

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Antonela Špehar, apsolvant

Diplomski studij: Zootehnika

Smjer: Specijalna zootehnika

**USPOREDBA METODA RADIJALNE IMUNODIFUZIJE I REFRAKTOMETRIJE
ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA IMUNOGLOBULINA (IgG) U KOLOSTRUMU
KRMAČA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Antonela Špehar, apsolvant

Diplomski studij: Zootehnika

Smjer: Specijalna zootehnika

**USPOREDBA METODA RADIJALNE IMUNODIFUZIJE I REFRAKTOMETRIJE
ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA IMUNOGLOBULINA (IgG) U KOLOSTRUMU
KRMAČA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc.dr.sc. Vladimir Margeta, predsjednik
2. dr.sc. Kristina Gvozdanović, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE..... | 2 |
| 2.1. Kolostrum..... | 2 |
| 2.2. Kemijski sastav kolostruma..... | 5 |
| 2.3. Imunoglobulini..... | 9 |
| 2.4. Kolostrometar..... | 12 |
| 2.5. Refraktometrija..... | 13 |
| 2.6. Metoda radijalne imunodifuzije..... | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE RADA..... | 17 |
| 3.1. Životinje i prikupljanje uzoraka..... | 17 |
| 3.2. Analiza Brix refraktrometrom..... | 17 |
| 3.3. Analiza RID metodom..... | 18 |
| 3.4. Statistička obrada podataka..... | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 19 |
| 4.1. Kemijski sastav kolostruma..... | 19 |
| 4.2. Uspješnost BRIX i RID metode za utvrđivanje sadržaja imunoglobulina u kolostrumu..... | 21 |
| 4.3. Rasprava..... | 24 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 26 |
| 6. POPIS LITERATURE..... | 27 |
| 7. SAŽETAK..... | 30 |
| 8. SUMMARY..... | 31 |
| 9. POPIS TABLICA..... | 32 |
| 10. POPIS SLIKA..... | 33 |
| 11. POPIS GRAFIKONA..... | 34 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Svinjogojstvo je grana stočarstva kojoj je cilj uzgoj svinja, proizvodnja svinjskog mesa i prerađevina. Posebna pozornost posvećuje se kvaliteti mesa.

Dva su izvorna oblika svinja: europska divlja svinja (*sus scrofa ferus*) i azijska divlja svinja (*sus vitatus*). Pasmine svinja najčešće su podjeljene prema stupnju oplemenjivanja i proizvodnom tipu. Svinje prema stupnju oplemenjivanja dijelimo na plemenite pasmine (landras, durok, hemšir, jokšir, pietren i dr.), primitivne pasmine (turopoljska svinja, šiška, mangulica i dr.) i prijelazne pasmine (crna slavonska svinja, berkšir i dr.).

U intenzivnoj proizvodnji poželjan je što veći broj oprasene prasadi, ali i odbijene prasadi po krmači nakon dojnog razdoblja. Kako su svinje najplodnije od svih domaćih životinja u rasplodu mogu ostati i do 8 godina te u tom periodu dati do 20 legala prasadi (Kralik i sur., 2007.).

Prva hrana prasadi je kolostrum. Kolostrum je specifična vrsta mlijeka koju krmača izlučuje prvih par sati nakon prasenja. To je mlijeko koje sadrži visoku količinu imunoglobulina (koji prasetu služe kao obrana organizma u prvim danima života), proteina, masti, vitamina i minerala. Iznimno je važno da nakon prasenja sva prasada posisa kolostrum što prije, jer se sastav kolostrum brzo mijenja i prelazi u obično krmačino mlijeko. Razdoblje od prasenja do odbića je osjetljiviji dio proizvodnog ciklusa i od velike je važnosti za daljnji rast i razvoj prasadi.

Procjena kvalitete kolostruma na farmi treba biti brza i jednostavna, točna i cjenovno prihvatljiva. Za tu svrhu postoje različite metode, a najpogodnije su radijalna imunodifuzija i refraktometrija.

Radijalna imunodifuzija je najpreciznija metoda određivanja sadržaja imunoglobulina u kolostrumu, ali to je također metoda kod koje je potrebno čekati do 24 sata da bi se dobili rezultati. Druga metoda koja daje obećavajuće rezultate, ali i brzo dobivene rezultate je refraktometrija. To je metoda određivanja indeksa loma svjetlosti. Refraktometrijski određena suha tvar u vodi predstavlja topljive tvari. Suha tvar se određuje refraktometrom.

Cilj ovog rada je ovog rada je usporediti dvije metode za mjerenje koncentracije imunoglobulina u kolostrumu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Kolostrum

Kolostrum ili mljezivo je prvo mlijeko kojeg mliječna žlijezda luči prva tri dana nakon poroda. Specifično je zbog visoko energetske vrijednosti i visokog sadržaja imunoglobulina važnih za zaštitu novorođenčeta. Podložno je brzom grušanju zbog visokog sadržaja albumina i globulina (Babić i sur., 2003.). Izlučuje se iz mliječne žlijezde životinje nakon porođaja te unutar nekoliko sati. Bogato je proteinima, mastima, vitaminima te imunoglobulinima. Presudno je za opstanak novorođene životinje, kako radi hrane, tako i radi zaštite samog organizma. Procjenjuje se da prasad treba 160 do 170 ml kolostruma po kg tjelesne težine za preživljavanje (Devillers i sur., 2007.).

Prasad neposredno nakon prasenja počinje sisati. Nekoliko faktora kao što su težina, redosljed rođenja i veličine legla utječu na unos kolostruma (Le Dividich i sur., 2005.). Veća prasad posisa veću količinu kolostruma nego manja prasad (Le Dividich i sur., 2005.). Prasad koja se oprasi prva imati će prednost u odnosu na prasad koja se oprasila kasnije i zato će birati sise koje proizvode više mlijeka (Rooke i Bland, 2002.).

U istraživanju kojeg su proveli Hemsworth i sur. (1976.) uočeno je da je sva prasad u prosjeku sisala sedam sisa tijekom prva četiri sata nakon prasenja. Veća legla prasadi rezultiraju većim natjecanjem između prasadi u borbi za sise koje proizvode najviše mlijeka. Devillers i sur. (2007.) u svom istraživanju navode da su prosječna težina prilikom rođenja prasadi i veličina legla u negativnoj korelaciji. Odnosno s povećanjem veličine legla, porođajna masa prasadi opada i obrnuto. Za svako dodatno prase u leglu prosjek porođajne težine smanjiti će se za 25 g. Cabrera i sur. (2010.) dokazali su da što je duži period dojenja prasad je otpornija. U tom istraživanju, cilj je bio dokazati da duži period dojenja rezultira boljim prosječnim dnevnim povećanjem tjelesne težine te smanjenim mortalitetom (Eliasson i Isberg, 2011.).

Kod sisavaca postoje dvije faze stvaranja i izlučivanja mlijeka. Kolostrogeneza, odnosno nastajanje kolostruma te laktogeneza, nastajanje mlijeka (Farmer i sur., 2006.). Kada dođe do izlučivanja mlijeka stimulans dojenja potiče njegovo održavanje te se taj proces naziva galaktopoeza (Farmer i sur., 2006.). Kvaliteta i količina mlijeka krmače utječe na masu i vitalnost prasadi u prva 2-3 tjedna. Na količinu izlučenog mlijeka utječu dob krmače, pasmina, veličina legla i učestalost dojenja, dok kemijski sastav mlijeka ovisi o

stadiju laktacije i načinu hranidbe (Kralik i sur., 2007.). Dužina laktacije u svinja može biti 6-8 tjedana. Krmače može proizvesti od 200 do 400 litara mlijeka (Kralik i sur., 2007.).

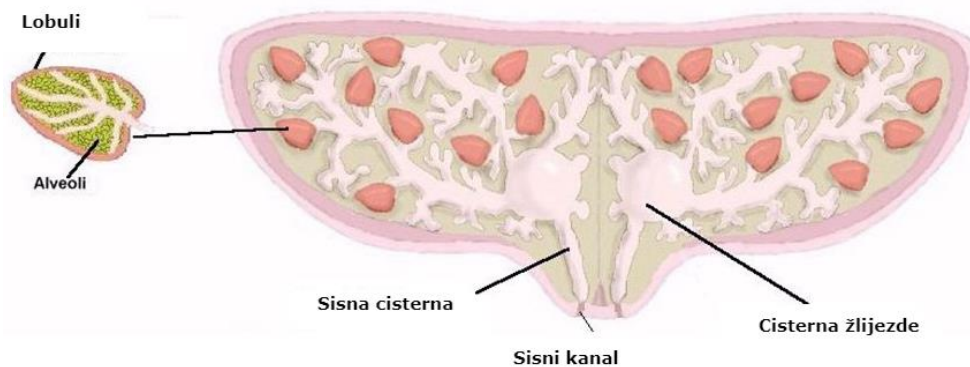


Slika 1. Prasad tijekom prvih par sati nakon prasenja

(Izvor: <https://www.viv.net>)

Mliječna žlijezda svinja počinje proizvoditi kolostrum prije prasenja, te se proizvodnja kolostruma nastavlja i do 48 h nakon početka dojenja (Klobasa i sur., 1987.). Postupno se kolostrum zamjenjuje zrelim mlijekom. Mliječna žlijezda krmača sastoji se iz niza kanalića čiji se broj i veličina tijekom razdoblja bređosti značajno povećaju. Ti kanalići se računaju u manje kanaliće (*ductules*). Na kraju svakog kanalića je skup malih vrećica koje se nazivaju alveole, skup alveola čini režnjić, a skup režnjića naziva se režanj. Svaka sisa sadrži između 15 i 20 režnjeva, a u svakom režnju nalazi se po jedan mliječni kanal (Čuljak, 2016.).

Hranjive tvari iz krvi sintetiziraju se u epitelnim stanicama alveola u mliječne komponente i transportiraju se u lumen alveola gdje se stvara mlijeko. Međutim, svinje u svojim mliječnim žlijezdama nemaju cisterne gdje se mlijeko čuva, već samo alveole i mliječne kanale (Hartmann i Holmes, 1989.). Sve dok prasad sisa mlijeko, mliječne žlijezde ga nastavljaju proizvoditi. Prasad dobiva pasivni imunitet putem imunoglobulina u kolostrumu. Vlastiti imunološki sustav aktivira se kada organizam može sam proizvesti antitijela. Imunoglobulini mogu prelaziti iz gastrointestinalnog trakta u krv do zatvaranja crijevne propusnosti (Rooke i Bland, 2002.). Starost krmače utječe na imunološku sposobnost njene prasadi (Cabrera i sur., 2010.).



