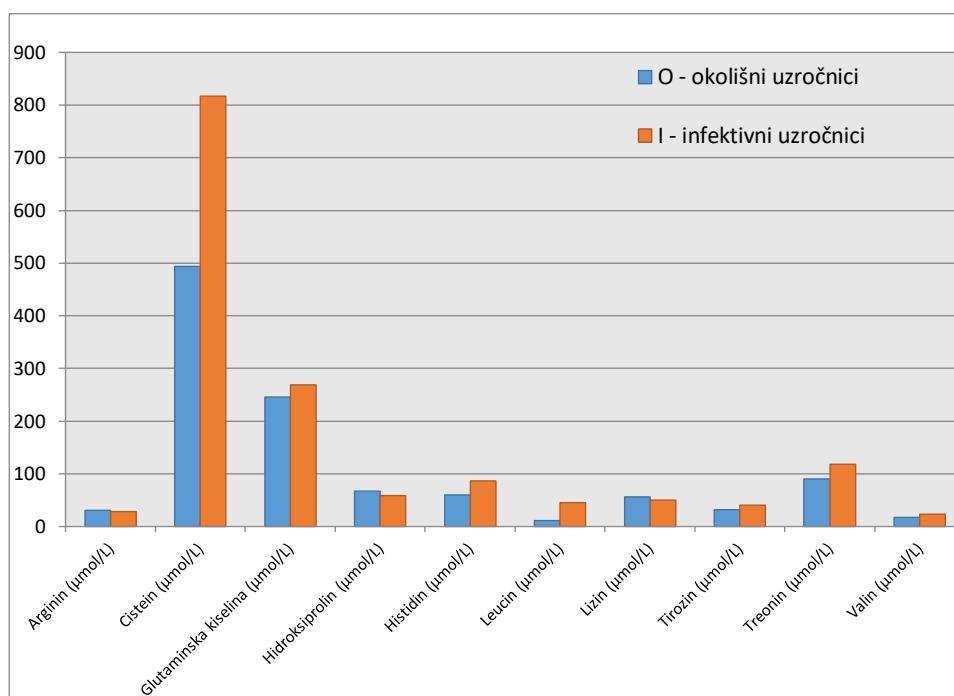
Grafikon 17b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

U Tablici 20. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viša razina asparaginske kiseline (27,51 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (286,56 $\mu\text{mol/L}$), serina (15,74 $\mu\text{mol/L}$), histidina (86,15 $\mu\text{mol/L}$), treonina (118,37 $\mu\text{mol/L}$), alanina (52,05 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (40,30 $\mu\text{mol/L}$), cisteina (816,70 $\mu\text{mol/L}$), valina (24,0 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (33,76 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (25,86 $\mu\text{mol/L}$) i leucina (45,36 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici) dok je viša razina asparagina (16,71 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (30,08 $\mu\text{mol/L}$), glicina (24,40 $\mu\text{mol/L}$), arginina (31,25 $\mu\text{mol/L}$), metionina (12,96 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (8,32 $\mu\text{mol/L}$), lizina (56,86 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolina (66,94 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

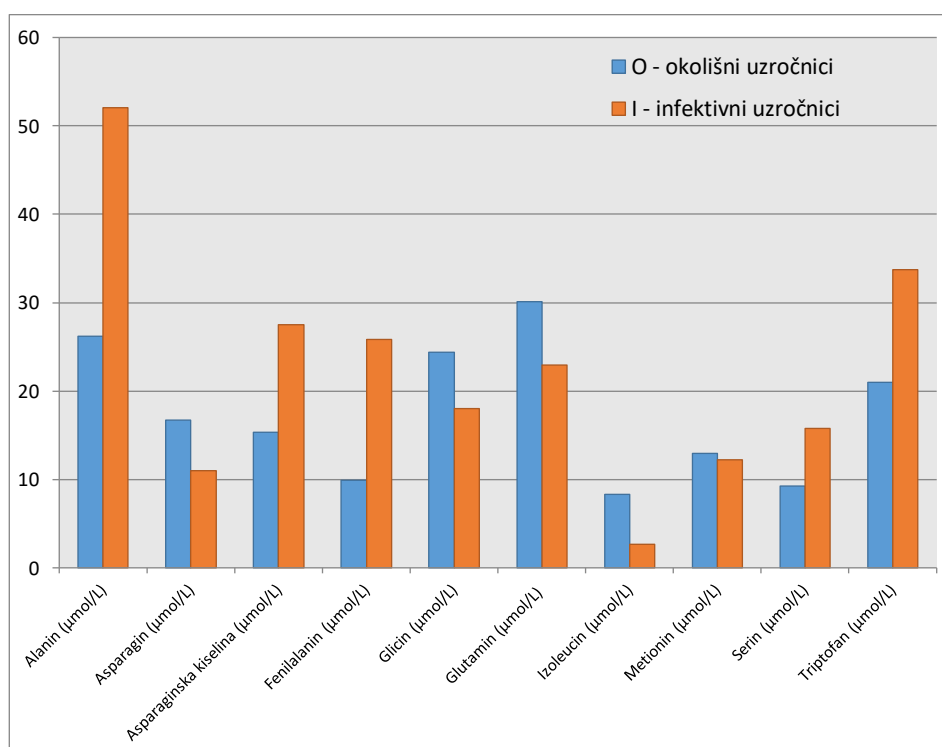
Tablica 20. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

Pokazatelj	I. O	II. I
Asparaginska kiselina (μmol/L)	15,34	27,51
Glutaminska kiselina (μmol/L)	245,65	268,56
Asparagin (μmol/L)	16,71	10,97
Serin (μmol/L)	9,22	15,74
Glutamin (μmol/L)	30,08	22,93
Histidin (μmol/L)	59,93	86,15
Glicin (μmol/L)	24,40	17,99
Treonin (μmol/L)	89,70	118,37
Arginin (μmol/L)	31,25	27,89
Alanin (μmol/L)	26,20	52,05
Tirozin (μmol/L)	32,27	40,30
Cistein (μmol/L)	494,29	816,70
Valin (μmol/L)	17,51	24,00
Metionin (μmol/L)	12,96	12,24
Triptofan (μmol/L)	20,96	33,76
Fenilalanin (μmol/L)	9,93	25,86
Izoleucin (μmol/L)	8,32	2,63
Leucin (μmol/L)	11,04	45,36
Lizin (μmol/L)	56,86	50,42
Hidroksiprolin (μmol/L)	66,94	59,18

O – okolišni uzročnici; I – infektivni uzročnici



Grafikon 18a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma



Grafikon 18b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

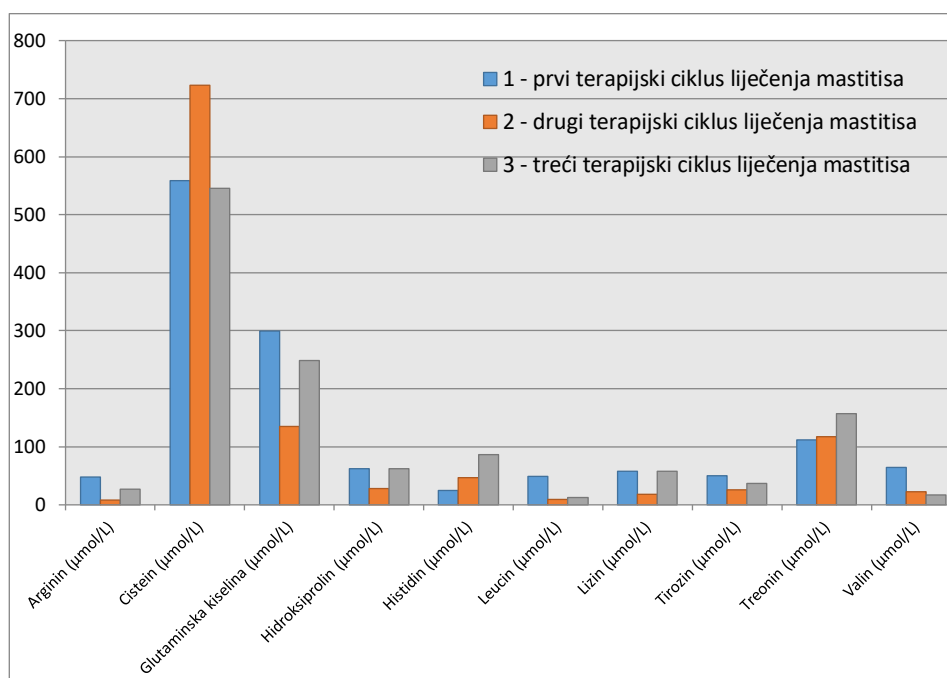
U Tablici 21. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa zabilježen najviši sadržaj glutaminske kiseline (299,82 $\mu\text{mol/L}$), serina (12,66 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (41,34 $\mu\text{mol/L}$), glicina (48,91 $\mu\text{mol/L}$), arginina (48,16 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (50,14 $\mu\text{mol/L}$), valina (64,61 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (32,73 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (20,43 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (8,75 $\mu\text{mol/L}$), leucina (48,50 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolin (62,38 $\mu\text{mol/L}$).

Kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa zabilježen je najviši sadržaj cisteina (723,39 $\mu\text{mol/L}$) i metionina (20,17 $\mu\text{mol/L}$), dok je kod krava iz skupine na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa zabilježen najviši sadržaj asparaginske kiseline (17,66 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (19,93 $\mu\text{mol/L}$), histidina (87,03 $\mu\text{mol/L}$), treonina (157,32 $\mu\text{mol/L}$), alanina (40,24 $\mu\text{mol/L}$) i lizina (57,62 $\mu\text{mol/L}$).

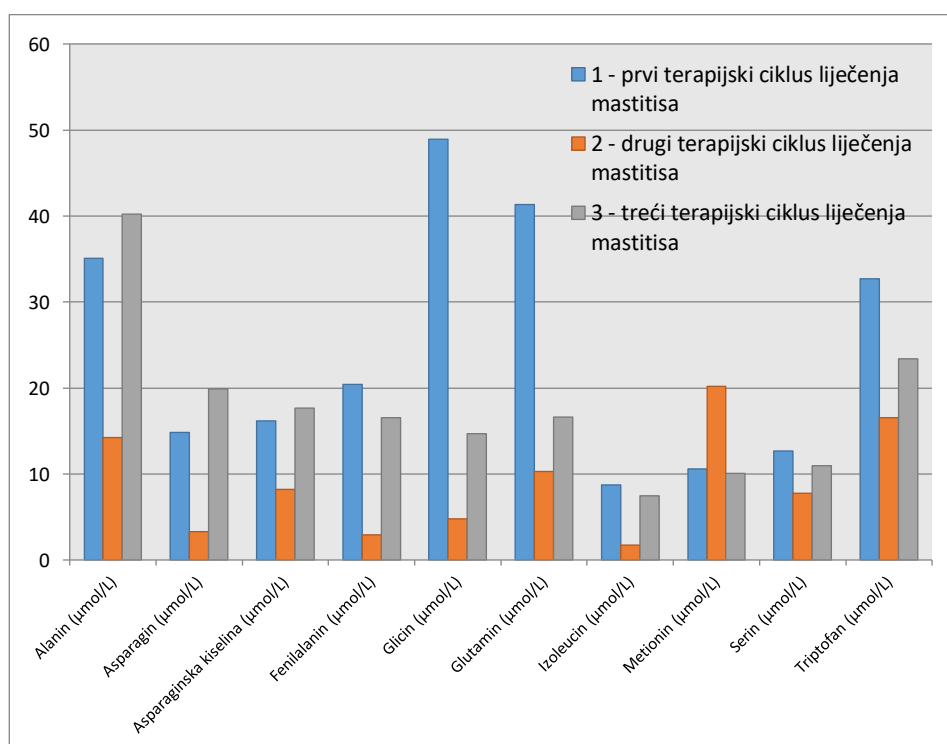
Tablica 21. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Pokazatelj	1	2	3
Asparaginska kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	16,16	8,19	17,66
Glutaminska kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	299,82	135,53	248,57
Asparagin ($\mu\text{mol/L}$)	14,85	3,28	19,93
Serin ($\mu\text{mol/L}$)	12,66	7,78	10,94
Glutamin ($\mu\text{mol/L}$)	41,34	10,27	16,59
Histidin ($\mu\text{mol/L}$)	24,82	46,41	87,03
Glicin ($\mu\text{mol/L}$)	48,91	4,78	14,72
Treonin ($\mu\text{mol/L}$)	111,71	117,24	157,32
Arginin ($\mu\text{mol/L}$)	48,16	8,11	26,90
Alanin ($\mu\text{mol/L}$)	35,05	14,23	40,24
Tirozin ($\mu\text{mol/L}$)	50,14	26,02	37,45
Cistein ($\mu\text{mol/L}$)	558,32	723,39	545,96
Valin ($\mu\text{mol/L}$)	64,61	22,93	17,33
Metionin ($\mu\text{mol/L}$)	10,60	20,17	10,06
Triptofan ($\mu\text{mol/L}$)	32,73	16,51	23,37
Fenilalanin ($\mu\text{mol/L}$)	20,43	2,96	16,57
Izoleucin ($\mu\text{mol/L}$)	8,75	1,74	7,49
Leucin ($\mu\text{mol/L}$)	48,50	8,92	12,61
Lizin ($\mu\text{mol/L}$)	57,55	18,69	57,62
Hidroksiprolin ($\mu\text{mol/L}$)	62,38	27,69	61,83

1 – prvi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 2 – drugi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 3 – treći terapijski ciklus liječenja mastitisa



Grafikon 19a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa



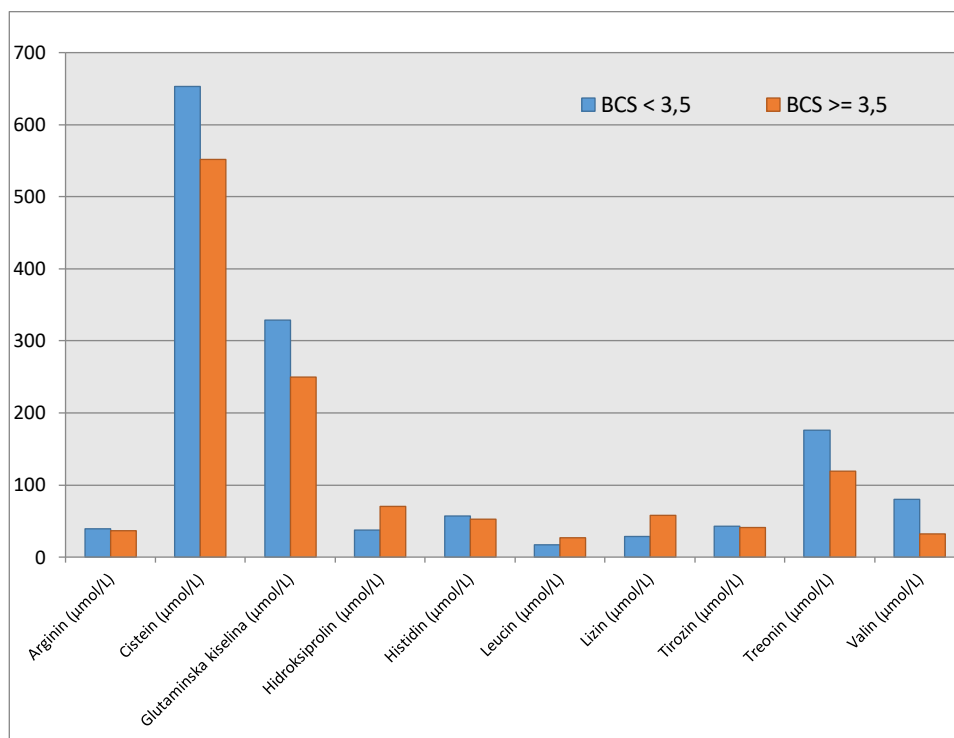
Grafikon 19b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

U Tablici 22. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj asparaginske kiseline (26,12 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (328,41 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (23,15 $\mu\text{mol/L}$), serina (13,51 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (29,96 $\mu\text{mol/L}$), histidina (56,85 $\mu\text{mol/L}$), glicina (35,01 $\mu\text{mol/L}$), treonina (175,92 $\mu\text{mol/L}$), arginina (39,07 $\mu\text{mol/L}$), alanina (37,06 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (42,84 $\mu\text{mol/L}$), cisteina (652,77 $\mu\text{mol/L}$), valina (80,46 $\mu\text{mol/L}$) i triptofana (27,82 $\mu\text{mol/L}$), dok je kod krava koje su imale BCS $\geq$ 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj metionina (13,07 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (16,03 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (8,79 $\mu\text{mol/L}$), leucina (26,69 $\mu\text{mol/L}$), lizina (57,94 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolina (70,51 $\mu\text{mol/L}$).

