

Obsah laktoferinu v mléce jako potenciální nástroj k efektivnější kontrole zdraví mléčné žlázy dojnic a redukci spotřeby antibiotik v mlékařství

**Nejeschlebová H., Bartáková K., Vorlová L., Navrátilová P.,
Hanuš O., Rychlíková M., Klimešová, M., Kopecký J., Jedelská R.**

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha - Šumperk

Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

MVDr. Jiří Mašek s.r.o., Zdravé krávy, Měřín

Workshop: „Metody zaprahování v praxi a zdraví mléčné žlázy dojnic“

4. prosince 2024

Česká technologická platforma pro zemědělství,

Česká zemědělská univerzita Praha, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Projekty MZe NAZV Země QK 21010123 a QK 21010326.

Součást aktivit České akademie zemědělských věd OŽV

“Váš partner inovací a výzkumu v potravinářství”

Laktoferin (LF)

- izolován 1939 z kravského mléka
- transportní glykoprotein vázající železo
- antibakteriální účinek
- v 60. letech rozvoj technik pro izolaci
- výskyt: mukózní sekrety (**mléko**, sliny, slzy, sekret nosní dutiny, žluč), plazma
- výskyt zjištěn v mléce lidském, kozím, ovčím, bývolím, velbloudím, kobyším, oslím, myším, prasečím
- absence v mléce krysím, psím, králičím, tulením

Význam LF

- antibakteriální funkce - ochrana proti infekci mléčné žlázy
- účinky bovinního LF: antianemické, protizánětlivé, antimikrobiální, imunomodulační, antioxidační, antikarcinogenní
- podpora růstu probiotických bakterií (*Bifidobacterium* a *Lactobacillus*)
- bovinní LF je schválen jako bezpečná složka potravin Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA 2012) i Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA 2016)
- využití: kosmetika, umělá mléčná kojenecká výživa, doplňky stravy

Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- Druh savce
 - ↑ nejvyšší v humánním mléce (v mléce přežvýkavců asi 10x nižší obsah)

Obsah syrovátkových bílkovin v kravském, kobyším a ovčím mléce

	kravské	kobyší	ovčí
Whey protein (% protein)	16–20	36–44 ^G	14–21 ^G
α-lactalbumin (% whey protein)	15–24 ^G	36–38 ^G	13–24 ^G
β-lactoglobulin (% whey protein)	64–88 ^G	29–30 ^G	64–87 ^G
Immunoglobulins (% whey protein)	8.0–16 ^G	15–17 ^G	4.5–6.6
Lactoferrin (% whey protein)	2.3–2.7 ^G	7.0–9.2 ^G	6.4–8.2

upraveno dle Blanco-Doval et al. (2024)

Obsah laktoperoxidázy, lysozymu a LF v lidském, oslím a kravském mléce

Milk	Lactoperoxidase (mg/L)	Lysozyme (g/L)	Lactoferrin (g/L)
Human	0.77	0.12	0.3–4.2
Donkey	0.11	1.0	0.080
Bovine	30–100	Trace	0.10

upraveno dle Polidori a Vincenzetti (2013)

Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- **Stadium laktace**

- Kravské mléko

- ↑ kolostrum: 1 500-5 000 mg/l, až 10 000 mg/l
- ↓ v průběhu 72 hodin od počátku produkce kolostra pokles
- zralé mléko: 32-486 mg/l
- ↑ starodojné mléko

Obsah LF v lidském a kravském mléce a lidském a kravském mlezivu

		LF (mg/l)
Člověk	Kolostrum	4 600 (600-16 000)
	Mléko (0,5-6 měsíců)	1 500 (300-4 200)
	Mléko (nad 6 měsíců)	700 (100-3 500)
Skot	Kolostrum	1 500 (200-5 200)
	Mléko	100 (70-120)