Slika 2. Presjek mliječne žlijezde krmače
(Izvor: <https://slideplayer.com>)

Nakon prasnja nužno je da prasad posisa kolostrum. Učestalost sisanja se razlikuje, kreće se od 20 puta tijekom dana kada je prasad tek oprasena do 10 puta kod nešto starije prasadi. Sisanje kolostruma važno je s aspekta preživljavanja prasadi u leglu te dobivanja većeg broja odbijene prasadi po krmači. Povećanje broja prasadi po krmači ima negativan utjecaj na prosječnu težinu prasadi. Sisanjem kolostruma prasad dobiva potrebne imunoglobuline koji izgrađuju pasivnu imunost. Tijekom prva dva tjedna života sisanje krmačinog mlijeka osigurava sve potrebe prasadi za hranjivim tvarima (Čuljak, 2016.). Željezo se daje par dana nakon prasnja s ciljem sprječavanja anemije. Kruta hrana daje se već od sedmog dana starosti, u hranilice da prasad kroz igru i njuškanje počne konzumirati hranu, u ovom slučaju praškastu ili u obliku briketa.

Prva dva tjedan nakon prasnja najkritičnija je faza u svinjogojskoj proizvodnji. Gubici tijekom tog razdoblja mogu iznositi i do 10 % (Dewey i sur., 2008.). Gubici do 5 % smatraju se prihvatljivima, ekonomski gledano. Razlozi gubitaka su mala porođajna težina, prignječenja, pothlađenost, proljev i drugo. Čak 20 % mortaliteta prasadi tijekom sisajućeg razdoblja posljedica je pojave proljeva kod prasadi. Kastracija prasadi se obično radi između 10. i 15. dana života, ali postoji i rana kastracija u dobi od trećeg od četvrtog dana. Sam postupak izaziva stres kod prasadi (Uremović i Uremović, 1997.; Čuljak, 2016.).

Sastav mlijeka nakon poroda kod sisavaca drastično se mijenja. Kod krmača kolostrum se izlučuje u prva 24 sata nakon prasnja (Devillares i sur., 2004.). Mlijeko u periodu između 24 i 96 sati nakon prasnja naziva se tranzicijskim mlijekom (Theil i sur., 2014.).

Proteini kolostruma i mlijeka ne samo da snabdijevaju novorođenu prasid potrebnim aminokiselinama, već imaju i ulogu u imuno zaštiti. Imunoglobulini se transportiraju kroz epitelne stanice sise putem receptoriziranog procesa, za koji se smatra da uključuje neonatalni Fc-receptor (FcRn) u slučaju IgG1 i IgG2 te polimerni imunoglobulinski receptor (pIgR) za IgA i IgM (Theil i Hurley, 2013.).

Kolostrum nakon prasnja sadži najveću koncentraciju imunoglobulina, s prosječnim koncentracijama ukupnih IgG, IgA i IgM od približno 65, 13 i 8 g/L (Hurley, 2018.). Ove koncentracije imunoglobulina ostaju poviše tijekom prvih 6 sati nakon prasnja, idućih 12 sati opadaju za otprilike 30-45 % te nastavljaju znatno opadati tijekom idućih nekoliko dana. Koncentracije IgG i IgM u mlijeku potom iznose 1 i 1,6 g/L, dok koncentracija IgA iznosi približno 4 g/L (Hurley, 2018.).

Kolostrum nastaje u procesu koji se naziva kolostrogeneza (Barrington i sur., 2001.). Razlika između kolostruma i mlijeka je visoka koncentracija kolostralnih imunoglobulina, posebno imunoglobulina G (IgG). Konačni stadij laktacije je nastanak i prijenos IgG preko posteljice iz majčine cirkulacije u mliječne izlučevine (Čuljak, 2016.). Prijenos IgG započinje nekoliko tjedana prije porođaja, a prestaje naglo neposredno prije porođaja (Girard, 1986.). Tijekom kolostrogeneze, homologna i heterologna IgG koncentracija je 100 puta viša nego koncentracija serumskog albumina (Čuljak, 2016.). Laktogeni hormoni, estrogen i progesteron, neophodni su za inicijaciju i prijenos IgG u mliječnu žlijezdu te jednim dijelom utječu na samu kolostrogenezu (Barrington i sur., 2001.).

2.2. *Kemijski sastav kolostruma*

Prosječna količina izlučenog kolostruma je 3,3 kg do 3,7 kg (Budimir i sur., 2014.). Prasad mora posisati kolostrum unutar nekoliko sati od prasnja, jer se mijenja propusnost stjenke crijeva za imunoglobuline što utječe na razvoj pasivne imunosti prasadi. Prasad može konzumirati različitu količinu kolostruma, ovisno o njihovoj mogućnosti da dođu do sisa krmače (Quesnel i sur., 2012.). Prijelaz kolostruma u mlijeko događa se vrlo brzo nakon prasnja, unutar nekoliko sati. Najveća razlika očituje se u koncentraciji imunoglobulina koji su najvažniji za stjecanje pasivne imunosti i preživljavanje prasadi (Budimir i sur., 2014.).

Sastojci mlijeka su proteini, masti, ugljikohidrati, minerali i vitamini. Na sastav mlijeka utječu brojni čimbenici. U kolostrumu, u prva 24 h nakon prasnja, prisutne su visoke koncentracije imunoglobulina, neki mikrominerala i vitamina te hormona rasta; u

manjoj koncentraciji je prisutna laktoza (usporedivši te iste komponente s zrelim mlijekom). Masti u mlijeku povećavaju se u razdoblju od 2 do 4 dana laktacije. Hranidba krmača može utjecati na koncentracije masti, vitamina, minerala te nekih specifičnih masnih kiselina; genetika i okolišni čimbenici također utječu na kemijski sastav kolostruma (Hurley, 2018.).

Tablica 1. Razlike u sastavu kolostruma i mlijeka kod krmača (100 ml; Budimir i sur., 2014.)

| Sastojci | Kolostrum | Mlijeko |
|-----------------|------------------|----------------|
| Voda, g | 75,2 | 81,3 |
| Laktoza, g | 3,4 | 5,3 |
| Masti, g | 5,9 | 7,6 |
| Proteini, g | 15,1 | 5,5 |
| IgG, g | 9,56 | 0,09 |
| IgA, g | 2,12 | 0,53 |
| IgM, g | 0,91 | 0,14 |

Lin i suradnici (2008.) objavili su studiju o probavljivosti imunoglobulina i aminokiselina u prva tri dana života prasadi. 12 sati nakon prasnjenja, kolostrum sadrži 21,9 % suhe tvari, 21,9 % masti i 0,91 % sirovog pepela. Od aminokiselina, u najvećoj koncentraciji ima glutaminske kiseline i glutamina (7,8 %), potom lizina (6,6 %) i prolina (5,6 %). Arginina ima u manjim postocima (2,1 %). Kolostralna koncentracija IgG iznosi 3.8 g/L (Lin i sur., 2009.).

Tablica 2. Kemijski sastav kolostruma krmača (Lin i sur., 2009.)

| Sastojci | Rezultati | Sastojci | Rezultati |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| Suha tvar, % | 21,9 ± 0,1 | Sirovi pepeo % | 0,91±0.05 |
| Masti, % | 21,92± 1,83 | Lys | 6,59±0,26 |
| IgG, g/L | 3,8±0,7 | Met | 1,05±0,06 |
| Ala | 2,03±0,09 | Phe | 2,03±0,15 |
| Arg | 2,12±0,09 | Pro | 5,63±0,09 |
| Asp + Asn | 3,81±0,31 | Ser | 2,74±0,12 |
| Cys | 0,73±0,01 | Thr | 2,67±0,16 |
| Gly | 1,96±0,09 | Trp | 0,66±0,01 |
| Glu + Gln | 7,80±0,55 | Tyr | 1,85±0,10 |
| His | 1,17±0,06 | Val | 3,25±0,20 |
| Ile | 1,86±0,13 | | |
| Leu | 4,46±0,24 | | |

Lin i sur. (2009.) provedli su istraživanje na 12 muških prasadi starih jedan dan, križanaca jorkšira i landrasa te duroka i jorkšira s ciljem utvrđivanja probavljivosti proteina kod novorođene prasadi. Unos kolostruma kod te prasadi iznosio je u prosjeku 330 ml/d u dobi od prvog do trećeg dana starosti. Prasad je normalno dobivala na težini tijekom trodnevnog razdoblja hranjenja, u prosjeku 140 g/d. Koncentracija IgG u plazmi prasadi u dobi od 3 dana bila je 3,4±0,3 g/L.

Tablica 3. Prirast novorođene prasadi u prva tri dana sisanja (Lin i sur., 2009.)

| Starost, d | Težina, g |
|-------------------|----------------------------|
| 1 dan | 1556.6±67.7 |
| 2 dan | 1691.2±65.9 |
| 3 dan | 1836.8±64.8 |
| Starost, d | Dnevni prirast, g/d |
| 1-2 dana | 134.4±10.6 |
| 2-3 dana | 145.8±8.1 |
| 1-3 dana | 140.0±7.6 |

Isti autori utvrdili su da kod trećeg dana nakon prasnjenja, najzastupljenija aminokiselina u plazmi bio je glicin (738,5 μmol/L), potom valin (681,6 μmol/L), prolin (607,5 μmol/L) i glutamin (587,8 μmol/L). Koncentracija arganina u plazmi bila je niska, u usporedbi s prolinom i glicinom. Metaboliti koji su potrebni za ciklus ureje, bili su prisutni u niskoj koncentraciji.

