

## Slutrapport

*Den här studien är fortsättningen på en tidigare SLF-finansierad pilotstudie (se Lakic m fl, 2009) med syfte att undersöka celltalsreaktionen i mjölken efter ett enstaka förlängt mjölkningsintervall på 24 tim. Den nu aktuella studien syftade till att undersöka reaktionens immunologiska bakgrund samt utveckla pilotstudiens undersökningar.*

## Bakgrund

Efter ett tekniskt stopp i automatiska mjölkningssystem har observerats tillfälligt ökat celltal (SCC) i tankmjölken. Efter stoppet får många kor stå länge i kö innan de blir mjölkade och mjölkningssupphållet för en enskild ko kan bli upp till ett dygn (Pettersson m fl., 2002). Det är troligt att detta är orsaken till det ökade tankcelltalet. Ett förhöjt SCC är en mastitindikator och anses generellt vara förknippat med lägre mjölk kvalitet och produktion. Ökat tankmjölkscelltal kan alltså innebära både reducerad volym levererad mjölk och anmärkningar eller missad premiumbetalning för producenten.

Effekten av ett enstaka förlängt mjölkningsintervall (FMI) är tidigare endast fragmentariskt undersökt i några enstaka studier (Fox & Schultz, 1985; Stelwagen & Lacy-Hulbert, 1996). Den tidigare SLF-finansierade pilotstudien (Lakic m fl, 2009) visade att SCC-reaktionen på konivå hade karaktären av en topp som med avseende på olika celltyper liknade den man ser vid andra mastitreaktioner och att mjölksammansättningen förändrades men så ringgradigt att den inte tycktes påverka mjölkens kvalitet hos kor med god juverhälsa. Resultaten tydde också på ett enstaka FMI ledde till kvardröjande reducerad daglig mjölmängd. Orsaken till celltalstoppen efter ett enstaka FMI och reaktionen i sig har dock inte undersökts.

Cellerna i mjölk utgörs nästan uteslutande av vita blodkroppar (leukocyter; (för översikt se Burvenich m fl, 1995). Ökad rekryteringen av leukocyter till juvret och mjölken utgör en väsentlig del av inflammationsreaktionen. Då rekryteras framför allt särskilda inflammationsceller, polymorfonukleära leukocyter (PMN) som således är ett mera direkt mått på inflammationsreaktionen än SCC. Men vid ett FMI finns inte något uppenbart inflammatoriskt stimuli, som t ex en infektion utgör. Så vad kan vara orsaken till den observerade celltalstoppen? Den ökade cellvandringen (migrationen) till mjölken skulle kunna bero på mikroskopiska vävnadsskador, på grund av att juvret spänns ut av den ackumulerade mjölkvolymen under FMI. Det kan resultera i ökad genomsläpplighet (permeabilitet) och läckage från blodet och vävnadsvätskan som omger cellerna, av cytokiner som verkar cellattraherande (kemotaktiska). De kan också frisättas från skadade epitelceller (för översikt se Alluwaimi, 2004). Interleukin (IL)-1 $\beta$  och IL-8 är cytokiner med stark effekt på PMN och väsentliga i juvret (för översikt se Alluwaimi, 2004).

Den korta durationen och icke-patologiska bakgrunden hos reaktionen efter ett FMI har dock väckt frågan om huruvida ändrad koncentration av vanliga mjölkkomponenter under ett FMI kan bidra till att initiera reaktionen. Flera sådana faktorer, såsom vassleproteinet alfalaktalbumin (ALA) och laktationshormonet prolaktin (PRL), har i olika sammanhang visats kunna ha en cytokinliknande effekt (Dogusan m fl, 2001; Yamaguchi m fl, 2007).

Ett FMI kan också tänkas medföra stress för djuren (Österman & Redbo, 2001) där kortisol skulle kunna vara orsak till SCC-reaktionen (Yagi m fl, 2004).

On-line registrering av SCC som kan göras i automatiska mjölkningssystem ger frekventa och detaljerade registreringar på gårdsnivå. Detta ställer krav på mer detaljerad kunskap. Det blir således allt viktigare att förstå detaljerna i hur SCC påverkas av olika faktorer och hur tillfälliga ökningarna av SCC ska tolkas för att lantbrukaren ska kunna använda den förfinade informationen på gården optimalt och veta när den ska föranleda åtgärder - och i så fall vilka. Det ställs på sin spets i utarbetandet av korrekta ”Standard operating procedures”

för Herd Navigator och andra liknande besättningsövervakande system. Att skaffa mer kunskap om den här typen av parafysiologiska inflammationsreaktioner i juvret, som inte har någon sjuklig historia, är således väsentligt, dels för att bättre kunna tolka SCC i praktiken, dels för att öka insikten i hur juvrets immunförsvar fungerar generellt.

