

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA

Kristina Musayeva

**NATŪRALIŲ ANTIMIKROBINIŲ
BALTYMŲ KONCENTRACIJOS KITIMO
TYRIMAI SVEIKŲ IR SERGANČIŲ
MASTITU KARVIŲ PIENE**

Daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai,
veterinarija (02A)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2012–2016 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Anatomijos ir fiziologijos katedroje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Judita Žymantienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

Nariai:

prof. dr. Vida Juozaitienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, zootechnika – 03A);

doc. dr. Antanas Šarkinas (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T);

doc. dr. Gintaras Zamokas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A);

dr. Asta Tvarijonavičiūtė (Barselonos autonominis universitetas (Ispanija), žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

Disertacija ginama viešame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Veterinarijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. birželio 16 d. 13 val. dr. S. Jankausko auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
VETERINARY ACADEMY

Kristina Musayeva

**NATURAL ANTIMICROBIAL PROTEIN
CONCENTRATIONS IN THE MILK
OF HEALTHY COWS AND COWS
WITH MASTITIS**

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences,
Veterinary (02A)

Kaunas, 2017

Dissertation has been prepared at the Department of Anatomy and Physiology, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2012–2016.

Scientific supervisor

Prof. Dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

Dissertation is defending at the Veterinary Research Council of Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Judita Žymantienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

Members:

Prof. Dr. Vida Juozaitienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Zootechnics – 03A);

Assoc. Prof. Dr. Antanas Šarkinas (Kaunas University of Technology, Technological Sciences, Chemical Engineering – 05T);

Assoc. Prof. Dr. Gintaras Zamokas (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A);

Dr. Asta TvariJonavičiūtė (Autonomous University of Barcelona (Spain), Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

Dissertation will be defended at the open session of the Veterinary Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy Dr. S. Jankauskas Auditorium at 1:00 p. m. on 16th of June, 2017.

Address: Tilžės 18, LT–47181 Kaunas, Lithuania

TURINYS

SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI	7
IVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Karvės tešmens anatinė ir morfologinė struktūra bei fiziologinė funkcija	13
1.2. Tešmens uždegimas	16
1.3. Somatinės ląstelės karvių piene	19
1.4. Tešmens apsaugos mechanizmas	20
1.5. Natūralios antimikrobinės medžiagos piene	21
1.5.1. Laktoferinas (LF)	22
1.5.2. Imunoglobulinai (Ig)	26
1.5.3. Beta-laktoglobulinas (beta-LG)	28
1.5.4. Alfa-laktalbuminas (alfa-LA)	28
1.5.5. Galvijų serumo albuminas (GSA)	29
1.6. Natūralių antimikrobinų baltymų tyrimų metodai	30
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	33
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	35
2.1. Tyrimų laikas, vieta ir objektas	35
2.2. Pieno mėginių paėmimo metodika.....	35
2.3. Somatinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodika	37
2.4. Mikrobiologinių tyrimų metodika.....	37
2.5. Imunofermentinės analizės (IFA) metodika	37
2.5.1. ELISA testo procedūra.....	38
2.6. Chromatografinės analizės metodika	41
2.6.1. Chromatografijos įranga ir sąlygos	41
2.7. Duomenų grupavimo statistinei analizei metodika	43
2.7.1. Statistinė duomenų analizė.....	45
3. TYRIMŲ REZULTATAI	46
3.1. Antimikrobinų baltymų koncentracijų pasiskirstymas piene pagal tešmens ketvirčių sveikumą.....	46
3.1.1. Antimikrobinų baltymų koncentracijų pasiskirstymas piene pagal somatinių ląstelių skaičiaus ir mikrobiologinės analizės įvertinimą	46
3.1.2. Antimikrobinų baltymų koncentracijų pasiskirstymas pagal SLS piene	49
3.2. Laktacijų tarpsnių bei skaičiaus įtakos antimikrobinų baltymų koncentracijos kaitai piene tyrimų rezultatai	51

3.3. Sezonų įtakos antimikrobinių baltymų koncentracijos kaitai piene tyrimo rezultatai	53
3.4. Tirtųjų veiksmų įtakos antimikrobinių baltymų kiekiui piene įvertinimas	54
3.5. Tirtųjų antimikrobinių baltymų koreliacinė analizė	59
3.5.1. Karvių tešmens ketvirčių sveikumo ir pieno antimikrobinių baltymų ryšys.....	60
3.5.2. Karvių laktacijos tarpsnių, laktacijų skaičiaus, sezonų ir pieno antimikrobinių baltymų ryšys	61
4. TYRIMŲ REZULTATŲ APITARIMAS.....	64
4.1. Antimikrobinių baltymų kiekis sveikųjų ir sergančiųjų mastitu tešmens ketvirčių piene.....	64
4.2. Karvių laktacijos tarpsnių ir laktacijų skaičiaus įtaka antimikrobinių baltymų kintamumui piene	68
4.3. Sezono įtaka antimikrobinių baltymų kiekiams karvių piene	70
IŠVADOS.....	72
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS	74
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	97
KITOS PASKELBTOS PUBLIKACIJOS	98
DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE	99
SUMMARY.....	118
PRIEDAI	160
GYVENIMO APRAŠYMAS	162
PADĖKA	163

SANTRUMPŲ PAAIŠKINIMAI

AB – antimikrobiniai baltymai (angl. *AP – antimicrobial proteins*)
ACN – acetonitrilas
alfa-LA – alfa-laktalbuminas (angl. *alpha-lactalbumin*)
AM – aplinkos mastitas (angl. *EM – environmental mastitis*)
beta-LG – beta-laktoglobulinas (angl. *beta-lactoglobulin*)
CD – diferenciacijos antigenas (angl. *cluster of differentiation*)
Da – daltonai
ESC – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *HPLC – high performance liquid chromatography*)
GSA – galvijų serumo albuminas (angl. *BSA – bovine serum albumin*)
HRP – krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*)
IFA – imunofermentinė analizė (angl. *ELISA – enzyme linked immunosorbent assay*)
Ig – imunoglobulinai
IgG – imunoglobulinas G (angl. *immunoglobulin G*)
IL – interleukinas (angl. *interleukin*)
kDa – kilodaltonai
KNS – koaguliazės neprodukuojantys stafilokokai (angl. *CNS – coagulase negative staphylococcus*)
LF – laktoferinas (angl. *lactoferrin*)
LSMU VA – Lietuvos sveikatos mokslų universitetas Veterinarijos akademija (angl. *LUHSVA – Lithuanian University of Health Science Veterinary Academy*)
MBA – mikrobiologinė analizė (angl. *microbiological analysis*)
ml – mililitrai
mm – milimetrai
ng – nanogramai
NK – ląstelės „natūraliosios žudikės“ (angl. *natural killer*)
NM – nespecifinis mastitas (angl. *nonspecific mastitis*)
OT – optinis tankis
PGR – polimerazinė grandininė reakcija
PMN – polimorfonukleariniai neutrofilai
pav. – paveikslas
proc. – procentai
RIA – radioimuninis metodas (angl. *radioimmunoassay*)
SK – sveikieji ketvirčiai (angl. *HQ – healthy quarters*)
SLS – somatinių ląstelių skaičius (angl. *SCC – somatic cell count*)
SM – subklinikinis mastitas (angl. *subclinical mastitis*)

t. y. – tai yra

TFA – trifluoroacto rūgštis (angl. *trifluoroacetic acid*)

TKS – tešmens ketvirčių sveikumas

TMB – tetrametilbenzidinas

val. – valandos

VĮ – valstybės įmonė

μl – mikrolitrai

IVADAS

Pienininkystė – vienas svarbiausių Lietuvos žemės ūkio sektorių, kurį plėtoti skatina šiai ūkio šakai itin palankios gamtinės sąlygos. Žmonės pasaulyje siekia maitintis geriau bei sveikiau, todėl itin didelis dėmesys kreipiamas į pieno produkcijos sudėtį ir kokybę. Šiuo metu plačiai ieškoma bioaktyvių baltymų panaudojimo galimybių sprendžiant visuotines sveikatos ir mitybos problemas. Pieno serumo frakcija turi didelę įvairovę baltymų, skirtingų savo chemine struktūra, biologinėmis funkcijomis (Sekmokienė ir kt., 2007; Liutkevičius ir kt., 2008; Park, 2009; Korhonen and Pihlanto, 2007). Daugelis baltymų pasižymi antimikrobinėmis, antivirusinėmis, antigrybelinėmis funkcijomis, kurios labai svarbios kovojant prieš įvairių ligų sukėlėjus (Korhonen et al., 2000; Korhonen, 2009).

Pieno sektoriuje pastebimas padidėjęs susidomėjimas natūraliu pieno liaukos atsparumo didinimu (Sordillo and Streicher, 2002; Malinowski et al., 2008). Daugybė tyrimų atliekama aiškinantis imuniteto veikimo principą, tačiau kaip funkcionuoja imuninė sistema esant tešmens uždegimui ir kaip šiuo atveju kinta pieno sudėtis mokslinėje literatūroje nėra pakankamai duomenų (Wheeler et al., 2007; Stelwagen et al., 2009; Szwajkowska et al., 2011). Manoma, jog esant optimalioms laikymo ir šėrimo sąlygoms natūralios apsaugos reakcijos geba pašalinti iš gyvulio organizmo infekcijos sukėlėjus (Sandholm and Pyorala, 1995; Oviedo-Boyso et al., 2007; Stelwagen et al., 2009). Tačiau jei imuninė sistema susilpnėjusi ar patogeninių mikroorganizmų virulentiškumas didelis, pasireiškia uždegiminiai procesai, tokie kaip subklinikinis ar lėtinis mastitas (Ali-Vehmas and Sandholm, 1995; Aniulis, 2007; Bannerman, 2009). Nepaisant didelio progreso genetikos, šėrimo sistemos, laikymo ir melžimo srityse, karvių mastitas išlieka daug finansinių nuostolių ir problemų pieno gamintojams sukelianti liga (Oviedo-Boyso et al., 2007; Wellnitz and Bruckmaier, 2012; Chaneton et al., 2013).

Nespecifinė imuninė sistema yra labai svarbi mastitų prevencijoje. Natūralių antimikrobinų faktorių aktyvavimas gali sumažinti antibiotikų kiekį, bei išlaikyti didelį terapijos efektyvumą (Kuroishi et al., 2003). Antimikrobinį pieno aktyvumą lemia jo sudėtyje esantys imunoglobulinai ir neimuniniai proteinai, tokie kaip laktoferinas, lizocimas, laktoperoksidazė, alfa-laktalbuminas, beta-laktoglobulinas (Bellamy et al., 1993). Kaip daugiafunkcinis baltymas, turintis antimikrobinų savybių, laktoferinas yra vienas svarbiausių apsauginių faktorių, kuris vaidina svarbų vaidmenį mastito prevencijai

ankstyvoje infekcijos stadijoje (Kawai et al., 2003; Wojdak-Maksymiec Mikołajczyk, 2012). Specifiniams apsaugos komponentams priskiriami imunoglobulinai dalyvauja humoraliniame imunitete. Krekenose esanti imunoglobulinų komplemento sistema užtikrina pagrindinę apsaugą nuo daugelio rūšių bakterijų bei suformuoja pasyvų imunitetą, kol veršeliui susiformuoja imuninė sistema. Piene imunoglobulinų koncentracija nedidelė, tačiau infekcijos ir uždegimo metu, šiuos antikūnus intensyviai pradeda gaminti PMN (polimorfonukleariniai leukocitai) ir jų koncentracija piene padidėja (Lindmark-Mansson, 2000). Be minėtųjų pieno antimikrobinių baltymų, alfa-laktalbuminai, beta-laktoglobulinai, galvijų serumo albuminas taip pat dalyvauja tešmens apsaugos mechanizme ir pasižymi priešuždegiminiu, bakteriostatinu, antivirusiniu, antioksidaciniu veikimu (Chatterton et al., 2006; Pan et al., 2006; Krol et al., 2008).

Šių medžiagų kiekis nėra pastovus ir kinta priklausomai nuo tešmens uždegimo stadijos, mastito sukėlėjo, karvės amžiaus, laktacijos tarpsnio, laikymo sąlygų, šėrimo ir įvairių aplinkos veiksnių (Zagorska et al., 2007; Cheng et al., 2008; Krol et al., 2012; Danowski et al., 2012). Lietuvoje iki šiol netirta, ar laktacijų skaičius ir tarpsnis, sezonas bei kiti veiksniai turi įtakos natūralių antimikrobinių baltymų kiekiui holšteinizuotų Lietuvos juodmargių veislės karvių piene.

Visose išvystytose pienininkystės šalyse, siekiant įvertinti, ar pienas gautas iš sveikų, nesergančių tešmens ligomis karvių, tiriamas somatinių ląstelių skaičius (SLS). Somatinės ląstelės, aptinkamos karvių piene, yra procesų, vykstančių pieno liaukoje, indikatorius (Rivas et al., 2001; Schukken et al., 2003; Green et al., 2004; Hillerton et al., 2005; Sharif and Muhammad, 2008). SLS piene parodo kintančias karvių imunines savybes (Philipsson et al., 1995; Žakas, 2002; Janosi and Baltay, 2004; Šimkienė ir Juozaitienė, 2007; Juozaitienė ir kt., 2008). SLS nustatymas piene vienas pirmųjų iki šių dienų plačiai taikomų specifinių ir patikimiausių testų diagnozuojant mastitą (Kitchen, 1981; Viguiet et al., 2009; Madouasse et al., 2012). Mastito formai įvertinti, bei efektyvaus gydymo parinkimui, be SLS nustatymo, atliekamas mikrobiologinis mastito sukėlėjo identifikavimo tyrimas (Hagiwara et al., 2003; Kocina et al., 2012; Chaneton et al., 2013).

Mokslinėje literatūroje gausu duomenų apie pieno baltymų antimikrobines savybes, jų išskyrimą ir panaudojimą, tačiau neradome informacijos apie laktoferino, alfa-laktalbumino, beta-laktoglobulino, galvijų serumo albumino Lietuvoje veisiamų karvių piene tyrimus, bei kas daro įtaką jų kitimui. Manome, kad reikalingi tyrimai iširti natūralių antimikrobinių baltymų dinamiškumą holšteinizuotų Lietuvos juodmargių karvių piene, priklausomai nuo laktacijų skaičiaus, laktacijos tarpsnių, tešmens sveikumo ir sezonų. Iš savo tyrimų taip pat norėtume išsiaiškinti, kaip kinta imuninių komponentų,

tokių kaip laktoferinas, imunoglobulinas, alfa-laktalbuminas, beta-laktoglobulinas ir galvijų serumo albuminas, koncentracijos piene, priklausimai nuo SLS ir mastito sukėlėjų pieno liaukoje.

Atsižvelgiant į pateiktus teiginius ir prielaidas buvo suformuluota darbo tikslas ir uždaviniai.

Darbo tikslas – ištirti natūralių antimikrobinių baltymų koncentracijos dinamiką sveikų ir sergančių mastitu karvių piene, bei pritaikyti optimalius metodus šioms medžiagoms aptikti bei įvertinti.

Darbo uždaviniai:

1. Pagal somatinių ląstelių skaičių piene ir mikrobiologinių tyrimų duomenų analizę įvertinti karvių tešmens ketvirčių sveikumą.

2. Nustatyti LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA koncentraciją sveikų ir sergančių mastitu tešmens ketvirčių piene.

3. Nustatyti LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA kiekių kitimą įvairiais laktacijos tarpsniais, pirmos, antros ir trečios laktacijų karvių piene.

4. Įvertinti sezonų (pavasario, vasaros ir rudens) įtaką tiriamųjų antimikrobinių baltymų kiekiams piene.

5. Įvertinti tiriamųjų veiksmų įtakas LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA pritaikius vienfaktorinę analizę ir daugiakfaktorinės analizės linijinius modelius.

6. Įvertinti LF, IgG, alfa-LA, beta-LG, GSA ir tešmens sveikumo, laktacijos tarpsnių ir skaičiaus, bei sezonų fenotipinius ryšius.

Mokslinis darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Atliktais tyrimais įvertinti pagrindinių antimikrobinių baltymų kiekiai sveikų ir sergančių mastitu holšteinizuotų Lietuvos juodmargių karvių piene.

Pirmą kartą Lietuvoje alfa-laktalbuminų, beta-laktoglobulinų ir galvijų serumo albuminų karvių piene tyrimams pritaikytas atvirkštinės fazės (angl. *RP – reverse phase*) efektyviosios skysčių chromatografijos metodas, o laktoferino ir imunoglobulino G nustatymui – daugiasluoksnis imunofermentinės analizės metodas (angl. *sandwich ELISA*).

Pirmą kartą taikant mišrių tiesinių modelių multivariacinę analizę įvertinta karvių tešmens ketvirčių sveikumo, laktacijų skaičiaus, laktacijos tarpsnių, bei sezonų įtaka laktoferino, imunoglobulino G, alfa-laktalbumino, beta-laktoglobulino ir galvijų serumo albumino kiekiams piene.

Pirmą kartą Lietuvoje įvertintos natūralių antimikrobinių baltymų ir tirtųjų požymių fenotipinės koreliacijos.

Nustatytas karvių tešmens ketvirčių sveikumo ryšys su natūralių antimikrobinių baltymų kiekiu, rodo šių baltymų aktyvų dalyvavimą tešmens

apsaugos mechanizme. Reikšminga laktacijos ir sezonų įtaka parodo, gyvulio organizmo jautrią reakciją į fiziologinius ir aplinkos pasikeitimus. Atlikta analizė, leidžia geriau suprasti antimikrobinių baltymų svarbą karvių tešmens apsaugos procesuose bei suteikia naujų duomenų sprendžiant visame pasaulyje aktualią problemą, susijusią su mastitais ir jų gydymu išvengiant nereikalingo antimikrobinių medžiagų (antibiotikų) vartojimo. Laktoferino ir imunoglobulino G rodikliai kartu su somatinių ląstelių skaičiumi piene galėtų būti vertinami nustatant subklininius mastitus ir tešmens atsparumą infekcijoms

Darbo aprobacija

Pagrindiniai disertacijos rezultatai paskelbti trijuose straipsniuose, iš kurių vienas – referuojamoje duomenų bazėje „*Thomson Reuters Web of Knowledge*“ ir turintis citavimo rodiklį, kiti du įrašyti į kitas patvirtintas tarptautines referuojamas duomenų bases. Taip pat duomenys skelbti mokslo populiarinimo leidinyje. Tyrimų rezultatai pateikti penkiose tarptautinėse ir dviejose nacionalinėse mokslinėse konferencijose.

Disertacijos struktūra ir apimtis

Darbą sudaro šios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų medžiagos ir metodų aprašymas, rezultatai, rezultatų aptarimas, išvados, pritaikomumas, naudoti literatūros šaltiniai (299 šaltiniai), paskelbtų publikacijų disertacijos tema sąrašas, kitų paskelbtų publikacijų sąrašas, dalyvavimo konferencijose sąrašas, disertacijos santrauka (angl. *summary*) anglų kalba, gyvenimo aprašymas ir padėka. Darbo apimtis – 163 puslapiai, pateikta 15 lentelių, 22 paveikslai ir 2 priedai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karvės tešmens anatomicinė ir morfologinė struktūra bei fiziologinė funkcija

Tešmuo yra svarbiausia melžiamų karvių kūno dalis, kurios morfologinės ir fiziologinės savybės bei išsivystymo tolygumas turi įtakos karvių produktyvumui ir sveikumui (Weiss et al., 2004; Tilki et al., 2005; Tancin et al., 2007; Juozaitienė ir kt., 2007).

Tešmuo arba pieno liauka sudaryta iš jungiamojo, riebalinio ir liaukinio audinių. Sekretinio audinio kiekis, arba sekretinių ląstelių kiekis, yra ribotas veiksnys, turintis įtakos pieno gamybai ir tešmens talpumui. Pieną sintetina sekretinės ląstelės, kurios išsidėsčiusios kaip atskiras sluoksnis ant bazinės membranos, rutulėlio pavidalo struktūra, vadinama alveole (Stelwagen et al., 1997). Keletas alveolių kartu sudaro lobulę. Alveolių dydis priklauso nuo gyvulio produktyvumo ir laktacijos mėnesio (Bruckmaier and Blum, 1998; Japertienė, 2007). Alveolių grupelės, jungdamosios tarpusavyje, sudaro stambesnes grupes, latakėliai – stambesnius pieno latakus. Pieno latakai jungiasi į pieno kanalus, pastarieji – į pieno takus, o šie praplatėja tešmens apačioje ir virsta tešmens ketvirčio cisterna. Į tešmens ketvirčio cisterną atsiveria 6–12 stambių pieno takų (Aslam et al., 1994; Stelwagen et al., 1997; Japertienė, 2007). Kiekviena tešmens pusė susideda iš priekinės ir užpakalinės dalies ketvirčių. Visi tešmens ketvirčiai atskirti vienas nuo kito, todėl pienas iš vieno ketvirčio negali patekti į kitus, taigi iš kiekvieno jų galima išmelžti atskirai. Kiekvieną tešmens ketvirtį sudaro sekretinis ir jungiamasis audinys, pieno latakai, pieno cisternos ir speniai, gausiai aprūpinti limfos ir kraujagyslių indais bei nervais. Kuo daugiau tešmenyje sekretinio audinio, kurį sudaro alveolės, tuo karvė produktyvesnė. Remiantis užsienio mokslininkų tyrimų duomenimis, nustatyta, kad geriau išsivystę yra užpakaliniai tešmens ketvirčiai nei priekiniai (Berglund et al., 2007; Tancin et al., 2007; Juozaitienė, 2014). Kiekvienas ketvirtis, tai yra kiekviena pieno liauka, baigiasi speniu. Spenių odoje plaukų, prakaito ir riebalinių liaukų nėra. Speniai (*papilla uberis*) yra palyginti ilgi, paprastai cilindriškos, rečiau kūgiškos formos. Kiekviename spenyje yra tik po vieną pieno talpyklą (*receptaculum lactis*), bet kartais pasitaiko talpykla su pertvara (Aniulis, 2007). Spenių paskirtis yra apsaugoti tešmenį nuo infekcijos iš išorės ir aktyviai dalyvauti melžimo procese (Grindal et al., 1991). Anatomicinės tešmens spenių savybės turi įtakos

kiekvieno tešmens ketvirčio produktyvumui ir tešmens sveikumui. Grindal su grupe tyrėjų (1991) nustatė, kad didesnė rizika infekcijai patekti yra trumpesni karvių speniai (Juozaitienė, 2014). Spenyje yra platus kraujagyslių ir nervų tinklas, todėl jis labai jautrus. Spenio cisterna pereina į spenio kanalą, kurio ilgis – apie 1 cm, diametras – 3–5 mm. Spenio kanalo gleivinėje yra 5–8 gleivinės raukšlės ir žiedinis raumuo, uždarančias spenio kanalą ir neleidžiantis laisvai ištekėti pienui. Spenio kanale esantis keratino kamštis turi baktericidinių savybių, sugeba adsorbuoti patekusias bakterijas ir jas pašalinti (Gronlund, 2004). Remiantis mokslininkų tyrimais, nustatytas spenių ilgio bei storio ryšys su primelžto pieno kiekiu (Kuczaj, 2003; Weiss et al., 2004) bei tešmens sveikumu (Grindal et al., 1991; Kuczaj, 2003; Juozaitienė, 2014).

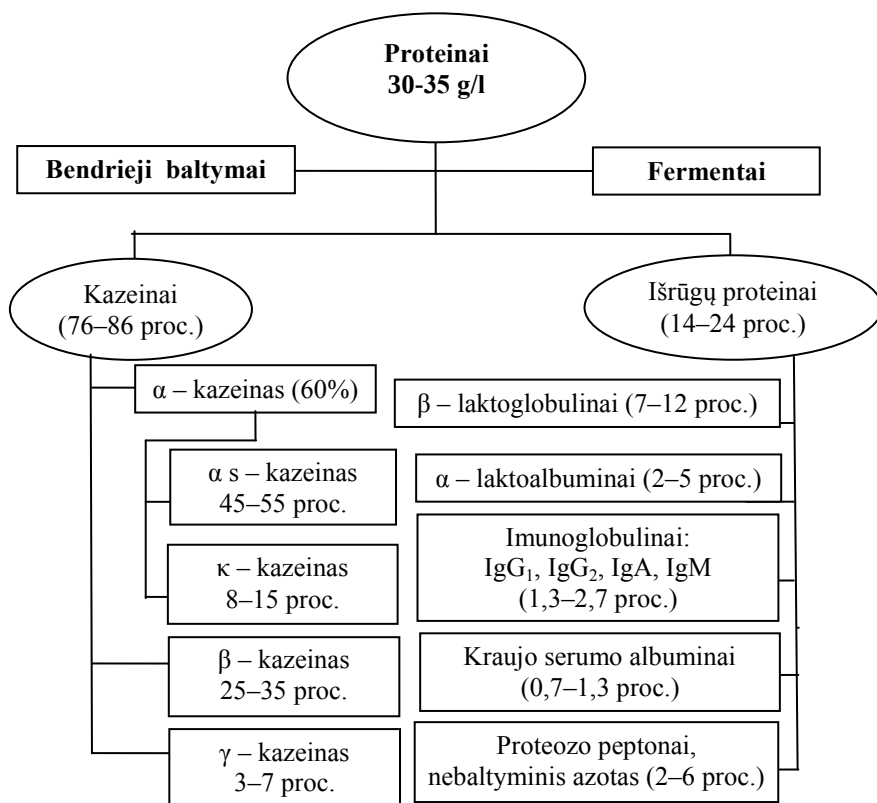
Tešmens ir spenių morfologiniai rodikliai įvairuoja priklausomai nuo veislės, bandos, amžiaus ir laktacijos (Tilki et al., 2005). Tešmens fiziologiniai rodikliai gali būti svarbus informacijos šaltinis, susijęs su karvių biologija, tinkamumu automatiniam melžimui, produktyvumu ir galimomis sveikatos problemomis, ypač mastitais (Tancin et al., 2007; Juozaitienė, 2014).

Tešmuo yra labai gerai aprūpintas kraujagyslėmis, arterijomis ir venomis (Akers, 2002; Hurley, 2003). Į tešmenį patekusios stambiosios arterijos išsišakoja į daugybę smulkesnių, o pastarosios – į kapiliarus. Kapiliarai gaubia alveoles, latakėlius, latakus, krauju aprūpina tešmens audinius. Alveolių epitelis iš prigludusių prie jų membranos kraujagyslių atrenka pritekančio kraujo medžiagas, reikalingas pieno gamybai. Tešmens poodiniame audinyje gausu venų ir limfagyslių. Užpakalinių ketvirčių viršuje yra du prie tešmens prigludę limfiniai mazgai. Esant sveikam tešmeniui jie sunkiai apčiuopiami. Tešmens šonuose po oda, aiškiai matomos venos. Išėjusios iš giliųjų tešmens audinių ir spenių jos palaipsniui jungiasi į didesnes ir sudaro dvi stambias poodines pieno venas, einančias papildve galvos link.

Pieno liaukos fiziologinė funkcija – pieno biosintezė. Pieno susidarymas – sudėtingas procesas, kuriame dalyvauja visas gyvulio organizmas, o tešmenyje vyksta daugybė biocheminių ir fiziologinių procesų (Linzell and Peaker, 1971; Larson, 1978; Sordillo and Streicher, 2002). Pieno gamybą ir atleidimą reguliuoja centrinė nervų sistema ir vidaus sekrecijos liaukos, išskiriančios hormonus. Svarbią vietą šiame procese užima endokrininė liauka – hipofizis (Nevilie et al., 2002). Pienas susidaro pieno liaukos liaukinio epitelio protoplazmoje veikiant fermentams. Pieno sekrecija susideda iš keturių stadijų. Pradžioje tešmens liaukinio epitelio ląstelėse iš kraujo rezorbuojami pieno sudėtiniai dalių pradmenys, jose vyksta šių dalių sintezė, o susidarę produktai slenka į viršutinę ląstelių dalį ir išskiriami į alveolių spindį (Shennan and Peaker, 2000). Ne visos pieno sudėtinės dalys susidaro ląstelėse. Į pieno liauką nepakitę praeina kraujo plazmos baltymai (albuminai, imunoglobulinai), aminorūgštys, riebiosios rūgštys, mineralinės medžiagos, vitaminai ir

kiti. Iš pratekančio kraujo epitelinės ląstelės atrenka tik tas medžiagas, kurios įeina į pieno sudėtį, todėl ji labai priklauso nuo kraujyje esančių medžiagų, reikalingų pieno gamybai, o jų kiekis – nuo gyvulio šėrimo. Alveolėse susikaupęs pienas stabdo, o periodiškas jo išmelžimas stimuliuoja sekreciją. Pačioje pieno liaukoje sintetunami pieno riebalai, baltymai ir laktozė. Pieno riebalai susidaro pieno liaukoje, pereinant iš kraujo plazmoje esančių neutralių riebalų ir riebiųjų rūgščių. Daugiausia jų susidaro iš acetato. Pieno riebalų sintezė tešmenyje priklauso nuo prieskrandžiuose rūgstančių angliavandenių.

Pagrindiniai pieno baltymų pradmenys yra kraujo plazmoje esančios aminorūgštys (lizinas, histidinas, triptofanas), polipeptidai, kraujo plazmos albuminai, globulinai, pieno liaukos parenchimos baltymai ir kitos nebaltyminės azoto medžiagos. Daugiausia pieno baltymų sintetinama pačiame tešmenyje, ir tik nedidelė jų dalis patenka iš kraujo. Pieno baltymai nėra vienalyčiai ir susideda iš trijų frakcijų: kazeino (75–80 proc. visų pieno baltymų), tirpiųjų baltymų t. y. serumo (išrūgų) baltymų (15–20 proc.) ir neproteininių komponentų frakcija, kurių sudėtyje yra nitrogenas (5 proc.). Šios frakcijos gali būti išskaidytos į komponentus, besiskiriančius savo chemine sudėtimi (Erasmus et al., 2001; Staniškienė ir kt., 2007). Kazeinu vadinama grupė baltymų, kurie nusėda parūgštinus pieną. Nusodinus kazeiną lieka išrūgų baltymai. Kazeinas sudarytas iš kazeino frakcijų, o išrūgas sudaro daugelis kitų svarbių imuninių proteinų (1.1.1 pav.). Pieno serumo baltymus sudaro medžiagų grupės, vadinamos albuminais (alfa-laktalbuminas) ir globulinais (beta-laktoglobulinas). Prie pieno baltymų priskiriami fermentai, kai kurie hormonai bei riebalų apvalkalėlių baltymai. Piene taip pat aptinkami baltymų skilimo produktai ir nebaltyminis azotas (urėja). Bendras baltymų kiekis piene ir kraujyje yra pastovus, tačiau esant pieno liaukos uždegimui ir laktacijos eigoje baltyminių frakcijų kiekis kinta (Urbienė, 2006; Staniškienė ir kt., 2007).



1.1.1 pav. Pieno baltymų klasifikacija
(pagal O'Mahony, 1988 ir Urbienė, 2006)

1.2. Tešmens uždegimas

Tešmens arba pieno liaukos uždegimas (lot. *mastitis*) – dažniausia melžiamų, trūkinamų ir užtrūkintų karvių liga. Pagal mastitų paplitimą ir ekonominius nuostolius tai yra vienas nuostolingiausių susirgimų gyvulininkystėje. Mastitas – tai ligų kompleksas, dėl kurio sumažėja pieno sintezė, pasikeičia jo sudėtis, pablogėja dietinės ir technologinės savybės (Kitchen, 1981; Aniulis, 2007).

Uždegimas – fiziologinis atsakas į įvairius dirgiklius, tokius kaip infekcija ar audinių pažeidimai, susiformavęs evoliucijos eigoje, kaip apsauginė organizmo reakcija. Uždegimo metu lokalizuojamas patogeninis faktorius, taip neleidžiant jam pasklisti po organizmą. Uždegimo židinyje sudaromos sąlygos patogeninio faktoriaus sunaikinimui, vyksta specifinės ir nespecifinės apsauginės reakcijos (Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt et al., 2007). Uždegimo laipsnis priklauso nuo organizmo fiziologinės reakcijos į sukėlėją, gyvulio

amžiaus, veislės, imuniteto stiprumo ir laktacijos tarpsnio (Petzl et al., 2008; Viguier et al., 2009). Mastito forma ir ligos trukmė tiesiogiai yra susijusios su leukocitų migracijos greičiu, imuniniu atsaku ir ląstelių baktericidiniu aktyvumu infekcijos vietoje.

Vienas svarbiausių uždegimo atsako komponentų, atliekančių pagrindinę pieno liaukos apsauginę funkciją, yra polimorfonuklearinių (PMN) leukocitų pasieninis judėjimas. Jie prilimpa prie smulkesnių kraujagyslių endotelio bei migruoja per tarpus, esančius tarp ląstelių, išklojančių kraujagysles. Migruojant PMN leukocitams į infekcijos vietą, piene padaugėja somatinių ląstelių skaičius (SLS) (Kelly et al., 2000). Iš visų pieno esančių leukocitų, 50 proc. sudaro neutrofilai, 36 proc. – limfocitai ir 14 proc. – makrofagai. PMN leukocitai infiltruoja audinius, išklojančius išvedamuosius kanalus, spenio kanalą. PMN leukocitų funkcija piene yra fagocituoti ir sunaikinti įsiveržusias bakterijas. Jei imuninės ląstelės migruoja greitai iš kraujo srauto ir sugeba pašalinti bakteriją, leukocitų kiekio didėjimas sustoja, ir SLS sumažėja iki pradinio skaičiaus (Aniulis ir kt., 2000; Paape et al., 2002). Uždegimas gali būti ūminis, kylantis per keletą sekundžių ar minučių, pavyzdžiui, atsakas į organų sužeidimą, arba lėtinis, trunkantis mėnesius, metus, pavyzdžiui, lėtinis mastitas. Mastitas gali būti infekcinės ir neinfekcinės kilmės. Išskiriamos dvi pagrindinės tešmens uždegimo formos: slapstasis (subklinikinis) ir klinikinis mastitas. Kad karvė serga klinikiu mastitu, galima įtarti iš pakilusios tešmens temperatūros. Be to, pažeistas tešmens ketvirtis parausta, patinsta, yra skausmingas, vizualiai matoma pakitusi pieno konsistencija (sutirštėjęs, gleivėtas su kraujo ar fibrino gumulėliais). Klinikinio mastito atveju primiliai labai sumažėja, o atlikus laboratorinius tyrimus nustatomas žymiai padidėjęs SLS bei patogeniniai mastito sukėlėjai (Tyler and Cullor, 1990). Karvei sergant slapčiuoju (subklinikiu) tešmens uždegimu, piene ir tešmenyje iš pirmo žvilgsnio jokių pakitimų nematyti, tačiau pieno gamyba sumažėja ir pakinta jo sudėtis bei padidėja SLS (Barbano et al., 1991; Batavani et al., 2007; Radostis et al., 2007). Be minėtųjų mastito formų, pasitaiko ir kitokių tešmens uždegimų, tokių kaip nespecifinis arba aseptinis mastitas. Nespecifiniam mastitui (NM) būdinga tai, kad jį sukelia ne bakterijos, bet fizinės pieno liaukų traumos, cheminis dirginimas, atsirandantis patekus gydomiesiems produktams, netinkamas melžimo įrangos veikimas. Ištyrus pieno mėginį, sukėlėjas neišskiriamas, bet būna padidėjęs somatinių ląstelių skaičius.

Uždegiminė reakcija tešmenyje lemia pieno kiekybinius ir kokybinius pokyčius (Kitchen, 1981). Stiprėjant uždegimui, cheminė pieno sudėtis panašėja į kraujo, nes sudėtinės dalys iš kraujo apytakos filtruojamos į pieno liauką. Uždegimo metu pieno komponentų kiekis kinta įvairiai (žr. 1 priedą). Pagrindinių sudedamųjų dalių kiekis pieno sausosiose medžiagose sumažėja

5–15 procentų. Labai pasikeičia riebalų sudėtis, padaugėja didelės molekulinės masės nesočiųjų riebalų rūgščių. Šie pokyčiai skatina lipolizę (riebalų skaidymą), dėl to suprastėja pieno produktų kokybė. Mastitas pažeidžia pieno liaukos sekrecijos ląsteles, kurios sintetina laktozę, riebalus ir baltymus. Sergančių mastitu karvių piene sumažėja riebalų, laktozės, alfa-laktalbumino, bendrojo kazeino, kalcio, vitaminų (ypač vitamino C), pagausėja natrio, chloro, albuminų ir globulinų. Padidėja tokio pieno pH (net iki 6,9 ir daugiau) ir oksidacinis aktyvumas (Hurley, 2003; Rudejevienė, 2007). Pieno liaukos uždegimas turi įtakos imunologiškai aktyvių peptidų kiekių sumažėjimui arba padidėjimui. Pieninių karvių bandose galima rasti sveikas karves, karves su vienu uždegimo (infekcijos) pažeistu tešmens ketvirčiu arba karves su visais pažeistais tešmens ketvirčiais. Tokia įvairovė liudija, kad mastitinių susirgimų dažnis ir paplitimas priklauso nuo karvių pieno liaukos jautrumo infekcijos sukėlėjams (Oviedo-Boyso et al., 2007; Bannerman, 2009; Wellnitz and Bruckmaier, 2012) ar jų išskirtiems toksinams (Strandberg et al., 2005; Mount et al., 2009), bei nuo tešmens ir spenių fiziologinių rodiklių (Juozaitytė ir Žakas, 2002; Uzmaj et al., 2003; Tancin et al., 2007).

Pasaulinėje literatūroje mastitai klasifikuojami pagal juos sukėlusius mikrobo rūšį (Blowey and Edmondson, 2010; Bortolami et al., 2015; Stelwagen et al., 2009). Pieninių karvių mastitų sukėlėjais gali būti daugelis virusų (Wellenberg et al., 2002), mikoplazmų, mielių, pirmuonių ir grybelių. Moxlininkas Watts (1988) identifikavo apie 137 skirtingus mastito etiologinius sukėlėjus, tačiau tik keletas iš jų išskiriami įprastiniais tyrimo metodais. Patogeniniai mikroorganizmai į pieno liauką patenka per spenio kanalą, kraują arba limfą. Jie skirstomi į užkrečiamuosius (kontaginius) ir aplinkos mikroorganizmus. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) ir *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) išskiriami kaip pagrindiniai užkrečiamieji, o enterobakterijos (*Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* genčių bakterijos), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) ir *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*), kaip aplinkos mastito sukėlėjai (Blowey and Edmondson, 2010; Bortolami et al., 2015). Koaguliazės neprodukuojantys stafilokokai (KNS) (*Coagulase Negative Staphylococci*) ir korinebakterijos (*Corynebacterium spp.*) priskiriami prie sąlyginai patogeninių aplinkos mikroorganizmų. Šių mikroorganizmų sukeltos uždegimo metu, SLS padaugėja 2–3 kartus, bei stipriai sumažėja produkcija ir pasikeičia pieno sudėtis. Pastaruoju metu šie mikroorganizmai išskiriami vis dažniau klinikinių mastitų atvejais (Pyorala and Taponen, 2009). Vieni iš dažniausiai nustatomų patogeninių mastito sukėlėjų – *E. coli* (Hogan and Smith, 2003) ir *S. aureus* (Bannerman et al., 2004; Zecconi et al., 2006). Karvės, kurios bent kartą buvo sirgusios *S. aureus* sukeltu mastitu turi didesnę reinfekcijos galimybę. *S. aureus* yra labai patogeniškas mikroorganizmas,

kuris greitai prasiskverbia į tešmens audinius. Užsikrėtusios karvės tešmenyje jau po šešių valandų šis patogeninis mikroorganizmas randamas parenchimoje, kur nepalankiomis sąlygomis sudaro mikropūlinukus. Nusilpus organizmui, iš šių inkapsuliuotų pūlinukų bakterijos vėl patenka į alveoles ir uždegimas atsinaujina. Karvės labai jautrios aplinkos sukėlėjų infekcijoms pirmąją laktacijos mėnesį, vėliau jautrumas mažėja. Didžiausias *E. coli* infekcijų skaičius būna per pirmąsias 7–10 laktacijos dienas po užtrūkinimo laikotarpio (Philipot et al., 2011). Be to, Burvenich ir kitų (2003) tyrimai parodė, kad *E. coli* ir *S. aureus* dažniausiai sukelia mastitą arti veršiavimosi periodo ir ankstyvosios laktacijos metu.

1.3. Somatinės ląstelės karvių piene

Somatinės ląstelės – tai biologinės kilmės priemaišos, išskiriamos tešmens liaukų latakuose. Tešmens epitelinės ląstelės, vykstant normaliems organizmo procesams, nuolat atskyra ir atsinaujina. Kai pieno liaukoje uždegimo nėra, SLS būna nuo 10 iki 200 tūkst./ml (vidutiniškai 50–75 tūkst./ml) ir vyrauja epitelinės ląstelės. Kitos somatinės ląstelės – tai baltieji kraujo kūneliai leukocitai: PMN, makrofagai ir limfocitai. Neutrofilai yra mieloidinės kilmės ląstelės, kurių citoplazma pripildyta granulių. Jie skirstomi į bazofilus, eozinofilus ir neutrofilus (Paape et al., 2003). Šie leukocitai dalyvauja nespecifinio imuninio atsako reakcijose infekcijos vietoje. Neutrofilai yra pagrindinis ląstelių tipas randamas pieno liaukos audinyje ankstyvojoje uždegimo stadijoje (Jensen and Eberhart, 1981). PMN kiekis mastitu sergančios karvės piene gali padidėti net 90 procentų (Paape et al., 2002). Makrofagai vykdo fagocitozę ir dominuoja (66–88 proc.) sveikos karvės piene (Sandholm, 1995). Kai mastitą sukeliančios bakterijos patenka į pieno liauką, makrofagai perduoda signalus imuninei sistemai, kuri aktyvuoja neutrofilus, kad sunaikintų patogeninius sukėlėjus (Mullan et al., 1985). Karvei susirgus tešmens uždegimu, apie 75 proc. ląstelių sudaro leukocitai. SLS padidėjimas uždegimo metu yra natūrali apsauginė ląstelių funkcija (Harmon, 2001; Koivula et al., 2005). Priklausomai nuo uždegimo intensyvumo, SLS piene gali padidėti net iki kelių dešimčių milijonų. Atsižvelgiant į įvairių veiksnių (sveikatos būklės, laktacijos periodo, šėrimo, amžiaus, veislės, metų laiko) įtaką karvės organizmui, ir remiantis žalio pieno pirminių kokybės rodiklių įvertinimo instrukcija, patvirtinta Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2006 m. liepos 25 d. įsakymu Nr. 3D-303 (žin., 2006, Nr. 85-3337), žaliame piene SLS negali viršyti 400 tūkst./ml.

Somatinės ląstelės piene yra vienas svarbiausių karvių pieno kokybės ir tešmens sveikatingumo rodiklių (Sharif and Muhammad, 2008). Kuo daugiau

somatinių ląstelių piene, tuo jis žemesnės kokybės ir menkesnės vertės. Anot mokslininkų Kromker ir kitų (2001) bei Hamann (2002), Cheng ir kitų (2008), pienas, kuriame SLS mažiau nei 100 tūkst./ml, yra iš sveiko tešmens, o Chaneton ir kiti (2013) teigia, kad tešmuo nepažeistas, kai SLS bendrame ketvirčių piene neviršija 200 tūkst./ml. Pienas, kuriame SLS yra daugiau nei 200 tūkst./ml, parodo, kad sukelta uždegiminė reakcija, tešmuo galimai infekuotas. Toks pienas netinkamas sūrių gamybai dėl sumažėjusios sūrių išeigos, kokybės ir galiojimo laiko (Dohoo and Meek, 1982; Barbano, 1999). SLS padaugėjus iki 100–200 tūkst./ml, kinta baltymų proporcijos, t. y. mažėja kazeino, daugėja bendrųjų ir išrūgų baltymų koncentracija piene (Barbano et al., 1991; Coulon et al., 1998; Tripaldi et al., 2003).

Nedidelį arba trumpalaikį SLS padidėjimą piene lemia biologiniai (amžius, veislė, laktacijos skaičius ir tarpsnis) ir aplinkos faktoriai (klimatas, sezonas, šėrimas, laikymas, melžimas) (Harmon, 1994; 2001). Fiziologinis SLS padidėjimas vyksta visuose tešmens ketvirčiuose vienodai, o sergant mastitu – dažniausiai viename ar keliuose tešmens ketvirčiuose (Hutton et al., 1990,). Aukštas SLS sveikuose tešmens ketvirčiuose sumažėja per tris paras, o infekuotuose – išlieka ir didėja (Barkema et al., 1999). Natūraliai SLS padidėja karvėms užtrūkstant, pradėjus jas melžti vieną kartą per dieną, pirmomis dienomis po veršiavimosi, taip pat su amžiumi t. y. didėjant laktacijų skaičiui (Barkema et al., 1999; Skrzypek et al., 2004; Staniškienė ir kt., 2007).

SLS piene parodo atsparumą mastitams, kintančias karvių imunines savybes (Philipsson et al., 1995; Žakas, 2002; Šimkienė ir Juozaitienė, 2007). Pieninių galvijų selekcinėse programose naudojamas SLS piene rodiklis, pasižymintis aukšta genetinė koreliacija su mastitu ir didesniu paveldimumu (Philipsson et al., 1995; Rogers et al., 1998; Juozaitienė ir Žakas, 2002).

1.4. Tešmens apsaugos mechanizmas

Pieno liauka nuo patogeninių mikroorganizmų patekimo yra apsaugota įvairių apsaugos mechanizmų (Rainard and Riollot, 2006). Šie mechanizmai skirstomi į dvi sistemas: nespecifinį (įgimtą) ir specifinį (įgytą) imunitetą (Sordillo and Streicher, 2002; Oviedo-Boyso et al., 2007; Kolkman et al., 2010). Nespecifinės imuninės reakcijos (uždegimas) paprastai atitinka infekcinio proceso lokalizaciją, o specifinės imuninės reakcijos dar apima ir visus pirminius bei antrinius imuninius organus. Įgimtas imunitetas yra dominuojantis gynybos metu ankstyvosiose infekcijos stadijose ir yra pajėgus atsispirti daugelio mikroorganizmų invazijai, dėl to yra labai svarbus apsaugant pieno liauką nuo mastito patogeninių sukėlėjų (Chaneton et al., 2008; Stelwagen et

al., 2009; Wellnitz and Bruckmaier, 2012). Greitas bakterijų sunaikinimas ir pašalinimas nesukelia jokių pastebimų pieno kokybės pokyčių (Sordillo and Streicher, 2002).

Nespecifinio arba įgimto imuniteto veikloje dalyvauja spenio bei tešmens anatinis barjeras (oda, epitelis, spenio sfinkteris, spenio kanalo peristaltika, keratinas, Fiurstenbergo rozetės), fagocitinis barjeras (neutrofilai, makrofagai, monocitai, natūralūs kileriai), skysčių barjeras (komplemento sistema, vazodiliacija, lizocimas, laktoferinas, laktoperoksidazinė sistema, citokinai), uždegiminis barjeras (kapiliarų pralaidumas, fagocitų emigracija) (Persson et al., 1993; Burvenich et al., 1995; Kehrl and Harp, 2001; Sordillo and Streicher, 2002; Kutila et al., 2004). Bakterijų sunaikinimas fagocitozės metu – svarbiausias antibakterinis mechanizmas tešmenyje (Gronlund, 2004). Jei patogeninis mikroorganizmas įveikia įgimtą-nespecifinę apsaugos sistemą, suveikia specifinis arba įgytas imunitetas (Hibbit et al., 1995). Specifiniai faktoriai (cirkuliuojantys antikūnai arba imunoglobulinai IgG1, IgG2, IgM, IgA ir su stimuliuotais limfocitais bei makrofagais susiję faktoriai) ir reakcijos yra labai specifiški: reaguoja tik su tokiu antigenu, kuris juos sukėlė. Svarbiausieji specifinio imuninio atsako elementai yra B ir T limfocitai ir jų išskiriamos imuninės medžiagos. Specifinių antikūnų reakcijoms pieno liaukoje padeda veikti nespecifiniai bakteriostatiniai faktoriai. Pagal tai, kas realizuoja specifines imunines reakcijas (cirkuliuojančios imuninės medžiagos ar su atitinkamomis ląstelėmis susiję faktoriai), skiriamos humoralinės ir ląstelinės imuninio atsako reakcijos, o atsižvelgiant į tai – humoralinis ir ląstelinis imunitetas. Humoralinės reakcijos yra ypač svarbios organizmui ginantis nuo daugelio bakterijų, virusų, mažiau – nuo grybelių. Jos taip pat realizuoja greito tipo hiperergines reakcijas. Ląstelinės reakcijos padeda organizmui gintis nuo daugumos ląstelėse parazituojančių sukėlėjų. Siekiant užtikrinti optimalų pieno liaukos apsaugos mechanizmą abi imuninės sistemos (įgyta ir įgimta) turi veikti kooperuotai ir integruotai (Sordillo and Streicher, 2002). Besidaugindamos bakterijos išskiria medžiagų apykaitos produktus ir toksinus, kurie stimuliuoja karvės apsauginius organizmo mechanizmus. Kelete naujausių pranešimų pažymėta, kad sveikoje arba infekuotoje pieno liaukoje vyrauja antimikrobiniai baltymai, susiję su tešmens gynyba (Rainard and Riollot, 2006; Smolenski et al., 2007; Wheeler et al., 2007; Singh et al., 2008).

1.5. Natūralios antimikrobinės medžiagos piene

Pieno sudėtyje yra daug peptidų ir baltymų, kurie turi bakteriostatinių ir baktericidinių savybių (Bagnicka et al., 2010). Ypač naudingi, maistininėmis,

fiziologinėmis ir funkcinėmis savybėmis pasižymintys baltymai išrūgose (Atanasova and Ivanova, 2010). Kaip pabrėžė Leman (1995), peptidai išrūgose pasižymi imunomoduliaciniu (aktyvina apsauginius organizmo mechanizmus) ir antibakteriniu poveikiu. Išrūgų baltymų komponentai ir jų peptidiniai fragmentai turi įvairių savybių, įskaitant antimikrobinę ir antivirulinę funkcijas, imuninės sistemos stimuliavimą, antikancerogeninį poveikį ir kitas metaboliškas ypatybes (Walstra et al., 2006). Išrūgas siūloma išskirti kaip naują pieno klasę, iš kurių ekstrahavus natūralias imunines, biologiškai aktyvias medžiagas, tiesiogiai moduliuojant imuninį atsaką, būtų galima panaudoti tešmens infekcijos prevencijai arba uždegimo likvidavimui (Stelwagen et al., 2009). Pastaruoju metu antimikrobiniai peptidai iš krekenų ar pieno atsiranda prekyboje kaip papildai imuninei sistemai stiprinti (Wheeler et al., 2007; Stelwagen et al., 2009).

Išrūgų baltymai sudaro apie 20 proc. visų piene esančių baltymų, į kuriuos įeina 50 proc. beta-LG, 12 proc. alfa-LA, 10 proc. imunoglobulinai, 5 proc. serumo albuminai, 0,23 proc. proteozės peptonai, laktoferinas (LF) ir laktoperoksidazės. Nors šios sudedamosios dalys nėra didelės, tačiau yra labai svarbios tiesioginei ir netiesioginei organizmo apsaugai (Severin et al., 2005).

1.5.1. Laktoferinas (LF)

Laktoferinas yra baltymas, natūraliai randamas daugelio žinduolių priešpienyje, piene, ašarose, seilėse bei kitose organizmo išskyrose, ir yra vienas pagrindinių nespecifinio imuniteto agentų (Hennart et al., 1991; Levay and Viljoen, 1995). Susižeidus, infekcijos ar uždegimo atveju LF atpalaiduojamas iš neutrofilų antrinių granulių į kraują (Artym, 2010; Garcia-Mantoya et al., 2012). Žmonių piene ir priešpienyje LF koncentracija atitinkamai – 2 mg/ml ir 7 mg/ml, o karvių piene ir krekenose atitinkamai – 0,2 mg/ml ir 1,5 mg/ml (Levay and Viljoen, 1995). Išrūgų baltymuose LF gali būti iki 5 proc. (Lonnerdal, 2003). LF biologinės savybės mokslinių tyrimų stebėjimų objekte nuo 1960 metų, kai jis pirmą kartą buvo išskirtas iš karvės, o vėliau iš žmogaus pieno (Ensminger and Ensminger, 1986; Wood, 1988; Shimazaki, 2000).

Tai yra geležį surišantis glikoproteinas (molekulinė masė – apie 80 kDa), kurį sudaro viena polipeptidinė grandinė iš 689 amino rūgščių (Lonnerdal and Iyer, 1995). LF piene gali būti trijų formų: be geležies jonų ir prisijungęs vieną arba du geležies jonus. Geležies jonų (Fe^{3+}) prisijungimas lemia bakteriostatines bei baktericidines savybes. Atimdamas geležį iš mikroorganizmų, kurių gyvavimui ji būtina, LF stabdo jų dauginimąsi ir augimą (Rainard and Riollet, 2003). LF svarbus ir saugant organizmą, gleivines nuo

grybelių, ypač nuo *Candida* rūšies, kurie sukelia žarnyno ar lyties organų kandidozę (pienligę), burnos gleivinės išopėjimus (Bellamy et al., 1993).

Moksliniais tyrimais įrodytas LF ir imunoglobulino kompleksinis antimikrobinis poveikis prieš gramneigiamas ir gramteigiamas bakterijas (Korhonen et al., 2000; Drobni et al., 2004). Atlikus tyrimus *in vitro*, nustatytas LF ir lizocimo inhibitorinis poveikis *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* ir *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) rūšių bakterijoms (Carlsson and Bjork, 1987).

Nemažai duomenų mokslinėje literatūroje pateikiama apie LF antivirusinį poveikį. LF neleidžia virusams patekti į ląsteles, stabdo jų dauginimąsi, gali prisijungti prie pačių virusų ir juos sunaikinti. LF aktyvus prieš žmogaus imunodeficito virusą, hepatito B, C ir G virusus, herpes virusą, žmogaus papilomos virusą, žmogaus citomegalo virusą, alfa-, rota-, entero-, adeno-, polio- virusus (Marshall, 2004; Jenssen, 2005; Pan et al., 2006).

Ypač reikšmingas daugiafunkcis antimikrobinis LF veikimas (Weinberg, 2007; Tomita et al., 2009). Mokslinėmis eksperimentų išvadomis ir klinikinių duomenų analizių duomenimis nustatyta, kad LF veikia prieš *E. coli*, *Salmonella* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteria*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Candida albicans* (*C. Albicans*), *Candida crusei*, *Tinea pedis*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Herpes simplex*, hepatito C virusus ir daugelį kitų patogeninių mikroorganizmų (Dionysius and Milne, 1997; Yamauchi et al., 1993; Pan et al., 2007; Зобкова и др., 2007; Самохина и др., 2012).