Tablica 4. Koncentracija IgG i aminokiselina u krvnoj plazmi prasadi stare tri dana (Lin i sur., 2009.)

| Sastojci | Rezultati | Sastojci | Rezultati |
|----------|------------|----------|------------|
| IgG, g/L | 3.4±0.3 | | |
| Ala | 464.2±39.7 | Leu | 331.2±24.2 |
| Arg | 231.8±24.0 | Lys | 246.1±24.5 |
| Asn | 165.9±13.4 | Met | 73.8±5.8 |
| Asp | 18.6±6.1 | Orn | 164.5±11.3 |
| β-Ala | 10.4±0.8 | Phe | 118.0±9.5 |
| Citrulin | 159.7±9.2 | Pro | 607.5±27.6 |
| Cys | 261.3±19.0 | Ser | 243.1±28.1 |
| Glu | 84.7±25.4 | Taurin | 78.7±8.2 |
| Gln | 587.8±34.4 | Thr | 481.1±33.6 |
| Gly | 738.5±59.9 | Trp | 43.4±5.3 |
| His | 117.7±9.8 | Tyr | 258.9±19.6 |
| Ile | 149.1±11.1 | Val | 681.6±29.6 |

Voda je ključna komponenta mliječne sekrecije. Djeluje poput medija koji omogućuje miješanje drugih sastojaka potrebnih za sintezu i izlučivanje mlijeka. Izlučivanje vode kao dijela mlijeka, povezano je sa sintezom i izlučivanjem ugljikohidrata mlijeka (laktoze) u sisama krmača. Ukupna suha tvar određuje se gravimetrijski isparavanjem vode iz uzoraka na temperaturama ispod 100 °C. Sukladno tome, ukupni sadržaj suhe tvari uključuje sve organske i anorganske komponente (Hurley, 2018.).

Laktoza je glavni ugljikohidrat u mlijeku te je zbog svoje osmolarnosti jedna od važnijih komponenti. Sinteza laktoze u mliječnoj žlijezdi povezana je s crpljenjem vode u sekretornoj stanici vezikule (Peaker, 1983.).

Nakon prasnjenja, postotak masti u kolostrumu kreće se od 4,9 % do 10,9 % s prosjekom od 6,4 %. Prosječni sadržaj masti kreće se od 5,9 % do 6,4 % do 18h nakon prasnjenja, a zatim se povećava na oko 8 % do 24h nakon prasnjenja (Casapo i sur.,1996.). Prosječni postotak masti relativno je stabilan od 7,0 % do 7,6 % (Theil i sur., 2014.). Udio kazeina u proteinima kolostruma nakon prasnjenja je u rasponu od 9 % do 32 % (Caspo i sur., 1996.). Koncentracija kazeina povećava se od 30 % do 45 % 24h nakon prasnjenja, dok koncentracija imunoglobulina značajno opada. β -laktoglobulin je glavni protein sirutke u mlijeku. Koncentracija mu je relativno konstantna od perioda prasnjenja do sedmog dana laktacije, 10-15 mg/ml (Hurley i Bryson, 1999.). Koncentracija α -laktalbumina najniža je u kolostrumu (1,8 – 2,0 mg/ml) i postupno se povećava tijekom prvih 7 dana laktacije na oko 3,3 mg/ml (Hurley i Bryson, 1999.).

Kazeini su posebna skupina proteina koji se nalaze samo u mlijeku. U mlijeku krmača prisutni su α S1 – kazein (CSN1S1), α S2-kazein (CSN1S2), β -kazein (CSN2) i κ -kazein (CSN3) (Theil i sur., 2013.). Koncentracija kazeina u krmačinom mlijeku nakon prasnjenja raste od 9 % do 32 %. Nakon 24h koncentracija kazeina je od 30 % do 45 % (Csapo i sur., 1996.), dok u zreom mlijeku njegova koncentracija iznosi 50 % do 55 % (Richert i sur., 1997.). Ukupni sadržaj proteina sirutke u kolostrumu nakon prasnjenja je 90 % nakon čega dolazi do smanjenja udjela. Tako u u zreom mlijeku koncentracija proteina sirutke iznosi otprilike 50 % (Csapo i sur., 1996.).

2.3. Imunoglobulini

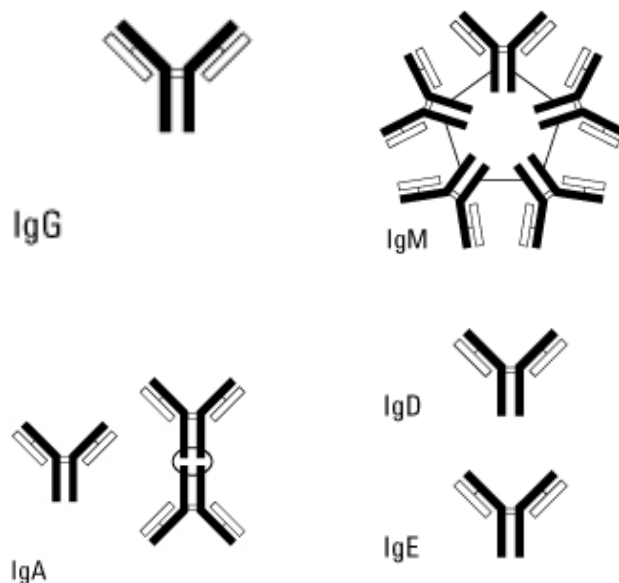
Funkcija imunološkog sustava je da štiti organizam od vanjskih uzročnika bolesti. Sve vrste sisavaca prilikom rođenja su imunokompetentne, a da bi postale kompetentne, imunosni sustav se mora potpuno razviti (Božić, 2006.). Nakon poroda, mliječna žlijezda sisavaca unutar prvih 72 sata proizvodi kolostrum. Kolostrum sadrži bitne sastojke potrebne za zaštitu zdravlja novorođene životinje (Božanić, 2004., Quesnel i sur., 2014.). Zahvaljujući kolostrumu, novorođena jedinka steče pasivnu imunost koja mu služi za obranu organizma u prvim tjednima života. Kolostrum je složena biološka tekućina, bogata imuno faktorima (imunoglobulini, leukociti, laktoferini, lizozimi, citokini), faktorima rasta te faktorima za

obnovu tkiva (Božanić, 2004., Quesnel i sur., 2014.). Koncentracije imunoglobulina u kolostrumu najviše su u prvih nekoliko sati nakon prasnja. U prvih 6 sati koncentracija IgG u kolostrumu je visoka, do 12 sata nakon prasnja koncentracija opada za gotovo 50%, te se nastavlja opadati (Hurley, 2018.) Pasivna imunost stječe se transplacentalnim ili kolostralnim prijenosom maternalnih protutijela, ovisno o vrsti životinje, odnosno o građi placente.

Kako građa placente nije jednaka kod svih vrsta životinja tako ni prijenos pasivne imunosti nije kod svih životinja jednak. Kod glodavaca i primata, nailazimo na hemoendotelialnu, tj. hemokorijalnu posteljicu, koje su vrlo propusne za majčina protutijela, što znači da su te jedinice odmah nakon rođenja zaštićene protutijelima (Božić, 2006. Friess i sur., 1980.). Druge vrste životinja, poput prasadi, teladi, janjadi, jaradi, štenadi i mačića pasivnu imunost stječu sisanjem kolostruma, u prvih 24 sata nakon rođenja. Naime tada je proteolitička aktivnost u probavnom sustavu niska. Epitel crijeva je najpropusniji za proteine upravo prvog dana rođenja, a crijevna mikroflora još nije uspostavljena (Božić, 2006., Friess i sur., 1980.).

Imunoglobulini su glikoproteini sastavljeni od jedne ili više jedinica, a svaka sadrži četiri polipeptidna lanca; dva identična teška lanca (H) i dva identična lagana lanca (L). Teški i lagani lanci drže se zajedno kombinacijom nekovalentnih interakcija i kovalentnih međulančanih disfluidnih veza, tvoreći dvostranu simetričnu strukturu (Janeway, 2001.).

Postoji pet osnovnih klasa imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. Razlikuju se prema vrsti teškog lanca koji se nalazi u molekuli. IgG molekule sastavljene su od teških lanca poznate kao gama - lanci; IgM imaju mu – lance; IgA imaju alfa – lance; IgD imaju delta – lance, a IgE imaju ipsilon – lance. Upravo te razlike u polipeptidnim teškim lancima omogućuju funkcioniranje imunoglobulina kod različitih imunoloških reakcija. Iako postoji pet različitih teških lanaca, postoji samo dva glavna tipa lakih lanaca: kappa (κ) i lambda (λ). Klase antitijela razlikuju se po valenciji kao rezultat različitog broja Y-sličnih jedinica (monomera) koji formiraju kompletan protein. IgG je monomer; klasa Ig nastala kao dio sekundarnog imunološkog odgovora na antigen (Janeway, 2001.).



Slika 3. Strukture imunoglobulina

(Izvor: <https://www.thermofisher.com/hr/>)

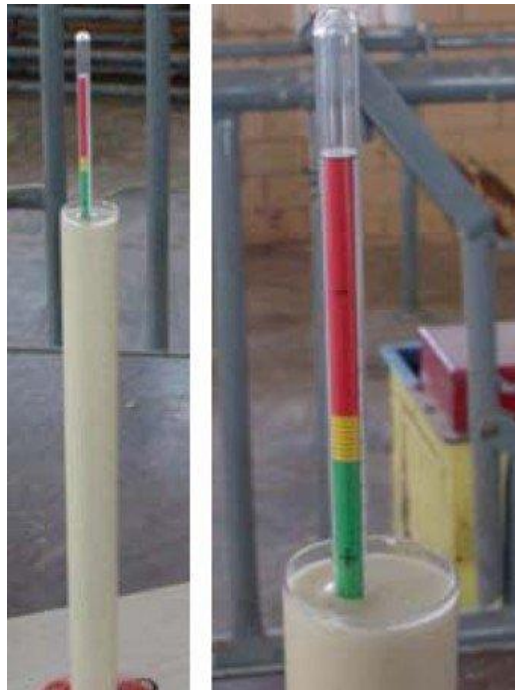
Prasad je rođena bez imunoglobulina u krvi. Zato je nužno da nakon prasanja sva prasad posisa kolostrum koji im daje određenu količinu energije i pasivnu imunost prije nego razviju vlastitu (King'ori, 2012.). IgG su predominantni u kolostrumu, dok su u mlijeku to IgA. Imunoglobulini su specifični za antigene kojima je izložena krmača. U gastrointestinalnom sustavu glavnu ulogu ima IgA koji je otporan na djelovanje proteolitičkih enzima. U kolostrumu se nalazi 40 % IgA, 80 % IgM i 100 % IgG koji su nastali u krvi krmača (Čuljak, 2016.).