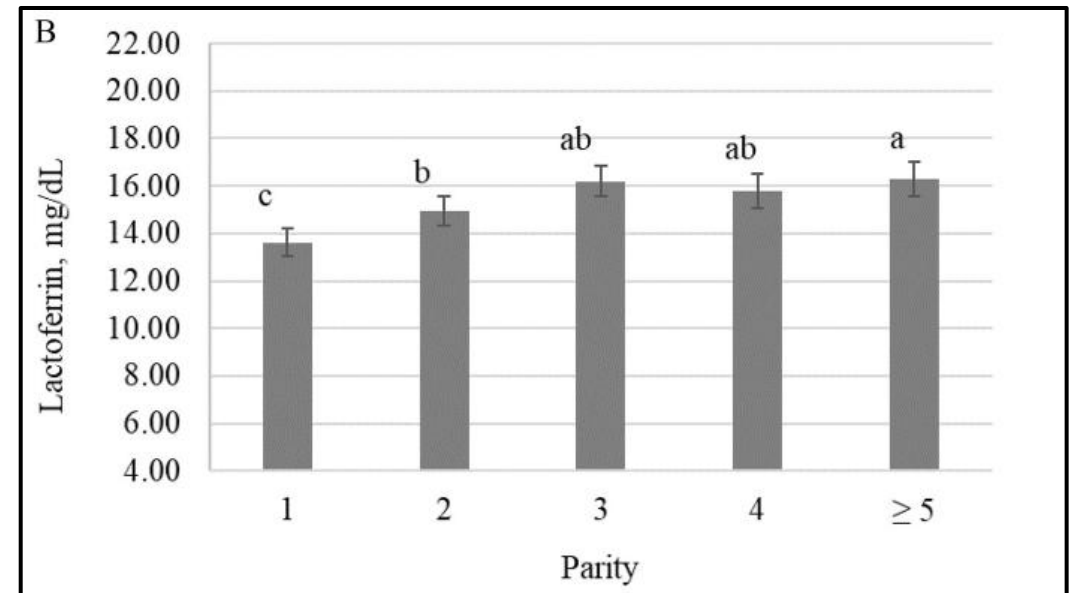
Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- Pořadí laktace

Vliv pořadí laktace na obsah LF v mléce

Normal milk	Number of samples (n = 122)	Milk LF concentration (log)	Significance (P)
Parity			
1	63	2.015 ± 0.214	=0.537
2	19	1.939 ± 0.236	
3	21	2.042 ± 0.231	
4	8	2.057 ± 0.128	
≥5	11	2.077 ± 0.297	

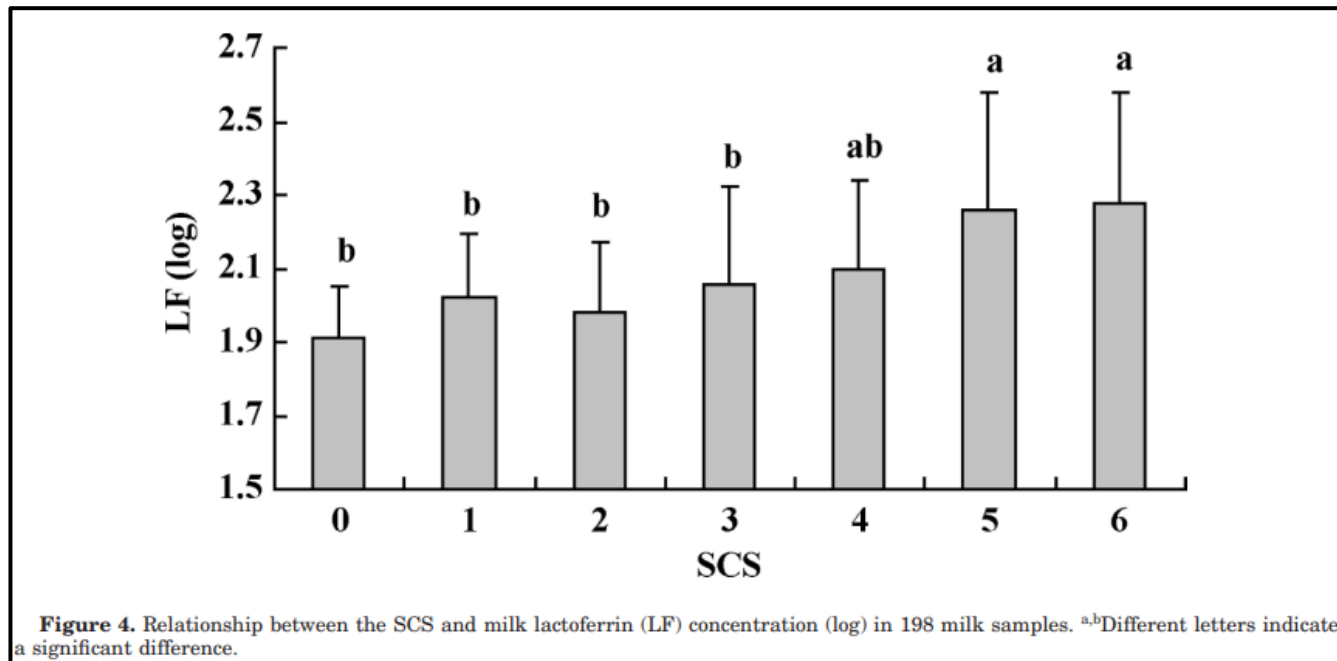
upraveno dle Cheng et al. 2008



upraveno dle Niero et al. 2023

Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- Zdravotní stav
 - ↑mastitida (klinická i subklinická)



