



## **Akutfasproteiner som markörer för förändringar i mjölkens sammansättning och egenskaper vid juverinflammation; slutrapport av projekt SLF 0230061**

*Åse Sternesjö och Maria Åkerstedt, Inst. för livsmedelsvetenskap, SLU, 750 07 Uppsala*

### **Bakgrund**

Juverinflammation utgör den vanligast förekommande och ekonomiskt mest förlustbringande sjukdomen inom mjölkproduktionen. Utöver det lidande som sjukdomen innebär för kon, resulterar mastit i reducerad mjölkproduktion. Mjolk från mastitkor har dessutom en avvikande sammansättning som i sin tur påverkar mjölkens kvalitet och processbarhet på ett negativt sätt (Auld och Hubble, 1998). Störst betydelse för mjölkens processegenskaper har förändringarna i mjölkens proteinsammansättning, såsom en minskning i kaseinhalten, ökning av mängden vassleproteiner samt en ökad proteolytisk aktivitet, resulterande i minskat ostutbyte och sämre ostkvalitet.

Mjölkens innehåll av somatiska celler utgör sedan många år det vanligaste måttet på mastit. Celltalet i juverfjärdedels- men även samlingsprov är en god markör för juverhälsa och mjolk från ett friskt juver innehåller normalt runt 50,000 celler per ml (Hamann, 2005). Parallellt utgör tankmjölkens celltal ett mått på den genomsnittliga juverhälsan i besättningen och ingår som betalningsgrundande parameter i mejeriföreningarnas kvalitetsprogram för mjölkråvaran. Det saknas dock entydiga vetenskapliga rön för vilken nivå tankmjölkens celltal har en negativ effekt på mjölkråvarans sammansättning och egenskaper. Omfattande forskning har under de senaste decennierna genomförts för att finna nya markörer för mastit och mjölk kvalitet. Forskningen har bl.a. motiverats utifrån utvecklingen av automatiska mjölkningssystem eftersom dessa inte möjliggör manuell undersökning av juver och mjolk (Mottram, 1997). Exempel på markörer som studerats i mjolk är förändringar av serumkomponenter (t.ex. BSA och antitrypsin), elektrisk konduktivitet, komponenter som bildas i juverepitelcellerna (t.ex. laktos,  $\alpha$ -laktalbumin) samt mjölkens enzymatiska aktivitet (t.ex. plasminogen/plasmin, myeloperoxidas, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidas) (Sandholm, 1995; Pyörälä, 2003). Under senare år har uppmärksamhet riktats mot en helt ny grupp av proteiner, de s.k. akutfasproteinerna (acute phase proteins; APP) och deras roll i samband med inflammatoriska processer. Akutfasproteinerna utgörs av en grupp serumproteiner som produceras och frisätts huvudsakligen från levern, och vars koncentrationer förändras dramatiskt vid stimuli, t.ex. trauma, infektion eller sjukdom. Hos nötkreatur anses Hp och SAA vara de känsligaste akutfasproteinerna och serumkoncentrationerna av dessa ökar kraftigt vid olika typer av akut och kronisk sjukdom (Murata et al., 2004). Förhöjda serumnivåer av Hp och SAA är en ospecifik markör för skada eller sjukdom som kan initieras av många stimuli. I samband med mastit ökar permeabiliteten mellan blod och mjolk, varvid akutfasproteinerna även

påträffas i mjölk, troligen som ett resultat av läckage från blodet (Eckersall et al., 2001, Nielsen et al., 2004). Hp och SAA i mjölken blir således en specifik markör för mastit, eftersom mjölk från friska juver inte innehåller detekterbara halter av akutfasproteinerna (Pyörälä, 2003; Grönlund et al., 2003; Petersen et al., 2004, Grönlund et al., 2005). De senaste åren har forskare även identifierat lokal syntes av Hp och SAA i juverepitelceller (McDonald et al., 2001; Hiss et al., 2004).

I vårt forskningsprojekt har vi studerat förekomsten av Hp och SAA i mjölk från juverfjärdedelar, i samlings- och tankmjölk. Vi har även studerat samband mellan förekomsten av Hp och/eller SAA, celltal och olika mjölk kvalitetsparametrar för att undersöka om akutfasproteinerna kan utgöra en känsligare och specifikare markör för förändringar i mjölkens sammansättning och processegenskaper i samband med mastit.