LF atsparus karščiui ir virškinimo fermentams (Wakabayashi et al., 2006; Malaczewska and Rotkiewicz, 2007). Klinikinių tyrimų metu pastebėta, kad LF vartojant kaip maisto papildą, žarnyno mikrofloroje pagausėja organizmui naudingų *Bifidobacterium* ir *Lactobacillus* rūšių bakterijų (Losnedahl et al., 1998). Manoma, kad LF, patekęs į žarnyną, pirmiausia veikia žarnyno imuninę sistemą ir tik vėliau, suskaidytas ir patekęs į kraujotaką, imunitetą veikia sistemiškai (Wakabayashi et al., 2006; Bizulevičius ir kt., 2007; 2008). Normalios bakterinės floros užtikrinimas, apsauga nuo patogeninių bakterijų vystymosi ir imuniteto stiprinimas labai svarbūs naujagimiams, todėl LF įtrauktas į naujagimiams skirtą maisto sudėtį (Wakabayashi et al., 2006; Actor et al., 2009). Dar vienas LF privalumas kovojant su bakterinėmis infekcijomis yra jo gebėjimas padidinti bakterijų jautrumą tam tikriems antimikrobiniais preparatais (vankomicinams, penicilinams, cefalosporinams) tuo pačiu mažinat vaistų dozes. LF ir penicilino derinys padidina antibiotikų inhibitorinį poveikį prieš *S. aureus* bakterijas (Diarra et al., 2002; Park, 2009).

LF pasižymi priešūždegiminėmis, antioksidacinėmis savybėmis, stimuluoja imuninę sistemą (Rainard and Riollot, 2003; Wakabayashi et al., 2006; Pan et al., 2007; Weinberg, 2007; Tomita et al., 2009). Eksperimentai *in vitro* patvirtino LF dalyvavimą reguliuojant humoralinio ir ląstelinio imuninio atsako reakcijas stimuliuojant limfocitų proliferaciją (dauginimąsi), aktyvuojant makrofagus, monocitus, NK (angl. *natural killer*) ląsteles ir neutrofilus, bei stimuliuojant žarnyno ir periferinių antikūnų atsaką (Pan et al., 2007). LF blokuoja bakterijų prisitvirtinimą prie gleivinių, o kai kuriais atvejais suardo enteropatogeninių bakterijų struktūras (Valenti et al., 2004). Carlsson ir Bjorck (1987), Pan ir kiti (2007) publikacijose teigiama, kad LF veikimas kartu su lizocimu, komplemento sistema, natūraliais antikūnais sustiprina inhibitorinį poveikį bakterijų augimui net ir nepadidėjus jų koncentracijai piene. *In vitro* bandymo metu nustatyta, jog laktoferino pepsininis hidrolizatas žymiai padidina splenocitų, išskiriamų imungoblinu IgM, IgG ir IgA, sekreciją (Gauthier et al., 2006).

LF taip pat slopina navikų (vėžinių ląstelių) vystymąsi plonojoje žarnoje ir kitose organizmo vietose (Pierce and Legrand, 2009). Šis baltymas indukuoja apoptozę, inhibuoja angiogenezę, moduliuoja kancerogenus metabolizuojančius fermentus ir veikia kaip geležies „surišėjas“ (Bosselaers et al., 1994; Parodi, 2007). LF hidrolizatas skiriamas *per os* padidina diferenciacijos antigenų (CD angl. *cluster of differentiation*) CD4+, CD8+ ir NK ląstelių proliferaciją blužnyje, padidina interleukinų (IL) IL-18 produkavimą žarnyno epitelyje. IL-18 potencialus interferono γ (IFN- γ) produkcijos stimulatorius, taip pat padidina NK ir citotoksinių T ląstelių aktyvumą (Horiguchi et al., 2005; Bizilevičius ir Kazlauskaitė, 2008). Bandymais *in vivo* ir *in vitro* įrodytas tiesioginis LF antivėžinis poveikis prieš melanomą ir gaubtinės žarnos vėžines ląsteles (Spadaro et al., 2008).

Įvairūs tyrimai atlikti siekiant nustatyti veiksnius, turinčius įtakos LF koncentracijai piene (Cheng et al., 2008; Soyeurt et al., 2007; Chaneton et al., 2008) ir krekenose (Tsuji et al., 1990). LF kiekis didėja, esant tešmens involiucijai, ir vėl sumažėja prieš veršiavimąsi. Šviežiame karvės piene LF būna nuo 0,02 iki 0,35 mg/ml (Rainard and Riollot, 2006). Ankstyvosiose krekenose LF koncentracija padidėja nuo 2 iki 5 mg/ml (Rainard and Riollot, 2003), kiti tyrimai nurodo LF koncentraciją nuo 0,5 iki 1 g/l (Walstra et al., 1999). Keletas autorių (Piccinini et al., 2007; Hiss et al., 2009) pranešė, kad nustatytas LF koncentracijos padidėjimas pirmomis laktacijos dienomis, kas įrodo jog LF yra susijęs su veršelių apsauga nuo infekcinių susirgimų iš kart po atsivedimo. Tyrimais patvirtinta, kad tešmens uždegimo atveju (klinikiniu ar subklinikiniu) LF koncentracija piene padidėja keletą kartų (Hagiwara et al., 2003; Chaneton et al., 2008; 2013). Carlsson ir kitų mokslininkų (1989) atlikti tyrimai įrodė, kad *Salmonella* genties bakterijų toksinais

užkrėtus karves ir sukėlus mastitą, padidėja laktoferino ir lizocimo koncentracija piene (Carlsson et al., 1989).

Kolkman ir kitų mokslininkų (2010) tyrimai patvirtino karvių veislės įtaką LF koncentracijai piene. Vidutinė LF koncentracija pieninių veislių karvių (Holšteinų fryzų ir Džersių) krekenose (2 mg/ml) reikšmingai didesnė nei mėsinių veislių karvių: 0,5 mg/ml Japonijos juodųjų arba *wagyu* (angl. *Japanese Black*) ir 0,4 mg/ml Japonijos rudųjų (angl. *Japanese Brown*). Šie tyrimai sutapo su Soyeurt ir kitų (2007) tyrimais, kuriuose LF koncentracija Džersių veislės karvių piene, palyginti su Holšteinų fryzais, nustatyta aukštesnė. LF koncentracija pieninių veislių karvių piene kinta nuo 0,02 mg/ml iki 12 mg/ml, kai tuo tarpu mėsinių veislių karvių piene nustatyta mažiau nei 1 mg/ml (Tsuji et al., 1990). Pastebėti LF koncentracijų skirtumai aiškinami tuo, kad pieninių veislių karvės dažnai serga tešmens uždegimu, dėl to didėja LF koncentracija piene. Remiantis Soyeurt ir kitų (2007) tyrimais, teigiama, kad yra galimybė atrinkti gyvulius, turinčius aukštą LF koncentraciją. Tikėtina, kad tokie gyvuliai turės padidėjusį atsparumą mastitams (Soyeurt et al., 2007).

Mokslininkai pastebėjo, kad padidėjusi išrūgų baltymų koncentracija vyresnių karvių piene yra susijusi su padidėjusiu pieno liaukos epitelio pralaidumu, kurį lemia ilgalaikiai, anksčiau buvę infekcinių mastitų pažeidimai (Mackle et al., 1999). Laktacijai progresuojant didėja SLS, tai taip pat daro įtaką padidėjusiai LF koncentracijai piene (Fadlelmoula et al., 2007). Laktacijos piko metu LF kiekiai maži, bet vėliau laktacijos eigoje LF kiekis proporcingai didėja. Cheng ir kitų mokslininkų tyrimuose nustatyta teigiama koreliacija tarp laktacijos tarpsnio ir LF koncentracijos (Cheng et al., 2008). Tsuji ir kiti ištyrė, kad LF kiekis vyresnių laktacijų karvių krekenose kelis kartus didesnis nei pirmaveršių karvių piene (Tsuji et al., 1990).

Kolkman ir kiti mokslininkai (2010) teigia, kad LF galėtų būti melžiamų karvių tešmens sveikatingumo vertinimo rodiklis, rodantis atsparumą infekciniams sukėlėjams. Chaneton ir kitų (2013) tyrimų rezultatai patvirtino, kad LF svarbus kovojant prieš tešmens infekciją, ypač pirmomis laktacijos dienomis. Mokslininkai pateikė įrodymus, kad LF gali būti panaudojamas pieninių karvių atskirų tešmens ketvirčių numatomų uždegimų rodiklis (Chaneton et al., 2013).

Atlikti eksperimentai patvirtino galvijų LF hidrolizato antibakterines savybes (Kawai et al., 2003). *In vivo* eksperimente nustatyta, kad po 14 dienų laktoferino pepsininio hidrolizato leidimo tiesiai į pieno liauką, piene visiškai neliko mastitą sukėlusių mikroorganizmų, tokių kaip *S. aureus*, *E. coli*, KNS ir streptokokų, bei sumažėjo SLS (Kawai et al., 2003). Su tuo pačiu hidrolizatu atlikus eksperimentą *in vitro*, nustatytas LF antimikrobinis veikimas prieš plazmos nekoaguliuojančius stafilokokus, streptokokus, enterokokus,

K. pneumoniae, mieliagrybius ir *Prototheca zopfii*. Be to, laktoferino hidrolizatas aktyvina neutrofilų O_2 produkciją (Kawai et al., 2007).

1.5.2. Imunoglobulinai (Ig)

Imunoglobulinai (Ig) – tai gynybiniai baltymai antikūnai arba gama globulinai, gaminami plazminių ląstelių, kilusių iš B limfocitų. Ig yra imuninių komponentų klasė, kurių pagrindinė funkcija yra atpažinti svetimas organizmui struktūras (antigenus), jas specifiskai prisijungti ir pašalinti iš organizmo (Pieškus, 2001). Ig molekulinė masė – 160 kD (Park, 2009). Ig piene gali būti 1,9–3,3 proc. nuo bendro baltymų kiekio, iki 80 proc. krekėnose ar iki 10 proc. išrūgose (Walsh and Duncan, 2000; Korhonen, 2004). Didžiausia Ig koncentracija – krekėnų formavimosi metu ir pirmomis dienomis po apsiveršiavimo. Krekėnose esanti Ig komplemento sistema užtikrina pagrindinę apsaugą nuo daugelio bakterijų rūšių bei suformuoja pasyvų imunitetą, kol veršeliui susiformuoja imuninė sistema. Galvijų serumo ir pieno išskyrų sudėtyje yra keturios pagrindinės Ig klasės IgG1, IgG2, IgM ir IgA, kurios skiriasi fizikine, chemine struktūra ir biologiniu aktyvumu (Fox, 2003). Karvių (atrajotojų) piene dominuoja IgG1 izotipas (65–90 proc.), kuris į pieną patenka iš kraujo (Basoglu et al., 1999; Korhonen, 2004; Gapper et al., 2007). Karvės piene tik 30 proc. IgG ir 10 proc. IgA yra gauti iš kraujo, o likusieji sintetinami lokaliai, tešmens limfoidiniuose audiniuose. Palyginti su giminingų izotopų paplitimu karvių piene ir kraujo plazmoje, piene gimininga IgG1 ir IgA proporcija yra aukštesnė nei plazmoje (Lindsay et al., 1982). Tai patvirtina, kad pieno liaukos epitelis aktyviai praleidžia šiuos izotopus į pieną per receptorių mechanizmą (Sanholm, 1995). Infekciniam antigenui į organizmą patekus pirmą kartą pirmiausia sureguoja IgM klasę, kurie siunčia signalą kitai Ig klasei. IgA klasę pasiskirsčiusi gleivinių išskyrose ir apsaugo gleivines nuo infekcinės mikrobu agliutinacijos (Hurley and Theil, 2013). Ig pasižymi bakteriostatinėmis (bakterijoms trukdančiomis vystytis) ir baktericidinėmis (bakterijas sunaikinančiomis) savybėmis. Ig neleidžia bakterijoms vystytis jas agliutinuodami, trukdo joms prisitvirtinti prie endotelinio sluoksnio, slopina patogeninių bakterijų metabolizmo procesus, atlieka opsonizaciją, bei reguliuoja komplemento sistemą (Marnila and Korhonen, 2002). Be to, Ig gali ištirpinti bakterijų ląsteles, sunaikinti jas bei neutralizuoti toksinus ir virusus. Toksinių junginių neutralizacija vyksta juos agliutinuojant (Park, 2009; Urbienė, 2015). Be fagocitozės bei komplemento aktyvinimo proceso, šie baltymai dalyvauja patogeninių mikroorganizmų *E. coli*, *C. albicans*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mutants* ir *H. pylori* sunaikinime (Gapper et al., 2007; Korhonen and Kaartinen, 1995). Tyrimais nustatyta, kad neimunizuotų karvių piene yra specifinių antikūnų

prieš žmonių rotavirusus, bei mikroorganizmus *Salmonella enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Shigella flexneri* (El-Loly, 2007).

Įvairių klasių Ig kiekis serume ir piene nėra pastovus, nes priklauso nuo karvės veislės, amžiaus, sveikatos būklės, bei laktacijos tarpsnio (Larson, 1992; Korhonen et al., 2000). Ig koncentracijos pikas piene pasiekiamas kolostrogenezės ir pieno liaukos uždegimo metu (Sordillo and Streicher, 2002). Pienas sumaišytas su krekenomis netinkamas sūrių, varškės gamybai. Ig koncentracija – indikatorius, rodantis, ar į pieną nėra patekę ankstyvųjų krekenų (Conesa et al., 2005). Po apsiveršiavimo imunoglobulinai iš serumo patenka į pieno liauką, todėl pirmosiose krekenose jų koncentracija yra didelė (40–50 mg/ml), kuri per kelias dienas nukrenta iki 0,1–0,7 mg/ml (Marnila and Korhonen, 2002; Elfstrand et al., 2002). Vėliau Ig aptinkami galvijų piene mažais kiekiais ir padaugėja vėlyvosios laktacijos metu (Auldish et al., 1998; Korhonen et al., 2000). Nors Ig normos piene nėra nustatytos, manoma, kad įpusėjus laktacijai nusistovi 0,1–0,3 mg/ml Ig kiekis (Auldish et al., 1998; Korhonen et al., 2000; Collin et al., 2002; Conesa et al., 2005). Kocina ir kiti tyrėjai (2012), atlikę tyrimus, padarė išvadą, kad Ig koncentracija mažiausia laktacijai įpusėjus. Ig koncentracija, infekcinio mastito metu, padidėja dėl padidėjusio tešmens audinių kraujagyslių pralaidumo (Burvenich et al., 2000; Kehrl and Harp, 2001; Pyorala, 2002) bei suintensyvėjusios PMN (polimorfonuklearinių) leukocitų sintezės (Lindmark-Mansson, 2000). Eksperimentai *in vitro* parodė, kad IgG koncentracija nuo 0,3 mg/ml slopina žmonių limfocitų proliferacijos atsaką į T ląsteles. Manoma, kad karvės piene IgG koncentracija vyrauja nuo 0,6 iki 0,9 mg/ml, kurios pakaktų žmonių normaliai imuninei būklei palaikyti (Marshall, 2004).

Daugelyje šalių prekiaujama maisto papildais, pagamintais imunoglobulinų pagrindu, skirtų veršelių ir paršelių virškinimo (gastro-intestinal) infekcijų prevencijai bei žmonių imuniteto palaikymui (El-Loly, 2007; Gapper et al., 2007; Stelwagen et al., 2009; Krol et al., 2012).

Brener su bendraautorais (1995) teigia, kad yra sąveika tarp imuninės ir reprodukcinės sistemos. Estrogenai veikia imunosupresyviai arba imunostimuliuojančiai, priklausomai nuo gyvulio hormoninės būklės. IgG kiekis karvių kraujo serume žymiai sumažėja rujos metu ir veršiuojantis. Atlikti tyrimai, norint išsiaiškinti antibiotikų įtaką gyvulio imuninei sistemai. Tyrimai patvirtino, kad antibiotikai gali veikti slopinančiai imuninės sistemos atžvilgiu (Laval, 1989).

JAV mokslininkas Andrew ir kiti (2001), trimis β -laktaminių antibiotikų tyrimo testais (*Charm Cowside*, *CITE Snap* ir *Penzym*) ištyrę 25 karvių pieną pirmas septynias dienas po apsiveršiavimo, nustatė, jog testai rodo klaidingus rezultatus dėl didelės natūralių imuninių medžiagų koncentracijos. Pasak autoriaus, norint išvengti klaidingai teigiamų testų rezultatų po apsiver-

šiavimo, nerekomenduojama pieną tirti iki šešto melžimo, kol atsinaujina pieno struktūrinės savybės (Andrew et al., 2001).

1.5.3. Beta-laktoglobulinas (beta-LG)

Beta-laktoglobulinas yra dominuojantis baltymas išrūgose iki 50 proc. baltymų ir jo kiekis piene gali būti nuo 2 iki 4 g/kg. Tik atrajotojai (karvės, avys) ir kiti monogastriniai gyvūnai (šuo, katė) gali išskirti beta-LG piene (Sawyer, 2003). Beta-LG yra -SS- ir -SH- grupių, todėl jis lengvai jungiasi su kitais baltymais. Šis baltymas pasižymi multifunkcinėmis savybėmis, t. y. sujungia ir perneša vitaminus, lipidus, metalų jonus ir yra susijęs antivi-rusiniu, antikancerogeniniu, hipocholesteroleminiu veikimu, trukdo patoge-ninų mikroorganizmų adhezijai (Chatterton et al., 2006; Liu et al., 2007; Krol et al., 2008). Be to, beta-LG yra biologiškai aktyvių peptidų šaltinis, kuris pasižymi antimikrobinu, antioksidaciniu, imunomoduliaciniu, opioidiniu ir kitais metaboliniais poveikiais (Pihlanto and Korhonen, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2007; Korhonen, 2009). Daugiausia (8–15 proc. visų pieno sudė-tinių dalių) šio baltymo yra laktacijos pradžios piene, todėl manoma, kad šis baltymas stiprina augančio organizmo imunitetą (Urbienė, 2006). Biologinės šio baltymo funkcijos vis dar nėra gerai žinomos, anot kai kurių mokslininkų, jis dalyvauja fosforo metabolizme pieno liaukoje, retinolio (vitamino A) ir riebiųjų rūgščių pernešime virškinimo trakte, bei pasyvaus imuniteto perda-vime (Farrell et al., 1987; Liu et al., 2007; Krol et al., 2008).

1.5.4. Alfa-laktalbuminas (alfa-LA)

Šio baltymo kiekis yra kintantis, todėl įvairūs literatūros šaltiniai nurodo skirtingą koncentraciją, išrūgose alfa-LA gali būti iki 25 proc. baltymų ir jo kiekis svyruoja nuo 1,2 iki 2 g/l pieno (Curadi et al., 2000; Brew and Grobler, 1992). Jų pagausėja krekenose: pirmomis valandomis po apsiveršiavimo, pieno albuminas sudaro 10–12 proc. visų pieno sudedamųjų dalių (Ski-mundris, 1997; Park, 2009). Alfa-LA dalelės labai mažos nuo 15–20 nm, o molekulinė masė 14 kDa. Šis baltymas sintetinamas pieno liaukoje ir iš-skiriamas su pienu (Brew and Grobler, 1992). Pastebėta, kad laktacijos pradžioje alfa-LA koncentracija sparčiai didėja, kol pieno gamyba stabi-lizuojasi ir pradeda mažėti iki pieno liaukos užtrūkimo (Goodman and Schanbacher, 1991). Alfa-LA pasižymi stipriu hidrofiliškumu, stabilumu temperatūros poveikiui, nekoaguliuoja veikiant fermentams. Alfa-LA – svar-bus baltymas, reguliuojantis pieno gamybą ir yra fermento-laktozės sintetazės (t. y. *UDP-galactosyltransferase*) sudėtinė dalis. Laktozės kiekis piene yra

tiesiogiai susijęs su alfa-LA koncentracija (Brew and Grobler, 1992). Alfa-LA dalyvauja transportuojant kalcio, cinko bei mangano jonus (Strohmaier, 2004; Chatterton et al., 2006; Krol et al., 2010). Alfa-LA – puikus šaltinis būtinų amino rūgščių triptofano ir cisteino, kurios yra serotonino ir glutathiono pirmtakai. Serotoninas ir glutathionas yra stiprūs antioksidantai, kurie stiprina imunitetą. Galvijų alfa-LA hidrolizatai ir iš jų gauti specifiniai peptidai atlieka daug biologiškai aktyvių funkcijų, tokių kaip antimikrobinis, antikancerogeninis, opioidinis, prebiotinis, imunomoduliacinis veikimas (Sternhagen et al., 2001; Pihlanto and Korhonen, 2003; Chatterton et al., 2006). Identifikuota keletas alfa-LA antimikrobiškai veikiančių peptidų, t. y. LDT1 (1–5 fragmentas), LDT2 (17-31-S-S-109-114 fragmentas) ir LDC (61-68-S-S-75-80 fragmentas). Pastarieji peptidai labiausiai aktyvūs gramteigiamų bakterijų atžvilgiu, nors silpnas poveikis pastebėtas ir prieš *Bordetella bronchiseptica* bei *K. pneumoniae* (Pellegrini, 2003; Clare et al., 2003). Hidrolizuotas alfa-LA padidina B limfocitų imuninį atsaką. Toks pat poveikis būdingas ir laktoferino hidrolizatui, kuris padidina IgA, IgG ir IgM produkciją. Kadangi nė vienas iš atskirų peptidų nepasižymi tokiu poveikiu, manoma, jog pasireiškia bendras keleto peptidų aktyvumas (Meisel and FitzGerald, 2003). Antibakteriniu poveikiu pasižymi ir avies išrūgų baltymų alfa-LA ir beta-LG hidrolizatai, kurie inhibuoja visų tirtųjų bakterijų (*E. coli* HB101, *E. coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265, *S. aureus* 9973) augimą (El-Zahar et al., 2004).

1.5.5. Galvijų serumo albuminas (GSA)

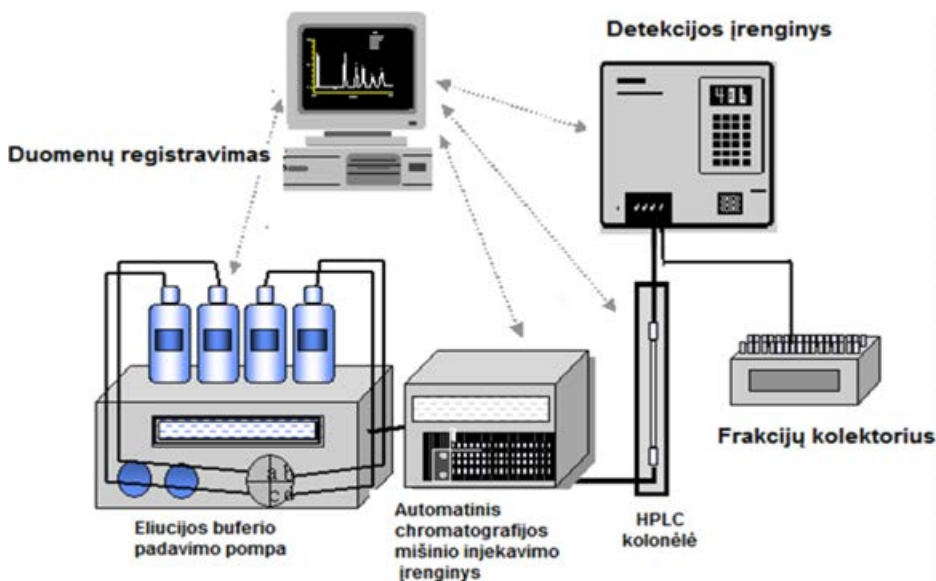
GSA sudaro 2–5 proc. išrūgų baltymų ir 1 proc. nuo bendro pieno baltymo (Fox, 2003). Pagrindinė albuminų sintezė vyksta kepenyse, o į pieną jie patenka per glaudžias epitelines jungtis difuziniu būdu iš kraujo (de Wit, 1998; Walsh and Duncan, 2000). Pieno liaukos epitelinės ląstelės, nors ir mažiau nei hepatocitai, taip pat sintetina albuminus (Shamay et al., 2005). Anot mokslininkų Litwinczuk ir kitų (2011), GSA pieno ir kraujo barjero pralaidumo pieno liaukoje indikatorius. GSA padidėjimas rodo suaktyvėjusią uždegiminę reakciją. Šio baltymo biologinė funkcija – baltymų pernešimas netirpioms riebalų rūgštims (Walzem et al., 2002). GSA sudėtyje – didelė sieros amino rūgščių ir glutamilicisteino koncentracija (Bounous, 2000). Šie peptidai – svarbūs antioksidanto glutathiono pirmtakai, kurio maži kiekiai rodo ligos požymius (Kharb et al., 2000). Kartu su kitais išrūgų baltymais GSA pasižymi priešvėžiniu potencialu, t. y. gebėjimu slopinti vėžinių ląstelių augimą (Laursen et al., 1990; Khan et al., 2013). Antioksidacinės šio baltymo savybės pastebėtos mokslininkų Tong ir kitų (2000), o Smith su kitais mokslininkais (1992) įrodė, kad *in vitro* GSA apsaugo lipidus nuo fenolio sukeltos oksidacijos.

1.6. Natūralių antimikrobinių baltymų tyrimų metodai

Padidėjus susidomėjimui apie pieno baltymų biologinį aktyvumą atsirado poreikis plėtoti technologijas tokių medžiagų atskyrimui ir nustatymui. Dabartinės technologijos suteikia galimybes nustatyti ir analizuoti pieno sudėtį smulkesnėse struktūrose. Pieno baltymai tiriami taikant chromatografijos, elektroforezės, radialinės imunodifuzijos, imunofermentinės analizės ir kitokias metodikas (de Jong et al., 1993; Leonil et al., 1995; Bobe et al., 1998; Ferreira and Cacote, 2003; Veloso et al., 2004). Nė vienas analizės būdas neužtikrina optimalaus visų pagrindinių išrūgose esančių antimikrobinių baltymų kiekybinio ir kokybinio nustatymo, todėl norint išskirti keletą baltymų tenka derinti kelias metodikas.

Baltymų atskyrimui pritaikyta daugelis chromatografijos rūšių: jonų mainų chromatografija (Xu et al., 2000; Fee and Chand, 2006), pasiskirstymo chromatografija (Yoshida, 1989; Bridonneau and Lederer, 1993), adsorbcinė chromatografija (Uzun et al., 2005; Plate et al., 2006), gelchromatografija (Almashikhi and Nakai, 1987), afininė (giminingumo) chromatografija (Bobe et al., 1998; Tu et al., 2002; Noppe et al., 2010; Ozkara et al., 2003). Chromatografija – tai fizikinis ir cheminis analizės metodas, grindžiamas molekulių atsiskyrimu dėl jų skirtingos struktūros ir kompozicijos (Kupiec, 2004). Tiriamosios medžiagos pasiskirsto tarp dviejų fazių, iš kurių viena yra nejudančioji arba stacionari (sorbentas, gelis), o kita judančioji arba mobilioji (eliuentas), kuri neša tiriamąsias medžiagas per nejudančiąją fazę. Mėginyje molekulės su nejudančiąja faze turi skirtingą trauką ir sąveiką, todėl molekulės galima lengvai atskirti. Mėginio komponentai, kurie turi stipresnę sąveiką su nejudančiąja faze, per kolonėlę juda daug lėčiau, nei komponentai su silpnesne sąveika. Dėl skirtingo judėjimo kolonėlėje galima atskirti įvairius junginius. Šių dienų modernioje farmacijos industrijoje šis analitinis metodas yra pagrindinis ir neatsiejamas instrumentas kuriant bei identifikuojant įvairias chemines struktūras (Kazakevich and Lobrutto, 2007).

Didelio efektyvumo skysčių chromatografija (ESC) yra vienas iš naujesnių metodų baltymų identifikavimui ir kiekybiniam įvertinimui (Rounds and Gregory, 2003). ESC metodu galima atskirti plataus poliariškumo junginius, kurių molekulinis svoris – nuo 54 iki 450 tūkstančių daltonų, tyrimas trunka apie 10 minučių ir atkuriamumas iki 99 proc. (McMaster, 2007). Junginių atskyrimo efektyvumą šiuo metodu lemia srauto (slėgio) kintamumas ir eliuentinės medžiagos (mobiliosios fazės) (Elgar et al., 2000). Kaip parodyta 1.6.1 paveiksle, ESC prietaisai apima pompą, injektorius, kolonėlę, detektorius ir integratorių arba duomenų kaupimo ir rodymo sistemą. Visos sistemos širdis yra kolonėlė, kurioje vyksta atsiskyrimas. Nors nejudanti fazė gali būti



1.6.1 pav. *Efektyviosios skysčių chromatografijos schema*
(pagal Levin, 2010)

sudaryta iš mikronų dydžio dalelių porų, aukšto slėgio siurblys turi perleisti judančiąją fazę per kolonėlę (Skoog et al., 2007). Plačiausiai naudojama kolonėlės medžiaga yra silicio pagrindas. Populiariausia medžiaga yra oktadecilsilicio dioksidas (ODS-silica), kuriame yra C18 danga, tačiau gali būti ir medžiaga su C1, C2, C4, C6, C8 ir C22 (Kupiec, 2004). Chromatografijos procesas prasideda, kai įleidžiamas tirpinys į injektorius ir injekuojamas kolonėlės gale. Komponentų atsiskyrimas prasideda tada, kai analizė ir judančioji fazė yra pumpuojamos per kolonėlę. Galiausiai kiekvienas komponentas išplaunamas iš kolonėlės ir duomenų ekrane matomos kaip smailės (Skoog et al., 2007). Eliuentinių komponentų aptikimas priklauso nuo detektoriaus, todėl labai svarbu pasirinkti tinkamą detektorius. Pagrindiniai detektoriai, naudojami ESC, yra lūžio indekso (RI), ultravioletiniai (UV-Vis) ir fluorescenciniai. Taip pat yra diodų matricos, elektrocheminiai, laidumo, skystas šviesos sklaidos, aerosoliu pagrįstas, chiralinis detektoriai (Thakkar et al., 2011).

Mokslinėje literatūroje pateikiami ESC analizės metodai, kurie taikomi atskirų antimikrobinių baltymų identifikavimui biologiniuose skysčiuose ar piene (Palmano and Elgar, 2002; Rounds and Gregory, 2003). Universalumas, trumpas analizės laikas ir didelė skiriamoji geba lėmė šio metodo populiarumą analizuojant baltymus pieno pramonėje (Elgar et al., 2000). Nustatyta, kad šis metodas tinkamas pagrindinių išrūgų baltymų, t. y. alfa-LA ir

beta-LG kiekybiniam įvertinimui, tačiau susidurta su sunkumais išskiriant mažesnius baltymus (GSA, imunoglobulinus ir proteazių peptonų frakcijas) (Elgar et al., 2000). Pastaruoju metu daugumoje publikuojamų mokslinių straipsnių kazeino, Ig, LF, lizocimo, alfa-LA, beta-LG ir GSA karvės piene identifikavimui ESC metodas naudojamas kaip pagrindinis (Romero et al., 1996; Palmano and Elgar, 2002; Enne et al., 2005; Dračková et al., 2009; Krol et al., 2010, Krol et al., 2013; Litwinczuk et al., 2011; Brodziak et al., 2012; Ruprichova et al., 2014). Syvaoga ir Korhonen (1993) Ig, alfa-LA, beta-LG ir GSA karvės piene greitai identifikavo ir kiekybiškai įvertino gelchromatografijos (gelfiltracijos) metodu vienu reakcijos paleidimu. ESC metodas rekomenduojamas kaip standartinis greitas, tikslus, kiekybinis imunoglobulinų išrūgose analizės būdas (El-Loly et al., 2007). Nors ESC sulaukė oficialaus daugelio tarptautinių organizacijų pripažinimo bei įteisinimo, metodas turi ir trūkumų: analizė sudėtinga, naudojami toksiški reagentai, reikia didelių investicijų (El-Loly et al., 2007).

Greitesni ir pigesni imunofermentinės analizės (IFA) metodai leidžia išvengti minėtų chromatografijos metodų trūkumų. Populiariausi metodai, kai reikia kiekybiškai ir kokybiškai įvertinti imuniniame atsake dalyvaujančius antigenus arba antikūnus, yra radioimuninis (angl. *RIA – radioimmunoassay*) ir imunofermentinis (angl. *ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay*) tyrimai (El-Loly et al., 2007; Gelsinger et al., 2015). Šių imunocheminių metodų esmė yra tai, jog turint gryną antigeną arba antikūną, jų kiekį galima išmatuoti panaudojus žymę, t. y. radioizotopą (RIA metodas) arba fermentą (ELISA metodas). Sukurta nemažai RIA ir ELISA metodų variantų, bet populiariausias yra daugiasluoksnis RIA ar ELISA metodas (angl. *sandwich*) (Gelsinger et al., 2015). Šiame metode naudojami du skirtingi antikūnai, atpažįstantys nepersidengiančius skirtingus to paties antigeno epitopus, kurio koncentraciją reikia išmatuoti. Fiksuotas pirmų antikūnų kiekis pririšamas prie tvirto paviršiaus, dažniausiai plastikinės mikrotitravimo plokštelės šulinėlių. Tada į šulinėlius dedamas tiriamasis tirpalas su nežinoma antigeno koncentracija, šalia ištirnavus standartinį tirpalą su žinoma antigeno koncentracija. Antigenas rišasi prie šulinėlio dugne esančių antikūnų, neprisirišę antigenai išplaunami. Į šulinėlius dedami antri antikūnai, žymėti radioizotopu arba fermentu, ir kuo daugiau šulinėliuose bus prie pirminių antikūnų prisirišusių antigenų, tuo daugiau prie šių antigenų prisiriš antrinių žymėtų antikūnų. Pagal standartinių antigenų rišimąsi nubraižomos standartinės kreivės, iš kurių išskaičiuojamos tiriamųjų tirpalų antigenų koncentracijos. Radioizotopas matuojamas specialiu izotopų matavimo skaitiklių, o fermentas matuojamas spektrofotometru pagal spalvoto produkto susidarymą po jo reakcijos su substratu. Taip gali būti nustatomi ir specifiniai patogenams antikūnai organizmo skysčiuose ir ląstelių kultūrose arba tiesiogiai prie tvirto

paviršiaus pririšant patogenų antigenus arba netiesiogiai atliekant daugiasluoksniį imunocheminį tyrimą. Metodai yra jautrūs ir tinkami išrūgų baltymų tokių kaip laktoferino (Hagiwara et al., 2003; Cheng et al., 2008; Chaneton et al., 2013; Sobczuk-Szul et al., 2014) ar imunoglobulinų (Li-Chan and Kummer, 1997; Conesa et al., 2005; Bar et al., 2009; Musayeva ir kt., 2015) kiekybiniam įvertinimui. El-Loly ir Farrag (2006) ištyrę imunoglobulinius RIA ir ELISA metodais nustatė, kad IgG ir IgM kiekybinių skirtumų tarp metodikų nėra, išskyrus IgA, kur ELISA metodika vertinant šį baltymą buvo jautresnė ir tikslesnė.

Be minėtų metodų, imunoglobulinų tyrimams taikoma nefelometrinė imunoanalizė (Collin et al., 2002) arba turbidimetrinė analizė (Eihvalde et al., 2012; Kocina et al., 2012). Kiekybiniams kazeino, alfa-LA, beta-LG karvės piene įvertinimams Olandijoje, Italijoje, Lenkijoje taikytas kapiliarinės elektroforezės metodas (de Jong et al., 1993; Cartoni et al., 1998; Sobczuk-Szul et al., 2014). Kapiliarinės elektroforezės (KE) metodas pasižymi dideliu efektyvumu, greita analize, ir paprasta analitine technika. KE yra skysčių chromatografijos ir elektroforezės derinys, kuris atliekamas kapiliariniu lygmeniu (mikro- ar nano- formatu). Šis metodas gali būti pritaikomas daugelyje sričių. KE analizė nereikalauja didelio reagentų kiekio ir mėginių skaičiaus. Tačiau tai neigiamai veikia rezultatų tikslumą ir metodo jautrumą. Pagrindinė problema – analizei naudojant mažą mėginio kiekį, analizė būna ne visada teisinga. Tačiau sumažinus tokias problemas, kurios gali turėti įtakos rezultatų kokybei, atidus mėginių paruošimas lemia didelį efektyvumą, greitą analizę ir tikslius rezultatus.

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Apibendrinant literatūros duomenis galima teigti, kad pieno biosintezė yra sudėtingas procesas, kuriame dalyvauja visas gyvulio organizmas, o tešmenyje vyksta daugybė biocheminių ir fiziologinių procesų (Linzell and Peaker, 1971; Larson, 1978; Sordillo and Streicher, 2002). Kad pasigamintų kokybiškas pienas, karvė turi būti sveika. Esant optimalioms laikymo ir šėrimo sąlygoms natūralios apsaugos reakcijos pašalina infekcijos sukėlėjus (Sandholm and Pyorala, 1995; Oviedo-Boyso et al., 2007; Stelwagen et al., 2009), tačiau susilpnėjus imunitetui, pasireiškia uždegiminiai procesai, tokie kaip subklinikinis ar lėtinis mastitas (Ali-Vehmas and Sandholm, 1995; Aniulis, 2007; Bannerman, 2009). Pieno sektoriuje ieškoma būdų kaip didinti natūralų pieno liaukos atsparumą infekciniams susirgimams (Sordillo and Streicher, 2002; Malinowski et al., 2008). Nespecifinės imuninės sistemos komponentai yra labai svarbūs mastitų prevencijoje. Antimikrobinį pieno

aktyvumą lemia jo sudėtyje esantys imunoglobulinai ir neimuniniai proteinai, tokie kaip laktoferinas (LF), alfa-laktalbuminas (alfa-LA), beta-laktoglobulinas (beta-LG), galvijų serumo albuminas (GSA) (Bellamy et al., 1993). Šių medžiagų kiekis piene nėra pastovus ir kinta, priklausomai nuo tešmens uždegimo stadijos, mastito sukėlėjo, karvės amžiaus, laktacijos tarpsnio, laikymo sąlygų, šėrimo ir įvairių aplinkos veiksnių (Zagorska et al., 2007; Cheng et al., 2008; Krol et al., 2012; Danowski et al., 2012). Lietuvoje iki šiol netirta, ar laktacijų skaičius, laktacijos tarpsnis, sezonas bei kiti veiksniai turi įtakos natūralių antimikrobinių baltymų kiekiui karvių piene. Atlikta analizė, leistų geriau suprasti karvių tešmens apsaugos mechanizmus ir antimikrobinių baltymų svarbą šiuose procesuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimų laikas, vieta ir objektas

Mokslinis ir tiriamasis darbas atliktas 2012–2016 metais LSMU VA Anatomijos ir fiziologijos katedroje, Virškinimo fiziologijos ir patologijos moksliniame centre, LSMU VA Gyvulininkystės instituto Chemijos laboratorijoje, VĮ „Pieno tyrimai“ akredituotoje laboratorijoje, kuri atitinka laboratorijų kompetencijai keliamus reikalavimus pagal standartą ISO/IEC 17025:2005.

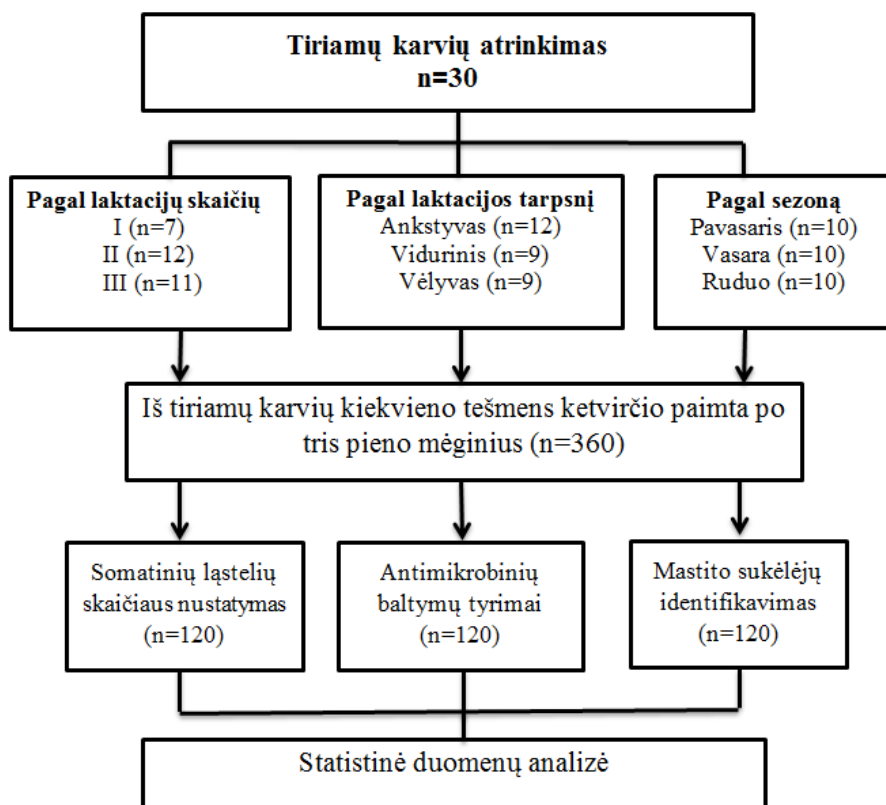
Tyrimai atlikti privačiame melžiamų karvių ūkyje Marijampolės rajone 2014–2015 metais. Ūkyje buvo laikomos 94 holšteinizuotos (holšteinizacijos laipsnis 75 proc.) Lietuvos juodmargių veislės karvės. Karvės melžiamos du kartus per parą: ganykliniu laikotarpiu – 6.00 ir 19.00 val., tvartiniu laikotarpiu – 7.30 ir 20.00 val. Vidutinis bandos primilžis per parą sudarė 1013 kg pieno, vidutinis riebalų kiekis piene sudarė – 4,06 proc. (2,96–5,16), baltymų kiekis – 3,15 proc. (2,74–3,65), laktozės kiekis – 4,34 proc. (3,9–4,85), somatinių ląstelių skaičius – 244 tūkst./ml (48–874). Karvių amžius buvo nuo 1 iki 10 metų, o vidutinis laktacijų skaičius – 4,2 laktacijos.

Tiriamuoju laikotarpiu atrinkta 30 kliniškai sveikų karvių, atsižvelgiant į jų laktacijos skaičių bei tarpsnį. Atrinktos ankstyvo (iki 120 dienos), vidurinio (121–200 dienos), vėlyvo (201–305 dienos) laktacijos tarpsnio pirmos, antros ir trečios laktacijų karvės.

2.2. Pieno mėginių paėmimo metodika

Pieno mėginiai tyrimams imti tris kartus per metus (pavasari, vasarą ir rudenį) vakarinio melžimo metu pagal standartizuotus mėginių ėmimo nurodymus ISO 707:2008. Iš kiekvienos karvės kiekvieno tešmens ketvirčio paimta po tris pieno mėginius (po 50 ml kiekvienas mėginys). Melžimo pradžioje paimtas pirmasis mėginys mastito sukėlėjų nustatymui, kuris konservuotas VĮ „Pieno tyrimai“ boro rūgšties (504DI19) pagrindu paruoštu konservantu. Prieš imant mėginį speniai švariai nuplauti ir nuvalyti servetėle, sudrėkinta dezinfekavimo tirpalu. Iš spenių išmelžtos pirmosios 2–3 pieno čiurkšlės ir tik tada į mėgintuvėlį išmelžtos 5–6 pieno čiurkšlės mastito sukėlėjų tyrimui atlikti. Melžimo viduryje paimta po du mėginius

pieno kokybės tyrimui: vienas – SLS įvertinimui, kitas – antimikrobinių baltymų (AB): imunoglobulinų (IgG), laktoferino (LF), alfa-laktalbumino (alfa-LA), beta-laktoglobulino (beta-LG) ir galvijų serumo albumino (GSA) kiekio piene tyrimams. Žalio pieno mėginiai SLS nustatymui buvo konservuoti „Sedupolo“ tabletėmis (kiekvienoje tabletėje yra 8 mg bronopolo ir 0,3 mg natamicino). Įdėjus konservanto, pienas gerai išmaišytas. Konservuoti pieno mėginiai į laboratoriją tyrimams pristatyti per 2 val., specialiuose konteneriuose, kur palaikoma pastovi, ne aukštesnei kaip 4 ± 2 °C temperatūra. Iš viso per visą tyrimų laikotarpį surinkta ir ištirta 360 pieno mėginių. Darbo schema pateikta 2.2.1. paveiksle.



2.2.1 pav. Tyrimų schema

2.3. Somatinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodika

Pieno kokybės rodiklis – somatinių ląstelių skaičius, nustatytas prietaisu „SomaScope MK2“ (Foss, 3400 Hillerød, Danija), dirbančiu srauto citometrijos principu pagal LST EN ISO 13366-2:2006/AC:2007 standartą. Somatinių ląstelių skaičius piene išreiškiamas tūkst.ląst./ml.

2.4. Mikrobiologinių tyrimų metodika

Mikrobiologiniai tyrimai atlikti VI „Pieno tyrimai“ akredituotoje laboratorijoje. Mastito sukėlėjai identifikuoti vadovaujantis standartine darbo procedūra SDP 5.4.4.B.6 „Pagrindinių mastitą sukeliančių bakterijų nustatymas piene“ (2009), parengta pagal „*Laboratory and field handbook on bovine mastitis*“ vadovą. Mėginiai mikrobiologiniam tyrimui sėti į Petri lėkšteles su kraujo agaru ir selektyvinėmis mitybinėmis terpėmis (Oxoid, Anglija). Užsėtos Petri lėkštelės 24–48 val. kultivuotos termostate $+37\pm 1$ °C temperatūroje. Išskirtų mikroorganizmų morfologijai nustatyti iš kultūrų paruošti tepinėliai dažyti Gramo metodu (Diagnostika Merck, Vokietija) ir stebėti mikroskopu. Išaugusios kultūros sėtos į manitolio druskos agarą, DNR-azės, šlapalo terpes. Taip pat vertinta hemolizė, maltozės skaldymas, oksidazės testas ir plazmokoaguliazė, su 3 proc. vandenilio peroksido tirpalu įvertinta katalazės gamyba (žr. 2 priedą). Mikrobiologinis tyrimas buvo teigiamas, kai iš tešmens ketvirčio pieno mėginio išskiriama viena ar dvi bakterijų rūšys.

2.5. Imunofermentinės analizės (IFA) metodika

Kiekybiniams IgG ir LF iš karvės pieno nustatymams taikytas daugiasluoksnis „sumuštinio“ tipo IFA (angl. *ELISA – double antibody sandwich enzyme linked immuno sorbent assay*) metodas.

Pieno mėginių paruošimas. Prieš IgG ir LF tyrimą pieno mėginiai apdorojami paruošiant išrūgas. Išrūgos išgaunamos centrifuguojant centrifuga (Sigma 3-18KS, Vokietija) 25 ml šviežio pieno 20 minučių 4 °C temperatūroje 3000 rpm sukimosi greičiu. Po centrifugavimo nuimamas mėgintuvėlyje susidaręs paviršinis pieno riebalų sluoksnis (tyrimui naudojamas liesas pienas) ir gautas liesas pienas užšaldytas –20 °C temperatūroje iki tyrimo (pagal Sobczuk-Szul et al., 2014 metodiką).

Mėginių analizė. Kiekybiniams IgG ir LF iš karvės pieno nustatymams taikyti imunofermentiniai testai (angl. *Quantitative Bovine IgG ELISA Test*

Kit ir *Quantitative Bovine Lactoferrin ELISA Kit*, Biopanda Reagents, Jungtinė Karalystė), skirti imunoglobulinui G ir laktoferinui nustatyti karvės krekenose, piene ir kituose biologiniuose skysčiuose. Tyrimas atliktas remiantis gamintojo protokolais.

2.5.1. ELISA testo procedūra

Prieš tyrimą paruošti lieso pieno mėginiai ir imunofermentinių testų rinkiniai 3–4 val. laikomi kambario temperatūroje +20 °C. Mėginiai praskiedžiami reagentų rinkinyje pateiktu bei prieš vartojimą paruošiamu mėginių ir standartų skiedikliu (mėginio praskiedimo buferiu) santykiais LF 1:1000 ir IgG 1:2000. Pagal gamintojo protokolą paruošiami tiriamo antimikrobinio baltymo standartai. Tyrimui paruošiant reagentų rinkinyje pateiktus koncentruotus IgG ir LF standartinius tirpalus, atitinkamas koncentruoto standartinio tirpalo kiekis skiedžiamas su 500 µl reagentų rinkinyje pateiktu standartinių tirpalų skiedikliu ir gerai sumaišoma maišykle. Skirtingas IgG ir LF koncentracijos standartinių tirpalų paruošimas pateikiamas 2.5.1.1 ir 2.5.1.2 lentelėse. Imunoglobulino G aptikimo riba piene – 0–800 ng/ml, laktoferino – 0–500 ng/ml.

2.5.1.1 lentelė. IgG skirtingos koncentracijos standartinių tirpalų paruošimas

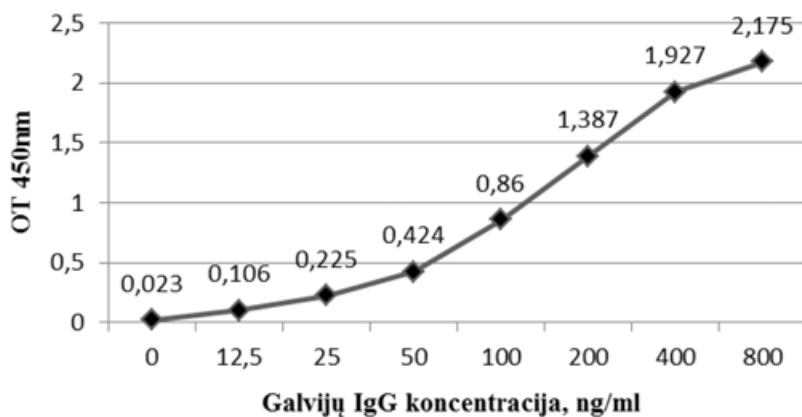
Standartai	Galvijų IgG koncentratas (ng/ml)	Galvijų IgG standarto kiekis	Standartinių tirpalų skiediklio kiekis
1	800	8 µl rinkinyje pateikto standarto koncentrato	992 µl
2	400	500 µl 1 standarto	500 µl
3	200	500 µl 2 standarto	500 µl
4	100	500 µl 3 standarto	500 µl
5	50	500 µl 4 standarto	500 µl
6	25	500 µl 5 standarto	500 µl
7	12,5	500 µl 6 standarto	500 µl
8	0	0 µl	500 µl

Tyrimo naudotos 96 šulinėlių mikroplokštelės, padengtos tiriamo AB antigeno. Į pirmuosius plokštelės šulinėlius pipete įlašinama (dviem pakartojimais) po 100 µl paruoštų standartinių tirpalų su skirtinga tiriamojo AB koncentracija. Į kitus testo mikroplokštelės šulinėlius pipete (dviem pakartojimais) įlašinama po 100 µl paruoštų pieno mėginių.

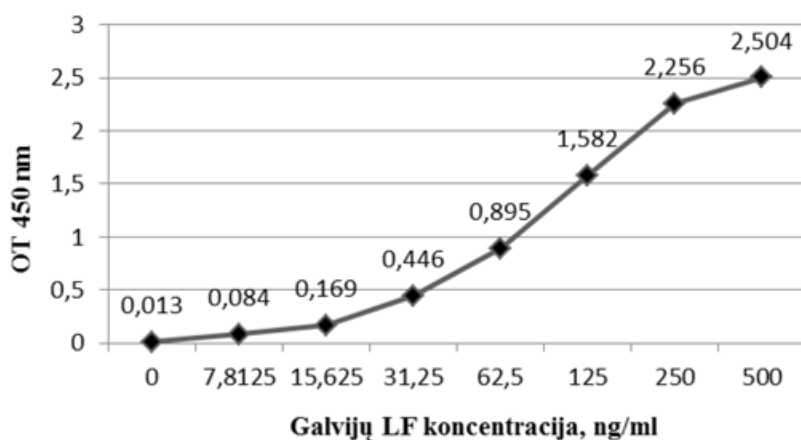
2.5.1.2 lentelė. LF skirtingos koncentracijos standartinių tirpalų paruošimas

Standartai	Galvijų LF koncentratas (ng/ml)	Galvijų LF standarto kiekis	Standartinių tirpalų skiediklio kiekis
1	500	10 µl rinkinyje pateikto standarto koncentrato	1990 µl
2	250	500 µl 1 standarto	500 µl
3	125	500 µl 2 standarto	500 µl
4	62,5	500 µl 3 standarto	500 µl
5	31,25	500 µl 4 standarto	500 µl
6	15,652	500 µl 5 standarto	500 µl
7	7,8125	500 µl 6 standarto	500 µl
8	0	0 µl	500 µl

Išdozavus standartinius tirpalus ir pieno mėginius, mikroplokštelės užklijuojamos sandaria apsaugine plėvele ir laikomos kambario temperatūroje 5 min. lėtai purtant purtykle (VDRL SHAKER, Principalmed). Vėliau inkubuojama 25 min. 37 °C temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos skystis iš mikroplokštelių išpilamas. Į kiekvieną šulinėlį pripilama po 250 µl buferinio plovimo tirpalo (pateikto reagentų rinkinyje) ir vėl išpilama. Plovimo procedūra pakartojama keturis kartus. Į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 µl krienų peroksidazės konjugato (angl. *HRP* – *horseradish peroxidase*) tirpalo pateikto reagentų rinkinyje (tiriamo AB antikūnai) ir vėl lėtai purtant purtykle laikoma 5 min. kambario temperatūroje. Vėliau inkubuojama 25 min. 37 °C temperatūroje tamsoje. Po to skystis išpilamas ir keturis kartus praplaunama buferiniu plovimo tirpalu. Į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 µl TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidinas) substrato pateikto reagentų rinkinyje. Sumaišoma ir inkubuojama 15 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos įpilama po 100 µl reakciją sustabdančio „STOP“ reagento, pateikto reagentų rinkinyje. Antikūnų kiekį mėginyje parodo reakcijos metu atsirandanti mėlyna spalva, kuri reakciją sustabdžius rūgštinti, tampa geltona. Gauti tyrimo rezultatai vertinami (ne vėliau kaip per 30 minučių po STOP reagento įpylimo) plokštelę įdėjus į spektrofotometrą. Išmatuojama kiekvieno plokštelės griovelio turinio šviesos absorbcija. Tyrimo rezultatai įvertinti automatinio spektrofotometru (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Suomija) matuojant tiriamojo mėginio optinį tankį (OT), kai bangos ilgis $\lambda = 450$ nm. Standartinė kreivė brėžiama kiekvienai plokštei atskirai. Standartinės kreivės ir jų parametrai pateikti 2.5.1.1 ir 2.5.1.2 paveiksluose.



2.5.1.1 pav. Galvijų IgG standartinė kreivė



2.5.1.2 pav. Galvijų LF standartinė kreivė

Rezultatai apskaičiuojami išmatavus standartinių tirpalų ir tiriamųjų mėginių absorbcijos vertes, kurios suvedamos į RIDAVIN.EXE programą, atliekama regresinė analizė ir pagal standartinę semilogaritminę kreivę apskaičiuojama tiriamųjų AB koncentracija mėginiuose (mg/ml).

2.6. Chromatografinės analizės metodika

Kiekybiniams alfa-LA, beta-LG ir GSA karvės piene įvertinimams taikytas atvirkštinės fazės efektyviosios skysčių chromatografijos metodas (angl. *RPHPLC – reverse phase high performance liquid chromatography*).