Koncentracije imunoglobulina IgM, IgA i IgG ovise i o broju prasnja krmače. Od prve do treće bređosti dolazi do smanjenja IgA i IgG, a koncentracija im se povećava od četvrte pa da zadnje bređosti. Broj prasnja povezan je s izloženošću životinje različitim antigenima. Koncentracija imunoglobulina niža je u sisnim regijama koje se nalaze u kaudalnom dijelu tijela naspram onih koje se nalaze u kranijalnom dijelu tijela (Čuljak, 2016., Farmer i Quesnel, 2008.). Prilikom određivanja koncentracije imunoglobulina u kolostrumu različitih krmača važno je da vrijeme uzoraka približno isto, a zbog mogućnosti promjene sastava kolostruma. Najveće promjene koncentracije imunoglobulina događaju se tijekom prvih 24 h nakon prasnja

2.4. Kolostrometar

Kolostrometar (hidrometar) je instrument jednostavne primjene, napravljen da pluta u kolostrumu i mjeri specifičnu težinu imunoglobulina pomoću obojane ljestvice kalibrirane u miligramima po mililitru (mg/mL). Napravljen je od krhkog stakla pa prilikom rukovanja treba biti oprezan. Kolostrometar nam služi za brzo odvajanje kvalitetnog od nekvalitetnog kolostruma (<https://extension.psu.edu>).

Kolostrometar se stavlja u posudu u kojoj se nalazi kolostrum, zelena boja ukazuje da u kolostrumu ima >5 mg/ml imunoglobulina, žuto ukazuje da kolostrum sadrži 20 do 50 mg/ml, dok crvena boja ukazuje da kolostrum sadrži <20 mg/ml imunoglobulina. Količinu imunoglobulina u kolostrumu treba što prije izmjeriti zato što je kolostrum pogodan za razvoj bakterija. Što više imunoglobulina se nalazi u kolostrumu, veće će biti i očitavanje na kolostrometru. Za što preciznije očitavanje, kolostrometar se treba koristiti pri sobnoj temperaturi ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pri nižim temperaturama, dolazi do visokog očitavanja imunoglobulina, dok pri višim temperaturama dolazi do nižeg očitavanja imunoglobulina (<https://extension.psu.edu>).



Slika 4. Kolostrometar

(Izvor: <https://extension.psu.edu/>)

2.5. Refraktometrija

Refraktometrija je metoda određivanje indeksa loma svjetlosti. Obavlja se refraktometrom, mjerenjem kuta pod kojim se svjetlosna zraka lomi pri prijelazu iz istraživane tekućine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Budući da je indeks loma otopina razmjerna njihovoj koncentraciji, refraktometrija služi i kao analitička tehnika za određivanje koncentracije šećernih sokova, voćnih sirupa, marmelada, masti u mlijeku i alkohola u alkoholnim pićima (Bielmann i sur., 2010.). Kako je upotreba kolostrometra na farmi nezgodna zbog njegove krhkosti, sve više se primjenjuje refraktometar za određivanje sadržaja imunoglobulina u kolostrumu. Korištenjem svega par kapljica, pri bilo kojoj temperaturi, može se odvojiti kvalitetan od nekvalitetnog kolostruma (Bielmann i sur., 2010.). Brix refraktometri, poznati kao i refraktometri šećera, najčešće se koriste u prehrambenoj i vinskoj industriji za procjenu sadržaja šećera. Jednostavni su za korištenje, kalibraciju, čišćenje i održavanje. Uzgajivači goveda sve više koriste refraktometar za procjenu koncentracije imunoglobulina u kolostrumu i/ili mjerenju i praćenju ukupne suhe tvari u mlijeku (Bielmann i sur., 2010.). Iako refraktometar značajno pomaže u mjerenju kvalitete kolostruma, još uvijek nedostaje pouzdan i lak test za mjerenje stupnja kontaminacije u kolostrumu. Visoki broj bakterija u kolostrumu može ometati pasivni prijenos imuniteta te tako predstavljati rizik da se tele razboli, iako kolostrum sadrži visoku razinu imunoglobulina (Bielmann i sur., 2010.).



Slika 5. Digitalni Brix refraktometar

(Izvor: <https://www.sperdirect.com>)

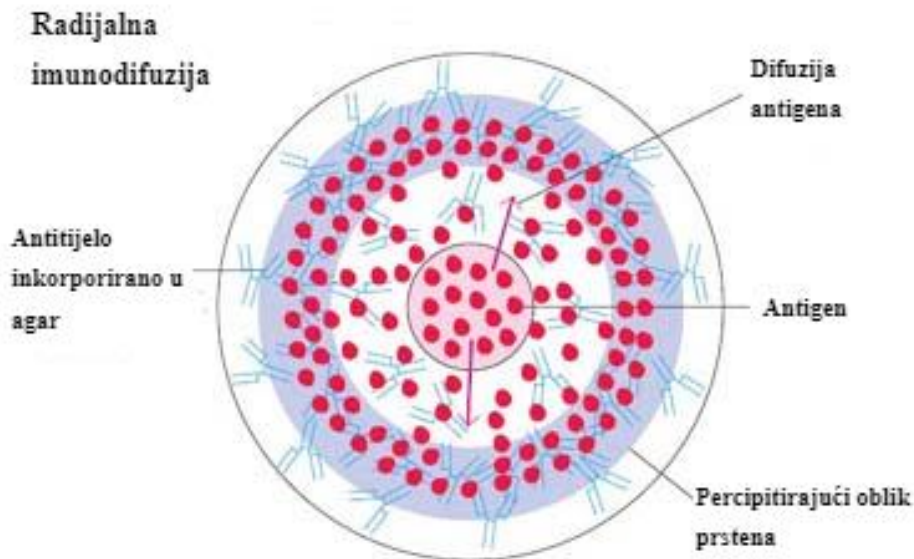
Quigley i sur. (2013.) proveli su istraživanje koristeći Brixov refraktometar za procjenu koncentracije imunoglobulina u kolostrumu goveda te usporedili dobivene rezultate s rezultatima RID i TIA (turbidimetrijski imunološki test) analize. Prosjek Brixovih rezultata iznosio je $23,8 \pm 3,5$, dok je koncentracija imunoglobulina izmjerena RID analizom iznosila $73,4 \pm 26,2$ g/L. Koncentracija imunoglobulina izmjerena TIA analizom iznosila je $67,5 \pm 25,0$ g/L. Postotak rezultata dobivenih Brixovim refraktometrom visoko je povezan ($r=0,75$) s koncentracijama imunoglobulina dobivenih RID analizom. Mjerenje imunoglobulina TIA metodom su u korelaciji sa Brix ($r=0,63$) i RID ($R=0,87$) mjerenjima, iako mjerenja imunoglobulina Brix i RID metodom nisu davala ujednačena, tj. konzistentna mjerenja kroz uzorke koji su bili testirani.

Hasan i sur. (2015.) proveli su istraživanje na 80 uzoraka kolostruma krmače, od nultog do četvrtog sata nakon prvog oprasenog praseta. Svježi uzorci kolostruma analizirani su nedugo nakon skupljanja na farmi digitalnim refraktometrom, u ovom slučaju Brix refraktometrom. Ostatak uzoraka zamrznut je, te se kasnije analizirao ELISA metodom. Prosjek rezultata dobivenih Brix refraktometrom bio je $25,1 \pm 3,01$, dok je koncentracija imunoglobulina izmjerena ELISA metodom bila $66,74 \pm 22,94$ mg/ml. Postotak rezultata izmjerenih Brix refraktometrom visoko je povezan s koncentracijom imunoglobulina analiziranih ELISA metodom ($r = 0,71$). Zaključak istraživanja je da su Brixovi refraktometri daju brze i pouzdane podatke, cjenovno su pristupačni i moguće ih je koristiti na farmama neposredno nakon skupljanja uzoraka.

2.6. Metoda radijalne imunodifuzije

Radijalna imunodifuzija (RID) ili Mancini postupak je metoda za dokazivanje i mjerenje različitih proteina, koja se temelji na precipitacijskoj reakciji između antigena i antitijela (Berne, 1974.). U uzorku koji sadrži antitijelo dodaje se agar otopljen fiziološkom otopinom. Potom se uzorak izlije u petrijevu zdjelicu te se ostavi da se ohladi i formira u gel (Berne, 1974.). U agar se stavlja antiserum koji utječe na osjetljivost aktivacije. Antigen difundira iz jažica izrezane u gelu u koje se ravnomjerno raspodjeljuje antiserum (Berne, 1974). U početku je koncentracija antigena visoka i nastaju topljivi antigen-antitijelo adukti. Kako antigen difundira dalje od jažice, kompleks antigen-antitijelo reagira s većom količinom antitijela, što utječe na stvaranje prstenova na gelu (Davis i Ho, 1976). Prstenovi antigena se potom koriste za konstrukciju kalibracijskog dijagrama. Koncentracije antigena

nepoznatih uzoraka, koje su također nastale na gelu mogu se izmjeriti na temelju promjera percipitirajućih prstenova (Davis i Ho, 1976.).



Slika 6. Radijalna imunodifuzija

(Izvor: <http://biosiva.50webs.org/agab.htm>)

Gelsing i sur. (2015.) uspoređivali su RID i ELISA metodu. Cilj im je bio usporediti koncentracije imunoglobulina izmjerene objema metodama u uzorcima kolostruma goveda prije i nakon termičke obrade te u plazmi. Kolostrum je testiran prije i nakon toplinske obrade na 60 °C kroz 30 min. Utvrđena je slaba korelacija između ELISA i RID rezultata u plazmi i kolostrumu (koji nije grijan). Koncentracija imunoglobulina bila je značajno niža u svim uzorcima izmjerenih ELISA metodom u usporedbi s RID metodom. Koncentracija imunoglobulina značajno se smanjila nakon toplinske obrade mjerena ELISA metodom, dok mjerenjem RID metodom nije bilo značajnog utjecaja. Vrijednosti dobivene prije i nakon toplinske obrade pokazale su promjene u matriksu proteina kolostruma zbog djelovanja topline primjenom ELISA i RID metoda.

