

Aus der ¹Veterinärstation, Zaprešić,
 der ²Abteilung für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs,
 Veterinärmedizinische Fakultät der Universität von Zagreb und
³Zo-invest, Zagreb, Kroatien

Beurteilung der Milchqualität aufgrund mikrobiologischer und zytometrischer Untersuchungen sowie der Bestimmung von Akute-Phase-Proteinen

von Vinko Medvid¹, Nevijo Zdolec², Vesna Dobranić², Željka Cvrtila Fleck², Tihana Fumić³ und Bela Njari²

(3 Tabellen, 23 Literaturangaben)

Kurztitel: Beurteilung der Milchqualität

Stichworte: Kuh – Milchqualität – Haptoglobin – Mikrobiologie – Zytometrie

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Beurteilung der Milchqualität basierend auf mikrobiologischen und zytometrischen Analysen sowie der Bestimmung von Haptoglobin in der Milch von klinisch gesunden Kühen (n=73). Mikrobiologische Untersuchungen der Rohmilch wurden entsprechend der genormten ISO-Methoden durchgeführt. Die Gesamtzahl der somatischen Zellen wurde mit einer fluoreszenzoptischen Methode erfasst. Der Anteil der einzelnen Subpopulationen an der gesamten Leukozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometer und der Hapto-

globingehalt mittels ELISA bestimmt. Dabei waren 71,2 % der Milchproben *Staphylococcus aureus*-positiv und 17,8 % *Escherichia coli*-positiv. Die Zahl der somatischen Zellen in der Milch lag bei 16.000 bis 932.000 Zellen/ml und die Menge des Haptoglobins bei 0,007 bis 1,8 µg/ml. Eine positive Korrelation ($r=0,62$) konnte zwischen der Zahl der somatischen Zellen und des Haptoglobinspiegels in der Probenesamtheit (n=73) ermittelt werden. Keine Korrelation ergab sich bei den untersuchten Proben einzelner Tiergruppen mit unterschiedlichen Zahlen somatischer Zellen.

erregern mit ein. Da alle genannten Methoden Defizite aufweisen, besteht der Bedarf nach neuen, schnellen und zuverlässigen Tests.

Bedeutende Fortschritte bei der Identifikation von Nukleinsäuremarkern und anderen neuen Biomarkern sowie die Entwicklung von Geräten mit Messsensoren eröffneten neue Möglichkeiten für die Mastitiserkennung. Viele neue Strategien bzw. ihre Vorteile gegenüber den konventionellen Tests sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Viguer et al., 2009).

Die Diagnose von subklinischer Mastitis erfordert eine Laboranalyse, was meistens die Bestimmung des somatischen Zellgehalts (somatic cell count, SCC) in der Milch einzelner Viertel oder kompositer Kuhmilch einschließt. Der SCC ist dabei ein wichtiger Parameter innerhalb von Qualitätsprogrammen der Milcherzeuger und beeinflusst den Milchauszahlungspreis. In vielen Ländern wird die Analyse des SCC routinemäßig durchgeführt. Hierzu wird die fluoreszenzoptischen Methode genutzt.

Abstract

Assessment of milk quality through microbiological and cytometric examination and determination of acute-phase proteins

Key words: cow – milk quality – haptoglobin – microbiology – cytometry

The aim of present study was to assess the milk quality based on microbiological and cytometric analyses and determination of haptoglobin in milk of clinically healthy cows (n=73). Microbiological analyses of raw milk were performed according to standard ISO methods, somatic cell count using a fluorescence-optic method, the rate of subpopulations in the total leucocyte population by flow cytometry, and the amount of haptoglobin by ELISA. Total of 71.2 % and 17.8 % of milk samples were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* positive, respectively. Somatic cell count ranged from 16000

to 932000, and quantity of haptoglobin from 0.007 to 1.8 µg/ml. There was a positive correlation between somatic cell count and haptoglobin levels ($r=0.62$) in whole population (n=73), but not in individual groups with lower or higher somatic cell counts.