Pieno mėginių paruošimas. Į stiklinę įpilama 25 ml žalio nekonservuoto karvės pieno. Kazeinai išsodinami parūgštinant pieno mėginį iki pH 4,6 su 2M druskos rūgštimi ir 15 minučių palaikant kambario temperatūroje. Susidariusios nuosėdos atskiriamos centrifuguojant $3000 \times g$ 20 minučių. Po centrifugavimo 10 ml supernatanto skiedžiama 1M NaCl iki 50 ml. Po 30 min. mėginiai filtruojami per $0,2 \mu m$ vienkartinus švirkštinius filtrus, kurių diametras – 25 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Vokietija) ir 20 μl supilama į chromatografinius buteliukus, kurie laikomi šaldytuve $4-6^{\circ}C$ temperatūroje, kol bus atliekama analizė (pagal Romero et al., 1996 ir Brodziak et al., 2012 metodikas).

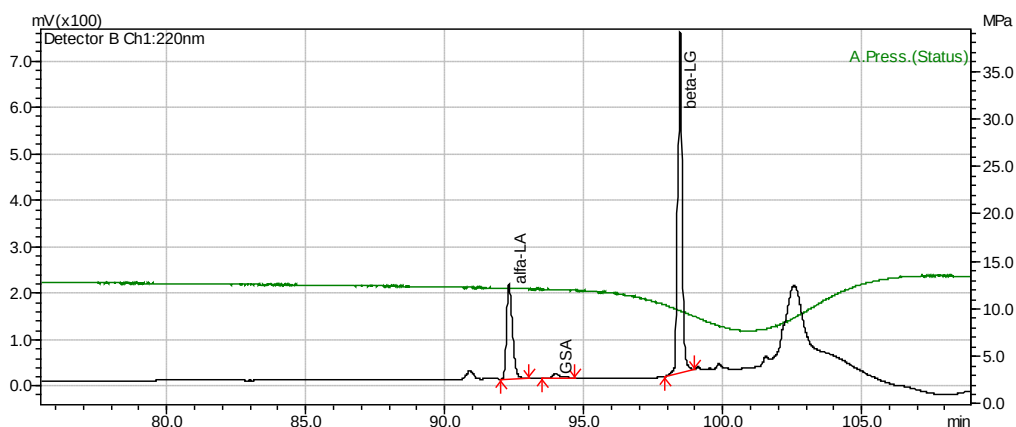
2.6.1. Chromatografijos įranga ir sąlygos

Kiekybinei ir kokybinei alfa-LA, beta-LG ir GSA analizei buvo naudota žemo slėgio gradiento skysčių chromatografinė sistema, sudaryta iš siurblių bloko LC-10ATvp, automatinio mėginių paėmimo modulio SIL-10ADvp, kolonėlės temperatūrą kontroliuojančio modulio CTO-10ACvp, UV-Vis detektoriaus SPD-10AVvp bei sistemos funkcionavimą kontroliuojančio modulio SCL-10Avp (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonija). Tyrimų duomenų kaupimui ir įvertinimui naudota LC Solution programinė įranga (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonija).

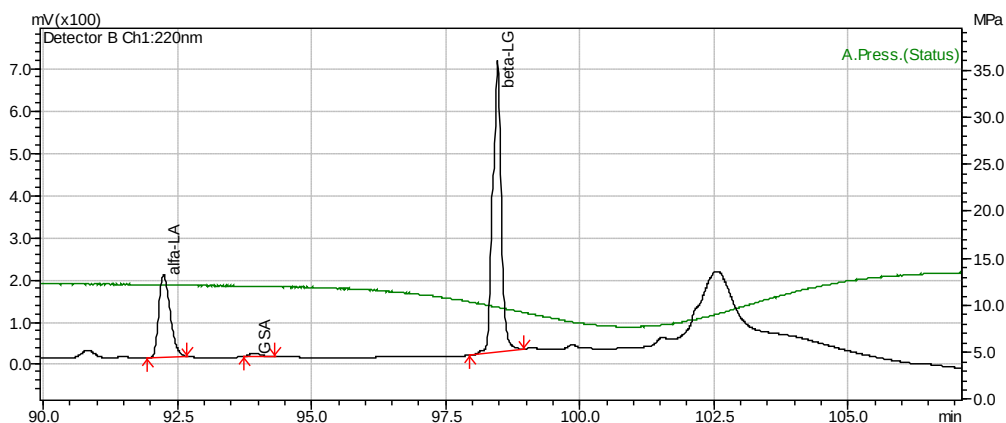
Alfa-LA, beta-LG ir GSA atskyrimas atliktas Nucleosil 300-5 C18, $250 \times 4,6$ mm chromatografinė kolonėle (Macherey-Nagel, Duren, Vokietija) naudojant to paties gamintojo Nucleosil 300-5 C18 prieškolonius. Atskyrimui naudotas dvikomponenčio gradiento režimas (Eliuentas A: 0,1 proc. TFA tirpalas vandenyje, Eliuentas B: 0,1 proc. TFA tirpalas acetonitrile): 0–80 min. linijinis gradientas (A:B) 90:10 – 60:40, 90 min. 55:45, 95 min. 10:90, 100 min. 90:10, 115 min. 90:10. Kolonėlės temperatūra $25^{\circ}C$, mobiliosios fazės debitas (tėkmės greitis) 1,0 ml/min., injekcijos tūris – 20 μl . Alfa-LA, beta-LG ir GSA identifikuojami ir kiekybiškai įvertinami matuojant 220 nm ilgio bangoje. Alfa-LA, beta-LG ir GSA kiekybiškai įvertinti atvirkštinės fazės efektyviosios skysčių chromatografijos būdu, palyginti etaloninių medžiagų su ekstrakte esančių junginių smailių plotais. Kalibracinių kreivių parametrai ir smailės chromatogramose pateiktos 2.6.1.1 lentelėje, 2.6.1.1 ir 2.6.1.2 paveiksluose.

2.6.1.1 lentelė. Kalibracinių kreivių parametrai

Parametrai	alfa- LA	beta-LG	GSA
Tiesės lygtis	$y = 132129x + 2088,10$	$y = 129177x + 337,24$	$y = 50801x - 664,97$
Koreliacijos koeficientas (R^2)	0,9997	0,9975	0,9996
Kalibracinė kreivė bręsta koncentracijų (mg/ml) intervale	0,300-1,500	0,241-1,207	0,030-0,253
Analičių sulaikymo trukmė (t_R , min)	92,31	98,47	93,99



2.6.1.1 pav. Kalibracinio tirpalo chromatograma



2.6.1.2 pav. Charakteringa alfa-LA ($t_R = 92,31$), GSA ($t_R = 93,99$) ir beta-LG ($t_R = 98,47$) chromatograma

Cheminės medžiagos ir tirpalų paruošimas. Naudoti analitinio švarumo elientai. Gradientinio švarumo acetonitrilas (ACN) (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Šveicarija), 99,8 proc. trifluoracto rūgštis (TFA) (Riedel-de-Haen, Vokietija). Išgrynintas dejonizuotas vanduo ($18,2 \text{ m}\Omega\text{cm}^{-1}$), ruošiamas vandens valymo sistema (Millipore, JAV). Prieš naudojimą elientai degazuojami.

Etaloniai tirpalai ruošiami iš efektyviosios skysčių chromatografijos grynumo standartinių junginių: alfa-laktalbuminas – iš galvijų pieno (angl. *α -lactalbumin*) 85 proc. grynumo; beta-laktoglobulinas – iš galvijų pieno (angl. *β -lactoglobulin*) 90 proc. grynumo ir galvijų serumo albuminas (angl. *Bovine Serum Albumin*) – 98 proc. grynumo (Sigma – Aldrich GmbH, Vokietija).

2.7. Duomenų grupavimo statistinei analizei metodika

Statistinei analizei atlikti tyrimų duomenys buvo sugrupuoti vadovaujantis šiais kriterijais:

- tešmens ketvirčių sveikumu (TKS) pagal SLS piene ir mikrobiologinės analizės (MBA) rezultatus;
- tešmens ketvirčių sveikumu pagal nustatytą SLS piene;
- laktacijų skaičiumi;
- laktacijos tarpsniu;
- sezonais.

Vertinant karvių tešmens ketvirčių sveikumą pagal SLS piene ir mikrobiologinę analizę (MBA), tyrimų duomenys suskirstyti į keturias grupes: AM grupė – aplinkos mikroorganizmų sukeltas mastitas; NM grupė – nespecifinis arba aseptinis mastitas; SM grupė – slapas arba subklinikinis mastitas; SK grupė – sveiki tešmens ketvirčiai. Mėginiai iš grupių AM, NM bei SM priskirti mastitu sergantiems ketvirčiams, o iš SK grupės – sveikiems ketvirčiams (2.7.1 lentelė).

2.7.1 lentelė. *Tešmens ketvirčių sveikumo vertinimas pagal SLS ir MBA (grupavimo metodika pagal Chaneton ir kt., 2013)*

Grupė	Specifikacija	Patogeninių mikroorganizmų išskyrimas	SLS (tūkst./ml)	Ketvirčių sveikumas
AM	Aplinkos mastitas	+	< 200	sergantys
NM	Nespecifinis mastitas	–	≥ 200	sergantys
SM	Subklinikinis mastitas	+	> 200	sergantys
SK	Sveikieji ketvirčiai	–	< 200	sveiki

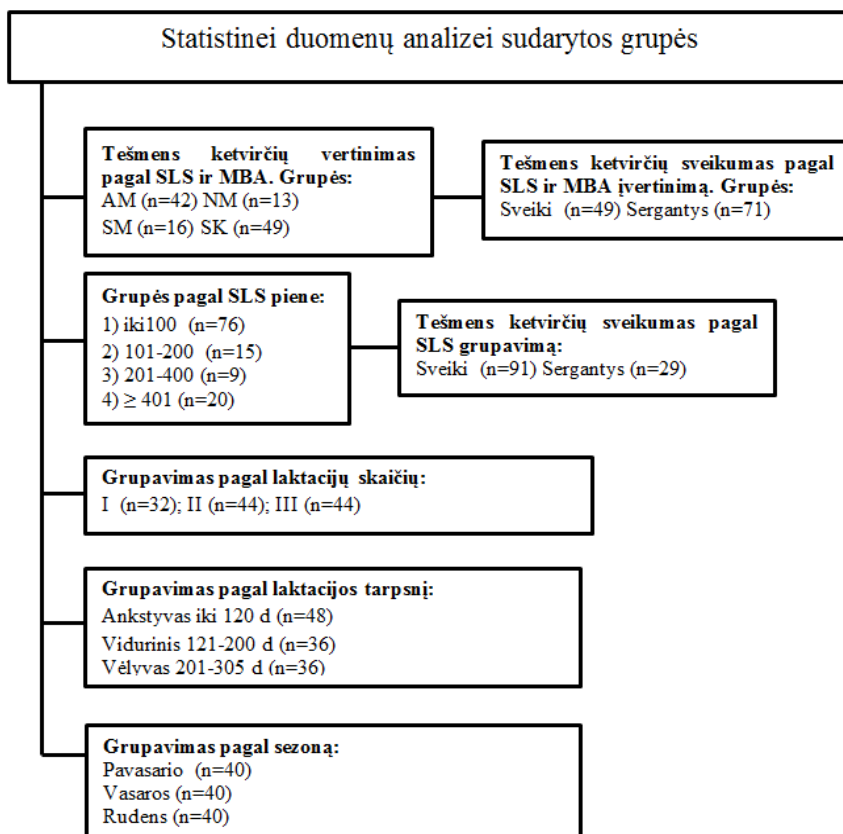
(+/-) buvimas/nebuvimas patogeninių mikroorganizmų pieno mėginyje.

Vertinant karvių tešmens ketvirčių sveikumą pagal nustatytą SLS pieno mėginiuose duomenys suskirstyti į keturias grupes. Pieno mėginiai iš pirmos ir antros grupės priskiriami sveikiems tešmens ketvirčiams, o iš trečios ir ketvirtos grupės – sergantiems tešmens uždegimu (2.7.2 lentelė).

2.7.2 lentelė. Tešmens ketvirčių sveikumo vertinimas ir suskirstymas pagal SLS piene

Grupė	SLS (tūkst./ml)	Ketvirčių sveikumas
1	iki 100	sveiki
2	Nuo 101 iki 200	sveiki
3	Nuo 201 iki 400	sergantys
4	Daugiau kaip 401	sergantys

Norėdami nustatyti kitų faktorių, t. y. laktacijų skaičiaus, laktacijos tarpinio bei sezono įtaką antimikrobinių baltymų kiekių kitimui piene, duomenis suskirstėme į grupes pagal analizuojamą faktorių (2.7.1 pav.).



2.7.1 pav. Duomenų grupavimo schema

2.7.1. Statistinė duomenų analizė

Tyrimų duomenų analizei panaudota Microsoft Excel 2010 skaičiuoklė ir SPSS (versija 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL) statistinis paketas. Karvės pieno antimikrobinių baltymų kiekiams ir SLS apskaičiuoti aprašomosios statistikos (angl. *descriptive statistics*) rodikliai: imties dydis (n), aritmetiniai vidurkiai (angl. *mean*), vidurkio standartinė paklaida (angl. *standard error of mean*, *SEM*), tarpusavio ryšiai pagal Pirsono (angl. *Pearson*) tiesinės koreliacijos koeficientus (r_p) bei jų statistinis reikšmingumas (p) (Juozaitienė ir Anskienė, 2014).

Kiekvieno veiksnio, grupių (AM, NM, SM, SK) pagal SLS ir MBA vertinimą (SLS/MBA), tešmens ketvirčių sveikumo (sveiki, sergantys) pagal SLS ir MBA grupes (TKS-SLS/MBA), grupių (1, 2, 3, 4) pagal SLS piene (SLS), tešmens ketvirčių sveikumo (sveiki, sergantys) pagal SLS grupes (TKS-SLS), laktacijų skaičiaus (LS), laktacijos tarpsnių (LT), sezonų (S), įtaka analizuojamiems rodikliams (LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA) įvertinta taikant vienfaktorinės analizės metodą (angl. *One-way ANOVA*). Reikšmingumas tarp vertinamų grupių vidurkių nustatytas *Fisher LSD* testu. Skirtumai laikyti patikimais, kai $p < 0,05$.

Daugiafaktorinės analizės būdu pagal tiesinį mišrų modelį (angl. *Mixed linear model analysis Anova*) apskaičiuota atskirų bei grupuotų veiksnių įtaka tirtų antimikrobinių baltymų pasiskirstymui piene. Vertinant minėtųjų veiksnių įtaką kiekvienam analizuojamam antimikrobiniam baltymui sudaryti keturi linijiniai modeliai:

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{SLS/MBA}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + \text{S}_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{TKS-SLS/MBA}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + \text{S}_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{SLS}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + \text{S}_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{TKS-SLS}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + \text{S}_k + e_{ijklkn}$$

Kur: Y – antimikrobinis baltymas, μ – tiriamojo antimikrobinio baltymo vidurkis, SLS/MBA_i – tešmens ketvirčiai pagal SLS ir MBA įvertinimą ($i = \text{AM, NM, SM, SK}$), TKS-SLS/MBA_i – tešmens ketvirčių sveikumas pagal SLS ir MBA įvertinimą ($i = \text{sveiki, sergantys}$), SLS_i – somatinių ląstelių skaičius piene ($i = 1, 2, 3, 4$), TKS-SLS_i – tešmens ketvirčių sveikumas pagal SLS įvertinimą ($i = \text{sveiki, sergantys}$), LS_j – laktacijų skaičius ($j = \text{I, II, III}$), LT_l – laktacijos tarpsniai ($l = \text{ankstyvas, vidutinis, vėlyvas}$), S_k – sezonai ($k = \text{pavasaris, vasara, ruduo}$), e_{ijklkn} – likutinė paklaida.

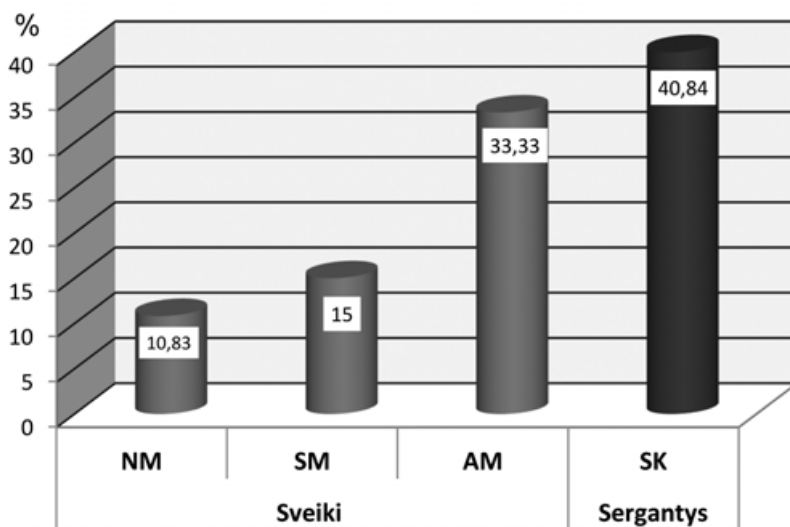
3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Antimikrobinų baltymų koncentracijų pasiskirstymas piene pagal tešmens ketvirčių sveikumą

Tešmens ketvirčių sveikumas pagal pasirinktus vertinimo kriterijus pasiskirstė nevienodai. Pagal SLS ir MBA įvertinimą nustatyta, kad sergančių mastitais tešmens ketvirčių buvo 18,32 proc. daugiau nei sveikų tešmens ketvirčių, o vertinant atskirai tik pagal SLS piene – sveikų ketvirčių buvo tis kartus daugiau nei sergančiųjų.

3.1.1. Antimikrobinų baltymų koncentracijų pasiskirstymas piene pagal somatinių ląstelių skaičiaus ir mikrobiologinės analizės įvertinimą

Įvertinus tešmens ketvirčių sveikumą pagal SLS ir MBA rezultatus, iš visų tirtųjų mėginių nustatyta 41 proc. (n = 49) sveikų ketvirčių, o iš sergančių mastitais – 33 proc. (n = 42) atvejų priskirti aplinkos mikroorganizmų sukeltam mastitui, 15 proc. (n = 16) – subklinikiniam mastitui ir 11 proc. (n = 13) – nespecifiniam mastitui (3.1.1.1 pav.).



3.1.1.1 pav. Tešmens ketvirčių pasiskirstymas pagal SLS ir MBA įvertinimą

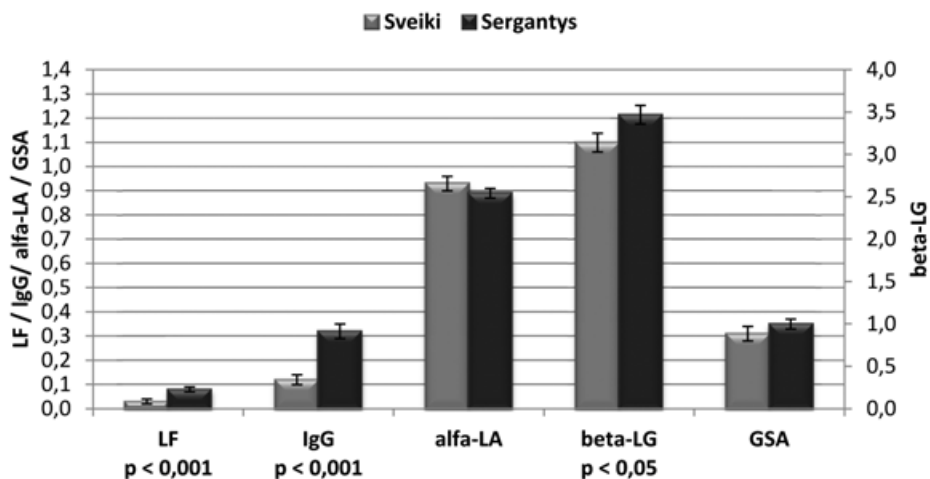
NM – nespecifinis mastitas; SM – subklinikinis mastitas; AM – aplinkos mastitas;
SK – sveiki ketvirčiai.

Įvertinus antimikrobinių baltymų pasiskirstymą sveikuose ir mastitu sergančiuose tešmens ketvirčiuose nustatyta, kad LF ir IgG koncentracijos sergančiuose ketvirčiuose buvo vidutiniškai 46 proc., o beta-LG bei GSA koncentracijos atitinkamai 4 proc. ir 6 proc. didesnės nei sveikuose ketvirčiuose. Tačiau alfa-LA kiekis 2 proc. buvo didesnis sveikuose ketvirčiuose. Kaip pateikta 3.1.1.1 lentelėje ir 3.1.1.2 paveiksle statistiškai reikšmingi skirtumai tarp antimikrobinių baltymų vidurkių sveikuose ir sergančiuose ketvirčiuose nustatyti LF ($p < 0,001$), IgG ($p < 0,001$) ir beta-LG ($p < 0,05$).

3.1.1.1 lentelė. Antimikrobinių baltymų vidurkiai (mg/ml) sveikuose ir mastitu sergančiuose tešmens ketvirčiuose

Ketvirčiai	n	LF	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Sveiki	49	0,03±0,01***	0,12±0,02***	0,93±0,03	3,14±0,11*	0,31±0,03
Sergantys	71	0,08±0,01	0,32±0,03	0,89±0,02	3,47±0,11	0,35±0,02

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.



3.1.1.2 pav. Antimikrobinių baltymų koncentracijos (mean ± SEM) sveikuose ir sergančiuose tešmens ketvirčiuose pagal SLS ir MBA įvertinimą

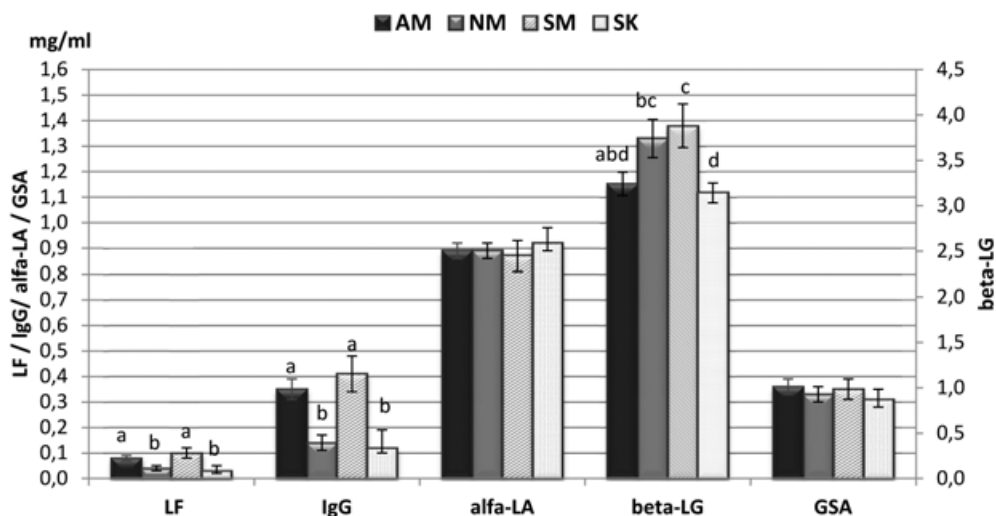
Pagal SLS ir MBA įvertinimą ir ketvirčių suskirstymą į grupes LF ir IgG koncentracijos subklinikinio mastitu sergančiuose ketvirčiuose buvo vidutiniškai 54 proc., o beta-LG – vidutiniškai 10 proc. didesnės nei sveikuose ketvirčiuose. GSA daugiausia rasta tešmens ketvirčiuose, kuriuose nustatytas aplinkos mikroorganizmų sukeltas mastitas, o alfa-LA – sveikuose ketvirčiuose. Palyginti antimikrobinių baltymų reikšmių vidurkiai tarp grupių,

sudarytų pagal SLS ir MB analizę, LF, IgG ir beta-LG skirtumai skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) (3.1.1.2 lentelė ir 3.1.1.3 pav.).

3.1.1.2 lentelė. Antimikrobinių baltymų vidurkių (mg/ml) pasiskirstymas SLS ir MBA vertinimo grupėse

Grupės	n	LF		IgG		Alfa-LA	Beta-LG		GSA
AM	42	0,08±0,01	a	0,35±0,04	a	0,89±0,03	3,24±0,13	abd	0,36±0,03
NM	13	0,04±0,01	b	0,14±0,03	b	0,89±0,03	3,74±0,21	bc	0,33±0,03
SM	16	0,10±0,02	a	0,41±0,07	a	0,87±0,06	3,88±0,24	c	0,35±0,04
SK	49	0,03±0,01	b	0,12±0,02	b	0,92±0,03	3,14±0,11	d	0,31±0,03

AM – aplinkos mastitas; NM – nespecifinis mastitas; SM – subklinikinis mastitas; SK – sveiki ketvirčiai. a,b,c,d – raidėmis stulpeliuose pažymėti antimikrobinių baltymų vidurkiai tarpusavyje skyrėsi statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

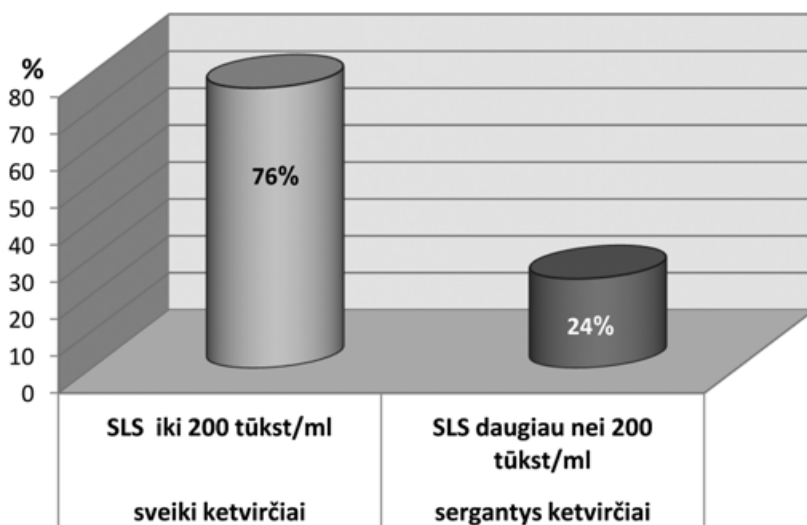


3.1.1.3 pav. Antimikrobinių baltymų koncentracijos (mean ± SEM) SLS ir MBA grupėse

AM – aplinkos mastitas; NM – nespecifinis mastitas; SM – subklinikinis mastitas; SK – sveiki ketvirčiai. a, b, c, d stulpeliuose pažymėti antimikrobinių baltymų vidurkiai tarpusavyje skyrėsi statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

3.1.2. Antimikrobinių baltymų koncentracijų pasiskirstymas pagal SLS piene

Duomenis suskirsčius į grupes pagal SLS piene ir įvertinus tešmens ketvirčių sveikumą, nustatyta 75,83 proc. sveikų ir 24,17 proc. sergančių ketvirčių (3.1.2.1 pav.). Atliktų tyrimų rezultatai (3.1.2.1 lentelė ir 3.1.2.2 pav.) parodė, kad LF, IgG, beta-LG ir GSA koncentracijos sergančiuose tešmens ketvirčiuose (SLS nuo $201 \geq 401$ tūkst./ml) buvo aukštesnės – atitinkamai 2 proc., 8 proc., 4 proc. ir 2 proc., nei sveikuose tešmens ketvirčiuose (SLS iki 200 tūkst/ml). Tik alfa-LA sveikuose tešmens ketvirčiuose nustatyta 6 proc. daugiau nei sergančiuose ir skirtumas tarp sveikų ir sergančių ketvirčių statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$).

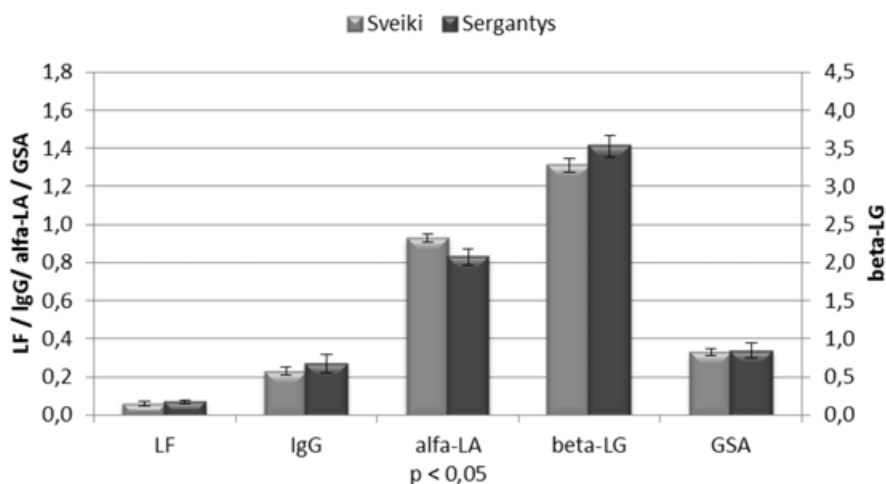


3.1.2.1 pav. Tešmens ketvirčių pasiskirstymas pagal SLS piene

3.1.2.1 lentelė. Antimikrobinių baltymų vidurkių (mg/ml) pasiskirstymas sveikuose ir sergančiuose tešmens ketvirčiuose pagal SLS įvertinimą

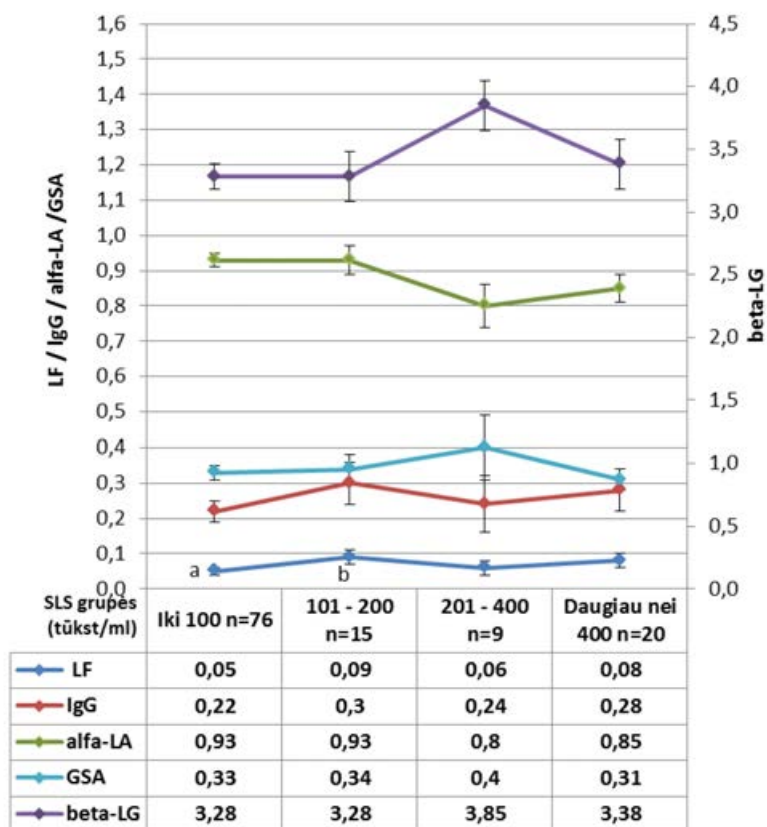
Ketvirčiai	n	LF	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Sveiki	91	0,06±0,01	0,23±0,02	0,93±0,02*	3,28±0,09	0,33±0,02
Sergantys	29	0,07±0,01	0,27±0,05	0,83±0,04	3,53±0,14	0,34±0,04

* $p < 0,05$.



3.1.2.2 pav. Antimikrobinių baltymų koncentracijos (mean ± SEM) sveikuose ir sergančiuose tešmens ketvirčiuose pagal SLS įvertinimą

Kaip matyti 3.1.2.3 paveiksle, antimikrobinių baltymų vidurkiai pagal SLS grupes pasiskirstė nevienodai. Nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) skirtumas tarp mažiausių (pirmoje grupėje) ir didžiausių (antroje grupėje) LF koncentracijų. IgG vidurkių pasiskirstymas tarp grupių buvo panašus kaip ir LF, tačiau statistiškai nepatikimas ($p > 0,05$). Sergančiųjų ketvirčių trečioje grupėje beta-LG ir GSA koncentracijos buvo didžiausios ir nuo pirmos bei antros grupės skyrėsi – atitinkamai 0,57 mg/ml, 0,57 mg/ml, 0,07 mg/ml ir 0,06 mg/l, o nuo ketvirtos grupės – atitinkamai 0,47 mg/ml ir 0,09 mg/ml. Alfa-LA kiekiai pirmoje ir antroje grupėse nesiskyrė ir buvo didesni nei sergančiųjų ketvirčių trečioje ir ketvirtoje grupėse atitinkamai 0,13 mg/ml ir 0,08 mg/ml.



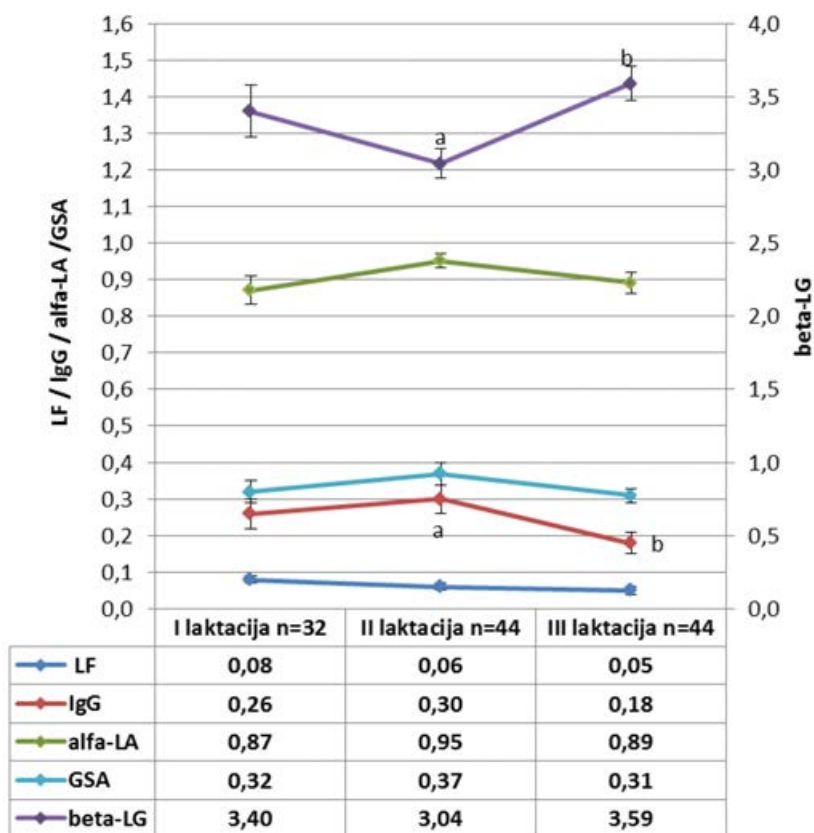
3.1.2.3 pav. Antimikrobinių baltymų pasiskirstymas (mean ± SEM)
SLS grupėse

a, b – raidėmis stulpeliuose pažymėti vidurkiai skyrėsi tarpusavyje statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

3.2. Laktacijų tarpsnių bei skaičiaus įtakos antimikrobinių baltymų koncentracijos kaitai piene tyrimų rezultatai

Atsižvelgdami į tai, kad natūralių antimikrobinių baltymų kiekis nėra pastovus ir kinta priklausomai nuo įvairių veiksnių, ištyrėme karvių laktacijų skaičiaus ir tarpsnių įtaką šių baltymų kiekiams piene.

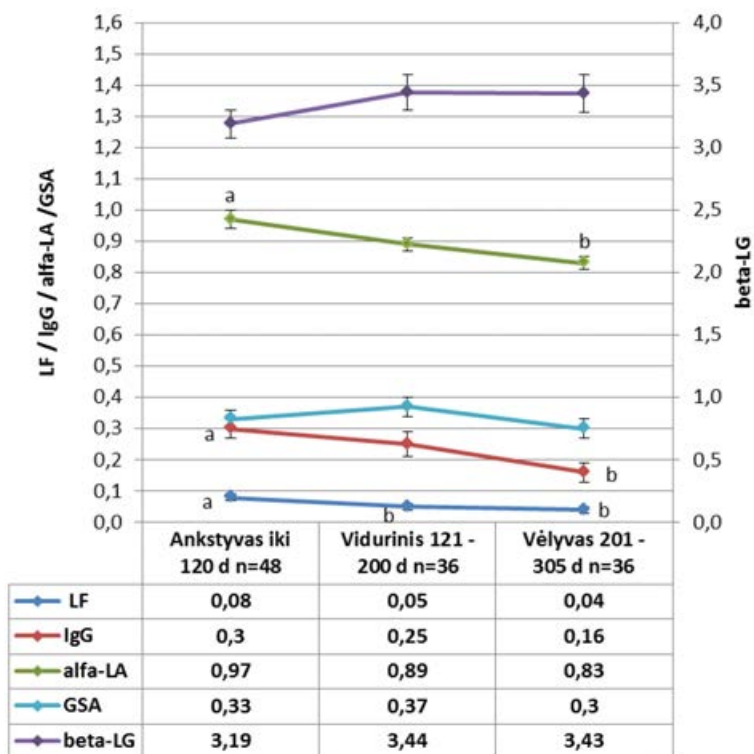
Įvertinę karvės amžiaus, tai yra laktacijos, įtaką tiriamųjų baltymų pasiskirstymui piene (3.2.1 pav.) nustatėme, kad antros laktacijos metu IgG, alfa-LA ir GSA kiekiai buvo didesni nei pirmoje ar trečioje laktacijoje. Pirmaveršių karvių piene nustatyta didžiausia LF koncentracija, o beta-LG koncentracijos pikas pasiekė trečios laktacijos metu. Vidurkių skirtumai tarp antros ir trečios laktacijų grupių buvo statistiškai reikšmingi ir skyrėsi 25 proc. IgG ($p < 0,05$) ir 8 proc. beta-LG ($p < 0,01$).



3.2.1 pav. Antimikrobinų baltymų kitimas (mean ± SEM) piene skirtingų laktacijų metu

a, b – raidėmis pažymėti atskirų baltymų vidurkiai skyrėsi tarpusavyje statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

Įvertinus laktacijos tarpsnio įtaką (3.2.2 pav.) nustatyta, kad ankstyvajame laktacijos tarpsnyje padaugėja LF, IgG bei alfa-LA kiekiai. Vėliau, laktacijai įpusėjus, didžiausios koncentracijos nustatytos beta-LG ir GSA. Palyginti su ankstyvuoju laktacijos tarpsniu prieš užtrūkimą, LF, IgG, alfa-LA bei GSA kiekiai sumažėja – atitinkamai 34 proc., 30 proc., 8 proc. bei 4 proc. IgG ($p < 0,01$) ir alfa-LA ($p < 0,001$) vidurkių skirtumai tarp ankstyvojo ir vėlyvojo laktacijos tarpsnių, o LF – tarp ankstyvojo ir viduriniojo ($p < 0,05$) bei ankstyvojo ir vėlyvojo ($p < 0,01$) laktacijos tarpsnių, buvo statistiškai reikšmingi.

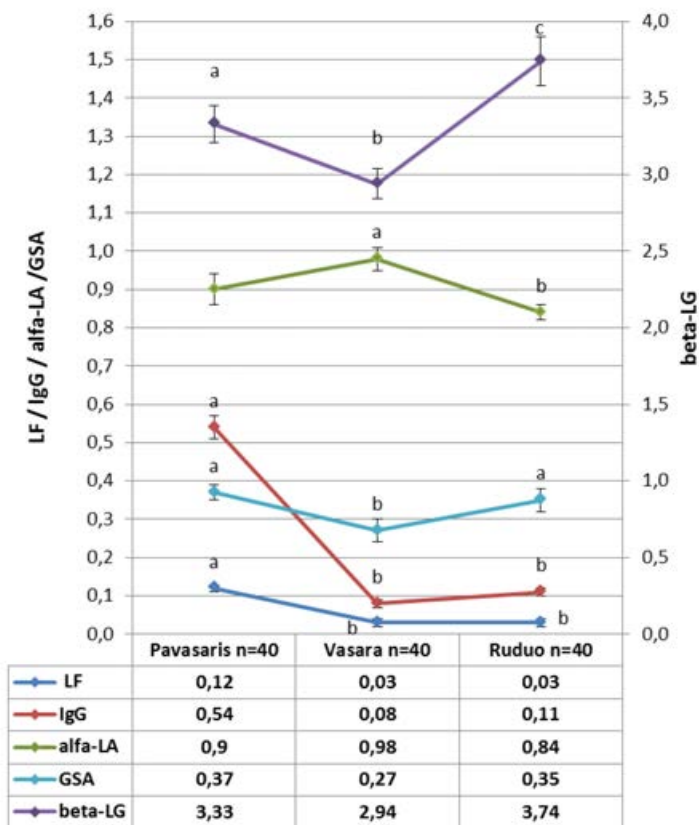


3.2.2 pav. Antimikrobinių baltymų kitimas (mean ± SEM) piene skirtingais laktacijos tarpsniais

a, b – raidėmis pažymėti atskirų baltymų vidurkiai skyrėsi tarpusavyje statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

3.3. Sezonų įtakos antimikrobinių baltymų koncentracijos kaitai piene tyrimo rezultatai

Išvertinus sezono įtaką antimikrobinių baltymų pasiskirstymui piene (3.3.1 pav.), nustatyta, kad LF, IgG ir GSA didžiausios koncentracijos buvo pavasario, alfa-LA – vasaros, o beta-LG – rudens sezonų metu. LF koncentracija vasaros ir rudens sezonų metu nekito ir buvo 60 proc. mažesnė nei pavasario metu. Vasaros metu IgG, beta-LG ir GSA koncentracijos buvo mažiausios, palyginti su kitais sezonais. Tik alfa-LA koncentracijos kiekis vasaros laikotarpiu buvo didžiausias ir nuo pavasario bei rudens sezonų skyrėsi – atitinkamai 4 proc. ir 8 proc. Statistiškai reikšmingi vidurkių skirtumai rasti LF ir IgG tarp pavasario ir vasaros ($p < 0,001$), pavasario ir rudens ($p < 0,001$), alfa-LA vasaros ir rudens ($p < 0,001$), beta-LG pavasario ir vasaros ($p < 0,05$), pavasario ir rudens ($p < 0,05$), vasaros ir rudens ($p < 0,001$) ir GSA pavasario ir vasaros ($p < 0,05$), vasaros ir rudens ($p < 0,05$) sezonų grupių.



3.3.1 pav. Antimikrobinių baltymų kitimas (mean ± SEM) piene skirtingų sezonų metu
a, b, c – raidėmis pažymėti atskirų baltymų vidurkiai skyrėsi tarpusavyje statistiškai reikšmingai $p < 0,05$.

3.4. Tirtųjų veiksnių įtakos antimikrobinių baltymų kiekiui piene įvertinimas

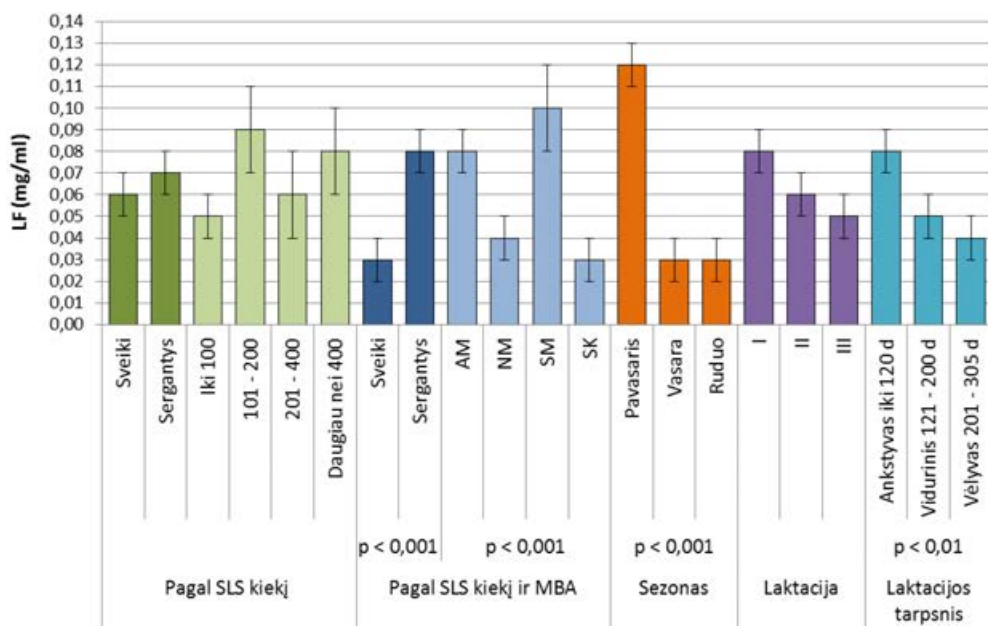
Vienfaktorinės disperinės analizės būdu buvo įvertinta SLS, tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS ir MBA vertinimą, bei pagal SLS grupių suskirstymą), laktacijų skaičiaus, laktacijos tarpų bei sezonų įtaka tiriamiesiems rodikliams (LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA).

Kaip matome iš 3.4.1–3.4.3 paveikslų, veiksnių SLS ir MBA grupių (AM, NM, SM, SK), bei tešmens ketvirčių sveikumo (sveiki, sergantys) pagal SLS ir MBA įvertinimą, įtaka labiausiai išreikšta LF ($p < 0,001$), IgG ($p < 0,001$), bei beta-LG, kur veiksnio SLS ir MBA grupės statistinis reikšmingumas – $p <$

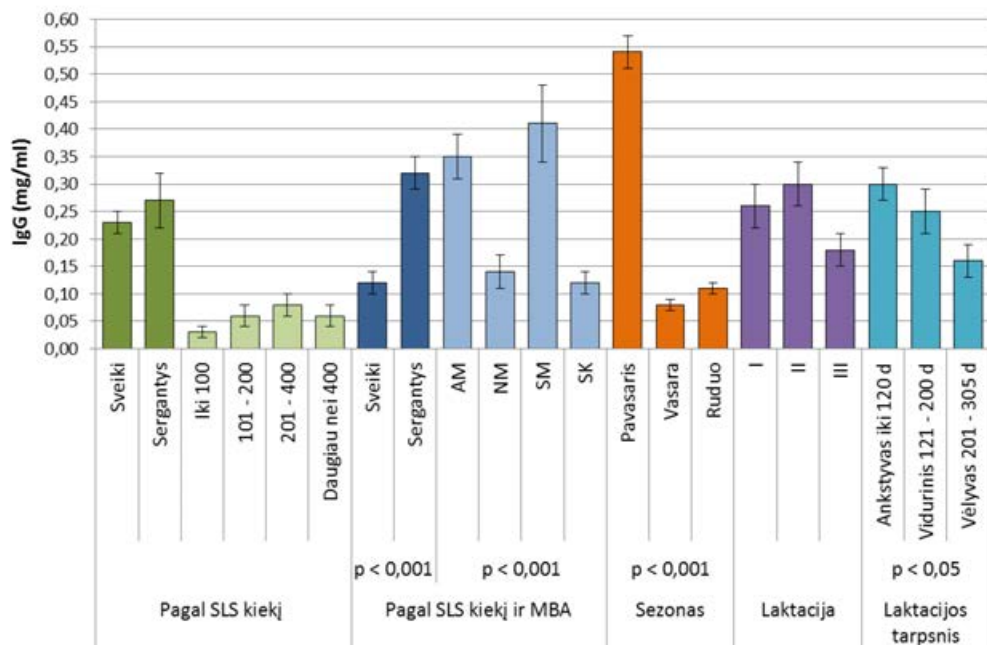
0,01, o veiksnio tešmens ketvirčių sveikumas pagal SLS ir MBA įtaka mažesnė – $p < 0,05$.

Tešmens ketvirčių sveikumas pagal SLS grupes (1, 2, 3, 4), statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) darė įtaką alfa-LA kiekiui, kai veiksnio įtakos koeficientas sudarė 4,3 proc. (3.4.2 pav.). Laktacijų skaičius reikšmingai ($p < 0,01$) darė įtaką beta-LG vidurkiui, kai veiksnio įtakos koeficientas sudarė 7,7 proc. (3.4.4 pav.). Laktacijos tarpinių statistiškai reikšminga įtaka nustatyta LF ($p < 0,01$), IgG ($p < 0,05$) bei alfa-LA ($p < 0,01$), kai veiksnio įtakos koeficientai sudarė – atitinkamai 8,5 proc., 6,1 proc. bei 9,1 proc. (3.4.1, 3.4.2 ir 3.4.3 pav.).

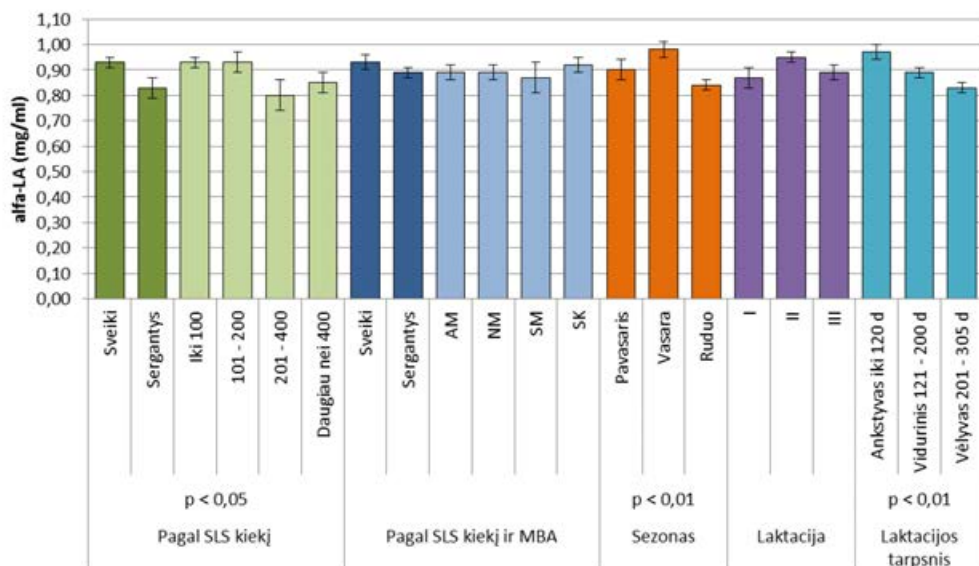
Visiems tirtiesiems rodikliams labiausiai turėjo įtakos metų laikai. Sezonai statistiškai reikšmingai turėjo įtakos LF, IgG ir beta-LG ($p < 0,001$), alfa-LA ($p < 0,01$) ir GSA ($p < 0,05$) kiekiams, kai veiksnio įtakos koeficientai daugiausia procentų sudarė LF (46,5 proc.) ir IgG (79,6 proc.) rodikliams (3.4.1, 3.4.2, 3.4.5 pav.).



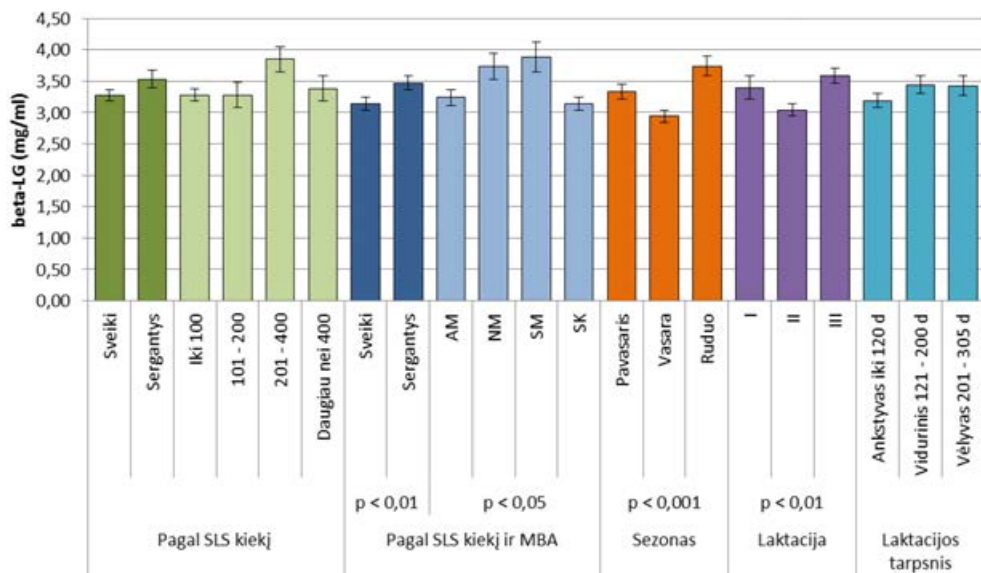
3.4.1 pav. Tirtųjų veiksmų įtaka LF kiekiui piene



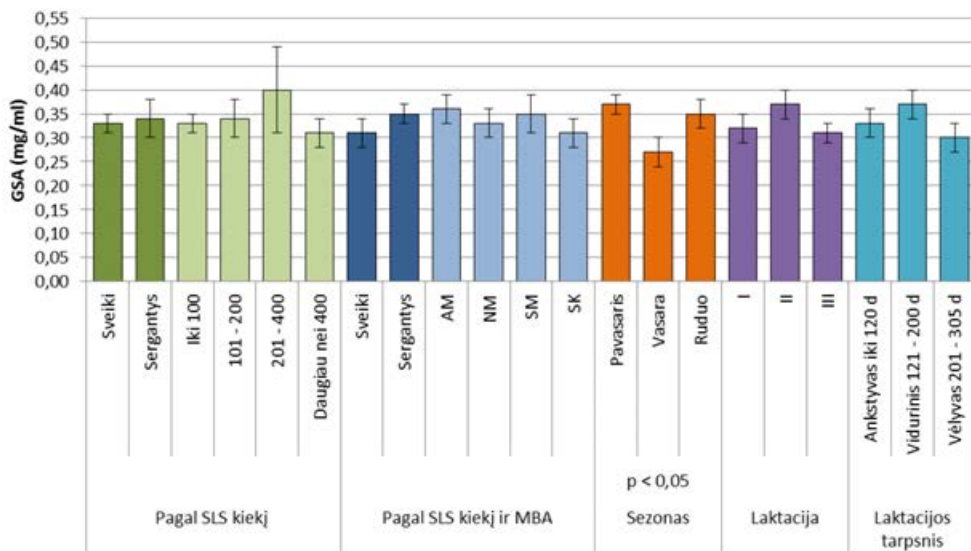
3.4.2 pav. Tirtųjų veiksmų įtaka IgG kiekiui piene



3.4.3 pav. Tirtųjų veiksmų įtaka alfa-LA kiekiui piene



3.4.4 pav. Tirtųjų veiksnių įtaka beta-LG kiekiui piene



3.4.5 pav. Tirtųjų veiksnių įtaka GSA kiekiui piene

Vertinant tirtųjų veiksnių sąveikos įtaką (3.4.1 lentelė) analizuojamiems rodikliams (LF, IgG, alfa-LA, beta-LG ir GSA), pagal dispersinės analizės tiesinį mišrų modelį nustatyta, kad sumažėjo laktacijos tarpsnio įtaka ($p > 0,05$), bet išryškėjo statistiškai reikšminga SLS įtaka LF (5,2 proc.,

$p < 0,001$) ir IgG (1,6 proc., $p < 0,05$). Išsiskyrė antra SLS grupė (100–200 tūkst./ml), kurioje LF buvo 80,6 proc. daugiau nei pirmoje grupėje (SLS iki 100 tūkst./ml) ($p < 0,05$). Daugiafaktorinės analizės modelis $IgG_{ijklkn} = \mu + TKS-SLS_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 85,6$ proc.) išryškino biologinių veiksnių – tešmens ketvirčių sveikumo, pagal SLS grupes x laktacijos skaičiaus jungtinės sąveikos, bei tešmens ketvirčių sveikumo, pagal SLS grupes x laktacijos tarpsnio sąveikos, įtakas IgG – atitinkamai 1,3 proc., $p < 0,05$ ir 1,1 proc., $p < 0,05$. Antros laktacijos ketvirčių piene IgG buvo 61,1 proc. daugiau nei pirmos laktacijos ($p < 0,05$) ketvirčių piene. Šio modelio analizė parodė, kad ankstyvuojų laktacijos tarpsniu IgG buvo 37,67 proc. daugiau nei viduriniuojų ir 50,25 proc. daugiau nei vėlyvuojų ($p < 0,05$) laktacijos tarpsniu. Daugiafaktorinės analizės linijiniu modeliu $LF_{ijklkn} = \mu + TKS-SLS/MBA_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 69,8$ proc.) nustatyta biologinių veiksnių – tešmens ketvirčių sveikumo, pagal SLS ir MBA x laktacijų skaičiaus jungtinės sąveikos, statistiškai reikšminga įtaka LF (3,2 proc., $p < 0,05$). Stebimi skirtingų krypčių LF vidurkių skirtumai, palyginti su SLS ir MBA grupėmis skirtingais laktacijos tarpsniais. Biologinių ir aplinkos veiksnių, tešmens ketvirčių sveikumas pagal SLS ir MBA x sezonas jungtinės sąveikos įtaka buvo statistiškai reikšminga LF (3,0 proc., $p < 0,05$) ir alfa-LA (5,4 proc., $p < 0,05$). Pavasarį LF ir alfa-LA buvo daugiau nei vasarą ir rudenį visose TKS-SLS/MBA grupėse. Taip pat nustatyti ryškūs LF skirtumai pavasarį tarp skirtingų TKS-SLS/MBA grupių. Didžiausia biologinių ir aplinkos veiksnių sezonas x laktacijos skaičius jungtinė sąveikos įtaka (6,6 proc., $p < 0,01$) nustatyta LF tiriant modelį $LF_{ijklkn} = \mu + SLS_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 77,9$ proc.). Pastebimas padidėjęs LF kiekis pavasario metu visose laktacijose, o ypač pirmoje laktacijoje ($0,16 \pm 0,01$ mg/ml), kai tuo tarpu vasaros laikotarpiu pirmoje laktacijoje LF kiekis buvo mažesnis 16 kartų ($0,01 \pm 0,01$ mg/ml), palyginti su LF kiekiu pavasarį. Daugiafaktorinė dispersinė analizė išryškino biologinių ir aplinkos veiksnių sezonas x laktacijos tarpsnis jungtinės sąveikos įtaką alfa-LA (8,8 proc., $p < 0,05$) ir beta-LG (6,2 proc., $p < 0,05$). Daugiausia alfa-LA nustatyta ankstyvuojų laktacijos tarpsniu vasaros laikotarpiu ($1,06 \pm 0,04$ mg/ml), mažiausiai – vėlyvuojų laktacijos tarpsniu pavasario laikotarpiu ($0,71 \pm 0,08$ mg/ml). Beta-LG pasiskirstymas ankstyvuojų ir viduriniuojų laktacijos tarpsniais nustatytas didžiausias rudens sezono metu, o vėlyvuojų laktacijos tarpsniu – pavasario metu.