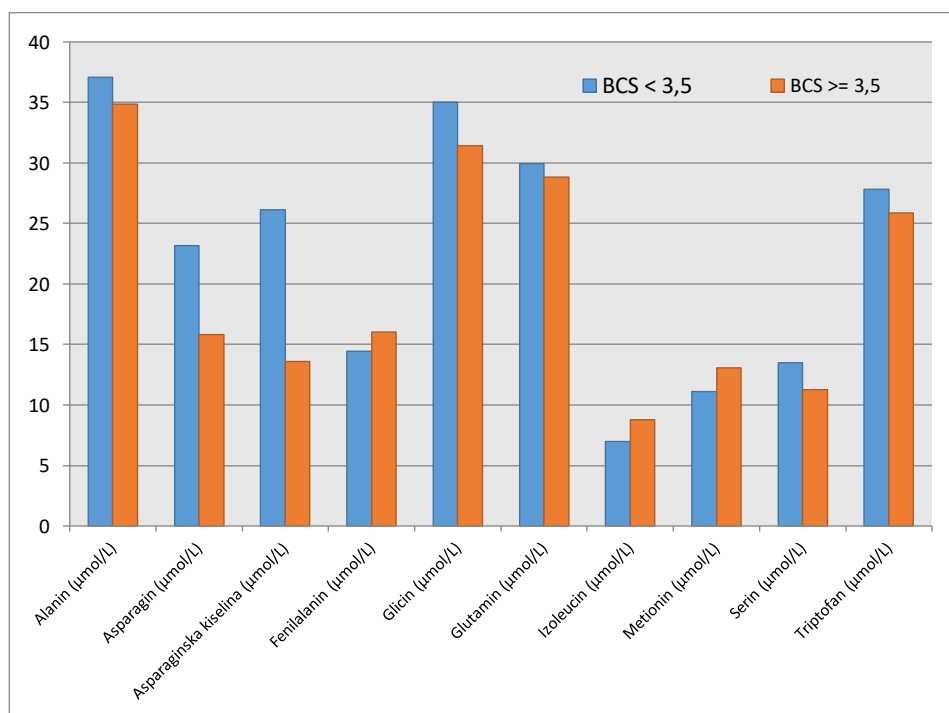
Tablica 22. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

Pokazatelj	BCS < 3,5	BCS ≥ 3,5
Asparaginska kiselina (μmol/L)	26,12	13,59
Glutaminska kiselina (μmol/L)	328,41	249,63
Asparagin (μmol/L)	23,15	15,83
Serin (μmol/L)	13,51	11,26
Glutamin (μmol/L)	29,96	28,81
Histidin (μmol/L)	56,85	52,73
Glicin (μmol/L)	35,01	31,45
Treonin (μmol/L)	175,92	119,51
Arginin (μmol/L)	39,07	36,70
Alanin (μmol/L)	37,06	34,85
Tirozin (μmol/L)	42,84	41,23
Cistein (μmol/L)	652,77	551,45
Valin (μmol/L)	80,46	31,98
Metionin (μmol/L)	11,13	13,07
Triptofan (μmol/L)	27,82	25,87
Fenilalanin (μmol/L)	14,44	16,03
Izoleucin (μmol/L)	7,00	8,79
Leucin (μmol/L)	16,71	26,69
Lizin (μmol/L)	28,94	57,94
Hidroksiprolin (μmol/L)	37,07	70,51

BCS – body condition score; indeks tjelesne mase



Grafikon 20a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava



Grafikon 20b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

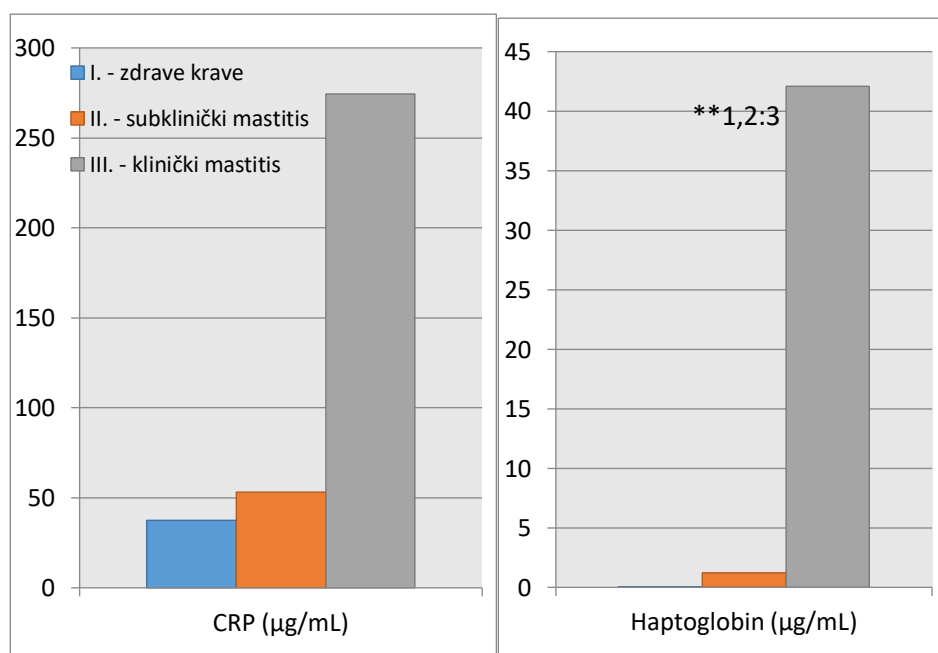
3.5. Koncentracija proteina akutne faze u mlijeku

U Tablici 23. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica. Značajno ($P < 0,05$) veća koncentracija AGP-a i HP ($P < 0,01$) bila je u skupini krava s kliničkim mastitisom. Koncentracija CRP-a bila je također najviša u toj skupini, ali bez statističke značajnosti ($P > 0,05$). Koncentracija SAA3-a zabilježena je u III. skupini krava s kliničkim mastitisom, ali značajne razlike postojale su između prvij dviju skupina.

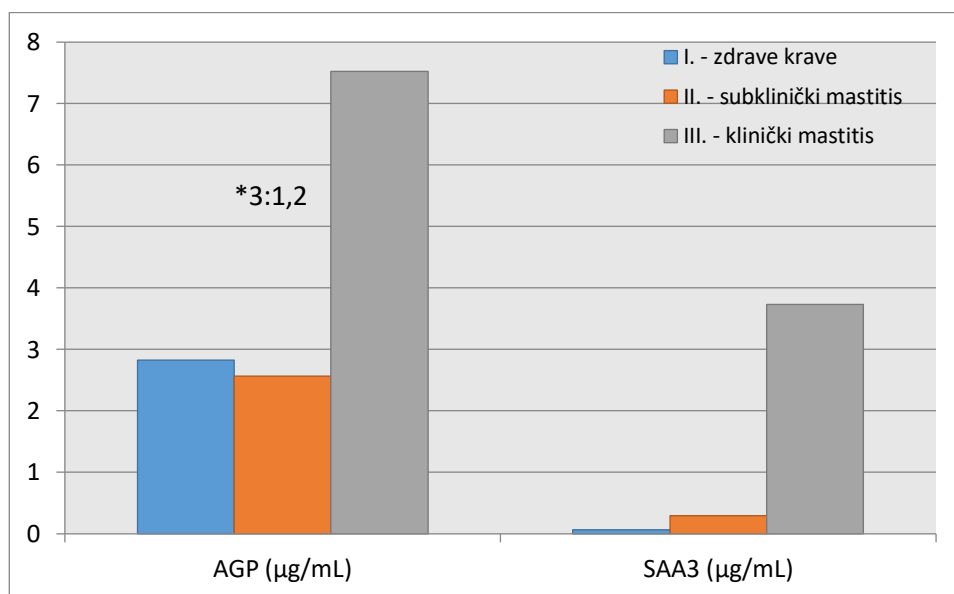
Tablica 23. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

Pokazatelj	I. < 200.00	II. 200.00 – 400.00	III. > 400.000
AGP (µg/mL)	2,83 ^a	2,57 ^a	7,52 ^b
CRP (µg/mL)	37,35	53,32	274,51
Haptoglobin (µg/mL)	0,05 ^A	1,21 ^A	42,11 ^B
SAA3(µg/mL)	0,07	0,30	3,73

I. – zdrave krave; II. – subklinički mastitis; III. – klinički mastitis, a,b $P < 0,05$; A,B, $P < 0,01$



Grafikon 21a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica



Grafikon 21b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica

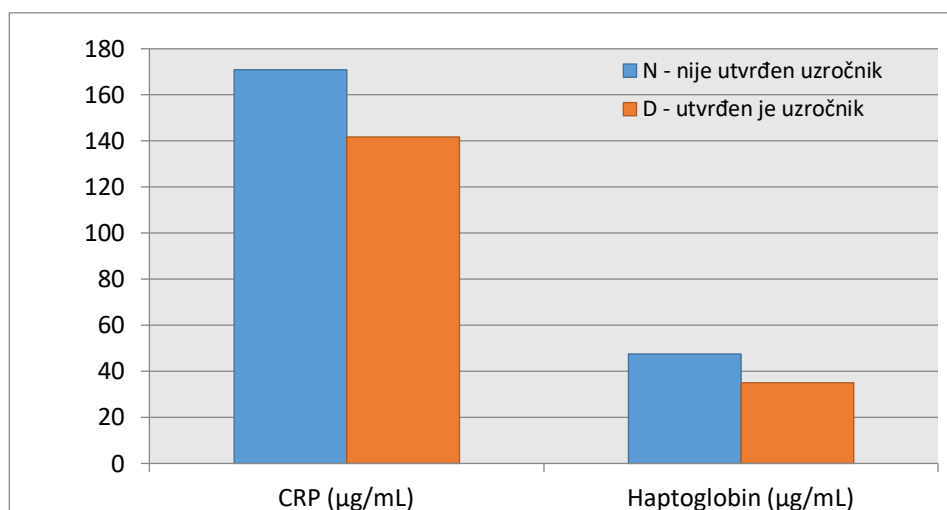
U Tablici 24. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viši sadržaj CRP-a (171,02 µg/mL) i haptoglobina (47,58 µg/mL) zabilježen kod krava iz I. skupine kod kojih nije utvrđen uzročnik u mlijeku, dok je viši sadržaj AGP-a (6,58 µg/mL) i SAA3-a (2,26 µg/mL) zabilježen kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku utvrđen uzročnik.

Tablica 24. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

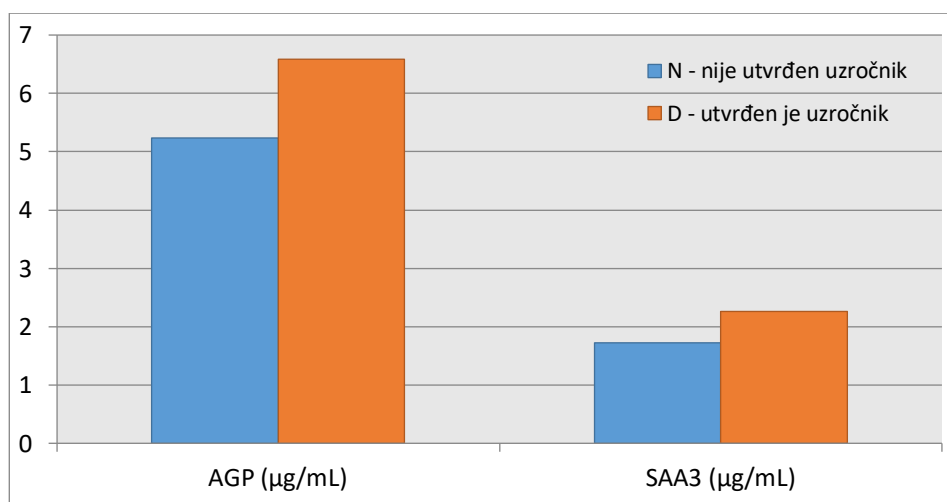
Pokazatelj	I. N	II. D
AGP (µg/mL)	5,24	6,58
CRP (µg/mL)	171,02	141,82

Haptoglobin (µg/mL)	47,58	34,95
SAA3 (µg/mL)	1,72	2,26

N – nije utvrđen uzročnik; D - utvrđen je uzročnik



Grafikon 22a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku



Grafikon 22b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku

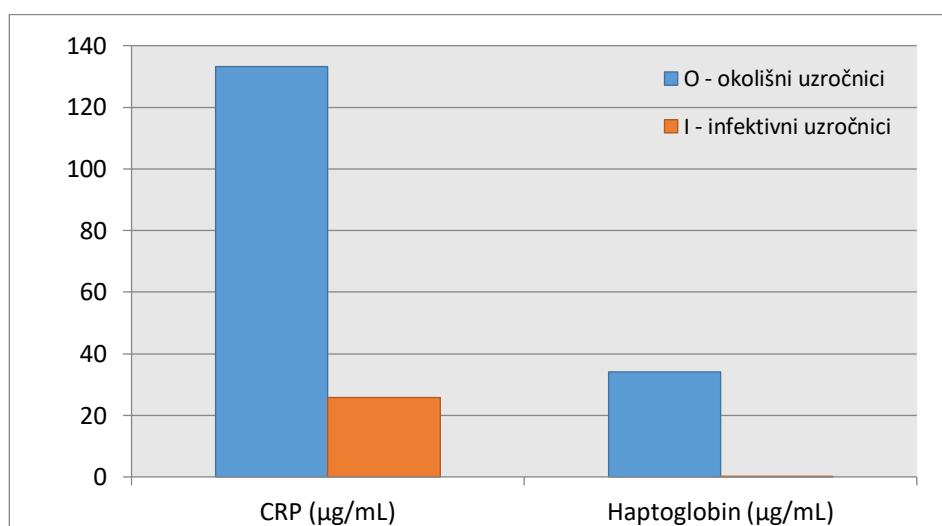
U Tablici 25. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viša razina AGP-a (5,55 µg/mL), CRP-a (133,17 µg/mL), haptoglobina

(34,02 $\mu\text{g/mL}$) i SAA3 (3,28 $\mu\text{g/mL}$) zabilježena kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

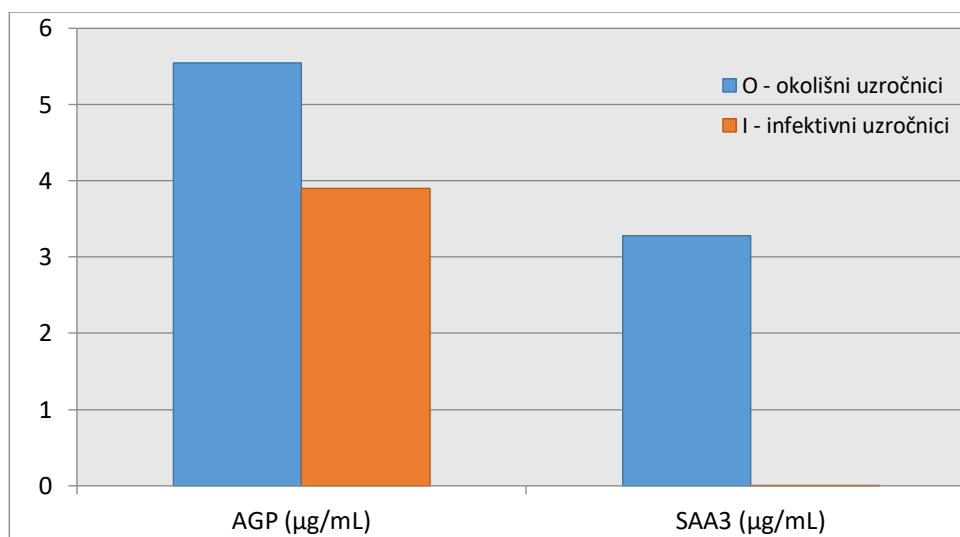
Tablica 25. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

Pokazatelj	I.	II.
	O	I
AGP ($\mu\text{g/mL}$)	5,55	3,90
CRP ($\mu\text{g/mL}$)	133,17	25,73
Haptoglobin ($\mu\text{g/mL}$)	34,02	0,01
SAA3 ($\mu\text{g/mL}$)	3,28	0,01

O – okolišni uzročnici; I – infektivni uzročnici



Grafikon 23a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma



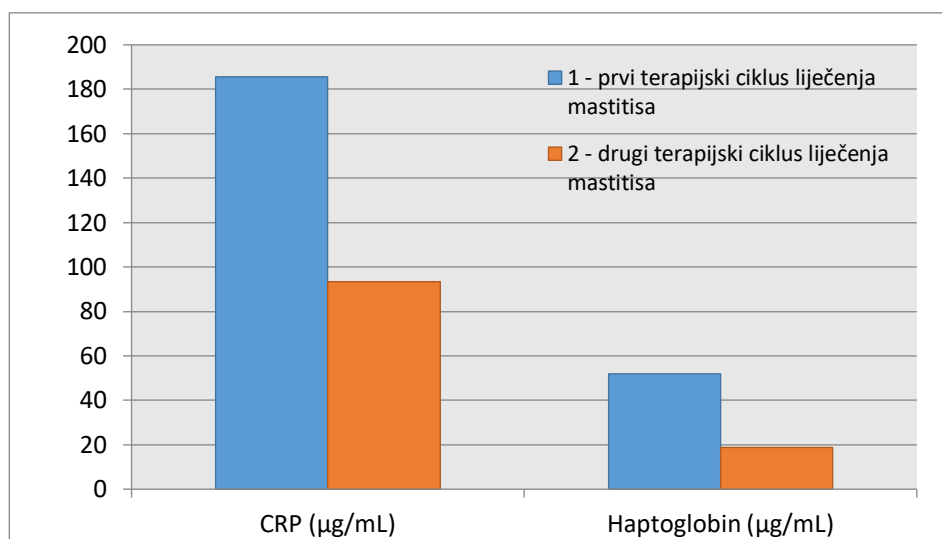
Grafikon 23b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma

U Tablici 26. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata vidljivo je viši sadržaj AGP-a (7,59 μg/mL) zabilježen kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa, dok je viši sadržaj CRP-a (185,48 μg/mL), haptoglobina (51,92 μg/mL) i SAA3-a (2,44 μg/mL) zabilježen kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