Den nu aktuella studien syftade till att undersöka inflammationsreaktionen och dess immunologiska bakgrund särskilt med avseende på cytokinliknande vanliga mjölkkomponenter samt utveckla pilotstudiens undersökningar av påverkan på mjölksammansättningen och mjolkproduktion. *Huvuddelen av studien är publicerad av Lakic m fl, (2011), se referenslistan; manus nr 2 är inskickat för publ.*

## Material och Metoder

### Djur

Totalt 27 kor av SRB-ras ingick i studien. De var inhysta i ett stall med traditionellt mjölkningssystem på Kungsängens Forskningscentrum, SLU och mjölkades regelbundet 2 ggr/dag. Endast kor med låga celltal (SCC < 100 000/ml) i provmjölkningen samt bakt-negativ juverdelsmjolk vid studiens start och avslutning ingick i undersökningen.

### Försöksuppläggning

Uppläggningsstudien baserades på den tidigare pilotstudien (Lakic m fl, 2009). Mjolkning skedde 2 ggr dagligen under hela studien utom dag 0 då korna utsattes för ett FMI på 24 tim genom att eftermiddagsmjölkningen (E-mjolkningen) uteslöts. Prov av samlingsmjolk togs vid de ordinarie mjölkningstillfällena under 4 dagar samt morgonmjölkningen (M-mjolkningen) den 5:e dagen (dag 0) för att fastställa kornas individuella basnivå. FMI inföll mellan M-mjolkningarna dag 0 och dag 1. Därefter följdes korna med provtagning vid de ordinarie mjölkningstillfällena under en period av ytterligare 10 dagar (dag 1, 2, 3, 4, 5, 7 och 10). Vid samtliga mjölkningar vägdes mjölken (True Test; Milk meter Cgm Tru-Tests Dk.2840, Danmark). Prover tagna dag 7 och 10 analyserades enbart med avseende på SCC och mjölksammansättning.

### Prover och provtagning

Prov (200 ml) togs från samlingsmjölken på varje ko. Provet delades upp för de olika analyserna inom 2 tim. I prover för totalräkning av celler tillsattes bronopol och de förvarades i +4 °C tills de analyserades. Mjolkprov för alla andra analyser förvarades i -20 °C i avvaktan på analys. Blodprov togs dag -1, 0 och 1 för analys av laktos, PRL och kortisol. Blodprovstagningen började ca 2,5 tim efter avslutad mjölkning. Prov togs från svansvenen i hepariniserade vacutainerrör (Vacutainer, Terumo, Sverige), placerades omedelbart på is och centrifugerades i 2200 x g i 15 min. Plasma överfördes till nya rör som förvarades i -20 °C tills de analyserades.

### Analyser

#### *Celler och mjölksammansättning*

SCC - Fluorescensbaserad elektronisk cellräkning (Fossomatic 5000 A/S N. Foss Electric, Hillerød, Danmark)

PMN diff – Manuell räkning i 20 µl mjolk i ljusmikroskop efter färgning med Newmans enligt referensmetoden för mjolk (IDF 148-1/ ISO/DIS 13366-1).

Fett, protein och laktos – Mid-infraröd spektroskopi (MilcoScan FT 120 A/S N Foss Electric, Hillerød, Danmark).

Kasein – Efter löpekoagulation av kaseinet bestämdes vassleproteinerna med mid-infraröd spektroskopi varefter kaseininnehållet räknades fram baserat på andelen vassleprotein samt totalprotein (Arla Foods analysis regulation 2000.004, 200001210), (FT 120, A/S N. Foss Electric, Dk).

#### *Permeabilitet och cellskada*

Bovint serumalbumin (BSA) – ELISA-kit (Bovine Albumin Elisa Quantitation Kit, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX., USA). Den optiska densiteten lästes av på en automatisk plattläsare (Model ELx 800; Bio-tek Inc., Winooski, VT, USA) vid 450 nm med referens vid 630 nm.

Laktos i blod – UV-metod i ett kommersiellt kit (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Lactose/D-galactose kit). Före analys togs proteinet bort från blod plasma enligt Stelwagen m fl, (1994).

Laktatdehydrogenas (LDH)-aktivitet – Fluorimetrisk, kinetisk metod enligt Larsen (2005) med hjälp av en Biomek 2000<sup>®</sup>, USA Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter, och spektrofotometer/fluorometer, Fluostar<sup>®</sup>, BMG Labtechnologies, USA.

#### *Cytokiner och akutfasproteiner*

Serum amyloid A i mjölk och blod – ELISA kits (PHASE<sup>™</sup> Milk Amyloid A [MAA] Assay; cat. TP-807 and PHASE<sup>™</sup> Serum Amyloid A Assay [SAA] – Multispecies; cat. TP-802, Tridelta Development Ltd, Wicklow, Ireland). Avläsning av optisk densitet som för BSA (fg).

IL1beta - Flödescytometri-baserad antikroppsdetektion xMAP enl Dernfalk m fl, 2007.  
Metoden är särskilt framtagen för analys av mjölk.

IL-8 – ELISA-kit (Quantikine<sup>™</sup>, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). De humana IL-8-antikropparna i detta kit har tidigare visats korsreagera med bovint IL-8 (Shuster m fl, 1995). Optisk densitet avlästes som för BSA (ovan).