3.4.1 lentelė. Tirtųjų veiksmų įtaka (proc., p vertės) antimikrobinų baltymų kiekiui įvertinta daugiafaktorinės dispersinės analizės būdu

Analizuojami veiksniai	LF	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
SLS	5,2 proc. p < 0,001	1,6 proc. p < 0,05	4,6 proc. p > 0,05	3,0 proc. p > 0,05	1,7 proc. p > 0,05
TKS-SLS	0,7 proc. p > 0,05	0,4 proc. p > 0,05	4,3 proc. p < 0,01	1,5 proc. p > 0,05	0,05 proc. p > 0,05
SLS/MBA	17,4 proc. p < 0,001	25,6 proc. p < 0,001	1,2 proc. p > 0,05	10,3 proc. p < 0,001	1,4 proc. p > 0,05
TKS-SLS/MBA	12,0 proc. p < 0,001	17,2 proc. p < 0,001	1,1 proc. p > 0,05	3,5 proc. p < 0,05	1,2 proc. p > 0,05
S	46,8 proc. p < 0,001	79,9 proc. p < 0,001	8,8 proc. p < 0,01	14,0 proc. p < 0,001	6,3 proc. p < 0,05
LS	2,3 proc. p > 0,05	0,04 proc. p > 0,05	3,4 proc. p > 0,05	6,9 proc. p < 0,05	3,3 proc. p > 0,05
LT	1,3 proc. p > 0,05	1,2 proc. p > 0,05	10,6 proc. p < 0,01	3,2 proc. p > 0,05	0,5 proc. p > 0,05
SLS x S	2,0 proc. p > 0,05	0,9 proc. p > 0,05	4,3 proc. p > 0,05	6,3 proc. p > 0,05	5,8 proc. p > 0,05
SLS x LS	1,0 proc. p > 0,05	1,4 proc. p > 0,05	1,4 proc. p > 0,05	3,1 proc. p > 0,05	2,2 proc. p > 0,05
SLS x LT	1,6 proc. p > 0,05	1,2 proc. p > 0,05	3,7 proc. p > 0,05	3,9 proc. p > 0,05	5,4 proc. p > 0,05
TKS-SLS x S	1,3 proc. p > 0,05	0,7 proc. p > 0,05	2,2 proc. p > 0,05	5,3 proc. p < 0,05	0,6 proc. p > 0,05
TKS-SLS x LS	0,6 proc. p > 0,05	1,3 proc. p < 0,05	0,9 proc. p > 0,05	1,0 proc. p > 0,05	2,0 proc. p > 0,05
TKS-SLS x LT	0,01 proc. p > 0,05	1,1 proc. p < 0,05	0,03 proc. p > 0,05	0,6 proc. p > 0,05	0,4 proc. p > 0,05
SLS/MBA x S	3,4 proc. p > 0,05	0,3 proc. p > 0,05	7,1 proc. p < 0,05	8,5 proc. p < 0,05	2,2 proc. p > 0,05
SLS/MBA x LS	5,0 proc. p < 0,05	0,7 proc. p > 0,05	2,9 proc. p > 0,05	4,7 proc. p > 0,05	2,4 proc. p > 0,05
SLS/MBA x LT	2,4 proc. p > 0,05	0,5 proc. p > 0,05	6,8 proc. p > 0,05	1,9 proc. p > 0,05	5,9 proc. p > 0,05
TKS-SLS/MBA x S	3,0 proc. p < 0,01	0,4 proc. p > 0,05	5,4 proc. p < 0,05	1,2 proc. p > 0,05	1,2 proc. p > 0,05
TKS-SLS/MBA x LS	3,2 proc. p < 0,01	0,2 proc. p > 0,05	0,4 proc. p > 0,05	0,6 proc. p > 0,05	0,7 proc. p > 0,05
TKS-SLS/MBA x LT	0,5 proc. p > 0,05	0,4 proc. p > 0,05	1,9 proc. p > 0,05	0,6 proc. p > 0,05	2,8 proc. p > 0,05
S x LS	6,9 proc. p < 0,05	1,1 proc. p > 0,05	5,2 proc. p > 0,05	4,0 proc. p > 0,05	4,4 proc. p > 0,05
S x LT	3,4 proc. p > 0,05	1,1 proc. p > 0,05	8,8 proc. p < 0,05	6,2 proc. p < 0,05	3,0 proc. p > 0,05
LS x LT	2,5 proc. p > 0,05	0,2 proc. p > 0,05	2,4 proc. p > 0,05	3,1 proc. p > 0,05	1,7 proc. p > 0,05

SLS/MBA – grupės pagal SLS piene ir jo mikrobiologinės analizės įvertinimą; TKS-SLS/MBA – sveiki arba sergantys tešmens ketvirčiai pagal SLS ir MBA kompleksinį vertinimą; SLS – grupės pagal somatinių ląstelių skaičių piene, TKS-SLS – sveiki arba sergantys tešmens ketvirčiai pagal SLS piene vertinimą; LS – laktacijų skaičius; LT – laktacijos tarpasnis; S – sezonas.

3.5. Tirtųjų antimikrobinių baltymų koreliacinė analizė

Atlikus antimikrobinių baltymų koreliacinę analizę (3.5.1 lentelė) nustatyti statistiškai patikimi ryšiai tarp LF ir IgG ($p < 0,01$), IgG ir GSA ($p < 0,05$) bei tarp beta-LG ir GSA ($p < 0,01$). Stipriausia teigiama koreliacija pastebėta tarp LF ir IgG ($r = 0,731$), silpnėsni, bet taip pat teigiami tarpusavio ryšiai nustatyti tarp IgG ir GSA ($r = 0,209$), bei tarp beta-LG ir GSA ($r = 0,293$). Analizė parodė silpnus, statistiškai nepatikimus, neigiamus koreliacijos koeficientus alfa-LA su LF, IgG ir beta-LG.

3.5.1 lentelė. Koreliacija (r) tarp tiriamųjų antimikrobinių baltymų

Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
LF	0,731**	-0,109	0,048	0,165
IgG	–	-0,025	0,043	0,209*
alfa-LA		–	-0,166	0,006
beta-LG			–	0,293**

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.5.1. Karvių tešmens ketvirčių sveikumo ir pieno antimikrobinių baltymų ryšys

Įvertinus tešmens ketvirčių sveikumą pagal SLS ir MBA bei tirtų antimikrobinių baltymų tarpusavio ryšius (3.5.1.1 lentelė) nustatyta, silpna teigiama koreliacija tarp LF ir alfa-LA ($r = 0,297$), silpna neigiama koreliacija tarp alfa-LA ir beta-LG ($r = -0,317$) ir vidutiniškai teigiama koreliacija tarp beta-LG ir GSA ($r = 0,502$), kai tešmens ketvirčiai sveiki. Esant tešmens ketvirčių uždegimui pagal SLS ir MBA įvertinimą išryškėjo stipri teigiama koreliacija tarp LF ir IgG ($r = 0,792$), taip pat statistiškai patikima, bet silpna neigiama koreliacija LF su alfa-LA ($r = -0,242$).

3.5.1.1 lentelė. Tešmens ketvirčių sveikumo pagal SLS ir MBA įvertinimą ir antimikrobinių baltymų koreliacijos koeficientai

Sveikumas	Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Sveiki ketvirčiai	LF	0,264	0,297*	0,204	0,175
	IgG	–	0,136	0,110	0,202
	alfa-LA		–	-0,317*	-0,145
	beta-LG			–	0,502**
Sergantys ketvirčiai	LF	0,792**	-0,242*	-0,103	0,126
	IgG	–	-0,024	-0,091	0,191
	alfa-LA		–	-0,052	0,163
	beta-LG			–	0,113

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Įvertinus tešmens ketvirčių sveikumą pagal SLS piene ir antimikrobinių baltymų ryšį (3.5.1.2 lentelė), nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp LF ir IgG ($r = 0,698$), silpni teigiami statistiškai patikimi koreliacijos koeficientai tarp LF ir GSA ($r = 0,214$), IgG ir GSA ($r = 0,215$), beta-LG ir GSA ($r = 0,242$), kai tešmens ketvirčiai sveiki (SLS < 200 tūkst./ml). Stiprus teigiamas koreliacinis ryšys tarp LF ir IgG ($r = 0,817$), kiek silpnesnis vidutinis teigiamas koreliacinis ryšys tarp beta-LG ir GSA ($r = 0,471$) išryškėjo, esant tešmens ketvirčių uždegimui (SLS > 201 tūkst./ml).

3.5.1.2 lentelė. *Tešmens ketvirčių sveikumo pagal SLS įvertinimą ir antimikrobinių baltymų koreliacijos koeficientai*

Sveikumas	Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Sveiki ketvirčiai	LF	0,698**	-0,052	0,038	0,214*
	IgG	–	-0,020	0,012	0,215*
	alfa-LA		–	-0,153	0,047
	beta-LG			–	0,242*
Sergantys ketvirčiai	LF	0,817**	-0,209	0,039	0,032
	IgG	–	0,010	0,115	0,192
	alfa-LA		–	-0,123	-0,078
	beta-LG			–	0,471**

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.5.2. Karvių laktacijos tarpsnių, laktacijų skaičiaus, sezonų ir pieno antimikrobinių baltymų ryšys

Atlikus ryšių tarp požymių analizę (3.5.2.1–3.5.2.3 lentelės) išryškėjo LF ir IgG stiprūs, sezonų metu vidutiniai, teigiami tarpusavio ryšiai visais laktacijos tarpsniais pirmos, antros ir trečios laktacijų metu ($p < 0,01$). Pavasarį, pirmos laktacijos ankstyvuoju tarpsniu, nustatyti neigiami, vidutinio stiprumo, LF ir alfa-LA tarpusavio ryšiai ($p < 0,05$). Antrai laktacijai įpusėjus išryškėjo vidutiniškai teigiami LF ir GSA, IgG ir GSA tarpusavio ryšiai ($p < 0,01$). Rudenį, trečios laktacijos vėlyvuoju laikotarpiu, nustatyti vidutiniškai teigiami IgG ir beta-LG, beta-LG ir GSA koreliacijos koeficientai ($r = 0,398$ – $0,634$; $p < 0,01$). Vasaros sezono metu silpnais ryšiais koreliavo tik LF su IgG ir alfa-LA ($p < 0,05$). Vėlyvuoju laktacijos tarpsniu beveik visų tirtųjų antimikrobinių baltymų tarpusavio ryšiai buvo statistiškai reikšmingi. Ankstyvuoju ir vėlyvuoju laktacijos tarpsniais išryškėjo silpni neigiami ryšiai tarp LF ir alfa-LA bei tarp IgG ir alfa-LA, o laktacijos viduryje – vidutiniškai teigiami koreliacijos koeficientai tarp IgG ir alfa-LA ($p < 0,05$).

3.5.2.1 lentelė. Laktacijų tarpinių ir antimikrobinių baltymų koreliacijos koeficientai

Laktacijos tarpsnis	Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Ankstyvas	LF	0,705**	-0,345*	0,044	0,011
	IgG	–	-0,293*	0,061	0,079
	alfa-LA		–	0,094	0,043
	beta-LG			–	0,236
Vidurinis	LF	0,745**	0,255	-0,273	0,559**
	IgG	–	0,405*	-0,256	0,509**
	alfa-LA		–	-0,227	0,185
	beta-LG			–	0,176
Vėlyvas	LF	0,770**	-0,330*	0,596**	0,130
	IgG	–	-0,349*	0,558**	0,023
	alfa-LA		–	-0,536**	-0,336*
	beta-LG			–	0,481**

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas *p < 0,05; **p < 0,01.

3.5.2.2 lentelė. Laktacijų skaičiaus ir antimikrobinių baltymų koreliacijos koeficientai

Laktacijos skaičius	Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Pirma	LF	0,922**	-0,421*	-0,068	0,079
	IgG	–	-0,241	-0,108	0,121
	alfa-LA		–	0,188	0,300
	beta-LG			–	0,320
Antra	LF	0,684**	-0,025	0,096	0,405**
	IgG	–	0,124	0,088	0,340*
	alfa-LA		–	-0,324*	-0,169
	beta-LG			–	0,283
Trečia	LF	0,619**	0,215	0,209	-0,038
	IgG	–	-0,035	0,398**	-0,038
	alfa-LA		–	-0,368*	-0,201
	beta-LG			–	0,507**

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas *p < 0,05; **p < 0,01.

3.5.2.3 lentelė. Sezono ir antimikrobinių baltymų koreliacijos koeficientai

Sezonai	Rodikliai	IgG	alfa-LA	beta-LG	GSA
Pavasaris	LF	0,408**	-0,407**	-0,003	-0,006
	IgG	–	0,028	-0,081	0,165
	alfa-LA		–	-0,067	0,402*
	beta-LG			–	-0,138
Vasara	LF	0,360*	0,392*	0,120	0,033
	IgG	–	0,001	-0,132	-0,111
	alfa-LA		–	-0,143	-0,036
	beta-LG			–	0,218
Ruduo	LF	0,436**	-0,276	0,234	0,388*
	IgG	–	-0,049	0,634**	0,366*
	alfa-LA		–	0,023	-0,235
	beta-LG			–	0,533**

Koreliacijos koeficientų reikšmingumas *p < 0,05; **p < 0,01.

4. TYRIMŲ REZULTATŲ APITARIMAS

4.1. Antimikrobinių baltymų kiekis sveikųjų ir sergančiųjų mastitu tešmens ketvirčių piene

Karvių mastitas yra pasikartojanti rimta problema, su kuria susiduria pieno gamintojai (Bernatowicz et al., 2004; Petrovski et al., 2006; Sharma et al., 2011; 2012). Ši liga yra pieno liaukos uždegiminis atsakas į metabolinius ir fiziologinius organizmo pokyčius ar traumas. Tačiau dažniausiai pieno liaukos uždegiminius procesus lemia susilpnėjusi imuninė sistema, nepajėgi pašalinti kontaginių ar aplinkos patogeninių mikroorganizmų invazijos bei dauginimosi (Dego et al., 2002; Bannerman et al., 2004; Oviedo-Boyso et al., 2007). Ankstyvas tešmens sveikumo nustatymas yra būtinas pieno gamintojams norint užtikrinti ne tik gyvulio gerovę, bet ir pieno kokybę bei produkciją. Somatinių ląstelių kiekis piene yra pripažintas pieno kokybės ir karvių sveikatos būklės įvertinimo rodiklis (Rivas et al., 2001; Schukken et al., 2003; Green et al., 2004; Robert-Granie et al., 2004; Hillerton et al., 2005; Piccinini et al., 2006). Padidėjęs SLS – indikatorius rodantis, kad karvė serga slaptuoju tešmens uždegimu (mastitu) (Schukken et al., 2003). Ši ligos forma neturi jokių klinikinių požymių ir nustatoma tiriant SLS piene (Green et al., 2004). Fiziologinis SLS padidėja visuose tešmens ketvirčiuose vienodai, o sergant mastitu – viename ar keliuose tešmens ketvirčiuose (Hutton et al., 1990). Anot mokslininkų Hamann (2002), Cheng ir kitų (2008), pienas, kuriame SLS – mažiau nei 100 tūkst./ml, yra iš sveiko tešmens, nors Chanton ir kiti (2013) teigia, kad sveikas tešmuo – kai SLS piene iki 200 tūkst./ml. Hamann (2002) teigimu, SLS „auksinis standartas“ – ≤ 100 tūkst./ml, nes didėjant šiam skaičiui sutrinka pieno sekrecija, dėl to mažėja produkcija, keičiasi pieno komponentų sudėtis. Kiti mokslininkai Smith (2002) ir Pyorala (2003), remdamiesi tyrimais, nustatė, kad tešmens ketvirčio pienas, kuriame SLS – daugiau nei 200 tūkst./ml, parodo, kad sukelta uždegiminė reakcija (subklinikinis mastitas). Toks pienas netinkamas sūrių gamybai dėl sumažėjusios sūrių išeigos, kokybės ir galiojimo laiko (Dohoo and Meek, 1982; Barbano, 1999). Remiantis žalio pieno pirminių kokybės rodiklių įvertinimo instrukcija, patvirtinta Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministro 2006 m. liepos 25 d. įsakymu Nr. 3D-303 (žin., 2006, Nr. 85-3337), aukščiausios rūšies piene SLS negali viršyti 400 tūkst./ml. Siekiant pagerinti karvių sveikatingumą, produktyvumą bei gerovę, būtinas imuninių faktorių ir tešmens

apsaugos mechanizmo prieš infekciją veikimo suvokimas (Chaneton et al., 2013). Literatūroje nurodoma, kad išrūgose esantys antimikrobiniai baltymai (AB) dalyvauja imuninės sistemos veikloje atlikdami daug svarbių apsauginių bei imunomoduliuojančių (stimuliuojančių) funkcijų (Bellamy et al., 1993; Krol et al., 2010; Pan et al., 2006; Wojdak-Maksymiec Mikolajczyk, 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). Pastaruoju metu atliekami tyrimai siekiant išsiaiškinti imuninių komponentų, tokių kaip laktoferinas (LF), imunoglobulinai (Ig), alfa-laktalbuminai (alfa-LA), beta-laktoglobulinai (beta-LG), galvijų serumo albuminas (GSA), dinamiškumą vietinių karvių piene (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012; Chaneton et al., 2013; Sobczuk-Szul et al., 2014). Daugelio autorių darbuose tešmens ar tešmens ketvirčių sveikumas vertinamas remiantis SLS piene tyrimais (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). Tyrimų duomenys pagal SLS piene dažniausiai skirstomi į keletą grupių, pagal kurias nustatomos sveikos ir tešmens uždegimu sergančios karvės. Anot Krol ir kitų bendraautorių (2012), tešmens ketvirčių pienas, kuriame SLS daugiau nei 200 tūkst./ml, parodo, kad tešmuo galimai infekuotas (subklinikinis mastitas) ir priskiriamas sergantiesiems (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012). Išanalizavę mokslinę literatūrą ir norėdami įvertinti tešmens ketvirčių sveikumą bei SLS įtaką natūralių AB kiekiams, pasirinkome tyrimų duomenų grupavimo metodiką pagal SLS piene. Lenkijoje atlikti tyrimai parodė, kad didėjantis SLS turėjo įtakos pagrindinių albuminų (alfa-LA ir beta-LG) kiekių sumažėjimui, tačiau imunologiškai aktyvių baltymų (laktoferino ir lizocimo) ir GSA kiekiai padidėjo ($p < 0,001$) (Litwinczuk et al., 2011). Krol ir bendraautorių (2012) tyrimai papildė Litwinczuk ir kitų (2011) duomenis, nustačius, kad SLS didėjimas statistiškai patikimai turėjo įtakos didėjančioms LF, IgG bei lizocimo koncentracijoms piene. Minėtuosiuose tyrimuose, SLS įtaką LF ir IgG kiekiams patvirtino apskaičiuoti aukšti koreliacijos koeficientai, kurie sutapo ir su mūsų gautais apskaičiavimais. Teigiami koreliacijos koeficientai tarp SLS ir LF nustatyti mokslininkų Hutton ir kitų (1990), Lindmark-Mansoon ir kitų (2000; 2006), bei Cheng ir kitų (2008), o tarp SLS ir IgG – Liu ir kitų (2009) bei Krol ir kitų (2012; 2014) darbuose. Mūsų ir minėtų tyrėjų rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad LF ir IgG rodiklius kartu su SLS piene reikėtų įvertinti nustatant subklinikinį mastitą.

Nustačius padidėjusį SLS piene būtinas mikrobiologinis mastito sukėlėjų tyrimas. Pagrindiniai kriterijai, SLS ir mikrobiologinė pieno analizė, nustatantys tešmens ketvirčių sveikumą, buvo pasirinkti ir mūsų darbe. Hagiwara (2003), Kocina (2012), Chaneton (2013) su kitais mokslininkais, mastito formai įvertinti ar sukėlėjui identifikuoti, be SLS nustatymo, taip pat atliko ir mikrobiologinius mastito sukėlėjo tyrimus. Anot mokslininkų Pyorala (2003), Chaneton ir kitų (2013), remiantis minėtaisiais dviem svarbiais kriterijais,

vertinant tešmens sveikumą, galima diferencijuoti pieno liaukos uždegimą (aplinkos, nespecifinis ar subklinikinis mastitas). Mūsų darbe pagal SLS ir mikrobiologinę analizę tešmens ketvirčiai pasiskirstė panašiai, t. y. 59 proc. – sergančiųjų ir 41 proc. – sveikųjų tešmens ketvirčių, kai kitų mokslininkų tyrime daugiausia (86,6 proc.) buvo sveikųjų ketvirčių (Chaneton et al., 2013). Chaneton ir kitų (2013) atliktame tyrime, dauguma (62 proc.) mikrobiologiškai tirtųjų mėginių buvo neigiami, nors SLS piene buvo daugiau nei 200 tūkst./ml. Mūsų darbe tokie mėginiai priskirti nespecifiniam mastitui ir sudarė 11 proc. mėginių. Tokiu atveju manoma, kad tyrimai, identifikuojantys mastito sukėlėją, reikalauja specifiškumo ir jautrumo, arba uždegiminiai procesai gali prasidėti ir be nustatomų bakterijų piene. Šiuos rezultatus patvirtino kiti tyrimai, kuriuose nustatyti kliniškai infekuoti tešmens ketvirčiai, tačiau patogeninių bakterijų neišskirta, nors vėliau mastito sukėlėjas identifikuotas atlikus polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) analizę (Taponen et al., 2009). Mokslinėse publikacijose teigiama, kad pieno liaukos fiziologinė būklė (užtrūkimo periodas ar laikotarpis po apsiveršiavimo) gali sumažinti imuninį atsaką prieš bakterijų invaziją (Chaneton et al., 2013). Susilpnėjus imuniniam atsakui, ištyrus pieno mėginius išskiriamos kai kurios bakterijų rūšys (Schwarz et al., 2010). Galbūt taip galima paaiškinti, kodėl piene, kuriame SLS mažiau nei 200 tūkst./ml, identifikuojami mastito sukėlėjai.

Mūsų tyrimų rezultatai sutapo su Hagiwara ir kitų (2003) atliktais eksperimentais, kuriuose LF koncentracija, sergančiuosiuose subklinikiniu mastitu tešmens ketvirčiuose, nustatyta statistiškai patikimai ($p < 0,001$) didesnė, nei sveikuosiuose ketvirčiuose. LF koncentracija piene priklauso ir nuo bakterijų rūšies specifiškumo bei patogeniškumo (Hagiwara et al., 2003). Auksiniu stafilokoku (*S. aureus*) ir kitais streptokokais infekuotuose tešmens ketvirčiuose LF kiekiai reikšmingai didesni, palyginti su KNS ir korinebakterijomis (*Corynebacterium bovis*) infekuotais ketvirčiais (Hagiwara et al., 2003). Manoma, kad mažesnė nei 0,2 mg/ml LF koncentracija piene nepakankama nuslopinti enterotoksikogeninių bakterijų *E. coli* ir *S. aureus* augimo (David et al., 1993; Hagiwara et al., 2003; Chaneton et al., 2008). Chaneton ir kitų mokslininkų (2008) tyrimuose didžiausia LF koncentracija nustatyta identifikavus tešmens streptokokus (*Str. uberis*). Mūsų tyrimuose nustatyta padidėjusi IgG koncentracija piene subklinikinio mastito atveju. Panašūs rezultatai gauti ir kitų mokslininkų tyrimuose, kai lėtinio ar subklinikinio mastito atveju padidėjusi IgG koncentracija piene, bet sumažėjusi kraujo serume parodė suintensyvėjusią imunoglobulinų migraciją iš kraujotakos į tešmens audinius, siekiant jį apsaugoti nuo infekcinio susirgimo (Kocina et al., 2012). IgG koncentracija *Str. uberis* infekcijos atveju labai padidėja, kai tuo tarpu mastito sukėlėjas – *S. aureus*, IgG kiekis gali būti mažesnis nei sveikųjų

tešmens ketvirčių piene (Kocina et al., 2012). Statistiškai patikimas LF ir GSA ($p < 0,05$) kiekių didėjimas, sutampantis su pieno liaukos progresuojančiu uždegimu, nustatytas ožkų ir buivolių piene (Leitner et al., 2004b; Piccinini et al., 2006). Mūsų tyrimų rezultatai sutapo su Irane atliktu bandymu, kuriame nustatytas Ig ir GSA koncentracijų padidėjimas, o alfa-LA sumažėjimas subklinikinio mastito sergančiuosiuose ketvirčiuose, tačiau, priešingai nei mes, Batavani ir kiti (2007), nustatė beta-LG sumažėjimą uždegiminės reakcijos pažeistame ketvirčių piene. Remiantis Auldist ir Hubble (1998) pateikta teorija, alfa-LA ir beta-LG padidėjimas karvių kraujyje yra susijęs su SLS padidėjimu piene. Minėtų antimikrobinių baltymų sumažėjimas piene susijęs (Auldist and Hubble, 1998) su pablogėjusia ląstelių sintezės ir sekrecijos funkcija, ir iš dalies dėl šių baltymų pratekėjimo į tarpląstelinį skystį dėl uždegimo metu padidėjusio kraujagyslių pralaidumo.

Sveikų karvių piene Ig yra nedaug ir jų kiekis priklauso nuo tešmens audinių kraujagyslių pralaidumo. Tešmens uždegimo metu pralaidumo barjeras pažeidžiamas, todėl Ig pradedami gaminti pažeistose pieno liaukose. Padidėjusi Ig dalis piene (Batavani et al., 2007) susijusi su tešmens laktoalbuminų sumažėjimo kompensavimu, nes yra palaikomas tam tikras balansas šių komponentų tarp pieno ir kraujo. GSA kiekio padidėjimas nustatytas mastitu sergančių karvių (Urech et al., 1999; Vijayalakshmi et al., 2001; Coulon et al., 2002), avių (Leitner et al., 2004a) bei ožkų (Leitner et al., 2004b) piene. Pagrindinė albuminų sintezė vyksta kepenyse, o į pieną jie patenka per glaudžias epitelines jungtis difuziniu būdu iš kraujo (de Wit, 1998; Walsh and Duncan, 2000). Pieno liaukos epitelinės ląstelės, nors ir mažiau nei hepatocitai, taip pat sintetina albuminus (Shamay et al., 2005). GSA padidėjimas mastitiniame piene reikštų pačios pieno liaukos reakciją, kuri suaktyvina albuminų sintezę. Anot mokslininkų Litwinczuk ir kitų (2011), GSA pieno ir kraujo barjero pralaidumo pieno liaukoje indikatorius. Taigi GSA padidėjimas rodo suaktyvėjusią uždegiminę reakciją, kai komponentai iš kraujo apytakos filtruojami į pieno liauką. Pagrindiniai išrūgų albuminai daugiausia sintetinami pačioje pieno liaukoje. Mūsų darbe, bei kitų autorių (Batavani et al., 2007; Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012) tyrimuose, nustatytas alfa-LA sumažėjimas subklinikinio mastito atveju, manoma, yra dėl sulėtėjusios pieno sintezės liaukoje.

4.2. Karvių laktacijos tarpinių ir laktacijų skaičiaus įtaka antimikrobinų baltymų kintamumui piene

Karvės amžius ir laktacijos tarpiniai yra pagrindiniai fiziologiniai faktoriai, darantys reikšmingą įtaką produktyvumui ir pieno sudėčiai (Linn, 1988; Ostersen et al., 1997; Auldist et al., 1998; Heck et al., 2009; Krol et al., 2013). Pieno liauka, skirtingai nuo kitų liaukų, funkcionuoja ne nuolat, o tik tam tikrais laiko tarpais. Karvių laktacija trunka vidutiniškai 305 dienas, o optimalus užtrūkimo laikotarpis – 60 dienų (Akers, 2002). Per laktaciją pieno savybės ryškiausiai pakinta tris kartus. Pirmąsias dienas po apsiveršiavimo išsiskiria krekenos, kurių cheminė sudėtis, išvaizda ir fiziologinis poveikis labai skiriasi nuo pieno. Jose yra daug lizocimo, globulinų, turinčių imuninių savybių ir apsaugančių atvestą veršelį nuo ligų. Vėliau, 280–285 dienas, – normalaus pieno (įprastos sudėties) išskyrimo laikotarpis. Užtrūkinamų karvių piene būna daugiau riebalų (5–7 proc.), baltymų, mineralinių medžiagų, fermentų ir mažiau laktozės nei laktacijos viduryje primelžtame piene (Ray et al., 1992). Laktacijos pabaigoje mažėja pieno kiekis, didėja SLS, todėl toks pienas netinka pramoniniam perdirbimui.

Pirmais laktacijos mėnesiais LF ir IgG koncentracijos karvių piene būna mažiausios ir didėja, kol pasiekia piką vėlyvuoju laktacijos tarpsniu (Levieux and Ollier, 1999; Hagiwara et al., 2003; Cheng et al., 2008; Liu et al., 2009; Krol et al., 2010; Krol et al., 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). Mūsų tyrimai parodė priešingus rezultatus. Ankstyvuoju ir viduriniu laktacijos tarpsniais LF ir IgG koncentracijos buvo statistškai patikimai aukštesnės nei vėlyvuoju tarpsniu. Šie duomenys sutapo su Chaneton ir kitų (2013) pranešimu kur teigiama, kad aukštas LF lygis ankstyvuoju laktacijos tarpsniu susijęs su infekuotais tešmens ketvirčiais. Šie rezultatai rodo, kad kai kurie tešmens ketvirčiai yra labai jautrūs infekcijos sukėlėjams, arba uždegiminis procesas tampa lėtinis. Manoma, kad ankstyvosios laktacijos ir pieno liaukos involiucijos periodu dėl susilpnėjusios imuninės sistemos pieno liauka yra jautriausia uždegimui (Burton and Erskine, 2003; Burvenich et al., 2003; Fadlelmoula, 2007). Elbably ir kitų mokslininkų (2013) atlikti tyrimai patvirtino, kad minėtais laikotarpiais mastitų paplitimo procentas didėja. Susirgimų mastitais pikas pastebimas pirmąjį laktacijos mėnesį (Compton et al., 2009), daugiausiai dėl pasireiškiančio funkcinio streso organizmui, o ypač tešmeniui. Sergamumas naujomis tešmens infekcijomis padidėja nuo paskutinės užtrūkimo savaitės iki veršiavimosi (Stoliuk et al., 2011), nes piene sumažėja LF koncentracija ir somatinių ląstelių veiksmingumas naikinant mikroorganizmų invaziją (Suriyasathaporn et al., 2000; Philipot et al., 2011). Kocina ir kiti (2012) tvirtina, kad viduriniu laktacijos tarpsniu LF ir Ig

koncentracijos žemiausios, todėl šiuo periodu būtina didinti šių baltymų kiekius optimaliai imuninei sistemai palaikyti. Aukštus koreliacijos koeficientus tarp laktacijos tarpsnio ir LF nustatė Cheng ir kiti mokslininkai (2008), o tarp laktacijos tarpsnio ir IgG – Liu ir kiti (2009). Mūsų gauti rezultatai sutapo su Ostersen ir kitų mokslininkų (1997) bei Sobczuk-Szul ir bendraautorių (2014) tyrimais, kuriuose beta-LG koncentracijos viduriniuoju ir vėlyvuuoju laktacijos tarpsniais aukštesnės nei laikotarpiu po apsiveršavimo. Vėlyvuuoju laktacijos tarpsniu alfa-LA kiekis mūsų bei Ostersen ir kitų mokslininkų (1997), Krol ir kitų (2013) tyrimuose buvo mažiausias. Manoma, kad alfa-LA kiekis sumažėja prieš karvių užtrūkimą dėl sumažėjusios pieno sintezės pieno liaukoje.

Prieštaringi tyrimų rezultatai gauti vertinant laktacijos skaičiaus įtaką AB kiekiams piene. Mūsų rezultatai panašūs su Hagiwara ir kitų tyrėjų (2003) atliktais tyrimais, kuriuose LF koncentracija vyresnių karvių piene statistiškai reikšmingai ($p \leq 0,05$) mažesnė nei pirmaveršių. Tačiau kiti tyrimai paneigė teoriją, kad karvei senstant LF ir Ig koncentracija piene mažėja (Soyeurt et al., 2007; Krol et al., 2010; Krol et al., 2012). Anot Krol ir kitų (2010), su kiekviena laktacija Ig ir lizocimo kiekiai didėja, kol pasiekiamas pikas ketvirtos laktacijos metu. Be to, didžiausios LF koncentracijos karvių piene nustatytos antros ir ketvirtos laktacijų metu (Krol et al., 2010). Vėlesni Krol ir kitų bendraautorių (2012) tyrimai patvirtino anksčiau minėtuosius rezultatus ir nustatė, kad LF ir IgG kiekis pirmaveršių karvių piene reikšmingai mažesnis, palyginti su antros–ketvirtos ($p \leq 0,05$) ar vyresnių ($p \leq 0,01$) laktacijų karvių pienu. Vyresnių karvių krekenose LF (Tsuji et al., 1990) ir IgG (Gulinski et al., 2006) kiekiai, didesni nei pirmaveršių (Mian-bin and Yin-jun, 2009). Panašūs rezultatai gauti Cheng ir kitų (2008), kuriuose LF kiekis trečios ir ketvirtos laktacijos piene yra didesnis nei pirmos ar antros laktacijos, nors skirtumai statistiškai nepatikimi. Galima būtų diskutuoti, ar pienas ir krekenos, dėl skirtingos cheminės sudėties ir produkcijos laikotarpio, gali būti lyginami. Tokie prieštaringi rezultatai galėtų būti dėl skirtingų metodikų ar mėginių skaičiaus bei pasirinktų vertinimo kriterijų tyrimuose.

Kaip jau buvo minėta, SLS tiesiogiai koreliuoja su LF ir IgG didėjimu, taigi vertinant laktacijos įtaką AB kiekiams reikėtų atsižvelgti ir į kitus faktorius. Su kiekviena laktacija albuminų ir globulinų kiekiai reikšmingai mažėja, o GSA didėja (Krol et al., 2013). Karvei senstant sergamumas mastitu dažnėja (Sharma et al., 2011; 2012). Uždegimo metu padidėja kraujagyslių pralaidumas, dėl to kraujo baltymai, kitos sudėtinės dalys ir uždegiminės (somaticinės) ląstelės iš kraujo patenka į pieną. Turint omenyje, kad GSA pieno ir kraujo barjero pralaidumo pieno liaukoje indikatorius (Litwinczuk et al., 2011), leidžia manyti, kad karvei senstant tešmens audinių pralaidumas didėja, dėl to GSA piene nustatoma daugiau. Dėl uždegimo

tešmenyje, pieną gaminančios epitelio ląstelės, tampa mažiau produktyvios, sumažėja primilžis ir alfa-LA sintezė. Mūsų tyrimai, vertinant minėtuosius antimikrobinius baltymus, yra priešaringi. Beta-LG didžiausia koncentracija nustatyta trečios, o alfa-LA ir GSA – antros laktacijos karvių piene. Be to, laktacijų skaičius turėjo statistiškai reikšmingos įtakos ($p < 0,01$) beta-LG koncentracijai piene. Minėtųjų AB kiekiams piene įtakos galėtų turėti ir kiti organizmo būklę veikiantys faktoriai (sezonas, veislė, laktacijos tarpsniai, mastitas ir kt.).

4.3. Sezono įtaka antimikrobinių baltymų kiekiams karvių piene

Sezonas – vienas svarbiausių aplinkos faktorių, kurio įtaka pieno sudėčiai tirta daugelio mokslininkų Lietuvoje (Juozaitienė ir Žakas, 2002; Žakas, 2002; Pečiulionienė ir kt., 2004; Pauliukas ir kt., 2005; Klimienė ir kt., 2005). Tačiau kaip kinta AB kiekiai skirtingų sezonų metu, vietinių karvių piene, nėra pakankamai duomenų. Mūsų tyrimais pirmą kartą nustatyta, kad holšteinizuotų Lietuvos juodmargių karvių piene antimikrobinių baltymų, t. y. LF ($p < 0,001$), IgG ($p < 0,001$), alfa-LA ($p < 0,01$), beta-LG ($p < 0,001$) ir GSA ($p < 0,05$) kiekių pasiskirstymui sezonas turi reikšmingos įtakos. Šie rezultatai sutapo su Latvijoje atliktų tyrimų duomenimis, kuriuose nustatyta statistiškai reikšminga sezoninio karvių laikymo įtaka IgG koncentracijai piene ($p < 0,001$) (Kocina et al., 2012). Kiti tyrimai Lenkijoje patvirtino statistiškai reikšmingą sezono įtaką LF ir alfa-LA kiekiams ožkų piene ($p < 0,01$) (Brodziak et al., 2014). Conesa ir kiti (2005) iš skirtingų Ispanijos regionų ištyrė daugiau nei tris tūkstančius pieno mėginių nustatė, kad IgG kiekis pavasario metu statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) didesnis nei kitais sezonais. Mūsų tyrimų duomenimis, tirtų antimikrobinių baltymų (LF, IgG ir GSA) kiekiai pavasario sezono metu statistiškai patikimai ($p < 0,05$) didesni nei kitais metų laikais. Kai alfa-LA didžiausią koncentraciją piene nustatėme vasaros, o mažiausią – rudens metu, kaip ir Gellrich ir kitų mokslininkų (2014) atliktame tyrime. Kituose tyrimuose Kazachstane, kuriuose sezonas buvo vienintelis reikšmingas faktorius, aukščiausia LF koncentracija kupranugarių piene nustatyta pavasarį, o IgG – žiemą (Konuspayeva et al., 2007). Krol ir kiti (2008), bei Brodziak ir kiti (2012) panašiais tyrimais nustatė padidėjusius LF, beta-LG ir alfa-LA kiekius karvių piene ganiavos, o GSA – tvartiniu laikotarpiu. Karvių piene, kurios ganosi laisvai, LF kiekiai reikšmingai didesni, nei tų, kurios ganiavos laikotarpiu laikomos pririštos (Turner et al., 2007). Galima daryti prielaidą, kad ganiavos laikotarpiu jau- noje žolėje gausu biologiškai aktyvių medžiagų, turinčių imunomoduliacinių

savybių (Brodziak et al., 2012), ir tai tiesiogiai turi įtakos LF, Ig ir beta-LG kiekiams piene.

Mūsų tyrimuose buvo analizuojamos sezonų, laktacijų skaičiaus bei laktacijos tarpsnių jungtinės sąveikos įtakos tiriamiesiems antimikrobiniais baltymams. Statistiškai patikimą sezono ir laktacijų skaičiaus įtaką nustatėme LF ($p < 0,05$), o sezono ir laktacijos tarpsnių jungtinės sąveikos įtaka nustatyta alfa-LA ir beta-LG ($p < 0,05$). Tyrimais nustatyta, kad karvių, apsiveršiančių vasaros metu, krekenose Ig kiekis didesnis, nei tų, kurios veršėsi žiemos laikotarpiu (Eihvalde et al., 2012). Pavasario ir vasaros sezonais antimikrobinų baltymų procentas karvių ir ožkų piene yra didesnis, nei rudens ir žiemos laikotarpiais (Litwinczuk et al., 2011; Brodziak et al., 2014). Manoma, kad tokie baltymų kiekio svyravimai galimi dėl skirtingų šėrimų ir laktacijos tarpsnių, t. y. dauguma karvių metų pradžioje būna ankstyvosios laktacijos. Tai leidžia daryti prielaidą, kad baltymų koncentracijos sezoniniam kintamumui piene turi įtakos kelių veiksnių kombinacija. Nuo balandžio iki birželio mėnesio, po žiemos sezono, karvių imunitetas nusilpęs, o prasidėjus ganiavai, suintensyvėjus pieno gamybai, padaugėja susirgimų mastitu (Klimienė ir kt., 2005), galbūt todėl ir padidėja antimikrobinų baltymų kiekiai. Nors kiti tyrimai liudija, jog karvės mastitu dažniau serga tvartiniu laikotarpiu. Šiuo laikotarpiu sergamumo padidėjimui įtakos turi prasta tvartų ventiliacija. Tvartuose laikomos karvės išskiria daug šilumos, susidaro drėgmė, dėl to kyla tvarto temperatūra, o tokia aplinka sudaro palankias sąlygas bakterijoms daugintis. Kocinos ir kitų mokslininkų (2012) tyrimuose IgG koncentracija tvartiniu laikotarpiu buvo panaši tiek mėginiuose, kuriuose buvo nustatyti patogeniniai sukėlėjai, tiek neinfekuotuose mėginiuose, o ganykliniu laikotarpiu IgG koncentracija buvo aukštesnė neinfekuotuose pieno mėginiuose.

AB pasiskirstymas piene, priklausomai nuo karvių veislės bei SLS, skirtingais metų laikais tyrinėtas Lenkijoje (Litwinczuk et al., 2011). Žiemos laikotarpiu didėjant SLS didėjo alfa-LA ir beta-LG kiekiai įvairių veislių karvių piene. Vasaros laikotarpiu alfa-LA kiekis panašus, o beta-LG kiekis statistiškai reikšmingai ($p < 0,01$) didėjo. Statistinė analizė parodė reikšmingą veislės ir sezono įtaką analizuojamiems antimikrobiniais baltymams Litwinczuk ir kiti (2011) tyrimuose, nors kituose tyrimuose Švedijos pieninių veislių karvių įtaka antimikrobinų baltymų kiekių kitimui, nepasitvirtino (Wedholm et al., 2006). Mūsų tyrime analizuota sezono ir SLS jungtinės sąveikos įtaka, kuri tirtiesiems antimikrobiniais baltymams nebuvo reikšminga ($p > 0,05$). Panašūs tyrimai atlikti kitų mokslininkų, kurie nustatė statistiškai reikšmingą veislės ir sezono sąveikos įtaką LF, lizocimo, alfa-LA, beta-LG bei GSA proporcijoms piene (Brodziak et al., 2012).

IŠVADOS

1. Kompleksinis somatinių ląstelių skaičiaus ir mikrobiologinių tyrimų rezultatų vertinimas tiksliau parodo uždegimą tešmens ketvirtyje, t. y. sergančiųjų tešmens ketvirčių nustatyta 35 proc. daugiau, nei vertinant tik pagal somatinių ląstelių skaičių piene.

2. Mastitu sergančiuosiuose tešmens ketvirčiuose nustatytas po 46 proc. ($p < 0,001$) LF ir IgG, 4 proc. ($p < 0,05$) beta-LG ir 6 proc. GSA koncentracijų padidėjimas, o alfa-LA koncentracija 2 proc. buvo didesnė sveikuosiuose tešmens ketvirčiuose.

2.1. Subklinikinio mastitu sergančiuosiuose tešmens ketvirčiuose nustatyti didžiausi LF, IgG ir beta-LG vidurkiai – atitinkamai 0,1 mg/ml, 0,41 mg/ml ir 3,88 mg/ml ($p < 0,05$).

2.2. Piene, kuriame nustatytas aplinkos mikroorganizmų sukeltas mastitas, nustatyta 7,4 proc. GSA daugiau nei sveikuose ketvirčiuose.

3. Įvertinus laktacijos skaičiaus bei tarpsnio įtaką antimikrobinių baltymų pasiskirstymui piene nustatyta:

3.1. Pirmaveršių karvių piene didžiausia koncentracija – LF (0,08 mg/ml), antros laktacijos karvių piene – IgG, alfa-LA ir GSA (atitinkamai 0,3 mg/ml, 0,95 mg/ml ir 0,37 mg/ml), o trečios laktacijos piene daugiausia nustatyta beta-LG (3,59 mg/ml).

3.2. Ankstyvuojų laktacijos tarpsniu nustatyta padidėję LF, IgG bei alfa-LA kiekiai (atitinkamai 0,08 mg/ml, 0,3 mg/ml ir 0,97 mg/ml), o laktacijai įpusėjus – padidėję beta-LG ir GSA (atitinkamai 0,37 mg/ml ir 3,44 mg/ml).

4. Nustatyta, kad holšteinizuotų Lietuvos juodmargių veislės karvių piene antimikrobinių baltymų, t. y. LF (46,8 proc.), IgG (79,9 proc.), alfa-LA (8,8 proc.), beta-LG (14 proc.) ir GSA (6,3 proc.) kiekių pasiskirstymui sezonas turi reikšmingos įtakos. LF, IgG ir GSA kiekiai pavasario (atitinkamai 0,12 mg/ml, 0,54 mg/ml ir 0,37 mg/ml), alfa-LA – vasaros (0,98 mg/ml), o beta-LG – rudens (3,74 mg/ml) sezonų metu aukštesni nei kitais metų laikais.

5. Vienfaktorinės dispersinės analizės metodu nustatyta tiriamųjų veiksnių įtaka antimikrobiniams baltymams:

5.1. Karvių tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS ir MBA kompleksinį vertinimą) įtaka labiausiai išreikšta LF (17,4 proc.; $p < 0,001$), IgG (25,6 proc.; $p < 0,001$) bei beta-LG (10,3 proc.; $p < 0,05$).

5.2. Karvių tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS vertinimą piene) įtaka nustatyta alfa-LA (4,3 proc.; $p < 0,05$).

5.3. Biologinių veiksnių įtakos analizė parodė, kad laktacijų skaičius darė reikšmingą įtaką beta-LG (7,7 proc.; $p < 0,01$), o laktacijos tarpniai darė įtaką LF (8,5 proc.; $p < 0,01$), IgG (6,1 proc.; $p < 0,05$) bei alfa-LA (9,1 proc.; $p < 0,01$).

5.4. Aplinkos faktorius sezonas reikšmingai įtakojo visų tirtų antimikrobinių baltymų kiekių pasiskirstymą piene, kai veiksnio įtakos koeficientai daugiausia procentų sudarė LF (46,5 proc.) ir IgG (79,6 proc.) rodikliams.

6. Pritaikius daugiafaktorinės analizės linijinius modelius išryškėjo statistiškai reikšminga tiriamųjų veiksnių tarpusavio sąveikos įtaka:

6.1. IgG didžiausią įtaką darė tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS grupes) ir laktacijų skaičiaus jungtinė sąveika (1,3 proc., $p < 0,05$) bei tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS grupes) ir laktacijos tarpsnio sąveika (1,1 proc., $p < 0,05$).

6.2. LF didžiausią įtaką darė tešmens ketvirčių sveikumo (pagal SLS ir MBA) ir laktacijų skaičiaus jungtinė sąveika (3,2 proc., $p < 0,05$) bei sezono ir laktacijų skaičiaus jungtinė sąveika (6,6 proc., $p < 0,01$).

6.3. alfa-LA ir beta-LG kiekiai piene labiausiai priklausė nuo sezono ir laktacijos tarpsnio jungtinės sąveikos (atitinkamai 8,8 proc. ir 6,2 proc., $p < 0,05$).

7. Įvertinus antimikrobinių baltymų ir tirtųjų veiksnių fenotipinius ryšius nustatyta:

7.1. Stiprus teigiamas ryšys tarp LF ir IgG ($r = 0,731$; $p < 0,01$), o tarp IgG ir GSA bei tarp beta-LG ir GSA – silpna teigiama koreliacija (atitinkamai $r = 0,209$; $p < 0,05$ ir $r = 0,293$; $p < 0,01$).

7.2. Stipri teigiama koreliacija tarp LF ir IgG ($r = 0,792$; $p < 0,01$), bet silpna neigiama koreliacija tarp LF ir alfa-LA ($r = -0,242$; $p < 0,05$) sergančiuosiuose tešmens ketvirčiuose pagal SLS ir MBA kompleksinį vertinimą.

7.3. Stipri teigiama koreliacija tarp LF ir IgG tiek sveikuosiuose ($r = 0,698$; $p < 0,01$), tiek sergančiuosiuose ($r = 0,817$; $p < 0,01$) tešmens ketvirčiuose; silpni teigiami koreliacijos koeficientai tarp LF ir GSA ($r = 0,214$; $p < 0,05$), IgG ir GSA ($r = 0,215$; $p < 0,05$), beta-LG ir GSA ($r = 0,242$; $p < 0,05$), kai tešmens ketvirčiai sveiki ir vidutinio stiprumo teigiamas koreliacinis ryšys tarp beta-LG ir GSA ($r = 0,471$; $p < 0,05$) esant tešmens ketvirčių uždegimui pagal SLS vertinimą.

7.4. Įvertinus tirtųjų veiksnių ryšį su antimikrobiniais baltymais nustatyti stiprūs, sezonų metu vidutiniai, teigiami LF ir IgG tarpusavio ryšiai visais laktacijos tarpniais pirmos, antros ir trečios laktacijų metu ($p < 0,01$).

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Actor JK, Hwang S, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des* 2009;15(17):1956-73.
2. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas: Šviesa; 2001.
3. Akers RM. Lactation and mammary gland. Iowa State Press; 2002. p. 54-6.
4. Ali-Vehmas T, Sandholm M. Balance between bacteria and host – the bacteria point of view. In: Sandholm M, Honkanen T, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyorala S, editors. *The Bovine Udder and Mastitis*. Iyväskylä, Finland: Gummerus Kirjapaino; 1995. p. 49-58.
5. Almashikhi SA and Nakai S. Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel-filtration techniques. *J Dairy Sci* 1987;70:2486-92.
6. Andrew SM. Effect of Composition of Colostrum and Transition Milk from Holstein Heifers on Specificity Rates of Antibiotic Residue Tests. *J Dairy Sci* 2001;84:100-6.
7. Aniulis E. Patelių pieno liaukos ligos. Kaunas: Terra Publica; 2007. p. 53-59.
8. Aniulis E, Japertas S, Leiputė K. Karvių pieno kokybės analizė, atsižvelgiant į somatinių ląstelių skaičių. *Vet Med Zoot* 2000;8(30):5-8.
9. Artym J. Role of lactoferrin in iron administration in the organism. Part II. Antimicrobial and antiinflammatory action by an iron sequestration. *Postepy Hig Med Dosw* 2010;64:604-16.
10. Aslam M, Jimenez-Flores R, Kim HY, Hurley WL. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins of bovine mammary gland secretions collected during the dry period. *J Dairy Sci* 1994;77(6):1529-36.
11. Atanasova J, Ivanova I. Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins. *Biotechnol Biotech Eq* 2010;24(2):1799-1803.
12. Auldish MJ, Hubble IB. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Aust J Dairy Technol* 1998;53:28-36.
13. Auldish MJ, Walsh BJ and Thomson NA. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J Dairy Res* 1998;65:401-11.
14. Bagnicka E, Strzalkowska N, Jozwik A, Krzyzewski J, Horbanczuk JO, Zwierzchowski L. Defensins in farm animals, their expression and polymorphism. *Acta Biochim Pol* 2010;57(4):487-97.

15. Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11:463-72.
16. Bannerman DD. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. J Anim Sci 2009;87:10-25.
17. Bar E, Foris I, Miron M, Bojita M, Mihai G. Determination of the content of Immunoglobulin (IgG) and Lactoferrin in bovine colostrum-comparative study. Bulletin UASVM Anim Sci and Biotech 2009;66(1-2):157-61.
18. Barbano DM. Influence of mastitis on cheese manufacturing. In: Practical Guide for Control of Cheese Yield, International Dairy Federation, Brussels, Belgium; 1999. p. 19-27.
19. Barbano DM, Rasmussen RR, Lynch JM. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. J Dairy Sci 1991;74:369-88.
20. Barkema HW, Deluyker HA, Schukken YH, Lam TJGM. Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. Prev Vet Med 1999;38:1-9.
21. Basoglu A, Camkerten I, Servinc M. Serum imunoglobulin concentrations in diarrhetic calves and their measurment by single radial immunodiffusion. J Vet Med 1999;54(1):9-10.
22. Batavani RA, Asri S and Naebzadeh H. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. Iranian J Vet Res 2007; 8:205-11.
23. Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S and Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Med Microbiol Immunol(Berl) 1993;182:97-105.
24. Berglund I, Pettersson G, Ostensson K, Svennersten-Sjaunja K. Quarter Milking for Improved Detection of Increased SCC. Reprod Dom Anim 2007;42:427-32.
25. Bernatowicz E, Reklewska B, Zdziarski K, Karaszewska A. Poziom bioaktywnych składników w mleku krow zależnie od zdrowia gruczołu mlekowego. Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego 2004; 72(1):185-93. [in Polish]
26. Biziulevičius GA, Kazlauskaitė J. Prospects for in situ within a host enzymatic production of immunostimulatory microbial lysis products. Central European Journal of Immunology, 2008;33:159.
27. Blowey RW, Edmondson P, editors. Mastitis control in dairy herds. 2nd ed. London: Cabi Publisher; 2010.