1 Einleitung

Zur Beurteilung der Milchqualität sollten möglichst frühzeitig alle relevanten Informationen über die Eutergesundheit der Tiere bekannt sein. Mastitis, insbesondere subklinische Mastitis, beeinflusst bedeutend die Milchqualität (Radostits et al., 2000; Benić, 2001; Santos et al., 2003). Konventionelle Methoden zur Mastitisiagnose schließen die Bestimmung der somatischen Zellzahlen, das Messen von Biomarkern zu Infektionsbeginn und die Identifikation von mikrobiellen Mastitis-

1.1 Akut-Phase-Proteine

Trotz der breiten Verwendung des SCC als Parameter für die Milchqualität wird vielfach nach alternativen Biomarkern für Mastitis und die Bestimmung der Milchqualität gesucht, was den Nachweis von Akute-Phase-Proteinen (APP), Haptoglobin (Hp) und Serum Amiloid A (SAA) mit einschließt. Obwohl der SCC mit Veränderungen im biochemischen System der Milchproduktion eng verbunden ist, ist es auf

der Ebene der Viertel ein weniger empfindlicher oder spezifischer Indikator der Milchqualität (Åkerstedt *et al.*, 2007).

Im Falle einer Verletzung, eines Traumas oder einer Infektion von Gewebe startet eine Reihe von hochkomplexen Reaktionen, um eine weiteren Schädigungen des Gewebes zu verhindern, infektiöse Mikroorganismen zu isolieren und abzutöten sowie um Prozesses zur Erneuerung des beschädigten Gewebes und zur Wiederherstellung normaler Organfunktionen zu aktivieren.

Dieser Prozess zur Aufrechterhaltung der Homöostase wird als Entzündung, und die dabei induzierten Reaktionen werden als Akute-Phase-Reaktion (APR) bezeichnet. Während der Akute-Phase-Reaktion erhöht sich im Bereich der verletzten bzw. entzündeten Stelle die Durchlässigkeit der Blutgefäße. Zugleich erhöht sich die Gewebeeinfiltration mit Phagozyten und humoralen Faktoren, welche die Synthese der Akute-Phase-Proteine (APP) stimulieren.

Das Ziel der Akute-Phase-Reaktion ist die Beseitigung der Entzündungsursachen und die Wiederherstellung der Homöostase, was Reaktionen des Nervensystems, der Leber, Fieber, katabole Reaktionen, einen beschleunigten Metabolismus und verschiedene sekundäre Veränderungen einzelner Funktionssysteme einschließt. Die größte Bedeutung bei der Anregung der Akute-Phase-Reaktion kommt den Zytokinen Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α zu (Bauman *u. Gaultie*, 1994; Kovač *u. Gamulin*, 2002; Gračner, 2005). Die bedeutendsten APP in der Veterinärmedizin sind Haptoglobin und Serum Amiloid A.

Erhöhte Haptoglobinkonzentrationen werden als unspezifische Entzündungsmarker erfasst, ihre Anwesenheit in Milch kann Hinweise auf einen Entzündungsprozess im Euter liefern. Aktuelle Forschungen haben gezeigt, dass neben hepatisch erzeugtem Haptoglobin auch eine extrahepatische Produktion in verschiedenen Geweben, einschließlich der Euterepithelzellen, existiert (Eckersall *et al.*, 2005; Grönlund *et al.*, 2003; Grönlund *et al.*, 2005). Viele Studien konnten die Haptoglobinkonzentration als nützlichen klinischen Parameter für den Nachweis und die Bestimmung des Ausmaßes von Entzündungsreaktionen bei Rindern

mit Mastitis, Pneumonie, Enteritis, Abszess und anderen Entzündungszuständen zeigen (Eckersall *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2004; Skinner, 2001).

In dieser Studie wurden die Milchproben mikrobiologisch untersucht und der somatische Zellgehalt gemessen sowie die Subpopulationen innerhalb der gesamten Leukozytenpopulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Außerdem sollten durch die Bestimmung des Haptoglobingehalts in der Milch Hinweise über die Eutergesundheit der Kühe ermittelt werden.