## **Material och metoder**

### *Mjolkprover*

För validering av den utvecklade biosensormetoden för Hp i mjölk (delstudie 1) erhöles mjölkprover från kliniska mastiter via SVA:s mastitlaboratorium (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala). I övriga studier tog vi själva ut juverfjärdedelsprover (delstudie 2) samt samlingsprover (delstudie 2 och 3) från kor tillhörande SLU:s försöksbesättningar i Jälla och Kungsängen, samt från en privat mjölkbesättning utanför Uppsala. Korna som ingått i dessa studier har alltid varit kliniskt friska, dvs. djuren har inte uppvisat kliniska tecken på sjukdom eller förändringar i juver eller mjölk. Endast kor som levererat mjölk till mejeriet vid samlingstillfället har använts men detta utesluter givetvis inte att kor har haft sub-klinisk mastit med förhöjda celltal och relaterade förändringar i mjölkens sammansättning. Frysta tankmjölkprover (delstudie 2) erhöles från Steins Laboratorium AB, Jönköping.

### *Haptoglobin (Hp)*

Hp i mjölkproverna analyserades i samtliga fall med den i delstudie 1 utvecklade biosensormetoden. Metoden är baserad på interaktionen mellan tillsatt hemoglobin och fritt (i mjölkprovet) respektive bundet Hp (på sensorytan) och principen för metoden beskrivs i resultatdelen av denna rapport.

### *Serum amyloid A (SAA)*

SAA i mjölkproverna analyserades med hjälp av en kommersiell ELISA för SAA (Tridelta Development Ltd., Irland).

### *Somatiska celler i mjölken; celltalet (SCC)*

Celltalet analyserades på färska mjölkprover med en fluoro-opto-elektronisk cellräknare (Fossomatic, Foss Electric, Hillerød, Danmark). I delstudie 2 analyserades celltalet i tankmjölkproverna av Steins laboratorium före infrysningen, emedan juverfjärdedels- och samlingsprover analyserades direkt efter provtagning vid Kungsängens forskningscentrum, Uppsala.

### *Protein (totalt), kasein, fett och laktos*

Mjölkens innehåll av protein (totalt), kasein, fett och laktos (delstudie 3) analyserades på färska mjölkprover med IR-teknik (Fourier Transform, Foss Electric, Danmark). Mjölkens kaseininnehåll bestämdes indirekt genom att löpefalla kaseinerna och därefter bestämma proteininnehållet i vasslefraktionen. Vasslefraktionens proteininnehåll subtraherades

därefter från mjölkens totala proteininnehåll. Samtliga analyser utfördes vid Kungsängens forskningscentrum.

### Proteolys

För att bestämma mjölkprovets proteolytiska status (delstudie 3) bestämdes mängden fria aminoterminaler i avfettade mjölkprover enligt en fluoescaminmetod (Wiking et al., 2002). Mjölkens intakta proteiner denaturerades först med triklorättiksyra och avlägsnades genom centrifugering. Peptider och mindre proteinfragment, som vid centrifugeringen fördelade sig i supernatanten, bestämdes därefter genom en reaktion mellan deras fria aminoterminal och ett reagens (fluoescamin) varvid ett fluoescerande ämne bildas.

