

## VYBRANÉ ANALYTICKÉ A INTERPRETAČNÍ ASPEKTY OBSAHU LAKTOFERINU V KRAVSKÉM MLÉČE

**Hana Nejeschlebová<sup>1</sup>, Oto Hanuš<sup>1</sup>, Klára Bartáková<sup>2</sup>,  
Eva Samková<sup>3</sup>, Lenka Vorlová<sup>2</sup>, Pavlína Navrátilová<sup>2</sup>,  
Markéta Borková<sup>1</sup>, Josef Kučera<sup>4</sup>, Lucie Hasoňová<sup>3</sup>,  
Karolína Hálová<sup>3</sup>, Jaroslav Kopecký<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>2</sup> Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny  
a ekologie

<sup>3</sup> Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
Fakulta zemědělská a technologická

<sup>4</sup> Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

### Selected analytical and interpretative aspects of lactoferrin content in cow milk

#### Abstrakt

Cílem studie bylo posoudit vztah mezi koncentrací laktoferinu (LF) ve vzorcích syrového kravského mléka a vybranými mléčnými ukazateli a dále zhodnotit vztah mezi referenční (kapalinová chromatografie na reverzní fázi s iontově párovacím činidlem, IP RP HPLC) a nepřímou (infračervená spektroskopie ve střední oblasti s Fourierovou transformací, FT-MIR) metodou stanovení LF. Za tímto účelem byly analyzovány 3 soubory vzorků syrového kravského mléka A (n = 20), B (n = 15), C (n = 129) na obsah LF, laktosu, počet somatických buněk (PSB) a měrnou vodivost. LF byl v souboru A a B stanoven jak metodou IP RP HPLC ( $LF_{HPLC}$ ), tak FT-MIR ( $LF_{FT-MIR}$ ). V souboru C byl LF stanoven pouze metodou FT-MIR. Rozmezí hodnot  $LF_{HPLC}$  pro soubor A činilo 80,99 až 536,75  $mg \cdot l^{-1}$  pro soubor B 85,04 až 212,29  $mg \cdot l^{-1}$ . Pro soubor C rozsah  $LF_{FT-MIR}$  činil 72,68 až 384,42  $mg \cdot l^{-1}$ . V souboru A koreloval  $LF_{HPLC}$  s obsahem laktosu ( $r = -0,8624$ ), PSB ( $r = 0,8431$ ), log PSB ( $r = 0,7741$ ) a měrnou vodivostí ( $r = 0,8725$ ). V souboru B byla zjištěna korelace  $LF_{HPLC}$  s obsahem laktosu

( $r = -0,5334$ ). V souboru C koreloval  $LF_{FT-MIR}$  s obsahem laktosu ( $r = -0,5114$ ), PSB ( $r = 0,2872$ ) a log PSB ( $r = 0,2470$ ). Tendence LF korelovat s uvedenými mléčnými ukazateli byla přítomná ve smyslu změn, ke kterým dochází v důsledku zánětů mléčné žlázy. V souborech A a B byla tato tendence výraznější pro  $LF_{HPLC}$  než  $LF_{FT-MIR}$ . Pro vztah  $LF_{FT-MIR}$  a  $LF_{HPLC}$  byl v souboru A a B získán korelační koeficient 0,5585, resp. 0,3178. Tudíž jen 31 %, resp. 10 % variací v hodnotách  $LF_{FT-MIR}$  bylo možné vysvětlit variabilitou hodnot  $LF_{HPLC}$ . Porovnání referenční a nepřímé metody tak ukázalo, že pro získání těsnějšího vztahu  $LF_{HPLC}$  a  $LF_{FT-MIR}$  je potřeba provést a následně ověřit sekundární kalibraci metody FT-MIR na metodu IP RP HPLC jako referenční.

**Klíčová slova:** kravské mléko, FT-MIR, IP RP HPLC, počet somatických buněk, laktosa, měrná vodivost, mas-titida.

#### Abstract

The objective of this study was to evaluate relationship between lactoferrin content (LF) in raw cow milk samples and selected milk parameters, and to compare reference (ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography, IP RP HPLC) and indirect (mid-infrared Fourier-transform spectroscopy, FT-MIR) method for LF determination in milk. For this purpose we analyzed three sets of milk samples A (n = 20), B (n = 15), C (n = 129) for LF, lactose, somatic cell count (PSB) and electrical conductivity. For the sets A and B, LF was determined using both IP RP HPLC ( $LF_{HPLC}$ ) and FT-MIR ( $LF_{FT-MIR}$ ). For the set C, LF was determined using only FT-MIR.  $LF_{HPLC}$  varied from 80.99 to 536.75  $mg \cdot L^{-1}$  for the set A, from 85.04 to 212.29  $mg \cdot L^{-1}$  for the set B.  $LF_{FT-MIR}$  varied from 72.68 to 384.42  $mg \cdot L^{-1}$  for the set C. For the set A,  $LF_{HPLC}$  was correlated with lactose content ( $r = -0.8624$ ), PSB ( $r = 0.8431$ ), log PSB ( $r = 0.7741$ ) and electrical conductivity ( $r = 0.8725$ ). For the set B,  $LF_{HPLC}$  was correlated with lactose content ( $r = -0.5334$ ). For the set C,  $LF_{FT-MIR}$  was correlated with lactose content ( $r = -0.5114$ ), PSB ( $r = 0.2872$ ) and log PSB ( $r = 0.2470$ ). LF tendency to correlate with these milk parameters appeared in terms of changes, that occur due to an inflammation of the mam-

mary gland. For sets A and B, this tendency was more pronounced in case of  $LF_{HPLC}$  than  $LF_{FT-MIR}$ . The relationship between  $LF_{HPLC}$  and  $LF_{FT-MIR}$  gave correlation coefficients of 0.5585, for the set A, and 0.3178, for the set B. Therefore only 31% and 10% of variations in  $LF_{FT-MIR}$ , respectively, could be explained by variability of  $LF_{HPLC}$ . The comparison of reference and indirect method for LF determination thus showed, that in order to get closer relationship between  $LF_{FT-MIR}$  and  $LF_{HPLC}$ , it is necessary to perform and verify a secondary calibration of FT-MIR by using IP RP HPLC as a reference method.