28. Bobe G, Beitz DC, Freeman AE, Lindberg GL. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Agr Food Chem* 1998;46:458-63.
29. Bortolami A, Fiore E, Giancesella M, Corro M, Catania S, Morgante M. Evaluation of the udder health status in subclinical mastitis affected dairy cows through bacteriological culture, somatic cell count and thermographic imaging. *Pol J Vet Sci* 2015;18(4):799-805.
30. Bosselaers IEM, Caessens PWJR, Boekel MAJS, Van Alink GM. Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food Chem Toxicol* 1994;32: 905-9.
31. Bounous G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res* 2000;20:4785-92.
32. Brener J, Shemesh M, Shore LS, Friedman S, Bider Z, Moalem U, Trainin Z. A possible linkage between gonadal hormones, serum and uterine levels of IgG of dairy cows. *Vet Immunol Immunoptahol* 1995;47:179-84.
33. Brew K, Grobler JA. alpha-Lactalbumin. In: Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry, Proteins*. New York: Elsevier Sci Publ Ltd; 1992.
34. Bridonneau P, Lederer F. Behavior of human immunoglobulin G subclasses on thiophilic gels: comparison with hydrophobic interaction chromatography. *J Chromat* 1993;616:197-204.
35. Brodziak A, Barłowska J, Krol J, Litwinczuk Z. Effect of breed and feeding system on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Ann Anim Sci* 2012; 12(2):261-9.
36. Brodziak A, Krol J, Barłowska J, Litwinczuk Z. Effect of production season on protein fraction content in milk of various breeds of goats in Poland. *Int J Dairy Technol* 2014;67(3):410-4.
37. Bruckmaier RM, Blum JW. Oxytocin release and milk removal in rumin. ants. *J Dairy Sci* 1998;81:939-49.
38. Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin N Am-Food Animal Pract* 2003;19:1-45.
39. Burvenich C, Detilleux J, Paape M, Massart-Leen A. Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. In: Zecconi A. editor. *Proceedings of the IDF Symposium on Immune Ruminant Mammary Gland*. Stresa, Italy; 2000. p. 9-20.
40. Burvenich C, Guidry AJ, Paape MJ. Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland. In: *Proceedings of the 3rd international mastitis seminar*. The National Mastitis Reference Center,

- Kimron Veterinary Institute. Beit-Dagan, Israel; 1995. p. 3-13.
41. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;34:521-64.
 42. Carlsson A, Bjorck L. The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *Milchwissenschaft* 1987;42:282-85.
 43. Carlsson A, Bjorck L, Persson K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *J Dairy Sci* 1989;72:3166-75.
 44. Cartoni GP, Coccioli F, Jasionowska R, Masci M. Determination of cow milk in buffalo milk and Mozzarella cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Italian J Food Sci* 1998;2:127-31.
 45. Chaneton L, Bonta M, Pol M, Tirante L, Bussmann LE. Milk lactoferrin in heifers: Influence of health status and stage of lactation. *J Dairy Sci* 2013;96(8):4977-82.
 46. Chaneton L, Tirante L, Maito J, Chaves J, Bussmann LE. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2008;91:1865-73.
 47. Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – technological implications for processing. *Intern Dairy J* 2006;16:1229-40.
 48. Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY et al. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J Dairy Sci* 2008;91:970-6.
 49. Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE. Biodefence properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr Pharmaceut* 2003;9:1239-55.
 50. Collin R, McLaren R, Thomson M, Malcolm D. Development and validation of a nephelometric immunoassay for IgG1 in milk. *Intern J Dairy Sci* 2002; 69:27-35.
 51. Compton CWR, Cursons RTM, Barnett CME and Mc-Dougall S. Expression of innate resistance factors in mammary secretion from periparturient dairy heifers and their association with subsequent infection status. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;127:357-64.
 52. Conesa C, Lavilla M, Sanchez L, Perez MD, Mata L, Razquin P, Calvo M. Determination of IgG levels in bovine bulk milk samples from different regions of Spain. *Eur Food Res Technol* 2005; 220:222-5.
 53. Coulon JB, Gasqui P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P and Pomies D. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition

- during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Anim Res* 2002;51:383-93.
54. Coulon JB, Hurtaud C, Remond B, Verite R. Factors contributing to variation in the proportion of casein to cows' milk true protein: a review of recent INRA experiments. *J Dairy Res* 1998;65:375-87.
 55. Curadi MC, Orlandi M, Greppi GF, Toppino PM, Barzaghi S, Cattaneo TMP. Identification of protein fractions in mares colostrum and milk. *Milchwissenschaft* 2000;55:446-9.
 56. Danowski K, Gross JJ, Meyer HHD, Klie H. Effects of induced energy deficiency on lactoferrin concentration in milk and the lactoferrin reaction of primary bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Anim Physiol An N* 2012;97:647-55.
 57. David AD, Paul AG and Joanne MM. Forms of lactoferrin: Their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 1993;76:2597-606.
 58. de Jong N, Visser S, Olieman C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *J Chrom A* 1993;652:207-13.
 59. de Wit JN. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci* 1998;81:597-608.
 60. Dego OK, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart* 2002;24:181-98.
 61. Diarra MS, Petitelere D, Lacasse P. Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2002;85:1141-9.
 62. Dionysius DA and Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci* 1997;80:667-74.
 63. Dohoo IR and Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J* 1982;23:119-25.
 64. Dračková M, Borkovcova I, Janšтова B, Naiserova M, Pridalova H, Navratilova P, Vorlova L. Determination of Lactoferrin in goat milk by HPLC method. *Czech J Food Sci* 2009;27:102-4.
 65. Drobni P, Naslund J and Evander M. Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake in vitro. *Antiviral Res* 2004;64:63-8.
 66. Eihvalde I, Kairisa D, Zagorska J. Analysis of factors influencing immunoglobulin concentration in colostrum of dairy cows. *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi* 2012;57:256-9.
 67. Elbably MA, Emeash HH and Asmaa NM. Risk factors associated with mastitis occurrence in dairy herds in Beni-Suef Governorate. *World's*

- Vet J 2013;3(1):5-10.
68. Elfstrand L, Lindmark-Mansson H, Paulsson M, Nyberg L, Akesson B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *Intern J Dairy Sci* 2002;12:879-87.
 69. Elgar DF, Norris CS, Ayers JS, Pritchard M, Otter DE, Palmano KP. Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase highperformance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *J Chromatogr A* 2000;878(2):183-96.
 70. El-Loly MM. Bovine milk immunoglobulins in relation to human health. *Inter J Dairy Sci* 2007;2(3):183-95.
 71. El-Loly MM, Farrag AF. Isolation of immunoglobulin-rich fractions from whey. *Milchwissenschaft* 2007;62(2):199-202.
 72. El-Zahar K, Sitohy M, Choiset Y, Metro F, Haertle T, Chobert JM. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft* 2004;59:653-6.
 73. Enne G, Elez D, Fondrini F, Bonizzi I, Feligini M, Aleandri R. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. *J Chromatogr A* 2005;1094:169-74.
 74. Ensminger AH, Esminger MKJ. Food for Health: A Nutrition Encyclopedia. Pegus Press: Clovis, California, USA. 1986.
 75. Erasmus LJ, Hermansen JE, Rulquin H. Nutritional and management factors affecting milk protein content and composition. *Bulletin of the International Dairy Federation* no 366; 2001. p. 49-61.
 76. Fadlelmoula AA, Fahr RD, Anacker G, Swalve HH. The Effect of management factors on somatic - cell counts and specific mastitis causing pathogens in large scale dairy units. *Res J Anim Vet Sci* 2007;2:24-7.
 77. Fadlelmoula A. The Management practises associated with prevalence and risk factors of mastitis in large scale dairy farms in Thuringia - Germany. *Aust J Basic and Applied Sci* 2007;1(4):619-24.
 78. Farrell HM, Bede MJ, Enyeart JA. Binding of p-nitrophenyl phosphate and other aromatic compounds by b-LG. *J Dairy Sci* 1987;70: 252-8.
 79. Fee JC and Chand A. Capture of lactoferrin, and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Sep Puri Tech* 2006;48:143-9.
 80. Ferreira I, Cacote H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-

- lactoglobulins. *J Chrom A* 2003;1015:111-8.
81. Fox PF. Milk Proteins: General and Historical Aspects. In: Fox PF and McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic; 2003.
 82. Gapper LW, David EJ, Copestake DEJ, Otter DE, Indyk HE. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:93-109.
 83. Garcia-Mantoya IA, Cendon TS, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochem Bioph Acta* 2012;1820(3):226-36.
 84. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J* 2006;16:1315-23.
 85. Gellrich K, Meyer HHD, Wiedemann S. Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as short-term restricted feeding in early and mid-lactation. *Czech J Anim Sci* 2014;59(3):97-106.
 86. Gelsinger SL, Smith AM, Jones CM, Heinrichs AJ. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. *J Dairy Sci* 2015;98(6):4084-9.
 87. Goodman RE and Schanbacher FL. Bovine lactoferrin mRNA: Sequence, analysis and expression in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180(1):75-84.
 88. Green MJ, Green LE, Schukken YH, Bradley AJ, Peeler EJ, Barkema HW et al. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2004;87:1256-64.
 89. Grindal RJ, Walton AW, Hillerton JE. Influence of milk flow rate and streak canal length on new intramammary infection in dairy cows. *J Dairy Res* 1991;58:383-8.
 90. Gronlund U. The immune response during acute and chronic phase of bovine mastitis. Doctoral thesis, Sweden. 2004. p.127.
 91. Gulinski P, Mlynek K, Gorski T. The influence of some environmental and genetics factors on cows colostrums immunoglobulin content. *Acta Fytotech Zootech* 2006;9(4):121-3.[in Polish].
 92. Gulinski P, Niedzialek G, Salmonczyk E, Gorski T. Immunoglobulin content in colostrum of cows within select genetic and environmental factors. *Medycyna Wet* 2006;62(3):339-42. [in Polish]
 93. Hagiwara S, Kawai K, Anri A, Nagahata H. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J Vet Med Sci*

- 2003;65:319-23.
94. Hamann J. Relationship between somatic cell count and milk composition. *Bulletin of the International Dairy Federation* 2002;379:56-9.
 95. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* 1994;77:2103-12.
 96. Harmon RJ. Somatic cell counts: A primer. 40th Annual Meeting, National Mastitis Council, Reno, NV. USA 2001. p. 3-9.
 97. Heck JM, Van Valenberg HJ, Dijkstra J, Hooijdonk AC. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *J Dairy Sci* 2009;92:4745-55.
 98. Hennart PF, Brasseur DJ, Delogne-Desnoeck JB, Dramaix MM, Robyn CE. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin a content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status and parity of mother. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:32-9.
 99. Hibbitt KG, Craven N, Batten EH. Anatomy, Physiology and Immunology of the Udder. In: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H., Eddy RG, editors. *Bovine Medicine*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1995. p. 273-88.
 100. Hillerton JE, Berry EA. Treating mastitis in the cow/a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol* 2005;98:1250-5.
 101. Hiss S, Weinkauf C, Hachenberg S and Sauerwein H. Relationship between metabolic status and the milk concentrations of haptoglobin and lactoferrin in dairy cows during early lactation. *J Dairy Sci* 2009;92:4439-43.
 102. Hogan J, Smith KL. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003;34:507-19.
 103. Horiguchi N, Horiguchi H, Suzuki Y. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:2445-9.
 104. Hurley WL and Theil PK. Immunoglobulins in Mammary Secretions. In: Fox PF and McSweeney PLH, editors. *Advanced Milk Chemistry*. Vol. 1- Proteins: Basic Aspects. 4th edition: New York: Springer Publishers; 2013.
 105. Hutton CT, Fox LK, Hancock DD. Mastitis control practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 1990;73(4):1135-43.
 106. Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 1993;61:719-28.
 107. Yoshida S. Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey. *J Dairy Sci* 1989;72:1446-50.
 108. Janosi S, Baltay Z. Correlations among the somatic cell count of

individual bulk milk, result of the california mastitis test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Vet Hung* 2004; 52(2):173-83.

109. Japertienė R. Karvių tešmens fiziologinių, morfologinių savybių įvertinimas, jų ryšys su produktyvumu ir tešmens sveikumo rodikliais. *Daktaro disertacija*. 2007. p. 4-30.
110. Jensen DL and Eberhart RJ. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am J Vet Res* 1981;42(5):743-7.
111. Jenssen H. Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin – an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:3002-13.
112. Juozaitienė V. Karvių tešmens ketvirčių išsivystymo morfologinių ir fiziologinių rodiklių ryšio su karvių produktyvumu bei tešmens sveikumu panaudojimo pieninių galvijų selekcijoje tyrimai. Žemės ūkio, maisto ūkio ir žuvininkystės moksliniai tyrimai ir taikomoji veikla. 2014 metų galutinė ataskaita. Prieiga per internetą: https://zum.lrv.lt/uploads/zum/documents/files/LT_versija/Veiklos_sritys/Mokslas_mokymas_ir_konsultavimas/Moksliniu_tyrimu_ir_taikomosios_veiklos_darbu_galutines_ataskaitos/1darbas2014.pdf
113. Juozaitienė V, Anskienė L. Statistinė duomenų analizė su SPSS gyvulininkystėje ir veterinarijoje. Kaunas: LSMU Leidybos namai; 2014.
114. Juozaitienė V, Šlyžius E, Žymantienė J, Oberauskas V, Čukauskas V, Tušas S, Januškevičius A. Skirtingų laktacijų karvių hematologinių ir pieno sudėties rodiklių fenotipinių ryšių tyrimai. *Vet Med Zoot* 2008; 44(66):50-5.
115. Juozaitienė V, Tušas S, Šlyžius E. Karvių tešmens išsivystymo ir melžimo savybių įvertinimas. *Vet Med Zoot* 2007;38(60):17-21.
116. Juozaitienė V, Žakas A. Paveldimumo įtaka somatinių ląstelių skaičiui juodmargių karvių piene. *Vet Med Zoot* 2002;17(39):72-4.
117. Kawai K, Nagahata H, Lee NY, Anri A, Shimazaki K. Effect of infusing lactoferrin hydrolysate into bovine mammary glands in sub-clinical mastitis. *Vet Res Commun* 2003;27:539-48.
118. Kawai K, Shimazaki K, Higuchi H, Nagahata H. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health* 2007;54:160-4.
119. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007. p. 6-11.
120. Kehrli ME and Harp JA. Immunity in the mammary gland. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 2001;17:495-516.

121. Kelly AL, Tiernan D, O'Sullivan C, Joyce P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *J Dairy Sci* 2000;83:300-4.
122. Khan MS, Dwivedi S, Priyadarshini M, Tabrez S, Siddiqui MA, Jagirdar H et al. Ribosylation of bovine serum albumin induces ROS accumulation and cell death in cancer line (MCF-7). *Eur Biophys J* 2013;42:811-8.
123. Kharb S, Singh V, Ghalaut PS, Sharma A, Singh GP. Glutathione levels in health and sickness. *Indian J Med Sci* 2000;54:52-4.
124. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby Immunology* (6 edition). New York: Freeman WH and Company; 2007.
125. Kitchen BJ. Review of the progress of dairy science. Bovine mastitis: milk composition changes related to diagnostic tests. *J Dairy Res* 1981;48:167-88.
126. Klimienė I, Mockeliūnas R, Butrimaitė-Ambrozevičienė Č, Sakalauskienė R. Karvių mastitas. *Tyrimai Lietuvoje. Vet Med Zoot* 2005; 31(53):67-76.
127. Kocina I, Antane V, Lusi I. The Concentration of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. *Proc Latv Univ Agr* 2012;27(322):44-53.
128. Koivula M, Mantysaari EA, Negussie E, Serenius T. Genetic and Phenotypic Relationships Among Milk Yield and Somatic Cell Count Before and After Clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2005;88:827-33.
129. Kolkman H, Zielak-Steciwo A, Nowakowski P. Lactoferrin an antimicrobial protein of bovine milk: a review. *Zesz Nauk UP Wroc, Biol Hod Zwierz, LXI*. 2010;579:177-85.
130. Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G, Levieux D. Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and Hybrids) from Kazakhstan. *J Dairy Sci* 2007;90(1): 38-46.
131. Korhonen H. Isolation of immunoglobulins from colostrums. *IDF Bulletin*; 2004;389:78-84.
132. Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Funct Foods* 2009;1(2):177-87.
133. Korhonen H, Kaartinen L. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S, editors. *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, Finland; 1995. p. 76-82.
134. Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Milk immunoglobulins and com-

- plement factors. *Brit J Nutr* 2000;84:75-80.
135. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides from food proteins In: Hui YH, editor. *Handbook of food products manufacturing*. John Wiley & Sons, Inc; 2007. p. 5-37.
 136. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 2007;9:1297-308.
 137. Krol J, Brodziak A, Litwinczuk Z, Barłowska J. Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. In: Bobbarala V, editor. *A search for antibacterial agents*. InTech; 2012. P. 107-124.
 138. Krol J, Brodziak A, Litwińczuk Z, Litwińczuk A. Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Pol J Vet Sci* 2013;16(2):395-7.
 139. Krol J, Litwinczuk A, Zarajczyk A, Litwinczuk Z. Alpha-laktoalbumina i beta-laktoglobulina jako związki biologicznie czynne frakcji białkowej mleka (Alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin as biologically active substances in proteinous fraction of milk). In Polish, summary in English. *Medycyna Weterynaryjna*. 2008;64:1375-8.
 140. Krol J, Litwinczuk Z, Brodziak A, Barłowska J. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cow's managed under intensive production system. *Pol J Vet Sci* 2010;13:357-61.
 141. Kromker V, Grabowski NT, Redetzky R and Hamann J. Detection of mastitis using selected quarter milk parameters. 2nd Intl Symp Bovine Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada; 2001. p. 486-7.
 142. Kuczaj M. Analysis of changes in udder size of high-yielding cows in subsequent lactations with regard to mastitis. *Electron J Pol Agric Univ Ser Anim Husb* 2003;6(1). Internetinè prieiga: <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/animal/art-02.html>
 143. Kupiec T. Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *Int J Pharm Compound* 2004;8(3):223-7.
 144. Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, Kamata S, Kumagai K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J Vet Med Sci* 2003;65(8): 899-906.
 145. Kutila T, Suojala L, Lehtolainen T, Saloniemi H, Kaartinen L, Tahti M, Sepala K, Pyorala S. The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Vet Pharm Ther* 2004;27:197-202.

146. Larson BL. Immunoglobulins of the mammary secretions. In: Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry 1-Proteins*. London: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 231-54.
147. Larson BL. Mechanisms of Milk Synthesis Progress and Projections. In: Larson BL, editor. *The Mammary Gland/Human Lactation/ Milk Synthesis*. Academic Press, INC: Published by Elsevier Inc; 1978. p. 367-70.
148. Laursen I, Briand P, Lykkesfeldt AE. Serum albumin as a modulator of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 1990;10: 343-52.
149. Laval A. Antibiotics and immunity. *Pro Veterinario*, France. 1989. p. 4-5.
150. Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merin U, Ezra E, et al. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *J Dairy Sci* 2004a;87:46-52.
151. Leitner G, Merin U and Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci* 2004b;87:1719-26.
152. Leman J. Bioaktywne białka serwatkowe. *Przegląd Mleczarski*. 1995;3. P:65-8. [in Polish]
153. Leonil J, Molle M, Gaucheron F, Arpino P, Guenot P, Maubois JL. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Lait* 1995;75:193-210.
154. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 1995;80:252-67.
155. Levieux D, Ollier A. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res* 1999;66(3):421-30.
156. Levin S, editor. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis. In book: *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia. Analysis and Pharmaceutical Quality*. 2010. Internetinè prieiga: <http://www.enisonlabs.com/Highproc.20Performanceproc.20Liquidproc.20Chromatographyproc.20inproc.20theproc.20Pharmaceuticalproc.20Analysis.pdf>
157. Li-Chan ECY, Kummer A. Influence of Standards and Antibodies in Immunochemical Assays for Quantitation of Immunoglobulin G in Bovine Milk. *J Dairy Sci* 1997;80:1038-46.
158. Lindmark-Mansson H. Bioactive proteins in bovine milk - Studies on glutathione peroxidase, lactoferrin and immunoglobulins. PhD thesis, Lund University, Lund, Sweden. 2000.

159. Lindmark-Mansson H, Branning G, Alden G, Paulsson M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *Int Dairy J* 2006;16:717-27.
160. Lindmark-Mansson H, Svensson U, Paulsson M, Alden G, Frank B, Johnsson G. Influence of milk components, somatic cells and supplemental zinc on milk processability. *Int Dairy J* 2000;10:423-33.
161. Lindsay MN, William DH, Keith WK. Genetic Differences in Concentration of Immunoglobulins G₁ and M in Serum and Colostrum of Cows and in Serum of Neonatal Calves. *American Society of Animal Science* 1982;53(6):1465-72.
162. Linn JG, editor. Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows. In book: *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1988.
163. Linzell JL, Peaker M. Mechanism of milk secretion. *Physiol Rev* 1971;51:564-97.
164. Litwinczuk Z, Krol J, Brodziak A, Barłowska J. Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. *J Dairy Sci* 2011;94(2): 684-91.
165. Liu GL, Wang JQ, Bu DP, Cheng JB, Zhang CG, Wei H. Y., et al. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *Vet J* 2009;182:79-85.
166. Liu HC, Cheng WL and Mao SJT. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. *J Dairy Sci* 2007;90:547-55.
167. Liutkevičius A, Sekmokienė D, Kulikauskienė M. Funkcionalusis maistas. KTU Maisto institutas. 2008. p. 17-21.
168. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1537-43.
169. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93-110. Internetinė prieiga: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.15.070195.000521>
170. Losnedahl KJ, Wang H, Aslam M, Zou S and Hurley WL. Antimicrobial Factors in Milk. *Illini Dairy Net Papers*, University of Illinois. 1998.
171. Mackle TR, Bryant AM, Petch SF, Hooper RJ, Auldist MJ. Variation in the composition of milk protein from pasture-fed dairy cows in late lactation and the effect of grain and silage supplementation. *New Zeal J Agr Res* 1999;42:147-54.
172. Madouasse A, Browne WJ, Huxley JN, Toni F, Bradley AJ, Green MJ. Risk factors for a high somatic cell count at the first milk recording in a large sample of UK dairy herds. *J Dairy Sci* 2012;95: 1873-84.

173. Malaczewska J, Rotkiewicz Z. Lactoferrin as a multipotential protein. *Medycyna Wet* 2007;63(2):136-9.
174. Malinowski E, Klossowska A, Smulski S. Changes in biologically active cow's milk components caused by mastitis. *Medycyna Wet* 2008;64(1):14-9.
175. Marnila P and Korhonen H. Immunoglobulins. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF, editors. *Encyclopedia of dairy sciences*. London, UK: Academic Press; 2002. p. 1950-6.
176. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med* 2004;9:136-56.
177. McMaster M, editor. *HPLC, A Practical User's Guide*. 2nd ed. New Jersey: Wiley Interscience, Hoboken; 2007.
178. Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharmaceut* 2003; 9:1289-95.
179. Mian-bin W, Yin-jun X. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion Exchange chromatography. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2009;14:155-60.
180. Mount JA, Karrow NA, Caswell JL, Boermans HJ, Leslie KE. Assessment of bovine mammary chemokine gene expression in response to lipopolysaccharide, lipoteichoic acid + peptidoglycan, and CpG oligodeoxynucleotide 2135. *Can J Vet Res* 2009;73:49-57.
181. Mullan NA, Carter EA, Nguyen KA. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. *Res Vet Sci* 1985;38(2):160-6.
182. Musayeva K, Sederevičius A, Želvytė R, Stankevičius R. Analysis of factors influencing immunoglobulin G in milk of dairy cows. *Vet Med Zoot* 2015;72(94):25-9.
183. Nevilie MC, McFadden TB and Forsyth I. Hormonal Regulation of Mammary Differentiation and Milk Secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(1):49-66.
184. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J Dairy Sci* 1987;70:563-70.
185. Noppe W, Plieva FM, Galaev IY, Vanhoorelbeke K, Mattiasson B, Deckmyn H. Immobilised peptide displaying phages as affinity ligands purification of lactoferrin from defatted milk. *J Chromat A* 2006;1101:79-85.
186. O'Mahony F, editor. *Rural Dairy Technology: Experiences in Ethiopia*; 1988. p.12.

187. Ostersen S, Foldager J, Hermansen JE. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J Dairy Res* 1997;64:207-19.
188. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infec* 2007;54:399-409.
189. Ozkara S, Yavuz H, Denizli A. Purification of immunoglobulin G from human plasma by metalchelate affinity chromatography. *J Appl Polym Sci* 2003;89:1567-72.
190. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003;34:597-627.
191. Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Dettloux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(2):109-21.
192. Palmano KP, Elgar DF. Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *J Chromat A* 2002; 947:307-11.
193. Pan Y, Lee A, Wan J, Coventry MJ, Michalski WP, Shiell B, Roginski H. Antiviral properties of milk proteins and peptides. *Int Dairy J* 2006;16:1252-61.
194. Pan Y, Rowney M, Guo R, Tobman P. Biological properties of lactoferrin: an overview. *Aust J Dairy Technol* 2007;62:3-42.
195. Park YW, editor. Bioactive components in milk and dairy products. 2nd. Wiley-Blackwell, USA. 2009. p. 15.
196. Parodi PW. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr Pharm Des* 2007;13:813-28.
197. Pauliukas K, Šidiškis AR, Urbonavičius A, Šerėnas K. Juodmargių karvių pieno sudėties ir kokybės rodiklių kaita veikiant laktacijai ir kitiems faktoriams. *Vet Med Zoot* 2005;30(52):67-71.
198. Pečiulionienė I, Pauliukas K. Pieno sudėties ir kokybės kitimas, esant skirtingam karvių šėrimui įvairiuose Lietuvos Respublikos regionuose. Tarptautinė konferencija „Gyvulių mitybos indėlis įprastinės ir ekologinės gyvulininkystės vystymui Lietuvoje“, LVA. Kaunas. 2004. p. 74-6.
199. Pellegrini A. Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr Pharmaceut* 2003;9:1225-38.
200. Persson K, Larsson I, Hallen SC. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet Im-*

- munol Immunopathol 1993;37:99-112.
201. Petrovski KR, Trajcev M, Buneski G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. J S Afr Vet Assoc 2006;77:53-60.
 202. Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Vet Res 2008;39(2):18.
 203. Philipot NW, Nickerson CS, Rutkauskas A, Tušas S, editors. Kaip laimėti kovą prieš mastitą. Kaunas: Vitae Litera; 2011. p.167.
 204. Philipsson J, Ral G, Berglund B. Somatic cell count as a selection criteria for mastitis resistance in dairy cattle. Livest Prod Sci 1995; 41:195-200.
 205. Piccinini R, Binda E, Belotti M, Dapra V, Zecconi A. Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. J Dairy Res 2007;74:226-32.
 206. Piccinini R, Mirelli M, Ferri B, Tripaldi C, Belotti M, Dapra V, et al. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. J Dairy Res 2006;73:129-33.
 207. Pierce A, Legrand D. Advances in lactoferrin research. Biochimie 2009;91:1-2.
 208. Pieškus J. Veterinarinės imunologijos pagrindai. Kaunas: Terra Publica; 2001. p. 120-40.
 209. Pihlanto A, Korhonen H. Bioactive peptides and proteins. In: Taylor SL, editor. Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc San Diego, CA. 2003. p. 175-276.
 210. Pyorala S. Indicators of inflammations in the diagnosis of mastitis. Vet Res 2003;34:565-78.
 211. Pyorala S. New Strategies to Prevent Mastitis. Reprod Dom Anim 2002;37:211-6.
 212. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. Vet Microbiol 2009;134:3-8.
 213. Plate K, Beutel S, Buccholz H, Demmer W, Fischer-Fruhholz S, Reif O, et al. Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase, and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. J Chromat A 2006;1117:81-6.
 214. Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet Res 2006;37:369-400.
 215. Rainard P, Riollot C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. Reprod Nutr Dev 2003;43:439-57.
 216. Ray DE, Halbach TJ, Armstrong DV. Season and lactation number

- effects on milk yield and reproduction of dairy cattle in Arizona. *J Dairy Sci* 1992;75(11):2976-83.
217. Rivas AL, Quimby FM, Blue J, Coksaygan O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:399-407.
 218. Robert-Granie C, Foulley JL, Maza E, Rupp R. Statistical analysis of somatic cell scores via mixed model methodology for longitudinal data. *Anim Res* 2004;53:259-73.
 219. Rogers GW, Banos G, Sander Nielsen U, Philipsson J. Genetic Correlations Among Somatic Cell Scores, Productive Life, and Type Traits from the United States and Udder Health Measures from Denmark and Sweden. *J Dairy Sci* 1998;81(5):1445-53.
 220. Romero C, Perez-Andujar O, Olmedo A, Jimenez S. Detection of Cow's Milk in Ewe's or Goat's Milk by HPLC. *Chromatographia* 1996;42:181-4.
 221. Rounds MA, Gregory JFI. High Performance Liquid Chromatography. In: Nielsen S, editor. *Food Analysis*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic; 2003. p. 463-78.
 222. Rudejeviënė J. Karvių slaptasis mastitas. Kaunas; 2007. p. 11-45.
 223. Ruprichova L, Kralova M, Borkovcova I, Vorlova L, Bedanova I. Determination of whey proteins in different types of milk. *Acta vet Brno* 2014;83:67-72.
 224. Sandholm M. Detection of inflammatory changes in the milk. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S, editors. *The Bovine Udder and Mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, Finland; 1995. p. 89-104.
 225. Sandholm M, Pyorala S. Diagnostics of mastitis. Clinical examination of a mastitic cow. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S, editors. *The Bovine Udder and Mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, Finland; 1995. p. 83-8.
 226. Sawyer L. β -Lactoglobulin. In: Fox PF, McSweeney P, editors. *Advanced Dairy Chemistry I*. 3rd ed. Kluwer, Amsterdam, The Netherlands; 2003. p. 319-86.
 227. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res* 2003;34:579-96.
 228. Schwarz D, Diesterbeck US, Failing K, König S, Brügemann K, Zschock M, et al. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany-a longitudinal study. *J Dairy Sci* 2010;93(12):5716-28.
 229. Sekmokienė D, Liutkevičius A, Malakauskas M. Funkcionalusis mai-

- stas ir jo veikliosios dalys. *Vet Med Zoot.* 2007;37(59):72-78.
230. Severin S, Wenshui X. Milk biologically active components as nutraceutical. *Review Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:645-56.
 231. Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ. Expression of albumin in non-hepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2005;88:569-76.
 232. Sharif A, Muhammad G. Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: A review. *Pakistan Vet J* 2008;28(4):194-200.
 233. Sharma N, Rho GJ, Hong H, Kang TY, Lee HK, Hur T, Jeong D. Bovine mastitis: an Asian perspective. *Asian J Anim Vet Advan* 2012; 7(6):454-76.
 234. Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Aust J Anim Sci* 2011;24(3): 429-38.
 235. Shennan DB, Peaker M. Transport of Milk Constituents by the Mammary Gland. *Physiol Rev* 2000;80(3):925-51.
 236. Shimazaki KI. Lactoferrin: a marvelous protein in milk? *Anim Sci J* 2000;71:329-47.
 237. Shimazaki K, Tsuda H, Tomita M, Kuwata T, Perraudin JP, editors. In: Lactoferrin: structure, function and applications. Proceedings of the 4th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, held in Sapporo, Japan, 18-22 May 1999. 2000. p. 465.
 238. Singh K, Davis SR, Dobson JM, Molenaar AJ, Wheeler TT, Prosser CG, et al. cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are up-regulated during involution of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2008;91:2236-46.
 239. Syvaoga EL, Korhonen H. Determination of colostral immunoglobulins by gel filtration chromatography. *International Dairy Federation (IDF)*; 1993. p. 216-19.

240. Skimundris V. Pieno savybės ir jo kokybės gerinimo būdai. Dotnuva. Akademija. 1997. p. 7-30.
241. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Instrumental Analysis. Cengage Learning; 6th edition. 2007.
242. Skrzypek R, Wojtowski J, Fahr RD. Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk: A case study from Poland. *J Vet Med A* 2004;51:127-31.
243. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI. Protection of albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. *Food Chem Toxicol* 1992;30:483-9.
244. Smith KL. A discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell counts and clinical mastitis. *Bull IDF* 2002;372:43-5.
245. Smolenski G, Haines S, Kwan FY, Bond J, Farr V, Davis SR, Stelwagen K, Wheeler TT. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomics approach. *J Proteome Res* 2007;6:207-15.
246. Sobczuk-Szul M, Wielgosz-Groth Z, Nogalski Z, Pogorzelska-Przybyłek P. Changes in the content of whey proteins during lactation in cow's milk with a different somatic cells count. *Vet Med Zoot* 2014;65:79-84.
247. Soyeurt H, Colinet FG, Arnould MR, Dardenne P, Bertozzi C, Renaville R, et al. Genetic variability of lactoferrin content estimated by mid-infrared spectrometry in bovine milk. *J Dairy Sci* 2007;90: 4443-50.
248. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(2):135-46.
249. Spadaro M, Caorsi C, Ceruti P, Varadhachary A, Forni G, Pericle F, Giovarelli M. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J* 2008;22:2747-57.
250. Staniškienė B, Šernienė L, Šiugždaitė J. Pieno ir jo produktų kokybės įvertinimas. Kaunas: Naujasis lankas. 2007. p. 256.
251. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* 2009; 87(1):3-9.
252. Stelwagen K, Farr VC, McFadden HA, Prosser CG, Davis SR. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *Am J Physiol* 1997;273:379-86.
253. Sternhagen LG, Allen JC. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein α -lactalbumin. *Adv Exp Med Biol* 2001;501:115-20.

254. Stoliuk V, Valchuk O. Mastitis in Ukrainian cows – effective ways to solve the problem. *International Dairy Topics* 2011;10(5):13-7.
255. Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005;31(1):72-86.
256. Strohmaier W. Chromatographic fractionation of whey proteins. *IDF, Bulletin* 2004;389:29-35.
257. Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielsen M, Brand A. Low somatic cell count: A risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci* 2000;83:1248-55.
258. Szwajkowska M, Wolanciuk A, Barłowska J, Krol J, Litwinczuk Z. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review. *Anim Sci Pap Rep* 2011; 29(4):269-80.
259. Šimkienė A, Juozaitienė V. Įvairių veiksnių įtakos laktozės kiekiui karvių piene tyrimai. *Vet Med Zoot* 2007;39(61):81-5.
260. Tancin V, Uhrinča M, Mihina Š, Sudzinova J, Foltys V, Tančinova D. Somatic cell count and quarter milk flow parameters from udder of dairy cows. *Slovak J Anim Sci* 2007;40(2):79-82.
261. Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT, Pyörälä S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci* 2009;92:2610-17.
262. Thakkar A, Kaushal R, Navneet K, Ashutosh U, Suri OP. High-performance liquid chromatography detectors. *Int J Pharm Technol* 2011; 2(5):1-7.
263. Tilki M, Inal S, Colak M, Garip M. Relationships between milk yield and udder measurements in Brown Swiss Cows. *Turk J Vet Anim Sci* 2005;29:75-81.
264. Tyler JW, Cullor JS. Mammary gland health and disorders. In: Smith BP, editor. *Large animal internal medicine*. 3rd ed. London, Mosby; 1990. p. 1019-22.
265. Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Ivatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 2009;9(1):52-7.
266. Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J Agric Food Chem* 2000;48:1473-8.
267. Tripaldi C, Terramoccia S, Bartocci S, Angelucci M, Danese V. The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulation

- properties of mediterranean buffalo milk. *Asian-Aust. J Anim Sci* 2003;16:738-42.
268. Tsuji S, Hirata Y, Mukai F, Ohtagaki S. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *J Dairy Sci* 1990; 73(1):125-8.
 269. Tu YY, Chen CC, Chang JH, Chang HM. Characterization of lactoferrin (LF) from colostrum whey using anti-LF antibody immunoaffinity chromatography. *J Food Sci* 2002;67:996-1001.
 270. Turner SA, Thomson NA, Auldist MJ. Variation of lactoferrin and lactoperoxidase in bovine milk and the impact of level of pasture intake. *New Zeal J Agr Res* 2007;50:33-40.
 271. Urbienė S. Pieno ir jo sudedamųjų dalių biologinė reikšmė. Kaunas, ASU. 2015.
 272. Urbienė S. Pieno sudėtis ir savybės. Žaliava produktų gamybai. Kaunas. 2006. p. 19-62.
 273. Urech E, Puhan Z, Schallibaum M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. *J Dairy Sci* 1999;82:2402-11.
 274. Uzmay C, Kaya Y, Akbas Y, Kaya A. Effects of udder and teat morphology, parity and lactation stage on subclinical mastitis in Holstein cows. *Turk J Vet Anim Sci* 2003;27:935-941.
 275. Uzun L, Say R, Denizli A. Porous poly (hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography. *React Funct Polym* 2005;64:93-102.
 276. Valenti P, Berlutti F, Conte MP, Longhi C, Seganti L. Lactoferrin functions current status and perspectives. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(6):127-9.
 277. Veloso ACA, Teixeira N, Peres AM, Mendonca A, Ferreira I. Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chem* 2004;87:289-95.
 278. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol* 2009;27:486-93.
 279. Vijayalakshmi P, Prathaban S, Dhanapalan P. Comparative study on the efficacy of diagnostic tests in the field diagnosis of bovine mastitis. *Indian Vet J* 2001;78:4-6.
 280. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J* 2006;16:1241-51.
 281. Walsh M, Duncan S. Milk. In: Genevieve Ch, Scott S, editors. *Food Chemistry: Principles and Applications: Science Technology System*, West Sacramento; 2000. p. 291-310.
 282. Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, Van Boekel MAJS,

- editors. Dairy Technology - Principles of Milk Properties and Processes Food Science and Technology. New York: CRC Press; 1999. p. 702-727.
283. Walstra P, Wouters J, Geurts T, editors. Dairy Science and Technology. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 782.
 284. Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42:353-75.
 285. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 1988; 16:41-66.
 286. Wedholm A, Hallen E, Larsen LVB, Lindmark-Mansson H, Karlsson AvH, Allmere T. Comparison of milk protein composition in a Swedish and a Danish dairy herd using reversed phase HPLC. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 2006;56:8-15.
 287. Weinberg ED. Antibiotic properties and applications of lactoferrin. *Curr Pharm Des* 2007;13:801-11.
 288. Weiss D, Weinfurter M, Bruckmaier RM. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004;87:3280-9.
 289. Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT. Viral infections and bovine mastitis: A review. *Vet Microbiol* 2002;88:27-45.
 290. Wellnitz O, Bruckmaier RM. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J* 2012;192:148-152.
 291. Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR. Immune components of colostrum and milk—A historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:237-47.
 292. Wojdak-Maksymiec K, Mikolajczyk K. Interactions between TNF- α , LTF and mLYZ Gene Variants in Determining Somatic Cell Count in Jersey Cows. *Pak Vet J* 2012;32(4):477-82.
 293. Wood R, editor. The Whole Foods Encyclopedia; Prentice-Hall Press: New York, USA, 1988.
 294. Xu Y, Sleight R, Hourigan J, Johnson R. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropptide from dairy whey. *Process Biochem* 2000;36:393-9.
 295. Zagorska J, Ciproviča I, Mikelsons V. Evaluation of Antibodies Concentration in Cow's Milk from Different Agricultural Systems. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*. 2007;18(313):45-50.
 296. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog* 2006;40:177-83.

297. Žakas A. Genetinių ir aplinkos veiksnių įtaka karvių pieno kokybei pagal somatinių ląstelių skaičių. Daktaro disertacija. Biomedicininiai mokslai, zootechnika. 2002. p. 7-105.
298. Зобкова ЗС, Мишина АВ, Бегунова АВ. Антимикробные свойства лактоферрина. Молочная промышленность 2007;10:60-1.
299. Самохина ЛС, Головин МА, Комолова ГС, Ганина ВИ, Ионова ИИ, Шаталова ЕС. Антибактериальная активность лактоферрина из коровьего молока. Молочная промышленность 2012;7:56-7.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Thomson Reuters Web of Knowledge“ ir turinčiuose citavimo rodiklį:

Musayeva Kristina, Sederevičius Antanas, Želvytė Rasa, Monkevičienė Ingrida, Beliavska-Aleksiejūnė Danuta, Kerzienė Sigita. Concentration of lactoferrin and immunoglobulin G in cows' milk in relation to health status of the udder, lactation and season. Polish Journal of Veterinary Sciences. Warsaw: De Gruyter Open. (Original article). DOI 10.1515/pjvs-2016-0093. 2016. Vol.19(4). P. 737-744. Citavimo rodiklis: 0.719 (2015).

Recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse:

Kristina Musayeva, Antanas Sederevičius, Rasa Želvytė, Ingrida Monkevičienė, Danuta Beliavska-Aleksiejūnė, Sigita Kerzienė, Saulius Bliznikas. Quantitative analysis of whey proteins in relation to health status of the udder quarters and season. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2016. T. 73(95). Suppl. 2016. P. 95-98.

Musayeva Kristina, Sederevičius Antanas, Želvytė Rasa, Stankevičius Rolandas. Analysis of factors influencing immunoglobulin G concentration in milk of dairy cows. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2015. T. 72(94). P. 25-29.

KITOS PASKELBTOS PUBLIKACIJOS

1. **Kristina Musayeva**, Antanas Sederevičius, Ingrida Monkevičienė, Aldona Baltušnikienė, Janina Černauskienė, Sigita Kerzienė, Birutė Karvelienė, Rasa Želvytė. The influence of feeding rapseed pomace and extruded full fat soybean on the fatty acid profile in cows milk. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2016. T. 73(95). P. 69-72.

2. **Musayeva Kristina**, Sederevičius Antanas, Želvytė Rasa, Monkevičienė Ingrida, Beliavska-Aleksiejūnė Danuta, Stankevičius Rolandas. Relationship between somatic cell count and milk casein level obtained by two different methods. Czech Journal of Food Sciences (CJFS). Praha: Czech Academy of Agricultural Sciences. ISSN 1212-1800. 2016. Vol.34. No.1. P. 47-51. Citavimo rodiklis: 0.728 (2015).

3. Daiva Kondrotaitė, **Kristina Musayeva**, Rasa Želvytė, Vida Juozaitienė, Ingrida Monkevičienė, Antanas Sederevičius. Somatinių ląstelių ir inhibitorinių medžiagų karvių piene tyrimai ganykliniu laikotarpiu. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2013. T. 61 (83). P. 44-47.

DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE

Tarptautinės mokslinės konferencijos:

1. Tarptautinė mokslinė konferencija „11th Baltic Conference on Food Science and Technology“ “Food science and technology in a changing world” FOODBALT 2017: balandžio 27–28 d. 2017 m. Jelgava, Latvija. Konferencijos metu pristatytas standinis pranešimas tema: **„Detection and quantification of the milk proteins by RP-HPLC method“**.

2. Tarptautinė mokslinė konferencija „Vietinių pašarinių žaliavų panaudojimas gyvūnų mitybai: nauda ir apribojimai, susiję su virškinimo fiziologija bei jų įtaka produkcijos kokybei ir gyvūnų sveikatai“: 2016 m. spalio 6 d. Kaunas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Veterinarijos akademija. Konferencijos metu pristatytas standinis pranešimas tema: **„Quantitative analysis of whey proteins in relation to health status of the udder quarters and season“**.

3. 10-oji tarptautinė mokslinė konferencija “The Vital Nature Sign”: 2016 m. gegužės 19–20 d., Vilnius, Lietuva. Konferencijos metu pristatytas standinis pranešimas tema: **“Analysis of factors influencing selected whey proteins concentration in cow’s milk“**.

4. IDF Pasaulinis pienininkystės kongresas „Tvarios pienininkystės svarba tenkinant mitybos poreikius“: Vilnius, Lietuva, 2015 m. rugsėjo 20–24 d. Tarptautinė pienininkystės federacija (IDF). Kongreso metu pristatytas standinis pranešimas tema: **„Determination of immunoglobulins G in cows milk in relation with somatic cells count“**.

5. 17-asis tarptautinis veterinarinės medicinos studentų mokslinis kongresas „17th International Veterinary medicine students Scientific Research Congress“: 2015 m. balandžio 28–30 d. Stambulas, Turkija. Kongreso metu pristatytas standinis pranešimas tema: **„The Concentration of Immunoglobulins G in Different Breed Cows Milk in Relation with Cow Udder Health and Lactation“**.

Nacionalinės mokslinės konferencijos:

1. IX nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2016 balandžio 13 d. Kaunas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Konferencijos metu pristatytas žodinis pranešimas tema: **„Natūralių antimik-**

robinių baltymų kiekio kintamumo tyrimai sveikų ir sergančių tešmens uždegimu karvių piene skirtingų sezonų metu“.

2. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“: 2015 m. balandžio 10 d. Kaunas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Konferencijos metu pristatytas žodinis pranešimas tema: „**Imunoglobulino G dinamiškumas karvių piene skirtingais laktacijos tarpsniais priklausomai nuo veislės bei tešmens sveikatingumo“.**

DOI 10.1515/pjvs-2016-0093

Original article

Concentration of lactoferrin and immunoglobulin G in cows' milk in relation to health status of the udder, lactation and season

K. Musayeva¹, A. Sederevičius¹, R. Želvytė¹, I. Monkevičienė¹,
D. Beliauskas-Aleksiejūnė¹, S. Kerzienė²

¹ Department of Anatomy and Physiology, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Tiltžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

² Department of Physics, Mathematics and Biophysics, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

Abstract

The aim of this study was to analyze an effect of udder health status, somatic cell count (SCC), stage and number of lactations, and different seasons on the concentration of lactoferrin (LF) and immunoglobulin G (IgG) in quarter milk samples ($n=120$) from crossbreed (Lithuanian Black-and-White & Holstein) dairy cows. Quarter health status was based on SCC and microbiological analysis. The highest mean value of LF and IgG were observed in quarters with subclinical mastitis 0.1 ± 0.02 mg/ml and 0.41 ± 0.06 mg/ml, respectively. Grouping the data according to SCC revealed increased LF (0.07 ± 0.01 mg/ml as against 0.06 ± 0.01 mg/ml) and IgG values (0.27 ± 0.05 mg/ml as against 0.23 ± 0.02 mg/ml) in DQ (SCC from 201,000 $\geq$ 401,000 cells/ml) compared to HQ (SCC up to 200,000 cells/ml). The milk LF and IgG levels were affected by stage of lactation ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) and season of the year ($p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). Nevertheless, SCC and subsequent lactation ($p>0.05$) had no effect on these immunity components.

Key words: udder, milk, lactoferrin, immunoglobulin G, mastitis

Introduction

Among the ailments that affect dairy ruminants, mastitis plays a prominent part. The prevention and treatment of mastitis represent a serious burden to producers and are primary concerns of the dairy industry. Innate immunity is a target of choice for selec-

tion against infectious diseases (Rainard and Riollet 2006). Immune factors in colostrum and milk play an important role in the host defense of the mammary gland itself, protecting it from pathogenic organisms (Sordillo et al. 1997, Oviedo-Boyso et al. 2007). The mammary host defense system has evolved into an extremely well-developed, complex, and highly effec-

Correspondence to: K. Musayeva, e-mail: kristina.musayeva@lsmuni.lt

tive barrier against pathogens, integrating both the innate and acquired immune response. If the activity of the immunological system is reduced or the virulence of pathogenic microorganisms is high, infection, partly eliminated, may continue for a longer period, and this process becomes apparent as subclinical or chronic mastitis (Ali-Vehmas and Sandholm 1995). Investigations indicate that those humoral immunity components as IgG and antibacterial factor of the udder LF play an important role in the immunological defence response of the cow udder (Korhonen and Kaartinen 1995, Marnila and Korhonen 2002, Kocina et al. 2012).

LF is an iron-binding protein, and because iron is required by some bacteria to grow, LF can reduce the growth of certain bacteria (Lotti et al. 2013). In cattle milk, bovine LF is present in polymorphonuclear lymphocyte secondary granules and is synthesized by cells of the glandular epithelium of the mammary gland (Molenaar et al. 1996). It has been shown that LF concentration increases during mammary involution (Hurley and Rejman 1993) and infection (Harmon et al. 1976, Kawai et al. 1999, Komine et al. 2005). A number of studies described factors that affect the relative LF concentration in milk. Harmon (1994) reported that the LF concentration of milk was significantly associated with SCC, levels of bovine serum albumin, stage of lactation, and milk production. Tsuji et al. (1990) reported that the LF content of multiparous cows was 2 to 3 times higher than that of primiparous cows. After the third lactation, no differences in LF content were observed. Hagiwara et al. (2003) reported that the concentration of milk LF was significantly related to the age of cows but not to the stage of lactation.

Immunoglobulins form specific immunity components and they are translocated by receptors through the blood-udder barrier (Kehrl and Harp 2001, Pyörälä 2002). Antibodies in milk are a reflection of the specific antibodies in the serum of cows. Immunoglobulin concentration increases during colostroneogenesis due to an increase of receptors and accumulation of IgG in the udder. The increase in immunoglobulins during mastitis is mainly caused by a leaky blood-udder barrier. Immunoglobulins are able to prevent the adhesion of microbes, inhibit bacterial metabolism, agglutinate bacteria, augment phagocytosis of bacteria, kill bacteria through activation of complement-mediated bacteriolytic reactions, and neutralize toxins and viruses (Pyörälä 2002, Korhonen 2009).

Gaining more insight in the self-defence mechanism of the udder may help to develop alternative protocols to enhance udder protection and to better identify cows at risk.

In order to understand and evaluate the role of LF and IgG in maintaining udder health, the dynamics of their amount in cow's milk in relation to pathogenic bacteria presence in the udder, SCC, stage and number of lactations during spring, summer and autumn seasons were investigated.

Materials and Methods

Selection of animals and collection of milk samples

The dairy herd tested consisted of 30 Lithuanian Black-and-White crossbreed with Holstein dairy cows. In total, 120 milk samples were collected individually from normal lactating dairy cows. Milk samples from individual quarters were collected once during the spring, summer and autumn (10 cows/40 quarter samples/each season). In order to test and estimate the udder health status, in all cows included in the investigation, we evaluated the udder and teats visually and palpated both before milking. All cows were clinically healthy with no signs of udder infection (by checking the presence of redness, swelling, hardness, and pain in the udder, or the presence of clots in milk) at sampling time. Evaluation of milk samples was carried out according to the method described by Sandholm and Pyörälä (1995).

Milk samples were collected for laboratory examination aseptically in accordance with the method recommended by the standard ISO 707:2008. Milk was obtained from udder quarters of the 1st, 2nd and 3rd lactations at early, middle and late stages of lactation. Criteria that included both SCC and a microbial analysis were used to assess the health status of the quarters.

Microbiological examination of milk samples

Microbiological examination for identification of pathogenic microorganisms was carried out as soon as the milk samples were delivered to the accredited central milk testing laboratory. Standard procedures for identifying pathogenic microorganisms in milk were performed in compliance with the laboratory criteria ISO/IEC 17025:2005 and according to standard operating procedures SOP 5.4.4.B.6:2009. A microbiologically positive quarter was defined as isolation of 1 or 2 bacterial species from a quarter milk sample. A sample was considered contaminated when three or more dissimilar colony types (mixed cultures) were observed with no predomination of a single colony type (Hogan et al. 1999).

Estimation of SCC

For determination of SCC, milk samples were preserved with bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol and 2-bromo-2-nitropropanol) in microtubes and analysed with the flow cytometric analysis method using a SomaScope cell counter (Foss, 3400 Hillerød, Denmark) according to standard EN ISO 13366-1:2008/Cor.1:2009.

Estimation of LF and IgG concentration

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used to determine LF and IgG concentration in bovine biological fluids is distributed as Biopanda Reagents (United Kingdom). Determinations were carried out in whey obtained by centrifugation of 50 ml of fresh milk for 20 minutes at a temperature of 4°C and a speed of 3,000 rpm (Sobczuk-Szul et al. 2014). The resultant whey was stored frozen at a temperature of -20°C until analysed. The concentration of LF and IgG in quarter milk samples was assayed using ready kits, following the procedure recommended by the manufacturer. For LF analyses the milk samples were diluted at the ratio of 1:1,000 and for IgG 1:2,000. In both analyses, a standard curve was plotted for each plate separately. The test results were estimated by measuring the optical density of samples at wave length $\lambda=450$ nm using a Thermo Scientific Multiskan EX spectrophotometer (Thermo electron corporation, China, 2005).

Grouping of the numerical material for statistical analysis

The numerical material was divided into groups according to the health status of the udder quarters, milk SCC, lactation and season of the year.

The health status of the udder quarters was assessed according to microbiological analysis and SCC in milk (Chaneton et al. 2013). Quarters with presence of bacterial growth, nonspecific mastitis, or sub-clinical mastitis were classified as diseased quarters (Table 1).

On the basis of the milk SCC the data were allocated into four groups: group I – up to 100,000 cells/ml ($n=76$); group II – from 101,000 to 200,000 cells/ml ($n=15$); group III – from 201,000 to 400,000 cells/ml ($n=9$) and group IV – over 401,000 cells/ml ($n=20$). Udder quarters from group I and group II corresponded to the healthy quarters ($n=91$) and quarters from group III and group IV to the diseased quarters ($n=29$).

To test the reliance of milk LF and IgG on subsequent lactation and its stage, the data were classified in three age classes: 1st ($n=32$), 2nd ($n=44$) and 3rd ($n=44$) lactation, as well as three lactation stages: early stage (until 120 day, $n=48$), middle stage (from 121 up to 200 day, $n=36$) and late stage (from 201 up to 305 day, $n=36$).

The data were divided into spring ($n=40$), summer ($n=40$) and autumn ($n=40$) for the analysis of seasonal effect on LF and IgG in milk.

Statistical analysis

The data obtained were statistically processed by using the SPSS program 20.0 for Windows using a one-way ANOVA procedure. The results are presented as mean and standard error of mean (mean $\pm$ SEM). The significance of differences between mean values of the evaluated groups was determined with the *post-hoc* Fisher LSD criterion. A value of $p<0.05$ was considered significant.

Results

The distribution of bacterial findings in 120 quarter milk samples, the proportions of bacterial isolates and the corresponding SCC, LF, IgG are shown in Table 1. Samples with mixed cultures ($n=10$) were excluded from these figures as these quarters cannot be categorised either as healthy or mastitic. No growth of bacteria was determined in 38.66% of quarter milk samples. Pathogenic staphylococci (two samples were positive for *Staphylococcus aureus*) and CNS were the most common bacteria of the microbiologically positive quarters isolated (35.2 and 20.17%, respectively). Gram-negative bacteria were isolated from 4.2%, and streptococci from 1.68% of the samples. LF and IgG concentrations were higher in quarters where bacteria were isolated compared with quarters where no growth of bacteria was determined.

Under the udder health assessment, 35% of diseased quarters (DQ) corresponded to the category „presence of bacterial growth (BG)“, 13% to sub-clinical mastitis (SM) and 11% corresponded to non-specific mastitis (NM) (Table 2). The DQ showed increased concentrations of LF and IgG (0.08 ± 0.01 mg/ml and 0.32 ± 0.03 mg/ml, respectively) compared with healthy quarters (HQ) (0.03 ± 0.01 mg/ml and 0.12 ± 0.02 mg/ml, $p<0.001$, respectively) in Fig. 1. The highest mean value of LF (0.1 ± 0.02 mg/ml) and IgG (0.41 ± 0.06 mg/ml) were observed in quarters with SM. Higher LF and IgG concentrations (0.08 ± 0.01 and 0.35 ± 0.03 mg/ml, respectively) were

Table 1. Bacterial findings.