Ameri i Wilkerson (2008.) uspoređivali su dva komercijalna RID testa, VET-RID (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas SAD) i SRID (VMRD Inc., Pullman, Washington, SAD). Prikupili su 30 uzoraka krvi od novorođene teladi Holstein pasmine neposredno nakon teljenja te 24 h nakon posisanog kolostruma. Rezultati dobiveni VET-RID kitom bili su bliže očekivanim koncentracijama dok su rezultati dobiveni SRID prelazili očekivane koncentraciju imunoglobulina. Bartier i sur. (2015.) proveli su istraživanje na 569

uzoraka kolostruma krava u kojem su usporedili rezultate mjerene Brix refraktometrom s rezultatima radijalne imunodifuzije (RID). Za izračun rezultata dobivenih podataka korišten je Spearmanov koeficijent korelacije. Prema RID analizi 29,1 % uzoraka kolostruma sadržavalo je 50 mg/mL IgG. Koncentracije imunoglobulina kretale su se od 8,3 do 128,6 mg/L IgG. Krave koje su imale tri i više laktacija imale su i već broj kolostralnih imunoglobulina ($69,5 \pm 1,98$ mg/mL) od krava s dvije laktacije ($59,80 \pm 2,06$ mg/mL) te krava s jednom laktacijom ($62,2 \pm 1,73$ mg/mL). Dobiveni rezultati kolostrametra bili su u većoj korelaciji s rezultatima RID analize ($r=0,77$) od Brixovih refraktometrijskih podataka ($r=0,64$).



Slika 7. IgG kit test radijalne imunodifuzije

(Izvor: <http://kentlabs.com>)

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Životinje i prikupljanje uzoraka

Istraživanje je provedeno na dvije komercijalne farme (farma A, farma B). Na svakoj farmi je odabrano po 20 plotkinja (krmača i nazimica) od kojih su se tijekom tri razdoblja uzimali uzorci kolostruma (proljeće, ljeto, zima). Uzorci kolostruma su uzimani nulti sat nakon prasenja iz prednjih sisa. Za mjerenje pomoću Brix refraktrometra je uzimano 10 ml uzorka. Istovremeno su uzimani i uzorci za mjerenje metodom radijalne imunodifuzije. Kemijska analiza kolostruma odrađena je pomoću uređaja MilkoScan FT120 (FossElectric). Nakon uzorkovanja kolostrum je pohranjen na -20°C do daljnje analize.

3.2. Analiza Brix refraktrometrom

Za analizu kolostruma pomoću Brix refraktrometra i određivanje sadržaja imunoglobulina uzorci su otapani na sobnoj temperaturi tijekom 12 sati. Kako bi se uzorak homogenizirao lagano ga se okretalo 10-12 puta. Sadržaj suhe tvari i imunoglobulina IgG određen je pomoću digitalnog refraktrometra (HI 96801, Hanna instruments, RI, USA).



Slika 8. Brix refraktrometar HI 96801

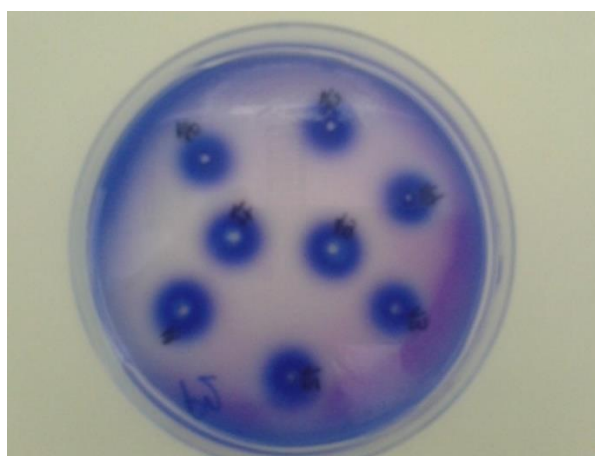
(Izvor: <http://au.rs-online.com>)

Brix refraktrometar radi po principu određivanja ukupne suhe tvari u kolostrumu koja je u korelaciji sa sadržajem imunoglobulina IgG. Udio suhe tvari od 21% odgovara sadržaju >50 g IgG/L imunoglobulina IgG što se smatra početnom točkom kvalitetnog

kolostruma. Prije stavljanja uzoraka u jažicu refraktrometra uređaj smo kalibrirali destiliranom vodom.

3.3. Analiza RID metodom

Početni korak u analizi pomoću metode radijalne imunodifuzije odnosio se na otapanje uzoraka u vodenoj kupelji na 23° C tijekom 8 sati. Nakon potpunog otapanja uzorak se lagano okretao tijekom 5 minuta kako bi se sadržaj epruvete homogenizirao. Analizirani uzorak kolostruma se nakapao u jažicu dok su se u agaroznom gelu pomiješala protutijela za imunoglobuline svinja.



Slika 9. Precipitirajući krug nastao tijekom razdoblja inkubacije
(Izvor: Čuljak, 2016.)

Sljedeći korak uključivao je razdoblje inkubacije u trajanju od 18 h do 24 h tijekom koje su imunoglobulini difundirali u gel te s anti-imunoglobulinima tvorili precipitate. Ukoliko je u serumu više imunoglobulina, precipitacijski krug će biti veći. Nakon završetka stvaranja precipitata pristupa se mjerenju površine precipitacijskog kruga te usporedbi s podacima na baždarnoj krivulji. Baždarna krivulja se načini izračunavanjem površine precipitacijskih krugova koji su nastali između standardnog pripravka anti-imunoglobulina i uzoraka kolostruma s poznatom količinom imunoglobulina.

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću SAS® Stat softvera (SAS® System, License No. 0092661001).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1.1. Kemijski sastav kolostruma

Tablica 5. Kemijski sastav kolostruma na farmi A i B tijekom tri razdoblja mjerenje (I, II, III)

| Parametri | Farma | | Razdoblje | | | Značajnost | | |
|-------------|--------|--------|-----------|--------|--------|------------|-----------|-------|
| | A | B | I | II | III | Farma | Razdoblje | F x R |
| Mast, g | 5,395 | 4,519 | 5,107 | 5,117 | 4,647 | *** | n.s. | n.s. |
| | 0,126 | 0,126 | 0,155 | 0,154 | 0,154 | | | |
| Proteini, g | 15,913 | 15,654 | 15,689 | 16,084 | 15,577 | n.s. | n.s. | *** |
| | 0,164 | 0,164 | 0,198 | 0,197 | 0,200 | | | |
| Laktoza, g | 2,566 | 2,338 | 2,488 | 2,512 | 2,355 | *** | n.s. | ** |
| | 0,049 | 0,049 | 0,061 | 0,061 | 0,061 | | | |
| BST, g | 19,790 | 19,380 | 19,072 | 19,182 | 20,501 | n.s. | n.s. | * |
| | 0,427 | 0,427 | 0,512 | 0,514 | 0,519 | | | |

P *** (P<0.001), ** (P<0.01), * (P<0.05).

BTS – bezmasna suha tvar

F x R – interakcija farma x razdoblje

Tablicom 5 je prikazan udio masti, proteina, laktoze i bezmasne suhe tvari (BST) u kolostrumu na farmi A i B tijekom tri razdoblja uzorkovanja. Udio masti tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama A i B kretao se od 4,519 % do 5,395 % na obje farme dok je najniži udio zabilježen tijekom trećeg razdoblja mjerenja. Što nam ukazuje da na sadržaja masti u kolostrumu utječe redosljed laktacije te dob krmače. Statistički značajan utjecaj na sadržaj masti u kolostrumu imala je farma (P<0.001).

Udio proteina tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama A i B kretao se od 15,654 % do 15,913 % na obje farme, dok je najniži udio zabilježen tijekom trećeg razdoblja

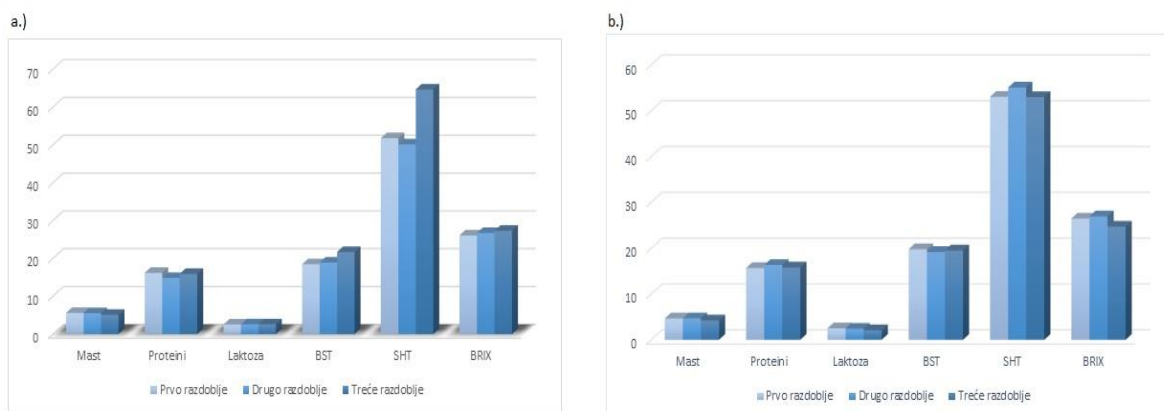
mjerenja. Ukupan sadržaj bjelančevina opada s porastom broja laktacija. Nije utvrđen statistički značaj na sadržaj proteina u kolostrumu na farmama.

Udio laktoze tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama A i B kretao se od 2,338 % do 2,566 % na obje farme, dok je najniži udio zabilježen tijekom trećeg razdoblja mjerenja. Udio laktoze u kolostrumu poprilično je ujednačen. Statistički značajan utjecaj na sadržaj laktoze u kolostrumu imala je farma ($P < 0.001$).

Udio bezmasne suhe tvari tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama A i B kretao se od 19,380 % do 19,790 % na obje farme, dok je najniži udio zabilježen tijekom prvog razdoblja mjerenja. Nije utvrđen statistički značaj na sadržaj bezmasne suhe tvari u kolostrumu na farmama.

Statistički značajan utjecaj interakcije farme i razdoblja mjerenja uočen je za skoro sva promatrana svojstva s izuzećem masti.

Prema Biemann i sur. (2010.) koncentracija imunoglobulina iznad 22 % označava kolostrum s visokim udjelom imunoglobulina, a ujedno je ekvivalentno udjelu od 50 g/L imunoglobulina u kolostrumu. Dobivene vrijednosti utvrđene analizom kolostruma ukazuju na kolostrum zadovoljavajuće kvalitete što može biti posljedica genetskih faktora te dobrog menadžmenta na farmama.