**Key words:** cow milk, FT-MIR, IP RP HPLC, somatic cell count, lactose, electrical conductivity, mastitis.

## Úvod

Laktoferin (LF) je transportní glykoprotein vázající železo, který patří do skupiny transferinů. Poprvé byl objeven v kravském mléce (Sørensen a Sørensen, 1939) a postupně byla jeho přítomnost potvrzena u celé řady savců. LF je přítomen v mukózních sekretech (mléko, sliny, slzy, sekret nosní dutiny, žluč aj.) a nachází se rovněž v sekundárních granulích neutrofilních leukocytů a krevní plazmě (Giansanti a kol., 2016).

LF je znám zejména pro svůj antibakteriální efekt, který je dán dvěma mechanismy. Za primární je považován bakteriostatický efekt LF spočívající ve vychytávání volného železa z prostředí, čímž se substrát nutný pro růst většiny patogenních bakterií stává nedostupným (Bullen a kol., 1972). Dále je znám rovněž přímý baktericidní účinek v důsledku vazby LF na buněčnou stěnu bakterií (Arnold a kol., 1982). Antibakteriálně působí také peptidy vznikající v důsledku enzymatického štěpení LF pepsinem (Wakabayashi a kol., 1992; Flores-Villaseñor a kol., 2010). U některých probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* bylo naopak zjištěno, že LF a jeho peptidy růst těchto bakterií podporují (Kim s kol., 2004).

Kromě antibakteriálního efektu LF byly popsány rovněž antivirové, antifungální, imunomodulační, anti-inflamatorní či antikarcinogenní účinky (Superti, 2020).

Nejbohatším zdrojem LF je mléko savců. Obsah LF se liší mezidruhově, v rámci jednotlivých druhů je potom nejvýrazněji ovlivněn fází laktace. Zralé kravské mléko obvykle obsahuje od 20 do 500  $mg.l^{-1}$  LF (Cheng a kol., 2008), v kolostru se nejčastěji nachází 1 500 až 5 000  $mg.l^{-1}$  LF (McGrath a kol., 2015), možné však jsou i koncentrace 10 000  $mg.l^{-1}$ . V průběhu 72 hodin od počátku produkce kolostru potom množství LF prudce klesá, zvýšení následuje až v pozdějších fázích laktace, ve starodojném mléce se mohou vyskytovat koncentrace LF srovnatelné s kolostrum (Valk-Weeber a kol., 2020).

Hladina LF v mléce je ovlivněna zdravotním stavem dojnice. LF, který se účastní imunitní odpovědi mléčné žlázy na mikrobiální infekci, je ve zvýšeném množství produkován v mléce dojnic postižených mastitidou. Reakce mléčné žlázy na infekci zvýšením vylučování LF

do mléka je zřejmě specifická pro různé druhy patogenů (Chaneton a kol., 2006). Hagiwara a kol. (2003) uvedli obsah LF u dojnic se subklinickou mastitidou od 300 do 1 300  $mg.l^{-1}$  (průměr 500  $mg.l^{-1}$ ), přičemž zároveň pozoroval trend vzrůstajícího obsahu LF se zvyšujícím se skóre počtu somatických buněk (PSB). Tendenci korelace PSB skóre a obsahu LF ( $r = 0,375$ ) zaznamenali rovněž Cheng a kol. (2008). Podobně Carlsson a kol. (1989) pozorovali při klinické mastitidě záměrně vyvolané infuzí endotoxinu *Salmonella Typhimurium* nárůst obsahu LF v mléce až na 1 600  $mg.l^{-1}$  a PSB v rádech až na  $10^8.ml^{-1}$ . Dle některých autorů může náchylnost dojnic k mastitidám souviset s polymorfismem v genu LF, neboť jedinci nesoucí různé alely vykazují rozdílný PSB (Wojdak a kol., 2006; Zhao a kol., 2008).

Król a kol. (2010) popsali významný vliv plemene na obsah LF, jako bohatší zdroj LF se ukázalo mléko simentálského skotu a skotu plemene Jersey než holštýnského skotu. Negativně je obsah LF ovlivněn množstvím denního nádoje (Harmon a kol., 1975; Cheng a kol., 2008). Některé studie (Tsuji a kol., 1990; Hagiwara a kol., 2003) uvedly pozitivní korelaci LF s pořadím laktace, avšak Cheng a kol. (2008) takový vztah nepotvrdili.

Byla rovněž popsána možnost ovlivnit obsah LF v mléce složením krmné dávky. Lefier a kol. (2010) uvedli významně vyšší obsah LF u dojnic, kterým bylo zkrmováno suché krmivo (seno a mletý ječmen/sójová moučka) než u dojnic na volné pastvě, u kterých suché krmivo představovalo pouze doplňkovou dietu.

Zkoumání biologického významu LF, zájem o využití jeho terapeutických vlastností pro komerční využití a také jeho potenciální diagnostický význam souvisí s potřebou spolehlivých metod jeho stanovení. Značná pozornost je věnována právě kvantifikaci LF v mléce jako snadno dostupnému zdroji tohoto proteinu, k jehož stanovení byla popsána řada metod od relativně jednoduchých a nenáročných na laboratorní vybavení (jednoduchá radiální imunodifúze) po pokročilé metody instrumentální analýzy (ELISA, vysoce účinná kapalinová chromatografie).