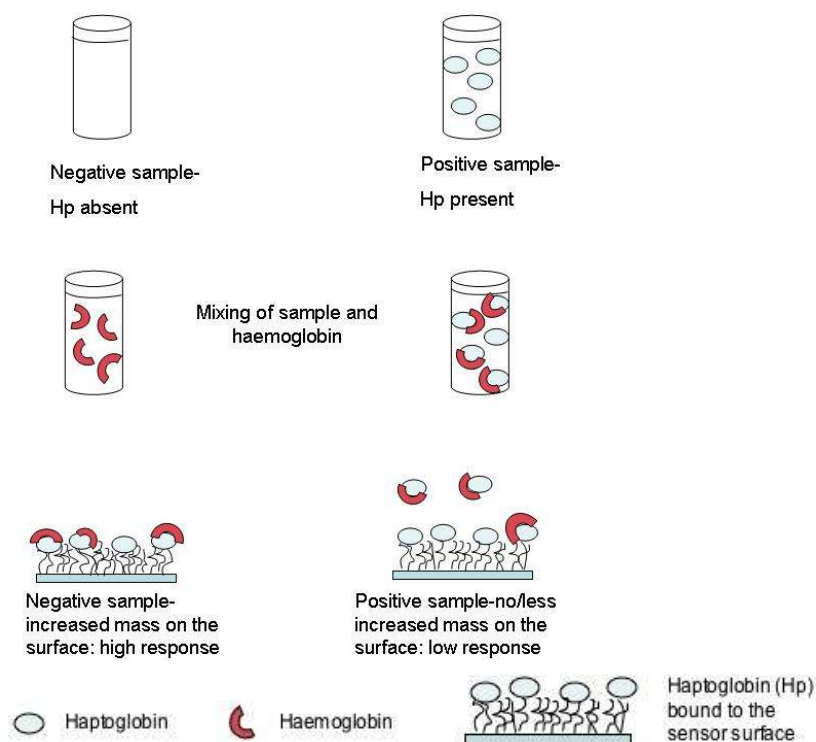
### Statistisk bearbetning

För all statistisk bearbetning har SAS (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) använts.

## Resultat

### Utveckling och validering av biosensormetod för analys av Hp i mjölk (delstudie 1).

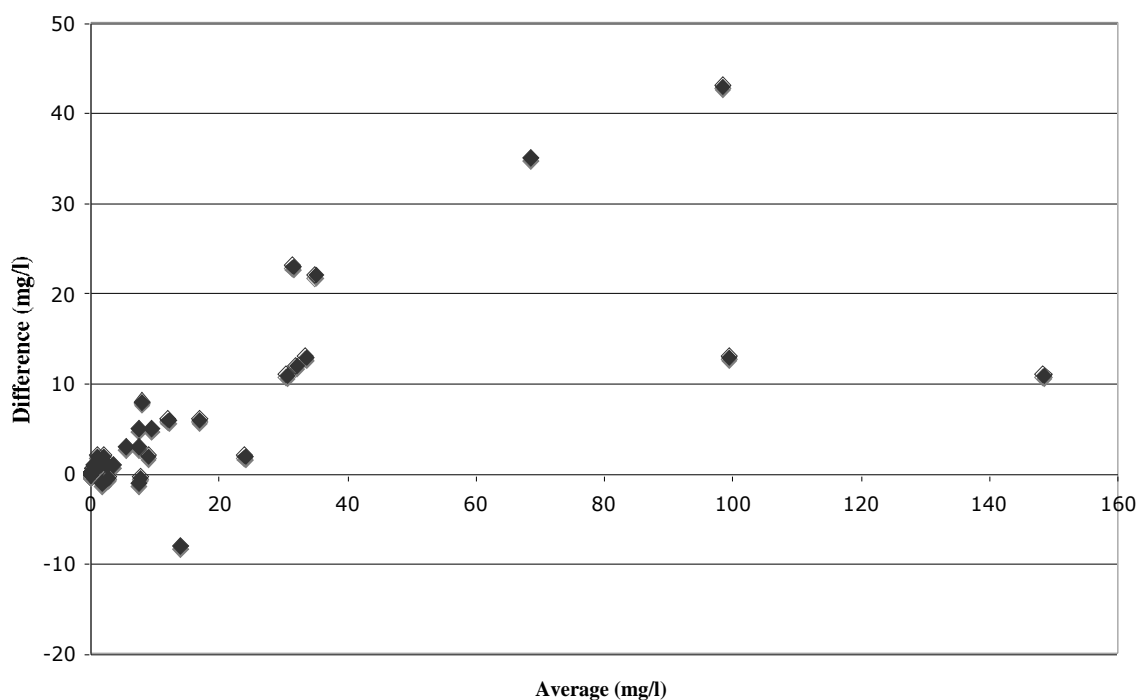
Inom ramarna för projektet har en känslig och snabb rutinmetod för analys av Hp i mjölk utvecklats med hjälp av biosensormetodik (Biacore, Uppsala). Metoden är baserad på interaktionen mellan Hp och hemoglobin, varvid Hp har kopplats kovalent till instrumentets sensoryta. Vid analys av Hp tillsätts en bestämd mängd hemoglobin till mjölkprovet innan det injiceras över sensorytan. Om mjölkprovet inte innehåller Hp, eller om halterna är under metodens detektionsgräns, binder maximal mängd hemoglobin till Hp-ytan vilket avläses som en ökning i massa på ytan (Figur 1).