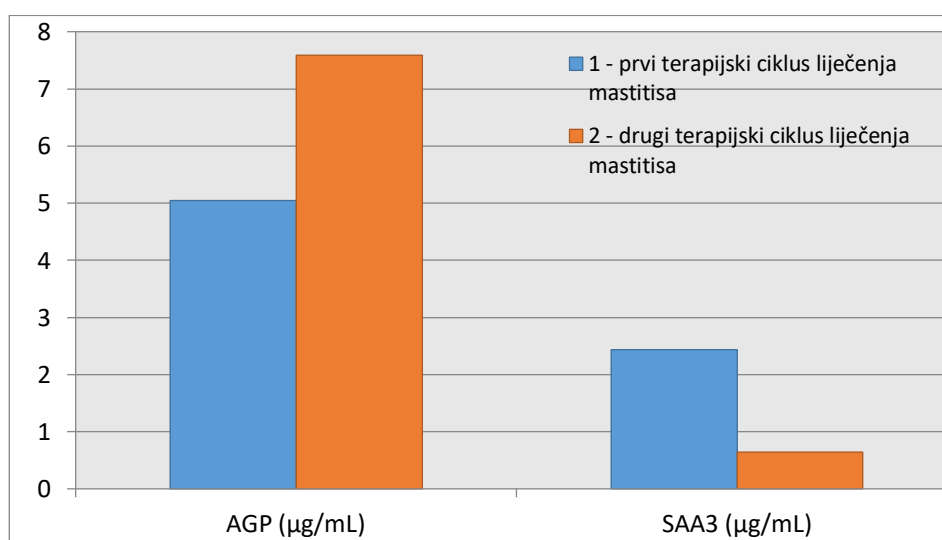
Tablica 26. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

Pokazatelj	1	2
AGP (μg/mL)	5,05	7,59
CRP (μg/mL)	185,48	93,27
Haptoglobin (μg/mL)	51,92	18,83
SAA3 (μg/mL)	2,44	0,64

1 – prvi terapijski ciklus liječenja mastitisa; 2 – drugi terapijski ciklus liječenja mastitisa;



Grafikon 24a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa



Grafikon 24b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa

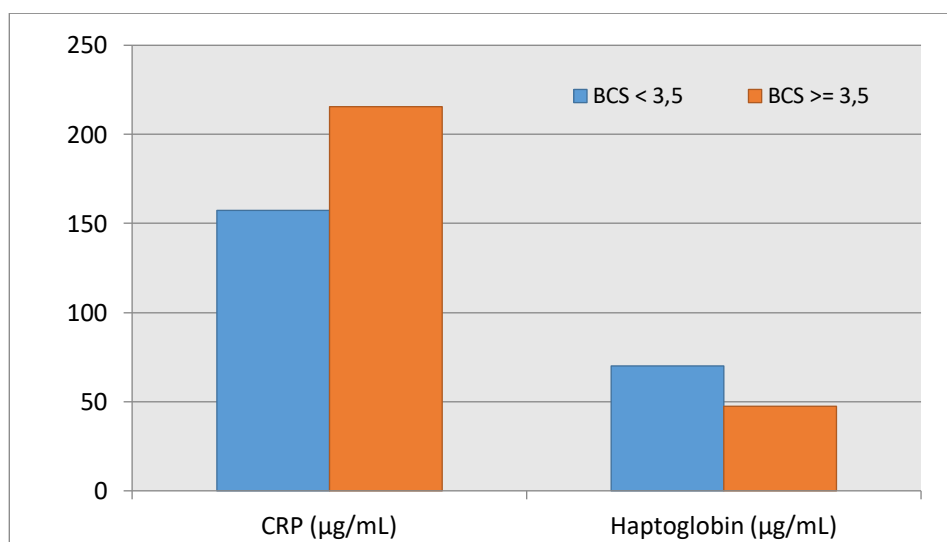
U Tablici 27. prikazane su procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj

haptoglobina (70,15 $\mu\text{g/mL}$) i SAA3 (3,46 $\mu\text{g/mL}$), dok je viši sadržaj AGP-a (6,37 $\mu\text{g/mL}$) i CRP-a (215,64 $\mu\text{g/mL}$) zabilježen u mlijeku krava koje su imale BCS $\geq 3,5$.

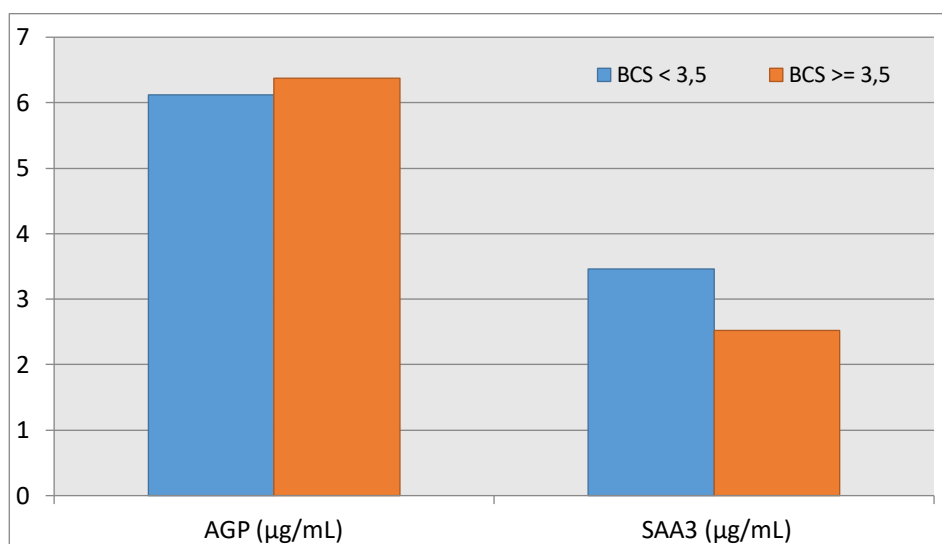
Tablica 27. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

Pokazatelj	BCS < 3,5	BCS $\geq 3,5$
AGP ($\mu\text{g/mL}$)	6,12	6,37
CRP ($\mu\text{g/mL}$)	157,52	215,64
Haptoglobin ($\mu\text{g/mL}$)	70,15	47,62
SAA3 ($\mu\text{g/mL}$)	3,46	2,52

BCS – body condition score, indeks tjelesne mase



Grafikon 25a. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava



Grafikon 25b. Procijenjene srednje vrijednosti (LS means) koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava

4. RASPRAVA

4.1. Proizvodni pokazatelji

Iz našega istraživanja vidljivo je da smo najviše procijenjene srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica zabilježili kod krava iz skupine supkliničkog mastitisa koje su na mjesečnoj kontroli mliječnosti imale povišen broj somatskih stanica (200.000 – 400.000 u ml). Imale su najviše procijenjene srednje vrijednosti za dnevnu količinu mlijeka (49,44 kg), dnevni sadržaj mliječne masti (4,43%) i dnevni sadržaj bjelančevina (3,24%). Najniže procijenjene srednje vrijednosti za dnevnu količinu mlijeka (34,88 kg), dnevni sadržaj mliječne masti (3,80%) zabilježili smo kod krava iz skupine s kliničkim mastitisom (> 400.000 u ml). Slične rezultate nalazimo u Kul i sur. (2019) koji su zaključili da je broj somatskih stanica u negativnoj korelaciji s dnevnom proizvodnjom mlijeka. Najveće gubitke u proizvodnji mlijeka utvrdili su kod krava s više od 500.000 somatskih stanica u ml (31,56 kg). U istom su istraživanju utvrdili da se povećanjem broja somatskih stanica u mlijeku smanjuje sadržaj mliječne masti. Najniži sadržaj mliječne masti (3,25%) zabilježili su u skupini krava s više od 500.000 somatskih stanica u ml. Ovi rezultati uvelike su u skladu s nalazima drugih autora: Millogo i sur. (2009) utvrdili su da se povećanjem broja somatskih stanica smanjuje proizvodnja mlijeka. U istraživanju kojeg su proveli Cinar i sur. (2015) također su utvrdili da proizvodnja mlijeka pada kada raste broj somatskih stanica. Najafi i sur. (2009) su dokazali da se udio masti u mlijeku smanjuje s povećanjem broja somatskih stanica. Suprotno, Erdem i sur. (2010) u svome istraživanju utvrdili su da učinak broja somatskih stanica za dnevnu proizvodnju mlijeka nije bio statistički značajan.

Iz naših rezultata o procijenjenim srednjim vrijednostima dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku vidljivo je da je viši dnevni sadržaj mliječne masti (4,05 %) zabilježen u skupini krava kod kojih nije utvrđen uzročnik u mlijeku, ali u istoj skupini krava zabilježen je viši broj somatskih stanica u mlijeku (3.502.535,89). Viši dnevni sadržaj bjelančevina (3,27%) zabilježen je u skupini krava kod kojih je utvrđen uzročnik u mlijeku.

Istraživanje Pakr i sur. (2007) potvrđuju pozitivnu korelaciju između broja somatskih stanica i postotka mliječne masti ($b=0,0177$) i bjelančevina ($b=0,4275$) te negativnu između broja somatskih stanica i postotka laktoze ($b= -0,6886$; $P < 0,001$) kada bakterije nisu bile prisutne u mlijeku. Kada su bakterije bile prisutne u mlijeku, odnosi između broja

somatskih stanica i postotaka mliječnih bjelančevina ($b = -0,2693$) i laktoze ($b = -0,4108$) bili su negativni ($P < 0,001$).

U našem istraživanju praćene su i srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o porijeklu mikroorganizama. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viša dnevna količina mlijeka (45,31 kg) i viši broj somatskih stanica (1.997.464,32) zabilježen kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici), dok je viši dnevni sadržaj mliječne masti (3,93 %) i viši dnevni sadržaj bjelančevina (3,29 %) zabilježen kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju mastitis mogu se podijeliti u dvije kategorije: zarazni uzročnici, koji se prenose s krave na kravu, prvenstveno tijekom procesa mužnje, i uzročnici iz okoliša, (National Mastitis Council, 2016). Najvažniji zarazni uzročnici su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Corynebacterium bovis*, dok su najvažniji okolišni uzročnici *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* i drugi Gram-pozitivni i katalaza-negativni koki (ostali streptokoki).

Gröhn i sur. (2004) istraživali su učinke prve pojave kliničkog mastitisa uzrokovanog specifičnim patogenima na proizvodnju mlijeka kod 3071 mliječne krave na 2 farme u državi New York. Proučavani patogeni bili su *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, ostali patogeni grupirani u zasebnu skupinu i skupina bez izoliranog patogena. Kod prvotelki, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* i skupina bez izoliranog patogena izazvali su najveći pad mliječnosti. Mliječnost je općenito počela padati 1. ili 2. tjedna prije dijagnoze, a najveći gubitak dogodio se neposredno nakon dijagnoze. Kod starijih krava, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli* i *Klebsiella spp.* uzrokovali su najveći pad mliječnosti. Rezultati istraživanja pokazuju da je gubitak mlijeka kod krava s mastitisom doista varirao ovisno o patogenu odgovornom za mastitis.

Procijenjene srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o broju tretmana mastitisa u našem istraživanju bile su sljedeće: najviši dnevni sadržaj mliječne masti (4,02%) i najviša dnevna količinu mlijeka (43,19 kg) bila je kod krava iz skupine na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa, dok smo najviši broj somatskih stanica (3.098.146,87) zabilježili kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

Martins i sur. (2020) utvrdili su da je veća proizvodnja mlijeka u zdravih krava (od +2,1 do +5,7 kg/kravi/dan) nego onih koje boluju od mastitisa. Kod zdravih krava zabilježili su i veće prinose mliječnih komponenti nego što su to zabilježili kod krava s kroničnim mastitisom i pozitivnim nalazom kulture uzročnika. Zdrave krave proizvele su više mlijeka nego krave s kroničnim mastitisom i pozitivnim nalazom kulture sporednih (+5,2 kg/kravi/dan) i glavnih uzročnika mastitisa (+7,1 kg/kravi/danu), a gubici su varirali od 5,8 do 11,8 kg/kravi/danu, ovisno o uzročniku. Kod krava s kroničnim mastitisom i pozitivnim nalazom kulture uzročnika utvrdili su smanjenu proizvodnju mlijeka za 24,5% i smanjeni ukupni sadržaj suhe tvari za 22,4%.

U našem istraživanju praćene su i srednje vrijednosti dnevnih svojstava mliječnosti u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije. Kod krava BCS < 3,5 zabilježena je viša dnevna količina mlijeka (38,30 kg), viši dnevni sadržaj mliječne masti (3,57%) i niži broj somatskih stanica (1.368.012,47), dok je kod krava koje su imale BCS $\geq$ 3,5 zabilježena niža dnevna količina mlijeka (36,27 kg), niži dnevni sadržaj mliječne masti (1,12%) i viši broj somatskih stanica (3.210.542,41).

Jilek i sur. (2008) utvrdili su da proizvodnja mlijeka kod krava korelira s njihovom tjelesnom kondicijom koja je osnova za procjenu upravljanja hranidbom mliječnih krava. Dakle, optimalna tjelesna kondicija mliječne krave ključna je za formiranje elitnog stada i postizanje visoke mliječnosti jer mršave i debele krave predstavljaju veći rizik za nižu proizvodnju mlijeka i veći broj somatskih stanica u mlijeku (Berry i sur. 2007).

Duchacek i sur. (2012) istraživali su promjene u sadržaju mliječne masti i proteina u mlijeku krava kao i promjenu tjelesne kondicije u razdoblju nakon teljenja. Istraživanjem su utvrdili da je sadržaj mliječne masti na početku laktacije iznosio 4,89% te se u 7. tjednu laktacije smanjio na 3,27%, a potom je porastao na 4,06% u 14. i 16. tjednu laktacije. Sadržaj proteina imao je tendenciju laganog pada do 7. tjedna laktacije, a zatim se povećavao do kraja promatranog razdoblja.

O svojim opažanjima Jilek i sur. (2008) i Roche (2007), izvijestili su da je samo postpartalna tjelesna kondicija utjecala na razinu proizvodnje mlijeka, dok su Mushtaq i sur. (2012) zabilježili da je proizvodnja mlijeka bila u negativnoj korelaciji s postpartalnom tjelesnom kondicijom, vjerojatno zbog mobilizacije tjelesnih rezervi, posebno u ranoj laktaciji.

Loker i sur. (2012) primijetili su da je promjena tjelesne kondicije i proizvodnja mlijeka fiziološki povezana, te da promjene nisu savršeno sinkronizirane. Navedeni autori utvrdili su da je niža proizvodnja mlijeka bila povezana s prekomjernom tjelesnom kondicijom (debele krave) kako je laktacija napredovala.

4.2. Biokemijski pokazatelji u krvi

U ovisnosti o razredima broja somatskih stanica u našem istraživanju, najviši sadržaj glukoze (3,34 mmol/L) i ukupnih proteina (91,00 g/L) utvrđeni su kod III. skupine krava s kliničkim mastitisom, dok smo najviši sadržaj ureje (12,89 mmol/L) te najviši sadržaj Fe (24,11 μ mol/L) i Ca (2,32 mmol/L) zabilježili kod I. skupine krava sa zdravim vimenom. Najviši sadržaj albumina (34,33 g/L), kolesterola (6,54 mmol/L), LDL-a (2,89 mmol/L) i BHB-a (0,56 mmol/L) zabilježili smo kod II. skupine krava (sa subkliničkim mastitisom).

U našem istraživanju praćene su i procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viši sadržaj glukoze (3,35 mmol/L), ureje (3,64 mmol/L), ukupnih proteina (89,07 g/L), kolesterola (4,88 mmol/L), BHB-a (0,55 mmol/L), Fe (20,02 μ mol/L) i P (1,97 mmol/L) zabilježen kod krava iz I. skupine kod kojih u mlijeku nije detektiran uzročnik. Viši sadržaj albumina (31,82 g/L) zabilježen je kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku detektiran uzročnik.

Iz naših rezultata o procijenjenim srednjem vrijednostima biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma vidljivo je da je viša razina ukupnih proteina (92,42 g/L), albumina (33,23 g/L), BHB-a (0,78 mmol/L) i P (1,89 mmol/L) zabilježena kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici), dok je viša razina ureje (10,16 mmol/L), kolesterola (4,67 mmol/L), LDL-a (2,02 mmol/L) i Fe (18,11 μ mol/L) zabilježena kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

U našem istraživanju praćene su i procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata vidljivo je da smo najviši sadržaj glukoze (3,40 mmol/L), ukupnih proteina (92,78 g/L), albumina (33,64 g/L), triglicerida (0,15 mmol/L), kolesterola (6,01 mmol/L), LDL-a (2,68 mmol/L), Ca (2,47 mmol/L) i P (2,14 mmol/L) zabilježili kod krava iz skupine na kojima su

provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa, dok smo najviši sadržaj Fe (20,61 $\mu\text{mol/L}$) zabilježili kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa. Najviši sadržaj ureje (18,53 mmol/L) zabilježili smo kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa.