Preferovanou metodou dnešní doby pro stanovení obsahu mléčných složek (včetně minoritních složek) je infračervená spektrometrie ve střední oblasti s Fourierovou transformací (FT-MIR). Jedná se o metodu, která vyžaduje minimální přípravu vzorků a umožňuje uchovávat celé spektrum absorbance změřeného vzorku a tím vzorek dodatečně analyzovat na libovolnou složku. Pro každý parametr je zapotřebí samostatná kalibrace, která je závislá na věrohodnosti výsledků použité referenční metody. FT-MIR je hojně využívána v laboratořích pro kontrolu užitkovosti a zpeněžování mléka. Možnost měření obsahu LF metodou FT-MIR potvrdili ve svých pracích Soyeurt a kol. (2012, 2020). Využití kalibračních modelů ke stanovení LF prostřednictvím FT-MIR představuje potenciál pro sběr informací v rámci rutinní kontroly užitkovosti a jejich využití pro zjišťování zdravotního stavu zvířat či výživové hodnoty mléka. Poslední uve-

dené podporuje fakt, že bovinní LF je schválen jako bezpečná složka potravin Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, 2016) i Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, 2012), díky čemuž představuje potenciál pro produkci mléčných výrobků s přidanou hodnotou.

Hypoteticky lze očekávat, že koncentrace LF bude těsněji korelovat s ostatními mléčnými ukazateli vztahujícími ke zdravotnímu stavu mléčné žlázy s ohledem na výskyt poruch sekrece mléka. Cílem práce bylo proto posoudit vztahy koncentrace LF ve zralém syrovém mléce k některým vybraným složkám a vlastnostem mléka a mezi referenční a nepřímou metodou stanovení pro možnost formulace některých interpretačních pravidel a postup výběru vzorků mléka pro validaci měřících metod.

## Materiál a metodika

### Vzorky mléka

Byly získány 3 soubory vzorků syrového kravského mléka. Soubor A ( $n = 20$ ) vznikl odebráním proporcionálně stejných objemů prvních stříků mléka ze všech čtvrtí dojnice, odběr byl proveden v říjnu 2021. Soubor B ( $n = 15$ ) tvořily individuální vzorky mléka odebrané dle předpisu kontroly užitkovosti, mléko z jednotlivých čtvrtí tak bylo zastoupeno úměrně jejich dojitosti. Odběr byl proveden v listopadu 2021. Vzorky souborů A a B byly odbírány v témže chovu dojníc holštýnského skotu. Soubor C ( $n = 129$ ) tvořila kombinace bazénových a individuálních vzorků mléka v poměru 10 : 3. Tyto vzorky byly odbírány průběžně od června do listopadu 2021 v chovech dojníc holštýnského a červenostrakatého skotu.

Vzorky o objemu 100 ml byly po odběru konzervovány chladem (teplota  $\leq 6$  °C), analýza proběhla do 24 hodin od odběru.

### Sledované mléčné ukazatele

Přehled sledovaných mléčných ukazatelů v souborech vzorků mléka, včetně použitých zkratk a jednotek je uveden v Tabulce 1.

### Analytické metody

Stanovení laktosy (monohydrát) a  $LF_{FT-MIR}$  metodou infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-MIR) bylo provedeno za použití přístroje DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA). Přístroj je pravidelně kalibrován dle výsledků referenčních metod na stanovení základních mléčných složek (sekundární kalibrace), nikoliv však na stanovení obsahu LF.

PSB byl stanoven metodou průtokové cytometrie na přístroji Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA), pravidelně kalibrovaném na referenční vzorky.

Měrná vodivost byla stanovena na konduktometru Hanna Instruments HI5321-02 (Woonsocket, USA) pravidelně kontrolovaném roztokem (KCl) o standardní vodivosti ( $10,2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), při 20 °C.

### Postup stanovení $LF_{HPLC}$ metodou IP RP HPLC

Vzorky mléka byly odstředěny (3000 otáček/15 minut/5 °C) a z povrchu byl mechanicky odebrán tuk. 50 ml takto upraveného vzorku bylo vysráženo 10% kyselinou octovou na hodnotu pH 4,6. Po odstředění byla syrovátka oddělena od kaseinu, zmrazena na teplotu  $-18$  °C a před vlastním stanovením rozmrazena a přefiltrována přes nylonový membránový filtr ( $0,22 \mu\text{m}$ ) do vialek pro HPLC stanovení.

Vlastní stanovení bylo provedeno kapalinovým chromatografem Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, USA). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze  $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (voda/ acetonitril/kyselina trifluorooctová), teplota kolony činila 50 °C, objem nástřiku byl 5  $\mu\text{l}$ . Analyty byly detekovány při 205 nm. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA).

### Statistické postupy

Soubory A, B a C byly popsány základními statistickými parametry (aritmetický a geometrický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, minimum, maximum a medián). PSB byl hodnocen v původní i logaritmičtě transformované formě, ostatní parametry pouze v původní formě.

K popisu vztahů  $LF_{HPLC} \times LF_{FT-MIR}$ ,  $LF_{HPLC} \times$  mléčné ukazatele (laktosa, PSB, log PSB, měrná vodivost) a  $LF_{FT-MIR} \times$  mléčné ukazatele byla použita regresní a korelační analýza. Z důvodu absence předchozí sekundární kalibrace stanovení LF metodou FT-MIR a současně nižšího počtu vzorků v souborech A a B byly vztahy  $LF_{FT-MIR} \times$  mléčné ukazatele popsány v těchto souborech pouze za účelem zjištění, která z metod stanovení LF poskytuje výsledky s těsnějším vztahem k mléčným ukazatelům vztaheným ke zdravotnímu stavu mléčné žlázy. Za účelem detailnější diskuse byly potom popsány vztahy  $LF_{FT-MIR} \times$  mléčné ukazatele pro soubor C, a to vzhledem k jeho většímu rozsahu, a tudíž předpokladu dostatečné

**Tab. 1** Sledované mléčné ukazatele v souborech A, B, C s příslušnými zkratkami a jednotkami

Ukazatel	Zkratka	Jednotka	Soubor
Laktosa (monohydrát)		%	A, B, C
Počet somatických buněk	PSB	$10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$	A, B, C
Měrná vodivost		$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$	A, B, C
Laktoferin metodou infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací	$LF_{FT-MIR}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	A, B, C
Laktoferin metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi s iontově párovacím činidlem (IP RP HPLC)	$LF_{HPLC}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	A, B

vypovídací hodnoty i přes absenci předchozí sekundární kalibrace metody FT-MIR.