2 Material und Methoden

Untersucht wurden die Milchproben von 73 klinisch gesunden Milchrindern von 15 privaten Bauernhöfen, die Quark und Rahm im breiteren Zagreber Raum vermarkten. Die einzelnen Milchproben setzten sich aus der Milch aller vier Euterviertel einer Kuh zusammen und wurden nach dem Melken in sterile Flaschen entnommen. Alle Proben wurden bis zur Ankunft im Labor bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt und noch am Tag der Probennahme untersucht.

Die einzelnen Milchproben wurden mikrobiologisch mittels ISO-Standardmethoden auf aerobe mesophile Bakterien (HRN ISO 4833:2003), *Escherichia (E.) coli* (HRN ISO 11866-1:2001), *Staphylococcus (S.) aureus* (HRN EN ISO 6888-1:2004), *Salmonella* spp. (HRN EN ISO 6579:2002), *Listeria monocytogenes* (HRN EN ISO 11290-2:1998) und Hefe- und Schimmelpilze (HRN ISO 6611:2001) untersucht.

Die Zahl der somatischen Zellen wurde mittels eines fluoreszenzoptischen Verfahrens (Fossomatic A-5000, FOSS Electric, Hillerød, Dänemark) bestimmt. Die Leukozytenzahl in der Milch wurde mittels Durchflusszytometer (Beckman Coulter EPICS-XL, Beckman Coulter, USA) ermittelt.

Die Milchproben wurden in gepufferter Phosphatlösung (PBS) bis zu einer Leukozytenzahl von 5,0 bis 9,7 x 10⁹/l verdünnt. Abschließend wurden 50 μ L monoklonale, mit Fluoreszenz-Farbstoff markierte Antikörper gegen bovine CD-Antigene (CD4, CD8 und CD45; Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) in 0,1 ml der verdünnten Probe für 20 min bei Zimmertemperatur zugefügt. Nach der Inkuba-

tion wurden die Proben mit 1 ml PBS gespült, und 5 min bei 2.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgegossen, und dem Sediment wurde 0,5 ml lysierendes Reagens (Ammoniumchlorid, NH₄Cl, pH 7,3) zugefügt. Die Mischung ruhte daraufhin 10 min bei Dunkelheit und Zimmertemperatur. Danach wurden die Proben erneut mit 1 ml PBS gespült und 5 min bei 2.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstands, wurden dem Sediment 1 ml PBS hinzugefügt.

Die so vorbereitete Probe wurde mittels Durchflusszytometer analysiert. Von sämtliche Proben wurden Triplikate vorbereitet, und pro Triplikat wurden je 10.000 Zellen analysiert.

Der Haptoglobingehalt wurde mit dem ELISA Test-Kit Bio K 271 (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Belgien) bestimmt; die Mikrotiterplatte war beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen bovinen Haptoglobulin. Dieser Antikörper sichert den spezifischen Nachweis von Proteinen in den zu untersuchenden Proben (Blutplasma, -serum oder Milch). Die zuvor verdünnten Milchproben wurden 60 min bei 21 \pm 3 °C auf der Mikrotiterplatte inkubiert. Die Eichgerade wurde durch Verdünnen der Standardlösung (lyophilisiertes Rinderserum) bestimmt.

Nach der ersten Inkubation wurde die Platte gespült, und weitere 60 min mit dem Konjugat, einem spezifischen anti-Rind Haptoglobulin-Antikörper, inkubiert. Nach dieser zweiten Inkubation wurde die Platte gespült und das Chromogen (Tetramethylbenzidin) hinzugefügt.

Der Vorteil dieses Chromogens ist eine größere Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen Peroxidase-Chromogenen und es ist nicht kanzerogen.

Die Enzymreaktion wurde schließlich durch Azidifizierung gestoppt, und die optische Dichte wurde mit dem Spektrofotometer bei 450 nm abgelesen. Die abgelesenen Werte für die optische Dichte der geprüften Proben wurden über die Kalibrationskurve in Haptoglobinkonzentrationen (ng/ml Milchprobe) umgerechnet.