Iz pregleda naših rezultata o procijenjenim srednjim vrijednostima biokemijskih pokazatelja u krvi u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava također je vidljivo da je kod krava koje su imale $\text{BCS} < 3,5$ zabilježen viši sadržaj ureje (6,03 mmol/L), ukupnih proteina (89,66 g/L), albumina (32,18 g/L), Fe (21,53 $\mu\text{mol/L}$) i Ca (2,40 mmol/L), dok je kod krava koje su imale $\text{BCS} \geq 3,5$ zabilježen viši sadržaj glukoze (3,25 mmol/L), kolesterola (5,07 mmol/L), LDL-a (2,18 mmol/L), BHB-a (0,48 mmol/L) i P (1,88 mmol/L).

U istraživanju Singh i sur. (2014), ispitujući učinak mastitisa na hematološke i biokemijske vrijednosti u krvi i minerala plazme kod goveda križanih pasmina, utvrdili su da je razina albumina bila značajno niža kod životinja sa subkliničkim (2,44 g/dl) i kliničkim (2,31 g/dl) oblikom mastitisa nego što je zabilježena kod zdravih životinja. Hipoalbuminemija ukazuje na stanje stresa koji pojačava katabolizam proteina uslijed raznih infekcija i trauma. Također su utvrdili da je razina kalcija u plazmi klinički i subklinički zaraženih životinja bila značajno ($P < 0,05$) viša nego što je to utvrđena kod zdravih životinja. U istom istraživanju Singh i sur. (2014) zabilježili su da je prosječna vrijednost anorganskog fosfora u plazmi zdravih životinja (6,24 mg/dl) bila neznajno ($P > 0,005$) viša nego što je bila kod subklinički (5,19 mg/dl) i klinički (4,94 mg/dl) zaraženih životinja, a što se može pripisati njegovom većem izlučivanju u mlijeku zbog oštećenja sluznice vimena.

Heinrich i sur. (1990) utvrdili su da je albumin široko priznat kao protein negativne akutne faze. Bertoni i sur. (1994) zabilježili su nižu razinu albumina kod krava s mastitisom, dok Dwivedi i sur. (2004) navode značajno povećanje prosječnih vrijednosti albumina kod krava s mastitisom.

U istraživanju koje su proveli Jožef i sur. (2022) ispitujući procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u plazmi u ovisnosti razredima ocjene mastitisa (temeljem dnevnog sadržaja laktoze i broja somatskih stanica), utvrdili su više vrijednosti ($P < 0,05$) glukoze u plazmi zdravih krava nego što su utvrdili kod krava iz skupine rizične

na mastitis. Vrijedosti ureje u plazmi nisu se značajno razlikovale u ovisnosti o razredima ocjene mastitisa, ali su više vrijednosti ureje u ovisnosti o dnevnom sadržaju laktoze utvrdili kod zdravih životinja. Najviše vrijednosti ureje u plazmi u ovisnosti o broju somatskih stanica utvrdili su kod krava iz skupine supkliničkog mastitisa. U navedenom istraživanju zabilježili su da su vrijednosti u sadržaju proteina varirale u ovisnosti o razredima ocjene mastitisa, ali razlika nije bila značajna ($P > 0,05$). Varijabilnost bez značajnih razlika ($P > 0,05$) utvrdili su i u koncentracijama albumina, triglicerida, β -hidroksibutirata i Fe u plazmi, dok su kod krava iz skupine rizične na mastitis, u ovisnosti o dnevnom sadržaju laktoze, utvrdili značajno višu ($P > 0,05$) koncentraciju Ca. U ovisnosti o broju somatskih stanica najviše vrijednosti Ca utvrdili su u skupini krava kod kojih postoji rizik od pojave mastitisa (200.000 – 400.000 u ml).

Neke studije ukazuju na to da se koncentracija Fe u serumu može koristiti kao marker akutne upale kod ljudi i nekih drugih životinjskih vrsta (Ward i sur. 1996; Sunder-Plamann i sur. 1999; Neumann, 2003; Borges i sur. 2007).

Borges i sur. (2007) zaključili su da se koncentracija Fe u serumu brzo smanjuje kao odgovor na upalu te da navedeni obrambeni mehanizam domaćina ima za cilj uskratiti Fe potrebno za bakterijsku virulentnost i replikaciju.

Lohuis i sur. (1990) utvrdili su da se koncentracija Fe u serumu smanjila u životinja s eksperimentalno induciranom respiratornom bolesti goveda i mastitisom, ali nije bila u korelaciji s drugim pokazateljima upale. Ipak, koncentracija Fe u serumu može biti koristan alat za dijagnostiku upala kod goveda oboljelih od različitih upala.

Tsukano i Suzuki (2020) pokazali su da u serumu krava s akutnim mastitisom nije bilo značajnih razlika u aktivnostima AST i GGT u serumu, ali postojale su razlike u koncentracijama Fe u serumu, čime su također potvrdili važnost Fe kao biomarkera u procjeni akutnog mastitisa u krava.

Neke studije (Rathaur i sur., 2020; Tripathy i sur., 2018) ukazale su na značajno povećanje aktivnosti serumskih AST i koncentracije proteina te značajno smanjenje koncentracije Ca i glukoze u krava zahvaćenih mastitisom, u usporedbi sa zdravim kravama, dok su Silankova i sur. (2014) pretpostavili da upala mliječne žlijezde dovodi do značajnog povišenja sadržaja glukoze u krvnoj plazmi koji je uzrokovan relativno većom stopom proizvodnje glukoze.

Moyes i sur. (2009) utvrdili su značajan pozitivan odnos između aktivnosti AST-a i razvoja kliničkog mastitisa tijekom rane laktacije bez uočenih razlika između zdravih krava i onih

sa subkliničkim mastitisom. Također, Moyes i suradnici ukazali su da su povećane koncentracije NEFA i BHBA povezane s razvojem mastitisa.

Mouffok i sur. (2013) utvrdili su značajno smanjenje postpartalne tjelesne kondicije krava praćene povišenjem vrijednosti kolesterola i β -hidroksibutirata (BHB). Korelacijskom analizom pokazali su da je koncentracija BHB prije teljenja bila u negativnoj korelaciji s tjelesnom kondicijom ($r = -0,321$; $P < 0,05$) i kolesterolom ($r = -0,308$; $P < 0,05$). U postpartalnom razdoblju, tjelesna kondicija bila je u negativnoj korelaciji s kolesterolom ($r = -0,416$; $P < 0,05$), ureom ($r = -0,366$; $P < 0,05$) i BHB ($r = -0,487$; $P < 0,05$). Međutim, utvrdili su da se proizvodnje mlijeka značajno smanjila usporedo s povišenjem sadržaja glukoze ($r = -0,449$; $P < 0,05$) i BHB ($r = -0,514$; $P < 0,05$). Nadalje, navedeni autori zabilježili su da se sadržaj mliječne masti značajno povećao usporedo s koncentracijom triglicerida u krvi ($r = 0,681$; $P < 0,05$) i BHB ($r = 0,522$; $P < 0,05$), što ukazuje na visoku mobilizaciju tjelesnih rezervi koje se koriste za sintezu mliječne masti. Navedeni autori su zaključili da se može pretpostaviti da su vrijednosti BHB najbolji pokazatelj tjelesne kondicije mliječnih krava koja određuje razinu njihove proizvodnje i kvalitetu proizvoda.

Mohammadi i sur. (2012) uočili su pozitivnu korelaciju između količine mlijeka, BHB i glukoze, dok su Ling i sur. (2003) izvijestili o snažnoj negativnoj korelaciji između koncentracije kolesterola i triglicerida kod krava u suhostaju, a ta je situacija bila obrnuta nakon teljenja. Analizom varijance utvrdili su da su vrijednosti kolesterola nakon teljenja bile niže kod krava s prosječnim tjelesnom kondicijom te da su se vrijednosti kolesterola povisivale usporedo sa smanjenjem tjelesne kondicije u periodu suhostaja i nakon poroda.

4.3. Biokemijski pokazatelji u mlijeku

Iz pregleda naših rezultata o procijenjenim srednjim vrijednostima biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica vidljivo je da smo najviši sadržaj glukoze (0,55 mmol/L) zabilježili kod I. skupine krava sa zdravim vimenom, dok smo najviši sadržaj ureje (5,09 mmol/L), ukupnih proteina (36,40 g/L), albumina (24,80 g/L), Fe (40,66 μ mol/L), Ca (3,44 mmol/L) i P (3,29 mmol/L) zabilježili kod II. skupine krava tj. skupine u subkliničkom mastitisu.

U našem istraživanju procjenjivali smo i srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je viši sadržaj glukoze (0,45 mmol/L), ukupnih proteina (32,32 g/L), albumina (20,84 g/L), Fe (13,99 μ mol/L) i Ca (3,08 mmol/L) zabilježen kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku detektiran uzročnik, dok je viši sadržaj ureje (4,67 mmol/L) zabilježen kod krava iz I. skupine kod kojih nije detektiran uzročnik u mlijeku. Procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma bila je viša razina glukoze (0,46 mmola/L), ukupnih proteina (32,83 g/L), albumina (20,91 g/L), Fe (14,41 μ mol/L), Ca (3,11 mmol/L) i P (2,81 mmol/L) u krava iz I. skupine (okolišni uzročnici), dok je viša razina ureje (4,65 mmol/L) zabilježena kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici).

Iz rezultata našeg istraživanja o procijenjenim srednjim vrijednostima biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa može se vidjeti da smo najviši sadržaj glukoze (0,56 mmol/L), albumina (22,37 g/L), Ca (3,26 mmol/L) i P (3,13 mmol/L) zabilježili kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa. Također smo utvrdili da je najviši sadržaj ureje (5,01 mmol/L), ukupnih proteina (33,24 g/L) i Fe (15,66 μ mol/L) zabilježen kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

U ovom istraživanju procjenjivali smo i srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata koje smo dobili vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj glukoze (0,48 mmol/L), ureje (4,62 mmol/L), ukupnih proteina (32,40 g/L), albumina (21,38 g/L) i Fe (20,17 μ mol/L).

Singh i Mathur (1990) iznijeli su podatke da važni minerali (Ca, P, Na, K, Cu, Mn, Fe i Zn) određeni u obranom mlijeku ili u sirutki mogu pretrpjeti značajne promjene kao posljedicu poremećaja sekrecije u mliječnim žlijezdama i povećane propusnosti krvnih kapilara.

Middleton i sur. (2004) dokazali su da infekcija mliječne žlijezde mijenja količinu elemenata u tragovima u mlijeku, npr. bakra, cinka i željeza dok su Verheijden i sur.

(1983) otkrili da mlijeko krave s upalom vimena sadrži nešto manje cinka od mlijeka zdravih životinja.

Mohamed i sur. (1999) utvrdili su da promjene u razinama makrominerala u pojedinačnim uzorcima mlijeka mogu biti pokazatelji infekcije vimena ili četvrti. Štoviše, Mohamed i sur. (1999) zaključili su da utvrđivanje i praćenje razina nekih minerala (Ca, Na, K, Mg, P, Fe, Zn i Cu) u uzorcima mlijeka može biti učinkoviti alat za praćenje bolesti mliječne žlijezde goveda. Isti autori utvrdili su da se kod subkliničkog oblika mastitisa, razina Cu u mlijeku smanjivala, dok se kod kliničkog oblika mastitisa razina povećavala. Također su utvrdili da se razina Zn povećavala kod kliničkog oblika mastitisa, a razina Fe povećavala sukladno težini same infekcije.

Erskine i Bartlett (1993), analizirajući eksperimentalno izazvan mastitis s bakterijom *E. coli*, utvrdili su da je infekcija rezultirala smanjenjem koncentracije cinka, željeza i bakra u serumu i ona je iznosila 28, 35 i 52% koncentracije prije izlaganja.

U istraživanju koje su proveli Jožef i sur. (2022), ispitujući procijenjene srednje vrijednosti biokemijskih pokazatelja u mlijeku u ovisnosti razredima ocjene mastitisa (temeljem dnevnog sadržaja laktoze i broja somatskih stanica), utvrdili su da se vrijednosti asparat aminotransferaze (AST) nisu značajno razlikovale ($P > 0,05$), no najviše vrijednosti utvrđene su kod životinja iz skupine rizične na mastitis ($DLC < 4,5\%$) i kod životinja s mastitisom ($SCC > 400.000$). Najviše vrijednosti γ -glutamil transferaze (GGT) utvrdili su u skupini zdravih životinja ($DLC > 4,5\%$) i kod skupine sa subkliničkim mastitisom ($SCC = 200.000$ do 400.000). U istome istraživanju, najniži sadržaj glukoze, proteina i Fe u mlijeku zabilježili su kod životinja iz skupine subkliničkog mastitisa ($DLC < 4,5\%$) i kod životinja s mastitisom ($SCC > 400.000$). Suprotno tome, kod istih skupina životinja zabilježili su najviši, ali ne i značajno veći ($P > 0,05$) sadržaj globulina u mlijeku. U navedenom istraživanju također su utvrdili naznatno viši sadržaj Ca ($P > 0,05$) u skupini zdravih životinja ($DLC > 4,5\%$), dok su kod životinja iz skupine subkliničkog mastitisa utvrdili značajno više vrijednosti Ca u mlijeku ($P < 0,05$).

Erskine i Bartlett (1993), u pokusu s induciranim mastitisom, utvrdili su smanjenje sadržaja Fe i Zn u serumu za otprilike 4 do 8 sati nakon najviše zabilježene koncentracije bakterija u mlijeku.

Turk i sur. (2021) utvrdili su viši sadržaj za ukupnih bjelančevina u mlijeku kod krava iz skupina s kliničkim i subkliničkim stadijem u usporedbi sa sadržajem bjelančevina u

zdravih krava. Gore spomenuti autori izvijestili su o obrnutom trendu u serumu, pri čemu je većina proteina bila zastupljena nižim vrijednostima u skupinama krava s kliničkim i subkliničkim stanjima u usporedbi sa zdravom skupinom. Povećana količina proteina u mlijeku mogla bi se objasniti kombinacijom lokalne sinteze u mliječnoj žlijezdi i ekstravazacijom krvnih proteina plazme u mliječnu žlijezdu kroz krvno-mliječnu barijeru. Sveukupno smanjenje vrijednosti proteina u serumu moglo bi biti uzrokovano smanjenom konzumacijom hrane tijekom sustavnog upalnog odgovora tj. negativnog odgovora proteina akutne faze (APP) i/ili prijenosa proteina u mliječnu žlijezdu.

Cilj istraživanja Andjelića i sur. (2022) bio je određivanje metaboličkih pokazatelja krvi i mlijeka te njihove korelacije u svrhu procjene metaboličkog statusa muznih krava. Utvrdili da je sadržaj mliječne masti i laktoze bio niži kod krava tijekom ranog stadija laktacije nego što je utvrđen u kasnijim stadijima, dok je sadržaj mliječnih bjelančevina i aktivnost AST, ALT, ALP i LDH u mlijeku bila znatno viša kod krava u ranom stadiju laktacije. Navedeni autori utvrdili su da je sadržaj mliječne masti bio u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem glukoze, ukupnih bjelančevina i triglicerida, a negativno s vrijednostima BHB, NEFA, ukupnog bilirubina, ALT, LDH i ALP u krvi. Aktivnosti enzima u mlijeku bile su u pozitivnoj korelaciji s aktivnosti enzima i vrijednostima NEFA, BHB i bilirubina u krvi, ali u negativnoj korelaciji s glukozom u krvi. Gore navedeni autori na temelju provedenog istraživanja zaključili su da između vrijednosti BHB u krvi i mlijeku postoji značajna pozitivna korelacija, a slične promjene vrijednosti metabolita u krvi i mlijeku tijekom laktacije i korelacija između njih potvrđuje da mlijeko ima veliki potencijal u predviđanju vrijednosti metabolita u krvi i metaboličkog statusa krava.

Tabatabaee i sur. (2021) procjenjivali su odnose između komponenti mlijeka (proteina akutne faze, enzima, metaboličkih pokazatelja i oksidativnih pokazatelja) i ishoda spontanog izlječenja subkliničkog mastitisa uzrokovanog bakterijom *Staphylococcus aureus* kod muznih krava. Usporedbom izmjerenih pokazatelja utvrdili su niže vrijednosti ALP-a i haptoglobina prilikom postavljanja dijagnoze i nakon izlječenja ($P < 0,05$) kod krava sa subkliničkim mastitisom i spontanim izlječenjem. Navedeni autori sugerirali su da povišene vrijednosti haptoglobina i viša aktivnost ALP-a ukazuju na pojačani oksidativni stres i mogu poslužiti kao rani dijagnostički pokazatelji kronične bolesti i perzistencije subkliničkog mastitisa uzrokovanog sa *S. aureus* kod muznih krava.

Bozhkova i sur. (1976) proveli su biokemijska i citološka ispitivanja na mlijeku i mliječnom serumu te krvi i krvnom serumu krava sa simptomima subkliničkog mastitisa. U navedenom istraživanju utvrdili su je da je mlijeko životinja sa subkliničkim mastitisom imalo manji sadržaj laktoze, anorganskog fosfora i sijačne kiseline te su zabilježili viši sadržaj klorida i porast aktivnosti alkalne fosfataze. Osim toga, utvrdili su i povišenje sadržaja serumskog albumina i gama-laktoglobulina te smanjenje sadržaja alfa-laktoglobulina i beta-laktoglobulina. Također su utvrdili i značajan pad ukupnih proteina.