Významnost korelací byla posouzena na konvenčních hladinách pravděpodobnosti intervalu spolehlivosti (ns  $P > 0,05$ ; \* (s)  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ). Vyhodnocení bylo provedeno s použitím programu MS Excel 2013 (Microsoft Corporation).

## Výsledky a diskuze

### Vztah LF a PSB

LF<sub>HPLC</sub> v rámci souboru A koreloval s PSB ( $r = 0,8431$ ;  $P < 0,001$ ) i log PSB ( $r = 0,7741$ ;  $P < 0,001$ ). V souboru B vztahy LF<sub>HPLC</sub> a PSB ( $r = 0,1431$ ;  $P > 0,05$ ), LF<sub>HPLC</sub> a log PSB ( $r = 0,0993$ ;  $P > 0,05$ ) poskytly naopak nevýznamné korelační koeficienty, avšak u obou vztahů bylo možné pozorovat mírně vzrůstající tendenci LF<sub>HPLC</sub> se vzrůstajícím PSB i log PSB. LF<sub>FT-MIR</sub> koreloval s PSB ( $r = 0,2872$ ;  $P < 0,01$ ) a log PSB ( $r = 0,2470$ ;  $P < 0,01$ ) v souboru C (Tabulka 3). Pozitivní korelaci PSB a LF uvedli rovněž Soyeurt a kol. (2020) a Trajkovska a kol. (2021b), zatímco Cheng a kol. (2008) uvedli pozitivní korelaci pouze LF a PSB skóre, nikoliv však LF a PSB.

PSB je považován za zásadní diagnostický nástroj pro včasnou detekci subklinických i klinických mastitid, neboť je ovlivňován zejména právě probíhající infekcí a další faktory (laktace, věk dojnice, stres, ...) mají většinou pouze malý vliv. Za hranici pro normální PSB je považována hodnota  $200 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ , při jejím překročení je pravděpodobné, že došlo k infekci mléčné žlázy (Harmon, 1994). Cheng a kol. (2008) uvedli, že ke zvyšování LF v mléce dochází až při překročení SCS (skóre PSB) 4 ( $\text{PSB} \geq 141 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $\leq 282 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ; tzn. významné zvýšení LF koncentrace v mléce při  $\text{PSB} \geq 283 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ , SCS 5), tedy v bodě, kdy je zvýšená pravděpodobnost infekce mléčné žlázy. Původní informace o významu, potřebě, základních principech a definici log transformace hodnot PSB na SCS ( $\text{SCS} = \log_2(\text{SCC}/100) + 3$ , kde  $\text{SCC} = \text{PSB}$  v  $10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ), především pro linearizaci vztahu mezi PSB a ztrátami dojivosti v souvislosti s výskytem poruch sekrece mléka u krav, jsou uvedeny v pracích: Ali a Shook, 1980; Shook, 1982; Raubertas a Shook, 1982; Reneau a kol., 1983 a 1988; Reneau, 1986; Wiggans a Shook, 1987. Zde je pak možné dohledat, že středy zmíněných oborů v lineární škále pro SCS 4 a 5 jsou  $200$  a  $400 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  PSB. Tyto následně odpovídají ztrátám mléka na dojivosti u holštýnských dojnic  $200$  a  $300$  kg pro první a  $400$  a  $600$  kg pro další laktace. Vzhledem k tomu, že soubor B obsahoval značně menší podíl (6 %; 1/15) vzorků s PSB přesahujícím SCS skóre 4 než soubor A (25 %; 5/20), lze tuto skutečnost vidět jako možnou příčinu v rozdílech závislosti LF<sub>HPLC</sub> a PSB (log PSB) mezi jednotlivými soubory mléka.

### Vztah LF a laktosy

LF<sub>HPLC</sub> a laktosa ukázaly negativní korelaci v souboru A ( $r = -0,8624$ ;  $P < 0,001$ ), B ( $r = -0,5334$ ;  $P < 0,05$ ) a rovněž LF<sub>FT-MIR</sub> a laktosa negativně korelovaly ( $r = -0,5114$ ;  $P < 0,001$ ) v souboru C (Tabulka 3). Podobných výsledků dosáhli Cheng a kol. (2008) a Trajkovska a kol. (2021b), kteří uvedli rovněž negativní korelaci laktosy a LF. Uvedené zřejmě souvisí se skutečností, že zdraví mléčné žlázy je vedle metabolismu a energetické bilance významným faktorem, který ovlivňuje schopnost mléčné žlázy syntetizovat laktosu. Uvedené je v souladu s tvrzeními Bobbo a kol. (2017) a Antanaitis a kol. (2021), kteří popsali tendenci ke snižování obsahu laktosy se zvyšujícím se PSB a nižší obsah laktosy v mléce s výskytem mastitidních patogenů, než v mléce prostém mastitidních patogenů.