0 ≤ SCC	0 <	18,000
18,000 ≤ SCC	1 <	36,000
36,000 ≤ SCC	2 <	71,000
71,000 ≤ SCC	3 <	142,000
142,000 ≤ SCC	4 <	283,000
283,000 ≤ SCC	5 <	566,000
566,000 ≤ SCC	6 <	1,132,000
1,132,000 ≤ SCC	7 <	2,263,000
2,263,000 ≤ SCC	8 <	4,536,000
4,536,000 ≤ SCC	9	

Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- **Zdravotní stav**
 - ↑mastitida (klinická i subklinická)

Table 2. Lactoferrin (Lf) concentrations in quarter milk from cows with subclinical mastitis

Subclinical mastitis		Number of samples	Milk Lf concentration in logarithmic form mean ± standard deviation
Total		270	2.70 ± 0.39
Bacteria species	SA	84	2.83 ± 0.27 ^{a)}
	SAG	8	2.90 ± 0.22 ^{ab)}
	OS	61	2.78 ± 0.39 ^{a)}
	CNS	92	2.58 ± 0.38 ^{bc)}
	CB	25	2.37 ± 0.56 ^{c)}

Somatic cell count score	SCC 0	8	2.43 ± 0.53 ^{ab)}
	SCC 1	11	2.53 ± 0.37 ^{ab)}
	SCC 2	29	2.41 ± 0.53 ^{a)}
	SCC 3	33	2.62 ± 0.29 ^{ab)}
	SCC 4	26	2.73 ± 0.35 ^{ab)}
	SCC 5	10	2.90 ± 0.18 ^{b)}
	SCC 6	6	2.51 ± 0.76 ^{ab)}
	SCC 7	3	3.13 ± 0.22 ^{ab)}

0 ≤ SCC 0 < 18,000
 18,000 ≤ SCC 1 < 36,000
 36,000 ≤ SCC 2 < 71,000
 71,000 ≤ SCC 3 < 142,000
 142,000 ≤ SCC 4 < 283,000
 283,000 ≤ SCC 5 < 566,000
 566,000 ≤ SCC 6 < 1,132,000
 1,132,000 ≤ SCC 7 < 2,263,000
 2,263,000 ≤ SCC 8 < 4,536,000
 4,536,000 ≤ SCC 9

Faktory ovlivňující obsah LF v mléce

- **Plemeno**

Table 1. Effect of breed on antimicrobial protein content in bovine milk.

Specification	Breed				
		Polish Holstein-Friesian Black-White n = 154	Polish Holstein-Friesian Red-White n = 108	Simental n = 85	Jersey n = 76
Lactoferrin (mg/l)	\bar{x}	88.42 ^A	89.56 ^A	116.74 ^B	103.48 ^{AB}
	SD	14.72	15.26	16.54	15.68
Lysozyme (μ g/l)	\bar{x}	8.22 ^A	8.11 ^A	9.84 ^{AB}	13.02 ^B
	SD	0.99	1.69	1.88	2.21
Immunoglobulins G (mg/l)	\bar{x}	423.6 ^A	459.7 ^{AB}	579.9 ^C	508.6 ^{BC}
	SD	18.4	20.2	16.5	29.1

A, B, C – differences significant at $P \leq 0.01$

upraveno dle Król et al. 2010

- **Výživa**

- rozporuplné údaje (vliv pastvy na obsah laktoferinu?)

- **Genetika**

- heritabilita 0,22 (Arnould et al. 2009)

Metody stanovení LF

**Radiální
imunodifúze**

ELISA

**Vysoceúčinná
kapalinová
chromatografie
(HPLC)**

**Infračervená
spektroskopie
ve střední
oblasti s
Fourierovou
transformací
(MIR-FT)**

Studie: stanovení LF metodou MIR-FT a potenciál k predikci mastitid

Soubor A

- 120 individuálních vzorků mléka ze 4 různých chovů
- eliminace sezónních vlivů
- plemeno: Holštýn a České strakaté v poměru 1:1
- PSB: 1/3 vzorků od krav s PSB do 300 tis./ml, 2/3 od krav s PSB nad 300 tis./ml

Soubor B

- 91 individuálních vzorků mléka z 1 chovu
- eliminace sezónních vlivů
- plemeno: Holštýn
- PSB: náhodný výběr