**Figur 1.** Principen för analys av haptoglobin med biosensormetoden. Till mjölkprovet tillsätts en känd mängd hemoglobin. Provet injiceras över sensorytan, det tillsatta hemoglobinet binder till haptoglobin på sensorytan och ger upphov till en ökning i massa, uttryckt som respons units (RU). Interaktionen inhiberas dock av fritt haptoglobin i provet i proportion till koncentrationen. Ändringen i respons registreras och haptoglobinkoncentrationen i provet bestäms med hjälp av en standardkurva.

Om provet däremot innehåller Hp kommer det att bilda ett komplex med tillsatt hemoglobin. Interaktionen mellan hemoglobin och Hp på sensorytan inhiberas, och endast en mindre mängd hemoglobin binder till Hp-ytan. Ändringen i massa på sensorytan är omvänt proportionerlig mot Hp-koncentrationen i mjölkprovet, dvs. ju mer Hp desto mindre blir ändringen i massa på sensorytan. Före injiceringen av nästa prov injiceras en regenereringslösning (SDS) för att tvätta bort hemoglobin som binder till ytan. Den totala tiden för en analys, inklusive regenereringssteget, är ca 7 minuter.

Den utvecklade metoden uppvisade en detektionsgräns på 1 µg/ml Hp i mjölk och god precision. Variationen (CV; coefficient of variation) inom dag (n=10) var 3.6% respektive 5.5%, variationen mellan dagar (n=3) var 5.9% respektive 8.6% vid Hp-koncentrationerna 4 respektive 12 µg/ml i mjölk. För validering användes metoden vid analys av Hp i samlingsprover från 43 kliniskt friska kor, samt i 23 juverfjärdedelsprover från kor med misstänkt klinisk mastit. Samliga prover analyserades även med en kommersiell ELISA för jämförelse mellan metoderna (Tridelta Development Ltd., Irland) och resultaten i de två metoderna jämfördes. Detektionsgränsen för ELISA-metoden anges av tillverkaren till 0.3 µg/ml Hp i mjölk. Överrensstämelsen mellan metoderna var god även om de observerade nivåerna var generellt högre i ELISA-metoden än i biosensormetoden, i synnerhet vid analys av juverfjärdedelsproverna från kor med misstänkt mastit (Figur 2).



**Figur 2.** Bland-Altman plot för illustration av skillnaderna mellan resultat från analyser av haptoglobin (Hp) i mjölk med ELISA respektive biosensormetoden. Den genomsnittliga Hp-koncentrationen i provet ( $[\text{ELISA} + \text{biosensor}]/2$ ) och skillnaden mellan ELISA och biosensormetod ( $\text{ELISA} - \text{biosensor}$ ) på x- respektive y-axel.

*Hp och SAA i relation till celltalet i mjölk från juverfjärdedelar, samt i samlings- och tankmjölk (delstudie 2).*

I denna studie analyserades olika typer av mjölkprover (juverfjärdedelar; n=103, samlingsprover; n=165 och tankmjölksprover; n=96) analyserades med avseende på Hp,

SAA och celltal. Syftet med arbetet var dels att undersöka vilka koncentrationer av Hp och SAA som förekommer i olika typer av mjölkprover, dels att studera ev. samband mellan Hp, SAA och celltal. Resultaten (tabell 2) visade signifikanta samband mellan förekomst av SAA och celltal på alla nivåer (i juverfjärdedels-, samlings- samt tankmjölksprover). Förekomst av Hp uppvisade ett signifikant samband med celltalet i juverfjärdedels- och samlingsprover men ej i tankmjölksprover. Förekomst av det ena akutfasproteinet visade även ett signifikant samband med förekomst av det andra akutfasproteinet i juverfjärdedels- och samlingsprover men inte i tankmjölk.