Die erzielten Resultate wurden mit Hilfe des Computerprogramms Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., USA) bearbeitet. Der Pearson-Test wurde zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten zwischen Parametern verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

In die Studie wurden insgesamt 73 Milchrinder von 15 privaten Bauernhöfen einbezogen. Für eine bessere Auswertung wurden die Milchproben entsprechend der Zahl der somatischen Zellen in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: ≤ 100.000 Zellen/ml, Gruppe 2: >100.000 bis 400.000 Zellen/ml und Gruppe 3: >400.000 Zellen/ml (Tab. 1 bis 3).

In Gruppe 1 fielen so insgesamt 32 Milchproben. Die niedrigste Zellzahl betrug hier 16.000, die höchste 100.000/ml, wobei im Durchschnitt 62.687,50 somatische Zellen/ml bestimmt wurden. Die durchschnittliche Haptoglobinnmenge war vergleichsweise niedrig und betrug 0,232 μg Haptoglobin/ml. In die Gruppe 2 fielen insgesamt 27 Proben, die durchschnittliche Haptoglobinnmenge lag hier bei 0,516 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In die Gruppe 3 fielen 14 Muster mit durchschnittlichen 562.500 somatischen Zellen/ml. Haptoglobinnmenge betrug in Gruppe 3 durchschnittlich 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.1 Mikrobiologische und zytometrische Ergebnisse

Koagulase-negative Staphylokokken wurden am häufigsten und zumeist bei erstgebärenden Kühen aus der Kuhmilch isoliert. Da Staphylokokken nicht obligat pathogen sind, bleiben die Infektionen zumeist subklinisch. Allerdings können persistierende Infektionen zu einer Erhöhung der Zellzahl und einer Minderung der Milchqualität führen.

In zahlreichen internationalen Studien erwies sich *S. aureus* als der häufigste Erreger der Rindermastitis. 50 bis 100 % der Rinder, in deren Milch eine erhöhte Zellzahl festgestellt wurde, waren mit diesem Erreger infiziert. Bei den eigenen Untersuchungen erwiesen sich nur 28,8 % aller Proben frei von *S. aureus*. Verglichen mit der Studie von Topolko und Beni \acute{c} (1997), in der *S. aureus* nur bei 10,8 % der untersuchten Tieren festgestellt wurde, lagen die vorliegenden Ergebnisse damit bedeutend höher. Beni \acute{c} (2004) ermittelte dagegen eine Infektion mit *S. aureus* bei 33,4 % der untersuchten Tiere.

In der vorliegenden Studie wurde in insgesamt 13 Milchproben *E. coli* nachgewiesen, 5 Proben entstammten der Gruppe 1, 4 Proben der Gruppe 2 und 4 Proben der Gruppe 3. Insgesamt bedeutete dies einen *E. coli*-Nachweis in 17,8 % der Milchproben. Dieses Ergebnis lag damit deutlich höher als die *E. coli*-Nachweiskraten von 1,0 % bzw. 6,6 % bei Topolko und Beni \acute{c} (1997) bzw. Beni \acute{c} (2004).

Die Zahl der somatischen Zellen in der Milch ist eng mit einer Entzündung der Milchdrüse verbunden und deshalb als internationaler Standard für die Bestimmung der Milchqualität (Harmon, 2001) anerkannt. Diese Zahl liegt in der Milch nicht Mastitis kranker Rinder unter 2×10^5 . Bei der Mehrzahl der gesunden Tiere liegt sie sogar unter 10^5 (Harmon, 2001; Ruegg, 2003).