4.4. Aminokiselinski sastav mlijeka

Procjenom srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica utvrdili smo da je kod I. skupine krava (zdrave krave) zabilježen najviši sadržaj histidina (88,63 $\mu\text{mol/L}$), treonina (137,34 $\mu\text{mol/L}$), valina (57,28 $\mu\text{mol/L}$) i metionina (16,50 $\mu\text{mol/L}$), dok je kod II. skupine krava (subklinički mastitis) zabilježen najviši sadržaj asparaginske kiseline (16,66 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (398,46 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (21,53 $\mu\text{mol/L}$), serina (13,54 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (40,86 $\mu\text{mol/L}$), arginina (53,72 $\mu\text{mol/L}$) i cisteina (1302,24 $\mu\text{mol/L}$).

Kod III. skupne krava (klinički mastitis) zabilježili smo najviši sadržaj glicina (35,88 $\mu\text{mol/L}$), alanina (43,11 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (49,03 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (33,08 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (26,13 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (9,64 $\mu\text{mol/L}$), leucina (49,51 $\mu\text{mol/L}$), lizina (70,15 $\mu\text{mol/L}$) i hidrok diprolina (76,72 $\mu\text{mol/L}$).

U našem istraživanju također smo procjenjivali i srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku. Iz pregleda rezultata našeg istraživanja vidljivo je da je viša razina asparaginske kiseline (16,82 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (16,01 $\mu\text{mol/L}$), histidina (63,13 $\mu\text{mol/L}$), metionina (12,88 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (7,62 $\mu\text{mol/L}$), lizina (56,07 $\mu\text{mol/L}$), hidroksiprolina (66,00 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz II. skupine tj. kod krava kod kojih u mlijeku nije detektiran uzročnik, dok je viša razina glutaminske kiseline (265,60 $\mu\text{mol/L}$), serina (12,35 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (30,93 $\mu\text{mol/L}$), glicina (40,20 $\mu\text{mol/L}$), treonina (143,65 $\mu\text{mol/L}$), arginina (39,92 $\mu\text{mol/L}$), alanina (34,51 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (49,80 $\mu\text{mol/L}$), cisteina (662,83 $\mu\text{mol/L}$), valina (66,65 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (31,38 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (19,58 $\mu\text{mol/L}$) i

leucina (34,18 $\mu\text{mol/L}$) zabilježena kod krava iz I. skupine tj. kod krava kod kojih je u mlijeku detektiran uzročnik.

Iz pregleda naših rezultata o procijenjenim srednjim vrijednostima aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma vidljivo je da smo višu razinu asparaginske kiseline (27,51 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (286,56 $\mu\text{mol/L}$), serina (15,74 $\mu\text{mol/L}$), histidina (86,15 $\mu\text{mol/L}$), treonina (118,37 $\mu\text{mol/L}$), alanina (52,05 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (40,30 $\mu\text{mol/L}$), cisteina (816,70 $\mu\text{mol/L}$), valina (24,0 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (33,76 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (25,86 $\mu\text{mol/L}$) i leucina (45,36 $\mu\text{mol/L}$) zabilježili kod krava iz II. skupine (infektivni uzročnici), dok smo višu razinu asparagina (16,71 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (30,08 $\mu\text{mol/L}$), glicina (24,40 $\mu\text{mol/L}$), arginina (31,25 $\mu\text{mol/L}$), metionina (12,96 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (8,32 $\mu\text{mol/L}$), lizina (56,86 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolina (66,94 $\mu\text{mol/L}$) zabilježili kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

U istraživanju koje smo proveli također smo procijenjivali i srednje vrijednosti aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa. Iz pregleda rezultata našeg istraživanja vidljivo je da je kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa zabilježen najviši sadržaj glutaminske kiseline (299,82 $\mu\text{mol/L}$), serina (12,66 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (41,34 $\mu\text{mol/L}$), glicina (48,91 $\mu\text{mol/L}$), arginina (48,16 $\mu\text{mol/L}$), tirozina (50,14 $\mu\text{mol/L}$), valina (64,61 $\mu\text{mol/L}$), triptofana (32,73 $\mu\text{mol/L}$), fenilalanina (20,43 $\mu\text{mol/L}$), izoleucina (8,75 $\mu\text{mol/L}$), leucina (48,50 $\mu\text{mol/L}$) i hidroksiprolin (62,38 $\mu\text{mol/L}$).

Kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa zabilježili smo najviši sadržaj cisteina (723,39 $\mu\text{mol/L}$) i metionina (20,17 $\mu\text{mol/L}$), dok smo kod krava iz skupine na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa zabilježili najviši sadržaj asparaginske kiseline (17,66 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (19,93 $\mu\text{mol/L}$), histidina (87,03 $\mu\text{mol/L}$), treonina (157,32 $\mu\text{mol/L}$), alanina (40,24 $\mu\text{mol/L}$) i lizina (57,62 $\mu\text{mol/L}$).

Iz pregleda naših rezultata o procijenjenim srednjim vrijednostima aminokiselinskog sastava u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava vidljivo je da je kod krava koje su imale $\text{BCS} < 3,5$ u mlijeku zabilježen viši sadržaj asparaginske kiseline (26,12 $\mu\text{mol/L}$), glutaminske kiseline (328,41 $\mu\text{mol/L}$), asparagina (23,15 $\mu\text{mol/L}$), serina (13,51 $\mu\text{mol/L}$), glutamina (29,96 $\mu\text{mol/L}$), histidina (56,85 $\mu\text{mol/L}$), glicina (35,01

μmol/L), treonina (175,92 μmol/L), arginina (39,07 μmol/L), alanina (37,06 μmol/L), tirozina (42,84 μmol/L), cisteina (652,77 μmol/L), valina (80,46 μmol/L) i triptofana (27,82 μmol/L), dok je kod krava koje su imale BCS $\geq 3,5$ u mlijeku zabilježen viši sadržaj metionina (13,07 μmol/L), fenilalanina (16,03 μmol/L), izoleucina (8,79 μmol/L), leucina (26,69 μmol/L), lizina (57,94 μmol/L) i hidroksiprolina (70,51 μmol/L).

Proučavanjem aminokiselinskog sastava mlijeka u krava zaraženih mastitisom jasno je dokazana ovisnost između pogoršane kakvoće mlijeka i promjene sadržaja aminokiselina. U mlijeku s većim brojem somatskih stanica sadržaj aminokiselina bio je veći. Koncept da se koncentracije metabolita mijenjaju tijekom mastitisa (čak i u subkliničkoj fazi) u svome istraživanju potvrdili su Pyörälä (2003); Baeker i sur. (2002). Sukladno tome, u prethodnim istraživanjima koje su proveli (Andrei i sur., 2001; Ianni i sur., 2015) utvrđeno je da se ukupni sadržaj aminokiselina u mlijeku značajno povećava kod mastitisa u usporedbi s normalnim mlijekom, a to se posebno odnosi na povećanje nekih aminokiselina, uključujući razgranate lance i aromatske aminokiseline.

U istraživanjima koje je provela Polenska (1991) utvrdila je da je koncentracija svih aminokiselina smanjena u prosjeku za 1,9 posto u mlijeku s 500 000 do 1 milijun somatskih stanica u jednom ml, dok je u prosjeku porasla za 47 posto u mlijeku s 1-5 milijuna somatskih stanica, 87 posto u uzorcima s 5-10 milijuna somatskih stanica, a čak za 100 posto u mlijeku s 10-20 milijuna somatskih stanica u 1 ml mlijeka. Asparaginska kiselina, treonin, serin i alanin najviše su se mijenjali ovisno o broju somatskih stanica, s druge strane, glutaminska kiselina i fenilalanin pokazali su najmanju promjenjivost.

Ianni i sur. (2019) ustvrdili su da je rana dijagnoza subkliničkog mastitisa kod krava ključnim čimbenikom za brzo i adekvatno liječenje životinje te da su dobro poznate promjene u sadržaju specifičnih metabolita, uključujući slobodne aminokiseline kod krava s mastitisom (čak i u subkliničkim stadijima). Navedeni autori istraživali su odnose između varijacije sadržaja nevezanih aminokiselina s vrijednošću broja somatskih stanica metodom reverzibilne faze izravnog uparivanja iona koja se temelji na upotrebi detektora raspršivanja svjetlosti isparavanjem (IP-RP-HPLC-ELSD) na 65 uzoraka kravljeg mlijeka. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se utvrdilo postojanje razlika između vrijednosti broja somatskih stanica i koncentracije izoleucina (Ile), leucina (Leu), valina (Val) i tirozina (Tyr). Uzorci su bili podijeljeni u dvije skupine prema vrijednosti broja

somatskih stanica (skupinu I činili su uzorci s SCC < 400 000 stanica/mL, dok je skupina II obuhvaćala uzorke s SCC > 400 000 stanica/mL).

Na temelju statističkih analiza, navedeni autori utvrdili su značajne razlike u sadržaju aminokiselina razgranatog lanca izoleucina (Ile) i leucina (Leu) između navedenih dviju skupina ($p < 0,02^*$ i $<0,005^{**}$), te su ovom studijom potvrdili da je promijenjen metabolizam određenih slobodnih aminokiselina paralelan s povišenjem vrijednosti broja somatskih stanica.

Csilla i sur. (2007) ispitivali su sadržaj slobodnih aminokiselina i slobodnih D-aminokiselina u uzorcima mlijeka s različitim brojem mikroorganizama kao i sastav mliječnih proizvoda proizvedenih od njih. Ukupan broj mikroorganizama u ispitivanim uzorcima mlijeka varirao je od $1,25 \times 10^6$ do $2,95 \times 10^6$. Istraživanjem su utvrdili da koncentracija slobodnih D-aminokiselina i slobodnih L-aminokiselina raste s porastom broja mikroorganizama. Međutim, povećanje sadržaja D-aminokiselina bilo je veće s obzirom na udio mikroorganizama. U navedenom istraživanju utvrđen je i posebno značajan porast broja mikroorganizama u rasponu od $1,5 \times 10^6$ do $2,9 \times 10^6$. Navedeni autori na temelju analize uzoraka skute i sireva proizvedenih različitim tehnologijama došli su do zaključka da postoji povezanost između ukupnog broja mikroorganizama i sadržaja slobodnih D-aminokiselina i slobodnih L-aminokiselina kod svježih mliječnih proizvoda i mliječnih proizvoda koji su sazrijevali tijekom kratkog vremenskog perioda. Istodobno su utvrdili da ukupni broj mikroorganizama ne utječe na omjer enantiomera.

Grispoldi i sur. (2019) utvrdili su da *Staphylococcus aureus* ima sposobnost proizvodnje aminokiselina razgranatog lanca ovisno o hranidbi, te su pokazali da su vrijednosti leucina i izoleucina u korelaciji s opterećenjem bakterijom *S. aureus* u uzorcima mlijeka. Primjenom ANOVA i Tukey-Kramer analize pokazali su statistički značajne razlike u sadržaju (izoleucina i leucina) između dviju skupina koje su se razlikovale ovisno o pozitivnosti pretraživanih uzoraka na *S. aureus* ($p < 0,001$) te su navedeni autori zaključili da povezanost između izoleucina i leucina i infekcije vimena bakterijom *S. aureus* ima važan klinički značaj za brzu dijagnostiku mastitisa navedenim uzročnikom.

Csapo i sur. (1995) koristili su kalifornijski mastitis test za dijagnostiku mastitisa te su proveli analizu uzorka mlijeka na slobodne aminokiseline i slobodne D-aminokiseline. Autori su utvrdili veći sadržaj slobodnih D-aminokiselina u odnosu na sadržaj slobodnih

aminokiselina u slučajevima pozitivnog rezultata kalifornijskog mastitis testa. Sadržaj slobodnih D-aminokiselina u prvim mlazovima mlijeka zdravih krava bio je približno pet puta viši nego u kasnije izmuzenim mlazovima mlijeka vimena istih krava. Navedeni autori također su utvrdili viši sadržaj slobodnih aminokiselina i slobodnih D-aminokiselina kod upale vimena kao i kod pozitivnog nalaza mastitis testa. Na temelju rezultata, autori su zaključili da su vrlo niske vrijednosti slobodnih D-aminokiselina karakterističan nalaz u uzorcima sirovog mlijeka, dok je viši sadržaj slobodnih D-aminokiselina karakterističan za uzorke mlijeka koji su uzeti bez izdvajanja prvih mlazeva i mlijeka krava sa subkliničkim mastitisom.

Iako je u određenoj mjeri pronađen odnos između vrijednosti broja somatskih stanica i izoleucina, leucina i sadržaja tirozina u kravljem mlijeku, ostaju pitanja u vezi s biokemijskim mehanizmima koji leže u pozadini ovih odnosa. Jasno je da bi mogla postojati velika klinička vrijednost praćenja razine izoleucina i leucina u mlijeku te bi ona mogla predstavljati novi potencijalni alat za brzu dijagnozu subkliničkog mastitisa kod krava. Stoga se i nadalje vrše istraživanja koja ispituju sadržaj aminokiselina u sirovom mlijeku i njihovom povezanošću s mastitisom, a posljedično i s bakterijskom aktivnošću u vimenu.

4.5. Koncentracija proteina akutne faze u mlijeku

U našem istraživanju procjenjivali smo srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima broja somatskih stanica. Najviši sadržaj AGP-a (7,52 µg/mL), CRP-a (274,51 µg/mL), haptoglobina (42,11 µg/mL) i SAA3-a (3,73 µg/mL) zabilježili kod III. skupine krava s kliničkim mastitisom. Iz pregleda naših rezultata o procenjenim srednjim vrijednostima koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o razredima pojavnosti mikroorganizama u mlijeku vidljivo je da je viši sadržaj CRP-a (171,02 µg/mL) i haptoglobina (47,58 µg/mL) zabilježen kod krava iz I. skupine kod kojih nije detektiran uzročnik u mlijeku, dok je viši sadržaj AGP-a (6,58 µg/mL) i SAA3-a (2,26 µg/mL) zabilježen kod krava iz II. skupine kod kojih je u mlijeku detektiran uzročnik.

U našem istraživanju također smo procjenjivali srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o porijeklu mikroorganizma. Višu razinu AGP-a (5,55

µg/mL), CRP-a (133,17 µg/mL), haptoglobina (34,02 µg/mL) i SAA3 (3,28 µg/mL) zabilježili kod krava iz I. skupine (okolišni uzročnici).

Iz rezultata našeg istraživanja o procijenjenim srednjim vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o broju tretmana mastitisa vidljivo je da je viši sadržaj AGP-a (7,59 µg/mL) zabilježen kod krava iz skupine na kojima su provedena dva terapijska ciklusa liječenja mastitisa, dok je viši sadržaj CRP-a (185,48 µg/mL), haptoglobina (51,92 µg/mL) i SAA3-a (2,44 µg/mL) zabilježen kod krava iz skupine na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa.

U ovom istraživanju prikazali smo i zabilježili procijenjene srednje vrijednosti koncentracije proteina akutne faze u mlijeku u ovisnosti o ocjeni tjelesne kondicije krava. Iz pregleda rezultata vidljivo je da je kod krava koje su imale BCS < 3,5 u mlijeku zabilježen viši sadržaj haptoglobina (70,15 µg/mL) i SAA3 (3,46 µg/mL), dok je viši sadržaj AGP-a (6,37 µg/mL) i CRP-a (215,64 µg/mL) zabilježen u mlijeku krava koje su imale BCS ≥ 3,5.

U istraživanju Ceciliani (2012) iznio je da se proteini akutne faze (APP) već dugo koriste u humanoj medicini za dijagnozu i prognozu upalnih stanja, a njihova je analiza postala značajan dijagnostički alat u veterinarskoj medicini, dok su Chemonges i sur. (2014) i Eckersall i sur. (2001) utvrdili da su proteini akutne faze (APP) zapravo proteini koji se uglavnom proizvode u jetri i otpuštaju u serum, nakon podražaja upalnim citokinima, posebno s interleukinom-1 (IL-1), interleukinom-6 (IL-6) i čimbenikom nekroze tumora alfa (TNFα) u odgovoru akutne faze kao dijelu urođenog imunološkog odgovora.

Glavni proteini akutne faze su oni čija se koncentracija povećava do i preko 100 puta nakon upale, a kod goveda najrelevantniji proteini akutne faze u serumu su haptoglobin (Hp), serumski amiloid A (SAA), protein koji veže lipopolisaharid (LBP) i alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP) (Ceciliani i sur., 2012). Haptoglobin, SAA i C-reaktivni protein (CRP) identificirani su u mlijeku, što ukazuje na njihov potencijal kao biomarkera mastitisa (Thomas i sur., 2015; Simoes i sur., 2018), a prisutnost proteina akutne faze u tkivu ili organu (tekućini) može se smatrati specifičnijim pokazateljem upale lokalizirane u tom organu, osobito kada ne postoji odgovarajući porast serumskog proteina akutne faze (Nielsen i sur., 2004).

Thomas i sur. (2018) primjetili su povećanje otpuštanja Hp, SAA, CRP i AGP u stanicama mliječne žlijezde u slučajevima mastitisa, što ukazuje na lokalnu proizvodnju

ovih proteina akutne faze kao odgovor na bakterijsku infekciju, dok su Hussein i sur. (2018) zaključili da se navedeni pristup smatra točnijim budući da proteini akutne faze imaju manje ometajućih čimbenika nego test za određivanje broja somatskih stanica.