#### *Cytokinliknande fysiologiska mjölkfaktorer samt stresshormon*

Alfalaktalbumin – ELISA-kit (Bovine Alpha-Lactalbumin Elisa Quantitation Kit, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX., USA). Avläsning av optisk densitet som för BSA (fg).  
Prolaktin och kortisol i mjölk och blod – Radio immuno assay; prolaktin enligt Bruckmaier m fl, (1992) och kortisol enligt Blum m fl, (1985).

#### *Statistisk analys*

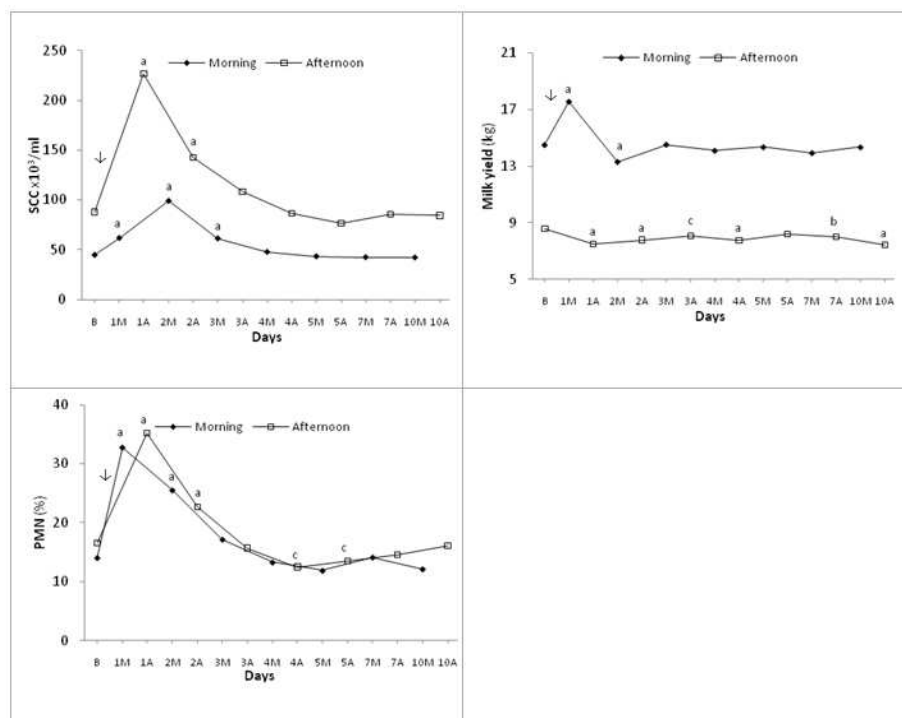
Data analyserades med variansanalys (PROC MIXED; SAS-program version 9.1 Cary, NC, USA). SCC 10-logatritmerades först för att få mer normaldistribuerade data. Least squares means från variansanalysen jämfördes med t-test. Utöver data från analyserna beräknades medelvärdet för output/tim mellan mjölkningarna av de olika parametrarna och testades för att få ett mått som inte påverkades av de olika långa mjölkningsintervallen och -volymerna (spädnings-/koncentrationseffekt). Data från M- resp. E-mjölk jämfördes separat med sina resp. baslinjer (medelvärde av samtliga förprover).

## Resultat

Generellt uppvisade förändringarna av de flesta parametrar ett peak-mönster med den starkaste reaktionen vid 2:a mjölkningen efter FMI.

#### SCC och PMN

Resultaten visas i figur 1. SCC var signifikant förhöjt i både M- och E-mjölk dag 1 och 2 efter FMI. Reaktionen var mest uttalad i E-mjölk med det högsta värdet dag 1. Max-värdet i M-mjölk sågs först dag 2. Förändringarna i cellkoncentration bekräftades av den kalkylerade output/tim mellan mjölkningarna (se Lakic m fl, 2011).



**Figur 1.** Mjölmängd, celltal (SCC) och polymorfonukleära leukocyter (PMN) i morgon- och eftermiddagsmjölk efter ett enstaka förlängt mjölkningsintervall (FMI) på 24 tim. Baslinjen (B) är medelvärdet av förprover tagna dag -4,-2,-1, och för morgonmjölk därutöver dag 0. FMI utgör intervallet B-1M i figurens x-axel. Data representerar LS-means. SE för mjölmängd, SCC and PMN i morgon resp eftermiddagsmjölk var 0.31 resp 0.21; 0.03 resp 0.03 (10-log värden); och 1.36 resp 1.63. Bokstäverna i figuren indikerar statistiskt signifikant skillnad mellan det aktuella provtagningstillfället och baslinjevärdet före FMI: a:  $p < 0.001$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.05$ .

Andelen PMN (fig. 1) var signifikant förhöjd i M- och E-mjölk dag 1 och 2. Därefter sjönk PMN-andelen till värden signifikant lägre än baslinjen under några dagar innan de återgick till värden som inte var skiljda från baslinjen. Resultaten bekräftades av output/tim (se Lacic m fl, 2011). I motsats till SCC var PMN kraftigt förhöjt redan i M-mjölk dag 1 men hade redan dag 2 börjat minska medan SCC fortsatte att öka.