Analýzy:

- obsah LF metodou HPLC (referenční metoda) a MIR-FT (nepřímá metoda), stanovení vybraných mléčných ukazatelů

Statistika:

- korelační a regresní analýza:
 - LF referenční metodou vs. LF nepřímou metodou, LF vs. mléčné ukazatele

Vztah LF k mléčným ukazatelům, soubor A (n = 120)

Mléčný ukazatel	LF HPLC	LF MIR-FT
	Pearsonův korelační koeficient	
Tuk	0.233*	0.595***
Hrubé bílkoviny	0.414***	0.808***
Kasein	0.439***	0.812***
Laktosa (monohydrát)	-0.451***	-0.265**
Celková sušina	0.215*	0.677***
Močovina	-0.316**	-0.112
Volné mastné kyseliny	0.480***	0.816***
Kyselina citronová	-0.262**	-0.383**
PSB	0.529***	0.290**
Log PSB	0.578***	0.326**
Měrná vodivost	0.326**	-0.078
Bod mrznutí	-0.152	-0.366**

Mastitida:

↑ LF

↓ Laktosa

↓ Močovina

↑ Volné mastné kyseliny

↓ Kyselina citronová

↑ PSB

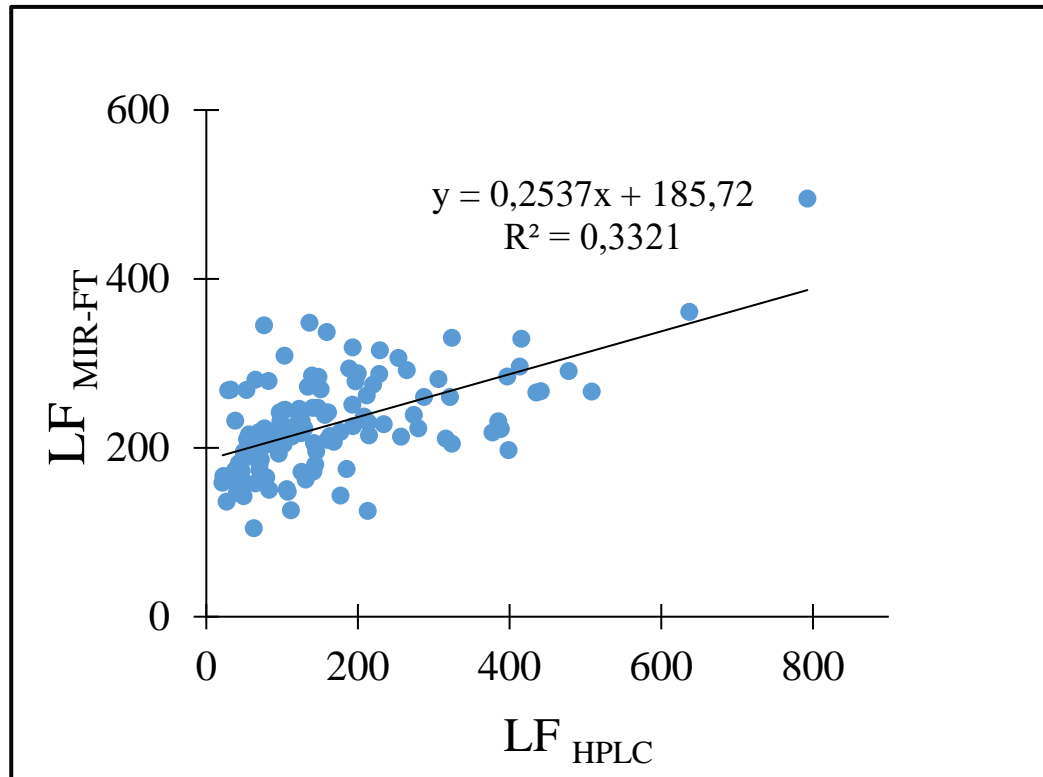
↑ Měrná vodivost

↓ Bod mrznutí

PSB = počet somatických buněk; LF HPLC = LF referenční metodou;
 LF MIR-FT = LF nepřímou metodou; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