Gronlund i sur. (2005) zaključili su da bi proteini akutne faze u mlijeku mogli biti specifični i osjetljivi pokazatelji intramamarnih infekcija, dok su Morimatsu i sur. (1991) utvrdili da haptoglobin (Hp) postoji u goveđem serumu u polimernim oblicima i veže se za slobodni hemoglobin (Hb), prenoseći ga iz krvi u jetru gdje se Hb reciklira. Migrirajući neutrofili, tkivo mliječne žlijezde, somatske stanice ili serum mogu biti izvori Hp u mlijeku tijekom mastitisa (Hiss i sur., 2004; Thielen i sur., 2007; Lai i sur., 2009; Thielen i sur., 2005; Thielen sur., 2006).

Istraživanja McDonald i sur., 2001; Jacobsen i sur., 2005; Eckersall i sur., 2006 također su pokazale da se serumski amiloid A (SAA) proizvodi u mnogim drugim, ekstrahepatičkim tkivima, uključujući mliječnu žlijezdu, dok su Rossevatn i sur. (1992) iznijeli da je to mali protein molekularne mase između 10-17 kDa s oko 112 aminokiselinskih ostataka, a njegovi glavni izoformi su SAA1, SAA2 i SAA3, pri čemu se SAA1 i SAA2 proizvode u jetri, dok se SAA3 proizvodi u ekstrahepatičkim tkivima.

McDonald i sur. (2001) utvrdili su da se protein akutne faze koji se pretežno nalazi u mlijeku naziva amiloid. Istraživanjima je dokazano da proteini akutne faze, Hp i M-SAA3 koreliraju s brojem somatskih stanica i bakterijskom infekcijom u slučajevima subkliničkih i kliničkih mastitisa izazvanih prirodnom (Eckersall i sur., 2001; Nielsen i sur., 2004; Kalmus i sur., 2013) i eksperimentalnom (Jacobsen i sur., 2005; Eckersall i sur., 2006; Hirvonen i sur., 1996; Larsen i sur., 2010; Pedersen i sur., 2003) infekcijom, stoga se mogu nazvati dijagnostički markeri upale vimena.

U istraživanju Dalanezl i sur. (2020), s ciljem utvrđivanja koncentracije proteina akutne faze u mlijeku krava s kliničkim mastitisom uzrokovanim različitim uzročnicima, utvrdili su da su krave zaražene s *E. coli*, *K. pneumoniae* ili *Streptococcus* iz okoliša imale više vrijednosti Hp u usporedbi s onima zaraženim drugim patogenima. U navedenom istraživanju također su utvrdili da je kod infekcija vimena s *Mycoplasma spp.* ili *Staph. aureus* došlo do umjerenog povećanja vrijednosti Hp u mlijeku. Vrijednosti Hp u mlijeku bile su slične vrijednostima koje su utvrđene kod *Staph. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Streptococcus* iz okoliša. Navedeni autori najviše vrijednosti SAA u mlijeku zabilježili su kod krava s mastitisom uzrokovanim bakterijom iz roda *Streptococcus* iz okoliša dok je infekcija vimena s bakterijama *K. pneumoniae* i

Enterococcus spp. uzrokovala nižu vrijednost SAA od vrijednosti zabilježene kod infekcije s bakterijama iz okoliša roda *Streptococcus* i veću od *Mycoplasma spp.* i *Staph. aureus*. Autori su također utvrdili da je infekcija s *Enterococcus spp.* dovela do znatnog povećanja vrijednosti SAA, a što se može pripisati drugačijem mehanizmu stimuliranja proizvodnje i oslobađanja proteina, ili pogrješkama metode jer su drugi proteini akutne faze utvrđeni u niskim koncentracijama u uzorcima mlijeka zaraženim ovim patogenom.

U navedenom istraživanju postojale su značajne razlike između koncentracija AGP-a u mlijeku krava s mastitisom uzrokovanim različitim patogenima dok je kod mastitisa uzrokovanog s bakterijama *E. coli* i *Staph. aureus* došlo do znatnijeg povišenja vrijednosti AGP-a. Također je uočeno i povišenje vrijednosti CRP-a u uzorcima mlijeka krava s mastitisom uzrokovanim bakterijom *E. coli* dok je kod infekcije vimena s bakterijom *Staph. aureus*, *Streptococcus* iz okoliša i *Mycoplasma spp.* zabilježeno umjereno povišenje vrijednosti CRP-a u mlijeku.

Na temelju rezultata navedenog istraživanja autori su zaključili da je postojala jaka pozitivna i značajna ($P < 0,05$) korelacija između koncentracija Hp, AGP i CRP u mlijeku krava s mastitisom, što bi moglo ukazivati na to da su patogeni sa sličnim obrascima koncentracije za ove proteine akutne faze inducirali slične upalne odgovore u epitelnim stanicama vimena. Nije pronađena značajna korelacija između SAA, CRP i AGP, što ukazuje na to da navedeni proteini akutne faze različitih uzročnika mastitisa nisu povezani i da ne uzrokuju sličnu upalnu reakciju.

Rainard i sur. (2006) utvrdili su da u reakciji akutne faze, uz porast $\text{TNF-}\alpha$, dolazi do povećanja migracije polimorfonuklearnih stanica (PMN) u mliječnu žlijezdu, što dovodi do većeg broja fagocitnih stanica, čime se povećava broj ubijenih bakterija, koje oslobađaju više LPS-a, a čime se potiče upalni odgovor i proizvodnja proteina akutne faze. Visoka koncentracija Hp u uzorcima mlijeka krava s mastitisom uzrokovanim *Streptococcus*om iz okoliša može biti povezana s primjetnim priljevom PMN nakon streptokokne infekcije, povećavajući otpuštanje Hp u mlijeko (Pedersen i sur., 2003).

Bannermann i sur. (2004) zabilježili su da su gram-pozitivne bakterije dobro poznate po tome što uzrokuju kronični mastitis umjesto akutnog zbog nedostatka LPS-a te da *Streptococcus uberis* (streptokok iz okoliša) može dovesti do izraženog upalnog

odgovora kod infekcija mliječne žlijezde što dovodi do povećanja proteina akutne faze kao što je Hp. Gram-pozitivnim patogenima potrebno je više sati nakon infekcije za povećanje citokina i proteina akutne faze, ali viša koncentracija traje dulje u usporedbi s gram-negativnim bakterijama (Pedersen i sur., 2003; Bannermann i sur. 2004; Suojala i sur., 2008; Bannermann i sur. 2009).

Guha i sur. (2013) utvrdili su da su koncentracije alfa-1 glikoproteina u mlijeku krava sa subkliničkim mastitisom uzrokovanim bakterijama *E. coli*, *Streptococcus spp.* i *Staphylococcus spp.* bile više od onih kod krava koje nemaju mastitis, ali vrijednosti AGP-a se nisu razlikovale između ove tri bakterije.

Bannerman i sur. (2004) utvrdili su da su gram-negativne bakterije povezane s izraženim odgovorom proteina akutne faze, dok gram-pozitivne bakterije induciraju blagi odgovor proteina akutne faze, tako da je umjerena koncentracija proteina akutne faze kod mastitisa uzrokovanog bakterijom iz roda *Streptococcus* zapravo i očekivana.

Ceciliani i sur. (2007) utvrdili su da je visoka koncentracija AGP povezana s velikom mobilizacijom bijelih krvnih stanica, tako da se blaga mobilizacija tih stanica u vimenu može povezati s niskom koncentracijom proteina. U prilog tome dokazano je da bijele krvne stanice mogu stimulirati apoptozu epitelnih stanica vimena (Zhao i sur. 2008) izazivajući porast koncentracije AGP-a, pa bi uzročnici koji uzrokuju izraženiji influks bijelih krvnih stanica mogli dovesti do veće koncentracije proteina akutne faze. Navedene istraživanja potvrđuju da se Hp, AGP i CRP mogu koristiti kao alati za dijagnosticiranje mastitisa krava uzrokovanog različitim patogenima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja utvrđena je povezanost određenih pokazatelja (biomarkera) u mlijeku i krvi krava i pojavnosti upale mliječne žlijezde. Utvrđene su procijenjene srednje vrijednosti određivanih biomarkera u pojedinim četvrtima vimena s obzirom na broj somatskih stanica, pojavnost i porijeklo mikroorganizama, broj liječenja mastitisa i tjelesnu kondiciju. Tijekom analitičkog dijela istraživanja, temeljem statističke analize prikupljenih i objedinjenih baza podataka, utvrdili smo da su niže navedeni istraživani pokazatelji biomarkeri koji mogu biti korisni prediktori mastitisa:

- **Smanjenje dnevnog sadržaja mliječne masti** dobar je prediktor narušenog zdravlja vimena i to smo potvrdili u krava s kliničkim mastitisom, kod skupine krava kod koje je utvrđen uzročnik mastitisa i kod skupine krava s infektivnim uzročnikom mastitisa.
- Smanjena koncentracija **Fe u serumu** dobrim je prediktorom mastitisa. To potvrđuju rezultati niže koncentracije Fe u krava u kojih je utvrđen infektivni uzročnik mastitisa, dok je viša koncentracija zabilježena u krava sa zdravim vimenom i u onih na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa. Koncentracija Fe u serumu smanjuje se kao odgovor na upalu mliječne žlijezde te predstavlja obrambeni mehanizam domaćina koji ima za cilj uskratiti Fe potrebno za bakterijsku virulentnost i replikaciju.
- **Niska koncentracija ureje u krvi** kod krava iz skupina s infektivnim uzročnicima mastitisa. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se sadržaj ureje u krvi smanjuje kao odgovor na upalu u mliječnoj žlijezdi.
- Viša koncentracija **ukupnih proteina u krvi** utvrđena je u krava s kliničkim mastitisom, u skupinama krava s mastitisom uzrokovanim infektivnim uzročnicima te kod skupina krava na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa. Sadržaj ukupnih proteina u krvi povećava se kao odgovor na upalu u mliječnoj žlijezdi.
- Najviša koncentracija **proteina akutne faze u mlijeku** (AGP-a, CRP-a, Haptoglobina i SAA3) utvrđena je u skupini krava s kliničkim mastitisom. Značajno ($P < 0,05$) viša koncentracija AGP-a i haptoglobina utvrđene su u mlijeku krava s kliničkim mastitisom. Veće koncentracije ($P > 0,05$) svih mjerenih proteina akutne faze utvrđeni

su u mlijeku krava u kojih su detektirani okolišni uzročnici mastitisa, u skupini krava na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa. Potvrdili smo da su ovi biomarkeri dobrim prediktorima mastitisa, čak i uslučajevima kada uzročnik nije detektiran.

- U stanjima mastitisa, u skupini gdje je detektiran infektivni uzročnik mastitisa te kod skupina krava na kojima su provedena tri terapijska ciklusa liječenja mastitisa **povišena je koncentracija aminokiselina *histidina u mlijeku***. U krava s utvrđenim mastitisom, utvrđenim infektivnim uzročnicima u mlijeku, te kravama na kojima je proveden jedan terapijski ciklus liječenja mastitisa, utvrđena je ***povišena koncentracija aminokiselina *fenilalanin, leucin i hidroksiprolin u mlijeku****.
- Metabolomika (uz genomiku, transkriptomiku i proteomiku) može dati sveobuhvatan uvid u biološko i zdravstveno stanje životinje i/ili stada. Njeni rezultati iz bioloških tekućina i tkivnih ekstrakata pokazuju trenutno stanje istraživanog biološkog sustava, a relativno je jeftina i pristupačna za upotrebu.

6. LITERATURA

1. Aladrović J., Pavković, M., Beer-Ljubić, B., Vranković, L., Stojević, Z. (2018): Metabolic profile in Holstein dairy cow herd. *Vet. stn.* 49, 9-18. (In Croatian).
2. Albert, C., Pohn, G., Lóki, K., Salamon, S., Albert, B., Sára, P., Z. Mándoki, Z., Csapó, J. (2007): Effect of microorganisms on free amino acid and free d-amino acid contents of various dairy products.
<https://www.researchgate.net/publication/27200689>
3. Andjelić, B., Djoković, R., Cincović, M., Bogosavljević-Bošković, S., Petrović, M., Mladenović, J., Čukić, A. (2022): Relationships between milk and blood biochemical parameters and metabolic status in dairy cows during lactation. *Metabolites*, 12(8): 733. doi: 10.3390/metabo12080733
4. Auldist, M., Hubble, I. (1998): Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, 53(1): 28-36.
5. Bannerman, D.D. (2009): Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 87, 10–25. doi: 10.2527/jas.2008-1187.
6. Bannerman, D.D., Paape, M.J., Goff, J.P., Kimura, K., Lippolis, J.D., Hope, J.C. (2004): Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet. Res.*, 35, 681–700. doi: 10.1051/vetres:2004040.
7. Bannerman, D.D., Paape, M.J., Hare, W.R., Sohn, E.J. (2003): Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Sci.*, 86, 3128–3137. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73914-9.
8. Batavani, R. A., Asri, S., & Naebzadeh, H. (2007): The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8(3), 205–211.
9. Berry, D.P., Lee, J.M., Macdonald, K.A., Stafford, K., Matthews, L., Roche, J.R. (2007): Association among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 90, 637-648.
10. Bertoni, G., Trevisi, E., Cappelli, F.P., V., Piccioli Cappelli, F., Trenti, F. (1994): Variations in blood parameters with mastitis of different severity in dairy cows. *Proceedings 18th World Buiatrics Congress: 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, Italy.* 2: 1427-1430.

11. Bozhkova, G., Tsvetkov, A. (1976): Biochemical and cytological changes in the milk and blood of cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. Nauki.*, 13(10): 74-79.
12. Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira V., Benedito, J.L. (2005): Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* 196(2), 286-292.
13. Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H. (2012): Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics.*, 75, 4207–4231. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.
14. Ceciliani, F., Pocacqua, V., Lecchi, C., Fortin, R., Rebucci, R., Avallone, G., Bronzo, V., Cheli, F., Sartorelli, P. (2007): Differential expression and secretion of alpha 1-acid glycoprotein in bovine milk. *J. Dairy Res.*, 74, 374–380. doi: 10.1017/S0022029907002646.
15. Chládek, G. (2002): Blood plasma urea and its relationship with yield and composition of cows milk. *Med. Weter.* 58, 871-873.
16. Cinar, M., Serbest, U., Ceyhan, A., Gorgulu, M. (2015): Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 105-108.
17. Csapo, J., Csapo-Kiss, Z., Stefler, J. (1995): Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 2375-2381. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76865-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76865-5)
18. Dalanezi, F.M., Schmidt, E.M.S., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F., Guerra, S.T., Lopes, B.C., Cerri, R.L.A., Chadwick, C., Langoni, H. (2020): Concentrations of acute-phase proteins in milk from cows with clinical mastitis caused by different pathogens.
doi: 10.3390/metabo12080733.
doi: 10.3390/pathogens9090706.
19. DeGaris, P. J., Lean, I. J. (2008): Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.*, 176(1): 58–69.
20. Duchacek, J., Vacek, M., Stadnik, L., Beran, J., Okrouhla, M. (2012): Changes in milk fatty acid composition in relation to indicators of energy balance in Holstein cows. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2012, LX, No. 1, pp. 29–38.
21. Ducusin, R. J. T., Uzuka, Y., Satoh, E., Otani, M., Nishimura, M., Tanabe, S., Sarashina, T. (2003): Effects of extracellular Ca^{2+} on phagocytosis and intracellular

- Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 75(1): 27–32.
22. Dwivedi, H.P., Kumar, M., Upadhyay, A.K. (2004): Biochemical changes in cows suffering from mastitis. *Indian J. Vet. Med.* 24, 101-102.
23. Đuričić, D., Beer-Ljubić, B., Vince, S., Turk, R., Valpotić, H., Žura Žaja, I., Maćešić, N., Benić, M., Getz, I., Samardžija, M. (2020): Effects of dietary clinoptilolite supplementation on β -hydroxybutyrate serum level and milk fat to protein ratio during early lactation in Holstein-Friesian cows. *Microporous Mesoporous Mater.* 292, 109766, 4 doi:10.1016/j.micromeso.2019.109766
24. Eisenberg, S. W. F., Ravesloot, L., Koets, A. P., Grünberg, W. (2019): Effect of dietary phosphorus deprivation on leukocyte function in transition cows. *J. Dairy Sci.*, 102(2): 1559–1570.
25. Erdem, H., Atasever, S., Kul, E. (2010): Determination of milk production characteristics and milk losses related to somatic cell count in Jersey cows raised in the black sea region of Turkey. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 5, 217-222.
26. Erskine, R.J., Bartlett, P.C. (1993): Serum concentrations of copper, iron, and zinc during escherichia coli-induced mastitis. *Journal of Dairy Science*, 76, 408–413. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77360-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77360-9)
27. George, L.W., Divers, T.J., Ducharme, N., Welcome, F.L. (2007): Diseases of the teats and udder, Rebhun's diseases of dairy cattle, Second edition ed. Missouri: Elsevier health science, 327–393.
28. Goff, J.P. (2015): Ruminant digestive physiology and intestinal microbiology. In: Erickson, H.H., Goff, J.P., Uemura, E.E.: *Duke's physiology of domestic animals*. Ames, Iowa, 522-540.
29. González, R.N., Wilson, D.J. (2003): Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 19(1): 199–221.
30. Gráff, M., Miko, E. (2015): Analysis of mastitis in Holstein-Fresian cows and economic effects of mastitis. *Agricult. Manage/Lucrari Stiintifice Ser I Manage Agricol.*, 17.
31. Grispoli, L., M. Karama, M., F. Ianni, F., La Mantia, A., Pucciarini, L., E. Camaioni, E., Sardella, R., Sechi, P., Natalini, B., Cenci-Goga, B.T. (2019): The relationship between *S. aureus* and branched-chain amino acids content in composite cow milk. *Animals* 9, 981. doi:10.3390/ani9110981.