### Vztah LF a měrné vodivosti

LF<sub>HPLC</sub> a měrná vodivost ukázaly pozitivní korelaci v souboru A ( $r = 0,8725$ ;  $P < 0,001$ ), nikoliv však v souboru B ( $r = -0,0424$ ;  $P > 0,05$ ). Pozitivní korelaci LF<sub>FT-MIR</sub> a měrné vodivosti ( $r = 0,0542$ ;  $P > 0,05$ ) jsme rovněž nezaznamenali v souboru C (Tabulka 3). Trajkovska a kol. (2021a) zaznamenali zvýšení měrné vodivosti (z  $5,62 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  na  $6,42 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) za současného nárůstu obsahu LF a PSB. Zvyšování měrné vodivosti mléka v důsledku mastitidy je způsobeno změnami v poměru

Tab. 2 Základní statistické parametry souborů A, B, C

		Laktosa	PSB	Log PSB	Měrná vodivost	LF <sub>FT-MIR</sub>	LF <sub>HPLC</sub>
		%	$10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$		$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Soubor A	n	20	20	20	20	20	20
	x	5,15	372	1,8454	4,87	121,60	211,81
	g		70				
	sx	0,43	781,0	0,8310	0,53	38,22	104,99
	vx	8,3	209,8		10,9	31,4	49,6
	min	3,76	5	0,6990	4,39	51,49	80,99
	max	5,60	3185	3,5031	6,66	199,40	536,75
	m	5,28	39	1,5801	4,67	123,21	173,54
	Soubor B	n	15	15	15	15	15
x		5,08	155	1,7871	4,24	201,74	143,90
g			61				
sx		0,17	345,1	0,4928	0,28	46,70	31,92
vx		3,4	222,2		6,7	23,1	22,2
min		4,83	19	1,2672	3,60	131,02	85,04
max		5,44	1378	3,1392	4,75	282,37	212,29
m		5,07	48	1,6767	4,21	209,04	145,42
Soubor C		n	129	129	129	71	129
	x	4,98	289	2,3148	4,61	165,80	
	g		206				
	sx	0,13	390,1	0,3078	0,18	28,82	
	vx	2,7	135		4,0	17,4	
	min	4,06	47	1,6721	4,24	72,68	
	max	5,22	2814	3,4493	5,03	384,42	
	m	5,00	197	2,2945	4,59	165,98	

n = počet případů; x = aritmetický průměr; g = geometrický průměr; sx = směrodatná odchylka; vx = variační koeficient (%); min = minimum; max = maximum; m = medián

kationtů a aniontů a laktosy, kdy v infikované čtvrti dochází k poklesu koncentrace laktosy a  $K^+$  a naopak nárůstu  $Cl^-$  a  $Na^+$ . Zatímco pro normální mléko se měrná vodivost pohybuje obvykle mezi 4 až 5  $mS.cm^{-1}$  při 25 °C, u mléka dojnic zasažených mastitidou jsou uváděny hodnoty s větší variabilitou, a to 5 až 9  $mS.cm^{-1}$  (Hamann a Zecconi, 1998). V naší práci vykázal soubor A rozmezí hodnot měrné vodivosti 4,39 až 6,66  $mS.cm^{-1}$ , soubor B 3,60 až 4,75 a soubor C 4,24 až 5,03  $mS.cm^{-1}$  (Tabulka 2). Tyto poměrně velké rozdíly tak mohou vysvětlovat odlišné vztahy LF a měrné vodivosti mezi jednotlivými soubory.

### Vztah $LF_{HPLC}$ a $LF_{FT-MIR}$ , porovnání vztahu LF a parametrů mléka vzhledem k metodě stanovení LF

Bez předchozí sekundární kalibrace metody FT-MIR poskytl vztah  $LF_{HPLC}$  a  $LF_{FT-MIR}$  v souborech vzorků mléka A a B korelační koeficient 0,5585 ( $P < 0,01$ ), resp. 0,3178 ( $P > 0,05$ ). Tudíž jen 31 %, resp. 10 % variací v hodnotách  $LF_{FT-MIR}$  lze vysvětlit variabilitou hodnot  $LF_{HPLC}$  (Graf 1a,1b). Průměrná diference činila 90,22  $mg.l^{-1}$ , resp. -57,84  $mg.l^{-1}$ . Směrodatná odchylka průměrné diference činila 89,45  $mg.l^{-1}$ , resp. 47,46  $mg.l^{-1}$ .

Z uvedeného vyplývá, že je třeba získat těsnější závislosti mezi výsledky  $LF_{HPLC}$  a  $LF_{FT-MIR}$ . Je nutné provést a následně ověřit sekundární kalibraci metody FT-MIR na metodu referenční. Kalibrační sada by měla obsahovat vzorky mléka pokrývající dostatečně široké rozmezí hodnot LF, které se reálně vyskytují v mléce. Jako vhodný se tak pro kalibrační sadu jeví rozsah hodnot LF alespoň 50 až 1000  $mg.l^{-1}$ .

Z Tabulky 3 je patrné, že vztah hodnot  $LF_{HPLC}$  k parametrům mléka ve smyslu změn spojovaných s mastitidami byl v rámci souborů A a B vždy těsnější než v případě  $LF_{FT-MIR}$ . Lze proto očekávat, že výsledky navázané na referenční metodu zvýší potenciál praktického