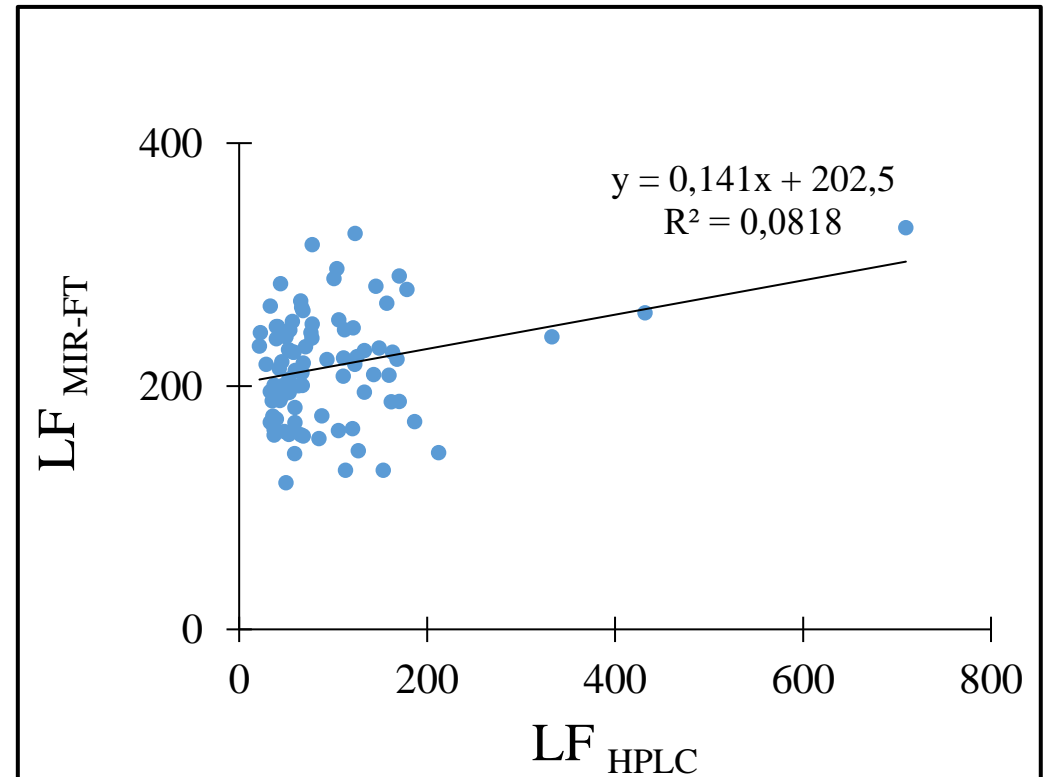
LF (mg/l) referenční vs. nepřímou metodou

Soubor A (n = 120)