32. Gröhn, Y.T., Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schulte, H., Bennett, G., Schukken, Y.H. (2004): Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3358–3374.
33. Grünberg, W. (2014): Treatment of phosphorus balance disorders. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 30(2): 383–408.
34. Guan, R. W., Wang, D. M., Wang, B. B., Jiang, L. Y., & Liu, J. X. (2020). Prognostic potential of pre-partum blood biochemical and immune variables for postpartum mastitis risk in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02314-6>
35. Guha, A., Guha, R., Gera, S. (2013): Comparison of α 1-antitrypsin, α 1-acid glycoprotein, fibrinogen and NOx as indicator of subclinical Mastitis in Riverine Buffalo (*Bubalus bubalis*) *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 26, 788–794. doi: 10.5713/ajas.2012.12261.
36. Gurbulak, K., Canooglu, E., Abay, M., Atabay, O., Bekyurek, T. (2009): Determination of subclinical mastitis in dairy cows by different methods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(5): 765-770.
37. Habel, J., & Sundrum, A. (2020): Mismatch of glucose allocation between different life functions in the transition period of dairy cows. *Animals*, 10(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ani10061028>
38. Harmon, R. J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103–2112. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)
39. Havranek, J., Rupiĉ, V. (2003): Mlijeko od farne do mljekare. *Hrvatska mljekarska udruga*, Zagreb. str. 29-44.
40. Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus, T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621-636.
41. Herdt, T. (2000): Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional metabolic profile testing. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 16(2): 387-403.
42. Hisaeda, K., Koshiishi, T., Sasaki, A., Shinozuka, Y., Isobe, N., Kawai, K. (2020): Changes in ionized calcium concentration in the blood of dairy cows with peracute coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, 82(4): 457–462.

-
43. Hiss, S., Mielenz, M., Bruckmaier, R.M., Sauerwein, H. (2004): Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression, *J. Dairy Sci.*, 87:3778–84.
<https://europepmc.org/article/med/1030869>.
<https://www.researchgate.net/publication/235562284>
<https://www.researchgate.net/publication/258047547>
44. Hussein, H.A., El-Razik, K.A.E.H.A., Gomaa, A.M., Elbayoumy, M.K., Abdelrahman, K.A., Hosein, H.I. (2018): Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Vet. World.*, 11, 34–41. doi: 10.14202/vetworld.2018.34-41.
45. Ianni, F., Sardella, R., Lisanti, A., Gioiello, A., Cenci Goga, B.T., Lindner, W., Natalini, B. (2015): Achiral-chiral two-dimensional chromatography of free amino acids in milk: A promising tool for detecting different levels of mastitis in cows. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 116, 40–46.
46. Ianni, F., Sechi, P., La Mantia, A., Pucciarini, L., Camaioni, E., Cenci-Goga, B.T., Roccaldo Sardella, R., Benedetto Natalini, B. (2019): The Relationships between somatic cells and isoleucine, leucine and tyrosine content in cow milk. *Appl. Sci.*, 9, 349. doi:10.3390/app9020349.
47. Jacobsen, S., Niewold, T.A., Kornalijnslijper, E., Toussaint, M.J.M., Gruys, E. (2005): Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet Immunol Immunopathol.*, 104:21–31.
48. Jasper, D.E. (1982): The role of Mycoplasma in bovine mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181(2): 158–162.
49. Jilek, F., Pytloun, P., Kubešova, M., Štipkova, M., Bouška, J., Volek, J. (2008): Relationships among body condition score, milk yield and reproduction in Czech Fleckvieh cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 357–367.
50. Jožef, I., Šperanda, M., Ďidara, M., Bešlo, D., Gantner, V. (2022): The Variability of biochemical and hematological parameters depending on the mastitis occurrence in dairy cows. *Poljoprivreda / Agriculture*, 28(1), 68-76.
<https://doi.org/10.18047/poljo.28.1.10>
51. Kalmus, P., Simojoki, H., Pyorala, S., Taponen, S., Holopainen, J., Orro, T. (2013): Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in
-

- bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *J. Dairy Sci.*, 96:3662–70.
52. Kaneko, J.J., Harvey, J., & Bruss, M.L. (2008): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, (6th ed.). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3)
 53. Kehrli, M. E. Jr., Goff, J. P. (1989): Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.*, 72(5): 1188–1196.
 54. Kimura, K., Reinhardt, T. A., Goff, J. P. (2006): Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 89(7): 2588–2595
 55. Kitchen, B.J. (1981): Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48(1), 167–188. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021580>
 56. Kocić, G., Bjelaković, L., Cvetković, T., Pop-Trajković, Z., Jonović, M., Bjelaković, B., Sokolović, D., Jevtović, T., Stojanović, D. (2010): Enzyme activity of human milk during the first month of lactation. *Acta Medica Medianae* 49 (2), 20-24.
 57. Kos, J., Hromosti goveda kao uzrok smanjene proizvodnje mlijeka. Pozvano predavanje Veterinarski dani 2003., Šibenik.
 58. Kos, J., Kirurške bolesti: Govedarstvo u obiteljskim gospodarstvima Zbornik radova Veterinarski dani*1997 Cavtat, str.76-85.
 59. Krishnappa, S., Satyanarayana, M.L. Narayanaswamy, H. D., Rao, S., Yathiraj, S., Isloor, S., Mukartal, S.Y., Gupta, S., Singh, S.V., & Elattuvalappil, A.M. (2016): Haemato-biochemical profile and milk leukocyte count in subclinical and clinical mastitis affected buffaloes. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(12), 642–647. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.12.642.647>
 60. Kul, E., Şahin, A., Atasever, S., Uğurlutepe, E., Soydaner, M. (2019): The effects of somatic cell count on milk yield and milk composition in Holstein cows. *Vet. arhiv* 89, 143-154.
 61. Lai, I.H., Tsao, J.H., Lu, Y.P., Lee, J.W., Zhao, X., Chien, F.L. et al. (2009): Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Vet. Res.*, 40.
 62. Langer, A., Sharma, S., Sharma, N.K., Nauriyal, D.S. (2014): Comparative efficacy of different mastitis markers for diagnosis of sub-clinical mastitis in cows,

- International Journal of Applied Sciences and Biotechnology 2(2), 121–125. 10.3126/ijasbt.v2i2.10191.
63. Larsen, L.B., Hinz, K., Jorgensen, A.L.W., Moller, H.S., Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M. et al. (2010): Proteomic and peptidomic study of proteolysis in quarter milk after infusion with lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, 93:5613–26.
 64. Leblanc, S.J. (2006): Monitoring programs for transition dairy cows. *Proceedings of the 26th World Biometrics Congress, Nice*, 460-472.
 65. Leitner, G., Krifucks, O., Kiran, M.D. et al. (2011): Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet. Immunol Immunop*, 142 25 35.
 66. Lohuis, J.A., Schukken, Y.H., Verheijden, J.H., Brand, A., A. S. Van Miert, A.S. (1990): Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *J. Dairy Sci.*, 73:333–341.
 67. Loker, S., Bastin, C., Miglior, F., Sewalem, A., Schaeffer, L.R., Jamrozik, J., Ali, A., Osborne, V. (2012): Genetic and environmental relationships between body condition score and milk production traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci*, 95, 410-419.
 68. Marino, R., Iammarino, M., Santillo, A., Muscarella, M., Caroprese, M., Albenzio, M. (2010): Rapid method for determination of amino acids in milk. *J. Dairy Sci.* 93 :2367–2370.
 69. Martins, L., Barcelos, M.M., Cue, R.I., Anderson, K.L., Santos, M.V., Gonçalves, J.L. (2020): Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. *Journal of Dairy Research*, 87, 298-305.
 70. McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., Weber, A. (2001): Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol.*, 83:203–11.
 71. Melchior, M.B., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. (2006): Biofilms a role in recurrent mastitis infections. *Vet J* 171 398 407.
 72. Middleton, J.R., Luby, Viera, L., Tyler, J.W., Casteel, S. (2004): Influence of *staphylococcus aureus* enzymes and minerals in intramammary infection on serum copper, zinc and iron concentration. *J. Dairy Sci.*, 87: 976-979.

-
73. Millogo, V., Ouédraogo, G.A., Agenäs, S., Sevennersten-Sjaunja, K. (2009): Day-to-day variation in yield, composition and somatic cell count of salable milk in handmilked Zebu dairy cattle. *African J. Agric. Res.* 4, 151-155.
 74. Mohamed, I.E., El Owni, O.A.O., Habbani and Mohamed, G.E. (1999): Microminerals in the milk of healthy and mastitic cows. *Tanzian J. Sci.*, 25: 39-44.
 75. Mohammadi, M.C., Ghasrodashti, A.R., Tamadon, A., Behzadi, M.A. (2012): Effects of prepartum monensin feeding on energy metabolism and reproductive performance of postpartum high-producing Holstein dairy cows. *Pak. Vet. J.*, 32, 45-49.
 76. Morimatsu, M., Sarikaputi, M., Syuto, B., Saito, M., Yamamoto, S., Naiki, M. (1992): Bovine Haptoglobin - Single Radial Immunodiffusion Assay of Its Polymeric Forms and Dramatic Rise in Acute-Phase Sera. *Vet Immunol Immunopathol.*, 33:365-72.
 77. Morimatsu, M., Syuto, B., Shimada, N., Fujinaga, T., Yamamoto, S., Saito, M. et al. (1991): Isolation and Characterization of Bovine Haptoglobin from Acute Phase Sera. *J Biol Chem.*, 266:11833-7.
 78. Mouffok, C.E., Madani, T., Semara, L., Ayache, N., Rahal, A. (2013): Correlation between body condition score, blood biochemical metabolites, milk yield and quality in Algerian Montbéliarde cattle. *Pak. Vet. J.*, 33, 191-194.
 79. Moyes, K.M., Larsen, T., Friggens, N.C., Drackley, J.K., Ingvarsen, K.L. (2009): Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 92, 5419-5428.
 80. Mushtaq, A., Qureshi, M.S., Khan, S., Habib, G., Swati, Z.A., Rahman, S.U. (2012): Body condition score as a marker of milk yield and composition in dairy animals. *J Anim Plant Sci*, 22 (Suppl 3): 169-173.
 81. Najafi, M.N., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khorami, J., Rekik, B. (2009): Fat and protein contents, acidity and somatic cell counts in bulk milk of Holstein cows in the Khorasan Razavi Province. Iran. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 19-26.
 82. National Mastitis Council (2016): Current concepts of bovine mastitis, 5th ed The National Mastitis Council, New Prague, MN.
 83. Neumann, S. (2003): Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. *Comp. Clin. Pathol.* 12:90-94.
-

-
84. Nielsen, B.H., Jacobsen, S., Andersen, P.H., Niewold, T.A., Heegaard, P.M.H. (2004): Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet Rec.*, 154:361–5.
 85. Oliveira, M., Nunes, S.F., Carneiro, C. et al. (2007): Time course biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.*, 124 187–91.
 86. Oltner, R., Wiktorsson, H. (1983): Urea concentration in milk and blood as influenced by varying amounts of protein and energy to dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 10, 457–467.
 87. O'Neill, J. (2016): Tackling Drug-resistant infections globally; final report and recommendations. Available at https://arm-review.org/sites/default/files/160525_Finalpaper_withcover.pdf (Accessed 20 October 2019).
 88. Orozco-Hernandez, J.R., Brisson, G.J. (1995): Juice extracted grass pellets and sodium Bicarbonate for cows fed timothy silage of two chop lengths. *J. Dairy Sci.* 78, 2415–2423.
 89. Park, Y.K., Koo, H.C., Kim, S.H., Hwang, S.Y., Jung, W.K., Kim, J.M., Shin, S., Kim, R.T., Park, Y.H. (2007): The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *J. Dairy Sci.* 90, 5405–5414.
 90. Payne, J.M., Payne, S. (1987): *The metabolic profile test*. Oxford university press. Oxford, NewYork, Tokyo.
 91. Pedersen, L.H., Aalbaek, B., Rontved, C.M., Ingvartsen, K.L., Sorensen, N.S., Heegaard, P.M.H. et al. (2003): Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J Comp Pathol.*, 128:156–64.
 92. Pedersen, L.H., Aalbæk, B., Røntved, C.M., Ingvartsen, K.L., Sorensen, N.S., Heegaard, P.M.H., Jensen, H.E. (2003): Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J. Comp. Pathol.*, 128, 156–164. doi: 10.1053/jcpa.2002.0620.
 93. Petzer, I.M., Karzis, J., Donkin, E.F., Webb, E.C., Etter, E.M.C. (2017): Validity of somatic cell count as indicator of pathogen-specific intramammary infections,

-
- Journal of the South African Veterinary Association, 88(1).
<https://doi.org/10.4102/jsava.v88i0.1465>
94. Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Seyfert, H-M., Hussen, J., Schuberth, H-J. (2018): Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci.*, 116:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.012>.
 95. Polenska, E. (1991): Dynamics of amino acids in milk of mastitis infected cows. *Zivocisna Vyroba* 36, 4, 313-320.
 96. Pyörälä, S. (2003): Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.*, 34, 565–578.
 97. Rainard, P., Riollot, C. (2006): Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.*, 37, 369–400. doi: 10.1051/vetres:2006007.
 98. Rathaur, A., Prakash, V., Gupta, P. K., Singh, S. J., Bhateshwar, V. (2020): Effect of subclinical mastitis in compositional change in milk and blood parameter of crossbred dairy cow. *International Journal of Chemical Studies*, 8, 10–12.
<https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2a.9247>
 99. Roche, J.R. (2007): Milk production responses to pre- and postcalving dry matter intake in grazing dairy cows. *Livest Sci*, 110, 12-24.
DOI:[10.1016/j.livsci.2006.08.016](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.08.016)
 100. Rossevatn, K., Andresen, P.K., Sletten, K., Husebekk, A., Husby, G., Nordstoga, K. et al. (1992): The Complete Amino-Acid-Sequence of Bovine Serum Amyloid Protein-A (Saa) and of Subspecies of the Tissue-Deposited Amyloid Fibril Protein-A. *Scand J Immunol.*, 35:217–24.
 101. Rueg, L.P. (2005): California Mastitis Test (CMT). Available at <https://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/california-mastitis-test-fact-sheet.pdf>., pristupljeno 11. 4. 2022.
 102. Sadek, K., Saleh, E., & Ayoub, M. (2017): Selective, reliable blood and milk biomarkers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2), 431–437. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1190-7>
 103. Saleh, N., Allam, T., Omran, A., & Abdelfattah, A. (2022): Evaluation of Changes in Hemato-Biochemical, Inflammatory, and Oxidative Stress Indices as Reliable Diagnostic Biomarkers for Subclinical Mastitis in Cows. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 72(2), 23–34. <https://doi.org/10.5455/ajvs.140786>
 104. Sarvesha, K., Satyanarayana, M. L., Narayanaswamy, H. D., Rao, S., Yathiraj, S., Isloor, S., Mukartal, S. Y., Srikanth, M., Anuradha, M. E., & Kamal, H. (2016): Effect of
-

- Subclinical and Clinical Mastitis on Haemato- Biochemical Profile and Milk Leukocyte Count in Indigenous Cows. *Journal of Cell and Tissue Research*, 16(3), 5829–5834. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11155.63527>
105. Schultz, L. (1977): Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *J. Food Pro.*, 40(2): 125–131.
 106. Shanwad, U., Patil, V., Dasog, G., Mansur, C., Shashidhar, K. (2002): Global Positioning System (GPS) in Precision Agriculture. The Asian GPS Conference, November 2014, 24–25.
 107. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., Leitner, G. (2014): Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. *Journal of Dairy Research*, 81, 358–363. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000260>
 108. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., & Leitner, G. (2014): Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 358–363. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000260>
 109. Simões, P.B.A., Campbell, M., Viora, L., Gibbons, J., Geraghty, T.E., Eckersall, P.D., Zadoks, R.N. (2018): Pilot study into milk haptoglobin as an indicator of udder health in heifers after calving. *Res. Vet. Sci.*, 116, 83–87. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.024.
 110. Singh, M.N. and Mathur B.N. (1990): Mineral modification of buffalo milk for infant formula manufacture employing electrodialysis. part II demineralization pattern of nutritionally important ionic species. *Ind. J. Dairy Sci.*, 43: 95-98.
 111. Singh, R., Bhardwaj, R.K., Azad, M.S., Beigh, S.A. (2014): Effect of mastitis on haemato-biochemical and plasma mineral profile in crossbred cattle. *Indian J. Anim. Res.*, 48, 63-66.
 112. Souza, G.N., Brito, J.R.F., Moreira, E.C., Brito, M.A.V.P., Silva, M.V.G.B. (2009): Somatic cell counts variation in dairy cows according to mastitis pathogens. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.5, p.1015-1020.
 113. Sumon, M.R., Parvin, S., Ehsan, A., Islam, T. (2020): Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. *J Adv Vet Anim Res.* 2020 Jun; 7(2): 314–319.
 114. Sunder-Plasmann, G., Patruta, S.I., Hörl, W.H. (1999): Pathobiology of the role of iron in infection. *Am. J. Kidney Dis.* 34(Suppl. 2): S25–S29.