Tab. 3 Lineární regresní vztahy mezi LF a parametry mléka

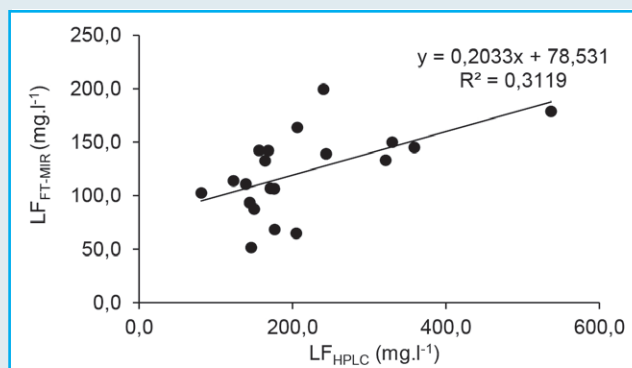
Soubor	Vztah	Rovnice	Koeficient determinace ( $R^2$ )	Koeficient korelace (r)
A	$LF_{HPLC} \times$ laktosa	$y = -0,0035x + 5,901$	0,7438	-0,8624 ***
	$LF_{HPLC} \times$ PSB	$y = 6,2713x - 956,12$	0,7108	0,8431 ***
	$LF_{HPLC} \times \log$ PSB	$y = 0,0061x + 0,5476$	0,5993	0,7741 ***
	$LF_{HPLC} \times$ měrná vodivost	$y = 0,044x + 3,9355$	0,7613	0,8725 ***
	$LF_{FT-MIR} \times$ laktosa	$y = -0,0062x + 5,9062$	0,3033	-0,5508 *
	$LF_{FT-MIR} \times$ PSB	$y = 9,767x - 815,39$	0,2285	0,4780 *
	$LF_{FT-MIR} \times \log$ PSB	$y = 0,0149x + 0,0376$	0,4677	0,6839 **
	$LF_{FT-MIR} \times$ měrná vodivost	$y = 0,007x + 4,017$	0,2550	0,5050 *
B	$LF_{HPLC} \times$ laktosa	$y = -0,0029x + 5,502$	0,2845	-0,5334*
	$LF_{HPLC} \times$ PSB	$y = 1,5476x - 67,375$	0,0205	0,1431 ns
	$LF_{HPLC} \times \log$ PSB	$y = 0,0015x + 1,5665$	0,0099	0,0993 ns
	$LF_{HPLC} \times$ měrná vodivost	$y = 0,0004x + 4,2941$	0,0018	-0,0424 ns
	$LF_{FT-MIR} \times$ laktosa	$y = 0,0001x + 5,0523$	0,0015	0,0388 ns
	$LF_{FT-MIR} \times$ PSB	$y = -0,7742x + 311,52$	0,0110	-0,1048 ns
	$LF_{FT-MIR} \times \log$ PSB	$y = -0,0023x + 2,2563$	0,0486	-0,2204 ns
	$LF_{FT-MIR} \times$ měrná vodivost	$y = -0,0042x + 5,0924$	0,4863	-0,6974 **
C	$LF_{FT-MIR} \times$ laktosa	$y = -0,0024x + 5,3732$	0,2615	-0,5114 ***
	$LF_{FT-MIR} \times$ PSB	$y = 3,8861x - 355,41$	0,0825	0,2872 **
	$LF_{FT-MIR} \times \log$ PSB	$y = 0,0026x + 1,8774$	0,0610	0,2470 **
	$LF_{FT-MIR} \times$ měrná vodivost	$y = 0,0007x + 4,5534$	0,0089	0,0542 ns

užití metody FT-MIR, neboť se zvýší jejich vypovídající hodnota ve vztahu ke zdraví mléčné žlázy.

### Závěr

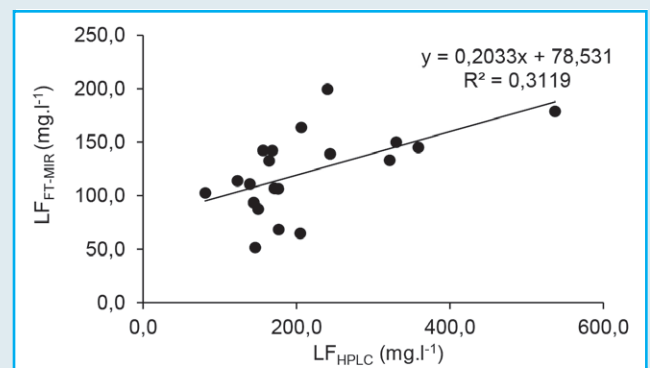
$LF$  vykazoval tendenci korelovat s vybranými parametry mléka ve smyslu změn, ke kterým dochází v důsledku zánětů mléčné žlázy. Tato tendence se mezi jednotlivými soubory do určité míry lišila, což bylo zřejmě dáno poměrně velkými rozdíly v rozmezích hodnot sledovaných parametrů mezi těmito soubory. Nejvýraznější korelaci bylo možné pozorovat ve vztahu LF a laktosy, kde tyto složky korelovaly ve všech třech souborech vzorků mléka. Vztah LF a PSB poskytl korelaci ve dvou souborech a vztah LF a měrné vodivosti pouze v jednom souboru. Výsledky naší práce tak potvrdily roli LF jako obranného mechanismu mléčné žlázy proti infekci

Graf 1a Lineární regresní vztah mezi výsledky referenční ( $LF_{HPLC}$ ) a nepřímé metody ( $LF_{FT-MIR}$ ) stanovení LF v mléce pro soubor A



n = 20; r = 0,5585 \*\*

Graf 1b Lineární regresní vztah mezi výsledky referenční ( $LF_{HPLC}$ ) a nepřímé metody ( $LF_{FT-MIR}$ ) stanovení LF v mléce pro soubor B



n = 15; r = 0,3178 ns

a poukazují tak na možnost jeho využití jako doplňkového testu detekce mastitid.

Výsledky porovnání referenční (IPRP HPLC) a nepřímé (FT-MIR) metody stanovení koncentrace LF v mléce ukázaly potřebu provést a následně ověřit sekundární kalibraci metody FT-MIR na metodu referenční. Výsledky s užším vztahem k referenční metodě budou velmi pravděpodobně disponovat vyšší vypovídající hodnotou vzhledem ke zdraví mléčné žlázy dojníc, čímž se zvýší potenciál praktické aplikace rutinní metody FT-MIR.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů MZe NAZV ZEMĚ QK21010326, MZe RO 1422 a GAJU 005/2022/Z.