Grafikon 1. Grafički prikaz kemijskog sastava kolostruma tijekom tri razdoblja mjerenja na farmi A (a.) i farmi B (b.)

Grafikonom 1 prikazana je primjena sadržaja masti, proteina, laktoze, bezmasne suhe tvari i suhe tvari na farmi A i B tijekom razdoblja mjerenja.

4.2. Uspješnost BRIX i RID metode za utvrđivanje sadržaja imunoglobulina u kolostrumu

Tablica 6. Udio sadržaja imunoglobulina izmjerenih BRIX i RID na obje farme tijekom tri razdoblja mjerenja

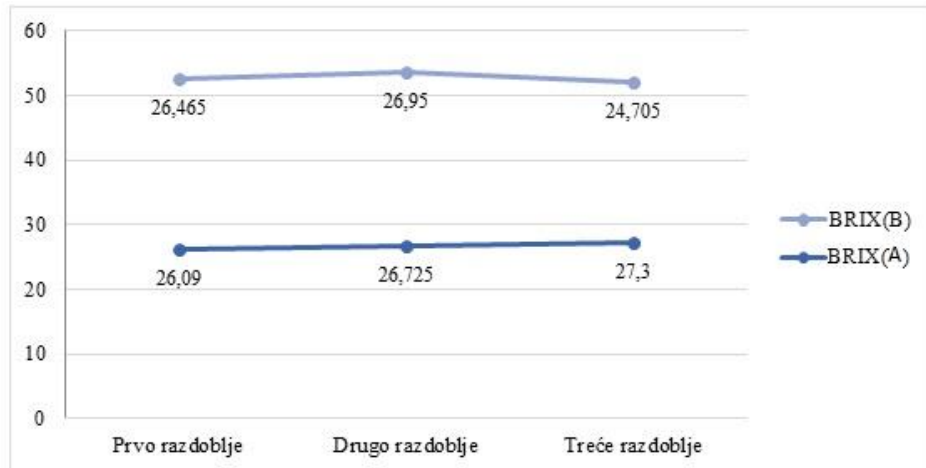
| Parametri | Farma | | Razdoblje | | | Značajnost | | |
|-----------|--------|--------|-----------|--------|--------|------------|-----------|-----|
| | A % | B % | I | II | III | Farma | Razdoblje | FxR |
| RID | 51,117 | 58,120 | 51,880 | 52,558 | 59,419 | *** | *** | *** |
| | 0,608 | 0,608 | 0,745 | 0,741 | 0,744 | | | |
| BRIX | 27,471 | 25,273 | 27,353 | 26,847 | 24,916 | *** | *** | *** |
| | 0,258 | 0,258 | 0,304 | 0,306 | 0,323 | | | |

P *** (P<0.001), ** (P<0.01), * (P<0.05).

F x R – interakcija farma i razdoblje

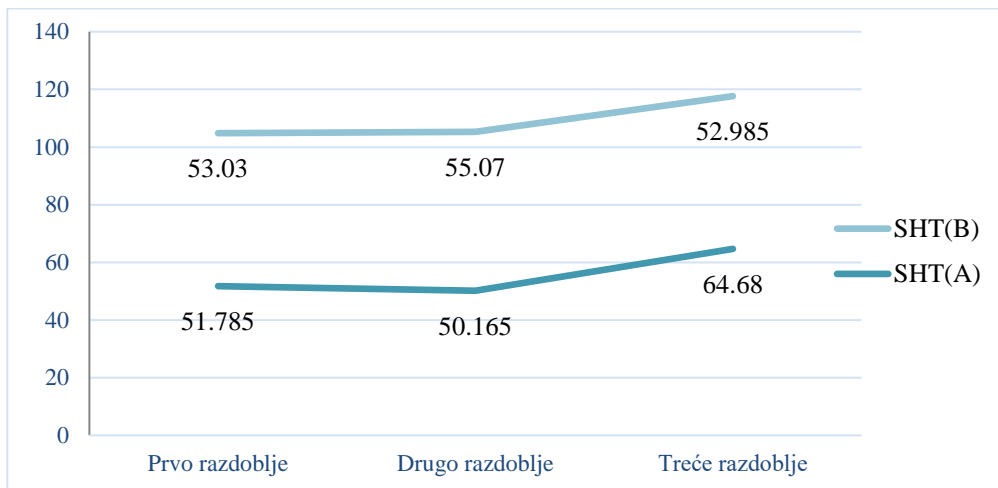
Koncentracija imunoglobulina izmjerene RID metodom kretale su se od 51,117 % (farma A) do 58,120 % (farma B). Najveća koncentracija IgG mjerena tom metodom zabilježena je tijekom trećeg razdoblja mjerenja (59,419 %). Utvrđen je statistički značajan utjecaj farme i razdoblja mjerenja, te njihove interakcije na sadržaj IgG u kolostrumu krmača.

Koncentracija imunoglobulina izmjerene BRIX metodom kretale su se od 25,273 % (farma B) do 27,471 % (farma A). Najveća koncentracija IgG mjerena istom metodom zabilježena je tijekom prvog razdoblja mjerenja (27,353 %). Utvrđen je statistički značajan utjecaj farme i razdoblja mjerenja, te njihove interakcije na sadržaj IgG u kolostrumu krmače.



Grafikon 2. Promjena koncentracije IgG određenih metodom radijalne imunodifuzije (BRIX) na farmama A i B tijekom tri razdoblja uzorkovanja

Grafikon 2. Prikazuje promjenu sadržaja imunoglobulina u kolostrumu krmača tijekom tri razdoblja uzorkovanja na farmama A i B. Tijekom trećeg razdoblja je utvrđen najniži sadržaj IgG na farmi B dok je najviši sadržaj zabilježen tijekom drugog razdoblja uzorkovanja. Nadalje, na farmi A je najviši sadržaj zabilježen također tijekom trećeg razdoblja dok je najniži utvrđen tijekom prvog razdoblja.



Grafikon 3. Promjena koncentracije IgG određenih metodom refraktometrije (RID) na farmama A i B tijekom tri razdoblja uzorkovanja

Grafikon 3. Prikazuje promjenu sadržaja imunoglobulina u kolostrumu krmača tijekom tri razdoblja uzorkovanja na farmama A i B. Tijekom prvog razdoblja utvrđen je

najniži sadržaj IgG na farmi A dok je najviši sadržaj zabilježen tijekom trećeg razdoblja uzorkovanja. Na farmi B najviši sadržaj IgG zabilježen je tijekom drugog razdoblja uzorkovanja dok je najniži utvrđen tijekom trećeg razdoblja uzorkovanja.

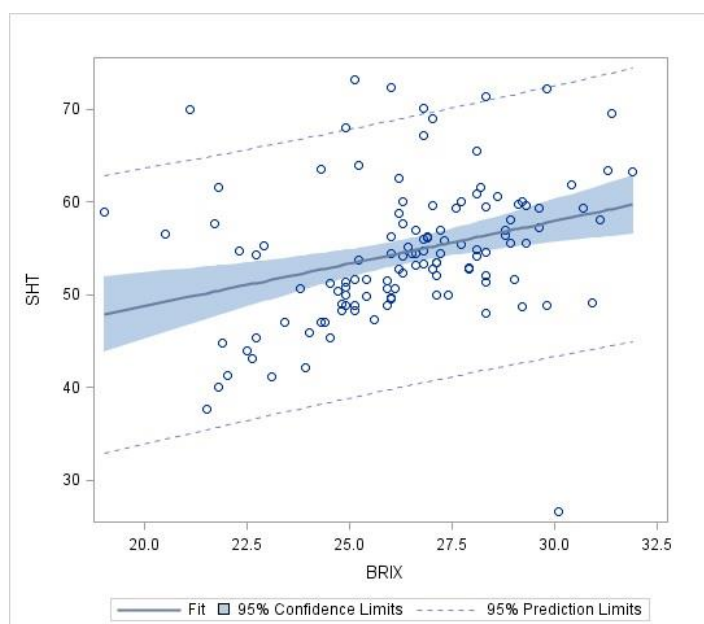
Tablicom 7 je prikazana korelacija između udjela imunoglobulina izmjerenih pomoću metoda radijalne imunodifuzije i refraktometrije. Kako bi se utvrdila korelacija između navedenih metoda, izračunat je koeficijent korelacije (R) te koeficijent determinacije (r^2). Koeficijent korelacije za farmu A bio je 0,5407 dok je za farmu B iznosio 0,2828. Utvrđeni koeficijenti determinacije iznosili su 0,2924 (farma A) te 0,08 (farma B).

Tablica 7. Korelacija između Brix i RID metode

| Farma | R | r^2 | Statistička značajnost |
|---------|--------|--------|------------------------|
| Farma A | 0,5407 | 0,2924 | P<0,001 |
| Farma B | 0,2828 | 0,08 | P<0,001 |

*R= koeficijent korelacije; r^2 = koeficijent determinacije

Regresijski pravac udjela imunoglobulina određenih metodama radijalne imunodifuzije (RID) i refraktometrije (BRIX) za farmu A i farmu B prikazani su grafikonom 4. Dobiveni rezultati ukazuju na signifikantnu povezanost dvije metode.



Grafikon 4. Regresijski pravac koncentracije IgG određenih BRIX i RID metodama

4.3. RASPRAVA

U našem istraživanju koje smo proveli na dvije farme, s dva različita hibridna programa, uzeti su uzorci kolostruma u tri različita razdoblja (proljeće, ljeto, zima). Udio masti tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama kretao se od 4,519 % do 5,395 % na obje farme dok je najniži udio zabilježen tijekom trećeg razdoblja mjerenja. Udio proteina tijekom razdoblja na farmama kretao se od 15,654 % do 15,913 % na obje farme, dok je najniži zabilježen tijekom trećeg razdoblja mjerenja. Udio laktoze tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama kretao se od 2,338 % do 2,566 % na obje farme, dok je najniži udio zabilježen tijekom trećeg razdoblja mjerenja. Udio bezmasne suhe tvari tijekom razdoblja uzorkovanja na farmama kretao se od 19,380 % do 19,790 % na obje farme, dok je najniži udio zabilježen tijekom prvog razdoblja mjerenja.