-
115. Suojala, L., Orro, T., Järvinen, H., Saatsi, J., Pyörälä, S. (2008): Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, 50, 1–10. doi: 10.1186/1751-0147-50-18.
 116. Štraus, B. & Barišić K. (2009): Proteini. U: Čvorišćec, D. & Čepelak, I.: Štrausova Medicinska Biokemija. Medicinska Naklada Zagreb, 176-203.
 117. Tabatabaee, N., Heidarpour, M., Khoramian, B. (2021): Milk metabolites, proteins and oxidative stress markers in dairy cows suffering from *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis with or without spontaneous cure. *Journal of Dairy Research*, 88, 326 – 329. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029921000613>
 118. Thielen, M.A., Mielenz, M., Hiss, S., Petzl, W., Zerbe, H., Schuberth, J. et al. (2006): Regulation of haptoglobin (Hp) mRNA expression in the bovine mammary gland parenchyma during experimental mastitis. *J Anim Sci.*, 84:336.
 119. Thielen, M.A., Mielenz, M., Hiss, S., Sauerwein, H. (2005): Qualitative detection of haptoglobin mRNA in bovine and human blood leukocytes and bovine milk somatic cells. *Vet Med.*, 50:515–20.
 120. Thielen, M.A., Mielenz, M., Hiss, S., Zerbe, H., Petzl, W., Schuberth, H.J. et al. (2007): Short communication: Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *J Dairy Sci.*, 90:1215–9.
 121. Thomas, F.C., Geraghty, T., Simões, P.B.A., Mshelbwala, F.M., Haining, H., Eckersall P.D. (2018): A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Res. Vet. Sci.*, 119, 176–181. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.06.015.
 122. Thomas, F.C., Waterston, M., Hastie, P., Parkin, T., Haining, H., Eckersall, P.D. (2015): The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Vet. Res.*, 11, 1–10. doi: 10.1186/s12917-015-0533-3.
 123. Tremblay, Y.D.N., Lamarche, D., Chever, P. et al. (2013): Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci.*, 96 234 46.
 124. Tripathy, R.K., Rath, P.K., Mishra, B.P., Panda, S.K., Jena, B. (2018): Clinico-pathological and compositional changes in milk of mastitis cows. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 1680–1687. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.199>

-
125. Tsukano, K., Suzuki, K. (2020): Serum iron concentration is a useful biomarker for assessing the level of inflammation that causes systemic symptoms in bovine acute mastitis similar to plasma haptoglobin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82, 1440–1444.
126. Turk, R., Rošić, N., Kuleš, J., Horvatić, A., Gelemanovic, A., Eckersall, P.D. (2021): Milk and serum proteomes in subclinical and clinical mastitis in Simmental cows. *Journal of Proteomics*, 244, 104277. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104277>
127. Turner, A., Tisdall, D., Barrett, D.C., Wood, S., Doesey, A., Reyher, K.K. (2018): Ceasing the use of the highest priority critically important antimicrobials does not adversely affect production, health or welfare parameters in dairy cows, *Veterinary Record* 183, 6.
128. Vailati-Riboni, M., Elolimy, A., Loor, J.J. (2016): Nutritional systems biology to elucidate adaptations in lactation physiology of dairy cows. In: Kadarmideen H. N. *System biology in animal production and health*, vol 2. Springer International Publishing, Cham, 97-125.
129. Vanhoudt, A., van Hees-Huijps, K., Van Kneusel, A.T.M., Sampimon, O.C., Vernooij, J.C.M., Nielsen, M., Werven, T. (2018): Effects of reduced intramammary antimicrobial use during the dry period on udder health in Dutch dairy herds. *Journal of Dairy Science* 101, 3248-3260.
130. Vasudevan, P., Nair, M.K., Annamalai, T. et al. (2003): Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.*, 92 179 85.
131. Verheijden, J.H.M., Schotman, A.J.H., Van Miert, A.S.J.A.M. and Van Duin, C.T.M. (1983): Zinc concentrations in skimmed milk and whole milk samples from healthy and mastitic cows. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 1637-1640.
132. Wildman, E.E., Jones, G.M. Wagner, P.E., Bowman, R.I., Trout, H.F., Lesch, t.N. (1982): A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production variables in high-producing Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 65: 495.
133. Ward, C.G., Bullen, J.J., Rogers, H.J. (1996): Iron and infection: New developments and their implication. *J. Trauma* 41:356–364.
134. WHO (2017): WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Available at
-

<https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixt/en> (Accessed 27 October 2019).

135. Yagci, I. (2008): Subclinical mastitis in sheeps; etiology, epidemiology and diagnosis methods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 14(1), 117-122.
136. Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., Wang, X. (2012): Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* 137(2), 293-300.
137. Zhao, X., Lacasse, P. (2008): Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.*, 86, 57–65. doi: 10.2527/jas.2007-0302.

7. SAŽETAK

Metabolomika je jedna od grana „multi-omik“ pristupa, koja se bavi analizom cjelokupnog metaboloma organizma. Bavi se profiliranjem metabolita u različitim tjelesnim tekućinama i tkivima. Mastitis je još uvijek vrlo učestala bolest mliječnog govedarstva i traže se rješenja za rano otkrivanje početka bolesti.

Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost određenih pokazatelja u mlijeku i krvi krava i pojavnosti upale mliječne žlijezde u cilju otkrivanja biomarkera za neinvazivno i brzo otkrivanje promjena u mliječnoj žlijezdi i dijagnozi mastitisa. Cilj je bio utvrditi procijenjene srednje vrijednosti biomarkera u pojedinim četvrtima vimena s obzirom na broj somatskih stanica, pojavnost mikroorganizama, broju liječenja mastitisa i kondiciji.

Istraživanje je provedeno na 151 kravi holštajn pasmine od 2. do 5. laktacije prosječne proizvodnje mlijeka veće od 30 L. Uzorci mlijeka uzimani su tijekom jutarnje mužnje nakon pranja i dezinfekcije vimena i sisa, metodom uzorkovanja koja je u skladu s hrvatskom normom HRN EN ISO 707 „Mlijeko i mliječni proizvodi – Poduka za uzorkovanje“. Prva dva mlaza mlijeka su odbačena kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka. Jedan uzorak uzet je u sterilne epruvete za mikrobiološku analizu, a drugi je spremljen za određivanje aminokiselina, proteina akutne faze i biokemijske pokazatelje. Broj somatskih stanica određen je mikroskopskom metodom HRV EN ISO 13366-1:1999. Bakteriološka pretraga uzoraka mlijeka izvršena je prema akreditiranoj metodi SOP Z-II-3-07 Rev.04. Krv je izvađena iz repne vene u epruvete s Li-heparinom nakon čega je centrifugirana, odvojena je plazma i smrznuta na -80 °C do analiza.

Metabolički pokazatelji u plazmi određivani su u cilju utvrđivanja grešaka u hranidbi koje pogoduju razvoju mastitisa. Za istraživanje odabrane su tri skupine krava: 1. krave koje su na mjesečnoj kontroli mliječnosti imale nizak broj somatskih stanica (ispod 200 000), 2. krave koje su imale povišen broj somatskih stanica (200 000- 400 000) i 3. krave koje su imale visok broj somatskih stanica (>400 000 u ml). Određeni su metaboliti, enzimi i minerali u plazmi i mlijeku biokemijskim automatskim analizatorom Becman Coulter AU 400. Određeni su sljedeći pokazatelji: enzimi aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), gama glutamiltransferaza (GGT), metaboliti glukoza, urea, ukupni protein, albumin, trigliceridi, beta hidroksimaslačna kiselina (BHB), minerali Ca, P, Fe. Metaboliti glukoza, ukupni protein, albumini, trigliceridi i beta hidroksimaslačna (BHB) indikatori su energetske opskrbe organizma. Aktivnost enzima ukazuje na stanje jetre, a

minerali pomažu u dijagnostici zdravlja i kontroli adekvatnosti hranidbenih normi. Pomoću automatskog biokemijskog analizatora Becman Coulter AU 400 određeni su i metabolički pokazatelji u serumu mlijeka koji su pripremljeni nakon odvajanja mlječne masti i homogeniziranja pomoću vortex uređaja. Određeni su sljedeći pokazatelji: enzimi aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), gama glutamiltransferaza (GGT), metaboliti glukoza, urea, ukupni protein, albumin, željezo, kalcij i fosfor. Slobodne aminokiseline određene su prema modificiranoj metodi Marino i sur. (2010.) i Uredbi EU HR03-006-2013. Iz uzoraka mlijeka mast je uklonjena centrifugiranjem, mlijeko se razrijedilo s 5% sulfosalicilnom kiselinom u omjeri 1:1, profiltriralo s PES 0,2 µm filterom, a u 180 µL filtrata dodan je interni standard norvalina 20µL. Određena su četiri proteina akutne faze: C reaktivni protein (CRP), haptoglobin (HP), mamarni amiloid A (M-SAA3) i alfa 1 kiseli glikoprotein (AGP). Svi proteini akutne faze određeni su imunenzimskim testovima (ELISA metodom; Life Diagnostics Inc., West Chester, USA), a prema uputama proizvođača.

Tijekom analitičkog dijela istraživanja, temeljem statističke analize prikupljenih i objedinjenih baza podataka utvrdili smo sljedeće: 1. postojanje varijabilnosti i kovarijabilnosti dnevnih proizvodnih svojstava (dnevna količina mlijeka, dnevni sadržaj mlječne masti i proteina i biokemijskih pokazatelja u uzorcima krvne plazme i mlijeka krava iz svake pojedine četvrti, 2. postojanje statističkih razlika i varijabilnost u koncentracijama aminokiselina, metaboličkih pokazatelja i proteina akutne faze u mlijeku zdravih, subkliničkih i klinički bolesnih četvrti, 3. postojanje varijabilnosti metabolita u krvi krava s obzirom na broj zahvaćenih četvrti, prisutnost uzročnika, kondiciju, broju liječenja i broja somatskih stanica.

Utvdili smo da postoji povezanost između pojedinih indikatora metaboličkog i zdravstvenog statusa mliječnih krava, te smo utvrditi da niže navedeni istraživani pokazatelji su biomarkeri koji mogu biti korisni prediktori mastitisa: 1. biokemijski pokazatelji u krvi: Ukupni proteini, Fe, Urea, Glukoza, P, LDL i BHB, 2. biokemijski pokazatelji u mlijeku: Fe, Glukoza, Ca i Urea, 3. slobodne aminokiseline određivane u mlijeku: Hidroksiprolin, Histidin, Glutaminska kiselina, Leucin, Lizin, Alanin, Fenilalanin, Glicin, Glutamin, Serin i Triptofan, 4. proteini akutne faze: AGP, CRP, Haptoglobin i SAA3.

Ključne riječi: mastitis, broj somatskih stanica, biomarkeri, proteini akutne faze, aminokiseline mlijeka, biokemijski pokazatelji

8. SUMMARY

Metabolomics is one of the branches of the "multi-omics" approach, which deals with analysis of the entire metabolome of the organism. It deals with the profiling of metabolites in different body tissues fluids and tissues. Mastitis, inflammation of the mammary gland, is still the most expensive disease of intensive dairy cattle farming.

The aim of the research was to determine the correlation of certain indicators in the milk and blood of cows and incidence of inflammation of the mammary gland in order to detect biomarkers for non-invasive and fast detection of changes in the mammary gland and diagnosis of mastitis. The goal was to determine estimated mean values of biomarkers in individual quarters of the udder with regard to the number of somatic cells, occurrence of microorganisms, number of mastitis treatments and condition.

The research was conducted on 151 cows of the Holstein breed from the 2nd to the 5th lactation on average of milk production greater than 30 L. Milk samples were taken during the morning milking after washing and disinfection of udders and teats, with a sampling method that is in accordance with Croatian according to the HRN EN ISO 707 standard "Milk and milk products - Instruction for sampling". The first two milk spurts were discarded to avoid sample contamination. One sample was taken in sterile test tubes for microbiological analysis, and the other is saved for the determination of amino acids, acute phase proteins and biochemical indicators. The number of somatic cells was determined by microscopic method HRV EN ISO 13366-1:1999. Bacteriological examination of samples of milk was performed according to the accredited method SOP Z-II-3-07 Rev.04. Blood was taken from tail veins into tubes with Li-heparin, after which it was centrifuged, plasma was separated and frozen at -80 °C until analysis.

Metabolic indicators in the plasma are determined in order to determine errors in feeding which favor the development of mastitis. Three groups of cows were selected for the research: 1. cows that are on monthly control of milk yield had a low number of somatic cells (below 200,000), 2. Cows that had an increased number of somatic cells (200,000-400,000) and 3. cows that had high somatic cell count (>400,000 in ml). Metabolites, enzymes and minerals were determined in plasma and milk with a biochemical automatic analyzer Becman Coulter AU 400. Certain are the following indicators: enzymes aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyltransferase (GGT), metabolites glucose, urea, total protein, albumin, triglycerides, beta hydroxybutyric acid (BHB), minerals Ca, P, Fe. Metabolites glucose,

total protein, albumins, triglycerides and beta hydroxybutyric acid (BHB) are energy indicators supply of the organism. Enzyme activity indicates the condition of the liver, and minerals help in health diagnostics and control of the adequacy of nutritional norms. Using automatic biochemical analyzer Becman Coulter AU 400 and metabolic indicators were determined milk serum that was prepared after milk fat separation and homogenization using a vortex device. The following indicators were determined: aspartate aminotransferase enzymes (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyltransferase (GGT), metabolites glucose, urea, total protein, albumin, iron, calcium and phosphorus. Free amino acids were determined according to modified method of Marino et al. (2010) and EU Regulation HR03-006-2013. From milk samples the fat was removed by centrifugation, the milk was diluted with 5% sulfosalicylic acid in ratios 1:1, filtered with a PES 0.2 µm filter, and an internal standard was added to 180 µL of the filtrate norvaline 20µL. Four proteins of the acute phase were determined: C reactive protein (CRP), haptoglobin (HP), mammary amyloid A (M-SAA3) and alpha 1 acid glycoprotein (AGP). All acute phase proteins were determined by immunoenzymatic tests (ELISA method; Life Diagnostics Inc., West Chester, USA), and according to the manufacturer's instructions.

During the analytical part of the research, based on the statistical analysis of the collected and consolidated databases, we determined the following: 1. existence of variability and covariability of daily production characteristics (daily amount of milk, daily content milk fat and protein and biochemical indicators in samples of blood plasma and milk of cows from each individual quarter, 2. existence of statistical differences and variability in concentrations of amino acids, metabolic indicators and acute phase proteins in the milk of healthy, subclinical and quarter with clinical mastitis, 3. the existence of variability of metabolites in the blood of cows with regard to the number of affected quarters, the presence of the causative agent condition, number of treatments and the number of somatic cells.

We found that there is a connection between certain indicators of metabolic and health status of dairy cows, and we determined that the researched indicators listed below are biomarkers that can be useful predictors of mastitis: 1. biochemical indicators in the blood: Total proteins, Fe, Urea, Glucose, P, LDL and BHB, 2. biochemical indicators in milk: Fe, Glucose, Ca and Urea, 3. free amino acids determined in milk: Hydroxyproline, Histidine, Glutamic acid, Leucine, Lysine, Alanine, Phenylalanine, Glycine, Glutamine, Serine and Tryptophan, 4. acute phase proteins: AGP, CRP, Haptoglobin and SAA3.

Key words: mastitis, somatic cell count, biomarkers, acute phase proteins, milk aminoacids, biochemical indicators

ŽIVOTOPIS

Dalibor Đud rođen je 2. 4. 1978. godine u Koprivnici, Republika Hrvatska, a trenutno živi u Velikoj Gorici. Osnovnu školu završio je 1992. godine u Kloštru Podravskom dok je 1996. godine završio prirodoslovno matematičku gimnaziju u Virovitici. Dana 4. 6. 2008. godine završio je studij veterinarske medicine na Sveučilištu u Zagrebu, i stekao visoku stručnu spremu i zvanje doktor veterinarske medicine. Pripravnički staž započeo je 1. 7. 2008. godine u Veterinarskoj stanici "NOVA" d.o.o. Koprivnica gdje je 24. 2. 2010. godine položio stručni ispit i stekao stručnu osposobljenost za samostalan rad na poslovima doktora veterinarske medicine. U Veterinarskoj stanici "NOVA" d.o.o. Koprivnica radio je kao terenski veterinar u velikoj praksi, maloj praksi te u veterinarskoj ljekarni. U periodu 2010.-2020. godine radio je kao voditelj veterinarske službe Poljoprivrednog poduzeća Orahovica d.o.o. te je zbog potrebe PP Orahovice d.o.o. za centralizacijom veterinarske službe pristupio polaganju državnog stručnog ispita za veterinarskog inspektora koji je položio 26. 3. 2011. godine. Kao voditelj veterinarske službe radio je i bio odgovoran za zdravstveni status i proizvodnju na nekoliko farmi sustava krava – tele (oko 800 krava u sustavu), farmi tovne junadi (oko 700 grla), svinjogojskoj farmi u Tovarniku (300 krmača i nazimica te 2000 prasadi) te je obavljao veterinarske poslove na 5 šaranskih ribnjačarstva (oko 6000 hektara ribnjaka). Od siječnja 2020. godine zaposlen je kao viši stručni savjetnik u Upravi ribarstva Ministarstva poljoprivrede u Zagrebu.

Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.

Oženjen je i ima jednog sina.