#### SAA

SAA koncentrationen (fig. 2) var signifikant förhöjd i både M- och E-mjölk till och med M-mjölknings dag 3. Detta bekräftades av beräknad output/tim.

#### BSA

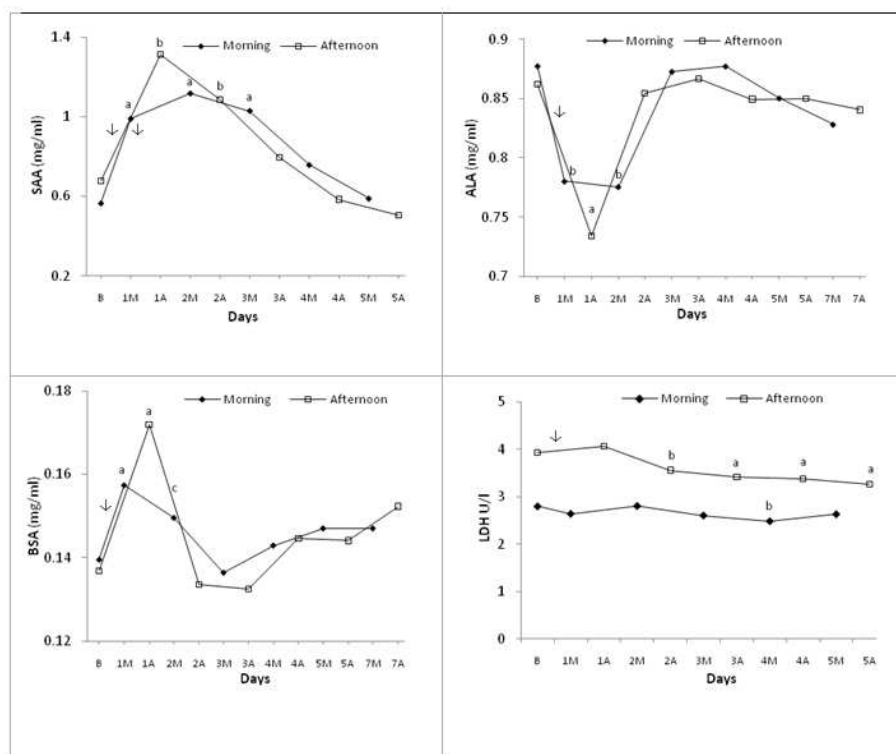
BSA koncentrationen (fig. 2) var signifikant förhöjd i både M- och E-mjölk till och med M-mjölknings dag 2. Det högsta värdet sågs i E-mjölk dag 1 vilket bekräftas av output/tim. Output/tim i M-mjölk var dock sänkt dag 1 och dag 2 oförändrad.

#### LDH

I M-mjölk förändrades inte LDH-aktiviteten (fig. 2) signifikant efter FMI. I E-mjölk sjönk aktiviteten från och med dag 2 och kvarstod signifikant lägre än före FMI till studiens slut.

#### Laktos i blod

Laktos i blod ökade signifikant efter FMI, från basvärden på 0.060 mM i M-mjölk resp 0.039 mM i E-mjölk till 0.12 mM ( $p < 0.001$ ) resp 0.047 mM ( $p < 0.05$ ), dag 1.



**Figur 2.** Serum amyloid A (SAA), alfalaktalbumin (ALA), bovint serum albumin (BSA) samt laktatdehydrogenas (LDH) i morgon- och eftermiddagsmjölk efter ett enstaka förlängt mjölkningsintervall (FMI) på 24 tim. Baslinjen (B) är medelvärdet av förprover tagna dag -4,-2,-1, och för morgonmjölk därutöver dag 0. FMI utgör intervallet B-1M i figurens x-axel. Data representerar LS-means. SE för SAA, ALA and BSA i morgon resp eftermiddagsmjölk var 0.10 resp 0.14; 0.03 resp 0.03 and 0.004 resp 0.004. Bokstäverna i figuren indikerar statistiskt signifikant skillnad mellan det aktuella provtagningstillfället och baslinjevärdet före FMI: a:  $p < 0.001$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.05$ .

### IL-1 $\beta$ , IL-8

IL-1 $\beta$  kunde inte detekteras i några prover. IL-8 uppmättes i mycket låga koncentrationer (LS-mean 1,2-1,9 pg/ml) som inte förändrades över tid.

### ALA

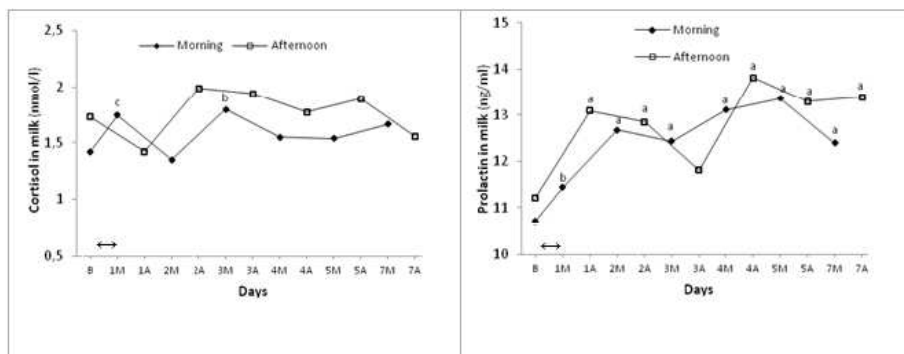
ALA (fig. 2) koncentrationen minskade signifikant i både M- och E-mjölk till och med M-mjölknings dag 2. Resultaten bekräftas av output/tim.

### Kortisol

I blodplasma sågs inga signifikanta förändringar av kortisolkoncentrationen efter FMI: I morgonprover var baslinjen 6.1 nmol/l och värdet dag 1 var 7.2 nmol/l. I eftermiddagsprover var baslinjen 4.4 nmol/l och dag 1 var värdet 3.6 nmol/l. I mjölk var kortisolkoncentrationen (fig. 3) signifikant förhöjd enstaka provtagningar efter FMI och endast i M-mjölk.

### PRL

PRL i blodplasma förändrades inte efter FMI. Baslinjen respektive värdet dag 1 var 20.1 ng/ml respektive 18.1 ng/ml i morgonproverna. I eftermiddagsproverna var motsvarande värden 23.7 ng/ml respektive 23.6 ng/ml. I mjölk (fig. 2), var PRL signifikant förhöjt vid alla mjölkningar efter FMI, med undantag av ett enstaka tillfälle, E-mjölknings dag 3.



**Figur 3.** Kortisol och prolaktin i morgon- och eftermiddagsmjölk efter ett enstaka förlängt mjölkningsintervall (FMI) på 24 tim. Baslinjen (B) är medelvärde av förprover tagna dag -4,-2,-1, och för morgonmjölk därutöver dag 0. FMI utgör intervallet B-1M i figurens x-axel. Data representerar LS-means. SE för kortisol och prolaktin i morgon- respektive eftermiddagsmjölk var 0.15 och 0.19; respektive 0.55 and 0.63. Bokstäverna i figuren indikerar statistiskt signifikant skillnad mellan det aktuella provtagningstillfället och baslinjevärde före FMI: a:  $p < 0.001$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.05$ .

### Mjölmängd

Mjölmängden (fig. 1) vid den första mjölkningen efter FMI var signifikant förhöjd men den beräknade mjölksyntesen (output/tim) under FMI minskade signifikant. Därefter var mjölmängden vid M-mjölkningarna oförändrad medan den vid E-mjölkningarna var signifikant reducerad med i genomsnitt 0.75 kg/dag och ko under resten av studien.

### Mjölksammansättning

Resultaten för fett, protein, laktos, kasein och vassle visas i tabell 1. Generellt var koncentrationen av olika mjölkkomponenter signifikant förhöjda främst vid de två första mjölkningarna efter FMI varefter de minskade och låg vid enstaka provtagningar signifikant lägre än baslinjen. Laktos var den enda parameter som minskade direkt efter FMI och låg kvar på lägre värden under hela studien.

Tabell 1. Mjölksammansättning efter ett förlängt mjölkningsintervall (FMI) på 24 tim.

Data presenteras som medelvärden. Baseline = basvärdet dvs medelvärde av förprover tagna dag -4, -2, -1, och för morgonmjölkningar även dag 0. FMI infaller mellan baseline och dag 1. M = morgonmjölkning, A = eftermiddagsmjölkning. Statistisk signifikant skillnad mellan respektive värde och baslinjen före FMI visas: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ .

	Milking	Baseline	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 7	Day 10
Fat (%)	M	4.35	4.64**	4.65**	4.28	4.07**	4.07**	4.27	4.33
	A	6.67	8.54***	6.47	6.22**	6.21**	6.17**	6.61	6.57
Protein (%)	M	3.67	3.82***	3.64	3.59***	3.70*	3.68	3.68	3.73***
	A	3.89	4.04***	3.80***	3.89	3.92	3.86	3.86	3.92
Lactose (%)	M	4.78	4.69***	4.72***	4.74**	4.76	4.76	4.77	4.76
	A	4.67	4.59***	4.68	4.68	4.69	4.7	4.65	4.70
Casein (%)	M	2.70	2.80***	2.64***	2.60**	2.71	2.68		
	A	2.83	2.93***	2.73***	2.83	2.85	2.82		
Whey (%)	M	0.98	1.02***	1.00***	0.99	0.99*	0.99*		
	A	1.06	1.10***	1.07	1.06	1.06	1.04*		

## Diskussion

Resultaten i den aktuella studien var helt i överensstämmelse med de som framkom i studien av Lakic m fl (2009), som hade samma design. Det gällde såväl magnitud som kinetik hos reaktionen. Studien visar således en god upprepbarhet.

Liksom tidigare (Lakic m fl, 2009) visades att redan under FMI sker en tydlig ökning av andelen PMN medan SCC var marginellt ökat direkt efter FMI. Här liksom tidigare (Lakic m fl, 2009) visades att peak-värdena på SCC och PMN % uppmättes dock inte förrän vid den andra mjölkningen efter FMI. Om man jämför M-mjolk så sågs det högsta SCC värdet inte förrän dag 2 då andelen PMN redan hade börjat minska. Det är intressant eftersom förändringar i SCC och andel PMN generellt anses följa vandra väl både i fysiologiska och patologiska förhållanden, (Ostensson, K., 1993a, b; Kelly m fl, 2000), dvs ju högre SCC desto högre PMN %. Således utgjorde andra celler än PMN toppen på SCC-ökningen. Det kan indikera en annorlunda kemotaktisk bakgrund till SCC-reaktionen efter ett FMI.

LDH ökade inte parallellt med det ökade SCC och var till och med signifikant sänkt efter dag 2. Det är anmärkningsvärt eftersom LDH tidigare visats ha en god korrelation med SCC (Kitchen m fl, 1980) och används som mastitindikator i t ex Herd Navigator. Källan till LDH-aktivitet i mastitmjolk är främst de många leukocyterna (Kato m fl, 1989) men LDH kan även komma från epitelceller (Kitchen m fl, 1980). Det är möjligt att LDH-aktiviteten inte skiljer sig mellan olika nivåer inom det totalt sett ganska låga celltalsområdet i den aktuella studien. Resultaten indikerar att korrelationen mellan SCC och LDH kan behöva utvärderas bättre under olika omständigheter. Men den oförändrade LDH-aktiviteten tyder ändå på att det ökade mjölktrycket under FMI inte hade åstadkommit någon epitelcellsskada.

Det har tidigare observerats att långa mjölkningsintervall över längre tid ger ökad permeabilitet i juvret pga det återkommande ökade mjölktrycket (Stelwagen m fl, 1994). Vår studie visade att redan vid ökat mjölktryck under ett *enstaka* FMI kan det ge upphov till ökad permeabilitet vilket avspeglas i läckage av laktos från mjolk till blod och något senare läckage av BSA i motsatta riktningen. BSA är en liten molekyl och används regelmässigt som permeabilitetsindikator. Laktos gick ut i blod då mjölktrycket var som högst medan BSA främst kunde läcka in efter det att juvret blivit tömt och det intramammära trycket hade minskat. BSA skulle möjligen kunna vara en faktor bakom initieringen av inflammationen efter ett FMI.

Läckage från blod av kemotaktiska faktorer skulle kunna vara det som initierar inflammationsreaktionen. Dock kunde inga (IL-1 $\beta$ ) eller extremt små mängder (IL-8) av cytokiner detekteras i mjölkproverna. Orsaken till att IL-1 $\beta$  respektive IL-8 valdes för analys är att de har en stark effekt på PMN-migration (för översikt se Sordillo m fl, 1997; Alluwaimi, 2004) och kan förväntas kvarstå förhöjda något längre än andra proinflammatoriska cytokiner (Dernfalk m fl, 2007). Men det kan givetvis ha förelegat ökningscyklerna som inte undersöktes, som kan ha initierat PMN-migrationen. Dock tyder i alla fall inte resultaten på att IL-1 $\beta$  respektive IL-8 skulle ha orsakat den ökade PMN-migrationen och SCC-toppen.

SAA är ett av de viktigaste akutfasproteinerna hos nötkreatur. Mjölkinnehållet av SAA (MAA) kan vara ett resultat av både lokal och systemisk effekt av (Jacobsen m fl, 2005). SAA kan verka kemotaktiskt på PMN och har visats öka i komjolk innan SCC ökar (Petersen m fl, 2004). Den ökade koncentrationen av MAA som observerades efter FMI kan alltså ha lockat PMN till ökad migration. Om MAA verkligen var förhöjt innan PMN-reaktionen startade kan dock inte avgöras i den föreliggande studien eftersom reaktionen högst sannolikt initierades vid någon tidpunkt redan under det pågående FMI. Tidigare studier har indikerat att FMI applicerade under längre tid kan vara associerat med stress/obehag för kon (Österman & Redbo, 2001) och det finns ett samband mellan stresshormonet kortisol i mjolk och SCC

(Gygax m fl, 2006). Men inga förändringar observerades i kortisol efter ett enstaka FMI varken i blod eller mjölk i den nu aktuella studien. Vad som initierade akutfasreaktionen och SAA syntesen återstår att besvara.

Vanliga mjölkkomponenter såsom ALA har visats kunna påverka PMN. Vissa studier av ALA i andra sammanhang än mastit pekar på att det kan hämma PMN-migration (Wong et al., 1997). Således skulle nedgången i ALA som inträffade samtidigt med PMN-peaken efter FMI kunna förklara den ökade PMN-migrationen genom en reducerad hämmande effekt av ALA. I nyligen genomförda studier som ligger utanför det här projektet har vi visat att ALA har en hämmande effekt på PMN-migrationen, *in vitro* (ej publicerat).

PRL koncentrationen i mjölk ökade efter FMI parallellt med andelen PMN men kvarstod sen även förhöjd under resten av studien. PRL har många immunologiska egenskaper och flera undersökningar tyder på att PRL stimulerar kemotaxis hos PMN (Dogusan m fl, 2001). Om PRL skulle vara en faktor bakom PMN-ökningen efter ett FMI är det dock märkligt att inte andelen PMN förblir förhöjd så länge PRL-ökningen kvarstår. Det har dock visats att om PRL kvarstår förhöjt kan det efter en initial stimulering få en nedreglerande effekt på PMN-migrationen (Auchtung m fl, 2005). Således skulle den ökade koncentrationen PRL, med det mönster som observerades efter FMI kunna ha bidragit till den initialt ökade PMN-migrationen. I studier som ligger utanför den nu aktuella har vi kunnat visa att PRL direkt kan stimulera PMN-migration, *in vitro* (ej publicerat).

Den minskade koncentrationen av ALA efter FMI kan vara en orsak till den observerade reduktionen av laktoshalten. Det är välkänt att ALA är en nödvändig faktor för co-enzymet galactosyl-transferas, som behövs för laktosyntesen. Laktoshalten påverkades dock sannolikt även av det påvisade läckaget ut till blod (Stelwagen & Lacy-Hulbert, 1996).

Den högre mjölmängd som sågs första mjölkningen efter FMI var betingad av ackumuleringen av mjölk under de 24 timmarna och ska inte tolkas som en ökad mjölkproduktion. Tvärtom var mjölksyntesen reducerad med ca 20 % under FMI visat i output/tim, sannolikt på grund av negativ feedback från det ökade mjölktrycket. Liksom i studien av Lakic m fl (2009) påvisades en kvarstående reduktion av mjölmängden efter FMI. Trots att tiden som korna följdes utökades till 10 dagar återgick inte mjölmängden till den normala utan var fortfarande reducerad vid studiens slut. Reduktionen per ko var i genomsnitt 0,75 kg/dag i E-mjölk. Reduktionen kan möjligen vara kopplad till den minskade laktoshalten. Laktos är en viktig osmoregulator i mjölk och då koncentrationen minskar så minskar också mjölkvolymen.

Mjölksammansättningen påverkades främst under 2 dagar efter FMI i enlighet med resultaten av Lakic m fl (2009). I motsats till Delamare m fl. (2006) indikerar resultaten att syntesen av mjölkkomponenter inte var försämrade med undantag för laktos. Det styrks av den beräknade output/tim. Dessutom tyder den ökade koncentrationen av kasein och andra proteiner på att det inte förelåg någon kvalitetssänkande effekt av proteolytiska enzymer efter FMI. Således sågs ingen kvalitetssänkande effekt på mjölken efter FMI vilket överensstämmer med studien av Lakic m fl (2009).

### Sammanfattning och slutsatser

- Ett enstaka FMI ledde till 2-3 ggr ökat mjölkcelltal under 1-2 dagar, mest uttalat efter det att mjölkning återupptagits samt dessutom till nedsatt mjölkproduktion per ko med > 0,75 kg/dag under de 10 dagar efter FMI som studien pågick.
- Mjölksammansättning påverkades men kvaliteten försämrades inte.



- Ett enstaka FMI ger upphov till en inflammationsreaktion som liknar den som ses vid infektiös mastit men är mera ringradig. Kor med högre SCC-nivåer kan förväntas reagera kraftigare.
- Akutfasproteinet SAA spelar sannolikt en betydande roll för att sätta igång cellreaktionen efter ett FMI men resultaten antyder att även de i mjölken normalt förekommande faktorerna ALA och PRL kan vara bidragande aktörer. BSA-läckage från blod kan möjligen vara det som initierar akutfasreaktionen.
- Ett FMI ger negativa ekonomiska konsekvenser för lantbrukaren, främst genom den långvarigt reducerade mjölmängden men även genom eventuellt lägre betalning för mjölken på grund av SCC-toppen
- Det är viktigt att förebygga mjölkstopp och om de inträffar, se till att de blir så kortvariga som möjligt.
- Att den största reaktionen inträffar först efter det att mjölkning återupptagits kan indikera att celltalstoppen möjligen skulle kunna kuperas, med anpassad mjölkning direkt efter ett FMI. Detta bör undersökas vidare.

## Referenser

- Alluwaimi, A.M. (2004). The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in Veterinary Science* 77(3), 211–222.
- Auchtung T.L., Rius, A.G., Kendall, P.E., McFadden, T.B. & Dahl, G.E. (2005). Effects of photoperiod during the dry period on prolactin, prolactin receptor, and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88(1), 121-127.
- Blum, J.W., Jans, F., Moses, W., Fröhli, D., Zemp, M., Wanner, M., Hart, I.C., Thun, R. & Keller, U. (1985). Twenty-four-hour pattern of blood hormone and metabolite concentrations in high-yielding dairy cows: effects of feeding low or high amounts of starch, or crystalline fat. *Zentralbl Veterinarmed. A* 32(6), 401-418.
- Bruckmaier, R.M., Schams, D. & Blum, J.W. (1992). Aetiology of disturbed milk ejection in parturient primiparous cows. *Journal of Dairy Research*. 59(4), 479-89.
- Burvenich, C., Guidry, A.J. & Paape, M.J. (1995). Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland. Proceedings of the 3rd International Mastitis Seminar, IDF, Ed. A. Saran and S. Soback, May 28 - June 1, Tel Aviv, Israel , 3-13.
- Delamare, E. & Guinard-Flament, J. (2006). Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. *Journal of Dairy Sci* 89(6), 2007–2016.
- Dernfalk, J., Persson-Waller, K. & Johannisson, A. (2007). The xMAP technique can be used for detection of the inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in bovine samples. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118(1-2), 40–49.
- Dogusan, Z., Hooghe, R., Verdood, P. & Hooghe-Peters, E.L. (2001). Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Neuroimmunol* 120(1-2), 58-66.
- Fox, L.K. & Schultz, L.H. (1985). Effects of infection status on quarter milk production and composition following omitted milking. *Journal of Dairy Science* 68(2), 418-423.
- Jacobsen, S., Niewold, T.A., Kornalijnslipjer, E., Toussaint, M.J. & Gryus, E. (2005). Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104(1-2), 21–31.
- Kato, K., Mori, K. & Katon, N. (1989). Contribution of leukocyte origin of lactate dehydrogenase isozymes in milk of bovine mastitis. *Japanese Journal of Veterinary Science* 51(3), 530–539.
- Kelly, A.L., Tiernan, D., O'Sullivan, C. & Joyce, P. (2000). Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *Journal of Dairy Science* 83(2) 300-304.
- Kitchen, B.J., Middleton, G., Durward, I.G., Andrews, R.J., Salmon, M.C. (1980). Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *Journal of Dairy Sci* 63(6), 978-983.
- Lacic, B., E. Wredle, K. Svennersten-Sjaunja, and K. Östensson. 2009. Is there a special mechanism behind the changes in somatic cell and polymorphonuclear leukocyte counts, and composition of milk after a single prolonged milking interval in cows. *Acta Vet. Scand.* 51(1): 4.

- Lakic, B., K. Svennersten-Sjaunja, L. Norell, J. Dernfalk, and K. Östensson. 2011. The effect of a single prolonged milking interval on inflammatory parameters, milk composition and yield in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140: 110-118.
- Larsen, T. (2005). Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay. *Journal of Dairy Research* 72(2), 209–216.
- Ostensson, K. (1993b). Variations during lactation in total and differential leukocyte counts, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine. *Acta Veterinaria Scandinavica* 34(1), 83-93.
- Österman, S. & Redbo, I. (2001). Effects of milking frequency on lying down and getting up behaviour in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 70(3) 167-176.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P. & Heegaard, P.M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35(2), 163-187.
- Shuster, D.E., Kehrl, M.E.Jr. & Baumrucker, C.R. (1995). Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-I to reduced performance during infectious disease. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine* 210(2), 140-149.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K. & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science* 80(8), 1851-1865.
- Stelwagen, K., Davis, S.R., Farr, V.C., Prosser, C.G. & Sherlock, R.A. (1994). Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *Journal Dairy Science* 77(2), 426–432.
- Stelwagen, K. & Lacy-Hulbert, S.J. (1996). Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *American Journal of Veterinary Research* 57(6), 902-905.
- Wong, W.C., Liu, A.H., Regester, G.O., Francis, L.G., Watson, D.L. (1997). Influence of whey and purified whey proteins on neutrophil functions in sheep. *Journal of Dairy Research* 64(2), 281–288.
- Yagi, Y., Shiono, H., Chikayama, Y., Ohnuma, A., Nakamura, I. & Yayou, K. (2004). Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 66(4), 381-387.

## Publikationer

- Lakic B, Svennersten-Sjaunja K, Norell L, Dernfalk J & Östensson K 2011 The effect of a single prolonged milking interval on inflammatory parameters, milk composition and yield in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140 110-118
- Manuskript inskickat för publicering i *Journal of Dairy research*: Lakic B, Svennersten-Sjaunja K, Bruckmaier RM, Norell L, Östensson K: Prolactin and cortisol in bovine milk and blood during the peak in somatic cell count and neutrophils after a prolonged milking interval and the chemotactic effect of prolactin, *in vitro*.
- Abstract samt posterpresentation vid symposium “The mammary gland in health and disease”, Uppsala 2010 (internationella forskare och forskarstuderande); Centrum för reproduktionsbiologi (SLU/UU).
- Abstract samt posterpresentation) vid CoLact (Comparative Lactation Network) workshop i Köpenhamn, 2011.
- Abstract samt posterpresentation vid International Milk Conference (Endocrinology), Bern, Schweiz, 2011.

## Övrig resultatförmedling till näringen (inkl publ av posterabstracts)

- Sammanfattning av presentation vid Svensk Mjölks D&U konferens 2011.
- Poster vid SLUs LEARN-dag för uppstart av nätverket med näringen, 2011.
- Kortreferat av resultat till rådgivare via Svensk Mjölks interna webbkommunikation (genom Hans Gustafsson, Svensk Mjölks).
- Pressrelease från SLU i samband med disputation, 2011.
- Resultaten har förutom till näringen förmedlats i undervisningen av veterinärstudenter samt i den internationella Masterskursen Biology of Lactation, SLU.