**Tabell 2.** Samband mellan celltal (SCC) och förekomst av haptoglobin (Hp) respektive serum amyloid A (SAA) i juverfjärdedels-, samlings- och tankmjölksprover. Värdena i tabellen är p-värden från Chi-square-analys.

Typ av mjölkprov	Hp/SCC	SAA/SCC	Hp/SAA
Juverfjärdedelsmjölk	<0.0001	<0.0001	0.0028
Samlingsmjölk	<0.0001	<0.0001	0.0008
Tankmjölk	n.s	0.0013	n.s

n.s. = ej signifikant

*Hp och SAA i samlingsmjölk i relation till mjölkens sammansättning (delstudie 3).*

I denna studie analyserades samlingsprover (n= 89) med avseende på celltal, förekomst av Hp, förekomst av SAA, protein (totalt), kasein, kaseintal (kaseinets andel av totalt protein), proteolys, fett, laktos och mjölmängd. Arbetet utfördes delvis i samarbete med Kerstin Svennersten Sjaunja (Husdjurens utfordring och vård, SLU) samt Lotte Bach Larsen (Danmarks JordbrugsForskning, Foulum). Resultaten visade ett signifikant samband mellan förekomst av SAA och celltal, medan Hp uppvisade ett signifikant samband med mjölkens kaseininnehåll. Vid förekomst av både Hp och SAA erhöles ett signifikant samband med celltal, kaseininnehåll samt proteolys (Tabell 3). I studien analyserades även samband mellan celltal och de övriga kvalitetsparametrarna, varvid celltalet uppvisade ett signifikant samband med totalt protein, laktos, och proteolys.

**Tabell 3.** Samband mellan olika mjölk kvalitetsparametrar och förekomst av haptoglobin (Hp), serum amyloid A (SAA) respektive förekomst av både Hp+SAA i samlingsprover från 89 kliniskt friska kor. Resultaten kategoriserades i två grupper baserat på medianen för respektive parameter. Värdena i tabellen är p-värden från Chi-square-analysen.

Parameter	Median	Hp	SAA	Hp+SAA	SCC
Protein; totalt (%)	3.61	n.s.	n.s.	n.s.	0.01
Kasein (%)	2.72	0.02	n.s.	0.04	n.s.
Kaseintal	0.73	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Proteolys (eq Leu <sup>†</sup> )	1.07	n.s.	n.s.	0.05	0.04
Fett (%)	4.93	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Laktos (%)	4.50	n.s.	n.s.	n.s.	0.004
Mjölmängd (liter)	9.61	n.s.	n.s.	n.s.	0.03
SCC (celler/ml)	83 000	n.s.	< 0.0001	0.002	

n.s. = inte signifikant; † eq Leu = equivalent mM Leucine

## Diskussion

I tidigare undersökningar som beskriver förekomsten av Hp och SAA i mjölk har akutfasproteinerna i regel studerats utifrån perspektivet mastitdiagnostik. Undersökningar i mjölk är därför oftast genomförda med experimentella mastiter och med ett begränsat antal friska kor som kontroller. Det finns idag endast ett fåtal publicerade undersökningar, och i förekommande fall med ett begränsat antal djur, som belyser förekomsten av Hp och SAA i mjölk från ”friska kor”, dvs. kor vars mjölk levereras till mejeriet. Det finns inte heller några undersökningar av mjölkens innehåll av Hp och SAA i relation till dess sammansättning och egenskaper.

På grund av inledande problem rörande renframställning av de bovina formerna av Hp och SAA, tillika problem att hitta immunoreagens för de dessa, begränsade vi metodutvecklingsarbetet inom projektet till att ta fram en biosensormetod för Hp. En kommersiell ELISA-metod har istället använts för att analysera SAA i mjölken. Vi gjorde bedömningen att det för projektets framgång är viktigast att prioritera studierna rörande samband mellan förekomst av Hp och SAA i mjölk och förändringar i mjölkens sammansättning och egenskaper. Preliminära studier med en monoklonal antikropp mot bovint SAA (gåva från Kieran Walsh, Tridelta Development Ltd., Irland) visar dock att det torde vara relativt enkelt att tillämpa Biacore för analys av SAA i mjölk. Frågan huruvida SAA fördelar sig i mjölkens fettfas eller i skummjölken behöver dock undersökas. Om SAA återfinns i mjölkfettet kräver detta tillsats av lämplig detergent, för att förhindra att mjölkfettet ”sätter sig” på ytan under den tid proverna befinner sig i instrumentet.