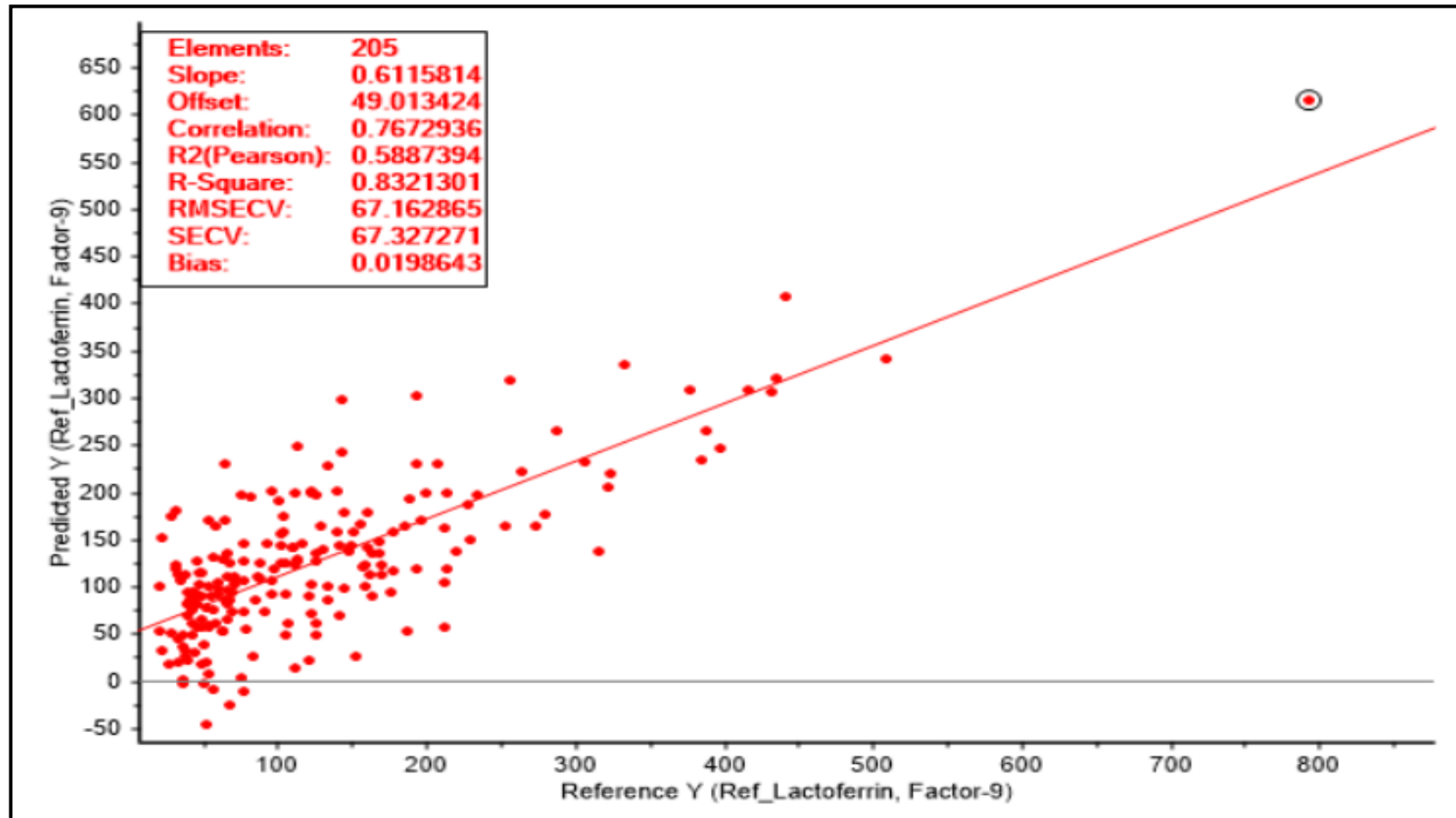
Korelační koeficient $r = 0,576^{***}$

Soubor B (n = 91)



Korelační koeficient $r = 0,286^{**}$

LF (mg/l) referenční vs. nepřímou metodou, n = 205 (nový kalibrační model)



Craig Parsons, Bentley Instruments Inc. (2024)

Korelační koeficient $r = 0,767$

LF jako ukazatel zdraví mléčné žlázy

- Existence rychlé metody stanovení LF + vztah LF ke zdraví mléčné žlázy

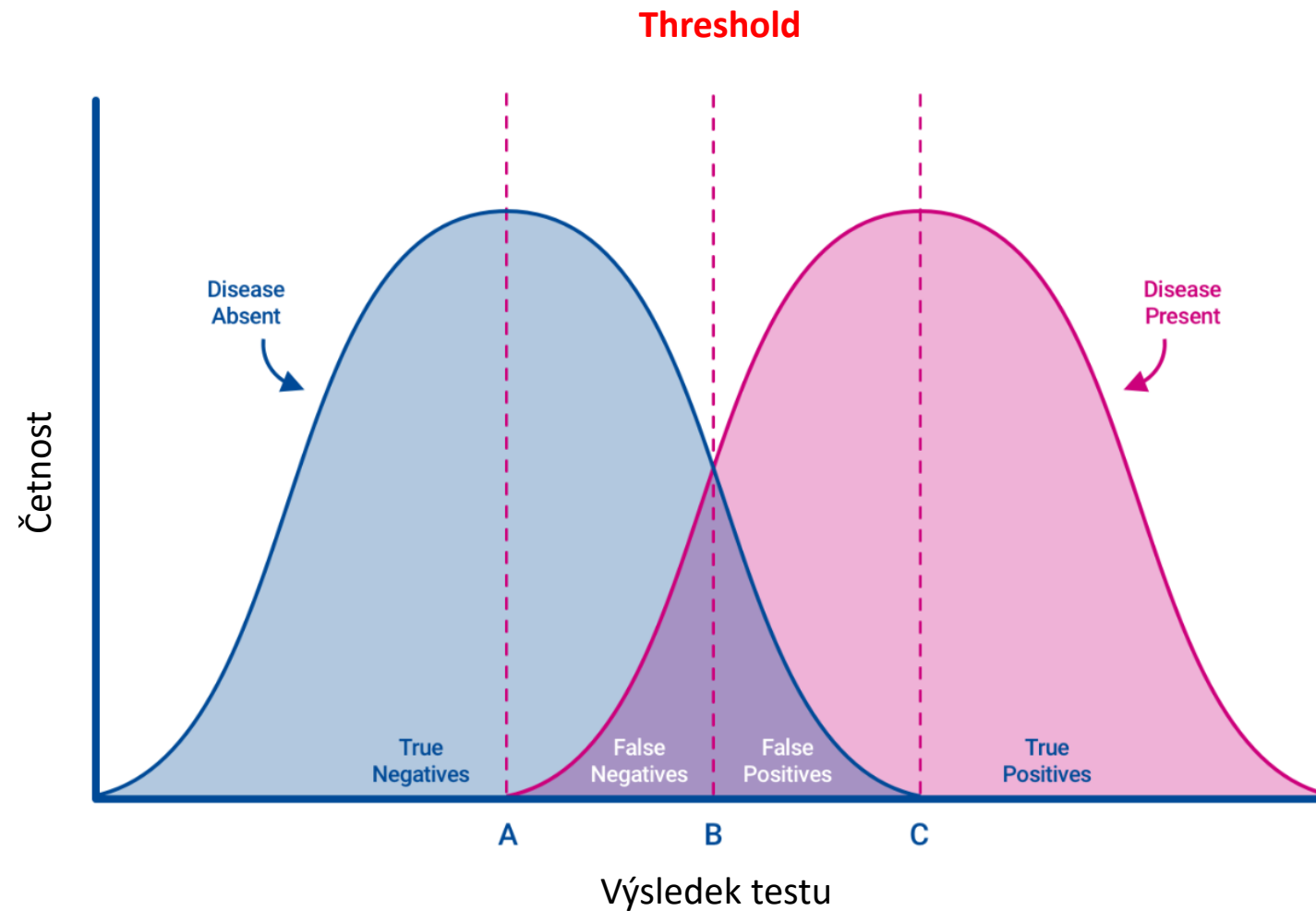
=> možnost využití informace o obsahu LF ke kontrole zdraví mléčné žlázy => potřeba ustanovit diskriminační limit LF pro zdravou mléčnou žlázu

Literatura uvádí různé hodnoty LF pro zdravou mléčnou žlázu:

Publikace	Země	Plemeno	Počet	LF (mg/l)	Metoda stanovení LF	Diagnostika mastitidy
Hagiwara et al. 2003	Japonsko	Holštýn	111	169,8	radiální imunodifúze	mikrobiologické vyšetření
Cheng et al. 2008	Čína	Holštýn	122	115,4	sandwich ELISA	PSB (limit 141 tis./ml)
Chaneton et al. 2008	Argentina	-	139	121	kompetitivní ELISA	mikrobiologické vyšetření
Niero et al. 2023	Itálie	Holštýn, Simentál	1746 (celkem)	129,5	radiální imunodifúze	PSB (limit 200 tis./ml)

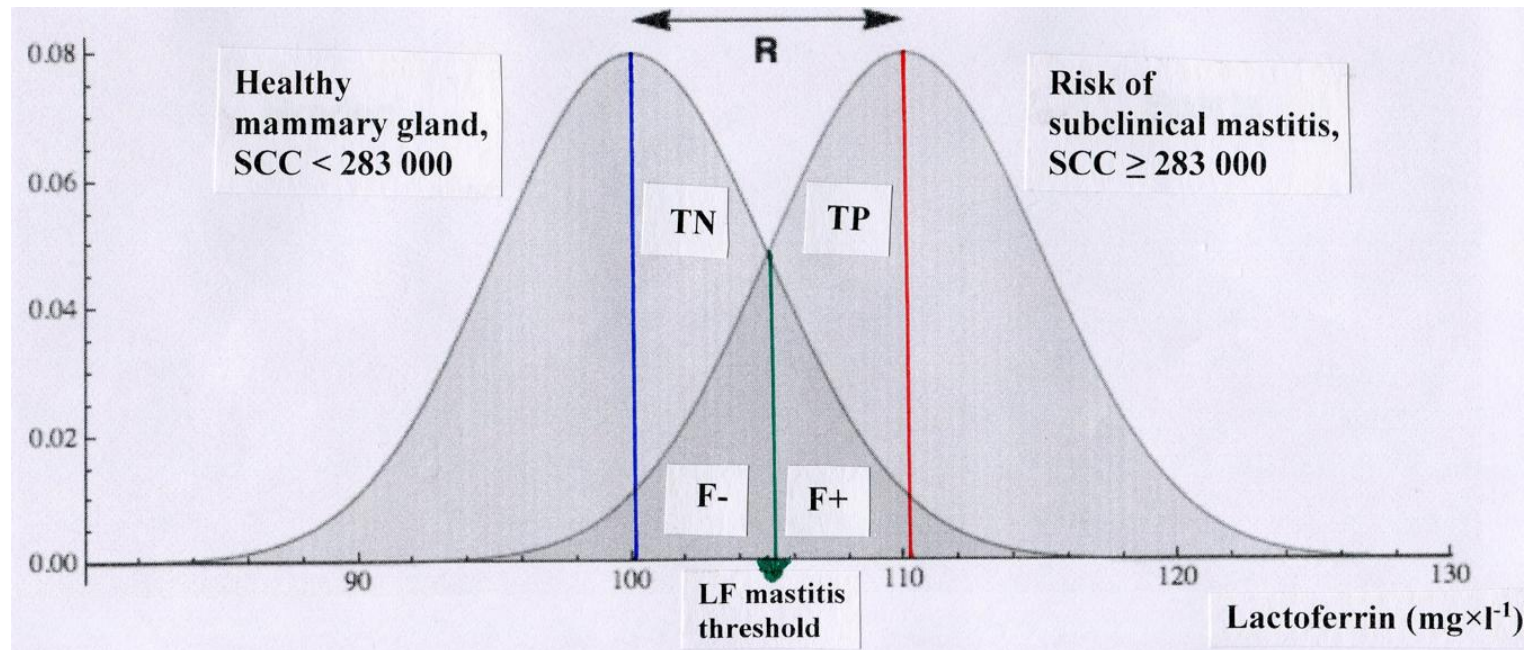
Odvození LF thresholdu pro zdravou mléčnou žlázu