### LITERATURA

- ALI A. K. A., SHOOK G. E. (1980): An optimum transformation for somatic cells concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63, s. 487–490.
- ANTANAITIS R., JUOZAITIEN E. V., JONIKE V., BAUMGARTNER W., PAULASKAS A. (2021): Milk Lactose as a Biomarker of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *Animals*, 11, (6), 1736. DOI: 1736. 10.3390/ani11061736
- ARNOLD R. R., RUSSELL J. E., CHAMPION W. J., BREWER M., GAUTHIER J. J. (1982): Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infection and Immunity*, 35, (3), s. 792–799. DOI: 10.1128/IAI.35.3.792-799.1982
- BOBBO T., RUEGG P. L., STOCCO G., FIORE E., GIANESELLA M., MORGANTE M., PASOTTO D., BITTANTE G., CECCHINATO A. (2017): Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, (6), s. 4868–4883. DOI: 10.3168/jds.2016-12353
- BULLEN J. J., ROGERS H. J., LEIGH L. (1972): Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *British Medical Journal*, 1, (5792), s. 69–75. DOI: 10.1136/bmj.1.5792.69
- CARLSSON A., BJÖRCK L., PERSSON K. (1989): Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science*, 72, (12), s. 3166–3175. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79475-3
- CHANETON L., TIRANTE L., MAITO J., CHAVES J., BUSSMANN L. E. (2008): Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91, (5), s. 1865–1873. DOI: 10.3168/JDS.2007-0732
- CHENG J. B., WANG J. Q., BU D. P., LIU G. L., ZHANG C. G., WEI H. Y., ZHOU L. Y., WANG J. Z. (2008): Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 91, (3), s. 970–976. DOI: 10.3168/jds.2007-0689
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2012): Scientific Opinion on bovine lactoferrin. *EFSA Journal*, 10, (5). DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2701. Staženo 10. 7. 2022. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2701>
- FDA (2016): GRAS Notice (GRN) No. 669, Cow's milk-derived lactoferrin. Staženo 10. 7. 2022. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/124472/download>
- FLORES-VILLASEÑOR H., CANIZALEZ-ROMÁN A., REYES-LOPEZ M., NAZMI K., DE LA GARZA M., ZAZUETA-BELTRÁN J., LEÓN-SICAÍROS N., BOLSCHER J. G. (2010): Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LF chimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 23, (3), s. 569–578. DOI: 10.1007/s10534-010-9306-4
- GIANSANTI F., PANELLA G., LEBOFFE L., ANTONINI G. (2016): Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 9, (4), 61. DOI: 10.3390/ph9040061
- HAGIWARA S., KAWAI K., ANRI A., NAGAHATA H. (2003): Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, (3), s. 319–323.
- HAMANN J., ZECCONI A. (1998): Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the International Dairy Federation* 334, Brussels, Belgium, s. 5–22.
- HARMON R. J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77, s. 2103–2112.
- HARMON R. J., SCHANBACHER F. L., FERGUSON L. C., SMITH K. L. (1975): Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 36, s. 1001–1007.
- KIM W. S., OHASHI M., TANAKA T., KUMURA H., KIM G. Y., KWON I. K., GOH J. S., SHIMAZAKI K. (2004): Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biomaterials*, 17, (3), s. 279–283. DOI: 10.1023/b:biom.0000027705.57430.f1
- KRÓL J., LITWIŃCZUK Z., BRODZIAK A., BARŁOWSKA J. (2010): Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13, (2), s. 357–361.
- LEFIER D., ARNOULD C., DUPLOYER M.-H., MARTIN B., DUPONT D., BEUVIER E. (2010): Effects of two different diets on lactoferrin concentrations in bovine milk. *Milchwissenschaft*, 65, (4), s. 356–359.
- MCGRATH B. A., FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., KELLY A. L. (2016): Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science and Technology*, 96, s. 133–158. DOI: 10.1007/s13594-015-0258-x
- RAUBERTAS J. K., SHOOK G. E. (1982): Relationship between lactation measures of SCC and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 65, s. 419–425.
- RENEAU J. K. (1986): Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, s. 1708–1720.
- RENEAU J. K., APPLEMAN R. D., STEUERNAGEL G. R., MUDGE J. W. (1983 a 1988): *Somatic cell count. An effective tool in controlling mastitis*. Agricultural Extension Service, University of Minnesota, AG-FO-0447.
- SHOOK G. E. (1982): *Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability*. National Mastitis Council, Louisville, Kentucky, s. 1–17.
- SØRENSEN M., SØRENSEN S. P. L. (1939): The proteins in whey. *Comptes-rendus des Trav. du Lab. Carlsberg*, 23, s. 55–99.
- SOYEURT H., BASTIN C., COLINET F. G., ARNOULD V. M.-R., BERRY D. P., WALL E., DEHARENG F., NGUYEN H. N., DARDENNE P., SCHEFFERS J., VANDENPLAS J., WEIGEL K., COFFEY M., THE' RON L., DETILLEUX J., REDING E., GENGLER N., MCPARLAND S. (2012): Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6, (11), s. 1830–1838. DOI: 10.1017/S1751731112000791
- SOYEURT H., GRELET C., MCPARLAND S., CALMELS M., COFFEY M., TEDDE A., DELHEZ P., DEHARENG F., GENGLER N. (2020): A comparison of 4 different machine learning algorithms to predict lactoferrin content in bovine milk from mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 103, (12), s. 11585–11596. DOI: 10.3168/jds.2020-18870.
- SUPERTI F. (2020): Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*, 12, (9), 2562. DOI: 10.3390/nu12092562
- TRAJKOVSKA B., KOCHOSKI L., DIMITROVSKA G., HAJRULAI Z., UZUNOV R., PETKOV V., DAVKOV F. (2021a): Changes in the lactoferrin concentration at drying of period. *Horizons-series B*, 9, s. 83–90.
- TRAJKOVSKA B., KOCHOSKI L., PETROVSKI K., DIMITROVSKA G., HAJRULAI Z., UZUNOV R., PETKOV V. (2021b): Impact of mammary gland infective status on the concentration of lactoferrin on cow's milk. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 36, s. 91–95.
- TSUJI S., HIRATA Y., MUKAI F., OHTAGAKI S. (1990): Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 73, (1), s. 125–128. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78654-7
- VALK-WEEBER R. L., ESHUIS-DE RUITER T., DIJKHUIZEN L., VAN LEEUWEN S. (2020). Dynamic Temporal Variations in Bovine Lactoferrin Glycan Structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, (2), s. 549–560. DOI:10.1021/acs.jafc.9b06762
- WAKABAYASHI H., BELLAMY W., TAKASE M., TOMITA M. (1992): Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferrin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*, 55, s. 238–240.
- WIGGANS G. R., SHOOK G. E. (1987): A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 70, s. 2666–2672.

WOJDAK-MAKSYMIEC K., KMIEC M., ZIEMAK J. (2006): Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinarni Medicina*, 51, (1), s. 14–20.

ZHAO C. H., HE G., WANG Y., ZHANG Z. (2008): Polymorphism analysis of the promoter of cow lactoferrin gene with PCR-RFLP and its correlation with subclinical mastitis. *Acta agriculturae Slovenica*, 92, (2), s. 185–187.

**Korespondujúci autor:** Mgr. Hana Nejeschlebová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,

Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

e-mail: hana.nejeschlebova@seznam.cz

*Přijato dne: 26. 9. 2022*

*Lektorováno: 20. 1. 2023*

## VPLYV POČTOV SOMATICKÝCH BUNIEK NA SPOL' AHLIVOSŤ STANOVENIA CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANIZMOV SUROVÉHO KOZIEHO MLIKA METÓDOU LASEROVEJ PRIETOKOVEJ CYTOMETRIE

**Martin Tomáška, Maroš Drončovský, Miroslav Kološta**

*Výskumný ústav mlékárenský, a.s. Žilina*

**Influence of the somatic cell counts  
on the reliability of the determination of total  
counts of microorganisms in raw goat's milk by  
the laser flow cytometry method**

### Abstrakt

Laserová prietoková cytometria sa bežne používa na meranie celkového počtu mikroorganizmov v surovom mlieku. Po zavedení tejto metódy na Slovensku pre surové kravské a ovčie mlieko, bude táto využitá aj pre surové kozie mlieko. Bolo preukázané, že vytvorenie prepočítavacieho vzťahu priamo meraných výsledkov na zariadení BactoScan FC do stupnice KTJ.ml<sup>-1</sup> je spoľahlivejšie, pokiaľ sú merania na tomto zariadení uskutočnené v takzvanom „vylepšenom“ móde. Takisto z výsledkov vyplýva, že väčšie rozdiely medzi meraniami v „normálnom“ a vo „vylepšenom“ móde sa vyskytujú u vzoriek s vyšším počtom somatických buniek (aj keď to neplatí vždy). Preto pri vzorkách s vysokými počtami somatických buniek je vhodné výsledky merania laserovou prietokovou cytometriou potvrdiť aj určenou kultivačnou metódou.

**Kľúčové slová:** surové kozie mlieko, celkový počet mikroorganizmov, somatické bunky, laserová prietoková cytometria

### Abstract

Laser flow cytometry is commonly used to measure the total number of microorganisms in raw milk. After the introduction of this method in Slovakia for raw cow's and sheep's milk, it will also be used for raw goat's milk. It has been proven that the creation of a conversion relationship of directly measured results on the BactoScan FC device to the CFUI.ml<sup>-1</sup> scale is more reliable if the measurements on this device are carried out in the so-called “enhanced” mode. The results also show that larger differences between measurements in “normal” and “enhanced” mode occur in samples with higher somatic cell counts (although this is not always the case). Therefore, in the case of samples with high numbers of somatic cells, it is advisable to confirm the results of laser flow cytometry measurements with the anchor cultivation method.

**Keywords:** raw goat's milk, total cell count, somatic cells, laser flow cytometry

### Úvod

Celkový počet mikroorganizmov (ďalej len CPM) je jedným z povinných ukazovateľov kvality a zdravotnej bezpečnosti surového kozieho mlieka, v zmysle európskeho potravinového práva (Nariadenie ES č. 853/2004). Geometrický priemer CPM za dva mesiace, pri odbere minimálne dvoch vzoriek za mesiac, nesmie presiahnuť hodnotu 500 000 KTJ.ml<sup>-1</sup>, ak sa mlieko ďalej spracováva bez tepelného ošetrenia a 1 500 000 KTJ.ml<sup>-1</sup>, ak sa mlieko následne tepelne ošetrí.

Určenou metódou na stanovenie CPM v mlieku je kultivačná metóda, podľa STN EN ISO 4833-1. Výhodou tejto metódy je, že výsledky sú vyjadrené priamo v KTJ.ml<sup>-1</sup> a je teda možné ich priamo použiť na výpočet príslušných geometrických priemerov. Na druhej strane, sú výsledky zisťované až po troch dňoch kultivácie a teda nie sú dostupné pre chovateľa/spracovateľa mlieka okamžite. Ten tým pádom nemôže robiť v prípade vysokých počtov KTJ nápravné opatrenia v hygiene okamžite.

Z tohto dôvodu sa do praxe zavádzajú rôzne alternatívne metódy, pri ktorých trvá získanie výsledku kratšie alebo sú menej prácne. V oblasti skúšania surového mlieka v centrálnych skúšobných laboratóriách bolo priekopníkom zariadenie MiniPetriFoss, od dánskej spoločnosti FOSS, ktoré umožňovalo automatizovať očkovanie veľkého počtu vzoriek mlieka na Periho misky. Výhodou danej metódy bolo výrazné zníženie používania pipiet na očkovanie, ako aj obídenie prípravy príslušných riedení na samotné očkovanie. Ostatné alternatívne metódy, ktoré sa v mikrobiológii všeobecne používali – meranie impedancie, zákalu a pod. sa pri skúšaní surového mlieka v praxi neujali. Prelom nastal až v zavedení metódy na princípe laserovej prietokovej cytometrie, keď sa objavili zariadenia typu BactoScan (FOSS), či Bactocount (Bentley). Metódu možno zjednodušene popísať tak, že