Bacterial isolate	No of samples n=119	% of isolates n=73	LF mg/ml	IgG mg/ml	SCC (10 ³ /ml)
Pathogenic staphylococci	42	57.53	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.04	273
CNS	24	32.88	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.03	166
<i>Streptococcus</i> spp.	2	2.74	0.08 ± 0.01	0.52 ± 0.03	113
Gram-negative bacteria	5	6.85	0.07 ± 0.01	0.56 ± 0.04	232
No growth	46	—	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02	100

CNS: Coagulase Negative Staphylococci. The figure in the first column is the number of all quarter milk samples. The second column represents percentages of bacterial isolates.

Table 2. Grouping of udder quarters according to microbiological analysis and SCC in milk.

Group	Specification	Pathogen isolation (+/-)	SCC (10 ³ /ml)	Health status of the quarters	Number of samples
BG	Presence of bacterial growth	+	< 200	diseased	42
NM	Nonspecific mastitis	—	≥ 200	diseased	13
SM	Subclinical mastitis	+	> 200	diseased	16
HQ	Healthy quarters	—	< 200	healthy	49

(+/-) presence/absence of pathogenic microorganisms in milk sample

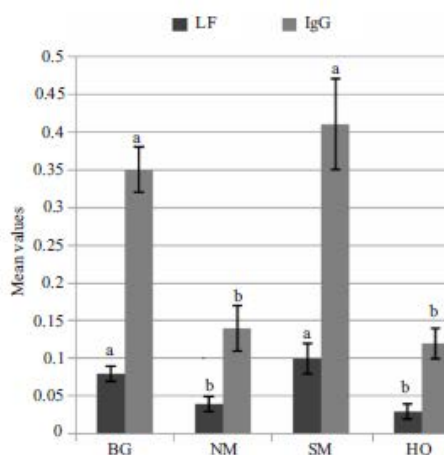


Fig. 1. Lactoferrin and immunoglobulin G concentrations mg/ml (mean ± SEM) in healthy and diseased quarters according to microbiological analysis and SCC groups. BG-positive for presence of bacterial growth, NM-non-specific mastitis, SM-subclinical mastitis, HQ-healthy quarters. a,b Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

detected in quarters with BG compared to HQ (0.03 ± 0.01 and 0.12 ± 0.02 mg/ml, respectively) and quarters with NM (0.04 ± 0.01 and 0.14 ± 0.03 mg/ml, respectively).

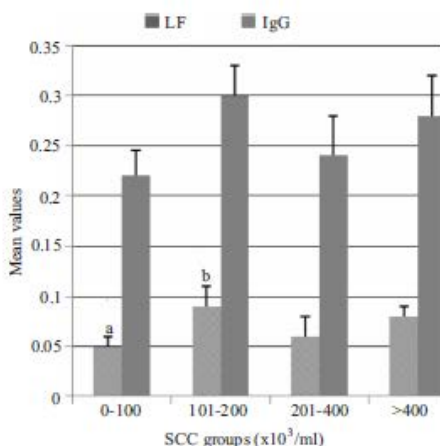


Fig. 2. Lactoferrin and immunoglobulin G concentrations mg/ml (mean ± SEM) in healthy and diseased quarters according to SCC groups. a,b Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Exploration of the SCC effect on LF and IgG revealed increased LF (0.07 ± 0.01 mg/ml) as against 0.06 ± 0.01 mg/ml and IgG values (0.27 ± 0.05 mg/ml) as against 0.23 ± 0.02 mg/ml) in DQ (SCC from 201,000 ≥ 401,000 cells/ml) compared to HQ (SCC up to 200,000 cells/ml) (Fig. 2). The highest mean value of LF 0.09 ± 0.02 mg/ml and IgG 0.3 ± 0.03 mg/ml was

Table 3. Effect of subsequent lactation on lactoferrin and immunoglobulin G content (mg/ml) in cows' milk.

Specification	Subsequent lactation			Effect
	1 st n=32	2 nd n=44	3 rd n=44	
LF	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	2.6% p=0.220
IgG	0.26 ± 0.04	0.30 ± 0.04 ^a	0.18 ± 0.02 ^b	4.7% p=0.060

^{a, b} – values (mean ± SEM) in the same row with different superscripts differ significantly (p<0.05).

Table 4. Effect of lactation stage on lactoferrin and immunoglobulin G content (mg/ml) in cows' milk.

Specification	Stage of lactation			Effect
	Early n=48	Middle n=36	Late n=36	
LF	0.08 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	8.5% p=0.005
IgG	0.30 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.04	0.16 ± 0.03 ^b	6.1% p=0.025

^{a, b} – values (mean ± SEM) in the same row with different superscripts differ significantly (p<0.05).

Table 5. Effect of season on lactoferrin and immunoglobulin G content (mg/ml) in cows' milk.

Specification	Season			Effect
	Spring n=40	Summer n=40	Autumn n=40	
LF	0.12 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	46.5% p=0.000
IgG	0.54 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	79.6% p=0.000

^{a, b} – values (mean ± SEM) in the same row with different superscripts differ significantly (p<0.05).

observed in HQ group II (SCC from 101,000 to 200,000 cells/ml) and significant differences between HQ groups (I and II) of LF mean values were found (p<0.05). The lowest mean value of LF 0.05 ± 0.01 mg/ml and IgG 0.22 ± 0.03 mg/ml was observed in HQ group I (SCC up to 200,000 cells/ml). No significant effects of SCC on milk LF and IgG concentrations were found (p>0.05).

The richest source of LF appeared to be milk obtained from primiparous cows, whereas the highest amount of IgG was at the 2nd lactation. At subsequent lactations LF concentrations decreased and lactation numbers had no effect on LF content in milk. The lowest level of IgG was found at the 3rd lactation and in the 2nd and 3rd lactations significant differences in IgG content were determined (p<0.05) (Table 3).

Milk collected during the first months of lactation (≤120 days) had the highest LF and IgG content. Significantly lower LF content was determined in the middle and late stages of lactation (p<0.05). Milk obtained at the late stage of lactation also showed the lowest level of IgG. At the late stage of lactation IgG content was significantly lower compared to IgG mean values at the early stage of lactation (p<0.05). A significant effect of stage of lactation on LF

(p<0.01) and IgG (p<0.05) content was noted (Table 4).

A further seasonal effect on LF and IgG content in milk was evaluated. LF and IgG peak concentrations were clearly observed in the spring season. LF concentration did not change in summer and autumn seasons and was 60% lower than during the spring. In summer, IgG level was the lowest compared to other seasons. A significant effect of season on LF (p<0.001) and IgG (p<0.001) contents was noted (Table 5).

Discussion

The LF and IgG concentrations in the milk of dairy cows might depend on the pathogenicity of each bacterial species. In the present study the lowest LF and IgG concentrations were found in milk infected with CNS, suggesting that CNS has a low pathogenicity. The present research data are in agreement with the results of Hagiwara et al. (2003) where LF concentration in quarters of cows infected with *S.aureus* and with other streptococci species were higher in comparison to CNS (*coagulase negative staphylococcus*). Investigations by Chaneton et al. (2008) and

Kocina et al. (2012) showed that LF and IgG concentrations are induced by different bacteria, with *Streptococcus uberis* causing the highest increase. Kocina et al. (2012) indicated that in the case of *S. aureus* infection the IgG mean value was lower even than in healthy quarter milk.

The effect of different factors, such as milk SCC, lactation stage, cow's age and season of the year, on milk LF and IgG were evaluated.

SCC is a commonly recognized indicator of bovine udder health, milk quality and its technological usability (Krol et al. 2012). As reported by Hillerton (1999), Hamann (2002) and Cheng et al. (2008), milk containing less than 100,000 somatic cells per 1 ml originates from a healthy udder. The SCC in milk constitutes a good diagnostic tool which allows early detection of either the subclinical or acute form of mastitis (Green et al. 2004, Cheng et al. 2008). According to Krol et al. (2012) a bovine quarter producing milk with a SCC of over 200,000 cells/ml shows the symptoms of subclinical mastitis. In the present research, the concentration of LF and IgG in the cows' milk related to health status of udder quarters was analysed. Two combined variables were used to determine the quarter health status: the SCC value and the isolation of pathogenic bacteria. Similar criteria have been used by other authors (Pyörälä 2002, Chaneton et al. 2013). In the present study 59% corresponded to diseased quarters and 41% to healthy quarters. Chaneton et al. (2013) show that the majority of analyzed milk samples consisted of healthy quarters (86.8%) and of the diseased quarters 62% corresponded to nonspecific mastitis. Most of the analysed milk samples with SCC levels lower than 200,000 were positive for bacterial isolation. This observation means that some specific bacterial species could be associated with weak immune responses (Schwarz et al. 2010) and it is possible that the physiological status of the mammary gland could induce a diminished immune response to bacterial invasion. Chaneton et al. (2013) established that most of the samples with an SCC level higher than 200,000 were negative for bacterial isolation; their explanation for this is that an inflammation process can occur without detectable bacteria in milk. The present research demonstrated higher LF and IgG concentrations in diseased quarters compared to healthy quarters ($p < 0.001$). Significant differences in these immunity components were observed between quarters with BG, NM, SM and HQ ($p < 0.05$). The same tendency of LF was also shown by Chaneton et al. (2013), but no significant differences were observed between quarters. Kocina et al. (2012) reported that IgG mean values in milk samples with pathogenic agents and without pathogens differed slightly and insignificantly.

The data for those indicators in groups formed by SCC showed increased values of LF (0.07 ± 0.01 mg/ml as against 0.06 ± 0.01 mg/ml) and IgG (0.27 ± 0.05 mg/ml as against 0.23 ± 0.02 mg/ml) in DQ (SCC from 201,000 to 401,000 cells/ml) compared to HQ (SCC up to 200,000 cells/ml). Similar results were also obtained by Cheng et al. (2008) where a relationship between milk LF concentration and SCC and LF correlation with SCC were indicated ($r = 0.375$, $p < 0.001$). Krol et al. (2012) calculated high correlation coefficients for LF $r = 0.65$ and for IgG $r = 0.79$ and these results confirmed the effect of SCC on LF and IgG. The effect of SCC on the content of IgG was reported also by other authors (Liu et al. 2009). In this research the highest mean value of LF was observed in the group with SCC from 101,000 to 200,000 cells/ml and the lowest mean value of LF in the group with SCC up to 100,000 cells/ml. According to Hamann (2002) the "gold standard" for a cell count to be up to 100,000 somatic cells/ml. Counts that reached above this point provided evidence of disturbed milk secretion that would lead to changes in its chemical composition.

Age of cows, usually referred to as the subsequent lactation, is one of the main physiological factors affecting the productivity and chemical composition of cow milk (Krol et al. 2012). In the present study, the milk LF and IgG concentrations tended to be low in lactating cows of advanced age ($p > 0.05$). These results agree with Hagiwara et al. (2003) where the milk LF concentration in 5-yr-old lactating cows was lower than that in 2-yr-old ($p \leq 0.01$) and 3-yr-old ($p = 0.05$) lactating cows. On the other hand, Krol et al. (2010, 2012) reported reverse results: primiparous cows were shown to produce significantly less LF and IgG as compared to cows at the 2nd to 4th lactations ($p \leq 0.05$) and older ($p \leq 0.01$). The lowest level of LF and IgG was found in the 1st lactation (0.89 ± 0.17 and 0.45 ± 0.16 mg/ml, respectively) and in subsequent lactations LF and IgG compounds increased gradually (Krol et al. 2012). Tsuji et al. (1990) reported that the LF content of multiparous cows was 2 to 3 times higher than that of primiparous cows. These conflicting results might reflect differences in the sample size and criteria for selecting milk samples.

While some researchers (Cheng et al. 2008, Krol et al. 2012, Sobczuk-Szul et al. 2014) noticed the highest mean concentration of LF in cow's milk obtained from the late lactation period, the present studies showed opposite results. The mean values of LF in milk in the early and middle stages of lactation were higher than in the late stage of lactation. These findings agree with Chaneton et al. (2013), where high levels of LF in early lactation was associated with infected quarters. These results suggest that some specific

quarters are highly susceptible to infection or are chronically infected. Concentrations of IgG during the lactation period were investigated by many other researchers. The significantly higher IgG content was reported in milk obtained in late lactation (Krol et al. 2012, Musayeva et al. 2015). In the present investigation the highest IgG content was observed in the early stage of lactation and significantly differed between stages of lactation ($p < 0.05$). In this research we observed a significant effect of the lactation stage on LF ($p < 0.01$) and IgG ($p < 0.05$) content. Cheng et al. (2008) also found high correlation coefficients between the content of LF and lactation stage ($r = 0.557$).

The present study on the seasonal effect on these immunity components in cow's milk indicated significantly higher LF and IgG values in the spring season ($p < 0.05$). This is in agreement with Conesa et al. (2005), who reported that IgG values from the whole population of analysed samples were found to be significantly higher also in the spring. In another study, the seasonal effect was the only significant variation factor observed, with the highest values in the spring for LF and in the winter for IgG (Konuspayeva et al. 2007). In our research data, a significant effect of season was estimated on LF ($p < 0.001$) and IgG ($p < 0.001$) contents. These results are in agreement with the findings of Kocina et al. (2012), who noted a significant effect of the seasonal storage of cows on the concentration of IgG in cows milk ($p < 0.001$) and Brodziak et al. (2014) whose research results indicated a significant effect of the season on LF content in goats milk ($p < 0.01$).

In terms of mastitis, it can be concluded that LF and IgG concentration in milk were elevated during subclinical mastitis as well as in quarters positive for bacterial growth. It should be assumed that the increased concentrations of LF and IgG in the diseased quarters indicated immune response activity. This suggests that LF and IgG content in milk might be a useful tool in mastitis detection and for evaluation of innate resistance against intramammary infections. Furthermore, the findings showed the high contribution of lactation stage and season of the year on milk LF and IgG concentrations, whereas parity showed no association.

Acknowledgements

This study was supported by the Science Foundation of Lithuanian University of Health Sciences (LUHS).

References

- Ali-Vehmas T, Sandholm M (1995) Balance between bacteria and host-The bacteria's point of view. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (eds) The bovine udder and mastitis: Univ Helsinki, Helsinki, Finland, pp 49-74.
- Brodziak A, Krol J, Barłowska J, Litwinczuk Z (2014) Effect of production season on protein fraction content in milk of various breeds of goats in Poland. *Int J Dairy Technol* 67: 410-419.
- Chaneton L, Bonta M, Pol M, Tirante L, Bussmann LE (2013) Milk lactoferrin in heifers: influence of health status and stage of lactation. *J Dairy Sci* 96: 4977-4982.
- Chaneton L, Tirante L, Maito J, Chaves J, Bussmann LE (2008) Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 91: 1865-1873.
- Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wang JZ (2008) Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J Dairy Sci* 91: 970-976.
- Conesa C, Lavilla M, Sánchez L, Perez MD, Mata L, Razquin P, Calvo M (2005) Determination of IgG levels in bovine bulk milk samples from different regions of Spain. *Eur Food Res Technol* 220: 222-225.
- Green MJ, Green LE, Schukken YH, Bradley AJ, Peeler EJ, Barkema HW, de Haas Y, Collis VJ, Medley GF (2004) Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J Dairy Sci* 87: 1256-1264.
- Hagiwara S, Kawai K, Anri A, Nagahata H (2003) Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J Vet Med Sci* 65: 319-323.
- Hamann J (2002) Relationship between somatic cell count and milk composition. *Bull Int Dairy Fed* 379: 56-59.
- Harmon RJ (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* 77: 2103-2112.
- Harmon RJ, Schanbacher FL, Ferguson LC, Smith KL (1976) Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect Immun* 13: 533-542.
- Hillerton JE (1999) Redefining mastitis based on somatic cell count. *Bull Int Dairy Fed* 345: 4-6.
- Hogan JS, Gonzalez RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, Smith KL (1999) Laboratory handbook on bovine mastitis, revised ed, National Mastitis Council, Madison.
- Hurley WL, Rejman JJ (1993) Bovine lactoferrin in involuting mammary tissue. *Cell Biol Int* 17: 283-289.
- Kawai K, Hagiwara S, Anri A, Nagahata H (1999) Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Vet Res Commun* 23: 391-398.
- Kehrli ME Jr, Harp JA (2001) Immunity in the mammary gland. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17: 495-516.
- Komine K, Komine Y, Kuroishi T, Kobayashi J, Obara Y, Kumagai K (2005) Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *J Vet Med Sci* 67: 667-677.
- Kocina I, Antane V, Lusiš I (2012) The Concentration of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. *Proc Latv Univ Agr* 27: 44-53.

- Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G, Levieux D (2007) Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and *Hybrids*) from Kazakhstan. *J Dairy Sci* 90: 38-46.
- Korhonen HJ (2009) Bioactive components in bovine milk. In: Park YW (ed) *Bioactive components in milk and dairy products*. Wiley-Blackwell, USA, pp 19-20.
- Korhonen H, Kaartinen L (1995) Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (eds) *The Bovine Udder and Mastitis*. Univ Helsinki, Finland, pp 76-82.
- Krol J, Brodziak A, Litwinczuk Z, Barłowska J (2012) Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. In: Bobarala V (ed) *A search for antibacterial agents*. InTech pp 107-124.
- Krol J, Litwinczuk Z, Brodziak A, Barłowska J (2010) Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol J Vet Sci* 13: 357-361.
- Liu GL, Wang JQ, Bu DP, Cheng JB, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Zhou ZF, Hu H, Dong XL (2009) Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *Vet J* 182: 79-85.
- Lotti SN, Cooper A, Murray J (2013) Human lactoferrin expressed in cow milk can extend the shelf life of milk. *Reprod Fertil Dev* 26: 226-227.
- Marnila P, Korhonen H (2002) Immunoglobulins. In: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF (eds) *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, Amsterdam, pp 1950-1956.
- Molenaar AJ, Kuys YM, Davis SR, Wilkins RJ, Mead PE, Tweedie JW (1996) Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *J Dairy Sci* 79: 1198-1208.
- Musayeva K, Sederevičius A, Zelvytė R, Stankevičius R (2015) Analysis of factors influencing immunoglobulin G concentration in milk of dairy cows. *Vet Med Zoot* 72: 25-29.
- Oviedo-Boyso J, Valdes-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 54: 399-409.
- Pyörälä S (2002) New Strategies to Prevent Mastitis. *Reprod Dom Anim* 37: 211-216.
- Rainard P, Riollot C (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 37: 369-400.
- Sandholm M, Pyörälä S (1995) Diagnostics of mastitis. Clinical examination of a mastitic cow. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (eds) *The Bovine Udder and Mastitis*. Gummerus Press, Javaskyla, Finland, pp 83-88.
- Schwarz D, Diesterbeck US, Failing K, König S, Brügemann K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP (2010) Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany – a longitudinal study. *J Dairy Sci* 93: 5716-5728.
- Sobczuk-Szul M, Wielgosz-Groth Z, Nogalski Z, Pogorzelska-Przybyłek P (2014) Changes in the content of whey proteins during lactation in cow's milk with a different somatic cells count. *Vet Med Zoot* 65: 79-84.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D (1997) Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 80: 1851-1865.
- Tsuji S, Hirata Y, Mukai F, Ohtagaki S (1990) Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *J Dairy Sci* 73: 125-128.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF WHEY PROTEINS IN RELATION TO HEALTH STATUS OF THE UDDER QUARTERS AND SEASON

Kristina Musayeva¹, Antanas Sederevičius¹, Rasa Želvytė¹, Ingrida Monkevičienė¹, Danuta Belavskė-Aleksiejūnė¹, Sigita Kerzienė², Saulius Bliznikas³

¹The Research Center of Digestive Physiology and Pathology Veterinary Academy
Lithuanian University of Health Sciences, Tilžės str.18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

²Department of Physics, Mathematics and Biophysics, Medical Academy
Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

³Institute of Animal Science, Veterinary Academy Lithuanian University of Health Sciences
R. Žebenkos str. 12, LT-82317 Baisogala, Radviliškis distr., Lithuania

Corresponding author: Kristina Musayeva
phone +370 606 29236, e-mail: kristina.musayeva@lsmuni.lt

Abstract. The aim of the study was to evaluate the amount of chosen whey proteins, i.e. lactoferrin (LF), immunoglobulin G (IgG), alpha-lactalbumin (alpha-LA), beta-lactoglobulin (beta-LG) and bovine serum albumin (BSA) in cow milk in relation with somatic cell count (SCC) and pathogenic bacteria presence in quarter milk at different seasons. The quarters health status was set on the base of SCC and microbiological analysis. The diseased quarters (DQ) showed increased concentration of all proteins analysed, except alpha-LA, in compare to healthy quarters (HQ) ($p < 0.001$). Significant differences of LF, IgG and beta-LG were observed between quarters with presence of bacterial growth (BG), nonspecific mastitis (NM), subclinical mastitis (SM) and healthy quarters (HQ) ($p < 0.05$). In our research data, significant effect of season was estimated on LF ($p < 0.001$), IgG ($p < 0.001$), alpha-LA ($p < 0.01$), beta-LG ($p < 0.001$) and BSA ($p < 0.05$) contents.

Keywords: whey proteins, udder, milk, mastitis

Introduction

Mastitis has been and continues to be recognized as one of the major disease problems concerning the dairy industry. The prevention and treatment of mastitis represent a serious burden to producers. Innate immunity is a target of choice for selection against infectious diseases (Rainard and Riollet, 2006). Immune factors in colostrum and milk play an important role in the host defense of the mammary gland itself, protecting it from pathogenic organisms (Sordillo et al., 1997; Oviedo-Boyso et al., 2007). Milk contains many peptides and proteins, which exhibit bacteriostatic and bactericidal properties in their intact form (Bagnicka et al., 2010). Especially the whey proteins contain peptides that improve the immunomodulatory activity (stimulating defence mechanisms of the body) and antibacterial activity (Sobczuk-Szul et al., 2010). The concentration of the whey proteins varies not only depending on the degree of infection of the udder but it is also affected by the keeping conditions (Kocina et al., 2012).

In order to understand and evaluate the role of LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA in maintaining the udder health, the dynamics of their amount in cow milk in relation with SCC and pathogenic bacteria at different seasons was investigated.

Materials and methods

The tested dairy herd consisted of 30 Lithuanian Black-and-White crossbreed with Holstein dairy cows. In total 120 milk samples were collected individually from normal lactating dairy cows. Milk samples from individual quarters were collected once during the spring, summer and autumn (10 cows/40 quarter samples/each season). All cows were clinically healthy without any signs of udder infection at the sampling time. Milk samples were collected for laboratory examination aseptically in accordance with the method recommended by the „Milk and milk products. Guidance on sampling (ISO 707:2008)“ standard.

Microbiological examination for identification of pathogenic microorganisms was made as soon as the milk samples were delivered to the accredited central milk testing laboratory. Standard procedures for identifying pathogenic microorganisms in milk were performed in compliance with the laboratory criteria (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2005) and according the method „Estimation of the main pathogenic microorganisms causing mastitis in milk SDP 5.4.4.B.6“(2009).

For determination of SCC milk samples were preserved with bronopol in microtubs and analysed with the flow cytometric analysis method using a SomaScope cell counter (Foss, 3400 Hillerød, Denmark).

ELISA used to determine LF and IgG concentration in bovine milk (Biopanda Reagents, UK). Determinations were carried out in whey obtained by centrifugation of 50 ml of fresh milk for 20 minutes at a temperature of 4°C and the speed of 3,000 rpm (Sobczuk-Szul et al. 2014). The resultant whey was stored frozen at a temperature of -20°C until analysed. The concentration of LF and IgG in quarter milk samples was assayed using ready kits, following the procedure recommended by the manufacturer.

To evaluate the content of whey proteins, i.e. alpha-LA, beta-LG and BSA, samples from cow's milk were prepared according to Romero et al. (1996). Separation of whey proteins was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) method described by J. Krol (2012). For this purpose, a high pressure gradient HPLC system Varian ProStar (Varian Corp., USA) was used, consisting of two ProStar 210 pumps, automatic sampling module Prostar 410 and Prostar 363 fluorescence detector. The separation of the alpha-LA, beta-LG and BSA content was performed by HPLC using a 5 µm particle size, 250 mm long and 4.6 mm internal diameter Nucleosil C18 chromatographic column equipped with guard column containing the same packing material (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Each protein was calibrated individually by injecting solutions of the standards (20 µl). Purified proteins from bovine milk (alpha-LA, beta-LG and BSA) were purchased from Sigma (Germany). All chemicals were HPLC analytical grade. The separation was carried out at 25 °C using the gradient system. The mobile phase was solvent A: 90% water, 10% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B: 90% acetonitrile, 10% water and 0.1% TFA. alpha-LA, beta-LG and BSA content was identified and quantified by measuring the fluorescence at 220 nm wavelengths. The sample injection volume was of 20 µl. Data collection and evaluation was performed by using LG Solution (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) operating system.

Grouping of the numerical material for statistical analysis

The health status of the udder quarters was assessed according to microbiological analysis and SCC in milk (according to Chaneton et al., 2013). Quarters with presence of bacterial growth, nonspecific mastitis, or subclinical mastitis were classified as diseased quarters (DQ) (Table 1).

Table 1. Grouping of the udder quarters according to the microbiological analysis and SCC in milk

Group	Specification	Pathogen isolation	SCC (10 ³ /ml)	Health status of the quarters	Number of samples
BG	Presence of bacterial growth	+	< 200	diseased	42
NM	Nonspecific mastitis	-	> 200	diseased	13
SM	Subclinical mastitis	+	> 200	diseased	16
HQ	Healthy quarters	-	< 200	healthy	49

(+/-) presence /absence of pathogenic microorganisms in milk sample

All the data obtained were fractionated into spring (n=40), summer (n=40) and autumn (n=40) for the analysis of seasonal effect on whey proteins.

Statistical analysis

The obtained data were statistically processed by using SPSS program 20.0 for Windows using a one-way ANOVA procedure. The results are presented as mean and standard error of mean (mean±SEM). The significance of differences between mean values of the evaluated groups was determined with the *post-hoc* Fisher LSD criterion ($\alpha=0.05$) (Juozaitienė et al., 2014).

Results

The DQ showed statistically significant increased concentrations of LF ($p<0.001$) 46%, IgG ($p<0.001$) 46%, beta-LG ($p<0.05$) 4% and BSA 6% compared with HQ, while alpha-LA concentration was 2% higher in HQ milk samples (Table 2).

Table 2. Mean values of whey proteins (mg/ml) in healthy and diseased quarters according to health status of the udder

Quarters	LF	IgG	alfa-LA	beta-LG	BSA
Healthy	0.03±0.01***	0.12±0.02***	0.93±0.03	3.14±0.11*	0.31±0.03
Diseased	0.08±0.01	0.32±0.03	0.89±0.02	3.47±0.11	0.35±0.02

Differences significant at * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Under the udder health assessment 33% of DQ corresponded to the group BA, 15% - to SM and 11% corresponded to NM and the rest part 41% corresponded to HQ. The highest mean value of LF (0.1±0.02 mg/ml), IgG (0.41±0.06 mg/ml) and beta-LG (3.88±0.24 mg/ml) were observed in quarters with SM. It was determined higher LF (72.7%) IgG (74.5%), beta-LG (50.8%) and BSA (57.3%) concentration in quarters with BG compared to HQ. The peak of alpha-LA was observed in HQ. Significant differences of LF, IgG and beta-LG mean values between groups were determined ($p<0.05$) (Table 3).

Further seasonal effect on whey proteins content in milk was evaluated. LF, IgG and BSA peak concentrations were clearly observed in spring, alpha-LA in summer and beta-LG in autumn. LF content remained stable in summer and autumn and 60% were lower compared to content in springtime. The lowest levels of IgG, beta-LG and BSA (0.08 mg/ml, 2.94 mg/ml and 0.27 mg/ml, respectively) were in summer in compare to content with other seasons. The final results of one-

way analysis of variance (summarized in Table 4) indicate a significant effect of season on the content of all the proteins analysed.

Table 3. Distribution of whey proteins mg/ml (mean±SEM) in quarters according to the microbiological analysis and SCC groups

Groups	n	LF	IgG	alfa-LA	beta-LG	BSA
BG	42	0.08±0.01 a	0.35±0.04 a	0.89±0.03	3.24±0.13 abd	0.36±0.03
NM	13	0.04±0.01 b	0.14±0.03 b	0.89±0.03	3.74±0.21 bc	0.33±0.03
SM	16	0.10±0.02 a	0.41±0.07 a	0.87±0.06	3.88±0.24 c	0.35±0.04
HQ	49	0.03±0.01 b	0.12±0.02 b	0.92±0.03	3.14±0.11 d	0.31±0.03

a,b,c,d - differences significant at $p<0.05$

Table 4. Variability of whey proteins mg/ml (mean±SEM) depending on season

Season	n	LF***	IgG***	alfa-LA**	beta-LG***	BSA*
Spring	40	0.12±0.01 a	0.54±0.03 a	0.90±0.04	3.33±0.12 a	0.37±0.02 a
Summer	40	0.03±0.01 b	0.08±0.01 b	0.98±0.03 a	2.94±0.10 b	0.27±0.03 b
Autumn	40	0.03±0.01 b	0.11±0.01 b	0.84±0.02 b	3.74±0.16 c	0.35±0.03 a

a,b,c - differences significant at $p<0.05$ and significant effect at * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Discussion and conclusion

The SCC in milk constitutes a good diagnostic tool that allows early detection of either subclinical or acute form of mastitis (Cheng et al. 2008, Krol et al. 2012). In the present research, the concentration of LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA in the cow's milk related to health status of udder quarters was analysed. Two combined variables were used to determine the quarter health status: the SCC value and the isolation of pathogenic bacteria. Similar criteria have been used by other authors (Chaneton et al. 2013). In the present study 59% corresponded to DQ and 41% to HQ. In Chaneton et al. (2013) research the most part of analyzed milk samples consisted of HQ (86.8%) and of the DQ 62% corresponded to NM. Most of analysed milk samples with SCC levels lower than 200,000 cells/ml were positive for bacterial isolation. This observations means that some specific bacterial species could be associated with weak immune responses (Schwarz et al. 2010) and it is possible that the physiological status of the mammary gland could induce a diminished immune response upon bacterial invasion. Chaneton et al. (2013) have established most of the samples with SCC level higher than 200,000 cells/ml and were negative for bacterial isolation. This factor researchers explained that an inflammation process can occur without detectable bacteria in milk. The present research demonstrated higher levels of all proteins analysed, except alpha-LA, in DQ compared to HQ ($p<0.001$). Significant differences of LF, IgG and beta-LG were observed between quarters with BG, NM, SM and HQ ($p<0.05$). The same tendency of LF was also shown by Chaneton et al. (2013), but no significant differences were observed between quarters. Korcina et al. (2012) reported IgG mean values in milk samples with pathogenic agents and without pathogens differed slightly and insignificantly.

The present studies on seasonal effect on analyzed whey proteins indicated the significantly higher LF, IgG and BSA values in spring season ($p<0.05$). This is in agreement with Conesa et al. (2005), who reported that IgG values from the whole population of analysed samples were found to be significantly higher also in the spring. It can be assumed that the bioactive compounds contained in green forages (at pasture period), which have immunomodulatory properties, have an indirect effect on LF levels (Brodziak et al. 2014). In another study, the seasonal effect was observed, with the highest values in the spring for LF and in the winter for IgG (Konuspayeva et al. 2007). In our research data, significant effect of season was estimated on LF ($p<0.001$), IgG ($p<0.001$), alpha-LA ($p<0.01$), beta-LG ($p<0.001$) and BSA ($p<0.05$) contents. These results are in agreement with the findings of Korcina et al. (2012), who noted significant effect of the seasonal keeping of cows on the concentration of IgG in cows milk ($p<0.001$) and Brodziak et al. (2014) research results with the significant effect of the season on LF and alpha-LA contents in goats milk ($p<0.01$). A higher percentage of whey proteins in the spring-summer season compared with the autumn-winter season was also found in research performed on cow's milk by Litwinczuk et al. (2011).

It can be concluded that LF, IgG and BSA concentration in milk were elevated during subclinical mastitis as well as in quarters positive for bacterial growth. It should be assumed that the increased concentrations of analysed proteins (except alpha-LA) in the diseased quarters showed their immune response activity. Furthermore, the findings showed the high contribution of season of the year on milk antimicrobial proteins concentrations.

Acknowledgements

The study was supported by Science Foundation of Lithuanian University Health Sciences (LUHS).

References

- Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwiak A., Krzyżewski J., Horbańczuk J. O., Zwierzchowski L. Defensins in farm animals, their expression and polymorphism. *Acta Biochimica Polonica* 2034. 2010. Vol. 57 (4). P. 487-497.

2. Brodziak A., Krol J., Barłowska J. and Litwinczuk Z. Effect of production season on protein fraction content in milk of various breeds of goats in Poland. *International Journal of Dairy Technology*. 2014. Vol. 67. P.410–419.
3. Chaneton L., Bonta M., Pol M., Tirante L. and Bussmann L.E. Milk lactoferrin in heifers: Influence of health status and stage of lactation. *J Dairy Sci*. 2013. Vol.96. P.4977–4982.
4. Cheng J.B., Wang J.Q., Bu D.P., Liu G.L., Zhang C.G., Wei H.Y., Zhou L., Wang J.Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J Dairy Sci*. 2008. Vol.91. P.970–976.
5. Conesa C., Lavilla M., Sánchez L., Pérez M.D., Mata L., Razquín P., Calvo M. Determination of IgG levels in bovine bulk milk samples from different regions of Spain. *Eur Food Res Technol*. 2005. Vol. 220. P. 222–225.
6. Juozaitienė V., Anskienė L. In: Statistinė duomenų analizė su SPSS gyvulininkystėje ir veterinarijoje. LSMU Leidybos namai, Kaunas. 2014. P. 20–30.
7. Kocina I., Antane V., Lūsis I. The Concentration of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. *Proc Latv Univ Agr*. 2012. Vol. 27(322). P.44–53.
8. Komuspayeva G., Faye B., Loiseau G., Levieux D. Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and Hybrids) from Kazakhstan. *J Dairy Sci*. 2007. Vol. 90(1). P. 38–46.
9. Krol J., Brodziak A., Litwinczuk Z., Barłowska J. Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. In: Bobbarala V (Ed) A search for antibacterial agents. 2012. P.107–118.
10. Litwinczuk Z., Krol J., Brodziak A. and Barłowska J. Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different cow breeds subject to somatic cell count. *Journal of Dairy Science*. 2011. Vol. 94. P.684–691.
11. Oviedo-Boyso J., Valdes-Alarcon J.J., Cajero-Juarez M., Ochoa-Zarzosa A., Lopez-Meza J.E., Bravo-Patino A. and Baizabal-Aguirre V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect*. 2007. Vol.54. P. 399–409.
12. Rainard P., Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*. 2006. Vol. 37. P. 369–400.
13. Romero C., Perez-Andujar O., Jimenes S. Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia*. 1996. Vol. 42. P.181–184.
14. Schwarz D., Diesterbeck U.S., Failing K., König S., Brügemann K., Zschöck M., Wolter W., Czerny C.P. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany—a longitudinal study. *J Dairy Sci*. 2010. Vol.93(12).P.5716–5728.
15. Sobczuk-Szul M., Wielgosz-Groth Z., Nogalski Z., Pogorzelska-Przybyłek P. Changes in the content of whey proteins during lactation in cow's milk with a different somatic cells count. *Vet Med Zoot*. 2014. Vol. 65. P.79–84.
16. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., and DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*. 1997. Vol. 80. P. 1851–65.

Received 13 June 2016

Accepted 21 June 2016

ANALYSIS OF FACTORS INFLUENCING IMMUNOGLOBULIN G CONCENTRATION IN MILK OF DAIRY COWS

Kristina Musayeva¹, Antanas Sederevičius¹, Rasa Želvytė¹, Rolandas Stankevičius²¹Department of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary Academy
Lithuanian University of Health Sciences²Department of Animal Breeding and Nutrition, Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

Corresponding author: Kristina Musayeva

e-mail: kristina.musayeva@ismuni.lt; tel. +370 60629236

Abstract. In this study, the purpose was to estimate immunoglobulins G (IgG) concentration in milk depending on cows' breed, number of lactations and somatic cell count (SCC). Twenty cows of different breeds (Lithuanian Black-and-White, Dutch Black-and-White, and German Black-and-White) and lactations (from 1st to 6th) were used in the study. The research material was split into four groups according to SCC detected in the milk samples: 1st group – SCC up to 100 x10³/ml; 2nd group – 101 – 400 x10³/ml; 3rd group – 401 – 1,000 x10³/ml and 4th group – 1,001 x10³/ml. Samples of fresh milk were analysed for SCC performed by the heavy-duty counter-measurer *Somascope*. The contents of IgG were determined by the enzymatic method ELISA based on the competition between marked antigen-antibodies. The mean value for IgG concentration obtained from all the samples was 0.29±0.14 mg/ml. Milk IgG content increased with the increment of SCC. The relation between SCC and IgG content correlated significantly $r_p=0.931$, $r_s=0.854$ ($P<0.0001$). It was determined that IgG concentration varied from 0.26±0.15 mg/ml (1st-2nd lactations) to 0.41±0.11 mg/ml (5th-6th lactations). IgG concentration in milk was not significantly different among numbers of lactations and breeds of cows ($P>0.05$).

Keywords: immunoglobulin G, somatic cell count, cow, milk

Introduction

Bovine mastitis remains the disease causing the biggest economic losses to the dairy industry, despite the intensive research and prevention measures at herd level carried out for decades (Sobczuk-Szul et al., 2014). The immunological response to intramammary infection is a normal function of the cow's immune system (Harmon, 1994). Natural immunological protective reactions of the animal can successfully restrict and eliminate the udder infection (Sandholm and Pyörälä, 1995; Korcina et al., 2012). Investigations show evidence that humoral immunity components, such as immunoglobulins A and G, play an important role in immunological defence response of the cow udder (Korhonen and Kaartinen, 1995; Marnila and Korhonen, 2002; Korcina et al., 2012). Immunoglobulins form specific immunity components and they mainly penetrate into the udder during inflammation but are also formed locally (Burvenich et al., 2000; Kehrl and Harp, 2001; Pyörälä, 2002). Immunoglobulins are able to prevent the adhesion of microbes, inhibit bacterial metabolism, agglutinate bacteria, augment phagocytosis of bacteria, kill bacteria through activation of complement-mediated bacteriolytic reactions, and neutralize toxins and viruses (Pyörälä, 2002; Park, 2009).

The amount of immunoglobulins in milk varies and all factors influencing their concentration are not discovered yet (Korhonen et al., 2000; Krol et al., 2010). Some publications reported that during the middle stage of lactation, the concentration of immunoglobulins in healthy cow milk is low but it increases during the udder inflammation (Korhonen and Kaartinen, 1995; Korhonen et al., 2000; Korcina et al., 2012). As somatic cell count

(SCC) also forms a part of the defence system of the udder against mastitis, it has been suggested that with very low SCC the risk to environmental mastitis may increase (Schukken et al., 1990; Pyörälä, 2002). Pyörälä (2003) and Smith (2002) reported that a bovine quarter producing milk with an SCC >200 x10³/ml shows the symptoms of subclinical mastitis. According Burvenich et al. (2000), the quarters with elevated SCC are more resistant to mastitis than the quarters with low SCC. However, it is not likely that SCC levels of dairy cows will, through breeding, reach 'too low' levels in the near future. Dairy cows have been bred for high milk production, and there is a positive correlation between high milk yield and mastitis (Fleischer et al., 2001; Pyörälä, 2002).

It is generally accepted that changes in the content of milk components are caused in more than 50 % by genetic factors and in about 40 % by environmental ones (Brodziak et al., 2012). Nowadays, thirteen breeds of cattle are in use in Lithuania, while the milk production is dependent mainly on the Lithuanian Black-and-White breed. The productivity of cows and physico-chemical parameters of milk are influenced not only by breed of cows and feeding system but also by physiological factors such as age and stage of lactation (Krol et al., 2013; Krol et al., 2014).

Work should be concentrated on ways of minimising the negative influence on immune functions and ways of stimulating these functions, especially during periods of immune suppression, to increase the natural ability of the cow to resist, or defend herself, against udder infections. Detailed knowledge about the immune responses and important host defence factors is essential in order to find

better ways for the prevention and treatment of udder infections and mastitis (Mol and Clegg, 2002).

The aim of the present study was to evaluate the concentration of IgG in milk depending on cow breed, number of lactations and somatic cell count.

Material and methods

Selection of animals and collection of milk samples

The experimental part of the study was carried out at the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy (LUHS VA), Practical training and testing centre. Overall, 20 cows were selected. Cows enrolled in the study were from the 1st to 6th lactations of the best production (22–30 kg per day). Milk samples collected from three different breeds (Lithuanian Black-and-White, Dutch Black-and-White, and German Black-and-White) of dairy cows maintained in Lithuania. Milk samples were collected during control evening milking time as total quarter milk from each cow in pairs. After cleaning and disinfection of the teats, 50 ml of milk were aseptically collected in sterile plastic tubes according to LST EN ISO 707:1999+P: 2003 standard. Samples were kept under refrigeration until arrival to laboratory facilities and were tested within 6 h from collection.

Methods/technique

For determination of somatic cell count milk samples were preserved and analysed with the flow cytometric analysis method using a Somascope cell counter (Foss, 3400 Hillerød, Denmark) according to LST EN ISO 13366-1:2008+AC:2009 microscopic method standard.

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used to determine IgG concentration in bovine biological fluids is distributed as Biopanda Reagents (United Kingdom). This assay has been designed for the quantification of IgG by means of specific antibodies and it has been validated in an interlaboratory study with satisfactory results of repeatability. The procedure of the assay was carried out as follows. The kit provided the 96-well plate coated with specific antibodies against bovine IgG. Standards or samples (100 µl) in duplicate were added into each well and the plate was incubated at room temperature (RT) for 30 min. Afterwards, the wells were emptied by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent tissue. The plate was washed in Labsystems Multiwash microtiter plate automatic washer (Helsinki, Finland) with 300 µl of diluted wash buffer per well, making five cycles of washing. After removing the excess liquid as described above, 100 µl of the diluted horseradish peroxidase (HRP) - antibody conjugate solution was added into each well and incubated at RT

for 30 min. After this second incubation, the plate was washed as previously described and 100 µl of the substrate 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) solution was added into each well. In order to allow the colour development, the plate was incubated at RT for 10 min. Finally, 100 µl of the stop solution were added into each well. The concentration of antibodies in a sample was indicated by the blue colour appearing during the reaction and turning yellow after suppression of reaction with acid. The test results were estimated by measuring the optical density (OD) of samples at wave length $\lambda=450$ nm using spectrophotometer Thermo Scientific Multiskan EX (Thermo electron corporation, China, 2005). In order to calculate the IgG concentration of each sample, a graphic representation was made by plotting the concentrations of the standards (y axis) versus the mean values of the corresponding absorbances (x axis) for each plate. The IgG concentration of the samples was determined by interpolating the corresponding absorbances in the standard curve, which was adjusted to a second-order polynomial equation.

Statistical analysis

GraphPad Prism version 4.0 statistical package was used for biometric data analysis. Arithmetic averages ($\bar{x}$), medium standard deviations (SD), minimum and maximum values were calculated for cow's milk IgG parameters and somatic cell count. Pearson's (r_p) and Spearman's (r_s) correlation coefficients and linear regression were used to investigate the relationship between SCC levels and milk IgG. Results were statistically significant when R^2 was not less than 0.25.

The following factors were taken into consideration:

- The research material was split into four groups according to somatic cell count detected in the milk samples: 1st group – SCC up to $100 \times 10^3/\text{ml}$ ($n=3$); 2nd group – $101 - 400 \times 10^3/\text{ml}$ ($n=6$); 3rd group – $401 - 1,000 \times 10^3/\text{ml}$ ($n=8$) and 4th group – $1,001 \times 10^3/\text{ml}$ ($n=3$).
- Age classes mostly noticed as subsequent lactation: 1, 2, 3, 4, 5, 6.
- Three breeds of cows (Lithuanian Black-and-White, Dutch Black-and-White, German Black-and-White) were involved in this study.

Results. The mean value for IgG concentration obtained from all the samples was 0.29 ± 0.140 mg/ml. Immunoglobulin values in milk obtained in our research and the standards given in literature are summarized in Table 1.

Table 1. Immunoglobulin G values mg/ml (mean $\pm$ SD) in cow's milk

Immunoglobulin class	Data obtained in our studies		IgG values given in literature
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	Range of values	
IgG			0.30-0.60 (Pakkanen et al., 1997; Krol et al., 2010)
	0.29 $\pm$ 0.14	0.11-0.58	0.30-0.50 (Collin et al., 2002) 0.25 $\pm$ 0.12 the range of values 0.008-1.457 (Conesa et al., 2005) 0.72 (Grappier et al., 2007) 2.05 $\pm$ 0.83 the range of values 0.16-4.30 (Korcina et al., 2012)

With the growth of SCC, the concentration of IgG significantly increased. A substantial effect of SCC on IgG content was confirmed by relatively high positive values of calculated correlation coefficients. The relation between SCC and IgG content correlated significantly $r_p=0.931$, $r_s=0.854$, $P<0.0001$, regression analysis was significant $R^2=0.867$. The results are shown on Figs 1 and 2.

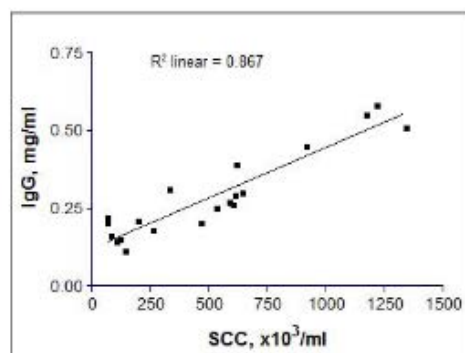


Fig. 1. Linear regression model of the effect of SCC ($\times 10^3/\text{ml}$) on milk IgG mg/ml

It was shown that among the many breeds of cows involved in milk production in Lithuania, the cows of the German Black-and-White breed produce a higher content of immunoglobulins G (the range from 0.14 to 0.58). A slightly lower level of IgG was established in milk of Dutch Black-and-White cows (the range from 0.15 to 0.39) as well as Lithuanian Black-and-White cows (the range from 0.11 to 0.51). The cows breed influence on

IgG concentration was not significant ($P>0.05$). The results are shown in Table 2.

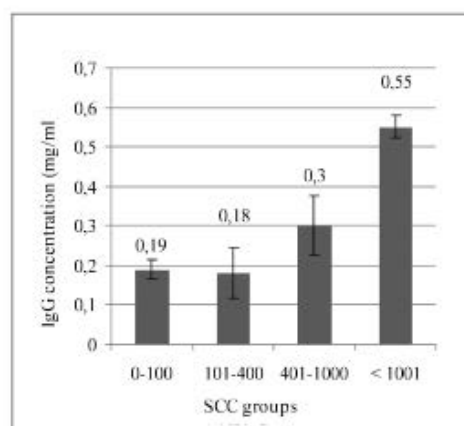


Fig. 2. Distribution of immunoglobulin G content by SCC groups

The obtained average results of IgG at different lactations ranged from 0.26 ± 0.15 mg/ml (1st and 2nd lactations cows) to 0.41 ± 0.11 mg/ml (5th and 6th lactations cows). Calculated congruency between cows lactations and IgG concentration in milk was not significant ($r=0.02$). We observed that the concentration of immunoglobulins in milk increases proportionally with increasing number of lactations as shown in Table 3.

Table 2. Effect of breed on IgG (mean $\pm$ standard deviation) content in cow's milk

Breed	Number of cows, n	Immunoglobulins G, mg/ml
Lithuanian Black-and-White	7	0.25 ± 0.12
Dutch Black-and-White	4	0.27 ± 0.08
German Black-and-White	9	0.33 ± 0.15

Table 3. Effect of lactation on IgG (mean $\pm$ standard deviation) content in cow's milk

Lactation	Number of cows, n	Immunoglobulins G, mg/ml
1-2	11	0.26 ± 0.15
3-4	6	0.28 ± 0.08
5-6	3	0.41 ± 0.11

Discussion. The amount of immunoglobulins in milk varies and all factors influencing their concentration are not yet discovered (Korhonen et al., 2000; Krol et al., 2010). Different authors have indicated that concentration of immunoglobulins A, G, and M in the cow milk varies not only depending on the degree of udder infection but it is also considerably affected by the cow age, lactation period, keeping conditions, and feeding (McFadden et al., 1997; Korcina et al., 2012).

The mean levels obtained for IgG in the whole population studied are 0.29 ± 0.14 mg/ml, a value close to the range referred to as normal for mature milk, which is 0.3-0.5 mg/ml (Collin et al., 2002). Similar IgG values were obtained by other researchers as well: 0.30-0.60 (Pakkanen, 1997; Krol et al., 2010). In the analysis of bovine IgG in milk, Grapper et al. (2007) ordered a higher IgG value 0.72 mg/ml. The highest concentration of the immunoglobulin G in milk 2.05 ± 0.83 mg/ml was

indicated by Latvian researchers (Korcina et al., 2012). As mentioned above, the amount of immunoglobulins in milk varies depending of many factors; therefore, all indicated immunoglobulin G values in milk are different.

Somatic cell count is a commonly recognized indicator of bovine udder health and milk quality. SCC has been shown to influence the immunoactive protein content (Krol et al., 2012). Milk with the highest number of the somatic cells (group 4) contained the highest IgG concentration 0.55 mg/ml. The same results were obtained from another research carried out in Poland (Krol et al., 2012). A substantial effect of SCC on IgG content was confirmed by high positive values of calculated correlation coefficients $r_p=0.931$, $r_s=0.854$, $P<0.0001$, where they were higher than those indicated by Krol et al., (2012 and 2014) in their research $r=0.79$ and $r=0.507$ respectively. Also the effect of SCC growth on the content of IgG was reported by Liu et al. (2009).

Cow's breed is one of the factors influencing the amount of immunoglobulin in milk. Krukowski et al. (2006) determined IgG content in milk from Black-and-White variety cows. IgG concentration in these cows' milk was 0.628 mg/ml. The studies of Leveux and Ollier (1999) revealed that milk gained from Holstein-Friesian cows contained 0.47 mg/ml of IgG at average. A significant amount of IgG was reported in milk of Polish Black-and-White cows 0.42 ± 0.18 mg/ml (Krol et al., 2010) and 0.53 ± 0.29 mg/ml (Krol et al., 2012). In the present research, a lower IgG content was found. Following our test data, the richest content of IgG in the milk of the breed German Black-and-White was 0.33 ± 0.15 mg/ml. The poorest source of IgG content in milk was the breed Lithuanian Black-and-White (0.26 ± 0.15 mg/ml). Some authors have reported that in healthy cow milk during the middle stage of lactation the concentration of immunoglobulin is low (Korhonen et al., 2000; Korcina et al., 2012). Other authors indicated that there is a positive correlation between high milk yield and mastitis (Fleischer et al., 2001; Pyörälä, 2002). Our results possibly indicate that the breeds with a low amount of IgG were in the middle stage of lactation and the milk yield of these cows was low too.

The age of the cow and the number of lactations are considered as two relevant factors, which determine IgG concentration in milk. The poorest source of IgG proved to be the milk obtained from the 1st and 2nd lactations cows (0.26 ± 0.15 mg/ml). Older cows, in the 5th and 6th lactations, produced milk with higher concentration of IgG compared to younger ones (0.41 ± 0.11 mg/ml). These findings are similar with the Krol et al. (2010; 2012) research where primiparous cows showed to produce significantly less IgG as compared to cows at 2 to 4 lactations ($P\leq0.05$) and older ($P\leq0.01$). The lowest level of IgG was found in the 1st lactation (0.454 ± 0.16 mg/ml) and in subsequent lactations IgG compounds increased gradually (Krol et al., 2012).

In conclusion, it should be stated that somatic cell count had a significant effect on content of the IgG in cows' milk evaluated. The increase in SCC caused a significant increase ($P<0.0001$) in IgG concentrations in

milk. Their source proves to be milk obtained from multiparous cows of German Black-and-White breed.

References

1. Brodziak A., Barłowska J., Krol J., Litvinczuk Z. Effect of breed and feeding system on content of selected whey proteins in cow's milk in spring-summer and autumn-winter seasons. *Ann. Anim. Sci.* 2012. 12(2). P. 261–269.
2. Burvenich C., Detilleux J., Paape M., Massart-Leen A. Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. In: Zecconi A (ed.), *Proceedings of the IDF Symposium on Immune Ruminant Mammary Gland*, Stresa, Italy. 2000. P. 9–20.
3. Collin R., McLaren R., Thomson M., Malcolm D. Development and validation of a nephelometric immunoassay for IgG1 in milk. *International Journal of Dairy Science*. 2002. 69. P. 27–35.
4. Conesa C., Lavilla M., Sánchez L., Pérez M. D., Mata L., Razquin P., Calvo M. Determination of IgG levels in bovine bulk milk samples from different regions of Spain. *European Food Research and Technology*. 2005. 220. P. 222–225.
5. Fleischer P., Metzner M., Beyerbach M., Hoedemaker M., Klee W. The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001. 84. P. 2025–2035.
6. Gapper L. W., Copestake D. E. J., Otter D. E., Indyk H. E. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. 389. P. 93–109.
7. Harmon R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 1994. 77. P. 2103.
8. Kehrli M., Harp J. Immunity in the mammary gland. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2001. 17. P. 495–516.
9. Korcina I., Antane V., Lusiš I. The Concentration of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. *Proc. Latv. Univ. Agr.* 2012. 27(322). P. 44–53.
10. Korhonen H., Kaartinen L. Changes in the composition of milk induced by mastitis, in: Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S. (Eds.). *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, Finland. 1995. P. 76–82.
11. Korhonen H., Marnila P., Gill H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*, 2000. 84(1). P. 75–80.
12. Krol J., Brodziak A., Litvinczuk Z., Barłowska J. Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. A search for antibacterial agents edited by Varaprasad

- Bobbarala Copyright © 2012 InTech., 2012. 7. P. 107–124.
13. Krol J., Brodziak A., Litvinczuk Z., Litvinczuk A. Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds. *Polish Journal of Veterinary Science*, 2013. 16(2). P. 395–397.
 14. Krol J., Litvinczuk Z., Brodziak A., Barłowska J. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cow's managed under intensive production system. *Polish Journal of Veterinary Science*. 2010. 13(2). P. 357–361.
 15. Krol J., Litvinczuk Z., Brodziak A., Karasinska A. Immunoglobulin G content in milk with regard to breed and age of cows and stage of lactation. *Med. Weter.* 2014. 70(4). P. 237–241.
 16. Krukowski H., Lisowski A., Rozanski P., Polkowska I. IgG level in mastitis cows' milk (in Polish). *Roczn Nauk PTZ*. 2006. 2(2). P. 65–69.
 17. Levieux D., Ollier A. Bovine immunoglobulin G, β -lactoglobulin, α -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J. Dairy Res.* 1999. 66. P. 421–430.
 18. Liu G. L., Wang J. Q., Bu D. P., Cheng J. B., Zhang C. G., Wei H. Y., Zhou L. Y., Zhou Z. F., Hu H., Dong X. L. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The Veterinary Journal*. 2009. 182. P. 79–85.
 19. Marnila P., Korhonen H. Immunoglobulins. In *Encyclopedia of Dairy Science*. Amsterdam: Academic Press, 2002. 3. P. 1950–1956.
 20. McFadden T. B., Besser T. E., Barrington G. M. Regulation of immunoglobulin transfer into mammary secretions of ruminants. in: R.A.S. Welch, D. J. W. Burns, S. R. Davis, C. G. Prosser (Eds.) *Milk Composition, Production and Biotechnology*. CAB International, Wallingford, UK; 1997. 9. P.133–151.
 21. Mol J. A., Clegg R. A. *Biology of the mammary gland*. New York, Springer-Verlag New York Inc. 2002. P. 314.
 22. Pakkanen R., Aalto J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*. 1997. 7. P. 285–297.
 23. Park Y.W. *Bioactive components in milk and dairy products*. Wiley-Blackwell, USA. 2009. 2. P.15.
 24. Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 2003.34. P.565–578.
 25. Pyörälä S. New Strategies to Prevent Mastitis. *Reprod Dom Anim*. 2002. 37. P. 211–216.
 26. Sandholm M., Pyörälä S. Diagnostics of mastitis. Clinical examination of a mastitic cow. In Sandholm M., Honkanen T., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L., Pyörälä S. (Eds.). *The Bovine Udder and Mastitis*. Iyväskylä, Finland: Gummerus Kirjapaino Oy. 1995. P. 83–88.
 27. Schukken Y., Grommers F., Van de Geer D., Erb H., Brand A. Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 2. Data and risk factors for all cases. *J Dairy Sci*. 1990. 73. P. 3463–3471.
 28. Smith K. L. A discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell counts and clinical mastitis. *Bull. IDF*. 2002. 373. P. 43–45.
 29. Sobczuk-Szul M., Wielgosz-Groth Z., Nogalski Z., Pogorzelska-Przybyłek P. Changes in the content of whey proteins during lactation in cow's milk with a different somatic cells count. *Veterinarija ir zootechnika*. 2014. 65(87). P. 79–84.