Den utvecklade metoden bedömdes ha god potential vid rutinanalys av Hp i mjölk. Skillnaderna mellan resultaten som erhöles i ELISA och Biacore (Figur 2) förklaras sannolikt av skillnader vad avser deras metodernas principer för detektion (Hp i mjölkprovet binder till antikropp respektive hemoglobin). Biacoremotoden missgynnades i denna studie av att de flesta av proverna innehållande Hp härstammade från kor med klinisk mastit. Det är mycket troligt att skador i juvervävnaden resulterat i ett inflöde av blodkomponenter till mjölken och med stor sannolikhet innehöll dessa prover även (lyserade) röda blodkroppar och fritt hemoglobin. Mycket små mängder fritt hemoglobin är tillräckliga för att störa analysen, eftersom mjölkprovets innehåll av hemoglobin som kan binda till Hp på sensorytan än större än i mjölkprover från friska kor. Haptoglobin i mjölken skulle således kunna maskeras av en större mängd hemoglobin. Vid analys av mjölk från kliniskt friska kor är dock inte detta något problem och vi har inte heller sett samma skillnader mellan ELISA och Biacore när mjölk från kor med subkliniska mastiter analyserats med båda metoderna.

Vår studie innehåller mycket intressanta observationer på juverfjärdedelsnivå vad gäller förekomsten av Hp och SAA i relation till celltalet. Höga Hp-koncentrationer i en juverfjärdedel resulterade även i ett högt celltal i samma juverfjärdedel, emedan övriga juverfjärdedelar inte påverkades vad gäller förekomst av Hp. Däremot sammanföll förekomst av SAA och ett förhöjt celltal i samma juverfjärdedel ofta med förekomst av SAA även i de övriga juverfjärdedelarna trots att celltalet i dessa inte var förhöjt. Koncentrationen av SAA i samlingsprovet spåds således inte ut i samlingsmjölken i samma utsträckning som Hp, vilket skulle kunna förklara varför förekomst av SAA är vanligare än Hp i såväl samlingsprover som i tankmjölk. Subklinisk mastit i en eller flera juverfjärdedelar (definierat som ett förhöjt celltalet vid jämförelse med icke påverkade juverdelar) kunde i flera fall upptäckas genom förekomst av SAA i samlingsprovet, trots att samlingsmjölkens celltal inte var förhöjt.

Såväl Hp som SAA uppvisade samband med celltalet i juverdels- och samlingsprover, emedan det i tankmjölk endast kunde påvisas ett samband mellan förekomst av SAA och celltal. Förekomsten av akutfasproteinerna i tankmjölk var överraskande frekvent, Hp detekterades i 41% och SAA i 82% av de analyserade proverna (n= 96). Detta är mer frekvent än på juverfjärdedels- och samlingsnivå, vilket ev. skulle kunna bero på en viss ”snedfördelning” med avseende på celltalet i de insamlade tankmjölksproverna. Då vi inte kände till om det överhuvudtaget förekom mätbara halter Hp och SAA i tankmjölk, är proverna selekterade så att det är ungefär lika många prover med förhöjda som med normala celltal (median 258 000 celler per ml).

Förekomst av både Hp och SAA i samlingsmjölk uppvisade samband med för mejeriindustrin mycket viktiga mjölk kvalitetsparametrar, dvs. kaseinnehåll och graden av proteolys som ägt rum. Celltalet uppvisade i denna studie samband med totalt protein, laktos, mjölmängd och proteolys. Av dessa parametrar ger egentligen bara proteolysen ett specifikt mått på mjölkens kvalitet och värde som råvara. Det totala proteininnehåller omfattar även vassleproteinerna, och ger ingen information om proteinkvalitet. Laktos och mjölmängd används inte heller som kvalitetsparametrar, även om laktos ibland använts som en indirekt markör för mastit.