Klobasa i sur. (1987.) u svom su istraživanju naveli da nakon prasenja kolostrum sadrži 24,0 % suhe tvari, 11,2 % proteina, 5,0 % masti i 3,20 % laktoze.

Aguinaga i sur. (2011.) u svom su istraživanju naveli da nakon prasenja kolostrum sadrži 22,6 % suhe tvari, 15,8 % proteina, 3,76 % masti i 2,34 % laktoze.

Balzani i sur. (2015.) proveli su istraživanje gdje su uzimali uzorke kolostruma od 124 krmače, vrijeme uzorkovanja podjelili su u tri kategorije: uzorci prikupljeni prije početka prasenja (9 sati prije), uzorci prikupljeni tijekom prasenja te uzorci prikupljeni 14 sati nakon prasenja. ANOVA testom pokazali su da temperatura skladištenja nije utjecala na Brixov postotak IgG u kolostrumu ($P > 0,05$). Rezultati ANOVE pokazuju značajan utjecaj vremena uzorkovanja na koncentraciju imunoglobulina kolostruma, mjereno s Brix refraktometrom i RID metodom (Brix $P < 0,003$; RID $P < 0,05$). Koncentracija IgG izmjerena RID metodom kreće se od 13,27 do 35,08 mg/L. Pearsonov koeficijent korelacije pokazao je da je postotak Brixovih rezultata pozitivno koreliran ($r = 0,56$, $P < 0,001$) s RID rezultatima (regresijska jednačba: $RID = 1.01 (\pm 0.2) Brix - 1.94 (\pm 5.66)$; $R^2 = 0.31$). Rezultati ove studije ukazuju da Brixov refraktometar omogućuje brzu i jeftinu procjenu IgG u kolostrumu krmača.

Hasan i sur. (2016.) proveli su istraživanje gdje su procjenjivali IgG u krmačinom kolostrumu pomoću Brixovog refraktometra te su dobivene rezultate usporedili s rezultatima IgG u krmačinom kolostrumu primjenom ELISA metode. Koncentracije IgG u kolostrumu u prosjeku su bile $52,03 \pm 30,70$ mg/ml (srednje vrijednosti) od 0 do 3 sata nakon prasenja. Koncentracija IgG u prosjeku se smanjila za 50% tijekom prvog dana laktacije ($P < 0,01$).

U našem istraživanju koncentracija imunoglobulina izmjerene BRIX metodom kretale su se od 25,273 % do 27,471 % . Najveća koncentracija IgG mjerena istom metodom zabilježena je tijekom prvog razdoblja mjerenja (27,353 %). Utvrđen je statistički značajan utjecaj farme i razdoblja mjerenja, te njihove interakcije na sadržaj IgG u kolostrumu krmače. Koncentracija imunoglobulina izmjerene RID metodom kretale su se od 51,117 % do 58,120 % . Najveća koncentracija IgG mjerena tom metodom zabilježena je tijekom trećeg razdoblja mjerenja (59,419 %). Utvrđen je statistički značajan utjecaj farme i razdoblja mjerenja, te njihove interakcije na sadržaj IgG u kolostrumu krmča. Koeficijent korelacije za farmu A bio je 0,5407 dok je za farmu B iznosio 0,2828. Utvrđeni koeficijenti determinacije iznosili su 0,2924 te 0,08.

Bielmann i sur. (2010.) u svome radu navode da koncentracija imunoglobulina iznad 22 % označava kolostrum s visokim udjelom imunoglobulina, a ujedno je ekvivalentno udjelu od 50 g/L imunoglobulina u kolostrumu.

5. ZAKLJUČAK

Upotrebom refraktometra, procjena kvalitete kolostruma može se obaviti odmah na farmi, nakon prasnja.

RID vrijednosti u našem istraživanju mjerenja koncentracije imunoglobulina kreću se od 51,117 % do 58,120 %. Najveća koncentracija IgG mjerena RID metodom zabilježena je tijekom trećeg razdoblja mjerenja (59,353 %).

Utvrđene Brix vrijednosti u kolostrumu krmače kretale su se od 25,273 % do 27,471 %. Najveća koncentracija IgG mjerena Brix-om zabilježena je tijekom prvog razdoblja (27.471 %).

Koeficijent korelacije za farmu A bio je viši te je iznosio je 0,5407 dok je za farmu B bio nizak te je iznosio 0,2828. Utvrđeni koeficijenti determinacije iznosili su 0,2924 (farma A) te 0,08 (farma B).

6. LITERATURA

1. Aguinaga, M. A., Gómez-Carballar, F., Nieto, R., Aguilera, J. F. (2011.): Production and composition of Iberian sow's milk and use of milk nutrients by the suckling Iberian piglet. *Animal*. 5 (9): 1390-1397.
2. Ameri, M., Wilkerson, M.J. (2008): Comparison of two commercial radial immunodiffusion assays for detection of bovine immunoglobulin G in newborn calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(3): 333-336.
3. Babić, K., Herak, M., Tušek, T. (2003.): *Anatomija i fiziologija domaćih životinja*; Tisak, Zrinski d.d. Čakovec
4. Balzani, A., Cordell, HJ., Edwards, SA. (2015.): Evaluation of an on-farm method to assess colostrum IgG content; *Animal*, page 1 of 6 © The Animal Consortium
5. Barrington, G.N., McFadden, T.B., Huyler, M.T., Besser, T.E. (2001): Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livestock Production Science*, 70: 95-104.
6. Bartier, A.L., Windeyer, M.C., Doepel, L. (2015.): Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement; *J. Dairy Sci.* 98 :1–7
7. Berne, B. H. (1974.): Differing methodology and equations used in quantitating immunoglobulins by radial immunodiffusion — a comparative evaluation of reported and commercial techniques" ; *Clinical Chemistry. U.S.A.* 20 (1): 61–69.
8. Biemann, V., Gillan, J., Perkins, N.R., Skidmore, A.L., Godden, S., Leslie, K.E. (2010.): An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle; *J. Dairy Sci.* 93:3713-3721
9. Božanić, R. (2004): Važnost i korištenje kolostruma. *Mljekarstvo*, 54(3): 209-224.
10. Božić, F. (2006.): Imunost mladunčadi, dostupno na <https://veterina.com.hr/?p=16253>
11. Budimir, K., Margeta, V., Čuljak, V., Margeta, P. (2014.): Utjecaj okolišnih i genetskih čimbenika na promjenu sastava kolostruma nakon prasenja; 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture, Croatia
12. Cabrera, R. A., Boyd, R. D., Jungst, S. B., Wilson, E. R., Johnston, M. E., Vignes, J. L., Odle, J. (2010.): Impact of lactation length and piglet weaning weight on long-term growth and viability of progeny. *Journal of Animal Science*. 88: 2265-2276.
13. Csapo, J., Martin, TG., Csapo-Kiss, ZS., Hazas, Z. (1996.): Protein, fats, vitamin and mineral *Dairy Journal*. 6:881–902.

14. Čuljak, V. (2016.): Utjecaj sadržaja imunoglobulina G (IgG) na zdravstveni status i proizvodna svojstva prasadi do odbića; doktorska disertacija
15. Davis, N.C., Ho, M. (1976.): Radial immunodiffusion manual of clinical immunology; chapter 2: Quantitation of immunoglobulins; Washington DC: American society for microbiology
16. Devillers, N., Farmer, C., Le Dividich J., Prunier, A. (2007.): Variability of colostrum yield and colostrum intake in pigs; *Animal*, 1:7, pp 1033–1041 & The Animal Consortium
17. Dewey, C.E., Gomes, T., Richardson, K. (2008): Field trial to determine the impact of providing additional care to litters on weaning weight of pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 72: 390–395.
18. Eliasson, C., Isberg, S. (2011.): Production and composition of sow milk; available at https://stud.epsilon.slu.se/3754/1/eliasson_et_al_111231.pdf
19. Famer, C., Devileras, N., Rooke, J.A., Le Dividich J. (2006.): Colostrum production in swine: from the mammary glands to the piglets; *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, No. 003
20. Farmer, C., Quesnel, H. (2008): Nutritional, hormonal, and environmental effects on colostrum in sows. *Journal of Animal Science*, 87: 56-64
21. Fries, A.E., Sinowatz, F., Skolek – Winnisch, R., Trautner, W. (1980.): The placenta of the pig; *Anatomy and embryology*; 179 – 191
22. Gelsinger, S.L., Smith, A.M., Jones C.M., Heinrichs, A.J. (2015.): Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma; *Journal of Dairy Science*, 98(6): 4084-4089.
23. Girard, J. (1986): Gluconeogenesis in late fetal and early neonatal life. *Neonatology*, 50(5): 237-258.
24. Hartmann, P. E. and Holmes, M. A. 1989. Sow lactation. In: *Manipulating Pig Production II. Proceedings of the Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association (A.P.S.A.)*
25. Hasan, SMK., Junnikkala, S., Valros, A., Peltoniemi, O., Oliviero, C. (2016.): Validation of Brix refractometer to estimate colostrum immunoglobulin G content and composition in the sow; *Animal*, page 1 of 6 © The Animal Consortium
26. Hasan, S., Junnikkala, S., Valros, A., Peltoniemi, O. (2015.): Use of Brix refractometer to evaluate colostrum IgG content at farm level; 7th European Symposium of Porcine Health Management

27. Hemsworth, P. H., Winfield, C. G., Mullaney, P. D. (1976.): A study of development of the teat order in piglets. *Applied Animal Ethology*. 2: 225-233.
28. Hurley, WL. (2018.): Composition of sow colostrum and milk; Chantal Farmer (ed.) *The gestating and lactating sow* 193
29. Hurley, WL., Bryson, JM. (1999.): Enhancing sow productivity through an understanding of mammary gland biology and lactation physiology. *Pig News and Information*. ;20:125N–130N.
30. Janeway, C. (2001.): *Immunobiology* (5th ed); Garland Publishing
31. Klobasa, F., Werhahn, E., Butler, J. E. (1987.): Composition of Sow Milk During Lactation. *Journal of Animal Science*. 64: 1458-1466.
32. Kralik, G., Kušec, G., Kralik, D., Margeta, V. (2007): Svinjogojstvo – biološki i zootehnički principi. *Tisak Grafika Osijek*, str. 19-368.
33. Le Dividich, J., Rooke, J. A., Herpin, P. (2005.): Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *Journal of Agricultural Science*. 143: 469-485.
34. Lin, C., Mahan, DC., Wu, G., Kim, SW. (2009.): Protein digestibility of porcine colostrum by neonatal pigs; *Livestock Science*
35. Peaker, M., (1983.): Secretion of ions and water. In: Mepham, T.B. (ed.) *Biochemistry of lactation*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp. 285-305.
36. Quesnel, H., Farmer, C., Devillers, N. (2012.): Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livest. Sci*. 146:105–114
37. Quesnel, H., Farmer, C., Theil, P.K. (2014.): Colostrum and milk production; *The gestating and lactating sow*; 173 – 192
38. Quigley, J.D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., Polo, J. (2013.): Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum; *Journal of Dairy Science*, volume 96, issue 2, pages 1148 - 1155
39. Rooke, J. A., Bland, I. M. (2002.): The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*. 78: 13-23.
40. Uremović, Z., Uremović, M. (1997): *Svinjogojstvo*. Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
41. Theil, PK., Lauridsen, C., Quesnel, H. (2014.): Neonatal piglet survival: impact of sow nutrition around parturition on foetal glycogen deposition, and production and composition of colostrum and transient milk. *Animal* 8: 1021-1030.