Die Zahl der somatischen Zellen ändert sich abhängig von Gesundheitsstatus der Milchdrüse. In der Milch gesunder Euterviertel ist die Gesamtzahl geringer als 200.000 Zellen/ml, sie bestehen aus Epithelzellen und Leukozyten (polymorphonukleare Neutrophile, Lym-

Tabelle 1: Ergebnisse der Untersuchungen der Milchproben von Kühen in Gruppe 1 (≤ 100.000 somatische Zellen/ml Milch)

	Aerobe Bakterien/ml	μg Haptoglobin/ml	Zahl der somatischen Zellen/ml	Lymphozyten (% der Gesamtzellzahl)	Monozyten (% der Gesamtzellzahl)	Granulozyten (% der Gesamtzellzahl)
Anzahl der Milchproben	32					
Minimalwerte	100	0,007	16.000	38,50	1,50	36,50
Maximalwerte	36.557	1,584	100.000	48,70	14,80	57,20
Mittelwert	3.020,53	0,232	62.843,75	43,14	7,84	49,19
Standardabweichung	6.434,96	0,400	25.945,49	3,17	2,20	4,09

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchungen der Milchproben von Kühen in Gruppe 2 (>100.000 bis 400.000 somatische Zellen/ml Milch)

	Aerobe Bakterien/ml	μg Haptoglobin/ml	Zahl der somatischen Zellen/ml	Lymphozyten (% der Gesamtzellzahl)	Monozyten (% der Gesamtzellzahl)	Granulozyten (% der Gesamtzellzahl)
Anzahl der Milchproben	27					
Minimalwerte	100	0,016	102.000	38,30	6,20	34,50
Maximalwerte	12.000	1,800	342.000	50,30	15,90	52,60
Mittelwert	2.777,78	0,516	201.629,63	44,31	9,63	45,90
Standardabweichung	2.634,73	0,598	68.568,97	3,62	3,06	5,78

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchungen der Milchproben von Kühen in Gruppe 3 (>400.000 somatische Zellen/ml Milch)

	Aerobe Bakterien/ml	μg Haptoglobin/ml	Zahl der somatischen Zellen/ml	Lymphozyten (% der Gesamtzellzahl)	Monozyten (% der Gesamtzellzahl)	Granulozyten (% der Gesamtzellzahl)
Anzahl der Milchproben	14					
Minimalwerte	200	0,127	420.000	42,20	8,00	35,50
Maximalwerte	5.000	1,800	932.000	52,50	15,10	49,00
Mittelwert	2.292,86	0,400	562.500	47,44	12,16	40,40
Standardabweichung	1.539,46	0,461	135.462,60	2,68	2,09	4,31

phozyten, Makrophagen u. a.) (Antunac et al., 1997).

In infizierten Eutervierteln bilden die neutrophilen Granulozyten mit über 90 % die größte Zellfraktion. Eine Zahl von über 200.000/ml ist dabei ein Indikator für Mastitis (Harmon, 1994, 2001; Ruegg, 2003). Die Zahl der Leukozyten in den eigenen Milchproben lag zwischen $38,3 \times 10^4$ (Gruppe 2) und $52,5 \times 10^4$ (Gruppe 3). Ein Anstieg polymorphonuklearen Leukozyten auch ohne Erhöhung der Gesamtzellzahl würde auf eine entzündliche Reaktion des Organismus und Abwehrmechanismen gegen das irritierenden Agens hinweisen. Da in den untersuchten Proben kein bedeutender Anstieg (auf 90 % und mehr) nachgewiesen wurde, litt demnach keines der untersuchten Rinder in der vorliegenden Studie eindeutig unter einer Mastitis.

Die Erhöhung der Zahl somatischer Zellen in einzelnen Eutervierteln könnte ebenfalls auf eine gestörte Sekretion hinweisen (Reneau, 1986; Harmon, 1994; Antunac et al., 1997; Topolko u. Benić, 1997). Besonders auch deshalb, weil in den eigenen Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise auf Mastitis vorlagen.