Received 29 July 2015

Accepted 30 September 2015

SUMMARY

INTRODUCTION

Dairying is one of the most important agricultural industries in Lithuania. People over the world seek to eat better and healthier food. They pay particular attention to the composition and quality of milk production. Milk is a valuable nutrient source. However recently, an interest has arisen in the ability of milk to kill bacteria and in the possibilities to apply this knowledge in mastitis control, functional food production and promotion of human health. An increasing scientific and commercial interest has been focused on biological properties of milk proteins. The whey fraction of milk contains a great variety of proteins that differ from each other in their chemical structure, functional properties and biological functions (Sėkmokienė ir kt., 2007; Liutkevičius ir kt., 2008; Park, 2009; Korhonen, 2009).

With the aim of facilitating the resistance of dairy cows against mastitis caused by pathogenic microflora, intensive investigations in immunology have been carried out almost for a century. However, remarkable contradictions still exist in this field of research and expected achievements are delayed (Wheeler et al., 2007; Stelwagen et al., 2009; Szwajkowska et al., 2011; Kocina et al., 2012). Natural immunological protective reactions of animals, if they are not in a suppressed condition, can successfully restrict and eliminate the udder infection (Sandholm et al., 1995; Oviedo-Boyso et al., 2007; Stelwagen et al., 2009). If the activity of the immunological system is reduced or the virulence of pathogenic microorganisms is high, infection, even partly eliminated, may continue for a longer period, and usually this process becomes apparent as subclinical or chronic mastitis (Ali-Vehmas and Sandholm, 1995; Aniulis, 2007; Bannerman, 2009). In spite of the great progress in genetics, feeding systems, housing and milking conditions, mastitis is still the most economically important illness leading to drastic milk losses, increasing drug and veterinary costs, reduced genetic improvement, changes in the hygienic and compositional quality of milk and decreased reproductive performance (Oviedo-Boyso et al., 2006; Wellnitz and Bruckmaier, 2012; Chaneton et al., 2013).

The non-specific immune system is very important in mastitis prevention. Activation of natural antimicrobial factors can reduce the amount of antibiotics, and maintain high effectiveness of treatment (Kuroishi et al., 2003). Antimicrobial activity in milk is determined from the immunoglobulins and non-immune proteins, such as lactoferrin (LF), lysozyme, lactoperoxidase, alpha-lactalbumin (alpha-LA), beta-lactoglobulin (beta-LG)

(Bellamy et al., 1993). LF has been well recognized as multifunctional protein and one of the most important protective factors, which plays an important role in the prevention of mastitis infection at an early stage (Kawai et al., 2003; Wojdak-Maksymiec and Mikołajczyk, 2012). Immunoglobulins (Igs) link various parts of the cellular and humoral immune system. The importance of colostral Igs to the newborn calf in protection against microbial infection is well documented (Korhonen, 2009). They are able to prevent the adhesion of microbes, inhibit bacterial metabolism, agglutinate bacteria, augment phagocytosis of bacteria, kill bacteria through activation of complement-mediated bacteriolytic reactions, and neutralize toxins and viruses. In addition to the mentioned antimicrobial proteins of milk, alpha-LA, beta-LG, and BSA also are involved in the udder protection mechanism and anti-inflammatory, bacteriostatic, antiviral and antioxidant activity (Chatterton et al., 2006; Pan et al., 2006; Krol et al., 2008).

Different authors have indicated that the concentration of these antimicrobial proteins in the cow milk varies depending not only on the degree of infection of the udder. It is also affected considerably by the cow age, lactation stage, keeping conditions, feeding and various environmental factors (Zagorska et al., 2007; Cheng et al., 2008; Krol et al., 2012; Danowski et al., 2012). So far, in Lithuania this kind of investigations have not been carried out.

Somatic cell count (SCC) is commonly recognized as an indicator of bovine udder health, milk quality, and the technological usability of the milk (Rivas et al., 2001; Schukken et al., 2003; Green et al., 2004; Hillerton and Berry, 2005). The measuring of the somatic cell count in milk is the standard method for detection of mastitis with subclinical manifestations (Schukken et al., 2003; Malinowski et al., 2008). For mastitis form assessment and effective selection of treatment, in addition to the SCC determination, a microbiological test for mastitis agent identification is carried out (Hagiwara et al., 2003; Kocina et al., 2012; Chaneton et al., 2013).

There is currently lack of data on antimicrobial protein variability in local cows. In our opinion, in order to understand and evaluate the role of antimicrobial proteins in the udder health it is necessary to investigate the dynamics of LF, IgG, alpha-LA, beta-LG, and BSA in milk in relation with somatic cell count and microbiological analysis of milk, lactation stage and number and the season.

Summarizing theoretical achievements reported in literary sources as well as the data obtained in the scientific studies, **the objective of the present study** was to evaluate the dynamics of natural antimicrobial proteins concentration in the milk of healthy cows and cows with mastitis, and apply optimal methods for detection and evaluation of these substances.

Goals:

To achieve the objective, the goals were as follows:

1. To evaluate the functional status (health) of the cow udder quarters by somatic cell count and microbiological analysis of milk;
2. To estimate the concentration of LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA in the milk of udder quarters of healthy cows and cows with mastitis;
3. To analyze the change of LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA concentrations in the milk of cows during different lactation stages of first, second and third lactations;
4. To estimate the seasonal (spring, summer and autumn) effects on the content of analysed antimicrobial proteins in milk;
5. To investigate influence of analysed factors on LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA by applying dispersion analysis (ANOVA) and linear statistical models;
6. To evaluate the relationship between antimicrobial proteins and udder health, stage and number of lactations and seasons.

Scientific novelty and practical significance of the research

The present study was focused on analysis of the dynamics of natural antimicrobial proteins in the milk of the Lithuanian Black-and-White cross-breed with Holstein dairy cows. For the first time in Lithuania, the reverse phase high performance liquid chromatography (RPHPLC) was applied for detection and evaluation of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and bovine serum albumin and sandwich enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin and immunoglobulin G. In addition, for the first time the relationship between these antimicrobial proteins and udder health, stage and number of lactations, and seasons was established by statistical modelling and the coefficients of phenotypical correlation were calculated. The estimated relationship between antimicrobial proteins content and udder quarters health indicates active participation of these proteins in the udder protection mechanism. Gaining more insight in the self-defence mechanism of the udder may help to develop alternative protocols to enhance udder protection and to better identify cows at risk. The established significant effect of lactation and seasons indicates that the animal body is very sensitive to the physiological and environmental changes. In terms of mastitis, it can be concluded that lactoferrin and immunoglobulin G in milk is elevated during subclinical mastitis. This suggest that lactoferrin and immunoglobulin G concentration together with the somatic cell count in milk might be a useful tool in mastitis detection and for evaluation of innate resistance against intramammary infections.

MATERIALS AND METHODS

Investigation venue, time and object

The scientific research was carried out during the period between 2012 and 2016 at the Department of Anatomy and Physiology at the Research Centre of Digestive Physiology and Pathology and at the Chemical Laboratory of the Institute of Animal Science of the Veterinary Academy (VA) Lithuanian University of Health Sciences (LUHS), and State enterprise „Pieno tyrimai“ accredited by the National Accreditation Bureau to carry out chemical, physical and microbiological tests of raw milk.

Selection of animals and collection of milk samples

The tested dairy herd consisted of 94 Lithuanian Black-and-White cross-breed with Holstein dairy cows. In total, 360 milk samples were collected individually from 30 normal lactating dairy cows. Milk samples from individual quarters were collected once during the spring, summer and autumn (10 cows/120 quarter samples/each season). For estimation of the udder health status of all cows included in the investigation, we evaluated the udder and teats visually and palpated before milking. All cows were clinically healthy with no signs of udder infection (by checking the presence of redness, swelling, hardness, and pain in the udder, or the presence of clots in milk) at sampling time.

Milk samples were collected for laboratory examination aseptically in accordance with the method recommended by the standard ISO 707:2008 (Milk and milk products - Guidance on sampling). Primarily milk samples were taken for microbiological analysis. Teats were washed thoroughly and dried with a disposable paper towel. The first three streams of milk from each teat were discarded. The teat end and orifice were disinfected with cotton swabs soaked in 70% ethyl alcohol and foremilk samples of approximately 50 mL were collected from each quarter of cow in a sterile tube held horizontally. Later, in the middle of the milking two samples of milk were taken for quality testing: one for estimation of somatic cell count (50 mL) another for antimicrobial proteins investigation (50 mL) (Fig. 1).

Milk was obtained from udder quarters of the 1st, 2nd and 3rd lactations at early, middle and late stages of lactation. Criteria that included both SCC and a microbial analysis were used to assess the health status of the quarters.

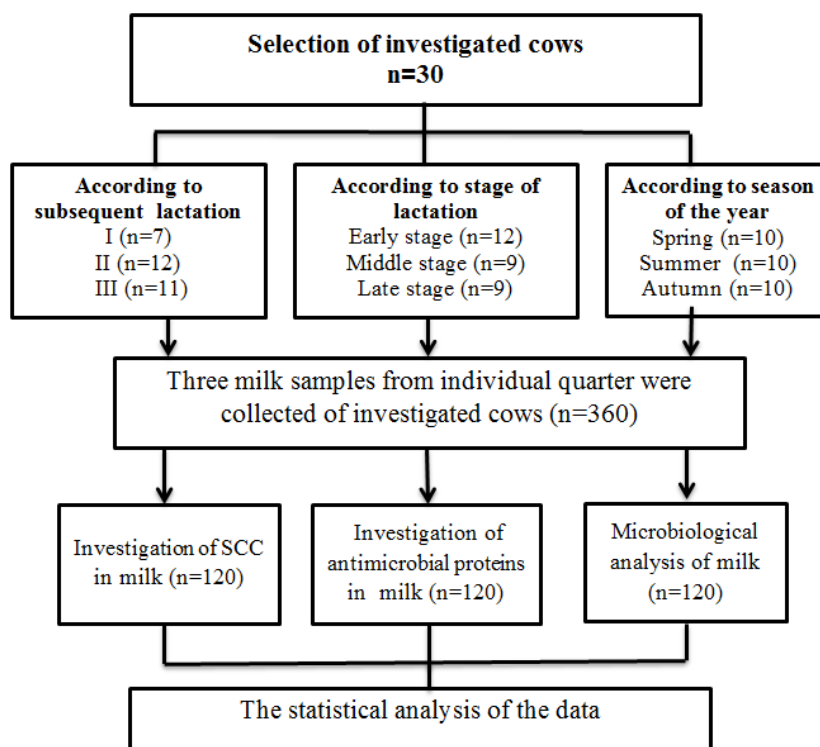


Fig. 1. Scheme of the investigations

Estimation of somatic cell count (SCC)

For determination of SCC, milk samples were preserved with bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol and 2-bromo-2-nitropropanol) in microtabs and analysed with the flow cytometric analysis method using a Somascope MK2 cell counter (Foss, 3400 Hillerød, Denmark) according to standard EN ISO 13366-1:2008/Cor.1:2009 (Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters). The direct measurement reading is SCC in thousands per one milliliter of milk (thou/mL).

Microbiological analysis of milk samples

Microbiological examination for identification of pathogenic microorganisms was carried out as soon as the milk samples were delivered to the accredited central milk testing laboratory. Standard procedures for identifying pathogenic microorganisms in milk were performed in compliance with the

laboratory criteria ISO/IEC 17025:2005 (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories) and according to standard operating procedures SOP 5.4.4.B.6:2009 (Laboratory and field handbook on bovine mastitis. National mastitis council, 1987). A microbiologically positive quarter was defined as isolation of one or two bacterial species from a quarter milk sample. A sample was considered contaminated when three or more dissimilar colony types (mixed cultures) were observed with no predominance of a single colony type.

Estimation of LF and IgG concentration

Milk sample preparation for analysis. The enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA) used to determine LF and IgG concentration in bovine biological fluids was distributed as Biopanda Reagents (United Kingdom). Determinations were carried out in whey obtained by centrifugation of 50 mL of fresh milk for 20 minutes at a temperature of 4°C and a speed at 3,000 rpm to remove creams and cells. The samples were then treated with 0.1 M hydrochloric acid at the controlled pH of 4.6 for casein precipitation. The treated samples were re-centrifuged and the supernatants (whey) were collected. The whey was stored frozen at a temperature of -20°C until analysed (according to Sobczuk-Szul and others method (2014)).

Immunosorbent assay procedure. The concentration of LF and IgG in quarter milk samples was assayed using ready kits, following the procedure recommended by the manufacturer's instructions. For LF analyses, the milk samples were diluted at the ratio of 1:1,000 and for IgG 1:2,000. In both analyses, a standard curve was plotted for each plate separately. The procedure of the assay was carried out as follows. The kit provided the 96-well plate coated with specific antibodies against bovine IgG or LF. Standards or samples (100 µl) in duplicate were added into each well and the plate was incubated at room temperature for 5 min and at incubator for 25 min at 37°C. Afterwards, the wells were emptied by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. The plate was washed in a Labsystems Multiwash microtiter plate washer (Helsinki, Finland) with 250 µl of wash buffer per well, making four cycles of washing. The rinsed wells were filled 100 µl with peroxidase conjugated antibodies and incubated at room temperature for 30 min. After repeated rinsing, the wells were filled with substrate solution (100 µl) and incubated at incubator for 15 min at 37°C. The concentration of antibodies in a sample was indicated by the blue colour appearing during the reaction and turning yellow after suppression of reaction with acid. The test results were estimated by measuring the optical density of samples at wave length $\lambda = 450$ nm using a Thermo Scientific Multiskan EX

spectrophotometer (Thermo electron corporation, China, 2005). In order to calculate the IgG and LF concentration of each sample, a graphic representation was made by plotting the concentrations of the standards (y axis) versus the mean values of the corresponding absorbances (x axis) for each plate. The concentrations of the bovine IgG and LF were determined by linear regression using computer program. The diluted samples values were corrected by dilution factor used to obtain the final concentration of bovine IgG and LF in the original milk sample.

Estimation of alpha-LA, beta-LG and BSA concentration

Milk sample preparation for analysis. For evaluation of the content of antimicrobial proteins, i.e. alpha-lactalbumin (alpha-LA), beta-lactoglobulin (beta-LG) and bovine serum albumin (BSA), whey samples from cow milk were prepared according to Romero et al. (1996) as follows: 25 mL of raw milk was adjusted to pH 4.6 with 0.1 mol·L⁻¹ HCl and allowed to stand at room temperature for about one hour for acid precipitation of caseins. Consequently, whey (7 mL) was taken from each of the samples separately and then centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. Finally, whey solutions were filtered through quality filters and then through 0.20 µm disposable sterile filters (Millipore). The supernatants in vials were refrigerated until further analysis and, when appropriate, injected into the chromatograph (in the amount of 20 µL).

The chromatographic equipment and conditions. Separation of antimicrobial proteins was performed by RP-HPLC method described by Krol and others (2010) and Brodziak and others (2012). The whole system consisted of a HPLC apparatus, a LC-10ATvp pumping system, a SIL-10ADvp autosampler, CTO-10Acvp column temperature controlling module and a SPD-10AVvp UV-VIS detector (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonija). The system was controlled by SCL-10Avp Chromatography Workstation System (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Data collection and evaluation was performed by using LC Solution operating system. The column used was Nucleosil 300-5 C18, 4.6×250 mm, equipped with guard column containing the same packing material (Macherey-Nagel, Duren, Germany). The separation was carried out at 37°C using the gradient system. The mobile phase was solvent A: water and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B: acetonitrile and 0.1% TFA. The mobile phases were filtered through 0.45 µm filters (Millipore) and degassed using ultrasound. The eluate was monitored at fluorescence 220 nm wavelengths. The alpha-LA, beta-LG and BSA compounds were quantified by comparison between peak area of alpha-

LA, beta-LG and BSA compound in sample and peak area of this compound in standard solution. Calibration curve parameters and the peak chromatogram are shown in Table 1 and Fig. 2.

Table 1. Calibration curve parameters

Parameters	alpha- LA	beta-LG	BSA
Equations line	$y = 132129x + 2088.10$	$y = 129177x + 337.24$	$y = 50801x - 664.97$
Correlation coefficient (R^2)	0.9997	0.9975	0.9996
Concentration range of calibration curve (mg/ml)	0.300–1.500	0.241–1.207	0.030–0.253
Run time (tR, min)	92.31	98.47	93.99

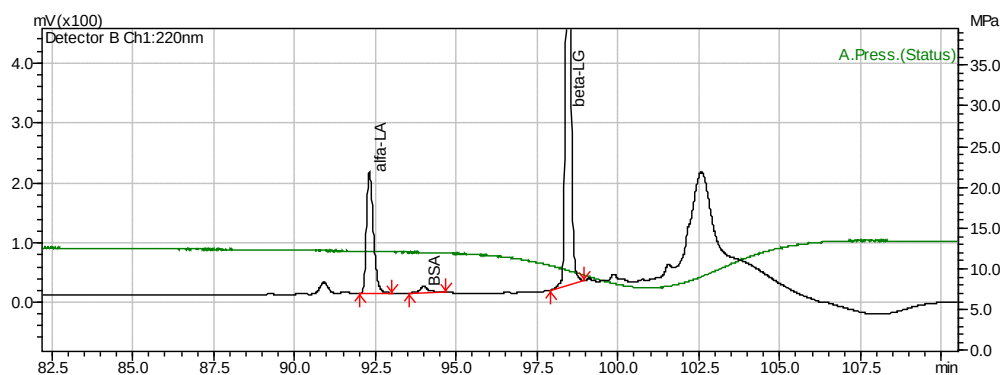


Fig. 2. Standard chromatogram of alpha-LA, beta-LG and BSA

Calibration of the chromatographic system for determination of anti-microbial proteins was carried out by the external standard method. For this purpose, each protein was calibrated individually by injecting solutions of the standards (20 μ l). Purified proteins from bovine milk (alpha-LA, beta-LG and BSA) were purchased from Sigma (Germany). All chemicals were of HPLC analytical grade.

Statistical data analysis and software

The data obtained were statistically processed by using Microsoft Excel 2010® and the SPSS program 20.0 for Windows (Inc., Chicago, IL) using a one-way ANOVA procedure. The results are presented as mean and standard error of mean (mean $\pm$ SEM). The significance of differences between mean

values of the evaluated groups was determined with the *post-hoc* Fisher's *LSD* test. A value of $P < 0.05$ was considered significant. The inner correlation of the parameters was evaluated according to Person correlation coefficients (r) and their statistical reliability (P). The results are considered to be statistically reliable when $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$. The following General Linear models were used for calculations of effects:

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{SLS/MBAgr}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + S_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{TKS_SLS/MBAgr}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + S_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{SLSgr}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + S_k + e_{ijklkn}$$

$$Y_{ijklkn} = \mu + \text{TKS_SLSgr}_i + \text{LS}_j + \text{LT}_l + S_k + e_{ijklkn}$$

Where: Y_{ijklkn} – dependent variable, μ – effect of total mean, SLS/MBAgr_{*i*} – effect of microbiological analysis and SCC evaluation ($i = \text{EM, NM, SM, HQ}$), TKS_SLS/MBAgr_{*i*} – effect of the health status of the udder quarters according to microbiological analysis and SCC ($i = \text{diseased, healthy}$), SLSgr_{*i*} – effect of SCC in milk ($i = 1, 2, 3, 4$), TKS-SLS_{*i*} – effect of the health status of the udder quarters according to SCC groups ($i = \text{diseased, healthy}$), LS_{*j*} – effect of subsequent lactation ($j = \text{I, II, III}$), LT_{*l*} – effect of lactation stage ($l = \text{early, middle, late}$), S_k effect of season ($k = \text{spring, summer, autumn}$), e_{ijklkn} – random error.

Grouping of the numerical material for statistical analysis

The numerical material was divided into groups according to the health status of the udder quarters, milk SCC, lactation and season of the year.

The health status of the udder quarters was assessed according to microbiological analysis and SCC in milk according Chanton and others (2013). The quarters with the presence of mastitis caused by environmental microorganisms, nonspecific mastitis, or subclinical mastitis were classified as diseased quarters (Table 2).

Table 2. Grouping of udder quarters according to microbiological analysis and SCC in milk

Group	Specification	Pathogen Isolation	SCC (thou/mL)	Health status of the quarters
EM	Environmental mastitis	+	< 200	diseased
NM	Nonspecific mastitis	–	≥ 200	diseased
SM	Subclinical mastitis	+	> 200	diseased
HQ	Healthy quarters	–	< 200	healthy

(+/-) presence /absence of pathogenic microorganisms in milk sample.

Based on the milk SCC, the data were allocated into four groups:

- group I – up to 100 thou/mL;
- group II – from 101 to 200 thou/mL;
- group III – from 201 to 400 thou/mL;
- group IV – over 401 thou/mL.

Udder quarters from group I and group II corresponded to the healthy quarters (n = 91) and quarters from group III and group IV – to the diseased quarters (n = 29).

To test the reliance of antimicrobial proteins on subsequent lactation and its stage, the data were classified into three age classes: 1st (n = 32), 2nd (n = 44) and 3rd (n = 44) lactation, as well as three lactation stages: early stage (until 120 day, n = 48), middle stage (from 121 up to 200 day, n = 36) and late stage (from 201 up to 305 day, n = 36).

The data were divided into spring (n = 40), summer (n = 40) and autumn (n = 40) for the analysis of seasonal effect on antimicrobial proteins in milk.

RESULTS

Distribution of antimicrobial protein concentrations in the milk of udder quarters according to their health status

In order to evaluate the health status of udder quarters the investigation data were grouped using two methods: somatic cell count (SCC) and results of microbiological analysis (MBA) and SCC in the milk. According to the chosen evaluation criteria, the health status of udder quarters varied. According to SCC and MBA, the number of udder quarters with mastitis was by 18.32% higher than the number of healthy quarters. Yet the evaluation based on the SCC in milk alone showed the number of healthy quarters to be three times as high as that of the quarters with mastitis.

Distribution of antimicrobial protein concentrations in the milk according to somatic cell count and microbiological analysis

Assessment of udder quarters according to the SCC and MBA results showed 41% (n = 49) of healthy quarters of the total. Thirty three percent (n = 42) of quarters had mastitis caused by environmental microorganisms, 15% (n = 16) had subclinical mastitis and 11% (n = 13) had nonspecific mastitis (Fig. 3).

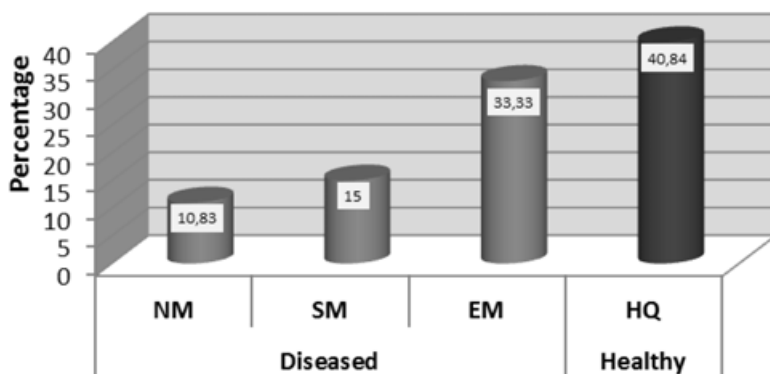


Fig. 3. Distribution of the udder quarters based on SCC and MBA assessment
 NM – nonspecific mastitis; SM –subclinical mastitis; EM – environmental mastitis;
 HQ – healthy quarters.

By assessment of antimicrobial protein distribution in healthy and affected quarters, it was established that LF and IgG concentrations in the affected quarters were on the average following by 46% and beta-LG and BSA concentrations respectively by 4% and 6% higher than in the healthy quarters. Yet the content of alpha-LA was by 2% higher in healthy quarters. As given in Table 3 and Fig. 4, the statistically reliable differences between the mean values of antimicrobial proteins in healthy and affected quarters were LF ($P < 0.001$), IgG ($P < 0.001$) and beta-LG ($P < 0.05$).

Table 3. Concentrations (mean $\pm$ SEM) of antimicrobial proteins in healthy and affected udder quarters according to SCC and MBA results

Quarters	No.	LF	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Healthy	49	0.03 $\pm$ 0.01***	0.12 $\pm$ 0.02***	0.93 $\pm$ 0.03	3.14 $\pm$ 0.11*	0.31 $\pm$ 0.03
Diseased	71	0.08 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.02	3.47 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.02

Differences significant at * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

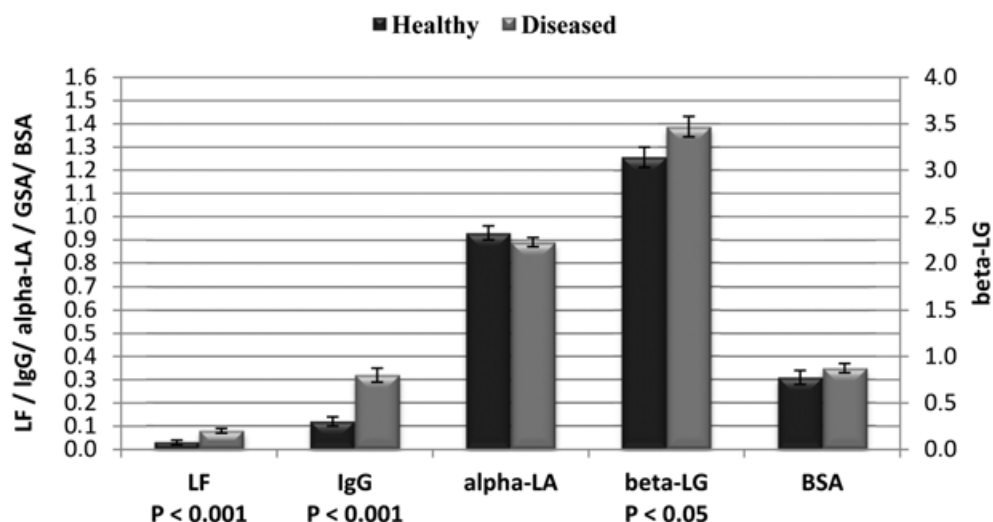


Fig. 4. Concentration of antimicrobial proteins in healthy and diseased quarters according to SCC and MBA assessment (mg/mL)

SCC and MBA results obtained in each group of quarters showed that LF and IgG concentrations in the quarters with subclinical mastitis were on the average by 54% and beta-LG by 10% higher than in healthy quarters. BSA concentrations were highest in the quarters with mastitis caused by environmental microorganisms and alpha-LA in healthy quarters. The average values of antimicrobial proteins in groups were compared and showed significant differences of LF, IgG and beta-G ($P < 0.05$) results are given in Table 4 and Fig. 5.

Table 4. Distribution of the average values (mg/mL) of antimicrobial proteins in SCC and MBA groups

Groups	No.	LF	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
EM	42	0.08±0.01 a	0.35±0.04 a	0.89±0.03	3.24±0.13 abd	0.36±0.03
NM	13	0.04±0.01 b	0.14±0.03 b	0.89±0.03	3.74±0.21 bc	0.33±0.03
SM	16	0.10±0.02 a	0.41±0.07 a	0.87±0.06	3.88±0.24 c	0.35±0.04
HQ	49	0.03±0.01 b	0.12±0.02 b	0.92±0.03	3.14±0.11 d	0.31±0.03

EM – environmental mastitis; NM – nonspecific mastitis; SM – subclinical mastitis; HQ – healthy quarters. Mean values denoted by different letters in rows are significantly different at a, b, c, d – $P < 0.05$

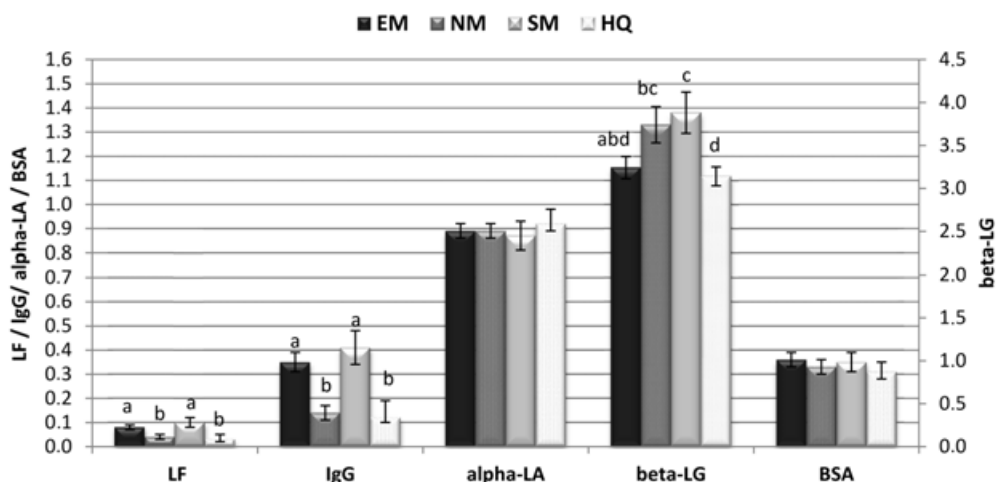


Fig. 5. Distribution of antimicrobial proteins in SCC and MBA groups (mg/mL)

Mean values denoted by different letters in columns are significantly different at a, b, c, d – $P < 0.05$

Distribution of antimicrobial protein concentrations according to SCC in the milk

By grouping the data according to SCC in the milk and evaluation of the health status of udder quarters, 75.83% (n = 91) of healthy and 24.17% (n = 29) of affected quarters were determined (Fig. 6). The obtained results (Table 5 and Fig. 7) showed that LF, IgG, beta-LG and BSA concentrations in the affected udder quarters (SCC from 201 $\geq$ 401 thou/mL) were higher than in the healthy quarters (SCC up to 200 thou/mL) by 2%, 8%, 4% and 2% respectively. Only alpha-LA in healthy quarters by 6% exceeded the value of affected quarters. The difference between the healthy and affected quarters was statistically significant ($P < 0.05$).

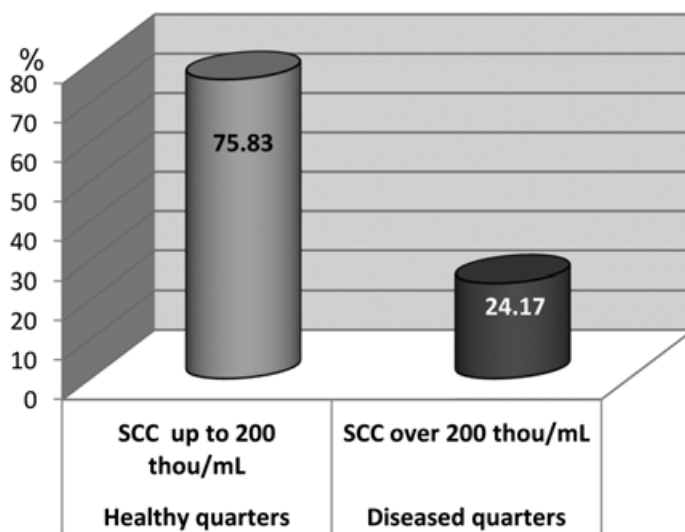


Fig. 6. Groups of quarters according to SCC in the milk

Table 4. Distribution of the average values (mean $\pm$ SEM) of antimicrobial proteins in healthy and affected quarters according to SCC

Quarters	No	LF	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Healthy	91	0.06 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.02*	3.28 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.02
Diseased	29	0.07 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.04	3.53 $\pm$ 0.14	0.34 $\pm$ 0.04

Differences significant at *P < 0.05.

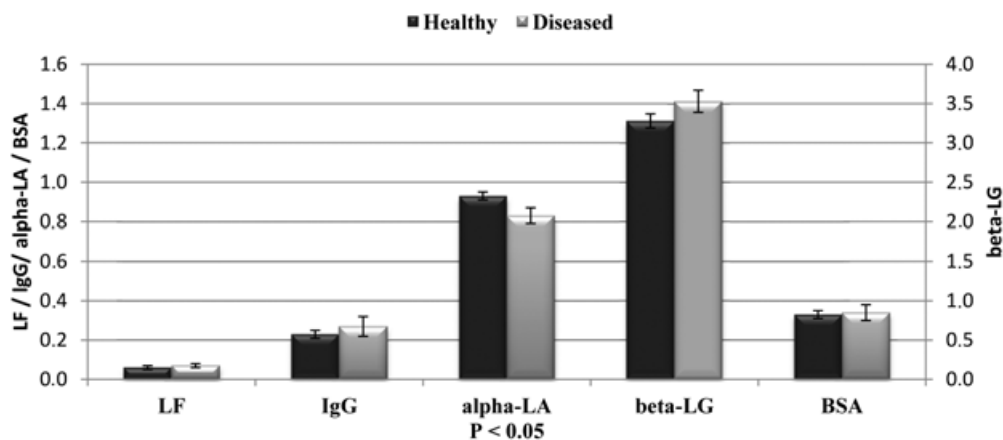


Fig. 7. Concentrations of antimicrobial proteins in healthy and affected quarters according to SCC (mg/mL)

As is shown in Fig. 8, the distribution of the average values of antimicrobial proteins in the groups distinguished by SCC is uneven. A statistically significant difference ($P < 0.05$) was determined between the lowest (first group) and highest (second group) LF concentrations. The distribution of IgG average values between the groups followed a similar pattern as that of LF yet it was not statistically significant. In the third group of udders with mastitis, the concentrations of beta-LG and BSA were highest. They differed from the values in the first and second groups by 0.57 mg/mL, 0.57 mg/mL, 0.07 mg/mL and 0.06 mg/mL respectively. The differences from the fourth group were 0.47 mg/mL and 0.09 mg/mL respectively. The values of alpha-LA in the first and the second groups were similar but higher than in the third and fourth groups of affected quarters: by 0.13 mg/mL and 0.08 mg/mL respectively.

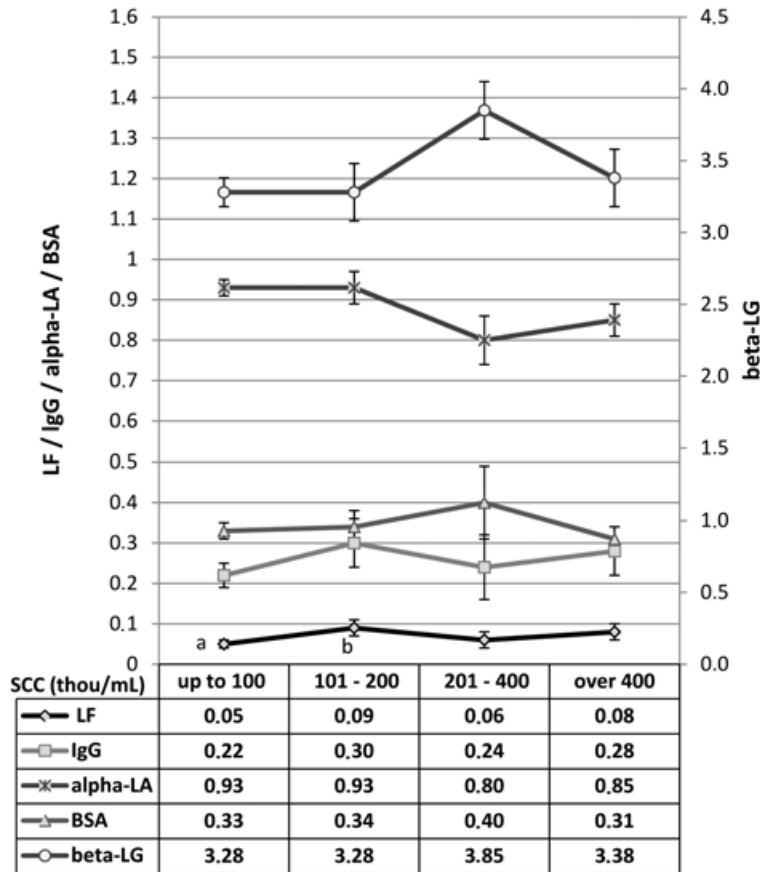


Fig. 8. Distribution of the average values (mean $\pm$ SEM) of antimicrobial proteins in SCC groups (mg/mL)

Mean values denoted by letters a and b are significantly different at $P < 0.05$.

Results of investigation of the influence of lactation stages and number on the concentrations of antimicrobial proteins in the milk

Bearing in mind that the concentration of natural antimicrobial proteins is a dynamic value, which can vary depending on different factors we investigated the influence of the number and stages of lactations on the values of these proteins in the milk.

Assessment of the influence of cow age, i.e. lactation number, on the distribution of proteins in milk (Fig. 9) showed that during the second lactation the concentrations of IgG, alpha-LA and BSA were higher than during the first or third lactations. The milk of the first-calf heifers contained the highest concentration of LF whereas the peak of beta-LG concentration was established during the third lactation. The average values of the second and third lactation groups differed (IgG by 25% and beta-LG by 8%) and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively).

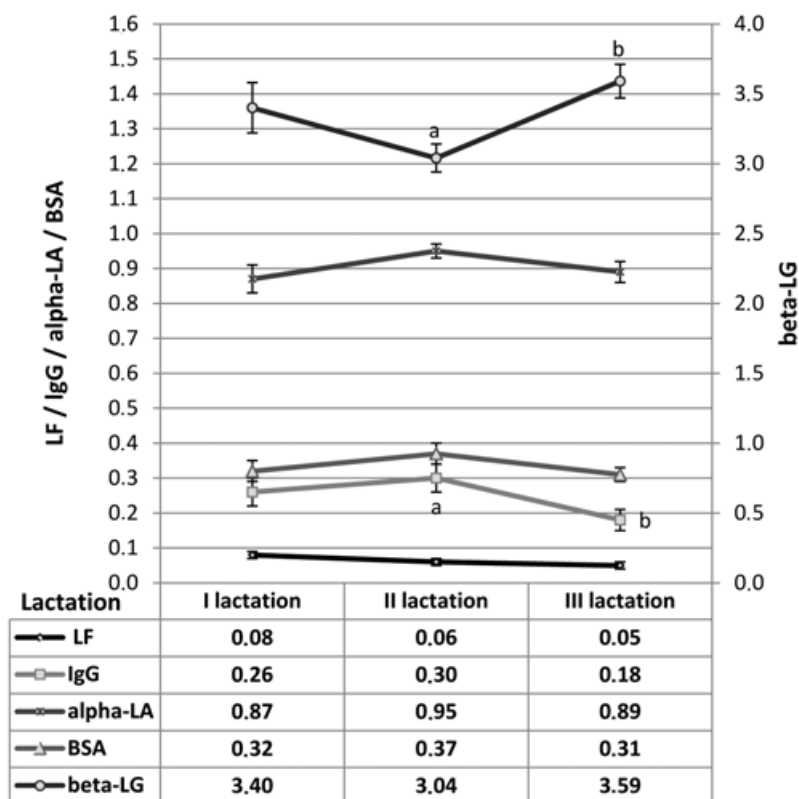


Fig. 9. Variations of antimicrobial proteins in milk during different lactations (mg/mL)

Mean values denoted by letters a and b are significantly different at $P < 0.05$.

Assessment of the influence of lactation stage (Fig. 10) revealed that the concentrations of LF, IgG and alpha-LA increased in the early stage of lactation. Later, in the middle of lactation, the highest concentrations were determined for beta-LG and BSA. In comparison with the early stage of lactation, before drying the concentrations of LF, IgG, alpha-LA and BSA decreased by 34%, 30%, 8%, and 4% respectively. The differences of IgG ($P < 0.01$) and alpha-LA ($P < 0.001$) average values during the early and late lactation stages and LF during the early and middle ($P < 0.05$) and early and late ($P < 0.01$) stages were statistically significant.

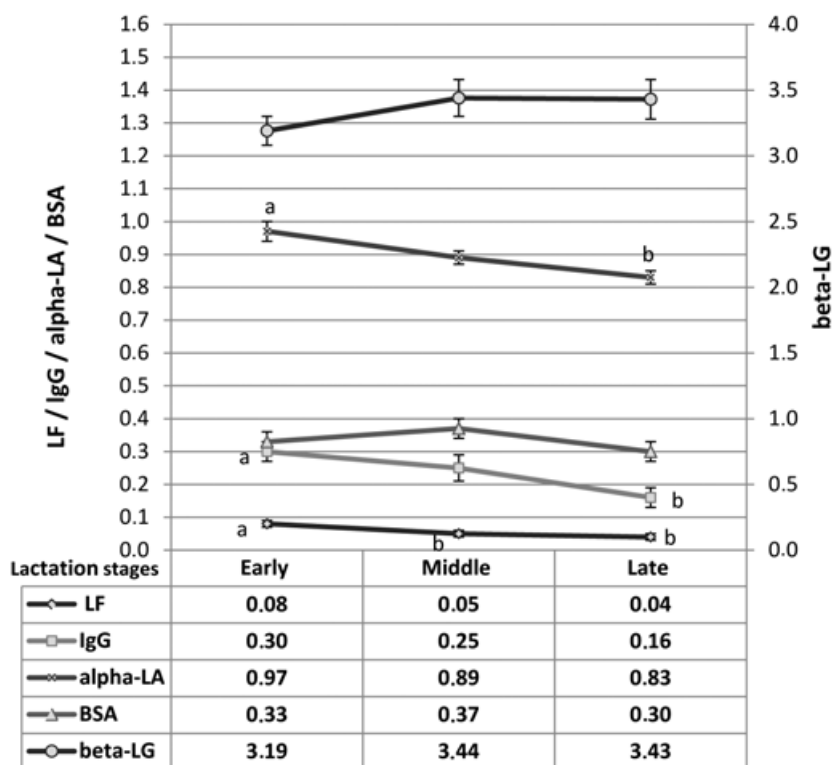


Fig. 10. Variations of antimicrobial proteins in milk during different lactation stages (mg/mL)
Mean values denoted by letters a and b are significantly different at $P < 0.05$.

Seasonal dynamics of antimicrobial protein concentrations in milk

Assessment of the influence of seasons on the distribution of antimicrobial proteins in milk (Fig. 11) showed that the highest concentrations of LF, IgG and BSA occurred in the spring, alpha-LA in the summer and beta-LG in the autumn. The LF concentration in the summer and autumn did not change and

was by 60% lower than in the spring. In comparison with other seasons, the concentrations of IgG, beta-LG and BSA in the summer were lowest. Only the concentration of alpha-LA was highest in the summer differing from the spring and autumn seasons by 4% and 8% respectively. Statistically significant differences of the average values were established for LF and IgG in the spring and summer ($P < 0.001$) and in the spring and autumn ($P < 0.001$), for alpha-LA in the summer and autumn ($P < 0.001$), for beta-LG in the spring and summer ($P < 0.05$), spring and autumn ($P < 0.05$), summer and autumn ($P < 0.001$) and for BSA in the spring and summer ($P < 0.05$) and summer and autumn ($P < 0.05$) groups.

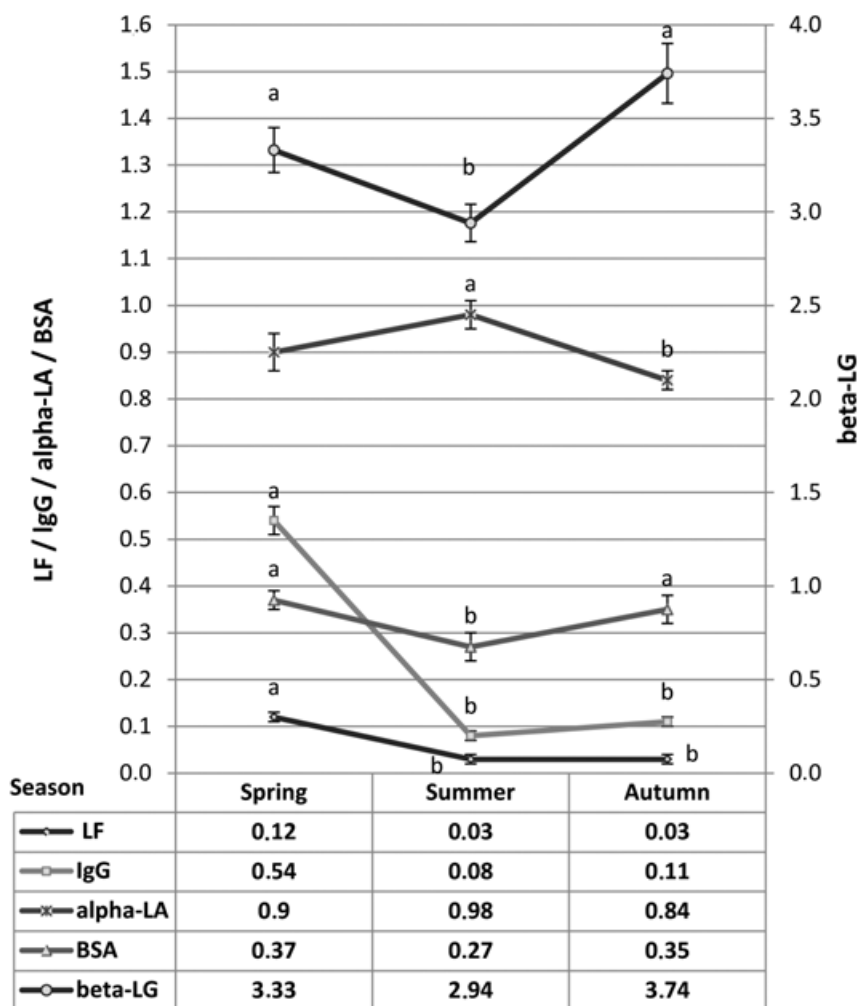


Fig. 11. Seasonal dynamics of antimicrobial proteins (mg/mL)
Mean values denoted by letters a and b are significantly different at $P < 0.05$.

Assessment of the influence of the investigated factors on the content of antimicrobial proteins in milk

By unifactor dispersion analysis the influence of SCC, health status of udder quarters (according to SCC and MBA and SCC groups), number and stages of lactation and seasons on the investigated indices (LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA) was evaluated.

As is shown in Figs 12, 13 and 14, the influence of factors of SCC and MBA (EM, NM, SM, HQ) groups and health status of udder quarters (healthy, diseased), established by SCC and MBA, is strongest on LF ($P < 0.001$), IgG ($P < 0.001$), and beta-LG, where statistical significance of factors of SCC and MBA groups is $P < 0.01$. Meanwhile, the influence of health factor of udder quarters according to SCC and MBA is less noticeable – $P < 0.05$.

Health status of udder quarters in SCC groups (1, 2, 3, and 4) produced a statistically significant influence ($P < 0.05$) on the content of alpha-LA when the factor influence coefficient was 4.3% (Fig.13). The number of lactations significantly ($P < 0.01$) affected the average value of beta-LG when the factor influence coefficient was 7.7% (Fig. 15). A significant influence of lactation stage was established for LF ($P < 0.01$), IgG ($P < 0.05$) and alpha-LA ($P < 0.01$), when factor influence coefficients were 8.5%, 6.1% and 9.1% respectively (Figs. 12, 13 and 14).

All investigated indices were most strongly affected by seasons. Seasonality statistically significantly affected the concentrations of LF, IgG and beta-LG ($P < 0.001$), alpha-LA ($P < 0.01$) and BSA ($P < 0.05$) when factor influence coefficients were highest for LF (46.5%) and IgG (79.6%) indices (Figs. 12, 13 and 16).

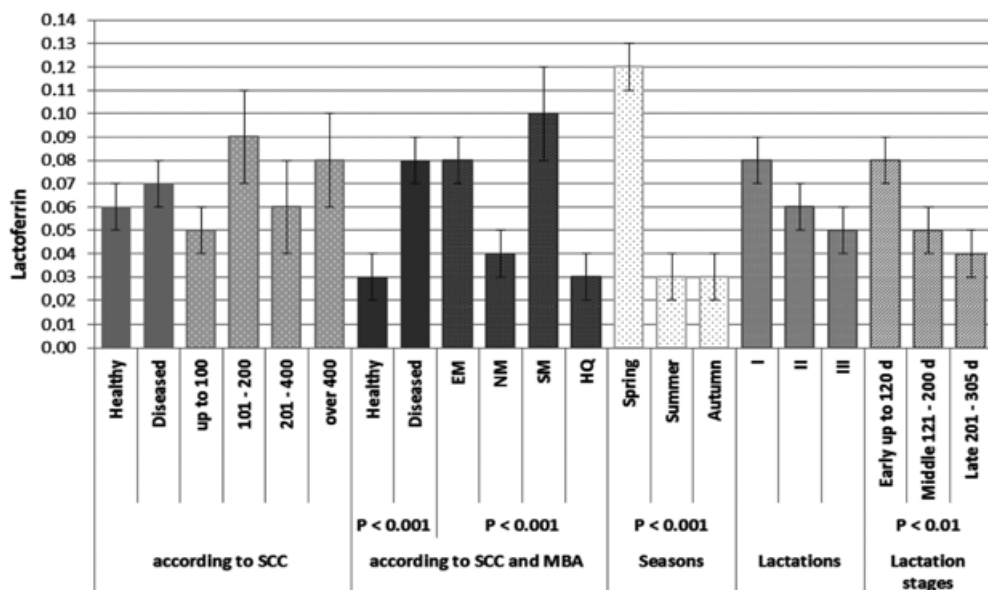


Fig. 12. The influence of the studied factors on LF concentrations in milk (mg/mL)

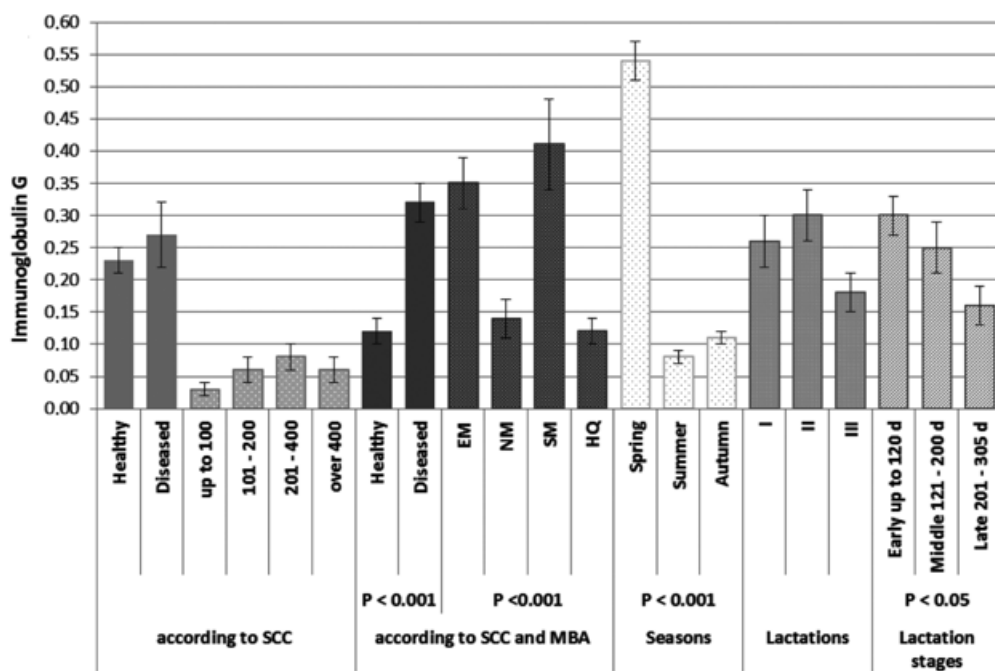


Fig. 13. The influence of the studied factors on IgG concentrations in milk (mg/mL)

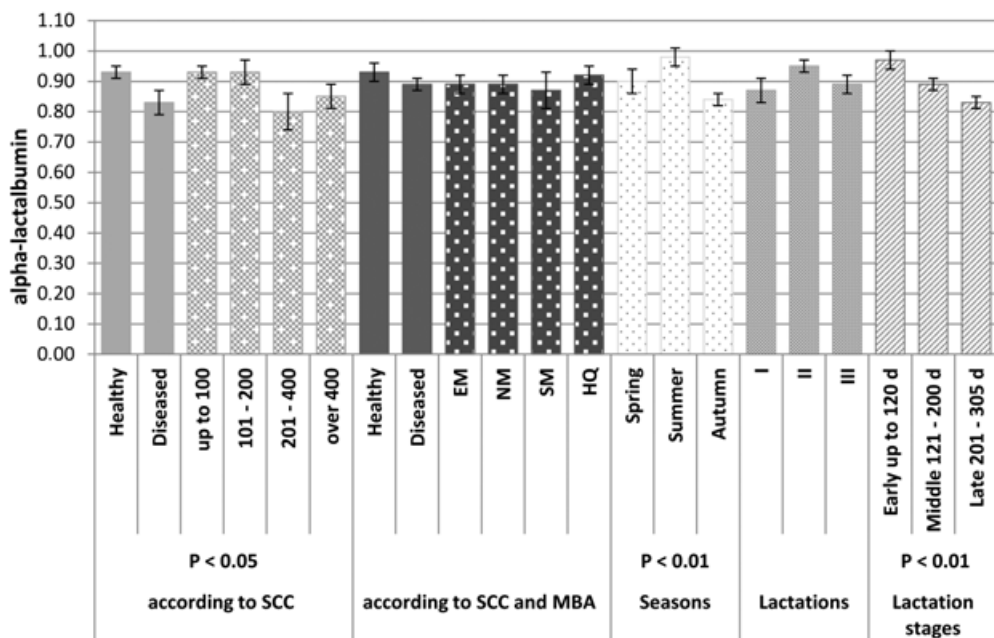


Fig. 14. The influence of the studied factors on alpha-LA concentrations in milk (mg/mL)

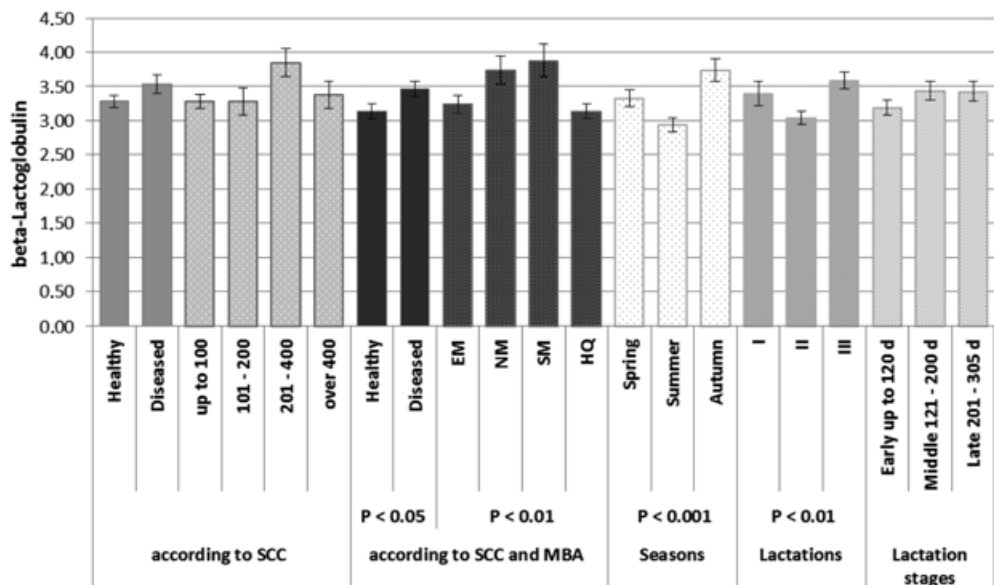


Fig. 15. The influence of the studied factors on beta-LG concentrations in milk (mg/mL)

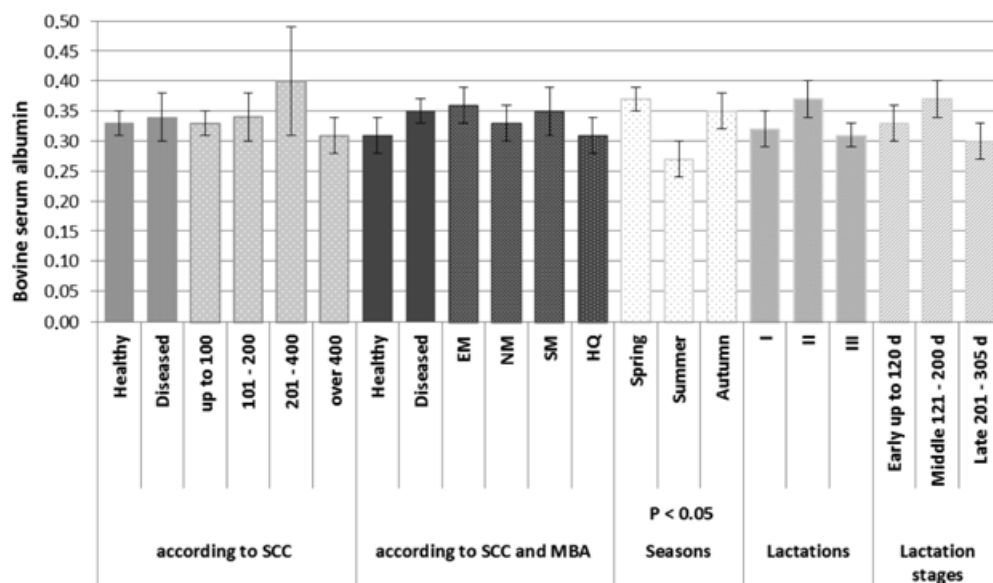


Fig. 16. The influence of the studied factors on BSA concentrations in milk (mg/mL)

Assessment of the joint influence of the studied factors (Table 6) on the analysed indices (LF, IgG, alpha-LA, beta-LG and BSA) using mixed linear model analysis ANOVA revealed that the influence of lactation stage decreased whereas the statistically significant influence of SCC on LF (5.2%, $P < 0.001$) and IgG (1.6%, $P < 0.05$) became more noticeable. The second SCC group (100–200 thou/mL) stood out for LF which by 80.6% exceeded the value of the first group (SCC up to 100 thou/mL) ($P < 0.05$). The model of multiple factor analysis $IgG_{ijklkn} = \mu + TKS - SLS_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 85.6\%$) allowed establishing the influence of biological factors (health status of udder quarters according to joint interaction of SCC groups x the number of lactations and health status of udder quarters according to joint interaction of SCC groups x lactation stages) on IgG; 1.3%, $P < 0.05$ and 1.1%, $P < 0.05$ respectively. IgG in the milk of udder quarters of the second lactation by 61.1% exceeded the value of the first lactation ($P < 0.05$). Analysis of this model showed that in the early lactation stage IgG concentration was by 37.67% higher than in the middle stage and by 50.25% higher than in the late stage of lactation ($P < 0.05$). Linear model of multiple factor analysis $LF_{ijklkn} = \mu + TKS - SLS/MBA_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 69.8\%$) showed a statistically significant influence of biological factors (health status of udder quarters according to SCC and MBA x joint interaction of the number of lactations) on LF (3.2%, $P < 0.05$). Comparison of SCC and MBA groups during various

Table 6. The influence (proc., p values) of the analysed factors on the content of antimicrobial proteins established by multiple factor dispersion analysis

Analyzed Factor	LF	IgG	Alpha-LA	Beta-LG	BSA
SCC	5.2% P < 0.001	1.6% P < 0.05	4.6% P > 0.05	3.0% P > 0.05	1.7% P > 0.05
HUQ-SCC	0.7% P > 0.05	0.4% P > 0.05	4.3% P < 0.01	1.5% P > 0.05	0.05% P > 0.05
SCC/MBA	17.4% P < 0.001	25.6% P < 0.001	1.2% P > 0.05	10.3% P < 0.001	1.4% P > 0.05
HUQ-SCC/MBA	12.0% P < 0.001	17.2% P < 0.001	1.1% P > 0.05	3.5% P < 0.05	1.2% P > 0.05
S	46.8% P < 0.001	79.9% P < 0.001	8.8% P < 0.01	14.0% P < 0.001	6.3% P < 0.05
LN	2.3% P > 0.05	0.04% P > 0.05	3.4% P > 0.05	6.9% P < 0.05	3.3% P > 0.05
LS	1.3% P > 0.05	1.2% P > 0.05	10.6proc. P < 0.01	3.2% P > 0.05	0.5% P > 0.05
SCC x S	2.0% P > 0.05	0.9% P > 0.05	4.3% P > 0.05	6.3% P > 0.05	5.8% P > 0.05
SCC x LN	1.0% P > 0.05	1.4% P > 0.05	1.4% P > 0.05	3.1% P > 0.05	2.2% P > 0.05
SCC x LS	1.6% P > 0.05	1.2% P > 0.05	3.7% P > 0.05	3.9% P > 0.05	5.4% P > 0.05
HUQ-SCC x S	1.3% P > 0.05	0.7% P > 0.05	2.2% P > 0.05	5.3% P > 0.05	0.6% P > 0.05
HUQ-SCC x LN	0.6% P > 0.05	1.3% P < 0.05	0.9% P > 0.05	1.0% P > 0.05	2.0% P > 0.05
HUQ-SCC x LS	0.01% P > 0.05	1.1% P < 0.05	0.03proc. P > 0.05	0.6% P > 0.05	0.4% P > 0.05
SCC/MBA x S	3.4% P > 0.05	0.3% P > 0.05	7.1% P < 0.05	8.5% P < 0.05	2.2% P > 0.05
SCC/MBA x LN	5.0% P < 0.05	0.7% P > 0.05	2.9% P > 0.05	4.7% P > 0.05	2.4% P > 0.05
SCC/MBA x LS	2.4% P > 0.05	0.5% P > 0.05	6.8% P > 0.05	1.9% P > 0.05	5.9% P > 0.05
HUQ-SCC/MBA x S	3.0% P < 0.01	0.4% P > 0.05	5.4% P < 0.01	1.2% P > 0.05	1.2% P > 0.05
HUQ-SCC/MBA x LN	3.2% P < 0.01	0.2% P > 0.05	0.4% P > 0.05	0.6% P > 0.05	0.7% P > 0.05
HUQ-SCC/MBA x LS	0.5% P > 0.05	0.4proc. P > 0.05	1.9% P > 0.05	0.6% P > 0.05	2.8% P > 0.05
S x LN	6.9% P < 0.05	1.1% P > 0.05	5.2% P > 0.05	4.0% P > 0.05	4.4% P > 0.05
S x LS	3.4% P > 0.05	1.1% P > 0.05	8.8% P < 0.05	6.2% P < 0.05	3.0% P > 0.05
LN x LS	2.5% P > 0.05	0.2% P > 0.05	2.4% P > 0.05	3.1% P > 0.05	1.7% P > 0.05

SCC/MBA – groups according to the microbiological analysis and somatic cell count; HUQ-SCC/MBA – health of udder quarters according to the microbiological analysis and somatic cell count; SCC – groups on the base of milk SCC; HUQ-SCC – health of udder quarters according to somatic cell count in milk; LN – number of lactation; LS – stage of lactation; S – season.

lactation stages showed the differences of LF average values in various directions. The joint influence of biological and environmental factors (health status of udder quarters according to SCC and MBA x season) was statistically significant for LF (3.0%, $P < 0.05$) and alpha-LA (5.4%, $P < 0.05$). In the spring, the content of LF and alpha-LA was higher than in the summer and autumn in all TKS-SCC/MBA groups. Noticeable variations of LF spring concentrations also were determined in different TKS-SCC/MBA groups. The strongest joint influence of biological and environmental factors season x number of lactations (6.6%, $P < 0.01$) was determined for LF by analysis of the model $LF_{ijklkn} = \mu + SLS_i + LS_j + LT_l + S_k + e_{ijklkn}$ ($R^2 = 77.9\%$). An elevated concentration of LF in the spring was observed in all lactation stages, in the first lactation in particular (0.16 ± 0.01 mg/mL). Meanwhile, in the summer the content of LF in the first lactation was 16 times (0.01 ± 0.01 mg/mL) as low as in the spring. Multiple factor dispersion analysis revealed the joint influence of biological and environmental factors season x lactation stage on alpha-LA (8.8%, $P < 0.05$) and beta-LG (6.2%, $P < 0.05$). The highest concentrations of alpha-LA occurred in the early lactation stage in the summer (1.06 ± 0.04 mg/mL) and the lowest in the late lactation in the spring (0.71 ± 0.08 mg/mL). The distribution of beta-LG values of early and middle lactation stages was highest in the autumn and of late lactation stage in the spring.

Correlation analysis of investigated antimicrobial proteins

By correlation analysis of antimicrobial proteins (Table 7), statistically significant relations were determined between LF and IgG ($P < 0.01$), IgG and BSA ($P < 0.05$) and beta-LG and BSA ($P < 0.01$). The strongest positive correlation was observed between LF and IgG ($r = 0.731$). A weaker positive correlation was observed between IgG and BSA ($r = 0.209$) and between beta-LG and BSA ($r = 0.293$). The correlation between alpha-LA and LF, IgG and beta-LG was weak and statistically insignificant.

Table 7. Correlation (r) between the investigated antimicrobial proteins

Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
LF	0.731**	-0.109	0.048	0.165
IgG	–	-0.025	0.043	0.209*
alpha-LA		–	-0.166	0.006
beta-LG			–	0.293**

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Correlation between health status of udder quarters and antimicrobial proteins in milk

Assessment of the health status of udder quarters by SCC and MBA and interrelations between the investigated antimicrobial proteins (Table 8) showed a weak positive correlation between LF and alpha-LA ($r = 0.297$), weak negative correlation between alpha-LA and beta-LG ($r = -0.317$) and average positive correlation between beta-LG and BSA ($r = 0.502$) in healthy udder quarters. In the quarters affected by inflammation (according to SCC and MBA analysis), a strong positive correlation was established between LF and IgG ($r = 0.792$) and weak negative correlation between LF and alpha-LA ($r = -0.242$).

Table 8. Correlation (r) between the health status of udder quarters determined by SCC and MBA and analyzed antimicrobial proteins

Health status of the quarters	Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Healthy	LF	0.264	0.297*	0.204	0.175
	IgG	–	0.136	0.110	0.202
	alpha-LA		–	-0.317*	-0.145
	beta-LG			–	0.502**
Diseased	LF	0.792**	-0.242*	-0.103	0.126
	IgG	–	-0.024	-0.091	0.191
	alpha-LA		–	-0.052	0.163
	beta-LG			–	0.113

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Analysis of the relations between the health status of udder quarters established by SCC in milk and antimicrobial proteins (Table 9) showed a strong positive correlation between LF and IgG ($r = 0.698$), weak positive correlation coefficients between LF and BSA ($r = 0.214$), IgG and BSA ($r = 0.215$), and beta-LG and BSA ($r = 0.242$) in healthy quarters (SCC < 200 thou/mL). A strong positive correlation link between LF and IgG ($r = 0.817$) and a slightly weaker average positive correlation between beta-LG and BSA ($r = 0.471$) were observed in udder quarters affected by inflammation (SCC > 201 thou/mL).

Table 9. Correlation (*r*) of the health status of udder quarters determined by SCC and analyzed antimicrobial proteins

Health status of the quarters	Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Healthy	LF	0.698**	−0.052	0.038	0.214*
	IgG	–	−0.020	0.012	0.215*
	alpha-LA		–	−0.153	0.047
	beta-LG			–	0.242*
Diseased	LF	0.817**	−0.209	0.039	0.032
	IgG	–	0.010	0.115	0.192
	alpha-LA		–	−0.123	−0.078
	beta-LG			–	0.471**

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Correlation between number and stages of lactation, seasons and antimicrobial proteins in the milk

Analysis of the links between the factors (Tables 10, 11 and 12) revealed LF and IgG strong, average in seasons, positive correlations during all stages of first, second and third lactations ($P < 0.01$). In the spring, during the early stage of the first lactation, the correlation between LF and alpha-LA was negative and average strong ($P < 0.05$). An average positive correlation between LF and BSA, and IgG and BSA was observed in the middle of the second lactation ($P < 0.01$). Average positive correlation coefficients ($r = 0.398$ - 0.634) between IgG and beta-LG, and beta-LG and BSA were established in the late stage of the third autumn lactation ($P < 0.01$). Weak correlation in the summer was established only between LF and IgG, and LF and alpha-LA ($P < 0.05$). In the late lactation stage, the correlations between almost all investigated antimicrobial proteins were statistically significant. In the early and late lactation stages, weak negative correlation was observed between LF and alpha-LA and between IgG and alpha-LA, whereas in the middle of lactation, average positive correlation was observed between IgG and alpha-LA ($P < 0.05$).

Table 10. Correlation (*r*) between lactation stages and antimicrobial proteins

Lactation stages	Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Early	LF	0.705**	-0.345*	0.044	0.011
	IgG	—	-0.293*	0.061	0.079
	alpha-LA		—	0.094	0.043
	beta-LG			—	0.236
Middle	LF	0.745**	0.255	-0.273	0.559**
	IgG	—	0.405*	-0.256	0.509**
	alpha-LA		—	-0.227	0.185
	beta-LG			—	0.176
Late	LF	0.770**	-0.330*	0.596**	0.130
	IgG	—	-0.349*	0.558**	0.023
	alpha-LA		—	-0.536**	-0.336*
	beta-LG			—	0.481**

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 11. Correlation (*r*) between lactation numbers and antimicrobial proteins

Lactation	Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
I	LF	0.922**	-0.421*	-0.068	0.079
	IgG	—	-0.241	-0.108	0.121
	alpha-LA		—	0.188	0.300
	beta-LG			—	0.320
II	LF	0.684**	-0.025	0.096	0.405**
	IgG	—	0.124	0.088	0.340*
	alpha-LA		—	-0.324*	-0.169
	beta-LG			—	0.283
III	LF	0.619**	0.215	0.209	-0.038
	IgG	—	-0.035	0.398**	-0.038
	alpha-LA		—	-0.368*	-0.201
	beta-LG			—	0.507**

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 12. *Correlation (r) between seasons and antimicrobial proteins*

Season	Indicators	IgG	alpha-LA	beta-LG	BSA
Spring	LF	0.408**	−0.407**	−0.003	−0.006
	IgG	–	0.028	−0.081	0.165
	alpha-LA		–	−0.067	0.402*
	beta-LG			–	−0.138
Summer	LF	0.360*	0.392*	0.120	0.033
	IgG	–	0.001	−0.132	−0.111
	alpha-LA		–	−0.143	−0.036
	beta-LG			–	0.218
Autumn	LF	0.436**	−0.276	0.234	0.388*
	IgG	–	−0.049	0.634**	0.366*
	alpha-LA		–	0.023	−0.235
	beta-LG			–	0.533**

Differences significant at * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

DISCUSSION

Concentrations of antimicrobial proteins in the milk of healthy and mastitis-affected udder quarters

Milk producers are confronted with mastitis in cows as a serious recurring problem (Bernatowicz et al., 2004; Petrovski et al., 2006; Sharma et al., 2011; 2012). Mastitis is an inflammatory reaction of mammary gland to metabolic and physiological changes of the organism or injury. The weakened immune system unable to eliminate the invasion of contagious or environmental pathogenic microorganisms and stop their proliferation is the most common cause of mastitis (Dego et al., 2002; Bannerman et al., 2004; Oviedo-Boyso et al., 2007). Prompt identification of health status of the udder is essential in order to ensure the welfare of the animals and high quality of milk and its products. Somatic cell count is recognized as the main indicator of milk quality and health status of cows (Rivas et al., 2001; Schukken et al., 2003; Green et al., 2004; Robert-Granie et al., 2004; Hillerton et al., 2005; Piccinini et al., 2006). An increased SCC is an indicator of latent mastitis (Schukken et al., 2003). This form of mastitis shows no clinical signs and can be detected by SCC in milk (Green et al., 2004). The physiological SCC increases in all udder quarters evenly whereas in cases of mastitis it increases only in one of a few quarters (Hutton et al., 1990). According to Hamann (2002) and Cheng et al. (2008), the milk with SCC less than 100 thou/mL indicates a healthy

udder. Chaneton et al. (2013) suggests that the udder can be regarded as healthy when SCC in milk is up to 200 thou/mL. Hamann (2002) is confident that SCC – ≤ 100 thou/mL is the “golden standard” because higher values disturb milk secretion and change milk components reducing milk production. Other researchers, Smith (2002) and Pyorala (2003), reported that milk from udder quarter in which SCC exceeds 200 thou/mL is indicative of inflammatory reaction (subclinical mastitis). This kind of milk cannot be used for cheese production because of reduced output, lower quality and shorter expiry date (Dohoo and Meek, 1982; Barbano, 1999). Following the regulation on the assessment of initial quality indices of raw milk, approved by Order No 3D-303, 25 July, 2006, of Minister for Agriculture of the Republic of Lithuania (Official Gazette 2006, No. 85-3337), the SCC in the highest quality milk cannot exceed 400 thou/mL. Attempts to improve the health status of cows and their productivity and welfare require knowledge about immunity factors and operation of udder protection mechanism (Chaneton et al., 2013). Literary sources point out that antimicrobial proteins (AP) contained in the whey participate in the activity of immune system performing many important protective and immunomodulation (stimulation) functions (Bellamy et al., 1993; Krol et al., 2010; Pan et al., 2006; Wojdak-Maksymiec Mikolajczyk, 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). Recent researches focus on the dynamics of components of immune system, such as lactoferrin (LF), immunoglobulins (Ig), alpha-lactalbumins (alpha-LA), beta-lactoglobulins (beta-LG), and bovine serum albumin (BSA), in milk (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012; Chaneton et al., 2013; Sobczuk-Szul et al., 2014). In many research works, the health status of udder and udder quarters is assessed based on SCC in the milk (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). The data obtained by milk SCC usually are grouped and the groups serve as a basis for identification of healthy cows and cows with mastitis. Krol and co-authors (2012) maintain that the milk from udder quarters with SCC exceeding 200 thou/mL is indicative of possible udder infection (subclinical mastitis) and the udder should be identified as affected by mastitis (Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012). Having analysed scientific literary sources and seeking to evaluate the health status of udder quarters and the influence of SCC on the AP concentrations we chose the method of grouping the investigation data according to SCC in the milk. Researches conducted in Poland showed that increasing SCC contributed to decreasing values of the main albumins (alpha-LA and beta-LG) but the concentrations of immunologically active proteins (lactoferrin and lysozyme) and BSA increased ($P < 0.001$) (Litwinczuk et al., 2011). Krol and co-authors (2012) supplemented Litwinczuk's et al. (2001) data. They determined that the increasing SCC statistically significantly

influenced the increasing concentrations of LF, IgG and lysozyme in the milk. In the mentioned researches, the influence of SCC on the content of LF and IgG was proved by high correlation coefficients, which are in agreement with our calculations. The positive correlation coefficients between SCC and LF also were confirmed by Hutton et al. (1990), Lindmark-Mansoon et al. (2000; 2006), and Cheng et al. (2008) and between SCC and IgG by Liu et al. (2009) and Krol et al. (2012; 2014). Our results and results obtained by other researchers allow assuming that identification of subclinical mastitis should be based on assessment of LF and IgG indices and SCC in milk.

Elevated SCC in milk requires microbiological investigation of mastitis agent. The present study is based on SCC and microbiological milk analysis for the health status of udder quarters. For identification of the form of mastitis and its agent, Hagiwara (2003), Kocina (2012), Chaneton (2013) and other researchers also applied microbiological analysis of mastitis agent along with SCC. According to Pyorala (2003), Chaneton et al. (2013), assessment of the health status of udder quarters by the mentioned two important criteria allows differentiating the inflammation of mammary gland (environmental, non-specific or subclinical forms of mastitis). In the present study, the distribution of udder quarters according to SCC and microbiological analysis was comparable, i.e. 59% affected quarters and 41% healthy quarters. Meanwhile, in the studies of other researchers healthy quarters accounted for 86.6% (Chaneton et al., 2013). The majority (62%) of microbiologically examined samples in Chaneton et al. (2013) study were negative despite that SCC in the milk exceeded 200 thou/mL. Such samples in our study were attributed to non-specific mastitis. They accounted for 11%. We can assume that procedures for identification of mastitis agent must be even more precise and sensitive. Nevertheless, we cannot deny the possibility that inflammatory processes may start before it is possible to identify bacteria in the milk. This assumption has been proved by other investigations when clinically infected udder quarters were identified without isolation of pathogenic bacteria, which were subsequently detected by analysis of polymerase chain reaction (PCR) (Taponen et al., 2009). It has been reported that the physiological state of mammary gland (dry period or after-calving time span) can weaken the immune response against bacterial invasion (Chaneton et al., 2013). When the immune response is weak, it is possible to identify some strains of bacteria in milk samples (Schwarz et al., 2010). Perhaps this is the explanation why mastitis agents are identified in milk with SCC below 200 thou/mL.

The results of our study are in agreement with the results obtained by Hagiwara et al. (2003) who determined a statistically significantly ($P < 0.001$) higher LF concentration in udder quarters affected by subclinical mastitis. The concentration of LF in the milk also depends on the specific character

and pathogenicity of bacteria strains (Hagiwara et al., 2003). The concentrations of LF in udder quarters infected with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and other streptococci are considerably higher than in the quarters infected with KNS and *Corynebacterium* (*Corynebacterium bovis*) (Hagiwara et al., 2003). It has been suggested that LF concentration in the milk lower than 0.2 mg/mL is insufficient to suppress proliferation of enterotoxigenic bacteria *E. coli* and *S. aureus* (David et al., 1993; Hagiwara et al., 2003; Chaneton et al., 2008). In Chaneton et al. (2008) studies, the highest LF concentrations were detected after identification of udder streptococci (*Str. uberis*). In our study, the elevated concentration of IgG was determined in the case of subclinical mastitis. Other researchers obtained similar results, when in cases of chronic and subclinical mastitis the concentration of IgG was higher in the milk but lower in the blood serum indicating an intensive migration of immunoglobulins from the blood circulatory system to udder tissues as a protective reaction against infection (Kocina et al., 2012). The IgG concentration in the case of *Str. uberis* infection noticeably increases in affected udder quarters whereas in the case of *S. aureus* infection it can be lower than in the milk of the healthy udder quarters (Kocina et al., 2012). A statistically reliable increase of LF and BSA ($P < 0.05$) concentrations in cases of progressive inflammation of mammary gland was determined in the goat and buffalo milk (Leitner et al., 2004b; Piccinini et al., 2006). Our results are in agreement with the results of the experiment performed in Iran, which showed increasing concentrations of Ig and BSA and decreasing concentrations of alpha-LA in udder quarters affected by subclinical mastitis. Yet Batavani et al. (2007), as distinct from our results, determined that the concentration of beta-LG decreased in the milk of inflammation-affected udder quarters. According to Auldist and Hubble (1998) theory, the increase of the concentrations of alpha-LA and beta-LG in the cow blood is related with the increase of SCC in the milk. The decrease of the mentioned antimicrobial proteins in the milk is predetermined (Auldist and Hubble, 1998) by impaired cell function of synthesis and secretion causing leakage of these proteins into the intracellular fluid due to increased vascular permeability during inflammation.

In the milk of healthy cows, the concentration of Ig is low and depends on the vascular permeability of udder tissues. Inflammation damages the permeability barrier and Ig production starts in the affected udder quarters. The elevated portion of Ig (Batavani et al., 2007) is related with the compensation of the decrease of lactoalbumins in milk in order to maintain equilibrium of these components between the blood and milk. BSA concentrations increase in the milk of cows (Urech et al., 1999; Vijayalakshmi et al., 2001; Coulon et al., 2002), sheep (Leitner et al., 2004a) and goats (Leitner et al.,

2004b) with mastitis. Albumins are synthesized in the liver. They can be transported into milk by diffusion across the epithelial cells from the blood (de Wit, 1998; Walsh and Duncan, 2000). The epithelial cells of blood also synthesize albumins though less intensively than hepatocytes (Shamay et al., 2005). Increasing concentrations of BSA in the milk of cows with mastitis are indicative of the reaction of the mammary gland, which activates albumin synthesis. Litwinczuk et al. (2011) suggest that BSA is an indicator of milk and blood barrier permeability in the mammary gland. Thus, the increasing concentrations of BSA indicate intensive inflammatory reaction when the components from the blood circulation system are filtered into the mammary gland. The main whey albumins usually are synthesized in the mammary gland. Presumably, the decrease of alpha-LA in the cases of subclinical mastitis, determined in the present study and in the studies of other researchers (Batavani et al., 2007; Litwinczuk et al., 2011; Krol et al., 2012), occurs due to slowdown of milk synthesis in the gland.

The influence of the number and stages of cow lactations on the changes of antimicrobial albumins in the milk

Cow age and lactation stages are the main physiological factors of productivity and milk composition (Linn, 1988; Ostersen et al., 1997; Auldist et al., 1998; Heck et al., 2009; Krol et al., 2013). Mammary gland, as distinct from other glands, functions at certain stages. Cow lactation lasts for 305 days on the average. The optimal dry period takes 60 days (Akers, 2002). During lactation, milk quality changes three times. On the first few days after calving, cows generate colostrum whose chemical composition, look and physiological impact differ from milk. Colostrum contains high concentrations of lysozyme and globulins to protect the new-born calf from disease. Later, normal milk (of normal composition) is generated for 280–285 days. The late-lactation milk before drying contains higher concentrations of fat, proteins, minerals, and enzymes and lower concentrations of lactose than the middle-lactation milk (Ray et al., 1992). At the end of lactation, the daily milk performance decreases and SCC increases what makes it unfit for industrial processing.

In the first months of lactation, the LF and IgG concentrations in the cow milk are lowest and increase towards the peak values during the late-lactation stage (Levieux and Ollier, 1999; Hagiwara et al., 2003; Cheng et al., 2008; Liu et al., 2009; Krol et al., 2010; Krol et al., 2012; Sobczuk-Szul et al., 2014). Opposite results were obtained in the present study. The concentrations of LF and IgG were statistically significantly higher during the early- and middle-lactation stages than during the late-lactation stage. These data are

in agreement with the results reported by Chaneton et al. (2013) who suggest that the high concentration of LF in the early-lactation stage is related with infected udder quarters. The results indicate high sensitivity of some udder quarters to infection agents when the inflammatory process becomes chronic. It is assumed that in the early-lactation stage and during involution the mammary gland becomes especially sensitive to inflammation due to weakened immune response (Burton and Erskine, 2003; Burvenich et al., 2003; Fadlelmoula, 2007). Investigations conducted by Elbably et al. (2013) proved that during the mentioned time spans the incidence of mastitis increases. The peak of mastitis infection occurs in the first lactation month (Compton et al., 2009) mainly due to functional stress on the organism, udder in particular. The incidence of new udder infections increases from the first dry week until calving (Stoliuk et al., 2011) because LF concentration in the milk decreases as also the efficiency of somatic cells in elimination of microorganism invasion (Suriyasathaporn et al., 2000; Philipot et al., 2011). Kocina and others (2012) suggest that LF and Ig concentrations in the milk of middle-lactation stage are lowest therefore during this stage the content of these proteins should be supplemented for maintaining the optimal immune response. High correlation coefficients between the lactation stages and LF were determined by Cheng et al. (2008) and between the lactation stages and IgG by Liu et al. (2009). Our results are in agreement with the findings of Ostersen et al. (1997) and Sobczuk et al. (2014) who established that beta-LG concentrations in the middle- and late-lactation stages are higher than during the postpartum period. According to our data and data obtained by Ostersen et al. (1997) and Krol et al. (2013), the concentration of alpha-LA was lowest in the late-lactation stage. It is assumed that alpha-LA concentration decreases before drying period due to reduced milk synthesis in the mammary gland.

Contrasting results were obtained on the influence of the number of lactations on the content of AP in the milk. Our results are comparable with the results obtained by Hagiwara et al. (2003) showing that LF concentration in the milk of older cows is lower than in the milk of first-calf heifers ($P < 0.05$). However, other studies disproved the theory that LF and Ig concentrations decrease in the milk of older cows (Soyeurt et al., 2007; Krol et al., 2010; Krol et al., 2012). Krol et al. (2010) maintain that Ig and lysozyme concentrations in the milk increase with cow ageing and reach their peak values during the fourth lactation. Besides, the highest LF concentrations in the cow milk occur during the second and fourth lactations (Krol et al., 2010). Subsequent investigations conducted by Krol et al. (2012) backed up the previous results. They showed that LF and IgG concentrations in the milk of first-calf heifers was significantly lower than in the milk of cows of the second–third lactations ($P \leq 0.05$) and even older cows ($P \leq 0.01$). The

content of LF in the colostrum of older cows (Tsuji et al., 1990) and IgG (Gulinski et al., 2006) is higher than in the colostrum of first-calf heifers (Mian-bin and Yin-jun, 2009). Cheng et al. (2008) obtained similar results according to which LF concentrations in the milk of the third and fourth lactations are higher than in the milk of the first and second lactations though the differences are not statistically significant. It could be a subject of discussion whether milk and colostrum can be compared bearing in mind their different composition and production time. The contradictory results might have been obtained as a result of different investigation methods, different number of examined samples or different chosen assessment criteria.

As was mentioned above, SCC is in direct correlation with increasing values of LF and IgG. Therefore, other factors also should be taken into consideration when evaluating the influence of lactations on AP concentrations. During subsequent lactations, the concentrations of albumins and globulins significantly decrease whereas the concentration of BSA increases (Krol et al., 2013). The incidence of mastitis in cows increases with age (Sharma et al., 2011; 2012). Inflammation increases vascular permeability contributing to transportation of blood proteins, other components and somatic cells from blood to milk. Bearing in mind that BSA is an indicator of milk–blood barrier permeability we can assume that in older cows the permeability of udder tissues increases and is responsible for higher BSA concentrations in the milk. Udder inflammation reduces the activity of milk-producing cells resulting in lower milk performance and poorer synthesis of alpha-LA. Our results obtained on assessment of the mentioned antimicrobial proteins are contradictory. The highest beta-LG concentration was established in the milk of the third lactation and alpha-LA and BSA concentrations in the milk of the second lactation. Besides, the number of lactations produced significant influence on the beta-LG concentration in milk ($P < 0.01$). The concentrations of AP in milk must depend also on other factors responsible for the status of the organism (season, breed, lactation stages, mastitis, etc.).

The influence of the seasons on the concentrations of antimicrobial proteins in the cow milk

Season is one of the most important environmental factors affecting milk composition. Many Lithuanian researchers (Juozaitienė ir Žakas, 2002; Žakas, 2002; Pečiulionienė ir kt., 2004; Pauliukas ir kt., 2005; Klimienė ir kt., 2005) have studied its influence. Yet data about AP concentrations in milk in different seasons are lacking. Our investigation is the first in Lithuania which showed that seasons have a significant influence on the distribution of antimicrobial proteins (LF ($P < 0.001$), IgG ($P < 0.001$), alpha-LA ($P < 0.01$),

beta-LG ($P < 0.001$) and BSA ($P < 0.05$)) in the milk of Lithuanian Black-and-White crossbred with Holstein dairy cows. The obtained results are in agreement with the findings of Latvian researchers who established a statistically significant seasonal influence on the IgG concentration in the cow milk ($P < 0.001$) (Kocina et al., 2012). Researches carried out in Poland proved statistically significant seasonality of LF and alpha-LA concentrations in the goat milk ($P < 0.01$) (Brodziak et al., 2014). Conesa et al. (2005) analysed over three thousand milk samples from different regions of Spain and determined that in the spring concentrations of IgG are significantly ($P < 0.05$) higher than the values obtained in other seasons. According to our data, the concentrations of investigated antimicrobial proteins (LF, IgG and BSA) in the spring were significantly ($P < 0.05$) higher than in other seasons. The highest alpha-LA concentration in milk was established in the summer and the lowest in the autumn. Gellrich and other researchers (2012) have reported similar results. According to investigations in Kazakhstan, where season was the only established significant factor, the highest LF concentration in the camel milk was determined in the spring and the lowest in winter (Konuspayeva et al., 2007). By similar investigations, Krol et al. (2008) and Brodziak et al. (2012) established elevated concentrations of LF, beta-LG and alpha-LA in the cow milk during the grazing season and BSA during the time of indoor feeding. The concentrations of LF in the milk of cows, which graze moving freely, are significantly higher than in the milk of cows that graze attached (Turner et al., 2007). It is possible to assume that during the pasturage time the young grass abounds in biologically active substances with immunomodulatory properties (Brodziak et al., 2012), which have a direct influence on the concentrations of LF, Ig and beta-LG in the milk.

In the present study we investigated the joint influence of seasons, number of lactations and lactation stages on the analysed antimicrobial proteins. A statistically significant influence of seasons and number of lactations was determined for LF ($P < 0.05$) and the joint influence of seasons and lactation stages for alpha-LA and beta-LG ($P < 0.05$). It has been reported that colostrum of cows of summer calving contained higher concentrations of Ig than colostrum of cows of winter calving (Eihvalde et al., 2012). In the spring and summer, the percentage of antimicrobial proteins in the milk of cows and goats is higher than in the autumn and winter (Litwinczuk et al., 2011; Brodziak et al., 2014). The variations of the content of proteins may be predetermined by different feeding protocols and lactation stages, i.e. the majority of cows are in early lactation. Based on the mentioned findings, we can draw a conclusion that the seasonal variations of antimicrobial proteins concentrations in the milk depend on a combined influence of a few factors.

From April until June (after winter), the immune response of cows is weak. The beginning of grazing period and higher rates of milk production increase the incidence of mastitis (Klimienė *et al.*, 2005). These are possible causes of elevated concentrations of antimicrobial proteins. Yet other researchers have reported that the incidence of mastitis is higher during the time of indoor feeding. Poor ventilation of cowsheds may be one of the causes. Cows produce much heat and moisture increasing the ambient temperature in the building, which is favourable for reproduction of bacteria. Kocina *et al.* (2012) found that IgG concentration during the indoor feeding period was similar in the samples with identified pathogenic agents and in uninfected samples whereas during the pasturage it was higher in the uninfected milk samples.

Antimicrobial proteins seasonal distribution in the milk depending on the breed of cows and SCC was investigated in Poland (Litwinzuk *et al.*, 2011). In the winter, alpha-LA and beta-LG concentrations increased with the increasing SCC in the milk of cows of different breeds. In the summer, alpha-LA concentration was comparable whereas the values of beta-LG increased ($P < 0.01$). Statistical analysis conducted by Litwinzuk *et al.* (2011) showed significant influence of breed and season on the analysed antimicrobial proteins. Yet the influence of Swedish dairy cow breeds on the variations of antimicrobial protein values was not proved (Wedholm *et al.*, 2006). We analysed the joint influence of season and SCC on the chosen antimicrobial proteins and determined that it was insignificant. Other researchers who determined a significant joint influence of season and breed on LF, lysozyme, alpha-LA, beta-LG and BSA proportions in the milk (Brodziak *et al.*, 2012) reported similar findings.

CONCLUSIONS

1. It was determined that complex evaluation by somatic cell count and microbiological analysis is more reliable in identification of inflammation of udder quarter (the number of identified affected udder quarters was by 35% higher) than evaluation by SCC in the milk alone.

2. The concentrations of LF and IgG in the udder quarters with identified mastitis were higher by 46%, beta-LG by 4% and BSA by 6% whereas the concentration of alpha-LA was by 2% higher in the healthy udder quarters.

2.1. The highest determined average values of LF, IgG and beta-LG were in udder quarters affected by subclinical mastitis by 0.1 mg/mL, 0.41 mg/mL and 3.88 mg/mL respectively ($P < 0.05$).

2.2. The concentration of BSA in the milk with identified environmental microorganisms caused mastitis was by 7.4% higher than in the healthy udder quarters.

3. Evaluation of the influence of the number and stage of lactations on the distribution of antimicrobial proteins in the milk showed that:

3.1. Highest concentrations of LF (0.08 mg/mL) occur in first-calf heifers, IgG, alpha-LA and BSA in the milk of second lactation cows (by 0.3 mg/mL, 0.95 mg/mL and 0.37 mg/mL respectively), and beta-LG (3.59 mg/mL) in the milk of third lactation.

3.2. The concentrations of LF, IgG and alpha-LA (by 0.08 mg/mL, 0.3 mg/mL and 0.97 mg/mL respectively) are elevated in the early stage of lactation and beta-LG and BSA (by 0.37 mg/mL and 3.44 mg/mL) are elevated in the middle stage of lactation.

4. It was determined that season is an important influencing factor for concentrations of antimicrobial proteins, i.e. LF (46.8%), IgG (79.9%), alpha-LA (8.8%), beta-LG (14%) and BSA (6.3%) in the milk of Lithuanian Black-and-White crossbreed with Holstein dairy cows.

4.1. LF, IgG and BSA (by 0.12 mg/mL, 0.54 mg/mL and 0.37 mg/mL respectively) in the spring, alpha-LA (0.98 mg/mL) in the summer and beta-LG (3.74 mg/mL) in the autumn are significantly higher than in other seasons.

5. The influence of the chosen factors on antimicrobial proteins was determined by unifactor dispersion analysis:

5.1. The influence of the health status of udder quarters (determined by complex evaluation of SCC and MBA) is strongest on LF (17.4%; $P < 0.001$), IgG (25.6%; $P < 0.001$) and beta-LG (10.3%; $P < 0.05$).

5.2. The influence of the health status of udder quarters (determined by SCC in the milk) was determined for alpha-LA (4.3%; $P < 0.05$).

5.3. Analysis of biological factors showed significant influence of the number of lactations on beta-LG (7.7%; $P < 0.01$) and lactation stages on LF (8.5%; $P < 0.01$), IgG (6.1%; $P < 0.05$) and alpha-LA (9.1%; $P < 0.01$).

5.4. Season as an environmental factor significantly influenced the distribution of the concentrations of all analyzed antimicrobial proteins in milk whereas the highest factor influence coefficients were for LF (46.5%) and IgG (79.6%).

6. Employment of linear models of multi-factor analysis showed statistically significant joint influence of investigated factors:

6.1. IgG was most strongly affected by joint interactions of the health status of udder quarters (SCC groups) and number of lactation (1.3%; $P < 0.05$) and by joint interaction of the health status of udder quarters (SCC groups) and lactation stages (1.1%; $P < 0.05$).

6.2. LF was most strongly affected by joint interaction of the health status of udder quarters (SCC and MBA) and the number of lactation (3.2%; $P < 0.05$) and by joint interaction of season and the number of lactation (6.6%; $P < 0.01$).

6.3. The concentrations of alpha-LA and beta-LG were most highly dependent on the joint interaction of season and lactation stage (by 8.8% and 6.2%; $P < 0.05$ respectively).

7. Assessment of phenotype relationships between the antimicrobial proteins and investigated factors showed that:

7.1. Correlation analysis showed a strong positive correlation between LF and IgG ($r = 0.731$; $P < 0.01$), and a weakly positive correlation between IgG and BSA and between beta-LG and BSA ($r = 0.209$; $P < 0.05$ and $r = 0.293$; $P < 0.01$ respectively).

7.2. A strong positive correlation between LF and IgG ($r = 0.792$; $P < 0.01$) and statistically reliable weak negative correlation between LF and alpha-LA ($r = -0.242$; $P < 0.05$) in the affected udder quarters were determined by complex assessment of SCC and MBA.

7.3. A strong positive correlation between LF and IgG in healthy ($r = 0.698$; $P < 0.01$) and affected ($r = 0.817$; $P < 0.01$) udder quarters, weak positive correlation coefficients between LF and BSA ($r = 0.214$; $P < 0.05$), IgG and BSA ($r = 0.215$; $P < 0.05$), beta-LG and BSA ($r = 0.242$; $P < 0.05$) in healthy udder quarters and an average positive correlation between beta-LG and BSA ($r = 0.471$; $P < 0.05$) in the inflammation-affected udder quarters were determined by assessment of SCC in milk.

7.4. A strong, average in seasons, positive correlation was determined between LF and IgG in all lactation stages during the first, second and third lactations ($P < 0.01$).

PUBLICATIONS

Publications based on the results of the dissertation were published in journals with an impact factor refereed by the „Thomson Reuters Web of Knowledge“

Musayeva Kristina; Sederevičius Antanas; Želvytė Rasa; Monkevičienė Ingrida; Beliavska-Aleksiejūnė Danuta; Kerzienė Sigita. Concentration of lactoferrin and immunoglobulin G in cows milk in relation to health status of the udder, lactation and season. Polish Journal of Veterinary Sciences. Warsaw: De Gruyter Open. (Original article). DOI 10.1515/pjvs-2016-0093. 2016. Vol.19(4). P. 737-744. Impact factor (Web of Science – Thomson Reuters): 2015 – 0.719.

Publications based on the results of the dissertation were published in peer – reviewed journals refereed by other data bases

Musayeva Kristina; Sederevičius Antanas; Želvytė Rasa; Monkevičienė Ingrida; Beliavska-Aleksiejūnė Danuta; Kerzienė Sigita; Bliznikas Saulius. Quantitative analysis of whey proteins in relation to health status of the udder quarters and season. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2016, Vol. 73(95), suppl. 2016, P. 95-98.

Musayeva Kristina; Sederevičius Antanas; Želvytė Rasa; Stankevičius Rolandas. Analysis of factors influencing immunoglobulin G concentration in milk of dairy cows. Veterinarija ir zootechnika. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija. ISSN 1392-2130. 2015. Vol. 72(94). P. 25-29.

Conferences based on the results of the dissertation

International conferences:

1. „11th Baltic Conference on Food Science and Technology“ “Food science and technology in a changing world” FOODBALT 2017: April 27-28, 2017, Jelgava, Latvia. Poster presentation „Detection and quantification of the milk proteins by RP-HPLC method“.

2. International scientific conference "The Use of local raw material in the animal nutrition: benefits and limitations regarding digestive physiology, products quality and animal health: 6 October, 2016, Kaunas, Lithuania. Lithuanian University of Health Sciences Veterinary Academy. Poster presentation.

sensation „Quantitative analysis of whey proteins in relation to health status of the udder quarters and season“.

3. 10th International Scientific Conference "The Vital Nature Sign": May 19-20, 2016, Vilnius, Lithuania. Vytautas Magnus University. Poster presentation „Analysis of factors influencing selected whey proteins concentration in cow's milk“.

4. IDF World Dairy Summit "Closing the Nutritional Gap with Sustainable Dairy": September 20–24, 2015, Vilnius, Lithuania. Poster presentation „Determination of immunoglobulins G in cows milk in relation with somatic cells count“.

5. 17th International Veterinary medicine students Scientific Research Congress: April 28–30, 2015, Istanbul, Turkey. Organised by Scientific Research Club of Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University. Poster presentation „The Concentration of Immunoglobulins G in Different Breed Cows Milk in Relation with Cow Udder Health and Lactation“.

National conferences:

1. 9th national scientific conference of doctoral students „Mokslas – sveikatai”: 13 April, 2016. Kaunas, Lithuania. Lithuanian University of Health Sciences. Oral presentation „Natūralių antimikrobinių baltymų kiekio kintamumo tyrimai sveikų ir sergančių tešmens uždegimu karvių piene skirtingų sezonų metu“.

2. 8th national scientific conference of doctoral students „Mokslas – sveikatai”: 10 April, 2015. Kaunas, Lithuania. Lithuanian University of Health Sciences. Oral presentation „Imunoglobulino G dinamiškumas karvių piene skirtingais laktacijos tarpsniais priklausomai nuo veislės bei tešmens sveikatingumo“.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my supervisor Prof. Habil. Dr. Antanas Sederevičius for his help, useful advises, patience and the time devoted to the preparation of this thesis. Thanks to all members of the Department of Anathomy and Physiology of the Veterinary Academy for sharing their scientific knowledge and experience.

Finally, I am thankfull for my family for being very supportive and encouraging.

This study partly was supported by the Science Foundation of Lithuanian University Health Sciences.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname	Kristina Musayeva
Address	Department of Anathomy and Physiology, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS), Tilžės 18, LT-47181, Kaunas, Lithuania
E-mail	kristina.musayeva@lsmuni.lt
Education	2012–2016 Doctoral (PhD) studies in Veterinary Medicine, LUHS Kaunas 2009–2011 Residency studies of Veterinary Virology, doctor of veterinary virology qualification, LUHS Kaunas 1999–2007 Master degree of Veterinary Medicine, doctor of veterinary medicine qualification, LUHS Kaunas 1987–1999 Studies at the Nemunas Secondary School, Kaunas
Professional Activity	since 2011 – until now Junior Researcher at the Research Center of Digestive Physiology and Pathology, Lithuanian University of Health Sciences Veterinary Academy 2016 Vice Rector's for Veterinary Medicine and Animal Husbandry Administrator, LUHS Since 2016 – until now Lecturer at Department Anatomy and Physiology, LUHS Veterinary Academy

PRIEDAI

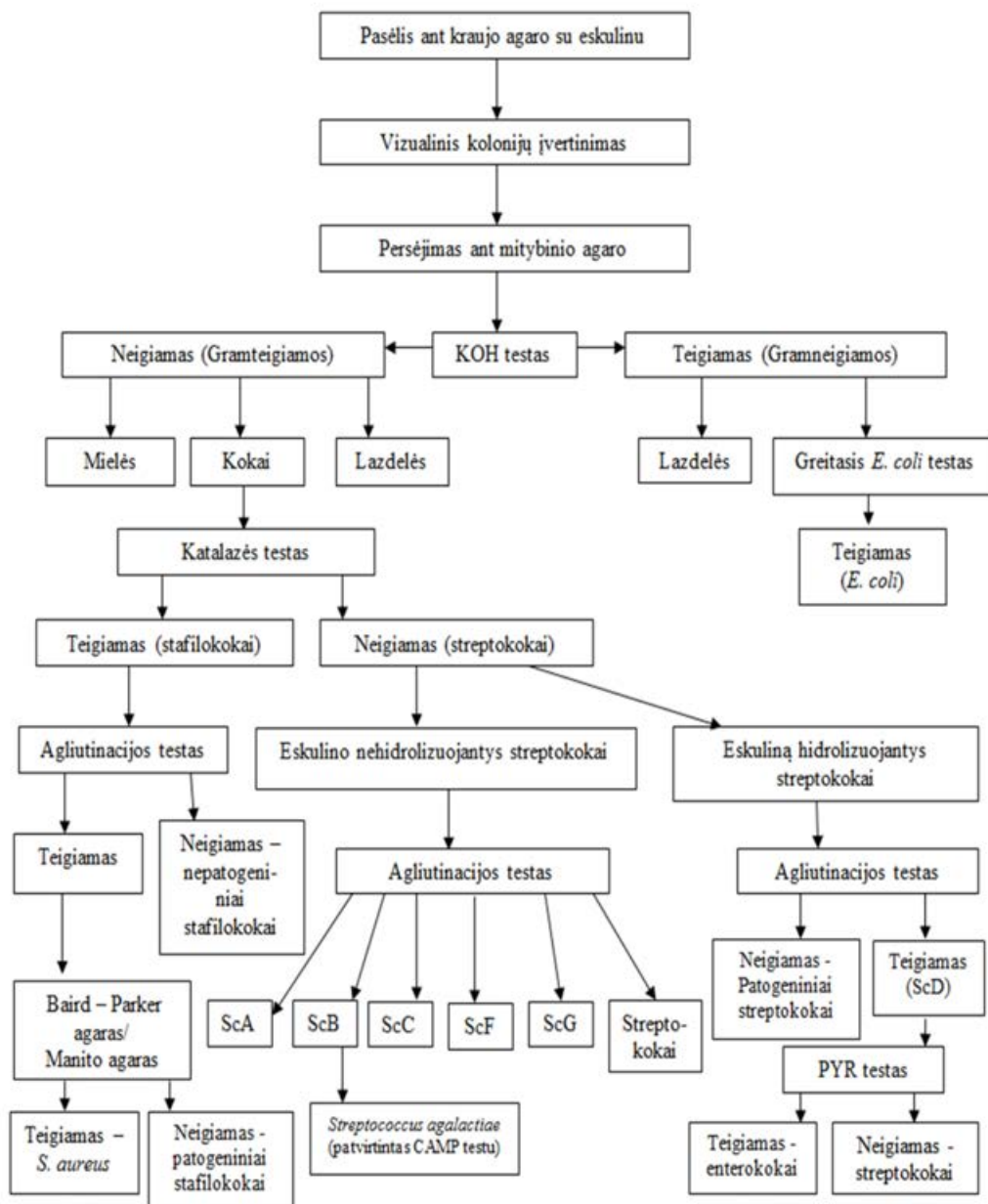
1 priedas

1 lentelė. Mastito poveikis pieno sudėčiai (Korhonen ir Kaartinen, 1995)

Komponentai	Normalus kiekis	Pasikeitimo kryptis*
Pagrindiniai komponentai		
Riebalai, proc.	4,3	–
Proteinai, proc.	3,3	–
Laktozė, proc.	4,8	–
Laisvosios riebiosios rūgštys (mEqv/l)	0,7	++
Proteinų frakcijos (mg/ml)		
Bendras kazeinas	27,9	--
Išrūgų baltymai	8,5	+++
Kazeinai (mg/ml)		
α -kazeinas	13,3	---
β -kazeinas	10,6	---
κ -kazeinas	1,6	++
Išrūgų baltymai (mg/ml)		
β -laktoglobulinas	3,3	---
α -laktalbuminas	1,2	---
Imunoglobulinai	0,6	+++
Serumo albuminas	0,3	+++
Laktoferinas	0,1	+++
Mineralinės medžiagos (µg/ml)		
Natris	470	++
Chloridas	1030	+++
Kalis	1500	–
Kalcis	1210	---
Magnis	120	---
Fosforas	950	---
Geležis	0.53	+
Varis	0.12	+
Cinkas	3.60	–
Fermentai		
Katalazė (µmol O ² /min/ml)	0,08	++++
Laktatdehidrogenazė (mU/ml)	300–500	+++
Laktoperoksidazė (µg/ml)	0,02	+
Lipazė (µg/ml)	1,5	++
Lizocimas (µg/ml)	0,0004	++++
Plazminas (U/ml)	73,5	+++
Ornitinodekarboksilazė (U/ml)	984	--
N-acetyl-β-D-glukosaminidazė (NAGase)	7,3	+++
Vitaminai (µg/ml)		
vit. A	0,37	+/-
B1 (tiaminas)	0,42	–
B2m (riboflavinas)	1,72	--
vit. C	18	---

* + = 10 x padaugėja; ++ = 11–100 x padaugėja; +++ = 101 – 1000 x padaugėja; ++++ = >1000 x padaugėja; – = 10% sumažėja; -- = 11–25% sumažėja; --- = 26–75% sumažėja; ---- = >75% sumažėja.

2 priedas



1 pav. Mastito sukėlėjų išskyrimo iš pieno ir jų identifikavimo schema

GYVENIMO APRAŠYMAS

Kristina Musayeva gimė 1981 m. balandžio 20 d. Kaune.

1999 m. baigė Nemuno vidurinę mokyklą ir tais pačiais metais įstojo į Lietuvos veterinarijos akademiją, Veterinarijos fakultetą, kurį baigė 2007 m. įgydama veterinarijos gydytojo kvalifikaciją.

2009 m. pradėjo veterinarinės virusologijos rezidentūros studijas Lietuvos veterinarijos akademijoje, kurias baigė 2011 m., įgydama veterinarijos gydytojo virusologo kvalifikaciją.

Nuo 2011 m. Lietuvos sveikatos mokslų universitete Veterinarijos akademijoje Virškinimo fiziologijos ir patologijos moksliniame centre dirba jaunesniąja mokslo darbuotoja, o nuo 2016 m. Anatomijos ir fiziologijos katedroje pradėjo dirbti lektore.

2012–2016 m. Lietuvos sveikatos mokslų universitete Veterinarijos akademijoje, Anatomijos ir fiziologijos katedroje parengta disertacija.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju visiems, padėjusiems parengti šį disertacinį darbą.

Dėkoju darbo vadovui profesoriui Antanui Sederevičiui už paskatinimą imtis mokslinio darbo, už idėjas, vertingus patarimus, skirtą laiką rengiant šią disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju LSMU VA Anatomijos ir fiziologijos katedros kolektyvui ir katedros vedėjai profesei Juditai Žymantienei už malonų bendradarbiavimą ir naudingus patarimus.

Nuoširdų ačiū tariau profesorėms Rasai Želvytei ir Ingridai Monkevičienei už konsultacijas rašant disertaciją ir mokslinius straipsnius, nuoširdų ir draugišką bendravimą.

Taip pat dėkoju disertacijos recenzentams profesoriui Vaidui Oberauskui ir docentui Modestui Ružauskui, pateikusiems vertingų patarimų bei naudingų kritinių pastabų.

Esu dėkinga docentei Sigitai Kerzienei už pagalbą ir suteiktas žinias atliekant statistinius tyrimus, vyresniajam mokslo darbuotojui Sauliui Bliznikui už pagalbą atliekant laboratorinius tyrimus.

Dėkoju bendradarbiams už nuoširdžią pagalbą, supratingumą, bei paskatinimą vykdant šį darbą.

Dėkoju savo šeimai už jų meilę, supratimą ir pagalbą. Šalia manęs esančių žmonių paskatinimai bei tikėjimas suteikė jėgų nesustoti, daryti, bei tikėti tuo ką darai.

Disertacijoje atlikti moksliniai tyrimai iš dalies buvo finansuojami LSMU mokslo fondo lėšomis.