42. Theil, PK., Hurley, WL. (2013.): The protein component of sow colostrum and milk; dostupno na cdn.intechopen.com/pdfs/50445.pdf
43. <https://extension.psu.edu/colostrum-management-tools-hydrometers-and-refractometers> (pristupljeno 25.8.2019.)

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je usporediti metodu radijalne imunodifuzije i refraktometrije u postupcima za određivanje koncentracije imunoglobulina u krmačinom kolostrumu te njihovu primjenu na farmama; utvrditi količinu imunoglobulina tijekom tri mjerna razdoblja. Istraživanje je provedeno na dvije komercijalne farme (farma A, farma B). Na svakoj farmi je odabrano po 20 plotkinja (krmača i nazimica) od kojih su se tijekom tri razdoblja uzimali uzorci kolostruma (proljeće, ljeto, zima). Uzorci kolostruma su uzimani nulti sat nakon prasenja iz prednjih sisa. Za mjerenje pomoću Brix refraktometra je uzimano 10 ml uzorka. Istovremeno su uzimani i uzorci za mjerenje metodom radijalne imunodifuzije. Za analizu kolostruma pomoću Brix refraktometra i određivanje sadržaja imunoglobulina uzorci su otapani na sobnoj temperaturi tijekom 12 sati. Kako bi se uzorak homogenizirao lagano ga se okretalo 10-12 puta. Sadržaj suhe tvari i imunoglobulina IgG određen je pomoću digitalnog refraktometra (HI 96801, Hanna instruments, RI, USA). Usporedivši dvije metode koje smo koristili, zaključili smo da upotrebom Bix refraktometra možemo na brz i lagan način odvojiti kvalitetan od nekvalitetnog kolostruma. Kako je Brix refraktometar jednostavan za korištenje, jeftin, manje osjetljiv na temperaturu, čvršći je, pogodniji je za korištenje na farmama. . Upotrebom Brix refraktometra, procjena kvalitete kolostruma može se obaviti odmah na farmi, nakon prasenja.

8. SUMMARY

The aim of this study was to compare the method of radial immunodiffusion and refractometry in the methods for determining the concentration of immunoglobulins in colostrum and for their application on the farms; determine the amount of immunoglobulin over the three measurement periods. The study was conducted on two commercial farms (farm A, farm B). On each farm, we selected 20 plots (sows and gilts), of which were taken colostrum samples over the three periods (spring, summer, winter). Colostrum samples were taken from zero hour after giving birth from front tits. 10 ml of the sample was taken for Brix refractometer measurements. At the same time, we also took samples for radial immunodiffusion measurements. For colostrum analysis with Brix refractometer and determination of immunoglobulin content, samples were dissolved at the room temperature for 12 hours. In order to homogenize the sample, it was gently rotated 10-12 times. The dry matter and immunoglobulin content (IgG) were determined using digital refractometer (HI 96801, Hanna instruments, RI, USA). Comparing these two methods we used, we concluded that using Brix refractometer we can quickly and easily separate high quality from low quality colostrum. As the Brix refractometer is easy to use, inexpensive, less temperature sensitive, it's firmer, more convenient for farm use. Using a Brix refractometer, an assessment of the colostrum quality can be done immediately on the farm, after giving birth.

9. POPIS TABLICA

| Broj tablice | Naziv tablice | Str. |
|---------------------|---|-------------|
| Tablica 1. | Razlike u sastavu kolostruma i mlijeka kod krmača | 6 |
| Tablica 2. | Kemijski sastav krmačinog kolostruma | 7 |
| Tablica 3. | Prirast novorođene prasadi u prva tri dana sisanja | 7 |
| Tablica 4. | Koncentracija IgG i aminokiselina u krvnoj plazmi prasadi stare tri dana | 8 |
| Tablica 5. | Kemijski sastav kolostruma na farmi A i B tijekom tri razdoblja mjerenje | 19 |
| Tablica 6. | Udio sadržaja imunoglobulina izmjerenih BRIX i RID na obje farme tijekom tri razdoblja mjerenja | 21 |
| Tablica 7. | Korelacija između Brix i RID metode | 23 |

10. POPIS SLIKA

| Broj slike | Naziv slike | Str |
|-------------------|--|------------|
| Slika 1. | Prasad tijekom prvih par sati nakon prasenja | 3 |
| Slika 2. | Presjek mliječne žlijezde krmače | 4 |
| Slika 3. | Strukture imunoglobulina | 11 |
| Slika 4. | Kolostrometar | 12 |
| Slika 5. | Digitalni Brix refraktometar | 13 |
| Slika 6. | IgG kit test radijalne imunodifuzije | 15 |
| Slika 7. | Radijalna imunodifuzija | 16 |
| Slika 8. | Brix refraktrometar HI 96801 | 17 |
| Slika 9. | Precipitirajući krug nastao tijekom razdoblja inkubacije | 18 |

11. POPIS GRAFIKONA

| Broj grafafikona | Naziv grfikona | Str. |
|-------------------------|--|-------------|
| Grafikon 1. | Grafički prikaz kemijskog sastava kolostruma tijekom tri razdoblja mjerenja na farmi A (a.) i farmi B (b.) | 20 |
| Grafikon 2. | Promjena koncentracije IgG određenih metodom radijalne imunodifuzije (BRIX) na farmama A I B tijekom tri razdoblja uzorkovanja | 22 |
| Grafion 3. | Promjena koncentracije IgG određenih metodom refraktrometrije (RID) na farmama A i B tijekom tri razdoblja uzorkovanja | 22 |
| Grafikon 4. | Regresijski pravac koncentracije IgG određenih BRIX i RID metodama | 23 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehnički znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij Zootehnika, smjer Specijalna zootehnika

Diplomski rad

Usporedba metoda radijalne imunodifuzije i refraktometrije za održavanje sadržaja
imunoglobulina (IgG) u kolostrumu krmača

Antonela Špehar

Sažetak: Cilj istraživanja bio je usporediti metodu radijalne imunodifuzije i refraktometrije u postupcima za određivanje koncentracije imunoglobulina u krmačinom kolostrumu te njihovu primjenu na farmama; utvrditi količinu imunoglobulina tijekom tri mjerna razdoblja. Istraživanje je provedeno na dvije komercijalne farme (farma A, farma B). Na svakoj farmi je odabrano po 20 plotkinja (krmača i nazimica) od kojih su se tijekom tri razdoblja uzimali uzorci kolostruma (proljeće, ljeto, zima). Uzorci kolostruma su uzimani nulti sat nakon prasnja iz prednjih sisa. Za mjerenje pomoću Brix refraktometra je uzimano 10 ml uzorka. Istovremeno su uzimani i uzorci za mjerenje metodom radijalne imunodifuzije. Usporedivši dvije metode koje smo koristili, zaključili smo da upotrebom Bix refraktometra možemo na brz i lagan način odvojiti kvalitetan od nekvalitetnog kolostruma. Kako je Brix refraktometar jednostavan za korištenje, jeftin, manje osjetljiv na temperaturu, čvršći je, pogodniji je za korištenje na farmama. . Upotrebom Brix refraktometra, procjena kvalitete kolostruma može se obaviti odmah na farmi, nakon prasnja.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: dr. sc. Kristina Gvozdanović

Broj stranica: 31

Broj grafikona i slika: 13

Broj tablica: 7

Broj literaturnih navoda: 43

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: krmača, kolostrum, imunoglobulini (IgG), refraktometrija, radijalna imunodifuzija

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc. dr. sc. Vladimir Margeta, predsjednik
2. dr. sc. Kristina Gvozdanović, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, član

Rad je pohranjen: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Animal Science**

Graduate thesis

Comparison of radial immunodiffusion method and refractometry in assessing of immunoglobulin (IgG) in sows colostrum

Antonela Špehar

Abstract: The aim of this study was to compare the method of radial immunodiffusion and refractometry in the methods for determining the concentration of immunoglobulins in colostrum and for their application on the farms; determine the amount of immunoglobulin over the three measurement periods. The study was conducted on two commercial farms (farm A, farm B). On each farm, we selected 20 plots (sows and gilts), of which were taken colostrum samples over the three periods (spring, summer, winter). Colostrum samples were taken from zero hour after giving birth from front tits. 10 ml of the sample was taken for Brix refractometer measurements. At the same time, we also took samples for radial immunodiffusion measurements. Comparing these two methods we used, we concluded that using Brix refractometer we can quickly and easily separate high quality from low quality colostrum. As the Brix refractometer is easy to use, inexpensive, less temperature sensitive, it's firmer, more convenient for farm use. Using a Brix refractometer, an assessment of the colostrum quality can be done immediately on the farm, after giving birth.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: dr. sc. Kristina Gvozdanović

Number of pages: 31

Number of figures: 13

Number of tables: 7

Number of references: 43

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: sow, colostrum, immunoglobulin (IgG), refractometry, radial immunodiffusion

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. doc.dr. sc. Vladimir Margeta, chairman
2. dr. sc. Kristina Gvozdanović, mentor
3. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek