

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Gregor BRIŠKI

**UPORABNOST APARATA DCC ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA
SOMATSKIH CELIC NA TERENU**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**DETERMINATION OF SOMATIC CELL COUNT ON THE FIELD
WITH DCC INSTRUMENT**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo – zootehnika. Poskus in analize so bili opravljeni v laboratoriju Katedre za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico visokošolske strokovne diplomske naloge imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico pa dr. Andrejo Miklič.

Recenzent: prof. dr. Bogdan PERKO

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: dr. Andreja MIKLIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Bogdan PERKO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Gregor Briški

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Vs
DK UDK 637.1:636.2(043.2)=163.6
KG govedo/krave/molznice/mleko/kakovost/mastitis/somatske celice/število/aparati/
DCC /FOSS
KK AGRIS L73/5214/9412
AV BRIŠKI, Gregor
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/MIKLIČ, Andreja (somentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2008
IN UPORABNOST APARATA DCC ZA UGOTAVLJANJE ŠTEVILA SOMATSKIH
CELIC NA TERENU
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP X, 34 str., 7 pregl., 7 sl., 2 pril., 21 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Število somatskih celic (SC) je pomemben kriterij pri ugotavljanju kakovosti mleka, saj je povišano število SC znak obolenj, največkrat vnetja mlečne žleze. Število SC je zato tudi kriterij pri plačevanju mleka. Hitro in zanesljivo ugotavljanje števila SC je lahko reju v veliko pomoč pri hitrem odkrivanju mastitisa in preprečevanju njegovega širjenja. DeLaval cell counter (DCC) je aparat za hitro ugotavljanje števila SC na terenu. Zanimalo nas je ali so rezultati analiz, opravljenih z aparatom DCC dovolj točni in primerljivi z rezultati, dobljenimi z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS), ki je zakonsko priznan aparat/metoda za rutinsko ugotavljanje števila SC v mleku. Regresijski koeficient za število SC/ml mleka, ugotovljenih z aparatom DCC in FOSS, je bil visoko statistično značilen ($p < 0,0001$), standardno odstopanje ponovljivosti meritev z aparatom DCC pa manjše od 2 %. Rezultati so potrdili ustreznost aparata DCC za hitro ugotavljanje SC v mleku.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 637.1:636.2(043.2)=163.6
CX cattle/dairy cows/milk/quality/mastitis/somatic cell count/instruments/DCC/FOSS
CC AGRIS L73/5214/9412
AU BRIŠKI, Gregor
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/MIKLIČ, Andreja (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2008
TI DETERMINATION OF SOMATIC CELL COUNT ON THE FIELD WITH DCC INSTRUMENT
DT Graduation thesis (Higher professional studies)
NO X, 34 str., 7 tab., 7 fig., 2 ann., 21 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Somatic cells count (SCC) is an important criterion in milk quality control, because the increased number of somatic cells is a sign of affected health condition, most often the inflammation of milk gland. SCC is therefore also a criterion for milk price. Fast and reliable determination of SCC can be a great help to breeders in timely detection of mastitis and in prevention of spreading the infection. DeLaval cell counter (DCC) is an instrument used for fast determination of SCC on the field. The goal of our research was to find out if the results obtained with DCC are precise enough and comparable with the results obtained by Fossomatic 5000 (FOSS), which is a legally recognized apparatus/method for the routine determination of SCC in milk. Regression coefficient for SCC/ml of milk determined with DCC instrument and with FOSS was highly statistically significant ($P < 0.0001$) and standard deviation of repeatability of results lower than 2 %. Our results confirmed the suitability of DCC for fast determination of SCC in milk.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEKO	3
2.2 KAKOVOST MLEKA IN KRITERIJI PLAČEVANJA	3
2.2.1 Pomen števila somatskih celic v mleku	6
2.3 MASTITIS	7
2.3.1 Dejavniki za nastanek mastitisa	8
2.3.2 Povzročitelji bovinega mastitisa	9
2.3.3 Odkrivanje mastitisa	11
2.3.4 Zdravljenje mastitisa	12
2.3.5 Preprečevanje in sanacija mastitisa	13
2.4 METODE UGOTAVLJANJA ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC	15
2.4.1 Definicije in ocena zanesljivosti indirektnih metod	16
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 MATERIAL	18
3.1.1 Vzorci mleka	18
3.1.2 Oprema	18
3.2 METODE DELA	21

3.2.1	Eksperimentalni del	21
3.2.1.1	Postavitev poskusa	22
3.2.2	Statistična obdelava podatkov	22
4	REZULTATI	23
4.1	OSNOVNA STATISTIKA	23
4.2	ANALIZA REGRESIJE	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	29
5.1	RAZPRAVA	29
5.2	SKLEPI	30
6	POVZETEK	31
7	VIRI	32
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvrstitev mleka glede na vsebnost skupnega števila mikroorganizmov (SŠMO) (Uredba o določitvi ..., 2001)	4
Preglednica 2: Povzročitelji bovinega mastitisa (Weimer, 1998)	10
Preglednica 3: Okoliški patogeni mikroorganizmi, ki povzročajo mastitis (Oliver in Pighetti, 2002)	11
Preglednica 4: Ponovljivost določanja števila somatskih celic (ŠSC) z aparatom DeLaval cell counter (DCC)	23
Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, določenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC) (vsi vzorci mleka)	24
Preglednica 6: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka vzorcev, ki so vsebovali <400.000 SC/ml, analizirano z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC)	24
Preglednica 7: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka vzorcev, ki so vsebovali >400.000 SC/ml mleka	25

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Somatske celice (SC), izgled pod mikroskopom (foto: Pengov, 2004)	6
Slika 2: Mastitis pri govedu (foto: Briški, 2007)	12
Slika 3: Aparat DeLaval cell counter (DCC) (foto: Briški, 2007)	19
Slika 4: Aparat Fossomatic 5000 (FOSS) (foto: Briški, 2007)	21
Slika 5: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vzorce, ki so vsebovali <400.000 somatskih celic (SC)/ml mleka	26
Slika 6: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vzorce, ki so vsebovali >400.000 somatskih celic (SC)/ml mleka	27
Slika 7: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vse vzorce mleka	28

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Izmerjene in logaritmirane vrednosti ŠSC, določenih z aparatom DCC, pri ugotavljanju ponovljivosti aparata
- Priloga B: Izmerjene in logaritmirane vrednosti ŠSC, določenih z aparatoma FOSS in DCC

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DCC	Delaval cell counter
DMSCC	direktna mikroskopska metoda ugotavljanja SC
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
FOSS	Fossomatic 5000
IDF	International Dairy Federation (mednarodno mlekarско združenje)
SC	somatske celice
SŠMO	skupno število mikroorganizmov
SŠSC	skupno število somatskih celic
ŠSC	število somatskih celic

1 UVOD

Kljub vsem naporom, po večini držav, kjer se ukvarjajo z intenzivno proizvodnjo mleka, opažamo, da je pogostost vimenskih okužb še vedno (pre)velika in da mastitis povzroča velike izgube rejcem in mlekarski industriji. Težave, povezane z mastitisom, pa nikakor niso samo finančne. Mastitis je kužna bolezen, ki se v čredi prenaša z živali na žival. Mikroorganizmi, povzročitelji vimenskih vnetij, so lahko nevarni tudi za zdravje ljudi. Mastitis lahko povzročijo fizikalni ali kemijski dejavniki, najpogostejši vzrok za nastanek obolenja pa je bakterijska infekcija (Early, 1998).

Za mastitična obolenja so dovzetnejše krave molznice, ki proizvajajo večjo količino mleka. To v praksi pomeni, da so najboljše molznice najbolj izpostavljene okužbi vimena, saj je proizvodnja mleka pri določeni živali obratno sorazmerna z njeno odpornostjo (Pengov, 2005).

Mastitis je vnetje mlečne žleze in je zelo resen problem sodobnih proizvajalcev mleka, zato je potrebna neprestana kontrola števila somatskih celic (v nadaljevanju ŠSC). Mastitis ugotavljamo na več načinov. Eden izmed načinov je mikrobiološki pregled mleka, hitrejši način pa je kontrola števila somatskih celic v mleku. V primeru, da število somatskih celic v mleku presega normalno in s predpisi dovoljeno vrednost, se takega mleka ne sme uporabljati, oziroma predelovati (Pengov, 2005).

Somatske celice (v nadaljevanju SC) so odmrle celice vimena in obrambne celice organizma (bele krvničke ali levkociti, makrofagi), ki so v mleku v določenem številu vedno prisotne. Po pravilniku o veterinarsko-sanitarnem nadzoru živilskih obratov, veterinarsko-sanitarnih pregledih ter o pogojih zdravstvene ustreznosti živil in surovin živalskega izvora, število somatskih celic v 1 ml surovega mleka ne sme presegati 400.000 SC/ml (Pravilnik o veterinarsko ..., 1999).

Pri vsaki okužbi, iz krvi v vime prihajajo bela krvna telesca in druge zaščitne celice, ki skušajo uničiti bakterije. Povečano ŠSC smatramo kot dokaz motnje v sekreciji mleka, oziroma prisotnost mastitisa (Pengov, 2005).

Za ugotavljanje ŠSC obstaja več načinov. Eden izmed načinov je barvanje SC in štetje pod mikroskopom, v praksi pa največ uporabljajo aparate, ki ŠSC določijo na osnovi fluorescenčne mikroskopije. Najbolj razširjen in zakonsko priznan aparat za ugotavljanje ŠSC je v številnih državah aparat Fossomatic 5000 (v nadaljevanju FOSS). Vse bolj priljubljen pa postaja tudi manjši, priročni aparat DeLaval cell counter (v nadaljevanju DCC), ki je namenjen hitremu ugotavljanju števila SC na terenu.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Namen naloge je bil ugotoviti primernost aparata DCC za ugotavljanje ŠSC v vzorcih mleka že na terenu.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Postavili smo si naslednjo hipotezo: rezultati števila somatskih celic, ugotovljenih z aparatom DCC, so v primerjavi z rezultati, dobljenimi z aparatom FOSS, ki ga uporabljajo v veterinarskih in mlekarških laboratorijih, dovolj točni za hitro kontrolo ŠSC na terenu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLEKO

Mleko je najbolj popolna naravna hrana. Definiramo ga kot biološko tekočino, ki je proizvod mlečne žleze in je prva hrana novorojenega sesalca. Novorojencu omogoča, s svojo pestro sestavo hranil, vitaminov, mineralov, encimov, zaščitnih snovi in rastnih faktorjev, uspešen razvoj v prvem, najbolj občutljivem življenjskem obdobju (Rogelj, 2003).

Mleko pa je zaradi bogate sestave tudi izvrsten rastni medij za različne mikroorganizme, od prehransko nezahtevnih do prehransko zahtevnih. Narava pridobivanja mleka je takšna, da okužbe mleka z mikroorganizmi praktično ne moremo preprečiti, zato je dobro poznavanje mikroflore, ki lahko prispe v mleko, izjemnega pomena. Poznavanje fizioloških in genetskih lastnosti mikroorganizmov in njihovih biokemijskih aktivnosti, s katerimi spreminjajo fizikalne, kemijske in senzorične lastnosti mleka, omogoča strokovnjakom, da ugotovijo izvor okužbe mleka in mlečnih izdelkov in kontrolirajo pogoje njihovega razmnoževanja. Tako lahko uspešneje preprečujejo prekomerno okužbo mleka in mlečnih izdelkov z mikroorganizmi, omejijo oziroma kontrolirajo njihovo rast in aktivnost, zmanjšajo število že prisotnih mikroorganizmov ali pa vodijo in usmerjajo njihovo delovanje (Rogelj, 2003).

2.2 KAKOVOST MLEKA IN KRITERIJI PLAČEVANJA

V Sloveniji sta se v letu 2001 kakovost mleka in kriterij plačevanja začela določati z uredbo o določitvi minimalne odkupne cene kravjega mleka za namen izvajanja ukrepov v okviru ureditve trga z mlekom in mlečnimi izdelki (Uredba o določitvi ..., 2001).

Po tej uredbi se je minimalna odkupna cena kravjega mleka oblikovala glede na vsebnost maščobe, beljakovin, skupnega števila mikroorganizmov (v nadaljevanju SŠMO) in števila SC (Uredba o določitvi ..., 2001).

Izhodiščna minimalna odkupna cena mleka brez davka na dodano vrednost je bila določena z deležem mlečne maščobe (3,7%) in deležem beljakovin (3,15%). Glede na kakovostni razred mleka (preglednica 1) se je izhodiščna minimalna odkupna cena mleka povečala oziroma zmanjša:

- E kakovostni razred + 5%
- 1. kakovostni razred 0%
- 2. kakovostni razred -5%
- 3. kakovostni razred -15%,

rezultat pa se je prištel oziroma odštel od izhodiščne minimalne cene (Uredba o določitvi ..., 2001).

Preglednica 1: Razvrstitev mleka glede na vsebnost skupnega števila mikroorganizmov (SŠMO) (Uredba o določitvi ..., 2001)

Kakovostni razred	SŠMO/ml
E (ekstra) kakovostni razred	do 50.000
1. kakovostni razred	50.000 do 100.000
2. kakovostni razred	100.000 do 400.000
3. kakovostni razred	400.001 do 800.000

Za mleko E in 1. kakovostnega razreda, ki je vsebovalo do 400.000 SC/ml mleka, se je izhodiščna minimalna odkupna cena mleka povečala za 5 %. Če je mleko vsebovalo več kot 600.000 SC/ml mleka, ni moglo biti razvrščeno višje kot v tretji kakovostni razred. Povprečna vrednost mlečne maščobe in beljakovin ter povprečje skupnega števila mikroorganizmov na ml (v nadaljevanju SŠMO), se je ugotavljalo v tekočem mesecu na podlagi najmanj dveh vzorcev mesečno (Uredba o določitvi ..., 2001).

To uredbo so dodatno izpopolnili s Pravilnikom o elementih za oblikovanje odkupne cene kravjega mleka (Pravilnik o elementih ..., 2001), ki je določal, da se cena mleka oblikuje na podlagi naslednjih elementov:

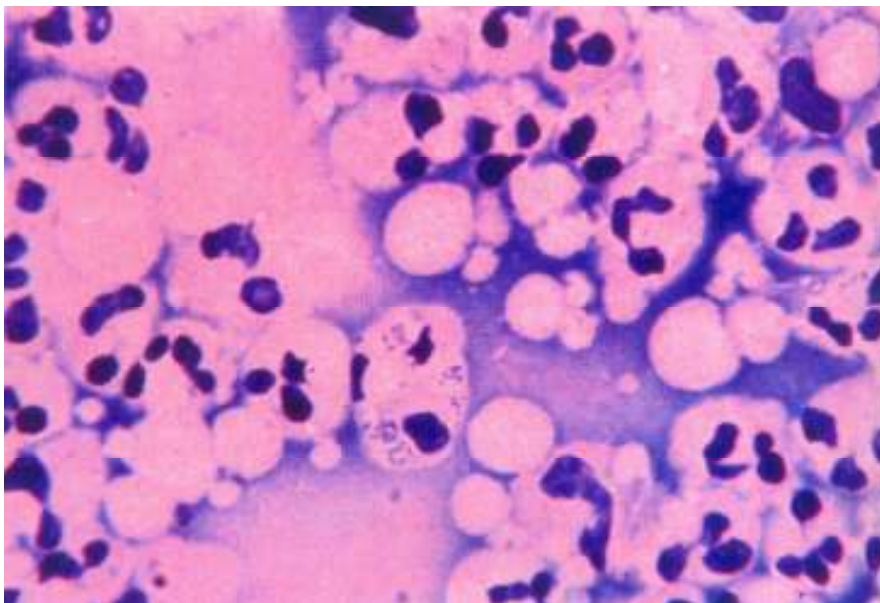
- sestava mleka, ki jo določata vsebnost mlečne maščobe in vsebnost beljakovin, se ugotavlja v zadnjem mesecu,
- higienska kakovost mleka, ki jo določata povprečje SŠMO in SC/ml mleka, se ugotavlja na podlagi opravljenih analiz v zadnjih treh mesecih,

- ugotavljanje zmrziščne točke mleka, ugotavljanje temperature mleka v zbiralnici ob prevzemu mleka.

Poleg gornjih elementov je bilo zapisano, da se proizvajalec in odkupovalec mleka dogovarjata o višini osnovne odkupne cene za mleko, ki vsebuje 3,7 % mlečne maščobe, 3,15 % beljakovin do 100.000 SŠMO/ml in 400.000 SC/ml mleka (Pravilnik o elementih ..., 2001).

V letu 2002 je bil z Uredbo o prenehanju veljavnosti uredbe o določitvi minimalne odkupne cene kravjega mleka za namen izvajanja ukrepov v okviru ureditve trga z mlekom in mlečnimi izdelki (Uredba o prenehanju ..., 2002) preklican prvi dokument, v letu 2005 pa s Pravilnikom o razveljavitvi Pravilnika o kakovosti konzumnega kravjega mleka (Pravilnik o razveljavitvi ..., 2005) še drugi dokument. Kljub prenehanju veljavnosti dokumentov, so v teh dokumentih navedeni elementi še vedno osnova vrednotenja mleka, cene mleka pa so določene s pogodbami med mlekarjami in proizvajalci mleka. Večina ostalih zahtev za mleko in mlečne izdelke, od proizvodnje, kakovosti in trgovanja, je povzetih in usklajenih z evropskimi predpisi.

Pri vrednotenju kakovosti mleka je število somatskih celic v mleku pomemben kriterij, ki celo pridobiva na pomenu, saj ostaja mastitis pereč problem v proizvodnji mleka.



Slika 1: Somatske celice (SC), izgled pod mikroskopom (foto: Pengov, 2004)

2.2.1 Pomen števila somatskih celic v mleku

Število somatskih celic v mleku je eden od kriterijev plačevanja odkupljenega mleka in mora biti pod 400.000 SC/ml mleka (Klopčič, 1997). SC so tudi merilo za kakovost mleka (Hočevnar, 1994).

SC predstavljajo limfociti, nevtrofilci in epitelne celice (slika 1). Njihovo število znatno variira v odvisnosti od stadija laktacije, starosti molznice, postopkov pri molži (higiena, molža, prehrana, stres), pasme, sezone, geografskega področja in individualnosti molznice (Božanić in sod., 2002).

2.3 MASTITIS

Pojav mastitisa je bil poznan že v medicini starega veka. Za mastitis je značilnih pet osnovnih znakov, ki jih opazimo na vimenu, to so: rdečina, toplota, otekline, bolečina in izguba funkcije vimena (Rogelj, 2003).

Nastanek mastitisa lahko povzročijo poškodbe mlečne žleze, ki so fizikalne ali kemične narave, vendar pa je najpogosteje vzrok obolenja bakterijska infekcija. Kljub temu, da je mlečna žleza neprestano izpostavljena patogenim mikroorganizmom, je za nastanek mastitisa potrebno, da je število patogenih mikroorganizmov dovolj visoko, da so le-ti dovolj virulentni, poleg tega pa je okužba odvisna tudi od občutljivosti živali same. Ponavadi se okužba začne z vdorom patogenih bakterij v seskov kanal med molžo, proces pa se hitro nadaljuje ob morebitnih poškodbah in/ali zmanjšani odpornosti živali (Weimer, 1998; Chambers, 2002).

Po obliki delimo mastitis na klinični in subklinični. Klinični mastitis spremljajo vidni znaki bolezni, ki so vidni tako na živali (povišana temperatura, oteklo, boleče in rdeče vime), kot tudi na mleku (poškodba beljakovin, prisotnost krvi ali gnojnih izcedkov, spremenjena kemična sestava). Glede na intenzivnost bolezenskih znakov in trajanje bolezni, klinični mastitis nadalje delimo na akutni in kronični. Za razliko od kliničnega mastitisa, lahko subklinični mastitis ugotovimo samo z laboratorijskimi preiskavami, največkrat na osnovi povišanega ŠSC ($>5 \times 10^5$ SC/ml) ali ugotavljanja povzročiteljev okužbe (Weimer, 1998; Chambers, 2002).

Mleko zdravih živali vsebuje <200.000 somatskih celic v ml, pogosto tudi manj kot 100.000 SC/ml. Kot odgovor na vnetne reakcije, ki potekajo v mlečni žlezi zaradi bakterijskih okužb, opazimo največkrat močno povišano število levkocitov in drugih obrambnih celic v krvi, posledično tudi v mleku. Prav levkociti v največji meri prispevajo k povišanemu ŠSC. Vendar je potrebna previdnost, saj nekateri patogeni mikroorganizmi povzročajo okužbe, pri katerih izrazitega porasta ŠSC ne opazimo. Poleg SC pa se

ponavadi močno poviša tudi število mikroorganizmov. Mleko okužene živali lahko že v mlečni žlezi vsebuje nekaj milijonov mikroorganizmov v mililitru (Early, 1998).

2.3.1 Dejavniki za nastanek mastitisa

Mastitisa pri kravah ni mogoče popolnoma izkoreniniti. Nekatere vrste bakterij, ki povzročajo vnetje mlečne žleze, namreč lahko dlje časa preživijo in se celo razmnožujejo v hlevskem okolju, kar pomeni, da so živali nenehno izpostavljene različnim mikroorganizmom. Kljub temu pa sam stik povzročiteljev z mlečno žlezo v večini primerov še ne zadošča za okužbo. To pomeni, da pri nastanku mastitisa poleg mikrobnih povzročiteljev sodeluje še vrsta med seboj zelo različnih dejavnikov. To so: žival, povzročitelji (mikroorganizmi) ter okolje (Pengov, 2005).

Razvoj okužbe in oblika mastitisa (akutna, kronična, prikrita) sta odvisna od sposobnosti posamezne živali, da s svojimi pridobljenimi in prirojenimi obrambnimi mehanizmi prevlada škodljive vplive, ki so lahko posledica neposrednega delovanja povzročiteljev ali neugodnih razmer v okolju. Med pomembnejše dejavnike okolja, ki vplivajo na nastanek mastitisa, uvrščamo potek molže, pravilno delovanje molznega stroja, način reje, nastilj, podnebne razmere in splošno nego ter oskrbo živali. Opazne so precejšnje razlike v odpornosti posameznih živali proti mastitisu (in drugim boleznim). Tudi pri isti živali ta odpornost ni stalna, temveč se s časom spreminja (Pengov, 2005).

Glavni vzroki za razlike v odpornosti so (Pengov, 2005):

- Mlečnost: najboljše molznice so najbolj občutljive za okužbe vimena.
- Bolezni: poporodne bolezni, vnetje maternice, prebavne motnje in bolezni parkljev so le nekatere od bolezni, ki zmanjšajo odpornost organizma.
- Starost: z naraščajočo starostjo se povečuje možnost okužbe. V primeru mastitisa je vzrok predvsem v slabšem delovanju mišice, ki zapira vhod v seskov kanal, in splošno zmanjšani učinkovitosti obrambnih mehanizmov v telesu.
- Oblika vimena: velika, globoka, viseča in ohlapna vimena so dovzetnejša za poškodbe in posledične okužbe, ki se razvijejo v mastitis.

- Kožne bolezni na vimenu: razjede, ekcemi in bradavice so predvsem pri molži zelo boleče, kar vpliva na slabo izmolzevanje prizadetih krav in povečuje možnost mastitisa.
- Laktacijsko obdobje: mlečna žleza je najbolj občutljiva v prvih tednih po porodu in v zadnjih tednih pred presušitvijo. Pogoste so tudi okužbe v prvi polovici presušitve.
- Prehrana: posledica neprimerne prehrane molznic je slabljenje splošne odpornosti živali, s čimer se občutno poveča možnost okužbe.
- Poškodbe: poškodbe na vimenu in (še bolj) na seskih pomenijo izredno veliko nevarnost za nastanek mastitisa.

Neposredni vzrok za nastanek mastitisa je torej okužba vimena s povzročitelji, ki sprožijo vnetni proces. Mikrobní povzročitelji (bakterije) vdrejo v mlečno žlezo praviloma skozi ustje seskovega kanala. Mikroorganizmi nato prek mlečne cisterne in mlečnih kanalov prodrejo globoko v žlezno tkivo vimena, kjer se namnožijo, posledica pa je vnetje mlečne žleze. Manj pogoste so okužbe zaradi poškodb na vimenu in še okužbe, ki bi prišle v vime po krvi. Pri okužbah po krvi (hematogena infekcija) prispejo mikrobní povzročitelji v vime iz katerega drugega vnetnega žarišča v telesu. V tem primeru so pogosto prizadete vse štiri vimenske četrti istočasno (Pengov, 2005)

2.3.2 Povzročitelji bovinega mastitisa

Med povzročitelji mastitisa se pojavlja široka paleta mikroorganizmov (preglednica 2). Večina med njimi je patogenih tudi za človeka. Kljub spremembam v tehnologiji reje živali in pridobivanju mleka, ki so vplivale tudi na pojav novih oportunistov in patogenih bakterij, vpletenih v mastična obolenja, ostajata najpogostejša povzročitelja *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus agalactiae*. Med molžo se hitro prenašata med vimenskimi četrtmi pa tudi med kravami. Pomembni prenašalci so lahko molzniki. Vse pomembnejši povzročitelji mastitisa postajajo, predvsem v velikih čredah, mikroorganizmi vrste *Mycoplasma*, ki pripadajo družini *Mollicutes*. Za te bakterije sta značilni zelo enostavna sestava genoma in odsotnost celične stene. Okužena mlečna žleza je glavni vir teh patogencev, ki živijo na ali v mlečni žlezi. Vsi naštetí mikroorganizmi spadajo zaradi

načina prenosa okužbe v skupino kužnih patogencev. Sem spada tudi *Corynebacterium bovis*, ki redko povzroči hujša vnetja, saj so okužbe blage in povzročijo le rahel dvig ŠSC, od 200.000 do 400.000 SC/ml (Rogelj, 2003).

Preglednica 2: Povzročitelji bovinega mastitisa (Weimer, 1998)

pogosti povzročitelji mastitisa	manj pogosti povzročitelji mastitisa
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Streptokoki	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
koliformne bakterije	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Escherichia coli</i>	koagulaza negativni stafilokoki
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Enterobacter</i> spp	<i>Brucella abortus</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Coxiella burnetti</i>
	<i>Leptospira</i> spp.
	<i>Mycobacterium bovis</i>
	<i>Serratia marcescens</i>

Prenos okužbe pri ostalih povzročiteljih mastitisa je manj odvisen od same molže. Njihov pomemben izvor so fekalije in nastilj, torej okolje, v katerem živali živijo, zato jih imenujemo tudi okoliški patogeni mikroorganizmi (preglednica 3). To je zelo raznolika skupina bakterij, s katerimi se živali okužijo predvsem med dvema molžama. Tako imenovani okoliški mastitis ima kar nekaj posebnosti:

- med laktacijo je pojavnost intramamarne okužbe nizka,
- število SC v skupnem mleku črede je nizko,
- okužbe so kratkotrajne,
- mnogo intramamarnih okužb lahko povzroči klinični mastitis in
- pojavnost okužb je visoka med dvema laktacijama (Rogelj, 2003).

Preglednica 3: Okoliški patogeni mikroorganizmi, ki povzročajo mastitis (Oliver in Pighetti, 2002)

vrste <i>Streptococcus</i> <i>S. acidominimus</i> <i>S. alactolyticus</i> <i>S. canis</i> <i>S. dysgalactiae</i> <i>S. equi</i> <i>S. equines</i> <i>S. parauberis</i> <i>S. uberis</i>	gram-negativne bakterije <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Pasteurella</i> spp.
vrste <i>Enterococcus</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. saccharolyticus</i>	

2.3.3 Odkrivanje mastitisa

Ugotavljanje ŠSC v mleku posameznih krav je zelo razširjena metoda za ugotavljanje subkliničnih oblik mastitisa. Vsekakor pa se moramo pri diagnostiki, na podlagi tako pridobljenih rezultatov, zavedati tudi pomanjkljivosti te metode. Povečano ŠSC v mleku je sicer večinoma dejansko povezano z vnetnim procesom vimena, ki pa je lahko posledica okužbe s celo vrsto različnih mikroorganizmov. Ta metoda seveda ni primerna za ugotavljanje povzročitelja okužbe, kar pa je za nadaljnje zdravljenje velikega pomena. Zato za usmerjeno (in uspešno) terapijo mastitisa poleg podatkov o ŠSC v mleku potrebujemo še rezultate bakteriološke preiskave in antibiograma (Pengov, 2005). Primer mastitisa je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Mastitis pri govedu (foto: Briški, 2007)

2.3.4 Zdravljenje mastitisa

Osnovna načela zdravljenja bakterijskih okužb so (Pengov, 2005):

- izbira učinkovitega antimikrobnega sredstva,
- vzdrževanje terapevtske koncentracije zdravila na mestu okužbe,
- ustrezno trajanje terapije,
- dopolnilno zdravljenje.

Pri zdravljenju mastitisa moramo upoštevati še naslednje dejavnike (Pengov, 2005):

- natančni podatki o živali in nastanku vnetja (starost, brejost, mlečnost, predhodne okužbe, čas nastanka vnetja),
- začetek zdravljenja (več časa poteče od pojava znakov vnetja do pričetka zdravljenja, manjša je možnost za popolno ozdravitev),

- kontrola zdravljenja (približno deset dni po zadnji aplikaciji antibiotika, na podlagi izvida bakteriološke preiskave in/ali ŠSC, preverimo uspeh zdravljenja),
- glede na rezultate raziskav v različnih državah je pri zdravljenju mastitisa, ne glede na etologijo (vrsto povzročitelja), parenteralna aplikacija (v mišico ali žilo) antibiotikov, sama ali v kombinaciji z intramamarno aplikacijo (v sesek), bolj učinkovita kot sama intramamarna aplikacija.

2.3.5 Preprečevanje in sanacija mastitisa

Ko se soočimo s problemom povečanega ŠSC v mleku na določeni kmetiji, tako rejci kot tudi veterinarji, praviloma najprej pomislijo na zdravljenje ali izločitev okuženih krav. Vendar pa vsi, ki se ukvarjajo s sanacijo problematičnih čred vedo, da so uspehi (izraženi v zmanjšanju ŠSC), če se omejimo samo na zdravljenje, običajno slabi. Pri strokovno izpeljani sanaciji naj bi bilo zato zdravljenje ali celo izločitev krav s subkliničnim mastitisom (in povečanim ŠSC) zadnji in ne prvi korak. Preden se, po posvetu z veterinarjem, odločimo za zdravljenje, se moramo zavedati, da je tak ukrep smiseln in finančno opravičljiv le, če se predhodno ugotovijo in po možnosti tudi odpravijo vzroki, ki pogojujejo nastanek novih okužb (Pengov, 2005).

Ukrepe za nadzor nad okužbami mlečne žleze v čredi delimo na naslednje (Pengov, 2005):

- a) Preprečevanje novih okužb
 - Vzdrževanje molzne opreme: redno vzdrževanje (servisiranje) molzne opreme, takojšen pregled molznega stroja, če ugotovimo spremembe na seskih ali povečano število mastitisa oziroma povečano ŠSC v skupnem, hlevskem vzorcu mleka.
 - Pravilna molža:
 - nenehno je potrebno skrbeti za čistočo; pomanjkljiva higiena v hlevu, še posebno ob molži, je vzrok za nove okužbe,

- pred namestitvijo tulcev morajo biti seski čisti in popolnoma suhi, za čiščenje in brisanje seskov ne uporabljamo iste krpe za vse krave,
 - izogibamo se »slepi molži« (delovanju molznega stroja, ko ni več pretoka mleka).
 - Razkuževanje seskov po molži:
 - razkužilo mora biti vedno sveže in v predpisani koncentraciji,
 - seske je potrebno razkuževati po vsaki molži.
- b) Odpravljanje obstoječih okužb
- Zdravljenje kliničnih in subkliničnih primerov mastitisa:
 - uporaba učinkovitega antibiotika (antibiogram),
 - primerno trajanje zdravljenja (praviloma vsaj tri dni),
 - obvezno moramo upoštevati karenco zdravila (čas po končanem zdravljenju, ko mleko ni primerno za oddajo).
 - Zdravljenje ob presušitvi: zdravljenja ob presušitvi nikakor ne smemo enačiti z uporabo antibiotikov, ki so namenjeni zaščiti mlečne žleze med presušitvijo; vsebnost antibiotikov v teh pripravkih je namreč odmerjena tako, da prepreči okužbo vimena v dobi presušitve, ni pa zadostna za odpravo že obstoječih okužb; zato se moramo pred presušitvijo ravnati po enakih načelih, kot pri zdravljenju v laktaciji.
 - Zaščita mlečne žleze v obdobju presušitve: če ni na voljo ustreznih podatkov je priporočljivo, da ob presušitvi vsem kravam dajemo antibiotike, namenjene zaščiti mlečne žleze med presušitvijo.
 - Izločanje kronično obolelih krav:

- izločimo živali, pri katerih se v eni laktaciji trikrat ali večkrat ponovi klinična oblika mastitisa,
- izločimo živali, pri katerih zdravljenje pred presušitvijo ni uspešno (Pengov, 2005).

2.4 METODE UGOTAVLJANJA ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC

Poznamo več načinov ugotavljanja ŠSC.

- Direktna mikroskopska metoda ugotavljanja SC (v nadaljevanju DMSCC), (referenčna metoda)

Ena izmed metod je mikroskopska metoda (barvanje SC in štetje pod mikroskopom).

Postopek za izvedbo mikroskopske metode: 0,01 ml mleka razporedimo po objektnem steklu (1 cm^2), sledi sušenje in barvanje razmaza, ko smo to storili, preštujemo obarvane SC s pomočjo mikroskopa. ŠSC, prešteti na določeni površini, pomnožimo z delovnim faktorjem, da dobimo ŠSC/ml (IDF 148A:1995).

- Coulter counter metoda

V mleko dodamo raztopino formaldehida, za fiksiranje SC. Sledi razredčevanje z mešanico emulzifikacijskega elektrolita in toplotna obdelava. Na ta način se s površine celic odstrani maščobne kroglice. Tako obdelan vzorec mleka gre v elektronski števec delcev. Mleko potuje skozi režo med elektrodama. Ko delec preide skozi režo, nadomesti volumen delca, z visoko prevodnostjo (tekočina v delcu ima visoko prevodnost), tekočina z manjšo prevodnostjo. Povečana odpornost zviša voltažo, kar povzroči pulzacijo (utripanje), ki je sorazmerna volumnu delca. Število pulzov pokaže število delcev, ki so prešli čez režo. Štejejo se samo pulzi, ki so nad določeno postavljeno mejo (IDF 148A:1995).

Bolj razširjena je metoda fluorescenčne citometrije, na tem principu delujejo različni aparati, najbolj razširjen je FOSS. Za rutinsko delo se uporabljajo aparati, ki delujejo na osnovi fluorescenčne citometrije, kot naprimer FOSS, DCC.

- Fluoro-opto elektronska metoda

Vzorci mleka, ki jih bomo pregledali, morajo biti dobro premešani in obarvani s fluorescentnim barvilom. Mešanico posebna naprava aparata prenese na vrteči disk, ki služi kot objektik za mikroskop. Vsaka obarvana celica, odkrita z mikroskopom, producira električni pulz, ki je ojačan in posnet. Direktno odčitavanje ŠSC v 1000/ml (IDF 148A:1995).

Ugotavljanje ŠSC je najbolj razširjena metoda za spremljanje zdravja vimena. Hkrati pa nam predstavlja ta postopek ugotavljanje higienskega standarda v zbranem mleku (DeLaval, 2008).

2.4.1 Definicije in ocena zanesljivosti indirektnih metod

- Referenčna metoda je metoda, ki je mednarodno spoznan bodisi s strani strokovnjakov, ali pa z dogovor med ustanovami, kot metoda, ki daje ali domnevno (verjetno) daje »pravo ali pripisano vrednost« količine snovi, ki jo merimo (IDF 128:1985).
- Indirektna metoda je metoda, ki komponent, ki morajo biti izmerjene, ne meri direktno, ampak meri eno ali več količin, ki so funkcionalno povezane s komponento, ki jo želimo izmeriti. Signal je ponavadi povezan z znanimi količinami vrednosti, ali pravo vrednostjo komponente, ki jo opazujemo s standardnimi materiali ali instrumenti, ali bolj pogosto z referenčno metodo (IDF 128:1985).
- Natančnost ali preciznost metode nam pove, koliko rezultati znotraj skupine meritev med seboj nihajo. Običajno jo podamo kot standardni odmik (s). Iz vrednosti standardnega odmika meritev pri posamezni metodi lahko ovrednotimo njeno natančnost: čim manjši je standardni odmik, bolj natančna je metoda. Natančnost

merimo z večkratnim injiciranjem ponovno pripravljenih raztopin (Prošek in Golc Wondra, 1997).

- Ponovljivost (repeatabilty) je natančnost, dobljena iz rezultatov pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti analitik, isti set vzorcev, isti laboratorij). Ponovljivost ugotavljamo znotraj dneva in med dnevi (Prošek in Golc Wondra, 1997).
- Točnost (accuracy) analitske metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost dobimo na dva načina. Eden je primerjanje rezultatov z referenčno metodo, za katero vemo, da nima systemske napake. Manjša kot je razlika med povprečjem meritev in pravo (referenčno) vrednostjo, bolj je metoda točna. Drugi način je dodajanje znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino in merjenje pripadajočih signalov. Točnost izrazimo z razmerjem med izmerjenimi in znanimi koncentracijami v odstotkih (%) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci mleka

V poskusu smo uporabili 130 vzorcev mleka, iz različnih živinorejskih obratov.

3.1.2 Oprema

- DELAVAL CELL COUNTER (DCC)

Splošen opis aparata:

DCC (slika 3) je baterijski prenosni aparat za hitro ugotavljanje števila SC na terenu, proizvaja ga švedsko podjetje DeLaval International AB (Gonzalo in sod., 2006). Aparat šteje jedra somatskih celic, ki se obarvajo z DNA specifičnim fluorescenčnim barvilom – propidiumjodidom (DeLaval, 2008).

Tehnični podatki aparata:

- Merilno območje: 10.000 do 4.000.000 SC/ml;
prikazano kot 10-4000 SC/ μ l
- Ponovljivost: 12 % pri 100.000 SC/ml
8 % pri 400.000 SC/ml
7 % pri 1.000.000 SC/ml



Slika 3: Aparat DeLaval cell counter (DCC) (foto: Briški, 2007)

- FOSSOMATIC 5000 (FOSS)

Splošen opis aparata:

FOSS je aparat za natančno ugotavljanje števila SC (slika 4), ki ga uporabljajo veterinarski in mlekarški laboratoriji. Aparat proizvaja dansko podjetje Foss Electric.

Aparat deluje na principu pretočne citometrije, ki temelji na pretoku vzorca skozi zelo majhno kapilaro, kjer se nahaja števec.

Obdelan vzorec, pomešan z nosilno tekočino, pod visokim tlakom potuje skozi kapilaro, ki dovoljuje prehod SC le zaporedoma. Celice so obarvane z barvilom, ki deluje le na SC. V kivetu je vzorec osvetljen z modro svetlobo, SC pa po osvetlitvi emitirajo rdečo svetlobo, ki

jo prestreže detektor, fotopomnoževalka pa posamezne signale emitirane svetlobe posameznih celic prešteje.

Tehnični podatki aparata:

- Merilno območje do 10.000.000 celic

- Ponovljivost:

Standardni setup: <4 % pri 500.000 SC/ml
<5 % pri 300.000 SC/ml
<7 % pri 100.000 SC/ml

Precizni setup: <2 % pri 500.000 SC/ml
<2,5 % pri 300.000 SC/ml
<3,5 % pri 100.000 SC/ml



Slika 4: Aparat Fossomatic 5000 (FOSS) (foto: Briški, 2007)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Eksperimentalni del

Za ugotavljanje točnosti določanja ŠSC v mleku, z aparatom DCC, smo uporabili 130 vzorcev surovega mleka. Vzorce mleka smo razdelili na dva podvzorca tako, da smo dobili dve skupini po 130 vzorcev mleka. V enem podvzorcu smo ugotavljali SŠSC z aparatom DCC v drugem pa z aparatom FOSS, ki je certificiran aparat za ugotavljanje SŠSC v mleku.

3.2.1.1 Postavitev poskusa

Poskus je potekal v Laboratoriju za mlekarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Laboratorij je akreditiran za določanje števila somatskih celic z aparatom FOSS, aparat pa kontroliran (točnost, natančnost, ponovljivost) s predpisanimi postopki.

V prvem delu poskusa smo najprej preverili ponovljivost določanja ŠSC z aparatom DCC in sicer tako, da smo isti vzorec mleka analizirali 20-krat zaporedoma. Sledilo je testiranje točnosti aparata DCC, v primerjavi z aparatom FOSS.

3.2.2 Statistična obdelava podatkov

Rezultate števila somatskih celic, ki smo jih ugotavljali z aparatom FOSS in DCC smo statistično obdelali s statističnim paketom SAS/STAT (SAS/STAT, 2000). Izračunali smo srednje vrednosti, standardne odklone in izvedli analizo regresije.

Porazdelitev podatkov skupnega števila somatskih celic ni bila simetrična (normalna), zato smo uporabili logaritemsko transformacijo. Po njej so bili podatki primerno porazdeljeni za analizo regresije z linearnimi modeli.

Analizo regresije smo izvedli tako, da smo meritve aparata DCC ($y_i = \log \text{DCC}$) obravnavali kot odvisno spremenljivko, meritve aparata FOSS ($x_i = \log \text{FOSS}$) pa kot neodvisno spremenljivko. Konstanta (a) predstavlja točko na y osi, kjer regresijska premica seka y os. Regresijski koeficient (b) predstavlja naklon premice, v model pa je vključen tudi slučajni ostanek (e_i).

Statistični model

$$y_i = bx_i + a + e_i$$

4 REZULTATI

V tem poglavju predstavljamo rezultate statistične analize v raziskavi pridobljenih analitskih podatkov.

4.1 OSNOVNA STATISTIKA

V analizo smo zajeli vzorce mleka krav, iz različnih živinorejskih obratov. Na ta način smo dobili vzorce, z ustreznim razponom vrednosti ŠSC, od manj kot 100.000/ml do več kot 1.000.000 SC/ml mleka. Najprej smo preverjali ponovljivost določanja ŠSC z aparatom DCC in nato njegovo točnost v primerjavi s certificiranim aparatom FOSS.

V preglednici 4 so zbrani osnovni statistični parametri ponovljivosti določanja ŠSC z aparatom DCC. Osnovni podatki so zbrani v prilogi A.

Preglednica 4: Ponovljivost določanja števila somatskih celic (ŠSC) z aparatom DeLaval cell counter (DCC)

Meritev	n	Povprečje	SD	Minimum	Maksimum
ŠSC/ml	20	107400	7618	92000	119000
log ŠSC/ml	20	5,0299	0,0312	4,9638	5,0755

SD – standardni odklon, n – število meritev, log – desetiški logaritem

Proizvajalec aparata DCC (DeLaval, 2008) v tehničnih podatkih za aparat navaja, da je standardno odstopanje ponovljivosti 7 %. Standardno odstopanje je bilo v našem primeru le 0,62 %, torej je bila ponovljivost metode zelo dobra.

V preglednici 5 predstavljamo osnovne statistične parametre za število SC, ugotovljenih v vseh vzorcih mleka, z aparatom DCC in aparatom FOSS.

Preglednica 5: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, določenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC) (vsi vzorci mleka)

Meritev	n	Povprečje	SD	Minimum	Maksimum
FOSS	129	280907	239770	17000	1391000
DCC	129	267132	212775	17000	1240000
log(FOSS)	129	5,315	0,352	4,230	6,143
log(DCC)	129	5,298	0,352	4,230	6,093

FOSS – Fossomatic 5000, DCC – DeLaval cell counter, log – desetiški logaritem, SD – standardni odklon, n – število meritev

Povprečno ŠSC v ml mleka, ugotovljeno z aparatom FOSS, je bilo nekoliko višje kot ŠSC, ugotovljeno z aparatom DCC. Standardni odklon logaritmiranih vrednosti ŠSC pa je bil pri obeh aparatih enak.

V preglednici 6 predstavljamo osnovne statistične parametre števila SC za vzorce, ki so vsebovali <400.000 SC/ml mleka.

Preglednica 6: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka vzorcev, ki so vsebovali <400.000 SC/ml, analizirano z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC)

Meritev	n	Povprečje	SD	Minimum	Maksimum
FOSS	102	181804	89277	17000	383000
DCC	102	178157	90637	17000	445000
log(FOSS)	102	5,189	0,274	4,230	5,583
log(DCC)	102	5,176	0,284	4,230	5,648

FOSS – Fossomatic 5000, DCC – DeLaval cell counter, log – desetiški logaritem SD – standardni odklon, n – število meritev

Povprečno ŠSC, ugotovljeno z aparatom FOSS, je bilo ponovno nekoliko višje kot ŠSC ugotovljeno z aparatom DCC, nekoliko večji standardni odklon logaritmiranih vrednosti ŠSC pa smo ugotovili pri aparatu DCC.

V preglednici 7 predstavljamo osnovne statistične parametre ŠSC za vzorce, ki so vsebovali >400.000 SC/ml mleka.

Preglednica 7: Osnovni statistični parametri za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka vzorcev, ki so vsebovali >400.000 SC/ml mleka

Meritev	n	Povprečje	SD	Minimum	Maksimum
FOSS	27	655296	260723	418000	1391000
DCC	27	603259	206366	378000	1240000
log(FOSS)	27	5,789	0,146	5,621	6,143
log(DCC)	27	5,760	0,130	5,577	6,093

FOSS – Fossomatic 5000, DCC – DeLaval cell counter, log – desetiški logaritem, SD – standardni odklon, n – število meritev

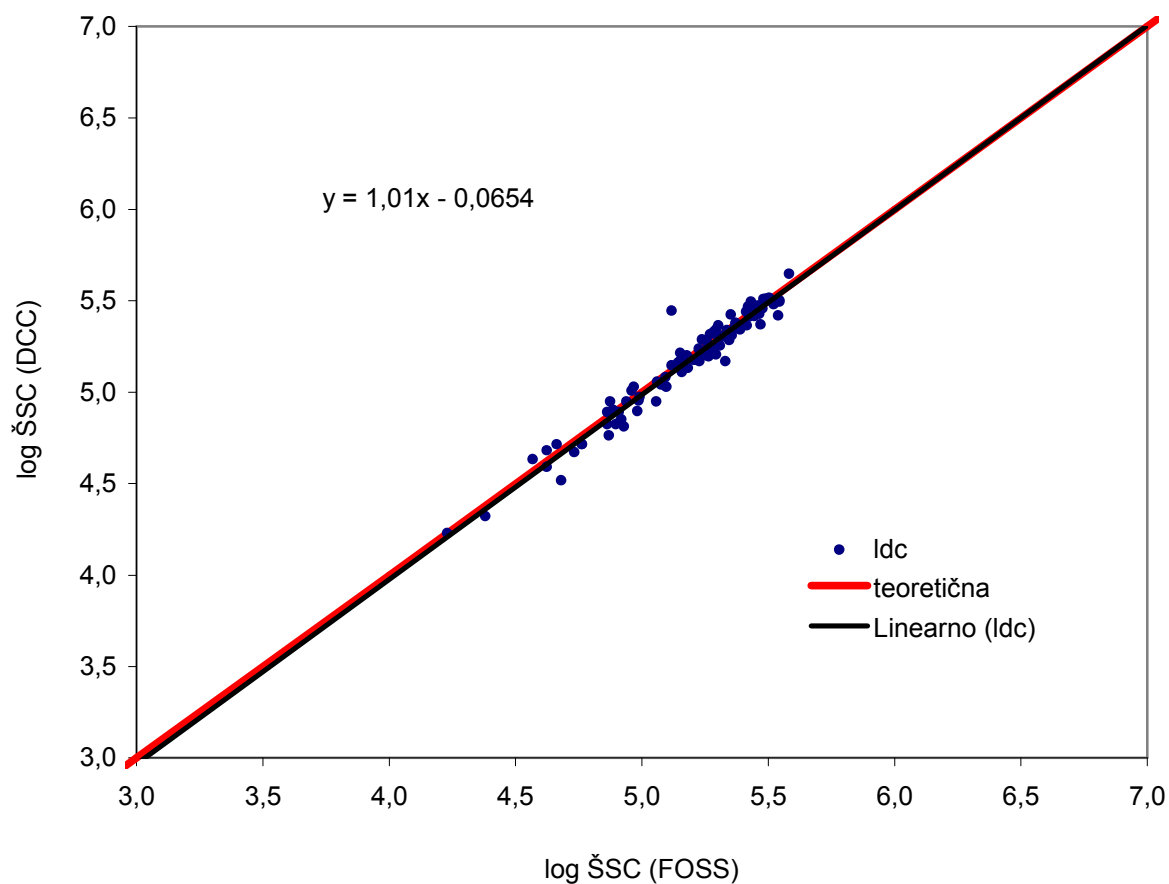
Povprečno ŠSC, ugotovljeno z aparatom FOSS, je bilo višje kot ŠSC, ugotovljeno z aparatom DCC tudi pri vzorcih mleka, ki so vsebovali več kot 400.000 SC/ml. Tudi standardni odklon logaritmiranih vrednosti je bil nekoliko večji pri aparatu FOSS kot pri DCC.

4.2 ANALIZA REGRESIJE

Izvedli smo analizo regresije ŠSC v ml mleka, ugotovljenih z aparatom DCC kot odvisno spremenljivko, glede na vrednosti, ugotovljene z aparatom FOSS.

Regresija, za vrednosti števila somatskih celic v območju <400.000 SC/ml mleka, izmerjenih z aparatom FOSS in DCC, je prikazana na sliki 5.

Regresijski koeficient je visoko statistično značilen ($p < 0,0001$) in je ocenjen z vrednostjo 1,01. Ocena točke na y osi, kjer regresijska premica seka os, je - 0,0654.



Legenda:

log ŠSC (DCC) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom DCC)

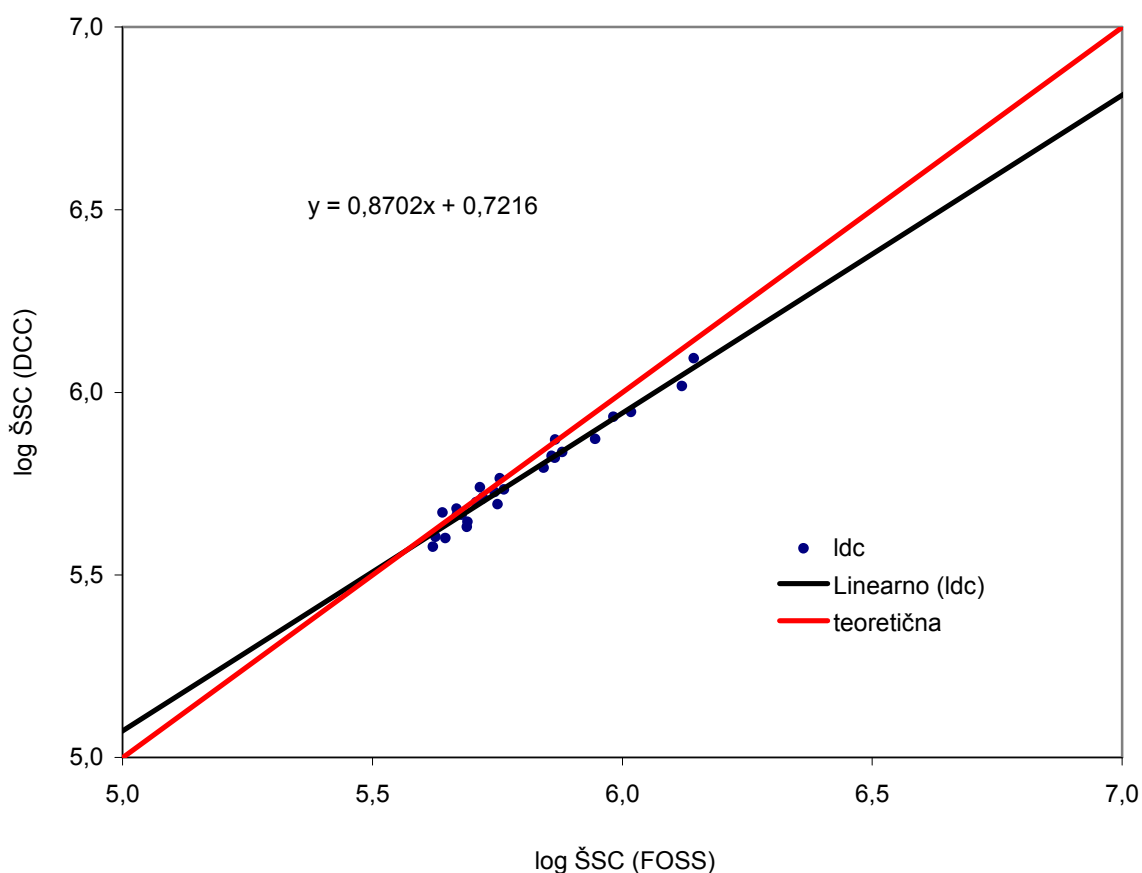
log ŠSC (FOSS) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom FOSS)

Slika 5: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vzorce, ki so vsebovali <400.000 somatskih celic (SC)/ml mleka

Izmerjene vrednosti števila somatskih celic, ugotovljenih z aparatom DCC in FOSS, so prikazane v prilogi B.

Regresija za vrednosti števila somatskih celic v območju >400.000 SC/ml mleka, izmerjenih z aparatom FOSS in DCC, je prikazana na sliki 6.

Regresijski koeficient je visoko statistično značilen ($p < 0,0001$) in je ocenjen z vrednostjo 0,8702. Ocena točke na y osi, kjer regresijska premica seka os, je 0,7216.



Legenda:

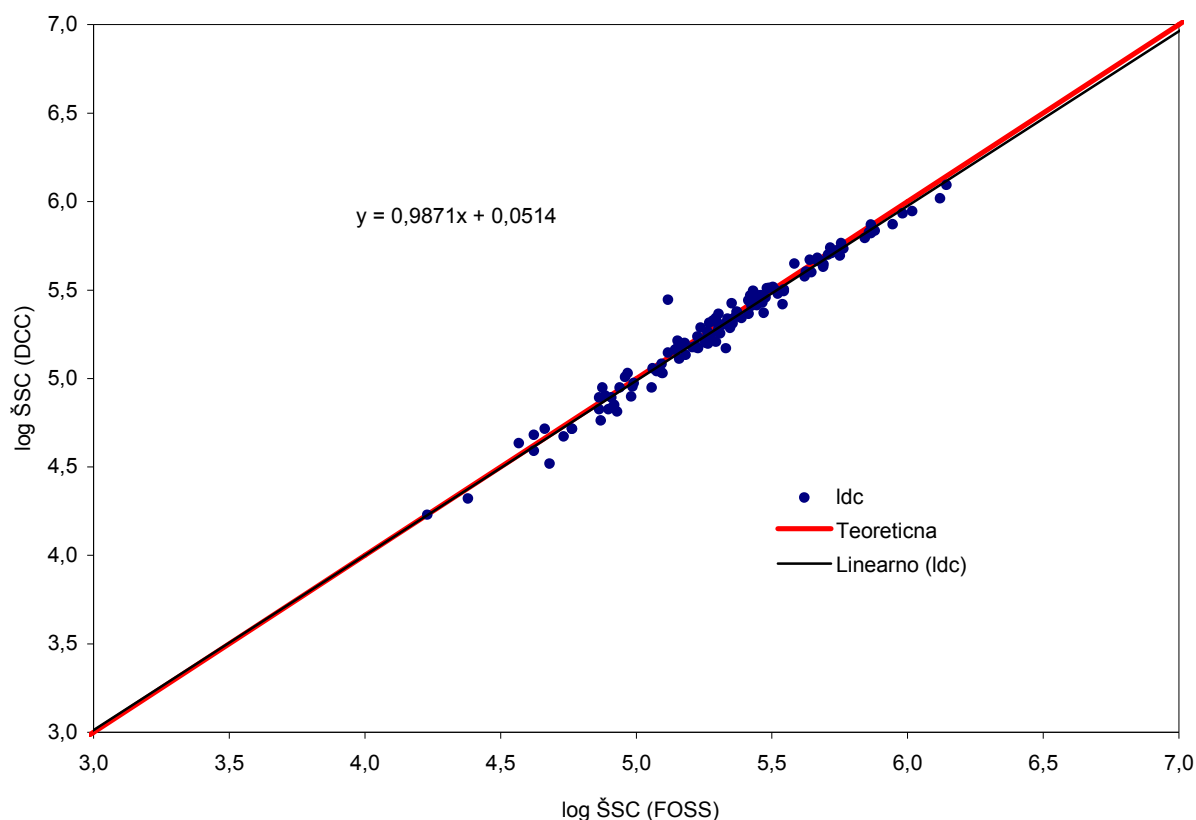
log ŠSC (DCC) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom DCC)

log ŠSC (FOSS) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom FOSS)

Slika 6: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vzorce, ki so vsebovali >400.000 somatskih celic (SC)/ml mleka

Na sliki 7 je prikazana regresija za izmerjene vrednosti števila somatskih celic z aparatom FOSS in DCC, za vse vzorce mleka, vključene v raziskavo.

Regresijski koeficient je visoko statistično značilen ($p < 0,0001$) in je ocenjen z vrednostjo 0,9871. Ocena točke na y osi, kjer regresijska premica seka os, je 0,0514.



Legenda:

log ŠSC (DCC) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom DCC)

log ŠSC (FOSS) = logaritem števila SC (analiza opravljena z aparatom FOSS)

Slika 7: Regresijska premica za število somatskih celic (ŠSC)/ml mleka, ugotovljenih z aparatom Fossomatic 5000 (FOSS) in DeLaval cell counter (DCC), za vse vzorce mleka

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Somatske celice so v mleku vedno prisotne, povečano število le teh, pa kaže na slabo zdravstveno stanje živali in je pogosto prvi znak vnetja mlečne žleze.

Hitro in zanesljivo ugotavljanje ŠSC je pomembno tako iz vidika proizvajalca, ki mu lahko izbruh mastitisa v čredi povzroči hude ekonomske težave, kot predelovalcev mleka, saj je sestava mleka mastitičnih živali spremenjena, mleko pa neustrezno za predelavo.

Razvoj analitskih metod in aparatov sledi željam po hitrih in zanesljivih analitskih postopkih in na trgu se pojavljajo vedno novi aparati. Takšen je tudi DCC, proizvajalca DeLaval, ki je lahek prenosni aparat, namenjen hitremu ugotavljanju ŠSC na terenu. Kljub temu, da je namenjen rutinskemu delu na terenu, pa morajo biti rezultati dovolj ponovljivi in točni. Zato smo najprej preverili ponovljivost, nato pa še točnost, aparata v primerjavi s certificiranim aparatom FOSS, ki ga uporabljajo v številnih veterinarskih in mlekarskih laboratorijih po svetu, za ugotavljanje ŠSC.

Ugotovili smo zelo dobro ponovljivost meritev z aparatom DCC, saj je bilo standardno odstopanje manjše od 2 %, kar je manjše odstopanje, kot ga v specifikacijah navaja proizvajalec DCC (DeLaval, 2008), pa tudi manjše, kot je v specifikacijah navedeno za aparat FOSS (Fossomatic 5000, 1996).

Rezultati ŠSC v mleku, ki smo jih dobili z aparatom DCC so bili primerljivi z rezultati, dobljenimi s certificiranim aparatom FOSS in dovolj točni, kar je pokazala regresijska analiza rezultatov, dobljenih z obema aparatoma.

Ocenjeni regresijski koeficient za meritve vseh, v analizo zajetih vzorcev, je 0,987 in se malo razlikuje od idealnega (1). Prav tako se tudi vrednost konstante (0,051) zelo malo razlikuje od idealne. Regresijski koeficient je visoko statistično značilen ($p < 0,0001$).

Tudi Gonzalo in sod. (2006) so dobili primerljive rezultate z našimi, saj navajajo, da je DCC metoda analize mlečnih vzorcev pokazala visoke koeficiente regresije ($b = 0,91$ do $1,01$) in korelacije ($r > 0,99$), ko so metodo primerjali z DMSCC in FOSS metodo, kot referenčnima metodama.

Ker velja, da je 400.000 SC/ml mleka zgornja meja števila somatskih celic za zdravo mlečno žlezo (Pravilnik o veterinarsko ..., 1999), smo opravili analizo regresije tudi ločeno za vzorce mleka, ki so vsebovali več kot 400.000 SC/ml in vzorce, ki so vsebovali manj kot 400.000 SC/ml. Regresijski koeficienti so bili v obeh primerih visoko statistično značilni ($p < 0,0001$), vendar so rezultati v območju merjenja nad 400.000 SC bolj odstopali (regresijski koeficient $0,87$), v območju merjenja pod 400.000 SC pa so se skoraj idealno ujemali (regresijski koeficient $1,01$). Boljša točnost aparata v območju do 400.000 SC v ml mleka je dobra lastnost aparata, saj so višje vrednosti avtomatično znak slabega zdravstvenega stanja živali in slabše kakovosti mleka.

Rezultati so potrdili ustreznost aparata DCC za hitro ugotavljanje SC v mleku, že na terenu, saj so v primerjavi z rezultati, ugotovljenimi z aparatom FOSS, dovolj točni.

5.2 SKLEPI

- Ponovljivost meritev ŠSC v mleku z aparatom DCC je boljša, od navedene proizvajalčeve, standardno odstopanje je manjše od 2 %.
- Rezultati ŠSC v mleku, ki smo jih dobili z aparatom DCC, so bili primerljivi z rezultati, dobljenimi s certificiranim aparatom FOSS in dovolj točni, kar je pokazala regresijska analiza rezultatov, dobljenih z obema aparatoma.
- Rezultati so potrdili ustreznost aparata DCC za hitro ugotavljanje SC v mleku.

6 POVZETEK

Število SC je pomemben pokazatelj zdravstvenega stanja živali.

Uporabljamo več metod za ugotavljanje števila somatskih celic v surovem mleku. Ena izmed metod je fluoro-optična metoda. Ta metoda temelji na sledeči proceduri: v kaseti se nahaja manjša količina posebnega reagensa, ki se odziva na prisotne SC. Testni vzorec, ki se nahaja v kaseti, se presvetli s svetlobo in na ta način povzroči fluorescentne signale. Signali se prenesejo na posebno ploščo, ki le te prešteje. Na ta način se posreduje število somatskih celic.

V našem poskusu za diplomsko nalogo smo ugotavljali uporabnost aparata DCC, za ugotavljanje števila SC na terenu. Preverjali smo natančnost aparata DCC.

Najprej smo preverjali ponovljivost določanja ŠSC z aparatom DCC in nato njegovo točnost v primerjavi z certificiranim aparatom FOSS. V analizo smo zajeli 129 vzorcev mleka krav, iz različnih živinorejskih obratov. Na ta način smo dobili vzorce, z ustreznim razponom vrednosti števila SC, od manj kot 100.000/ml do več kot 1.000.000 SC/ml mleka.

Po končanem poskusu smo analizirali dobljene rezultate, ter jih statistično obdelali.

Rezultati števila SC v mleku, ki smo jih dobili z aparatom DCC, so bili primerljivi z rezultati, dobljenimi s certificiranim aparatom FOSS in dovolj točni, kar je pokazala regresijska analiza rezultatov, dobljenih z obema aparatoma.

Ugotovili smo, da je aparat DCC uporaben za hitro ugotavljanje števila somatskih celic na terenu.

7 VIRI

Božanić R., Tratnik L., Drgalić I. 2002. Kozje mlijeko: Karakteristike i mogućnosti. Mlijekarstvo, 52, 3: 207-232

Chambers J.V. 2002. The microbiology of raw milk. V: Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3rd ed. Robinson R.K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 39-90

DeLaval. Technical data.

<http://www.delaval-us.com/Products/Milking/Cell-counter-DCC/DCC/>
(12. feb. 2008)

Early R. 1998. Liquid milk and cream. V: The technology of dairy products. 2nd ed. Early R. (ed.). London, Blackie Academic & Professional: 1-49

Fossomatic 5000. Type 71300. Operator's Manual. 1996. Hillerød, Foss Electric: 83 str.

Gonzalo C., Linage B., Carriedo J.A., Fuente de la F., San Primitivo F. 2006.

Evaluation of the Overall Accuracy of Delaval Cell Counter for Somatic Cell Counts in Ovine Milk. Journal of Dairy Science, 89, 12: 4613-4619

Hočevar J. 1994. Somatske celice – merilo za odkrivanje subkliničnih vnetij vimena. Kmečki glas, 51, 16: 12

IDF 128:1985. Milk. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. 1985: 10 str.

IDF 148A:1995. Milk. Enumeration of somatic cells 1995: 8 str.

Klopčič M. 1997. Število somatskih celic v mleku. Kmečki glas, 54, 35: 9

- Oliver S.P., Pighetti G.M. 2002. Environmental pathogens. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1728-1734
- Pengov A. 2005. Mastitis. Zdraviti ali preprečevati? Sodobno kmetijstvo, 38, 2: 11-12
- Pravilnik o elementih za oblikovanje odkupne cene kravjega mleka. Ur.l. RS št. 107-11726/01
- Pravilnik o razveljavitvi Pravilnika o kakovosti konzumnega kravjega mleka. Ur.l. RS št. 94-9843/05
- Pravilnik o veterinarsko-sanitarnem nadzoru živilskih obratov, veterinarsko-sanitarnih pregledih ter o pogojih zdravstvene ustreznosti živil in surovin živalskega izvora. Ur.l. RS št. 100-14926/99
- Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173-214
- Rogelj I. 2003. Mleko. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo: 513-539
- SAS/STAT User's guide. 2000. Version eight. Cary, SAS Institute: 846 str.
- Uredba o določitvi minimalne odkupne cene kravjega mleka za namen izvajanja ukrepov v okviru ureditve trga z mlekom in mlečnimi izdelki. Ur.l. RS št. 15-1583/01
- Uredba o prenehanju veljavnosti uredbe o določitvi minimalne odkupne cene kravjega mleka za namen izvajanja ukrepov v okviru ureditve trga z mlekom in mlečnimi izdelki. Ur.l. RS št. 39-3826/02

Weimer P. J. 1998. Microbiology of the dairy animal. V: Applied dairy microbiology. Marth E. H., Steele J. L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1-54

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za strokovno vodenje, pomoč, ter potrpežljivost ob izvedbi diplomske naloge.

Zahvaljujem se viš. pred. dr. Klemenu Potočniku za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za pomoč pri urejanju in pregledu diplomske naloge.

Hvala mojima staršema, Viljenki in Francetu Briški za ves trud, ki sta ga vložila vame in mi omogočila študij.

Hvala tudi vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali in mi v času študija stali ob strani.

Hvala!!!

PRILOGE

Priloga A:

Izmerjene in logaritmirane vrednosti ŠSC, določenih z aparatom DCC, pri ugotavljanju ponovljivosti aparata

vzorec	DCC	log(DCC)
1	101000	5,004321
2	108000	5,033424
3	105000	5,021189
4	119000	5,075547
5	103000	5,012837
6	101000	5,004321
7	114000	5,056905
8	104000	5,017033
9	115000	5,060698
10	104000	5,017033
11	110000	5,041393
12	108000	5,033424
13	109000	5,037426
14	92000	4,963788
15	100000	5
16	116000	5,064458
17	109000	5,037426
18	118000	5,071882
19	117000	5,068186
20	95000	4,977724

Priloga B:

Izmerjene in logaritmirane vrednosti ŠSC, določenih z aparatoma FOSS in DCC

vzorec	FOSS	DCC	log(FOSS)	log(DCC)
1	46000	52000	4,663	4,716
2	284000	294000	5,453	5,468
3	235000	237000	5,371	5,375
4	114000	89000	5,057	4,949
5	292000	268000	5,465	5,428
6	280000	283000	5,447	5,452
7	124000	108000	5,093	5,033
8	93000	107000	4,968	5,029
9	73000	67000	4,863	4,826
10	303000	324000	5,481	5,511
11	188000	167000	5,274	5,223
12	58000	52000	4,763	4,716
13	74000	58000	4,869	4,763
14	289000	282000	5,461	5,450
15	263000	294000	5,420	5,468
16	165000	150000	5,217	5,176
17	54000	47000	4,732	4,672
18	178000	166000	5,250	5,220
19	87000	89000	4,940	4,949
20	125000	107000	5,097	5,029
21	131000	140000	5,117	5,146
22	42000	48000	4,623	4,681
23	73000	78000	4,863	4,892
24	77000	80000	4,886	4,903
25	289000	296000	5,461	5,471
26	279000	260000	5,446	5,415
27	169000	148000	5,228	5,170
28	309000	325000	5,490	5,512
29	214000	148000	5,330	5,170
30	124000	121000	5,093	5,083
31	37000	43000	4,568	4,633

32	42000	39000	4,623	4,591
33	79000	67000	4,898	4,826
34	58000	52000	4,763	4,716
35	350000	318000	5,544	5,502
36	350000	312000	5,544	5,494
37	346000	263000	5,539	5,420
38	181000	168000	5,258	5,225
39	115000	114000	5,061	5,057
40	210000	202000	5,322	5,305
41	83000	71000	4,919	4,851
42	48000	33000	4,681	4,519
43	17000	17000	4,230	4,230
44	98000	94000	4,991	4,973
45	180000	159000	5,255	5,201
46	141000	147000	5,149	5,167
47	266000	258000	5,425	5,412
48	245000	220000	5,389	5,342
49	225000	209000	5,352	5,320
50	217000	218000	5,336	5,338
51	204000	180000	5,310	5,255
52	274000	272000	5,438	5,435
53	192000	213000	5,283	5,328
54	300000	287000	5,477	5,458
55	287000	296000	5,458	5,471
56	225000	266000	5,352	5,425
57	96000	79000	4,982	4,898
58	81000	78000	4,908	4,892
59	173000	194000	5,238	5,288
60	139000	145000	5,143	5,161
61	97000	90000	4,987	4,954
62	279000	285000	5,446	5,455
63	183000	185000	5,262	5,267
64	168000	173000	5,225	5,238
65	142000	164000	5,152	5,215
66	227000	205000	5,356	5,312
67	289000	278000	5,461	5,444
68	199000	207000	5,299	5,316
69	82000	69000	4,914	4,839

70	230000	220000	5,362	5,342
71	235000	239000	5,371	5,378
72	85000	65000	4,929	4,813
73	166000	153000	5,220	5,185
74	186000	207000	5,270	5,316
75	91000	102000	4,959	5,009
76	201000	192000	5,303	5,283
77	152000	136000	5,182	5,134
78	147000	151000	5,167	5,179
79	199000	183000	5,299	5,262
80	333000	302000	5,522	5,480
81	328000	314000	5,516	5,497
82	259000	276000	5,413	5,441
83	197000	161000	5,294	5,207
84	131000	279000	5,117	5,446
85	119000	110000	5,076	5,041
86	295000	235000	5,470	5,371
87	187000	176000	5,272	5,246
88	184000	157000	5,265	5,196
89	260000	232000	5,415	5,365
90	319000	329000	5,504	5,517
91	161000	150000	5,207	5,176
92	271000	268000	5,433	5,428
93	222000	193000	5,346	5,286
94	75000	89000	4,875	4,949
95	184000	179000	5,265	5,253
96	197000	220000	5,294	5,342
97	151000	159000	5,179	5,201
98	201000	232000	5,303	5,365
99	24000	21000	4,380	4,322
100	144000	129000	5,158	5,111
101	270000	313000	5,431	5,496
102	580000	542000	5,763	5,734
103	1041000	883000	6,017	5,946
104	883000	744000	5,946	5,872
105	510000	500000	5,708	5,699
106	758000	685000	5,880	5,836
107	734000	741000	5,866	5,870

108	467000	461000	5,669	5,664
109	1391000	1240000	6,143	6,093
110	423000	402000	5,626	5,604
111	1317000	1041000	6,120	6,017
112	563000	494000	5,751	5,694
113	466000	480000	5,668	5,681
114	490000	442000	5,690	5,645
115	525000	511000	5,720	5,708
116	519000	549000	5,715	5,740
117	722000	669000	5,859	5,825
118	696000	621000	5,843	5,793
119	960000	857000	5,982	5,933
120	489000	428000	5,689	5,631
121	477000	462000	5,679	5,665
122	418000	378000	5,621	5,577
123	733000	661000	5,865	5,820
124	443000	399000	5,646	5,601
125	556000	533000	5,745	5,727
126	526000	515000	5,721	5,712
127	569000	581000	5,755	5,764
128	383000	445000	5,583	5,648
129	437000	469000	5,640	5,671

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Gregor BRIŠKI

**UPORABNOST APARATA DCC ZA
UGOTAVLJANJE ŠTEVILA SOMATSKIH CELIC NA
TERENU**

DILOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2008