3.2 Haptoglobinkonzentration

Haptoglobin ist das Hauptprotein der Akute-Phase-Proteine und ein nachgewiesener Indikator für eine Entzündung der Milchdrüse. Akute-Phase-Proteine, besonders Haptoglobin, sind Gegenstand von Studien mit natürlich und experimentell verursachter Mastitis bei Milchtieren, wobei bereits eine Erhöhung der Haptoglobinnmenge in Milch und Serum festgestellt wurde.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Haptoglobinkonzentration ein nützlicher und wichtiger messbarer Indikator für die Entstehung und den Schweregrad einer Entzündungsreaktion bei Rindern mit Mastitis, Pneumonie, Enteritis, Peritonitis und anderen natürlichen und experimentell erzeugten Entzündungszuständen ist (Grönlund et al., 2003; Murata et al., 2004; Eckersall et al., 2005).

In den eigenen Untersuchungen betrug die Haptoglobinnmenge in Gruppe 1 0,007 bis 1,584 $\mu\text{g/ml}$, in Gruppe 2 0,016 bis 1,8 $\mu\text{g/ml}$ und in Gruppe 3 0,127 bis 1,8 $\mu\text{g/ml}$. Frühere Studien weisen darauf hin, dass es keinen bedeutenden Unterschied beim Haptoglo-

binspiegel in der Milch von Kühen mit milder oder mittelgradiger Mastitis gibt (Eckersall et al., 2005) Gleichzeitig wurde eine bedeutende Verbindung zwischen Haptoglobinspiegel im Blutserum und in der Milch der Kühe festgestellt. Aufgrund dessen erschien es möglich ist, dass der Nachweis von Akute-Phase-Proteinen als biologischer Marker für die Mastitiserkennung dienen kann.

Gračner (2005) hat in seinen Forschungen bei Kühen mit klinischer Mastitis einen Haptoglobinspiegel von 0,94 bis 25,5 $\mu\text{g/ml}$ und bei Kühen mit subklinischer Mastitis von 0,36 bis 10,2 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt. In der Kontrollgruppe lag der Haptoglobinspiegel unter 0,3 $\mu\text{g/ml}$, was der unteren Nachweisgrenze der verwendeten Untersuchungsmethode entsprach. Aus diesem Grund schloss Gračner, dass der erhöhte Haptoglobinspiegel der untersuchten Kühe mit klinischer und subklinischer Mastitis ein Anzeichen für die Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion ist.

Es besteht kein Zweifel, dass der Haptoglobinwert ein nützlicher Indikator für die Bewertung der Entstehung und des Schweregrades eines Entzündungsprozesses bei Kühen mit Mastitis und anderen natürlichen und experimentell erzeugten Entzündungszuständen ist (Murata et al., 2004).

In den eigenen Untersuchungen wurde keine Korrelation zwischen der Zahl der somatischen Zellen und des Haptoglobinspiegels in Gruppe 1 ($r=-0,20$, $p>0,001$) festgestellt. Dies war zu erwarten, da die niedrige Zellzahl in dieser Probenmenge (bis 100.000/ml) kein Anzeichen für einen Entzündungsprozess der Milchdrüse liefert.

Eine relativ geringe, aber statistisch signifikante positive Korrelation konnte zwischen der Zahl der somatischen Zellen und des Haptoglobinspiegels in Gruppe 2 festgestellt werden ($r=0,28$, $p<0,001$), sowie eine sehr schwache negative Korrelation zwischen beiden Parametern in Gruppe 3 ($r=-0,26$, $p>0,001$). Bei einer Betrachtung der Milchproben in ihrer Gesamtheit ließ sich eine positive Korrelation zwischen der Zellzahl und des Haptoglobinspiegels ($r=0,62$) nachweisen.

4 Fazit

Zusammengefasst stimmen die eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen ande-

rer Autoren überein, wonach Haptoglobin ein früher Indikator eines Entzündungsprozesses ist (Conner et al., 1988; Skinner et al., 1991) und damit auch ein Indikator für die hygienische Qualität des Lebensmittels Milch.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Überprüfung der Milchqualität mit Hilfe einiger neuer Verfahren zur Abschätzung der Eutergesundheit (Zytophotometrie, Messung des Haptoglobingehalts) in der täglichen Praxis erfolgreich angewendet werden kann. Allerdings sind noch weitere Studien bezüglich der Zuverlässigkeit, der technischen Umsetzung und der Wirtschaftlichkeit der Verfahren notwendig.