Våra resultat indikerar att akutfasproteinerna skulle kunna ge mer specifik information om mjölkens kvalitet än celltalet beträffande förändringar i mjölkens sammansättning och egenskaper i samband med mastit. I ett nytt SLF-projekt studeras samband mellan förekomst av akutfasproteiner och olika kvalitetsparametrar i färska, slumpmässigt uttagna tankmjölksprover för att ytterligare belysa värdet av Hp och SAA som alternativa markörer för råvarukvalitet.

### **Publikationer**

Resultaten från projektet har sammanställts för publicering i vetenskapliga tidskrifter som nedan:

M. Åkerstedt, L. Björck, K. Persson Waller and Å. Sternesjö (2006). Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. *Journal of Dairy Research* 73:299-305.

M. Åkerstedt, K. Persson Waller and Å. Sternesjö (2007). Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research* 74, 1-6 (in press).

M. Åkerstedt, L. Forsbäck, L. Bach Larsen, K. Persson Waller and Å. Sternesjö (2007). Haptoglobin and serum amyloid A in cows milk in relation to different milk quality parameters. Manuskript insänt till *Journal of Dairy Science*, januari 2007.

### **Övrig resultatförmedling till näringen**

Vi har deltagit och presenterat projekt och resultat som poster såväl som föredrag vid följande tillfällen:

-NORFA Workshop, Tallinn, June 9-11, 2004. Recent progress in quality and health aspects of milk components.

-5th International Colloquium on Acute Phase Proteins, 14-15 March 2005, Dublin, Ireland. M. Åkerstedt, L. Björck<sup>1</sup>, K. Persson Waller and Å. Sternesjö. Development of a rapid biosensor method for determination of haptoglobin in bovine milk.

- 4th IDF International Mastitis Conference, 12-15 June 2005, Maastricht, the Netherlands. M. Åkerstedt, L. Björck, K. Persson Waller and Å. Sternesjö. Development of a rapid biosensor method for determination of haptoglobin in bovine milk.

-NORFA Workshop, Reykjavik, August 20-23, 2005. Milk products and components in health and disease.

- 6th International Colloquium on Acute Phase Proteins, 24-26 August 2006, Copenhagen, Denmark. M. Åkerstedt, K. Persson Waller and Å. Sternesjö. Acute phase proteins-alternative markers for milk quality in relation to udder health?

- 27<sup>th</sup> IDF World Dairy Congress, 18-23 October 2006, Shanghai, China. M. Åkerstedt, K. Persson Waller and Å. Sternesjö. Acute phase proteins-alternative markers for milk quality in relation to udder health?

-Biacore Norden 2006. 14-15 September 2006, Uppsala, Sweden. Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. M. Åkerstedt and Å. Sternesjö.

### Referenser

- Auldist, M.J. and I.B. Hubble (1998). Effects on mastitis on raw milk and dairy products. *Austr. J. Dairy Technol.* 53, 28-36.
- Eckersall, P.D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan and J. L. Fitzpatrick (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record* 148, 35-41.
- Grönlund U, C. Hultén, P.D. Eckersall, C. Hogarth and K. Persson Waller (2003). Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Research* 70 (4), 379-386.
- Grönlund, U., C.H. Sandgren and K. Persson Waller (2005). Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Veterinary Research* 36 (2), 191-198.
- Hamann, J. (2005). Diagnosis of mastitis and indicators of milk quality. In *Mastitis in dairy Production*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Hiss, S., M. Mielenz, R.M. Bruckmaier and H. Sauerwein (2004). Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *Journal of Dairy Science* 87 (11), 3778-3784.
- McDonald, T.L., M. A. Larson, D. R. Mack and A. Weber (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (M-SSA3) into colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82, 203-211.
- Mottram, T. (1997) Automatic monitoring of the health and metabolic status of dairy cows. *Livestock Production Science* 48, 209-217.
- Murata, H., N. Shimada and M. Yoshioka (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal* 168 (1), 28-40.
- Nielsen, B. H., S. Jacobsen, P.H. Andersen, T.A. Niewold and P.M.H. Heegard (2004). Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Veterinary Record* 154 (12), 361-365.
- Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 35 (2), 163-187.



Sandholm, M. (1995) Detection of inflammatory changes in milk. In: The bovine udder and mastitis. Editors: M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen and S. Pyörälä. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Helsinki.

Wiking, L., M.B. Frost, L.B. Larsen and J.H. Nielsen (2002). Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft* 57 (4), 190-194.