Obecně:



Odvození LF thresholdu pro zdravou mléčnou žlázu

- Vlastní data, soubory A (n = 120) a B (n = 91), **celkem 211 vzorků**
- Rozdělení dat na základě obecně uznávaného thresholdu pro **PSB < 5** (PSB < 283 tis./ml) v systému kontroly užitkovosti
 - **PSB skóre < 5**, tj. PSB < 283 tis./ml = **normální mléko** – získáno 151 vzorků
 - **PSB skóre ≥ 5**, tj. PSB ≥ 283 tis./ml = podezření na **abnormální mléko** – získáno 60 vzorků



threshold LF: 123,7 mg/l

Využití LF k včasné predikci subklinické mastitidy v systému kontroly užítkovosti

- **Co máme v plánu?**

- Vyhodnocení korelací: LF a PSB v aktuálním měsíci
- Vyhodnocení korelací: LF a PSB v aktuálním měsíci, po 1 měsíci, po 2 měsících
- Výběr případů v aktuálním měsíci = LF vyšší (překročen threshold) a PSB nižší (pod thresholdem), porovnání průměrů PSB mezi aktuálním měsícem a dalším měsícem párovým *t*-testem
- Statistické parametry pro hodnocení diagnostického testu:

- **Specificita** = podíl zdravých jedinců, které test určí jako negativní

$$\frac{\text{počet správně negativních}}{\text{počet správně negativních a falešně pozitivních}}$$

- **Sensitivita** = podíl nemocných jedinců, které test určí jako pozitivní

$$\frac{\text{počet skutečně pozitivních}}{\text{počet skutečně pozitivních a falešně negativních}}$$



 **Děkujeme za
pozornost**



www.vumlekarensky.cz

hana.nejeschlebova@seznam.cz

Literatura

- Arnould VM, Soyeurt H, Gengler N, Colinet FG, Georges MV, Bertozzi C, Portetelle D, Renaville R. Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk. *J Dairy Sci.* 2009 May;92(5):2151-8.
- Blanco-Doval A, Barron LJR, Aldai N. Nutritional Quality and Socio-Ecological Benefits of Mare Milk Produced under Grazing Management. *Foods.* 2024 May 4;13(9):1412.
- Chaneton L, Tirante L, Maito J, Chaves J, Bussmann LE. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 2008 May;91(5):1865-73.
- Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wang JZ. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J Dairy Sci.* 2008 Mar;91(3):970-6.
- Hagiwara S, Kawai K, Anri A, Nagahata H. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J Vet Med Sci.* 2003 Mar;65(3):319-23.
- Krol J, Litwińczuk Z, Brodziak A, Barłowska J. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol J of Vet Sci.* 2010;13(2):357-361.
- Navrátilová a kol. *Hygiena produkce mléka.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-625-4
- Niero G, Thomas S A, Mouratidou K, Visentin G, De Marchi M, Penasa M, Cassandro M. Lactoferrin concentration in bovine milk: validation of radial immunodiffusion technique, sources of variation, and association to udder health status. *Ital J Anim Sci.* 2023; 22(1):230–238.
- Polidori P, Vincenzetti S. Use of Donkey Milk in Children with Cow's Milk Protein Allergy. *Foods.* 2013 May 6;2(2):151-159.