Literatur

1. Åkerstedt, M., K. Persson Waller, A. Sternesjö (2007): Haptoglobin and serum amyloid A in relation to somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *J. Dairy Res.* 74, 198-203.
2. Antunac, N., J. Lukač-Havranek, D. Samardžija (1997): Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. *Mljekarstvo* 47, 183-193.
3. Bauman, H., J. Gaudie (1994): The acute phase response. *Immunol. Today* 15, 74-80.
4. Benić, M. (2001): Mastitis u krava. U: Mastitisi – suzbijanje mastitisa i kakvoća mlijeka na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. (Benić M. Ed.) Hrvatski veterinarski institut. Zagreb, 37-90.
5. Benić, M. (2004): Vrste stanica u sekretu vimena krava s mastitisom uzrokovanim streptokokima i stafilokokima. *Doktorska disertacija*, Zagreb.
6. Conner, J. G., P. D. Eckersall, A. Wiseman, T. C. Aitchison, T. A. Douglas (1988): Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.* 44, 82-88.
7. Eckersall, P. D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan, J. L. Fitzpatrick (2005): Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Record* 148, 35-41.
8. Eckersall, P. D., F. J. Young, A. M. Nolan, C. H. Knight, E. M. Scott, J. L. Fitzpatrick (2004): Acute phase proteins in milk: local production of mammary associated serum amyloid A3 and haptoglobin. *The 5th International Colloquium on animal acute phase proteins*. Dublin Ireland.
9. Gračner (2005): Hematološki pokazatelji i razina haptoglobina u krvi i mlijeku krava s mastitisom. *Doktorska disertacija*. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet.
10. Grönlund, U., C. Hulten, P. D. Eckersall, C. Hogarth, K. Persson Waller (2003): Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Res.* 70, 379-386.
11. Grönlund, U., C. H. Sandgren, K. Persson Waller (2005): Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronically subclinical mastitis. *Vet. Research* 36, 191-198.
12. Harmon, R. J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103-2112.
13. Harmon, R. J. (2001): Somatic cell counts: A Primer National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, Nevada, Usa.
14. Kovač, Z., S. Gamulin (2002): Cjelovito reagiranje organizma na noksu. U: Patofiziologija (Urednici: S. Gamulin, M. Marušić, Z. Kovač) Medicinska naklada- zagreb. Pp. 499- 520.
15. Murata, H., N. Shimada, M. Yoshioika (2004):

Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet. J. 168, 28-40.

16. Radostits, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood, K. W. Hinchcliff (2000): *Mastitis. In: Veterinary medicine. A text of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses 9th ed., W. B. Saunders company. Philadelphia, London, New York, St. Louis Sydney, Toronto, 603-700.*

17. Reneau, J. K. (1986): *Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. J. Dairy Sci. 69, 1708-1720.*

18. Ruegg, P. L. (2003): *Investigation of mastitis problems on farms. Vet. Clin. Food Anim. 19, 47-73.*

19. Santos, M. V., Y. Ma, D. M. Barbano (2003): *Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. J. Dairy Sci., 86, 2491-2503.*

20. Skinner, J. G., R. A. Brown, L. Roberts (1991): *Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. Vet. Research 128, 147-149.*

21. Skinner, J. G. (2001): *International standardization of acute phase proteins. Vet. Clin. Pathol. 30, 2-7.*

22. Topolko, S., M. Benić (1997): *Aktualni problemi i epizootiološko stanje subkliničkih mastitisa u minifarmskoj proizvodnji mlijeka. Praxis veterinaria 45, 69-76.*

23. Viquer, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck, R. O'Kennedy (2009): *Mastitis detection: Current trends and future perspectives. Review. Trends Biotechnol. 27, 486-493.*

Korrespondenzadresse:

Prof. Bela Njari, Abteilung für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität von Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Kroatien, bnjari@vef.hr